

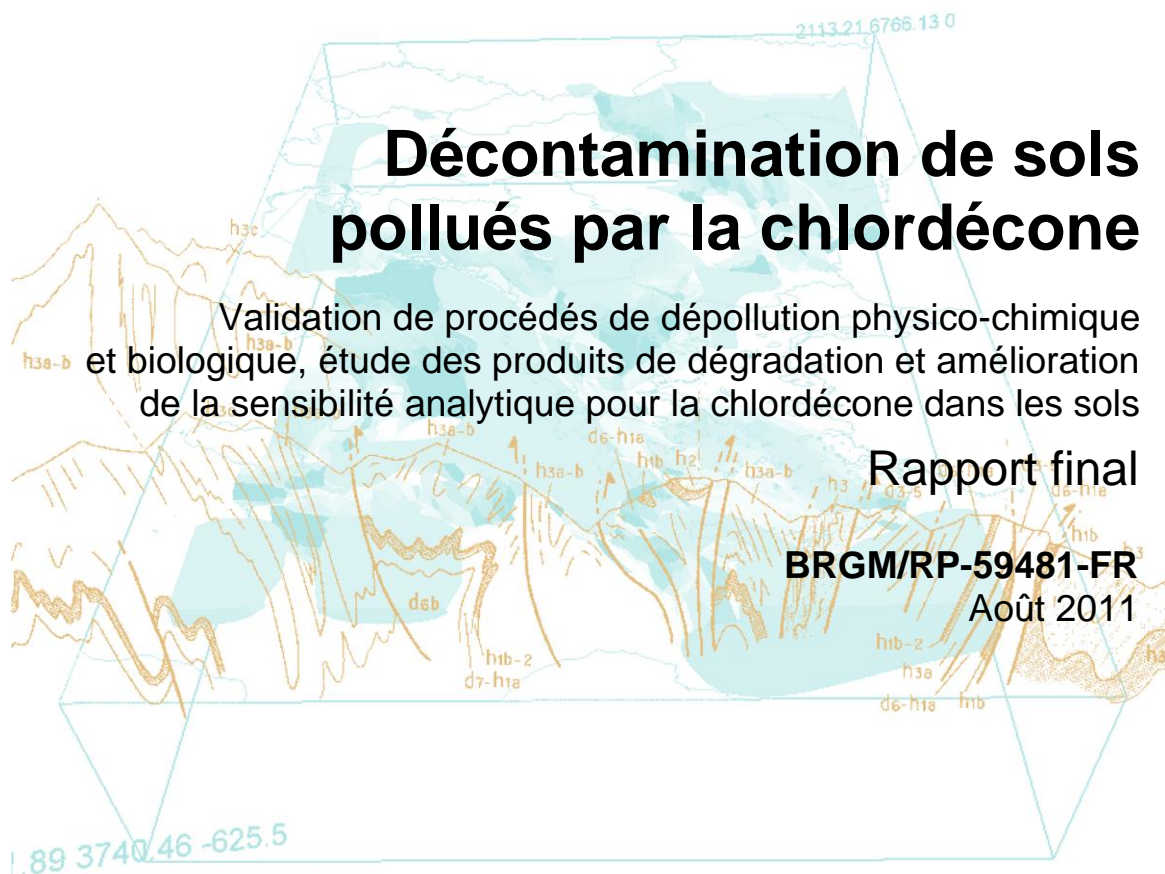


Décontamination de sols pollués par la chlordécone

Validation de procédés de dépollution physico-chimique et biologique, étude des produits de dégradation et amélioration de la sensibilité analytique pour la chlordécone dans les sols

Rapport final

BRGM/RP-59481-FR
Août 2011



Décontamination de sols pollués par la chlordécone

Validation de procédés de dépollution physico-chimique et biologique, étude des produits de dégradation et amélioration de la sensibilité analytique pour la chlordécone dans les sols

Rapport final

BRGM/RP-59481-FR

Août 2011

Étude réalisée dans le cadre des opérations de Service public du BRGM 2009 10POLA27 correspondant à la convention BRGM-MEEDDM n° SU 000 6693 MEEDDM/DGPR relative à la décontamination de sols pollués par la chlordécone

M.C. Dictor, A. Mercier, L. Lereau, L. Amalric, S. Bristeau, C. Mouvet
Avec la collaboration de
P. Auger, E. Béchu, D. Breeze, S. Touzelet, H. Tris, B. Henry

<p>Vérificateur :</p> <p>Nom : Garrido F.</p> <p>Date : 10/08/2011</p> <p>Signature : </p>

<p>Approbateur :</p> <p>Nom : Gaboriau H.</p> <p>Date : 12/08/2011</p> <p>Signature : </p>
--

En l'absence de signature, notamment pour les rapports diffusés en version numérique, l'original signé est disponible aux Archives du BRGM.

Le système de management de la qualité du BRGM est certifié AFAQ ISO 9001:2008.

Mots clés : Chlordécone, Andosol, Nitisol, Ferralsol, Remédiation, Décontamination, ISCR, Daramend, Compost, GC/MS.

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

Dictor M.C., Mercier A., Lereau L., Amalric L., Bristeau S., Mouvet C., avec la collaboration de **Auger P., Béchu E., Breeze D., Touzelet S., Tris H. et Henry B.** (2011) – Décontamination de sols pollués par la chlordécone. Validation de procédés de dépollution physico-chimique et biologique, étude des produits de dégradation et amélioration de la sensibilité analytique pour la chlordécone dans les sols. Rapport final. BRGM/RP-59481-FR, 201 p., 70 fig., 42 tabl., 6 ann.

Synthèse

Le Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement durable et de la Mer a mandaté le BRGM, par la convention SU 000 6693 MEEDDM/DGPR, pour travailler sur la décontamination de sols antillais pollués par la chlordécone en : i) validant une méthode analytique avec amélioration de la sensibilité pour la chlordécone dans les sols, ii) testant la validité de deux procédés de dépollution physico-chimique et biologique, iii) étudiant des produits de dégradation formés lors de la mise en œuvre des procédés, ces trois aspects devant être étudiés dans les trois principaux types de sols antillais (andosol, nitisol, ferralsol).

Les développements analytiques ont été effectués à partir des trois types de sols utilisés dans les expériences de dépollution. La méthode développée fait appel à une extraction à chaud sous pression (Accelerated Solvent Extraction) avec l'ajout d'un traceur (le trans-nonachlore) pour déterminer les rendements d'extraction, dont il est tenu compte pour corriger les résultats. Les extraits, auxquels sont ajoutés la chlordécone-¹³C et le chlorobiphényle 53 comme étalons internes, sont analysés par un chromatographe en phase gazeuse avec un détecteur de spectrométrie de masse triple quadripôle. La limite de quantification instrumentale pour la chlordécone est de 0,05 mg/kg. En outre, les paramètres suivants de la méthode analytique ont été quantifiés : fonction d'étalonnage, répétabilité, reproductibilité, efficacité de l'extraction, spécificité, et incertitudes. La mono-hydrochlordécone (5b-hydrochlordécone) peut également être quantifiée ; la di-hydrochlordécone peut être identifiée par son spectre de masse inclus dans la bibliothèque de spectres mais ne peut être quantifiée, faute d'étalon analytique. De fortes interférences analytiques ont été observées dans les échantillons traités par les procédés de remédiation ; il s'agit très probablement d'effets induits par les fortes teneurs en matières organiques ajoutées aux sols par les procédés étudiés. La résolution de ces problèmes nécessite l'emploi de la chlordécone-¹³C.

Des échantillons guadeloupéens d'andosol, de nitisol et de ferralsol contaminés en chlordécone ont été utilisés pour des expériences de dépollution en laboratoire à Orléans dans des mésocosmes à l'échelle pilote (entre 80 et 120 kg en poids frais, pour des volumes d'environ 80-120 litres par mésocosme, chiffres variables selon le type de sol). Ces mésocosmes ont été soumis à deux procédés industriels de décontamination, *In Situ* Chemical Reduction (ISCR) avec ajout de l'amendement Daramend[®], et ajout de compost à différentes doses avec ou sans alternance de phase anaérobie et aérobie. Les procédés ont été mis en œuvre pendant six mois, avec des prélèvements répartis à différents moments qui ont servi à un suivi physico-chimique (Eh, T°, teneur en eau, oxygène des gaz des sols), aux mesures de chlordécone et ses deux dérivés déchlorés connus, et à l'étude de divers paramètres microbiologiques (biomasses, activités, structure génétique des communautés).

Le procédé d'ISCR implique à chaque début de cycle l'ajout d'amendement Daramend[®] (60-80 % de matière organique végétale et 20-40 % de fer zéro valent microscopique) à raison de 2 % en poids sec du sol à traiter. Un cycle est constitué de

trois semaines de conditions de potentiel d'oxydo-réduction négatif (- 300 mV par rapport à l'Electrode Normale à Hydrogène), suivies d'une semaine de condition de potentiel d'oxydo-réduction positif (+ 400 - 600 mV par rapport à l'Electrode Normale à Hydrogène). La mise en œuvre du procédé s'est faite en partenariat avec la société détentrice du brevet (Adventus USA) et le partenaire industriel français (Valgo) choisi par Adventus.

Le procédé basé sur l'ajout de compost a eu deux variantes : soit ajout de 114-120 % de compost (Volume compost /Volume de sol auquel le compost est ajouté) et maintien de conditions aérobies, soit 12-14 % de compost ajouté (V/V) et instauration de conditions anaérobies pendant quatre semaines suivies de trois semaines de conditions aérobies. La mise en œuvre s'est faite en partenariat avec la société Biogénie.

Six mois de procédé d'ISCR-Daramend[®] permettent de diminuer de 90 % la teneur initiale en chlordécone du nitisol (passant de $1,1 \pm 0,2$ mg/kg, nombre d'échantillons indépendants analysés, $n = 16$, à $0,10 \pm 0,06$ g/kg, $n = 3$), de 95 % celle du ferralsol (passant de $2,2 \pm 0,5$ mg/kg, $n = 16$, à $0,12 \pm 0,01$ mg/kg, $n = 3$), et de 44 % celle de l'andosol (passant de $13,3 \pm 2,8$ mg/kg, $n = 16$, à $8,72 \pm 0,95$ mg/kg, $n = 3$). Des produits de transformation partiellement déchlorés sont observés ; la mono-hydrochlordécone (5b-hydrochlordécone) est présente au départ dans les trois sols mais elle ne peut être quantifiée que dans l'andosol, et sa concentration n'augmente pas suite au traitement. La dihydrochlordécone, qui ne peut être quantifiée faute d'étalon analytique, n'est détectée que dans les sols traités, jamais dans les témoins non traités. L'évolution du potentiel redox en fonction des cycles successifs d'ajout de Daramend[®] n'est pas ce qui est observé par ISCR dans d'autres types de sols. L'optimum du potentiel de l'ISCR n'a donc probablement pas été atteint et des travaux spécifiques sur le potentiel redox généré par le procédé dans les sols antillais devront être menés pour mieux comprendre comment agit le procédé et envisager son optimisation.

Les travaux consacrés aux activités microbiologiques de l'andosol traité par ISCR-Daramend[®] montrent une stimulation des activités ferri- et sulfato-réductrices après les phases anaérobies des cycles 4 et 6. Par contre, la mesure de l'activité dénitrifiante ne permet pas de conclure s'il y a ou non stimulation. Pour le ferralsol, le traitement Daramend[®] engendre une stimulation des activités dénitrifiante et sulfato-réductrices après les phases anaérobies des cycles 4 et 6. Par contre, l'activité de ferri-réduction n'est que très légèrement stimulée. Pour le nitisol, le traitement Daramend[®] engendre une stimulation des activités dénitrifiante, ferri-réductrice et sulfato-réductrice, essentiellement après la phase anaérobie du cycle 4.

Pour les sols traités par ISCR-Daramend[®], l'approche de biologie moléculaire mise en œuvre directement à partir de l'ADN extrait des sols et purifié selon une procédure développée spécifiquement pour le projet repose sur la technique d'empreinte moléculaire de Capillary Electrophoresis- Polymerase Chain Reaction-Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (CE-PCR-t-RFLP). Les résultats obtenus sur les sols avant traitement montrent que la structure génétique de la communauté bactérienne est spécifique de chaque sol. L'étude plus fine du nitisol montre une

augmentation significative des biomasses microbienne et bactérienne totales dès la fin du premier cycle du procédé ISCR ; les valeurs se stabilisent à la fin du 6^e cycle. Par ailleurs, le procédé ISCR conduit à une nette réduction, progressive, de la complexité de la structure génétique de la communauté bactérienne du nitisol.

Aucun des deux procédés mettant en œuvre du compost ne permet en six mois de diminuer de manière significative et reproductible la teneur initiale en chlordécone d'aucun des trois sols. Aucune formation de mono-hydrochlordécone (5b-hydrochlordécone) et dihydrochlordécone n'est observée. Malgré certaines difficultés à maintenir les conditions anaérobies optimales dans la variante avec alternance de phases anaérobies et aérobies, les analyses physico-chimiques et les dénombrements bactériens indiquent que les conditions réunies étaient proches de l'optimum. L'absence d'effet significatif des deux traitements mettant en œuvre du compost confirme le caractère extrêmement récalcitrant de la chlordécone.

Les perspectives ouvertes par les résultats obtenus sont nombreuses et prometteuses. Un complément de développements analytiques permettra de suivre l'apparition et le devenir pendant le traitement ISCR-Daramend[®] de produits de transformation réduits sans déchloration (chlordécol), et de produits déchlorés de la chlordécone autre que les mono- et di-hydrochlordécone. Des compléments d'étude en microbiologie moléculaire (détection de bactéries spécialisées dans la déchloration réductrice, détection de gènes impliqués dans la dégradation de composés chlorés) permettront de mieux suivre l'évolution des structures génétiques des sols traités. D'un point de vue géochimique, des essais supplémentaires sont prévus pour améliorer le contrôle du potentiel rédox et pour tester l'emploi de matières premières locales (bagasse) en substitut éventuel de la composante végétale du produit commercial Daramend[®]. Enfin, la perspective de tests *in situ* aux Antilles peut être envisagée à court terme : les résultats présentés dans ce rapport méritent en effet d'être confrontés à la réalité du terrain, en prenant évidemment toutes les précautions requises. Ce dernier saut d'échelle permettra à l'horizon de 18-24 mois d'apporter une réponse de base, très argumentée, sur la faisabilité technique de la décontamination par ISCR- Daramend[®] des sols antillais chargés en chlordécone.

Sommaire

1. Introduction	17
1.1. CONTEXTE ET ENJEUX ÉCONOMIQUES, ENVIRONNEMENTAUX ET SOCIÉTAUX LIÉS À LA CHLORDÉCONE.....	17
1.2. POSITIONNEMENT DE L'ÉTUDE.....	18
2. Matériels et Méthodes	21
2.1. PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS DE SOLS DANS LES PARCELLES GUADELOUPÉENNES	21
2.2. CONDITIONNEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SOL AVANT LE LANCEMENT DES EXPÉRIMENTATIONS.....	21
2.3. ANALYSES INITIALES DES SOLS	22
2.4. PROCÉDÉ VALGO/ADVENTUS	22
2.4.1. Opération de mise en anaérobiose et d'ajout de Daramend, et de mesure du potentiel rédox	23
2.4.2. Opération de mise en aérobose et mesure du potentiel rédox	24
2.4.3. Prélèvements des échantillons dans les sols témoins et mesure du potentiel rédox	25
2.4.4. Suivi de la teneur en oxygène des gaz des sols	25
2.4.5. Conditionnement des prélèvements avant analyses	26
2.5. PROCÉDÉS BIOGÉNIE	27
2.5.1. Préparation du compost	27
2.5.2. Conditionnement des sols pour la mise en mésocosmes	27
2.5.3. Environnement des essais expérimentaux.....	29
2.5.4. Simulation de procédé de compostage	29
2.5.5. Simulation de procédé par alternance de phases anaérobie/aérobie	32
2.6. SUIVI ANALYTIQUE : CHLORDÉCONE ET MÉTABOLITES	35
2.6.1. Les substances analysées	35
2.6.2. Méthode d'analyse retenue	39
2.7. SUIVI MICROBIOLOGIQUE DU PROCÉDÉ D'ISCR DARAMEND®	42
2.7.1. Dénombrements bactériens	43
2.7.2. Activité potentielle sulfato-réductrice	45
2.7.3. Activité potentielle ferri-réductrice	45
2.7.4. Activité potentielle dénitrifiante	46
2.7.5. Analyse des communautés microbiennes	46

2.8. SUIVI MICROBIOLOGIQUE DU PROCÉDE BIOGÉNIE	50
3. Résultats et discussions	51
3.1. DÉVELOPPEMENTS ANALYTIQUES	51
3.1.1. Pré-validation	51
3.1.2. Validation	68
3.2. CARACTÉRISATIONS DES SOLS	81
3.2.1. Paramètres physico-chimiques majeurs	81
3.2.2. Teneurs initiales en chlordécone	83
3.2.3. Teneurs en pesticides autres que la chlordécone.....	83
3.3. PROCÉDÉ ISCR DARAMEND MIS EN ŒUVRE AVEC LES SOCIÉTÉS VALGO/ADVENTUS	83
3.3.1. Suivi de la teneur en oxygène dans les gaz des sols	83
3.3.2. Suivi physico-chimique.....	86
3.3.3. Suivi des concentrations en chlordécone, 5b-hydrochlordécone et dihydrochlordécone.....	97
3.3.4. Suivi microbiologique	106
3.3.5. Étude de la structure génétique des communautés bactériennes des trois sols guadeloupéens avant le début de l'application du procédé ISCR.....	117
3.3.6. Étude de la communauté bactérienne du nitisol au cours du procédé ISCR.....	124
3.4. PROCÉDÉS PAR COMPOSTAGE MIS EN ŒUVRE AVEC LA SOCIÉTÉ BIOGÉNIE	130
3.4.1. Traitement par simulation de compostage	130
3.4.2. Traitement par alternance de phases anaérobie/aérobie avec ajout de compost.....	139
4. Conclusions-Perspectives	149
4.1. DÉVELOPPEMENTS ANALYTIQUES	149
4.2. TRAITEMENT PAR ISCR	149
4.3. TRAITEMENT PAR COMPOSTAGE CLASSIQUE ET PAR ALTERNANCE ANAÉROBIE/AÉROBIE AVEC AJOUT DE COMPOST.....	150
4.4. PERSPECTIVES	151
5. Remerciements	153
6. Bibliographie	155

Liste des figures

Figure 1 :	Cadrage dans le temps des différentes options de remédiation pour les différentes matrices (Clostre et al., 2010).	18
Figure 2 :	Schéma récapitulatif des 6 cycles de traitement d'ISCR-Daramend appliqués aux sols de Guadeloupe contaminés par la chlordécone.	23
Figure 3 :	Description de la chaîne de mesure de la teneur en oxygène dans les sols traités.	25
Figure 4 :	Positionnement des sondes à oxygène dans le sol (traitement DARAMEND®).	26
Figure 5 :	Illustration schématique d'un mésocosme.	30
Figure 6 :	Représentation de la chlordécone.....	36
Figure 7 :	Spectre IR de la chlordécone sous sa forme gazeuse.....	38
Figure 8 :	Hydratation d'un composé carbonylé et formation d'un gem-diol (Dupuis, 2005)....	38
Figure 9 :	Chromatogramme GC/MS de la chlordécone, chlordécone-5bhydro, transnonachlore et CB53 à 50 µg/L et du chlordécone C ¹³ à 200 µg/L dans le cyclohexane.....	42
Figure 10 :	Droites d'étalonnage de la CLD obtenues selon les solvants 1 / solvant 2 utilisés pour la préparation des solutions mère et filles et de la gamme d'étalonnage. Pourcentages affichés : % solvant 1 pour chaque niveau de concentration	53
Figure 11 :	Formule du mirex.....	54
Figure 12 :	Formule du transnonachlore.....	55
Figure 13 :	Taux de récupération du CLD avec/sans prise en compte du traceur (TNC).	55
Figure 14 :	Présence de kepol (m/z 220) à 10,3 min après injection d'un extrait de sol contenant du CLD (1,4 mg/kg) et ajout d'un agent protectant (D-sorbitol).	57
Figure 15 :	Influence de la matrice sur l'aire des standards interne CB53 et CLD13.	59
Figure 16 :	Détermination de l'aire retrouvée en chlordécone et CLD13 en fonction de la teneur en chlordécone injectée.	61
Figure 17 :	Évolution de l'intensité du pic de la chlordécone C13 en fonction de l'ajout de la chlordécone (0 à 10 mg/L) pour une même teneur en chlordécone C13 (0,4 mg/L).....	62
Figure 18 :	Teneur moyenne retrouvée (n = 5) par quantification sur base de l'étalon interne CLD13 et par méthode des ajouts dosés dans les trois sols avec ajout de matière organique (barre d'erreur = écart-type associé des cinq valeurs).....	64
Figure 19 :	Moyenne des teneurs retrouvées (n = 3) par étalonnage et ajout dosé en CLD-5bhydro dans un sol Andosol sans ajout de traitement (sol 1) et un autre sol Andosol avec ajout de 12 % du traitement Daramend® (sol 2) avec prise en compte de l'incertitude à 40 % pour ce niveau de concentration.....	64
Figure 20 :	Étalonnage interne de la CLD avec le standard interne CLD13.	65
Figure 21 :	Concentration en CLD retrouvée (ordonnée) par la droite d'étalonnage en fonction de la teneur préparée (abscisse).	69
Figure 22 :	Biais observés (en %) pour l'étude de l'étalonnage de la chlordécone.....	70

Figure 23 : Biais observés (en %) pour l'étude de l'étalonnage de la chlordécone-5bhydro....	71
Figure 24 : Biais observés (en %) pour l'étude de l'étalonnage du transnonachlore.....	71
Figure 25 : Biais observés en fonction du type de sol et de la teneur en CLD.	75
Figure 26 : Teneur en CLD mesurée dans l'andosol sans et avec ajout de matière organique (barre d'erreur = 20 %).....	78
Figure 27 : Teneur en CLD-5bhydro mesurée dans l'andosol sans et avec ajout de matière organique (barre d'erreur = 40 %).....	78
Figure 28 : Teneur en CLD mesurée dans le ferralsol sans et avec ajout de matière organique (barre d'erreur = 10 %).....	79
Figure 29 : Teneur en CLD mesurée dans le nitisol sans et avec ajout de matière organique (barre d'erreur = 15 %).....	79
Figure 30 : Évolution de la teneur en oxygène dans l'andosol traité par DARAMEND® au cours du temps à deux profondeurs (-10 cm et -60 cm par rapport à la surface du sol dans le mésocosme).	84
Figure 31 : Évolution de la teneur en oxygène dans le ferralsol traité par DARAMEND® au cours du temps à deux profondeurs (-10 cm et -60 cm par rapport à la surface du sol dans le mésocosme).	85
Figure 32 : Évolution de la teneur en oxygène dans le nitisol traité par DARAMEND® au cours du temps à 2 profondeurs (-10 cm et -60 cm par rapport à la surface du sol dans le mésocosme).	85
Figure 33 : Évolution du potentiel d'oxydo-réduction moyen à 10 cm de profondeur dans les trois sols traité (AND/DARA ; NIT/DARA ; FRL/DARA) et Témoin (AND, NIT, FRL) au cours de l'essai de traitabilité (six cycles successifs d'une alternance de phase anaérobie et aérobie).	87
Figure 34 : Potentiel redox à différentes profondeurs et à différentes phases du traitement (figures A à H) de l'andosol (AND-DARA).	92
Figure 35 : Potentiel redox à différentes profondeurs et à différentes phases du traitement (figures A à H) de l'andosol (FRL-DARA).	94
Figure 36 : Potentiel redox à différentes profondeurs et à différentes phases du traitement de l'andosol (NIT-DARA).....	96
Figure 37 : Évolution en fonction du temps des concentrations en chlordécone et en 5b-hydrochlordécone dans l'andosol traité (AND-DARA) et non traité (AND Témoin).	98
Figure 38 : Relation entre l'évolution du potentiel redox et la concentration en chlordécone normée (C/C ₀) dans l'andosol traité par le procédé Daramend® (AND-DARA).....	99
Figure 39 : Évolution en fonction du temps des concentrations en chlordécone et en 5b-hydrochlordécone dans le ferralsol traité (FRL-DARA) et non traité (FRL Témoin).	101
Figure 40 : Relation entre l'évolution du potentiel redox et la concentration en chlordécone normée (C/C ₀) dans le ferralsol traité par le procédé Daramend® (FRL-DARA). .	102
Figure 41 : Évolution des concentrations en chlordécone et en 5b-hydrochlordécone dans le nitisol traité (NIT-DARA) et non traité (NIT Témoin).	103

Figure 42 :	Relation entre l'évolution du potentiel redox et la concentration en chlordécone normée (C/C_0) dans le nitisol traité par le procédé Daramend® (NIT-DARA).	104
Figure 43 :	Évolution du taux de dégradation de la chlordécone dans les sols traités (-DARA) au cours de la succession des cycles de traitement.	105
Figure 44 :	Dénombrements bactériens (aérobies, anaérobies et ferri-réductrices) dans l'andosol non traité à T0 et aux temps correspondant aux fins de la phase anaérobie des cycles C1, C4 et C6 du sol traité DARAMEND®	106
Figure 45 :	Dénombrements bactériens (aérobies, anaérobies et ferri-réductrices) dans le ferralsol non traité à T0 et aux temps correspondant aux fins de la phase anaérobie des cycles C1, C4 et C6 du sol traité DARAMEND®	107
Figure 46 :	Dénombrements bactériens (aérobies, anaérobies et ferri-réductrices) dans le nitisol non traité à T0 et aux temps correspondant aux fins de la phase anaérobie des cycles C1, C4 et C6 du sol traité DARAMEND®	107
Figure 47 :	Relation entre le potentiel redox (mesuré à 10 cm de profondeur) et les dénombrements des bactéries hétérotrophes aérobie, anaérobies et ferri-réductrices au cours du traitement de l'andosol par le procédé DARAMEND® (AND-DARA).....	109
Figure 48 :	Relation entre le potentiel redox et les dénombrements des bactéries hétérotrophes aérobie, anaérobies et ferri-réductrices au cours du traitement du ferralsol par le procédé DARAMEND® (FRL-DARA).....	110
Figure 49 :	Relation entre le potentiel redox et les dénombrements des bactéries hétérotrophes aérobie, anaérobies et ferri-réductrices au cours du traitement du nitisol par le procédé DARAMEND® (NIT-DARA).	111
Figure 50 :	Comparaison des vitesses de production de N_2O entre les sols traités (-DARA) et non traités à T0 et à la fin des phases anaérobies des cycles 4 (15 semaines de traitement) et 6 (23 semaines de traitement).	113
Figure 51 :	Cinétiques de mesure de l'activité dénitrifiante potentielle dans le sol AND-DARA après 15 semaines de traitement.	113
Figure 52 :	Cinétiques de mesure de l'activité dénitrifiante potentielle dans le sol FRL-DARA après 15 semaines de traitement.	114
Figure 53 :	Cinétiques de mesure de l'activité dénitrifiante potentielle dans le sol NIT-DARA après 15 semaines de traitement.	114
Figure 54 :	Comparaison des vitesses de production de Fe(II) entre les sols traités (-DARA) et non traités à T0 et à la fin des phases anaérobies des cycles 4 (15 semaines de traitement) et 6 (23 semaines de traitement).	115
Figure 55 :	Comparaison des vitesses de consommation des sulfates entre les sols traités (-DARA) et non traités à T0 et à la fin des phases anaérobies des cycles 4 (15 semaines de traitement) et 6 (23 semaines de traitement).	116
Figure 56 :	Profils t-RFLP des fragments de l'ADNr 16S amplifiés par PCR à partir de l'ADN extrait directement des trois sols guadeloupéens étudiés (superposition des trois extractions indépendantes réalisées sur chaque sol).	119
Figure 57 :	Analyse en composante principale (PC1xPC2) des profils obtenus par PCR-t-RFLP de l'ADNr16S, après extraction de l'ADN directement du sol total, à partir de trois répétitions indépendantes, pour les différents sols guadeloupéens étudiés : andosol (AND), ferralsol (FRL) et nitisol (NIT).....	121

Figure 58 : Co-inertie : relation entre les caractéristiques physico-chimiques (origine des flèches) et la structure génétique des communautés bactériennes (tête des flèches) des trois sols.....	122
Figure 59 : Contribution de chaque paramètre physico-chimique dans la discrimination de la structure génétique des communautés bactériennes des trois sols guadeloupéens.....	123
Figure 60 : Biomasse microbienne totale estimée par la quantité d'ADN extrait du nitisol témoin et du nitisol traité par le procédé ISCR (moyenne de trois répétitions indépendantes) à différentes dates au cours du traitement.....	125
Figure 61 : Analyse en composante principale (PC1xPC2) des profils obtenus par PCR-t-RFLP de l'ADNr16S, après extraction de l'ADN directement du sol total, à partir de trois répétitions indépendantes, pour le nitisol témoin (Nit) et de nitisol traité par le procédé ISCR (Nit-Dar) à différentes dates au cours du traitement : avant le début du procédé (cycle 0), à la fin du 1 ^{er} cycle, du 4 ^e cycle et du 6 ^e cycle.....	128
Figure 62 : Profils t-RFLP des fragments de l'ADNr 16S amplifiés par PCR à partir de l'ADN extrait directement du nitisol témoin et du nitisol traité à trois dates au cours du traitement.	129
Figure 63 : Évolution de la température et de la concentration en oxygène dans le Mésocosme 1 (andosol).....	131
Figure 64 : Évolution de la concentration en oxygène et de la température dans le Mésocosme 3 (nitisol).	132
Figure 65 : Évolution de la concentration en oxygène et de la température dans le Mésocosme 5 (ferralsol).....	132
Figure 66 : Évolution des dénombrements pour les microflores aérobie et anaérobie.....	134
Figure 67 : Évolution de la concentration en oxygène et de la température dans le Mésocosme 2 (andosol).....	140
Figure 68 : Évolution de la concentration en oxygène et de la température dans le Mésocosme 4 (nitisol).	141
Figure 69 : Évolution de la température dans le Mésocosme 6 (ferralsol).....	142
Figure 70 : Évolution des dénombrements de microflore aérobie et anaérobie.	144

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des analyses réalisées au cours du traitement.	27
Tableau 2 : Conditionnement initial des différents traitements.....	28
Tableau 3 : Paramètres analytiques suivis et chronogramme des essais dans les mésocosmes soumis au compostage.	31
Tableau 4 : Dates des interventions des augmentations de débit dans les mésocosmes 1, 3 et 5.....	32

Tableau 5 :	Fréquence de prélèvements de sol pour les essais d'alternance de phases d'anaérobie/aérobie.	33
Tableau 6 :	Dates des interventions de purge à l'azote et des ajouts de mélasse dans les mésocosmes 2, 4 et 6.	35
Tableau 7 :	Propriétés physiques et chimiques de la chlordécone.	36
Tableau 8 :	Solubilité de la chlordécone en fonction du pH en solution (Dawson et al., 1979).	37
Tableau 9 :	Paramètres de détection en GC/MSMS (impact électronique) des étalons utilisés pour l'étude.	41
Tableau 10 :	Influence de l'ajout d'acétone sur la réponse de la CLD.	54
Tableau 11 :	m/z spécifique de la CLD et CLD13 pour le fragment C ₅ Cl ₆ obtenu en impact électronique.	60
Tableau 12 :	Aire de la CLD13 retrouvée en fonction de la CLD ajoutée (0 à 10 mg/L).	62
Tableau 13 :	Teneur retrouvée et biais % observé pour 10 injections successives d'un standard à 15,7 µg/L en CLD.	66
Tableau 14 :	Taux de récupération de la CLD dans les Sables de Fontainebleau après dopage à 0,1, 1 et 10 mg/kg.	67
Tableau 15 :	Teneur en chlordécone dans l'andosol humide (Brut) et après séchage (Sec). ..	68
Tableau 16 :	Teneur moyenne en chlordécone dans les sols bruts et après séchage et l'incertitude associée.	68
Tableau 17 :	Valeurs du F _{calculé} et de sa valeur critique au risque α de 1 %.	70
Tableau 18 :	EMA autorisés sur les points d'étalonnage.	72
Tableau 19 :	Teneurs en chlordécone et chlordécone-5bhydro dans les trois sols obtenues en répétabilité (extraction doublé) et en reproductibilité (cinq jours différents = cinq séries).	72
Tableau 20 :	Variabilité des résultats de la chlordécone et chlordécone-5bhydro dans les trois sols en répétabilité (extraction doublé), reproductibilité (cinq jours différents) et fidélité intermédiaire (repet/repro).	73
Tableau 21 :	Taux de récupération de la chlordécone dans le Nitisol (deux réplicats par niveau).	74
Tableau 22 :	Taux de récupération de la chlordécone dans le Ferralsol (deux réplicats par niveau).	74
Tableau 23 :	Taux de récupération de la chlordécone dans l'Andosol (deux réplicats par niveau).	75
Tableau 24 :	Teneur en CLD mesurée sans et avec ajout de matière organique exogène dans l'andosol.	77
Tableau 25 :	Teneur en CLD mesurée sans et avec ajout de matière organique exogène dans le nitisol.	77
Tableau 26 :	Teneur en CLD mesurée sans et avec ajout de matière organique exogène dans le ferralsol.	77
Tableau 27 :	Rendement d'extraction après dopage à 0,1 et 0,25 mg/kg en CLD du sol NIT et FRL.	80

Tableau 28 : Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur trois réplicats de chacun des trois sols après pré-conditionnement manuel (démottage, enlèvement des racines et cailloux).	82
Tableau 29 : Variabilité des trois mesures de potentiel redox (Eh/Electrode Normale à Hydrogène - ENH) effectuées en différents points de coordonnées XY mais toujours à -10 cm de la surface du mésocosme AND-DARA durant les phases anaérobies des six cycles de traitement du procédé Daramend.	88
Tableau 30 : Variabilité des trois mesures de potentiel redox (Eh/ Electrode Normale à Hydrogène - ENH) effectuées en différents points de coordonnées XY mais toujours à -10 cm de la surface du mésocosme FRL-DARA durant les phases anaérobies des six cycles de traitement du procédé Daramend.	89
Tableau 31 : Variabilité des trois mesures de potentiel redox (Eh/ Electrode Normale à Hydrogène - ENH) effectuées à -10 cm de la surface du mésocosme NIT-DARA durant les phases anaérobies des six cycles de traitement du procédé Daramend.	89
Tableau 32 : Comparaison des concentrations en chlordécone et en 5b-hydrochlordécone dans les échantillons composite et de la zone réductrice en fin de phase anaérobie des cycles 4 et 6 pour le sol AND-DARA.	100
Tableau 33 : Comparaison des concentrations en chlordécone et en 5b-hydrochlordécone dans les échantillons composite et de la zone réductrice en fin de phase anaérobie des cycles 4 et 6 pour le sol FRL-DARA.	102
Tableau 34 : Concentrations résiduelles en chlordécone en fin de traitement pour les trois sols comparées aux concentrations maximales admissibles dans les sols selon l'usage (jardin, cultures commercialisables).	106
Tableau 35 : Biomasse bactérienne totale estimée par la quantification du nombre de copies du gène codant l'ADNr 16S (moyenne de trois répétitions indépendantes) à différentes dates au cours du traitement.	127
Tableau 36 : Dénombrements de bactéries aérobies et anaérobies cultivables dans le nitisol à T0 en fin de phase anaérobie des cycles 1, 4 et 6 pour les sols non traité (Témoïn) et traité par le procédé ISCR.	127
Tableau 37 : Évolution en fonction du temps des densités des microflore totale aérobie et anaérobie dans les sols traités par compostage avec ajout initial de 115-125 % de compost en volume.	134
Tableau 38 : Évolution des différents paramètres analytiques relatifs à l'activité microbienne pour les mésocosmes en simulation de compostage.	136
Tableau 39 : Évolution en fonction du temps (T en semaines) des concentrations en chlordécone (CLD) dans les mésocosmes 1, 3 et 5 (α , β et χ : réplicats analytiques provenant d'échantillons indépendants).	138
Tableau 40 : Évolution en fonction du temps des densités des microflore totale aérobie et anaérobie dans les trois sols traités par alternance de phases aérobie et anaérobie après ajout initial de 12 % de compost en volume.	143
Tableau 41 : Évolution des différents paramètres analytiques relatifs à l'activité microbienne pour les mésocosmes en alternance de phases anaérobie/aérobie.	145
Tableau 42 : Évolution en fonction du temps (T en semaines) des concentrations en chlordécone (CLD) dans les mésocosmes 1, 3 et 5 (α , β et χ : réplicats analytiques provenant d'échantillons indépendants).	146

Liste des annexes

Annexe 1 : Compte-rendu des opérations de prélèvement des sols dans les parcelles guadeloupéennes	161
Annexe 2 Photos des sols tels que prélevés, avant le conditionnement manuel (élimination des éléments grossiers, démottage, quartage) réalisé avant le début des expérimentations	171
Annexe 3 : Étude de la faisabilité de synthèse chimique de la dihydrochlordécone (rapport artm1003 @rtMolécule)	177
Annexe 4 : Liste des 226 molécules analysées par le LDA.....	185
Annexe 5 : Compositions des milieux de culture	195
Annexe 6 : Dosage colorimétrique du Fe(II)	201

1. Introduction

1.1. CONTEXTE ET ENJEUX ÉCONOMIQUES, ENVIRONNEMENTAUX ET SOCIÉTAUX LIÉS À LA CHLORDÉCONE

Insecticide organo-chloré (C₁₀Cl₁₀O) de la famille des bishomocubanes, la chlordécone (CLD ; utilisée au féminin dans ce rapport, en lien avec la fonction cétone) a été utilisée aux Antilles entre 1972 et 1993 pour lutter contre le charançon du bananier. Son emploi a également concerné le Cameroun, la Côte d'Ivoire et plusieurs pays d'Amérique Latine (Équateur, Honduras, Nicaragua, Panama) (Joly, 2010 ; Fritz, 2009 ; OPECST, 2009), les USA jusqu'en 1976 (UNEP, 2007) ainsi que l'Asie (UNEP, 2007). En Europe, le Kélévan, qui se transforme partiellement en CLD en conditions naturelles de terrain (UNEP, 2007 ; WHO, 1986), a été utilisé pour lutter contre le doryphore de la pomme de terre en Allemagne et dans divers pays d'Europe de l'Est (Epstein, 1978).

De récents rapports ont retracé l'historique des autorisations accordées par l'État Français pour l'utilisation de la CLD (Joly, 2010 ; Fritz, 2009). Cette question ne sera donc pas traitée ici, si ce n'est pour préciser que l'emploi aux Antilles de 300 tonnes de CLD (1/6 de toute la production mondiale) sur des centaines de km² s'est fait en accord avec la législation.

Depuis une dizaine d'années, les réseaux de surveillance des milieux naturels ont mis en évidence une contamination en CLD forte et fréquente (*e.g.* Bertrand *et al.*, 2009). En Martinique, 50 à 55 % des points d'eau échantillonnés dépassent la norme pour l'eau potable fixée à 0,1 µg/L, avec une teneur maximale de 6,1 µg/L (OPECST, 2009). En ce qui concerne les eaux destinées à la consommation humaine, leur traitement pour éliminer la CLD et respecter les normes européennes de potabilité a nécessité la création de stations de traitement spécifiques, dont les coûts d'investissement et de fonctionnement se chiffrent en dizaines de millions d'euros. Certains contrôles effectués sur les productions végétales antillaises se sont également montrés positifs. La contamination, avérée en 2002, des « légumes racines » par la CLD a obligé les préfets à prendre en 2003 des arrêtés de précaution conditionnant la commercialisation de ces productions à une analyse « négative » (Cabidoche *et al.*, 2006a ; Achard *et al.*, 2007).

Les études les plus récentes donnent une image encore renforcée de l'ampleur et de la gravité de la situation aux Antilles. Les fortes contaminations en CLD de poissons et crustacés, tant dulçaquicoles (Monti et Coat, 2007) que marins (Bertrand *et al.*, 2009), ont entraîné des arrêtés préfectoraux d'interdiction de consommation et de commercialisation. Par ailleurs, l'étude épidémiologique Karuprostate vient de mettre en évidence un lien entre l'exposition à la CLD et le taux de cancer de la prostate (Multigner *et al.*, 2010 ; INVS, 2011).

Le volume total de sols à fort risque de contamination par la CLD a été estimé à 52 millions de m³, dont 10,6 millions (volumes cumulés Guadeloupe + Martinique)

couvrent les zones d'alimentation des captages d'eau souterraine ou de rivières (Colombano *et al.*, 2009).

Les caractéristiques intrinsèques de la CLD (très forte rémanence et sorption sur les solides ; des projections font état de plusieurs siècles avant un retour à la normale dans les andosols si rien n'est mis en œuvre pour remédier à la pollution ; Cabidoche *et al.*, 2009), les masses de CLD mises en jeu (300 tonnes), les superficies concernées (des centaines de km² représentant 15 et 19 % des surfaces agricoles utiles respectives de la Guadeloupe et de la Martinique), et les impacts socio-économiques (limitation de consommation de cultures vivrières, interdictions de pêche) et sanitaires (cancer de la prostate) font de la problématique « chlordécone aux Antilles » un enjeu environnemental, social et économique majeur.

1.2. POSITIONNEMENT DE L'ÉTUDE

Dans le cadre du Plan National d'Action Chlordécone I (2007-2010), le séminaire d'experts internationaux qui s'est tenu aux Antilles en mai 2010 a identifié des pistes à suivre pour avancer dans la remédiation des sols. L'approche couplée « physicochimie-microbiologie » a été identifiée, parmi celles capables de réduire les sources de pollution, comme celle susceptible d'arriver à des résultats tangibles dans les plus courts délais (3 à 5 ans ; fig. 1).

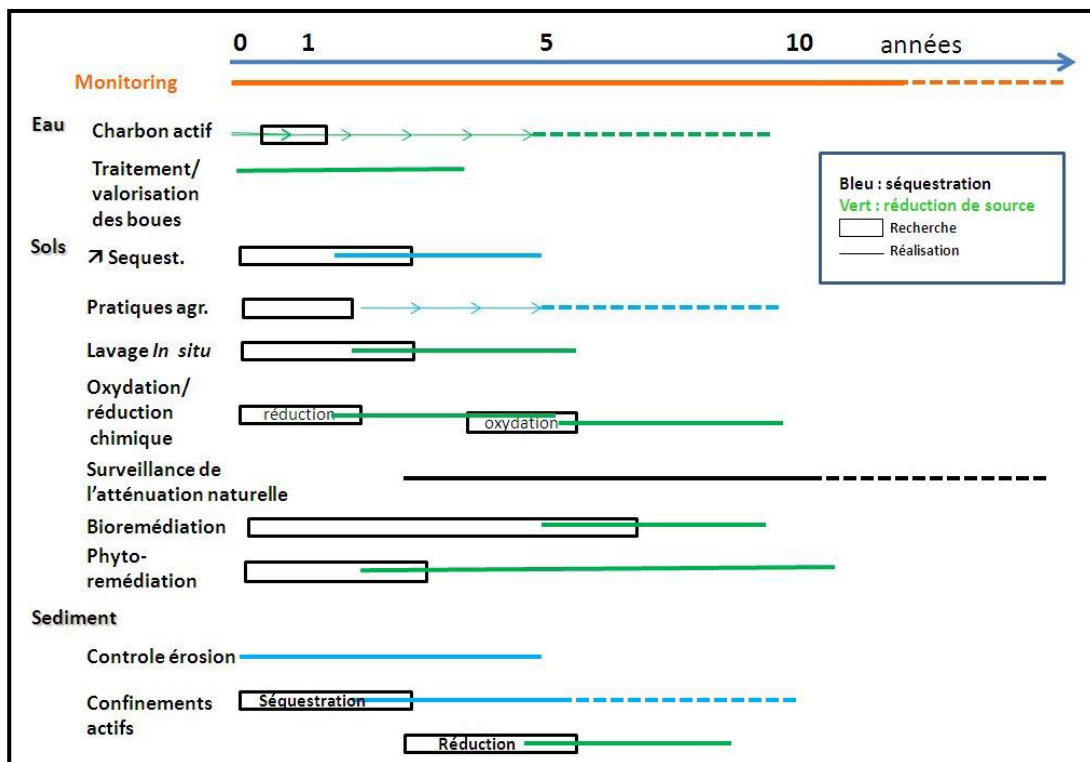


Figure 1 : Cadrage dans le temps des différentes options de remédiation pour les différentes matrices (Clostre *et al.*, 2010).

Si certains projets consacrés à la CLD, réalisés ou en cours, permettent d'apporter des réponses pour gérer les crises sanitaires (en évitant ou minimisant la contamination alimentaire) et économiques (en trouvant de nouveaux débouchés agricoles aux terres contaminées) engendrés par la CLD, aucun d'entre eux ne permet de résoudre définitivement le problème, ce qui impose (Colombano, 2010 ; MEDD, 2007 ; Nathanail *et al.*, 2002) l'élimination de la source (la chlordécone), pas seulement de l'isoler (billons recommandés comme pratique agricole alternative) ou de la piéger (ajout de compost).

Dans ce contexte, la convention SU 000 6693 MEEDDM/DGPR a mandaté le BRGM pour travailler sur la décontamination de sols antillais pollués par la chlordécone en : i) validant une méthode analytique avec amélioration de la sensibilité pour la chlordécone dans les sols, ii) testant la validité de deux procédés de dépollution physico-chimique et biologique, iii) étudiant des produits de dégradation formés lors de la mise en œuvre des procédés, ces trois aspects devant être étudiés dans les trois principaux types de sols antillais.

2. Matériels et Méthodes

2.1. PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS DE SOLS DANS LES PARCELLES GUADELOUPÉENNES

Afin de tester les procédés industriels sur des sols réels, des prélèvements des trois principaux types de sols antillais, andosol, nitisol et ferralsol ont été effectués. Initialement prévus sur les deux îles, les prélèvements ont été réalisés en Guadeloupe grâce aux indications fournies par le Dr Y.M. Cabidoche (INRA Guadeloupe).

Les prélèvements ont été effectués le 28 mai et 2 juin 2010 en appliquant le protocole établi pour tenir compte de la variabilité spatiale des concentrations en chlordécone au sein d'une même parcelle (Achard *et al.*, 2003). Le protocole inclut 25 points par parcelle selon une grille en étoile spatialisée (1 point tous les 17-20 m en X ou Y selon la superficie de la parcelle et décalage de 7 à 10 m des bordures de parcelle), sur une profondeur d'environ 30 cm, et ceci jusqu'à obtention d'un poids frais total d'environ 550 kg pour l'andosol et 400 kg frais pour le nitisol et le ferralsol (cf. ann. 1).

Les prélèvements unitaires ont été conditionnés dans des sacs plastiques solides avec un volume d'air d'environ 1/5 du volume de sol, puis fermés avec du scotch garantissant autant que possible le maintien de l'humidité du sol. Les cantines ont été de plus cerclées de scotch à la jointure entre couvercle et base, pour limiter les échanges avec l'extérieur.

Les cantines ont été expédiées par bateau puis transporteur routier jusqu'au centre scientifique et technique du BRGM à Orléans où elles sont arrivées le 19 juillet 2010.

2.2. CONDITIONNEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SOL AVANT LE LANCEMENT DES EXPÉRIMENTATIONS

Un protocole de conditionnement des trois types de sols reçus de la Guadeloupe a été établi. Les cailloux et racines ont été enlevés manuellement et un démottage manuel minutieux a été effectué. Le sol a ensuite été versé sur une bâche et une homogénéisation /quartage à la pelle a été réalisé. Deux échantillons de sol d'un poids frais de 80 kg ont été placés dans deux fûts en inox et stockés dans une chambre climatisée à 28 °C. Deux autres échantillons de 80 ont été stockés dans deux cantines dans la chambre climatisée à 28 °C. Des échantillons ont été prélevés pour une mesure d'humidité (105 °C), une analyse physico-chimique du sol. Le sol restant a été stocké à température ambiante.

Le **Ferralsol** (FRL) est un sol qui contient beaucoup de racines, pas ou peu de cailloux. Les cailloux et racines ont été enlevés manuellement. Le poids du refus (cailloux et racines) est de 1,89 kg et représente 0,06 % du poids total de sol.

Le **Nitisol** (NIT) est un sol qui contient quelques racines, beaucoup de cailloux, le sol s'effrite bien entre les doigts mais le tamisage n'est pas possible, car il se forme des

« boulettes ». Comme pour le sol précédent, les cailloux et racines ont été enlevés manuellement. Le poids du refus est de 16,7 kg et représente 0,66 % du poids total de sol.

L'**Andosol** (AND) est un sol hétérogène, plus argileux que les sols précédents, contenant des racines et quelques cailloux. Il forme aussi des « boulettes » lorsqu'il est tamisé à 4 mm. Le poids du refus est de 17,4 kg et représente 0,74 % du poids total de sol.

Des photos des sols sont visualisables en annexe 2.

Les humidités pondérales respectives du Nitisol, de l'Andosol et du Ferralsol à la fin des opérations de préconditionnement sont de 27,24, 60,35 et 30,75 %.

2.3. ANALYSES INITIALES DES SOLS

Une gamme de paramètres physico-chimiques majeurs a été analysée (SAS laboratoires, Ardon) sur des triplicats indépendants de chacun des trois types de sols séchés à une température inférieure à 40 °C jusqu'à poids constant, tamisés à 2 mm puis broyés à 200 µm. La CEC a été déterminée par la méthode Metson, à l'acétate d'ammonium pH 7 (NF X 31.130). La matière organique est calculée à partir de la mesure de carbone organique x 1,72 (NF ISO 14235). L'azote total a été déterminé par la méthode DUMAS (NF ISO 13878). L'analyse granulométrique a été effectuée après décarbonatation (norme X31.107). L'extraction du fer et de l'aluminium total a été réalisée par minéralisation à l'eau régale selon la NF ISO 11466 modifiée (méthode interne accréditée par le COFRAC) suivie d'un dosage à l'ICP-OES (selon la NF EN ISO 11885).

Des mesures de chlordécone après extraction par ASE et analyse en GC/MS (cf. sections 3.1. et 3.2.2.) ont été effectuées au BRGM sur les lots de sol avant le lancement des traitements de remédiation.

Une recherche très extensive (226 substances) des pesticides présents dans les sols a été commanditée au laboratoire départemental de la Drôme (LDA 26).

2.4. PROCÉDÉ VALGO/ADVENTUS

Pour chacun des trois sols à traiter, deux mésocosmes sont mis en œuvre : (i) un mésocosme témoin qui ne subit aucun traitement ; l'humidité initiale sera maintenue par des ajouts périodiques d'eau après vérification du taux d'humidité, (ii) un mésocosme DARA qui est soumis au procédé de *In Situ* Chemical Reduction (brevet Adventus) avec l'ajout de l'amendement Daramend.

Le procédé Adventus est caractérisé par une succession de cycles (limité à six pour des raisons économiques) composé d'une phase en anaérobie (trois semaines) et d'une phase en aérobie (une semaine). La figure 2 résume la succession des phases de traitement qu'ont subi les trois sols avec les différents ajouts réalisés au cours du traitement d'une durée de six mois.

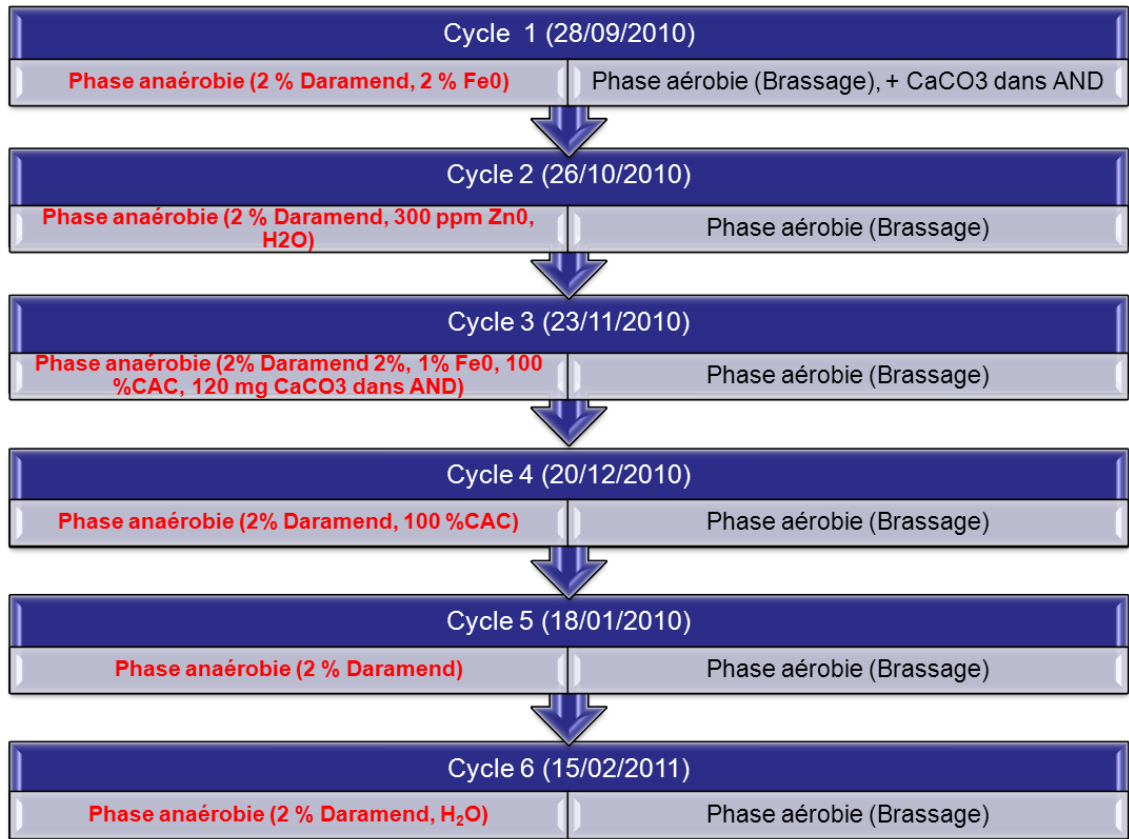


Figure 2 : Schéma récapitulatif des 6 cycles de traitement d'ISCR-Daramend appliqués aux sols de Guadeloupe contaminés par la chlordécone.

Six mésocosmes cylindriques avec couvercle, le tout en acier inoxydable, (2 par type de sol), sont placés dans un Algeco thermostaté à 28 °C, valeur représentative de la température moyenne des sols en Guadeloupe.

Les trois mésocosmes DARA ont été instrumentés au début du 3^e cycle avec des sondes d'oxygène afin de suivre l'évolution de l'oxygène des gaz des sols (et non l'oxygène dissout dans l'eau du sol) au cours de la succession des phases anaérobies et aérobies (cf. 3.3.1.).

2.4.1. Opération de mise en anaérobiose et d'ajout de Daramend, et de mesure du potentiel rédox

Le tiers supérieur du sol (les premiers 20 cm) est vidé à la pelle dans un bac en inox, et une mesure du potentiel redox est réalisée en triplicats à 10 cm de profondeur dans le sol resté en place dans le fût. Un second tiers du sol est vidé dans le bac en inox afin de réaliser une nouvelle mesure du potentiel redox (triplicats) dans la couche inférieure du sol (environ 40-60 cm de profondeur) restant dans le fût. Le fût est ensuite vidé entièrement. Un brassage de l'ensemble du sol réparti en une couche uniforme dans le bac en inox est effectué à la pelle.

Des prélèvements aléatoires avec un transplantoir sont réalisés afin d'obtenir un échantillon composite de sol pour les analyses physico-chimiques et microbiologiques. Le réactif DARAMEND® et autres réactifs, dont l'eau ajoutée pour rester à 90 % de la CAC, sont répartis sur la surface du sol. Une nouvelle homogénéisation du sol est réalisée et le sol est replacé dans le fût, qui est pesé avant son stockage dans la chambre climatisée à 28 °C. Les sondes à oxygène sont replacées dans les fûts. Une bâche plastique est déposée à la surface du sol dans le fût, et des lests (sacs de terre) sont déposés sur la bâche pour limiter au maximum les entrées d'air dans le fût, qui est par ailleurs muni d'un couvercle. Le fût est entreposé pendant trois semaines à 28 °C.

Le potentiel redox à 10 cm de profondeur dans les fûts DARA est mesuré en triplicats à l'aide d'une électrode redox (pH/ORP, modèle 196, WTW)¹. La sonde Eh a été calibrée avant chaque campagne de mesure avec un étalon. Le fût est ensuite pesé. Le poids de réactif DARAMEND®, d'eau (90 % de la capacité au champ), et éventuellement de Fe⁰ ou de Zn⁰ à ajouter sont calculés afin d'obtenir le pourcentage voulu.

2.4.2. Opération de mise en aérobiose et mesure du potentiel redox

Le tiers supérieur du sol (les premiers 20 cm) est vidé à la pelle dans un bac en inox, et une mesure du potentiel redox est réalisée en triplicats à 10 cm de profondeur dans le sol resté en place dans le fût. Un second tiers du sol est vidé dans le bac en inox afin de réaliser une nouvelle mesure du potentiel redox (triplicats) dans la couche inférieure du sol (environ 40-60 cm de profondeur) restant dans le fût. Le fût est ensuite vidé entièrement. Un brassage de l'ensemble du sol réparti en une couche uniforme dans le bac en inox est effectué à la pelle bineuse électrique (Gardena®). La mise en andin et homogénéisation à la bineuse sont répétés 3 fois. Le sol est ensuite étalé en une couche uniforme dans le bac en inox. Un quadrillage (16 carrés) est réalisé.

Des prélèvements aléatoires avec un transplantoir sont réalisés afin d'obtenir un échantillon composite de sol pour les analyses physico-chimiques et microbiologiques.

L'ensemble du sol est ensuite replacé, sans bâche de couverture, dans le fût, sans couvercle, qui est pesé avant son stockage dans la chambre climatisée à 28 °C. Un certain assèchement du sol se produit pendant la phase d'aérobiose. L'ajustement de l'humidité rendu nécessaire se fera dans les 24 à 48 h qui suivent la fin de la phase aérobiose, par aspersion à la surface du sol dans le fût après mesure de l'humidité à 105 °C réalisée sur une aliquote composite prélevée en fin de phase aérobie.

Le potentiel redox à 10 cm de profondeur dans les fûts DARA est mesuré en triplicats à l'aide d'une électrode redox (pH/ORP, modèle 196, WTW). La sonde Eh a été calibrée avant chaque campagne de mesure avec un étalon. Le fût est ensuite pesé. Le poids de réactif DARAMEND®, d'eau (90 % de la capacité au champ), et éventuellement de Fe⁰ ou de Zn⁰ à ajouter sont calculés afin d'obtenir le pourcentage voulu.

¹ Les valeurs de potentiel redox présentées dans la partie Résultats sont exprimées par rapport à l'Electrode Normale à Hydrogène.

2.4.3. Prélèvements des échantillons dans les sols témoins et mesure du potentiel rédox

Un carottage en triplicat est réalisé sur toute la hauteur du fût. À chaque tiers de la hauteur de sol prélevé par carottage, une mesure du potentiel redox est effectuée à l'aide de l'électrode redox. Selon les cas, le sol de chaque carotte est homogénéisé et trois échantillons indépendants sont disponibles, ou bien les trois carottages sont homogénéisés afin de réaliser un seul échantillon composite.

À partir de chaque réplicat ou échantillon composite, des prélèvements d'échantillons sont effectués pour les analyses microbiologiques, les analyses de la chlordécone et ses métabolites, et pour la mesure de l'humidité.

Le potentiel redox à 10 cm de profondeur dans les fûts Témoins est mesuré en triplicats à l'aide d'une électrode redox (pH/ORP, modèle 196, WTW). La sonde Eh a été calibrée avant chaque campagne de mesure avec un étalon. Le fût est ensuite pesé.

2.4.4. Suivi de la teneur en oxygène des gaz des sols

Des sondes (Apogée S100) de mesure de la teneur en oxygène dans les gaz des sols non saturés en eau ont été mises en place à la fin du 2^e cycle de traitement dans les fûts contenant les sols contaminés. Ces sondes sont reliées à une centrale d'acquisition Campbell et le stockage des données se fait via le logiciel Loggnet (figure 3, Figure 2). La gamme de mesure est comprise entre 0 et 100 % avec une sensibilité de 2,5 mV/% d'O₂ et une incertitude de 10 % sur la mesure. Le temps de réponse est de 60 secondes. Le résultat est donné en % d'O₂.

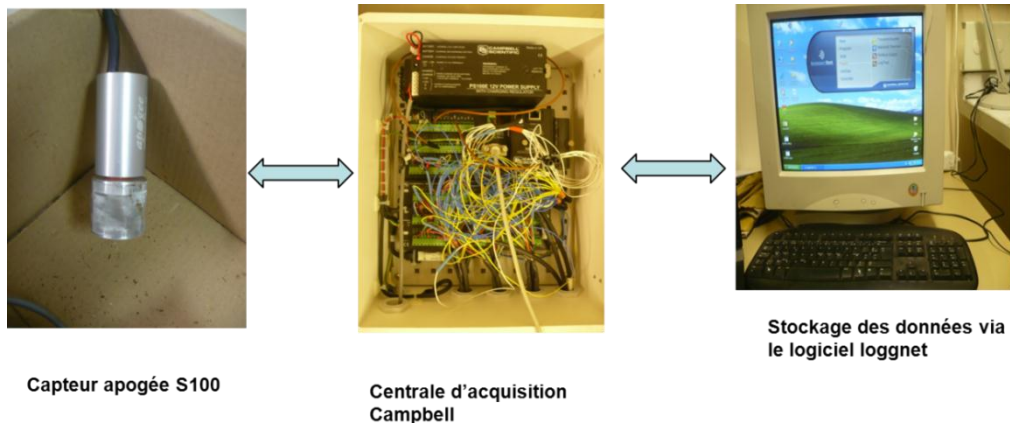


Figure 3 : Description de la chaîne de mesure de la teneur en oxygène dans les sols traités.

Quatre sondes à oxygène sont placées dans les sols traités uniquement : 2 à 10 cm de profondeur et 2 en profondeur à 10 cm du fond du fût (figure 4).

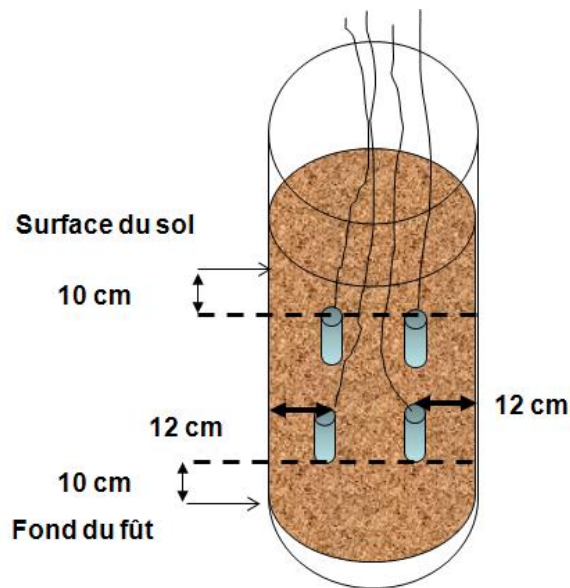


Figure 4 : Positionnement des sondes à oxygène dans le sol (traitement DARAMEND®).

2.4.5. Conditionnement des prélèvements avant analyses

Les prélèvements de sol ont été réalisés après l'homogénéisation décrite dans les paragraphes 2.4.1. et 2.4.2.

Les sols pour l'analyse de la chlordécone et de ses métabolites ont été placés dans des flacons cylindriques à double fermeture en polyéthylène capable de contenir 150 g de sol humide. Les sols ont été immédiatement traités pour analyse, ou stockés à 4 °C avant analyse.

Pour l'analyse des paramètres microbiologiques dans les échantillons prélevés en fin de phase anaérobie, le sol a été placé dans un sachet stérile (Whirl-Pak), flushé 3 fois avec de l' N_2 gazeux afin de maintenir les conditions d'anaérobiose, puis stocké à 4 °C avant utilisation. Dans le cas des échantillons de sol prélevés en fin de phase aérobie, le sol a été placé dans un sachet stérile (Whirl-Pak) et fermé puis stocké à 4 °C avant l'analyse des paramètres microbiologiques.

Des mesures d'humidités du sol ont été réalisées dans une étuve à 105 °C. Environ 200 g de sol humide sont placés dans un plateau en inox. Les plateaux sont ensuite mis à sécher dans une étuve à 105 °C pendant plusieurs jours. Le poids du plateau est pesé jusqu'à obtention d'un poids constant. L'humidité est calculée par rapport au poids humide.

Le Tableau 1 synthétise les prélèvements de sol réalisés en vue des analyses physico-chimiques et microbiologiques au cours du traitement des sols contaminés par la chlordécone.

Cycle n°	Phase anaérobie/aérobie	Analyse chlordécone et produits dérivés	Analyses microbiologiques
T0		X	X
1	ANA	X	X
	AER	X	X
2	ANA		
	AER		
3	ANA	X	
	AER		
4	ANA	X	X
	AER	X	X
5	ANA		
	AER		
6	ANA	X	X
	AER	x	X

Tableau 1 : Récapitulatif des analyses réalisées au cours du traitement.
Les analyses ont été réalisées en fin de phase anaérobie (ANA) ou aérobie (AER).

2.5. PROCÉDÉS BIOGÉNIE

(le texte de la section 2.5 se base sur le rapport d'étude fourni par la société Biogénie, modifié selon les demandes de C. Mouvet).

2.5.1. Préparation du compost

Un mélange a été préparé à partir d'un compost végétal mature en provenance de la Guadeloupe et d'un compost végétal frais (émondages) en provenance d'un site écocentre à Écharcon (France). Le mélange est un ratio volumique de 50 % de chacun des composts pour l'obtention d'un mélange final de 240 litres. Il a été décidé d'utiliser un mélange de compost pour l'étude de traitabilité puisque le compost provenant de la Guadeloupe semblait être mature, donc avec une source moins grande en composés organiques biodisponibles et une microflore probablement réduite par rapport à son état plus frais. L'ajout d'un compost végétal frais, constitué principalement de feuillage, apporte une fraction de carbone biodégradable nécessaire pour une activité microbienne intense.

2.5.2. Conditionnement des sols pour la mise en mésocosmes

Afin de maintenir un volume résiduel de sol en traitement 10 fois supérieur à la quantité de sol prélevé durant le traitement, une quantité minimale de près de 35 kg de sol sec par mésocosme a été nécessaire. Pour les traitements favorisant le compostage, un volume de compost équivalent à 115-125 % du volume de sol à traiter a été ajouté aux sols. Pour les traitements en alternance de phases anaérobie/aérobie, un ajout approximatif de 12 ± 1 % volumique de compost a été effectué à chacun des

sols en traitement. Divers autres intrants tels que de le nitrate d'ammonium (1 500 mg N/litre d'eau du sol), de l'engrais minéral (sulfate, phosphore, azote), de la chaux calcique (0,07 % m/m) ont été ajoutés à chaque type de sol afin d'obtenir des concentrations optimales de nutriments pour la croissance microbienne.

La chaux a été utilisée afin d'avoir une stabilité du pH en cours de traitement. La quantité de chaux (0,07 % m/m) ajoutée a été déterminée à l'aide de petits essais préliminaires sur les sols saturés en eau afin d'obtenir un pH aux alentours de 7,5. L'eau ajoutée dans les sols a permis de maintenir une humidité optimale dans les sols conditionnés avec le compost et de dissoudre les engrais solides pour avoir une bonne homogénéisation dans le sol. Le tableau 2 présente la composition initiale précise des différents essais.

Mésocosme	Type de sol	Quantité de sol		Compost		Nitrate d'ammonium (g)	Engrais (Algoflash) (g)	Chaux calcique (g)	Eau (kg)
		(kg)	(l)	(kg)	(l)				
1-AND-COMP	Andosol	34	36,8	18,2	45,0	50,4	27,2	238	3,75
2-AND-ANAE		60,5	65,5	4,0	9,0	89,4	48,4	423,5	1,5
3-NIT-COMP	Nitisol	30	26,5	13,5	30,3	55,6	30	210	3
4-NIT-ANAE		53,1	46,9	2,4	5,4	98,4	53,1	371	2
5-FER-COMP	Ferralsol	30	27,6	15,2	34,3	55,6	30	210	3
6-FER-ANAE		52,2	48,0	2,7	6,0	96,72	52,2	365,4	1,25

AND : Andosol NIT : Nitisol FER : Ferralsol COMP : Compostage

ANAE : Anaérobie/aérobie

Composition de l'engrais Algoflash :

- 12 % d'azote (N) dont 6 % d'azote nitrique et 6 % d'azote ammoniacal
- 5 % d'anhydride phosphorique (P₂O₅)
- 17 % d'oxyde de potassium (K₂O)
- 5 % d'oxyde de magnésium (MgO)
- 25 % d'anhydride sulfurique (SO₃)
- Oligo-éléments: 0,03 % de bore, 0,5 % de fer

Tableau 2 : Conditionnement initial des différents traitements.

La méthode de préparation des mélanges de sol et des intrants pour le traitement a été la même pour tous les essais. Ainsi, le sol était déposé dans un grand récipient en acier inoxydable pour y incorporer progressivement toute la quantité de compost végétal nécessaire. Par la suite, la chaux et les engrais solubilisés dans de l'eau ont été incorporés au sol conditionné. Les mélanges des médias ont été réalisés manuellement à l'aide d'une pelle de jardinage jusqu'à une homogénéisation complète. Des échantillons composites initiaux (T₀) ont été prélevés pour analyses physico-chimiques et biologiques.

Il est à noter qu'au moment de réaliser les essais à l'automne 2010, la méthode analytique du chlordécone n'était pas encore au point. Une inquiétude importante

reliée à la présence de compost végétal dans le sol pouvant interférer préoccupait les personnes responsables de cette analyse au BRGM. Les travaux menés à ce sujet ont confirmé ce risque d'interférence, lequel a été réglé vers la fin de la période de traitement par l'emploi de chlordécone ^{13}C comme étalon interne dans la phase analytique.

2.5.3. Environnement des essais expérimentaux

Les mésocosmes ainsi que l'appareillage nécessaire à la réalisation de la traitabilité ont été installés dans une grande pièce isolée (roulotte de chantier de type Algéco) équipée d'une unité de thermostatisation. La température a varié entre 26 et 28 °C pendant le 1^e mois, puis entre 23 et 25 °C pendant les cinq mois suivants. L'incubation des essais à cette température ambiante se voulait une simulation de la température des sols dans les Antilles françaises.

2.5.4. Simulation de procédé de compostage

Les trois sols conditionnés pour traitement en simulation de compostage ont été déposés dans des contenants isolés d'environ 60-100 litres. Les parois de ces récipients ont été recouvertes d'une membrane de téflon limitant une contamination du sol par le plastique ou une absorption des contaminants du sol sur les parois du contenant. Ces contenants sont appelés « mésocosmes ». Le sol est déposé sur une tige perforée recouverte d'un média poreux (gravier) située au fond du mésocosme permettant de faire circuler de l'air au-travers le sol à l'aide d'un système d'aspiration par une pompe vacuum.

L'aération du matériel est effectuée de manière constante à un faible débit (25 % du volume de matériel) pour 99 % du temps de traitement et de façon ponctuelle très intense (100 % du volume de matériel) toutes les semaines sur une période de 2 heures par semaine.

Cette hausse forcée du débit d'aération se veut une simulation d'une aération par brassage généralement effectuée toutes les semaines lors d'un traitement par compostage à grande échelle. L'aération des mésocosmes est nécessaire afin de maintenir une forte concentration en oxygène dans le sol. La figure 5 présente une illustration schématique d'un mésocosme. Les dimensions extérieures des mésocosmes sont de 95 cm x 42,2 cm x 44 cm pour l'andosol et de 46,4 cm x 80 cm x 40,6 cm pour le nitisol et le ferralsol.

L'identification des mésocosmes en simulation de compostage est la suivante : traitement de l'andosol dans le Mésocosme 1, celui du nitisol dans le Mésocosme 2 et celui du ferralsol dans le Mésocosme 3.

Afin d'effectuer un suivi des concentrations en oxygène dans le gaz des sols, des sondes à oxygène ayant la capacité de quantifier l'oxygène gazeux présent dans les pores du matériel ont directement été installées dans le sol.



Figure 5 : Illustration schématique d'un mésocosme.

Ces sondes ont été installées, à des profondeurs différentes (8 cm et 20 cm) dans les Mésocosmes 1 et 3 (afin de limiter les coûts, il a été décidé de ne pas instrumenter avec des sondes à oxygène le Mésocosme 5, ferralsol) et branchées à une centrale d'acquisition de données (datalogger) afin de suivre l'évolution de la concentration en oxygène. Le suivi de la température a été effectué dans les trois mésocosmes à l'aide de fils thermocouples entre 8 cm et 20 cm de profondeur.

La durée de traitement, initialement prévue à 24 semaines, s'est échelonnée sur 27 semaines. En effet, afin de bien orchestrer les diverses manipulations en fonction des emplois du temps des personnes en charge des prélèvements, les périodes d'incubation ont légèrement été modifiées. Des prélèvements pour analyses ont été effectués au début du traitement (semaine 0) et à la fin des semaines 7, 14, 20 et 27.

Les manipulations lors des quatre périodes (excluant le T_0) de prélèvement d'échantillons des trois mésocosmes en traitement par simulation par compostage (1, 3 et 5) ont été effectuées de la même manière et sans discrimination au niveau du type de sol. Ainsi, à la fin de chaque période de traitement en condition aérobie d'environ 6-7 semaines, des échantillons de sol ont été prélevés. Lors des prélèvements, les sols ont complètement été retirés du mésocosme et mélangés dans un grand bac en acier inoxydable pour être homogénéisés afin de préparer un échantillon composite. Suite au prélèvement, le sol est ré-humidifié avant la remise en traitement.

L'humidification du matériel est basée sur une observation visuelle du matériel avant brassage (zone d'assèchement sur le dessus de la masse de sol) et de sa capacité à se maintenir lorsque le sol est compacté manuellement. L'eau est ajoutée jusqu'à l'obtention d'une structure souhaitable par l'opérateur. Les échantillons prélevés sont ensuite soumis aux diverses analyses microbiologiques et chimiques.

Le tableau 3 présente la liste des paramètres analytiques suivis et le chronogramme associé.

Date	Analyses
T = 0 semaine ; début de la simulation de procédé	<ul style="list-style-type: none"> - Chlordécone - Azote assimilable, totale - Sulfates, sulfures - Phosphore assimilable - pH / Cond. électrique - Microflores totales aérobies /anaérobies - Carbone organique total (COT)
T=4 semaines	- Microflores totales aérobies /anaérobies
T=7 semaines	idem que T = 0 semaine
T=14 semaines	idem que T = 0 et 7 semaines
T=18 semaines	- Microflores totales aérobies /anaérobies
T=20 semaines	idem que T = 0, 7 et 14 semaines
T=24 semaines	- Microflores totales aérobies /anaérobies
T=27 semaines	idem que T = 0, 7, 14 et 20 semaines

Tableau 3 : Paramètres analytiques suivis et chronogramme des essais dans les mésocosmes soumis au compostage.

Note : Les analyses du chlordécone ont été réalisées par le laboratoire du BRGM.

- **Interventions particulières**

Les simulations de brassage par augmentation du débit d'aération passant de 25 % du volume de sol/heure à 100 % du volume de sol/heure n'ont pas été effectuées à toutes les semaines comme le prévoyait le protocole puisqu'il manquait de ressources techniques pour effectuer les travaux. Les fréquences hebdomadaires d'ajustement des débits d'aération étaient respectées en début d'expérience, mais ont été diminuées en cours de projet puisqu'il ne semblait pas y avoir de modification du taux d'oxygène dans les sols (voir les résultats du suivi de l'oxygène dans les gaz des sols à la section 3.5.1). Le tableau 4 présente les dates où il y a eu augmentation du débit d'aération comme simulation de brassage de sol.

Mois	Date
Octobre	08/10/2010
	11/10/2010
	15/10/2010
	22/10/2010
	29/10/2010
Novembre	08/11/2010
	26/11/2010
Décembre	10/12/2010
	23/12/2010
Janvier	03/01/2011
	16/01/2011
	26/01/2011
	28/01/2011
Février	25/02/2011
Mars	06/03/2011

Tableau 4 : Dates des interventions des augmentations de débit dans les mésocosmes 1, 3 et 5.

2.5.5. Simulation de procédé par alternance de phases anaérobie/aérobie

Le montage expérimental des essais par alternance de phases anaérobie/aérobie est sensiblement le même que celui des simulations de compostage. En effet, chaque type de sol conditionné a été déposé dans les mêmes types de mésocosmes, mais la différence réside dans les conditions d'aération du sol. En effet, le traitement comporte une première phase de quatre semaines en phase anaérobie, c'est-à-dire qu'aucun apport d'oxygène n'est effectué dans le sol. Durant cette phase, le mésocosme est entièrement recouvert d'un sac de plastique empêchant tout contact à l'air ambiant. Suite à la période de quatre semaines de traitement anaérobie, le mésocosme est retiré du sac de plastique et mis en condition aérobie pour une période approximative de deux semaines. La séquence d'aération du sol est effectuée à l'aide d'une pompe vacuum qui aspire l'air ambiant au-travers de la masse de sol à raison d'un minimum d'un changement d'air à l'heure du volume des pores dans le sol.

Dans le cas où la consommation de la matière organique n'est pas suffisante pour diminuer la concentration en oxygène dans le sol, un ajout d'un gaz inerte (azote) est effectué pour atteindre un niveau de condition anoxique, c'est-à-dire une concentration en oxygène inférieure à 5 %. Cet ajout d'azote est effectué par la tige d'aération servant à aspirer l'air avec la pompe vacuum lors de la séquence aérobie.

Un mélange de compost végétal a été ajouté en début de traitement de manière à ajouter une source de carbone et de nutriments permettant de stimuler l'activité

microbienne et atteindre rapidement une condition réductrice. La quantité initiale ajoutée est approximativement de 10 % volume de compost par volume total de sol. Il est à noter que le compost végétal a également servi comme source d'inoculum microbien. L'utilisation d'un compost des Antilles françaises a permis d'obtenir une certaine proportion de micro-organismes pouvant potentiellement se retrouver dans un compost végétal qui serait ajouté au sol lors de la réalisation d'un essai à grande échelle.

L'identification des mésocosmes en alternance de phases anaérobie/aérobie est la suivante : traitement de l'andosol dans le mésocosme 2, celui du nitisol dans le mésocosme 4 et celui du ferrasol dans le mésocosme 6.

Des sondes à oxygène ont été installées à des profondeurs différentes dans le sol (8 cm et 20 cm) dans les mésocosmes 2 et 4 et des thermocouples installés pour suivre la température des trois types de sol (mésocosmes 2, 4 et 6). Afin de limiter les coûts, il a été décidé de ne pas instrumenter le mésocosme 6 (ferralsol) avec des sondes à oxygène.

Le traitement par alternance de phases anaérobie/aérobie était prévu pour une période de 24 semaines. Par contre, pour les mêmes raisons que celles exposées pour le traitement par compostage, le traitement a dû être échelonné sur une période de 27 semaines. Le tableau 5 présente la fréquence des prélèvements qui ont été réalisés sur les mésocosmes 2, 4 et 6.

Traitement	Semaine des prélèvements							
Mésocosme #2, #4, #6	T ₀	T ₄	T ₇	T ₁₄	T ₁₈	T ₂₀	T ₂₄	T ₂₇

Tableau 5 : Fréquence de prélèvements de sol pour les essais d'alternance de phases d'anaérobie/aérobie.

- **Prélèvements des échantillons du traitement par alternance anaérobie/aérobie**

Les manipulations lors des sept périodes (excluant le T₀) de prélèvements d'échantillons des trois mésocosmes en traitement par alternance anaérobie/aérobie (mésocosmes 2, 4 et 6) ont été effectuées de la même manière sans discrimination au niveau du type de sol. Ainsi, à la fin de chaque période de traitement en condition anaérobie d'environ quatre semaines, des échantillons de sol ont été prélevés pour des analyses microbiologiques. Ces prélèvements ont été faits en préparant un échantillon composite d'approximativement 300 g de sol à partir de sous-échantillons prélevés aléatoirement dans le mésocosme. Le mésocosme est ensuite ré-échantillonné à la fin de la période aérobie de deux semaines.

Cet échantillonnage est similaire à celui effectué lors des essais de simulation de compostage : matériel homogénéisé à l'extérieur du mésocosme et prélèvement d'un

échantillon composite d'approximativement 750 g de sol. Le tableau 5 de la section 2.3.1 présente les paramètres analytiques et le chronogramme associé.

Le matériel est reconditionné avec de l'eau et de la mélasse (mélasse de canne entre 59 %-70 % de la MS en sucres totaux et 6 % de la MS en matière azotée totale) avant sa remise en mésocosme pour une autre séquence en condition anaérobie de quatre semaines et aérobie de deux semaines. Le tableau 6 présente les différentes séquences d'alternance de conditions anaérobie et aérobie ainsi que l'échéancier incluant les dates des différents prélèvements et ajouts d'amendements organiques (mélasse) effectués durant l'expérimentation.

Les phases de quatre semaines d'anaérobie (pas d'aération du sol, sac plastique entourant le mésocosme) ont eu lieu entre le T0 et T4 semaines, T8 et T11, T15 et T18, T21 et T24. Une mesure de la microflore anaérobie a été effectuée à la fin de chacune de ces phases. Les phases aérobies de 3 semaines, dont 2 en aération (33 % vol.media) ont eu lieu juste après la fin de phase anaérobie, donc pendant les semaines 5 à 7, 12 à 14, 19 à 20 (phase de 2 semaines seulement), et 25 à 27. Deux ajouts de mélasse ont été effectués à la fin des 14^e et 20^e semaines. Les prélèvements pour analyses complètes ont eu lieu à la fin des semaines 7, 14, 20 et 27.

- **Interventions particulières**

Lors de l'évolution du traitement en phases par alternance en anaérobie/aérobie, il y a eu quelques interventions particulières visant à maintenir les conditions d'opération telles que souhaitées. La difficulté dans ce projet a été de maintenir une condition anoxique sur une longue période suite à la première cascade anaérobie/aérobie. Ainsi, il y a eu deux types d'intervention dans le but de réduire les concentrations en oxygène dans les mésocosmes 2, 4 et 6. La première consistait à effectuer des ajouts d'azote (durée approximative de 30 minutes) dans les mésocosmes dans le but de purger l'air avec une concentration en oxygène trop élevée contenue dans les pores du sol. Le personnel technique du BRGM a effectué des purges à 10 reprises durant le traitement. Le tableau 6 présente les différentes interventions pour la réduction de la concentration en oxygène dans les pores du sol des mésocosmes en alternance de conditions anaérobie et aérobie.

Afin d'obtenir une stimulation de l'activité microbienne, des ajouts de mélasse ont été effectués en cours de traitement. Il est à noter qu'une plus grande quantité de mélasse (1 %-2 % massique habituellement effectuée lors d'essai anaérobie par Biogénie) aurait dû être ajoutée aux essais de sorte à augmenter davantage l'activité microbienne, mais le souhait de minimiser les interférences causées par la matière organique exogène lors de l'analyse du chlordécone nous a contraint à maintenir la concentration en mélasse à 0,1 % massique lors de chacun des deux ajouts effectués après les 14 (06-01-2011) et 20 semaines (18-02-2011).

Mois	Date	Intervention	Temps (semaine)
Novembre	17/11/2010	Purge azote	T=6,7
	26/11/2010	Purge azote	T=8,2
Décembre	07/12/2010	Purge azote	T=9,7
	10/12/2010	Purge azote	T=10,1
Janvier	06/01/2011	Ajout mélasse (0,1%)	T=14
	14/01/2011	Purge azote	T=15,2
	21/01/2011	Purge azote	T=16,1
	28/01/2011	Purge azote	T=17,1
Février	01/02/2011	Purge azote	T=17,7
	18/02/2011	Ajout mélasse (0,1%)	T=20,1
Mars	06/03/2011	Purge azote	T=22,4
	11/03/2011	Purge azote	T=23,1

Tableau 6 : Dates des interventions de purge à l'azote et des ajouts de mélasse dans les mésocosmes 2, 4 et 6.

2.6. SUIVI ANALYTIQUE : CHLORDÉCONE ET MÉTABOLITES

La méthode d'analyse utilisée pour la chlordécone et ses deux dérivés déchlorés, la chlordécone-5bhydro et la dihydrochlordécone, a été la chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à la spectrométrie de masse triple quadripôle.

Les essais préliminaires ont permis la mise au point des conditions analytiques (séparation, identification et quantification) et de l'extraction (rendement d'extraction). La validation de la méthode a ensuite été réalisée en accord avec la norme ISO 17025, en appliquant les exigences de la norme NF EN T90-210 dédiée aux méthodes d'analyses des eaux, à défaut de texte équivalent pour les sols. Cette validation inclut la caractérisation de la courbe d'étalonnage, l'étude de la spécificité, la caractérisation de la limite de quantification (ce point sera approfondi dans le rapport de la convention SU0007446, dû en mai 2012), la détermination de la répétabilité et reproductibilité et l'estimation des incertitudes de mesure. Cette démarche a été menée pour les trois principaux types de sol antillais Andosol, Ferralsol et Nitisol.

2.6.1. Les substances analysées

La méthode analytique devait permettre l'analyse de la chlordécone et les produits de dégradation déjà référencés dans la bibliographie (Borsetti *et al.*, 1978) à savoir la chlordécone-5bhydro et la dihydrochlordécone dans les sols Nitisol, Ferralsol et Andosol.

La chlordécone

La chlordécone est le nom commun de l'insecticide chloré : decachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta (cd) pentalen-2-one, lequel est également commercialisé sous le nom de kepone. Le numéro Chemical Abstracts Service (CAS) de la chlordécone est le 143-50-0.

La chlordécone a 10 chlores à 10 positions CAS différentes : 1, 1a, 3, 3a, 4, 5, 5, 5a, 5b, 6 (figure 6).

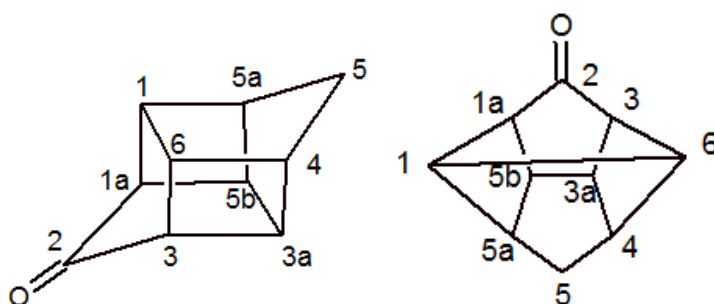


Figure 6 : Représentation de la chlordécone.

• Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physiques et chimiques de la chlordécone sont indiquées dans le tableau 7.

Propriété	Unité	Valeur	Source
Formule brute		C ₁₀ Cl ₁₀ O	
Poids moléculaire	g/mole	490,6	
Aspect à température et pression normales		Solide cristallin de couleur allant du fauve au blanc	CIRC, 1979 ¹
Pression de vapeur	Pa	3,0.10 ⁻⁵ (25 °C)	Kilzer, I <i>et al.</i> 1979 ²
		< 4,0.10 ⁻⁵ (25 °C)	CIRC, 1979 ¹
		4,0.10 ⁻⁵ (25 °C)	HSG 41, PISC, 1990
Solubilité dans l'eau	mg/L	0,35-1,0*	HSG 41, PISC, 1990
		1-2	EHC 43, PISC, 1990
		2,7 (25 °C)	Kilzer, I <i>et al.</i> 1979 ²
Point de fusion	°C	3,0	Kenaga, 1980
Point d'ébullition	°C	350; (décomposition)	CIRC, 1979 ¹
Log K _{oe}		Aucune donnée disponible	
		4,50	Howard, 1991 ¹
Log K _{ae}		5,41	Hansch <i>et al.</i> 1995 ²
Log K _{ae}		-6,69	Scheringer <i>et al.</i> 2006
Log K _{co}		3,38-3,415	Howard, 1991 ¹

¹: Extrait du rapport US ATSDR, 1995, ²: Extrait de la base de données accessible à l'adresse (<http://esc.syres.com/interkow/webprop.exe>)

Tableau 7 : Propriétés physiques et chimiques de la chlordécone.

La chlordécone a pour particularité d'être peu soluble dans l'eau, 1-2 mg.l⁻¹ (à 20 °C) pour les faibles pH acides et neutres. D'après Dawson *et al.* (1979), sa solubilité augmenterait rapidement dans des gammes de pH supérieures à 9 (tableau 8).

pH	Solubilité de la chlordécone (mg/L)
4	1.75
7	2.22
8	2.37
8.5	2.44
9	3.96
9.4	4.79
9.4(NaHCO ₃)	15.8
9.6	24.8
9.8	46.8
10	68.8
10.9	176

Tableau 8 : Solubilité de la chlordécone en fonction du pH en solution (Dawson *et al.*, 1979).

Cette molécule est par ailleurs très lipophile avec un coefficient de partage octanol/eau de 5 ; elle est soluble dans les solvants organiques (hexane et benzène) sous forme anhydre. Comme les autres organochlorés, elle se classe parmi les pesticides non ionisables.

- **Stabilité dans l'eau / hydratation**

Le standard de la chlordécone est commercialisé sous sa forme hydratée (figure 7) qui est la plus stable puisque la molécule mère est hygroscopique.

Ce standard n'est pas disponible sous la forme non hydratée et cette précision n'est pas donnée par tous les fournisseurs. Notre fournisseur (CIL-Cluzeau) commercialise le standard sous le nom chlordécone hydrate sous forme solide (réf. : C 11220000).

Les analyses menées par IR sur le solide ont permis de mettre son hydratation en évidence. Le spectre de la chlordécone (en réflexion totale atténuée et en transmission) ne montre pas de raies dans le domaine vers 1 700-1 800 cm⁻¹ domaine caractéristique des cétones. Par contre, on observe des raies dans le domaine au-dessus de 3 000 cm⁻¹ qui correspond aux raies caractéristiques des vibrations des liaisons OH.

Ce n'est donc pas de la chlordécone qui est présente mais bien la chlordécone hydratée.

Le spectre IR de la chlordécone référencé dans la littérature sous sa forme gazeuse (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>) est le suivant :

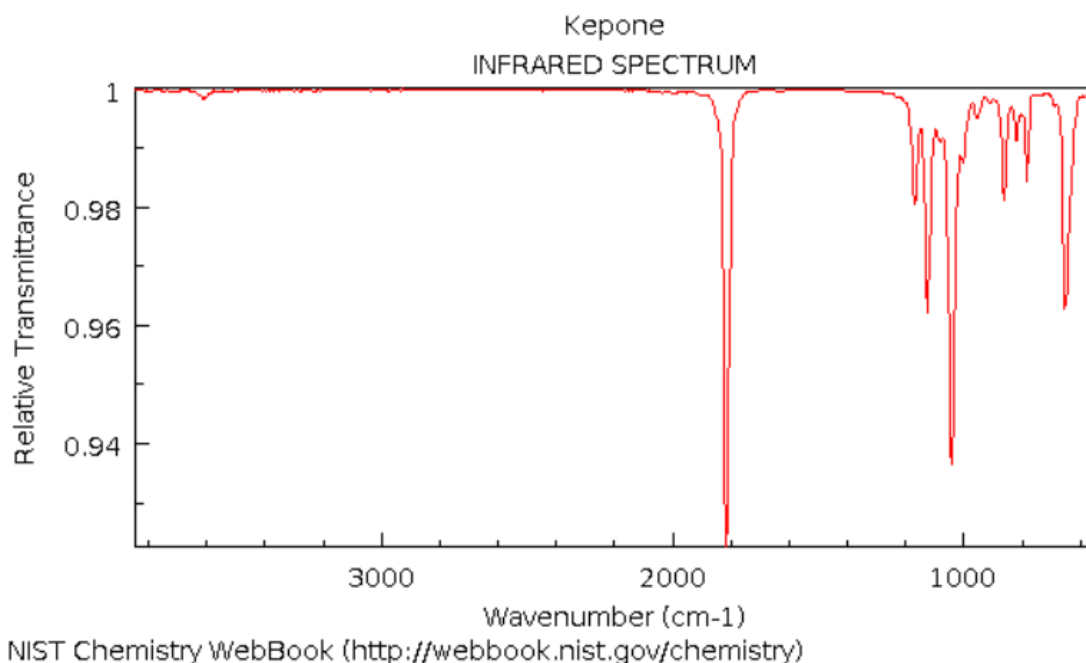


Figure 7 : Spectre IR de la chlordécone sous sa forme gazeuse.

La raie caractéristique de la cétone à 1700 cm^{-1} est bien présente mais le composé est sous forme gazeuse donc déshydraté. Lors de l'analyse en chromatographie gazeuse, l'injection du composé à chaud (environ $250 \text{ }^\circ\text{C}$) laisse supposer que cette déshydratation sera également observée.

La chlordécone est susceptible d'évoluer vers une forme plus soluble en fonction des conditions du milieu. En effet, comme les autres cétones, elle subit en milieu acide et en milieu basique une réaction d'hydratation à l'issue de laquelle se forme un « gem-diol » appelé chlordécone-hydrate, soluble en phase aqueuse et qualifié d'instable (figure 8).



Figure 8 : Hydratation d'un composé carbonyle et formation d'un gem-diol (Dupuis, 2005).

La 5b-hydrochlordécone

Ce composé est également hygroscopique et s'hydrate comme la chlordécone.

Ce produit de dégradation de la chlordécone correspond à une perte d'un chlore remplacé par un hydrogène en position 5b (nomenclature CAS). Ce composé est proposé par la société Dr Ehrenstorfer mais qui ne fournit pas de numéro CAS.

Le numéro CAS de l'hydrochlordécone est le n° CAS 53308-47-7 et a deux synonymes : 1, 3, 4-Metheno-2H-cyclobuta[cd]pentalen-2-one, -1,1a,3,3a,4,5,5,5a,5b-nonachloroocta hydro- et 1,3,4-Metheno-2H-cyclobuta[cd]pentalen-2-one- 1,1a,3,4,5,5,5a,5b,6- nona chlorooctahydro-. Ce composé correspondrait donc à une perte d'hydrogène de la chlordécone en position 6 ou 3a.

Le produit perd un chlore pour un hydrogène à une des dix positions : 1, 1a, 3, 3a, 4, 5, 5, 5a, 5b, 6. D'après les représentations du composé (figure 6), les composés avec une perte de chlore en 1, 6, 3a ou 5b sont similaires et correspondent au même composé.

Le composé chlordécone-5bhydro correspond donc au n° CAS 53308-47-7 appelé hydrochlordécone.

La chlordécone-5bhydro est la seule à être commercialisée : il existe toutefois de nombreuses formules possibles pour une monodéchloration de la chlordécone.

La dihydrochlordécone

La littérature scientifique (Alley *et al.*, 1973 ; Alley *et al.*, 1974 ; Harless *et al.*, 1978 ; Huckins *et al.*, 1982) mentionne la formation de dihydrochlordécone lors de la dégradation microbiologique de la chlordécone. Cette molécule n'est pas disponible en tant qu'étalon analytique.

La consultation menée auprès de grandes sociétés mondiales (Sigma-Aldrich, Moravek, Quotient Bioresearch, LGC Standards, Dr Ehrenstorfer Reference Materials (CIL-Cluzeau)) susceptibles de synthétiser cette molécule s'est soldée par un échec. La société @rtmolecule a accepté de conduire une étude de faisabilité dans un premier temps. Sur base de la littérature scientifique et de leur expérience, cette société a retenu une méthode de réduction de la chlordécone par voie photochimique avec un catalyseur au palladium et à l'aide d'un organolithien. Malgré les efforts investis par cette société, la dihydrochlordécone n'a pu être synthétisée, l'étude de faisabilité n'ayant pas montré les performances suffisantes.

Le rapport complet figure en annexe 3.

2.6.2. Méthode d'analyse retenue

Pour chaque échantillon de sol à analyser, une quantité de l'ordre de 200 g est prélevée après homogénéisation à l'aide d'une cuillère dans le conditionnement

d'origine. Le sol prélevé est séché dans les 24 h pour limiter toute dégradation de la chlordécone et des autres composés de dégradation éventuellement présents. Ce séchage est réalisé à 38 °C durant 72 heures. Ce prélèvement est enfin réduit à une granulométrie inférieure à 80 µm, d'abord par concassage (si présence d'éléments et mottes centimétriques) puis broyage dans un bol en agate, constituant ainsi un matériau fin et homogène.

Cette fraction, partiellement séchée et broyée, constitue l'échantillon sur lequel seront prélevées les prises d'essai pour réaliser l'extraction d'une part et pour déterminer la proportion de matière sèche d'autre part (séchage à 105 °C).

a) Les standards

Les standards utilisés sont commercialisés par CIL-Cluzeau : chlordécone hydrate sous forme solide (réf. : C 11220000) et la chlordécone-5bhydro (réf. : LA11220200CY) dans le cyclohexane à une concentration de 10 mg/L. Pour vérifier la justesse de la solution préparée en chlordécone, un point de contrôle est réalisé avec un standard chlordécone d'un fournisseur différent ; ce standard est commercialisé par Sigma-Aldrich (réf : 45379). L'ensemble de ces standards ont une pureté > à 98 %.

Le standard interne CB53 est commercialisé par Sigma-Aldrich (C 20005300). Le deuxième standard interne est la chlordécone 13C10 (CLM-4814-S) à 100 mg/L dans le nonane, commercialisé par CIL-Cluzeau. Le traceur transnonachlore est disponible chez Sigma-Aldrich (réf 442811).

Les standards commercialisés sous forme solide sont préparés à 200 mg/L dans l'acétone.

b) Extraction

L'extraction est réalisée avec un système extraction par fluide pressurisé (PFE) : ASE®. Ce système permet l'extraction par solvant (mélange acétone/hexane 50/50 v/v) des composés à partir de 5 g de sols à 100 °C sous pression élevée (110 bars). Cette pression est appliquée à la cellule d'extraction pour maintenir le solvant à l'état liquide durant l'extraction.

L'extrait est ensuite évaporé jusqu'à 10 mL, puis fractionné au 1/10 et finalisé dans 1 mL par évaporation sous flux d'azote du solvant d'extraction et transfert dans le cyclohexane.

c) Le couplage chromatographique GC et spectrométrie de masse (triple quadripôle)

L'analyse GC/MSMS est réalisée avec un système Bruker qui se compose d'un appareil de chromatographie gazeuse GC450 équipé avec un injecteur 1177, un passeur d'échantillon Combi Pal (CTC) et un spectromètre de masse triple quadripôle 300MS.

L'injecteur est équipé avec un liner 4 x 6,3 x 78,5 mm avec laine de verre et désactivation Sky™ (Restek réf. : 23309.5). 1 µl de l'extrait est injecté en splitless à 100 µl/sec. La température de l'injecteur est de 280 °C en isotherme. L'injecteur opère en mode splitless à 1 mL/min en débit constant et après 1 minute en mode split à 50 mL/min et à 20 mL/min entre 1 et 5 minutes.

La seringue est rincée avant (3 fois 5 µl de cyclohexane) et après l'injection de l'extrait et des étalons (5 fois 5 µl d'acétone et 2 fois 5 µl de cyclohexane).

Les composés sont séparés sur une colonne de 30 m de long, 0,25mm de diamètre interne et contenant une phase de 0,25 µm de 100 % diméthylpolysiloxane (Rxi-1MS, réf 13323, Restek). La colonne est chauffée à 50 °C pendant 1,1 minute puis jusqu'à 250 °C avec un gradient de 30 °C/min et enfin à 310 °C à 10 °C/min et en isotherme pendant 1,5 min.

La ligne de transfert est à 310 °C.

La source d'ionisation en impact électronique est à 250 °C.

Les temps de rétention et paramètres de détection sont les suivants (tableau 9) :

Composé	Temps de rétention (min)	Transition SRM de quantification (collision V, dwell time s)	Transition SRM de confirmation (collision V, dwell time s)
chlordécone	9,9	272 > 237 (15, 0,02)	270 > 235 (15, 0,01) 272 > 235 (15, 0,01)
chlordécone-5bhydro	9,3	272 > 237 (15, 0,02)	270 > 235 (15, 0,01) 272 > 235 (15, 0,01)
chlordécone C13	9,9	281 > 246 (15, 0,02)	279 > 244 (15, 0,02)
transnonachlore	9,2	409 > 300 (25, 0,02)	407 > 298 (25, 0,01) 411 > 302 (25, 0,01)
CB53	8,0	292 > 222 (25, 0,02)	292 > 257 (10, 0,01)

Tableau 9 : Paramètres de détection en GC/MSMS (impact électronique) des étalons utilisés pour l'étude.

La pression du gaz de collision (Argon en CID) est de 1,5 mTorr. Les résolutions de Q1 et Q3 sont fixées à 1,5 et 1,2 respectivement. L'ionisation est en impact électronique positif.

Le chromatogramme de tous les étalons en mode SRM est illustré en Figure 9.

Les concentrations dans les extraits de sol sont calculées par rapport à un étalonnage interne établi pour chaque composé et son standard interne. Le standard interne chlordécone C¹³ est utilisé pour la chlordécone et chlordécone-5bhydro. Le standard interne CB53 est utilisé pour le transnonachlore.

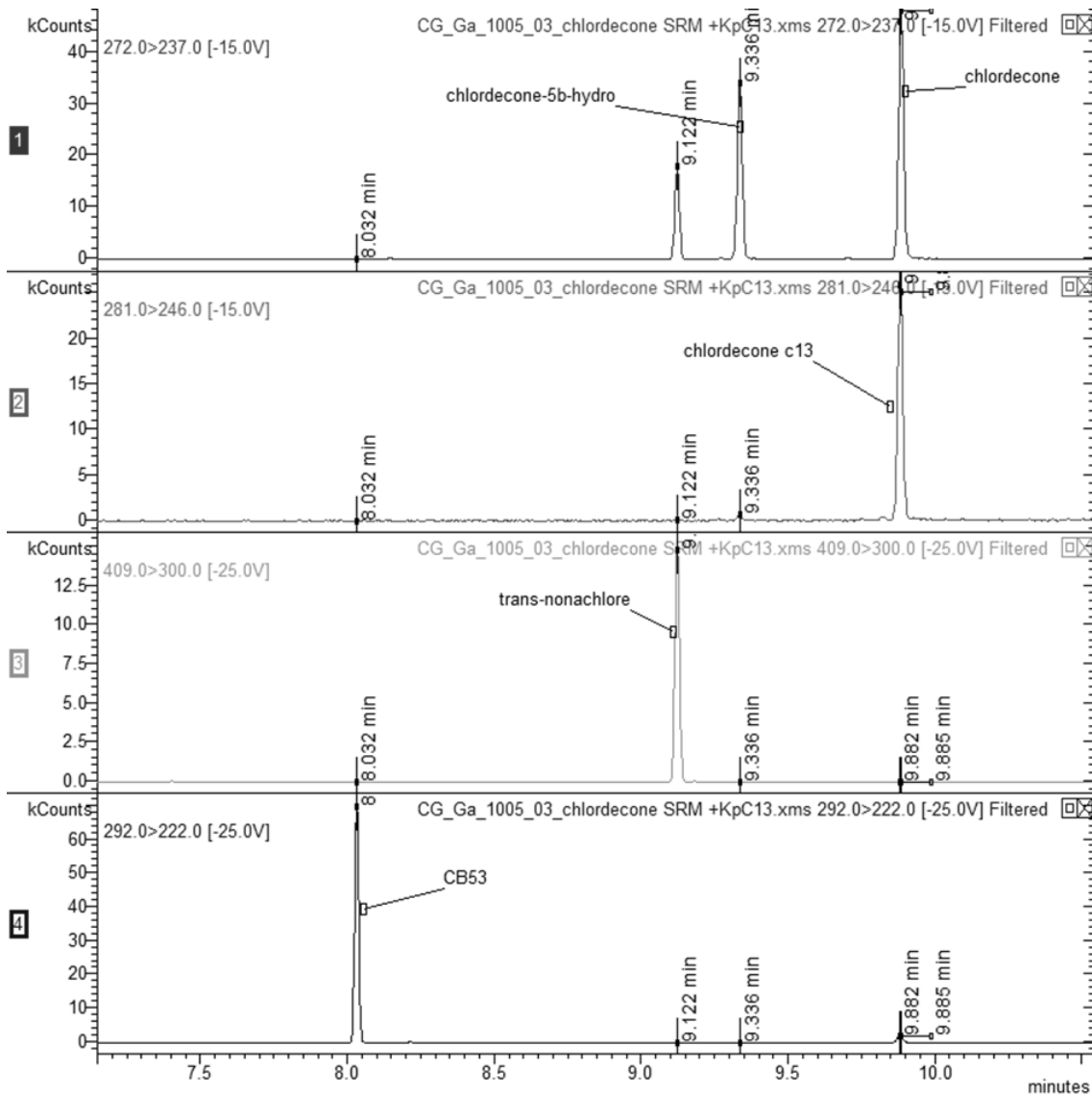


Figure 9 : Chromatogramme GC/MS de la chlordécone, chlordécone-5bhydro, transnonachlore et CB53 à 50 µg/L et du chlordécone C¹³ à 200 µg/L dans le cyclohexane.

2.7. SUIVI MICROBIOLOGIQUE DU PROCÉDÉ D'ISCR DARAMEND®

Les analyses microbiologiques suivantes ont été réalisées sur les échantillons de sol prélevés en fin de phase anaérobie ou aérobie :

- dénombrement de bactéries anaérobies et aérobiees totales par des approches de microbiologie classiques (cultivabilité sur des milieux de culture en microplaques) ;
- diversité bactérienne en utilisant des techniques d'écologie moléculaire afin de mettre en évidence une modification de la communauté microbienne (appauvrissement ou enrichissement) qui aurait un impact sur certaines activités clés du fonctionnement d'un sol ;

- suivi d'activités enzymatiques (par mise en culture en conditions contrôlée) liées au cycle de l'azote, du fer, du soufre afin d'identifier les éventuelles modifications engendrées par l'application du traitement DARAMEND®.

Ce travail sur la composante microbiologique du sol permet (i) de suivre l'évolution de la composante biologique au cours du traitement pour l'optimiser éventuellement ultérieurement, et (ii) d'évaluer l'impact du traitement sur la microflore endogène dont le rôle dans les fonctions du sol est primordial.

2.7.1. Dénombrements bactériens

La composition des milieux de culture est détaillée en Annexe 4.

a) Bactéries hétérotrophes anaérobies totales

Les bactéries hétérotrophes anaérobies totales du sol sont dénombrées par la technique du Nombre le Plus Probable (NPP). Les expériences sont réalisées sous boîte à gants sous atmosphère N₂. Des dilutions successives sont réalisées de 10⁻¹ à 10⁻⁷ dans des flacons contenant une solution saline (Annexe 4).

10 g de sol (équivalent sol sec) sont transférés dans un flacon contenant 90 mL de solution saline (dilution 10⁻¹). Après une étape de désagrégation du sol sur une table d'agitation rotative pendant 10 minutes, 10 mL de la dilution 10⁻¹ sont transférés dans un flacon contenant 90 mL de solution saline (dilution 10⁻²). Après une étape d'homogénéisation sur table d'agitation rotative pendant 10 minutes, 2 mL de la dilution 10⁻² est transféré dans un flacon contenant 18 mL de solution saline (dilution 10⁻³). Chaque dilution 10⁻ⁿ estensemencée avec 2 mL de la dilution 10⁻ⁿ⁻¹ après homogénéisation préalable au vortex.

Les tubes de Hungate contenant 9 mL de milieu de culture sontensemencés à raison de 1 mL/tube avec la dilution correspondante (5 tubes/dilution sontensemencés). Les tubes de milieu de culture sont incubés pendant 15 jours à 28 °C. Une lecture des tubes est réalisée après une et deux semaines d'incubation par observation visuelle du trouble formé lié à la croissance bactérienne.

Compte tenu du nombre important d'échantillons à dénombrer, une comparaison entre un dénombrement des bactéries anaérobies avec les tubes de Hungate et avec des microplaques (96 puits), beaucoup moins chronophages, a été réalisé à T0, afin de tester la technique de dénombrement en microplaques. Les microplaques sont placées dans une jarre anaérobie contenant un sachet GasPak™ générateur de CO₂. Une lecture des microplaques est réalisée après 1 et 2 semaines d'incubation par mesure de la densité optique à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (mesure du trouble formé lié à la croissance bactérienne).

b) Bactéries hétérotrophes aérobies totales

Les dénombrements des bactéries hétérotrophes aérobies ont été réalisés en microplaques 96 puits contenant un milieu de culture classiquement utilisé, le Nutrient Broth (Wollum, 1982).

10 g de sol (équivalent sol sec) sont transférés dans 90 mL de tampon phosphate 0,1 % stérile contenus dans un erlenmeyer de 250 mL stérile (dilution 10^{-1}). Le sol est désagrégé pendant 10 minutes sur une table d'agitation rotative. Après cette étape d'agitation, 10 mL de la dilution 10^{-1} sont transférés dans un erlenmeyer stérile contenant 90 mL de tampon phosphate stérile (dilution 10^{-2}). Après une étape de mise en suspension sur une table d'agitation rotative pendant 10 minutes, des dilutions en séries jusqu'à 10^{-6} dans des tubes d'eau déminéralisée stériles à raison de 1 mL dans 9 mL d'eau.

200 μ L de milieu de culture stérile sont distribués dans les puits de la microplaque ou 300 μ L pour les puits témoins non ensemencés. Les puits contenant 200 μ L de milieu sont ensemencés à raison de 100 μ L de la dilution choisie (5 puits/dilution). Les microplaques sont incubées pendant 14 jours à 28 °C.

À T0, 1 semaine et 2 semaines, une lecture de la Densité Optique (DO) à 595 nm est effectuée à l'aide du lecteur de microplaque pour suivre la croissance bactérienne.

c) Bactéries ferri-réductrices

Le dénombrement des bactéries ferri-réductrices est effectué en microplaques 96 puits en utilisant un milieu de culture hétérotrophe contenant du glucose comme source de carbone.

Dans une boîte à gant préalablement flushée à l'azote stérile, 200 μ L de milieu de culture sont répartis dans les puits ensemencés, 300 μ L pour les puits témoins non ensemencés. Les puits contenant 200 μ L de milieu de culture sont ensemencés avec 100 μ L de chaque dilution correspondante réalisée dans la solution saline (dix puits/dilution). Ce sont les mêmes dilutions qui ont servi à ensemercer les tubes et les microplaques pour le dénombrement des bactéries anaérobies. Les microplaques sont mises à incuber dans une jarre anaérobie en présence d'un sachet GazPak™ à 28 °C pendant deux semaines.

La révélation des bactéries ferri-réductrices après 1 et 2 semaines d'incubation se fait par la détection de Fe(II) dans les puits via une réaction colorimétrique. Sous boîte à gants préalablement flushée à l'azote, 50 μ L de milieu de culture de chacun des puits ensemencé (5 puits/dilution) et non ensemencé sont transférés sur une feuille de Parafilm. Une goutte d'une solution d'orthophénanthroline 0,5 % est ajoutée à chaque aliquote de milieu. La réaction vire au rouge vif en cas de réaction positive.

2.7.2. Activité potentielle sulfato-réductrice

L'activité potentielle sulfato-réductrice du sol est estimée par incubation d'échantillon de sol dans un milieu de culture qui va favoriser les bactéries sulfato-réductrices.

À proximité du bec Bunsen, 10 g de sol (équivalent sol sec) sont placés dans un flacon plasma stérile et hermétiquement fermé. 100 mL de milieu de culture sont ajoutés au sol. Le flacon est placé sur une table d'agitation rotative pour la mise en suspension du sol pendant 30 minutes à 12 °C. Après ce laps de temps, un prélèvement de la suspension de sol est effectué en conditions stériles pour une analyse de la concentration en sulfates. Ce prélèvement correspond au temps à partir duquel on effectue des prélèvements périodique afin de suivre la cinétique de sulfato-réduction (appelée T0). Les flacons sont ensuite flushés 2 fois 20 minutes à l'azote stérile. Les flacons sont placés sur une table d'agitation rotative à 28 °C pendant 15 jours.

Périodiquement, un prélèvement de milieu de culture (2 mL) est effectué dans chaque flacon, filtré à 0,45 µm. La concentration en sulfates est analysée par la méthode photométrique via les tests en tube Merck (Spectroquant®).

Les expérimentations sont réalisées en triplicats pour chaque échantillon de sol et un témoin négatif non ensemencé est suivi en parallèle (triplicat).

2.7.3. Activité potentielle ferri-réductrice

L'activité ferri-réductrice des sols a été mesurée en utilisant le milieu de Bromfield modifié (Bousserhine, 1995 ; Bousserhine *et al.*, 1998), dont la composition est détaillée en Annexe 4.

À proximité du bec Bunsen, dans un flacon à plasma de 250 mL stérile et hermétiquement fermé, sont placés 10 g de sol (équivalent sol sec) et 150 mL de milieu de culture. Le flacon est placé sur une table d'agitation rotative pour la mise en suspension du sol pendant 30 minutes à 12 °C. Après ce laps de temps, un prélèvement de la suspension de sol est effectué en conditions stériles pour une analyse des concentrations en Fer total et Fe (II) (T0). Les flacons sont ensuite flushés 2 fois 20 minutes à l'N₂ stérile. Les flacons sont placés sur une table d'agitation rotative à 28 °C pendant 15 jours.

Périodiquement, un prélèvement de milieu de culture (5 mL) est effectué dans chaque flacon, filtré à 0,45 µm. La concentration en fer total est analysée par la méthode photométrique via le test Fer (Spectroquant®, Merck). La concentration en Fe(II) est déterminée par photométrie par ajout d'une solution de phénanthroline qui forme une coloration orangée en présence de Fe(II). Le protocole détaillé est donné en annexe 5.

Les expérimentations sont réalisées en triplicats pour chaque échantillon de sol, et un témoin négatif non ensemencé est suivi parallèlement en triplicat également.

2.7.4. Activité potentielle dénitrifiante

L'activité enzymatique dénitrifiante (DEA) est déterminée en mesurant la formation de N_2O dans des suspensions de sol anaérobies contenant des NO_3^- et de l'acétylène (C_2H_2 , 10 %, v/v) (Tiedje, 1982). L'acétylène va bloquer la réaction de dénitrification au stade N_2O .

10 g de sol (équivalent sol sec) et 50 mL d'eau MilliQ stérile (filtration à 0,2 μm ou autoclavage) sont disposés dans un flacon à plasma de 250 mL stérile en verre muni d'un septum. Le flacon est flushé à l' N_2 .

À chaque flacon sont ajoutés 1 mL d'une solution de KNO_3 à 1 g/L pour une concentration finale de 20 mg/L et 2 mL d'une solution de glucose à 483 mg glucose/10 mL (concentration finale de 40 mgC-Glucose/50 mL). De l'acétylène est apporté au milieu pour une concentration finale de 10 % (v/v). Les flacons sont placés sur une table d'agitation à 28 °C pendant 1 mois.

Des prélèvements de la phase gazeuse ($V = 5$ mL) destinés à l'analyse de la production de N_2O sont effectués dans des tubes (BD Vacutainer®) à T0 et toutes les 2 heures pendant les 8 premières heures, puis à 48 h et 1 fois/semaine pendant quatre semaines.

Des prélèvements de la phase liquide sont réalisées à T0, 8 heures et à chaque temps de prélèvements de la phase gazeuse afin d'analyser les concentrations en nitrates, nitrites et ammonium par chromatographie ionique Dionex modèle ICS3000 comprenant un détecteur DC3000 avec un suppresseur ASRS 4 mm, un générateur d'éluant EG3000 muni d'une cartouche de KOH et un logiciel Chroméléon 6,80 SR5. La colonne est une IonPac AS19 de 25 cm de long et 4 mm de diamètre (température 30 °C) et la précolonne est une IonPac AG19 de 5 cm et 4 mm de diamètre.

Les expérimentations sont réalisées en triplicats pour chaque échantillon de sol, et un triplicat de témoin négatif non ensemencé est suivi en parallèle.

Les analyses de N_2O ont été effectuées avec un chromatographe en phase gazeuse (Varian 3800) équipé de 2 colonnes (Porapak Q 80-100 MESH, 2 m x 2 mm ID) montées avec un système de backflush. La température d'analyse est de 80 °C en isotherme. Le volume injecté est une boucle de 200 μL . La limite de détection est de 0,0001 % (1 ppm).

2.7.5. Analyse des communautés microbiennes

a) Sols étudiés et mode de conservation des échantillons

Les caractéristiques physico-chimiques des trois sols étudiés (andosol, ferralsol, nitisol) seront détaillées au paragraphe 3.2.1.

Des échantillons homogènes (sous-échantillons composites) de sol ont été prélevés à différentes dates au cours du traitement ISCR et congelés à -20 °C avant leur

utilisation pour les analyses moléculaires comme indiqué dans la norme ISO 10381-6. L'ensemble des échantillons a été décongelés en une seule fois.

b) Extraction directe des acides nucléiques (ADN) des microorganismes

- **Principe**

L'ADN total des micro-organismes (bactéries et champignons) est extrait directement du sol selon le protocole décrit par Martin-Laurent *et al.* (2001) et modifié par Ranjard *et al.* (2003). Ce protocole a été normalisé en juin 2010 auprès de l'Agence Française de Normalisation (AFNOR) et de l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO : International Organization for Standardization) sous la référence PR NF ISO 11063.

Cette méthode d'extraction de l'ADN est utilisée dans le cadre du Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS) coordonné par l'unité InfoSol de l'INRA d'Orléans-GISSOL (Arrouays *et al.*, 2003 ; Ranjard *et al.*, 2009).

- **Protocole expérimental : Norme PR NF ISO 11063 modifiée**

Les extractions d'ADN sont réalisées en triplicats à partir de chaque échantillon de sol. Le tampon de lyse décrit dans la norme PR NF ISO 11063 a été modifié en considérant différentes données sur l'adsorption de l'ADN dans les sols volcaniques (Saeki *et al.*, 2010, 2011 ; Herrera *et al.*, 2007). Un broyeur à billes à moment angulaire a été préféré pour la lyse mécanique.

250 mg de sol (équivalent sec) sont pesés dans des microtubes contenant 0,5 (\pm 0,05) g de billes de verre de diamètre 106 μ m (glass beads acid washed, Sigma, France) et 4 billes de diamètre de 2 mm (Sigma, France). 1 mL de tampon de lyse (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 50 mM, SDS (sodium dodécyl sulfate) 2 % dans de l'eau ultra pure) est ajouté dans chaque tube. Pour les andosols, un adjuvant complète la solution de lyse. La lyse physique est réalisée par agitation des microtubes dans un broyeur à billes (FastPrep Instrument, MP Biomedicals, France) à la vitesse de 5 m/s pendant 30 s.

Les échantillons sont incubés 15 min à 70 °C pour renforcer la lyse chimique. Après centrifugation (20 min, 10 000 g), l'ADN solubilisé dans le surnageant est prélevé. Les impuretés sont éliminées par ajout de 1/10^e de volume d'acétate de potassium 3M pendant 10 min à 4 °C. L'ADN est ensuite précipité à froid par un volume de 2-propanol (Sigma, France) pendant 3 h à -20 °C puis centrifugé 30 min à 10 000 g et 4 °C. Enfin, le culot d'ADN est lavé avec 400 μ L d'éthanol 70°, centrifugé 20 min à 10 000 g et 4 °C, séché puis dissout dans 100 μ L d'eau ultra-pure.

Les concentrations en ADN extraits sont évaluées par migration dans un gel d'agarose. Les gels colorés au bromure d'éthidium (BET) sont ensuite analysés avec le logiciel GeneTools (Gel Analysis Software, Syngene, UK). Les concentrations en ADN sont calculées par comparaison de l'intensité de fluorescence des ADN obtenus avec une gamme étalon d'ADN de concentrations connues. Cette mesure permet une approche de la biomasse microbienne totale de l'échantillon.

Deux étapes de purification des acides nucléiques, réalisées par colonne d'affinité de PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) qui fixe spécifiquement les substances humiques, et par colonne d'exclusion (GeneClean Turbo Kit, MP Biomedicals, France), permettent ensuite d'éliminer les solutés organiques co-extraits.

Les concentrations en ADN purifié sont estimées par fluorimétrie en utilisant un marquage au Sybr Green I (Invitrogen, USA) et une gamme étalon d'ADN (λ DNA, Promega, USA) de concentrations connues.

Les ADN sont conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour les analyses de la structure génétique des communautés bactériennes.

c) Caractérisation de la structure génétique des communautés bactériennes indigènes des trois sols avant le début du procédé

- **Principe**

L'analyse de la structure génétique des communautés bactériennes est effectuée par la technique d'empreinte moléculaire « CE-PCR-t-RFLP » pour « Capillary Electrophoresis- Polymerase Chain Reaction-Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism » (Kitts 2001), directement à partir de l'ADN extrait des sols et purifié selon la procédure décrite en b).

Cette méthode qualifiée de « culture-indépendante » permet d'obtenir une « image » globale de la diversité génétique des communautés bactériennes (ou fongiques), représentée sous la forme d'un profil dans lequel chaque pic représente, en théorie, une population bactérienne (ou fongiques) homogène pouvant correspondre à une espèce. Cette approche est basée sur l'amplification sélective par PCR (Polymerase Chain Reaction) d'un marqueur génétique de la communauté microbienne.

Pour l'analyse des communautés bactériennes, les gènes de l'opéron ribosomal sont les plus largement ciblés, et plus particulièrement le gène codant l'ARNr 16S. L'une des (ou les deux) amorces est (sont) marquée(s) à son (leur) extrémité par un composé fluorescent. Les produits d'amplification obtenus sont ensuite soumis à une digestion par une enzyme de restriction générant alors des fragments de restriction terminaux fluorescents de différentes tailles, en fonction des séquences d'ADNr des bactéries présentes dans l'écosystème étudié (Liu *et al.*, 1997 ; Marsh *et al.*, 2000).

Dans la présente étude, les fragments de restriction terminaux fluorescents sont séparés en fonction de leur taille sur une électrophorèse à capillaire (CE - capillary electrophoresis). Outre son niveau de résolution important, cette technique permet l'obtention de données numériques qui vont constituer une base de données dans laquelle pourront être stockés tous les profils permettant ainsi des comparaisons d'échantillons provenant d'analyses indépendantes ou de prélèvements réalisés à différents moments du traitement ISCR.

- **Protocole expérimental**

À partir des ADN extraits des trois sols et pour chaque répétition (triplicat), l'ADNr 16S des communautés bactériennes est amplifié par PCR avec les amorces 8F (6'FAM- 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', positions 8-27, *E. coli* 16SrDNA) marquée à l'extrémité 5' par un fluorochrome (6'FAM), et 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3', positions 1492-1513, *E. coli* 16SrDNA). Les PCR sont réalisées dans 50 µL final du mélange suivant : tampon 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, amorces 0,5 µM, GoTaq® Flexi DNA polymérase 1U (Promega, USA), ADN 0,01 ng/µL.

Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur iCycler (Biorad, France) dans les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 3 min à 95 °C, suivie de 35 cycles de dénaturation : 45 s à 95 °C – d'hybridation : 45 s 57 °C et d'élongation 1 min à 72 °C, puis une élongation finale de 10 min à 72 °C. Les PCR sont réalisées en triplicat pour chaque répétition d'extraction d'ADN. Après vérification de l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose, les produits PCR de chaque répétition ont été réunis et purifiés avec le kit NucleoSpin® ExtractII (Macherey-Nagel, Allemagne).

Les produits PCR purifiés sont quantifiés sur gel d'agarose par comparaison avec un marqueur moléculaire (Smart Ladder, Eurogentec, Belgique).

35 ng de produits PCR purifiés sont ensuite digérés par 2,5 U d'enzyme de restriction (*Hae*III, site de coupure GG/CC, Promega, USA) dans un volume final de 12 µL.

Un microlitre de chaque digestion est ensuite dénaturé 5 min à 95 °C, en présence de 0,5 µL de marqueur de poids moléculaire (GeneScan™ 600 LIZ, Applied Biosystems, USA) et de 18,5 µL de formamide (HiDi Formamide, Applied Biosystems, USA). La séparation des fragments de restrictions terminaux est réalisée automatiquement dans une électrophorèse à capillaire ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Les échantillons sont injectés pendant 30 s dans un capillaire contenant un gel de polyacrylamide POP4 (Applied Biosystems, USA), puis la migration est effectuée pendant 30 min à 60 °C sous une tension de 15 kV. Seuls les fragments de restriction en position terminale (t-RF) contenant le fluorochrome sont détectés.

- **Analyses statistiques**

Les profils obtenus par PCR-t-RFLP ont été détectés, alignés et analysés avec le logiciel StatFingerprints (Michelland *et al.* 2009) en utilisant le standard de taille interne GeneScan™ 600 LIZ (Applied Biosystems, USA) afin de définir une taille apparente pour chaque pic. Seuls les fragments entre 80 et 480 pb (paires de base) ont été considérés pour cette étude. L'analyse des données multivariées a été réalisée avec FactoMineR, un package du logiciel R (Husson *et al.*, 2008), en collaboration avec Jennifer Harris-Hellal (BRGM/EPI-BGE/Orléans).

2.8. SUIVI MICROBIOLOGIQUE DU PROCÉDE BIOGÉNIE

Les dénombrements de microflore totale aérobie et anaérobie ont été réalisés sur des échantillons de 1 litre de sol conditionnés en flacons stériles et envoyés au laboratoire prestataire (Wessling) en glacière avec pains de glace et livraison dans les 24 h suivant les prélèvements. La préparation de l'échantillon avant analyse est réalisée en s'inspirant de la norme FD CEN/TR 15215-1 Avril 2006 « Détection et dénombrement de *Salmonella* spp. dans les boues, les sols, les amendements du sol, les supports de culture et les biodéchets ». Les analyses de la flore totale aérobie et anaérobie sont réalisées selon la norme EN ISO 6222 « Qualité de l'eau – dénombrement des micro-organismes revivifiables – Comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture nutritif gélosé ».

3. Résultats et discussions

3.1. DÉVELOPPEMENTS ANALYTIQUES

3.1.1. Pré-validation

Une première méthode d'analyse pour le dosage de la chlordécone a été développée au BRGM en 2003, pour la caractérisation d'un mélange de sols de Martinique. Cette méthode consiste en une extraction automatisée sous pression à chaud suivie d'une méthode de purification, puis une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par spectrométrie de masse (quadripôle) ; elle permet une limite de quantification de 1 mg/kg de sol. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication internationale (Amalric *et al.*, 2006) et de l'accréditation par le Cofrac de la méthode d'analyse dans le cadre de la portée flexible.

Il est nécessaire d'améliorer cette méthode d'analyse pour répondre aux exigences suivantes :

- abaisser la limite de quantification de la chlordécone pour la rendre compatible avec les valeurs seuils 0,1 à 0,25 mg/kg, selon le type de sol et le type de culture (Cabidoche *et al.*, 2006) susceptibles d'entraîner une contamination des végétaux,
- identifier et quantifier des produits de transformation,
- ajouter un traceur mimant le comportement de la chlordécone dès le début du traitement de l'échantillon afin de tenir compte de toutes les variations éventuelles et particularités des échantillons, y compris la typologie pédologique initiale.

Pour optimiser les résultats de cette étude, un nouvel équipement a été acheté. Il s'agit d'un chromatographe en phase gazeuse (GC 450 Bruker) couplé à la spectrométrie de masse triple quadripôle (300MS Bruker) offrant une grande sensibilité pour des matrices complexes, une vitesse d'acquisition importante et donc une meilleure quantification.

L'emploi de la chlordécone marquée au carbone 13 (C¹³) est une autre spécificité de cette étude par rapport aux travaux antérieurs. Des tests préliminaires ont été menés pour mettre en place la méthode et cerner ses performances, avant de procéder à l'étape de validation.

a) Mise en place de la méthode d'analyse (GC/MS)

La problématique environnementale actuelle posée par la chlordécone dans les Antilles Françaises est amplifiée par la nature des sols contaminés ; ces sols volcaniques se caractérisent par une teneur élevée en argile (dont les allophanes, spécifiques des andosols et qui possèdent des caractéristiques très particulières) et en matière organique (jusqu'à 13 %).

De plus, les deux procédés de dépollution de ces sols testés au BRGM dans le cadre de la présente étude impliquent l'ajout de matière organique exogène (jusqu'à 50 % en volume par rapport au sol). Les fortes teneurs naturelles en matière organique des andosols (jusqu'à 13-15 %) et ces ajouts de matières organiques exogènes entraînent des extraits de sol dont la matrice est très chargée.

L'aspect matrice sera donc particulièrement considéré dans la mise en place de la méthode d'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

- **Interaction des solvants avec la chlordécone**

La publication de Huckins *et al.* (1982) met en évidence des effets du solvant sur la chlordécone par :

- réaction du méthanol avec la chlordécone pour former un héli-acétal ($C_{12}H_6Cl_{10}O_2$) dans des conditions de reflux pendant 18 h,
- réaction de l'acétone avec la chlordécone pour former un aldol ; moins de 1 % se formerait à 5 °C après 8 mois de contact,
- augmentation du signal de la chlordécone avec addition de méthanol dans une solution d'hexane,
- diminution du signal d'une solution de chlordécone dans l'acétate d'éthyle avec ajout de méthanol,
- aucune évolution du signal avec ajout de méthanol et isoctane à une solution de chlordécone dans l'acétate d'éthyle.

Ces effets ont été évalués au laboratoire.

Trois solutions mères de chlordécone sont préparées à 100 mg/L dans trois solvants de polarité différente : méthanol, isoctane et acétone. Trois gammes (50 à 250 µg/L) sont préparées à partir de ces solutions par dilution dans le cyclohexane.

Les points de gamme contiennent entre 0,05 % (50 µg/L) et 0,25 % (250 µg/L) du solvant utilisé pour la mise en solution initiale du standard à 100 mg/L.

Les trois gammes sont injectées et quantifiées par étalonnage externe (sans standard interne) (figure 10).

Plus le solvant utilisé pour la préparation de la solution mère est polaire plus la réponse de la chlordécone est exaltée, le méthanol donnant ainsi la meilleure réponse.

L'influence de la quantité de méthanol dans les étalons injectés (c'est-à-dire le volume de solution mère contenu dans les étalons après dilution avec le cyclohexane) a également été testée dans une autre expérience où l'étalon à 100 µg/L (contenant 0,1 % de méthanol) est enrichi en méthanol à 0,3 % et 0,5 % de méthanol. L'aire de la chlordécone est similaire pour ces trois essais (aire moyenne = 62000 et un écart-type de 1100 avec $n = 3$).

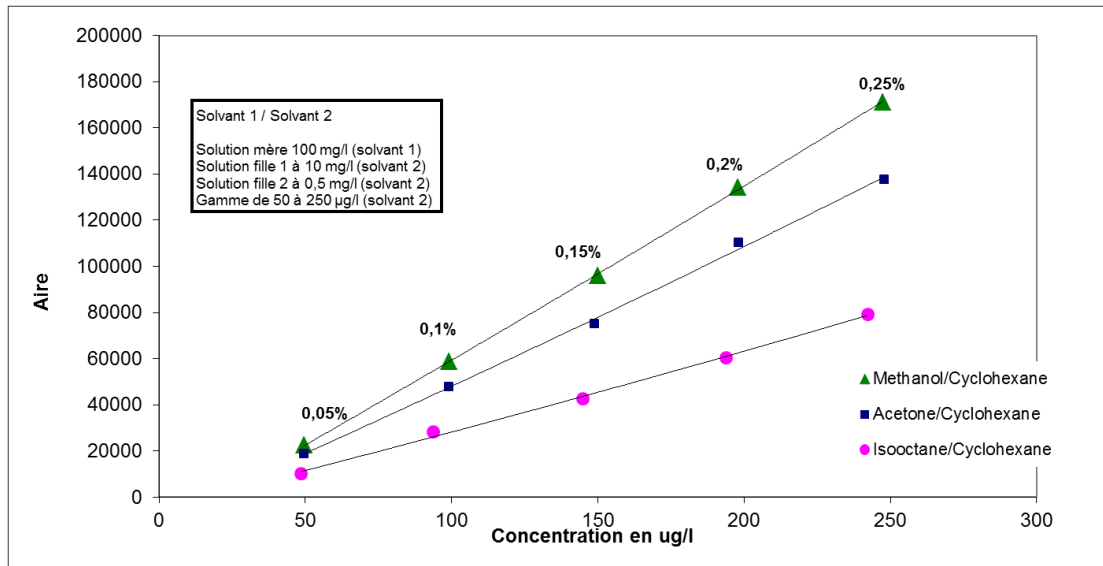


Figure 10 : Droites d'étalonnage de la CLD obtenues selon les solvants 1 / solvant 2 utilisés pour la préparation des solutions mère et filles et de la gamme d'étalonnage.
Pourcentages affichés : % solvant 1 pour chaque niveau de concentration

Par contre, avec un étalon à 100 µg/L (dans l'isooctane) ne contenant initialement pas de méthanol, l'ajout de méthanol à 0,2 et 0,4 % augmente le signal de la chlordécone d'un facteur 2 (0 % méthanol : aire = 22300 ; 0,2 % méthanol : aire = 44000 ; 0,4 % méthanol : aire = 40000).

Ces essais montrent l'influence de la composition en solvant final sur la réponse de la chlordécone lors de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse et donc l'influence de la préparation des gammes étalons et l'importance du choix et de la nature du solvant de la solution mère.

Il est primordial que le solvant final des échantillons et de la gamme étalon soient identiques pour avoir des résultats cohérents. Cela implique un choix judicieux pour les solvants d'extraction et d'analyse.

Par conséquent, l'acétone est utilisée comme solvant pour la solution mère puis le cyclohexane pour la préparation des étalons de la gamme. Ces solvants sont également utilisés pour l'extraction (hexane/acétone) et le solvant final de l'extrait (cyclohexane).

Une quantité de 0,05 % à 0,25 % d'acétone (utilisé pour préparer la solution mère) est présente dans les standards de la gamme d'étalonnage. L'acétone n'est pas présente dans les extraits de sols. Nous avons donc vérifié que le volume d'acétone n'a pas d'influence sur le signal de la chlordécone en ajoutant une quantité croissante d'acétone dans un étalon contenant uniquement du cyclohexane (tableau 10).

L'ajout d'acétone jusqu'à 0,25 % n'influence la réponse de la CLD.

% d'acétone ajouté dans le standard (200 µg/L) de CLD dans le cyclohexane	Aire CLD
0 %	76358
0,05 %	76260
0,1 %	74778
0,15 %	77318
0,2 %	78585
0,25 %	76761

Tableau 10 : Influence de l'ajout d'acétone sur la réponse de la CLD.

• Choix du traceur d'extraction

Un traceur d'extraction sera ajouté à chaque échantillon de sol sec et broyé, prêt pour l'analyse, afin de vérifier le bon fonctionnement du procédé d'extraction jusqu'au moment de l'injection en GC.

Le mirex ($C_{10}Cl_{12}$), même s'il n'a pas de fonction cétone, est très proche de la chlordécone de par la configuration du composé (figure 11) avec 12 chlores. Cependant ce produit est quantifié dans les sols (environ 0,05 mg/kg pour l'Andosol) et dans le standard de la chlordécone (environ 1 %) et ne pourra donc pas être utilisé.

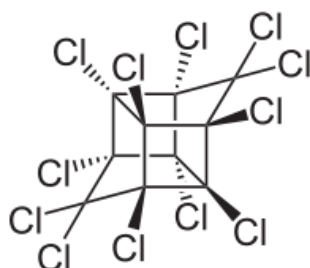


Figure 11 : Formule du mirex.

Le transnonachlore ($C_{10}H_5Cl_9$) (figure 12) est choisi bien qu'il n'a pas de fonction cétone (tout comme le mirex), car il comporte un cycle carboné et neuf atomes de chlore.

Son temps de rétention (9,2 min) est proche de ceux de la chlordécone (9,9 min) et de la chlordécone-5bhydro (9,3 min),

La chlordécone C^{13} (CLD13) n'est pas utilisée en traceur mais en standard interne pour prendre en compte le comportement de la chlordécone et de la chlordécone-5bhydro en chromatographie gazeuse. Il aurait été possible d'utiliser la CLD13 comme traceur d'extraction mais nous préférons avoir deux indicateurs différents, un pour l'extraction (le transnonachlore) et un pour l'analyse (CLD13) pour évaluer le déroulement de toute la méthode d'analyse.

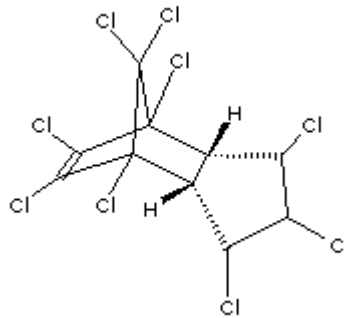


Figure 12 : Formule du transnonachlore.

Une solution de transnonachlore dans l'acétone sera ajoutée à chaque échantillon de sol avant l'extraction à l'ASE de manière à atteindre à 0,4 mg/kg.

Cette teneur, ramenée dans l'extrait, correspond à une concentration qui se trouve dans la gamme d'étalonnage (250 µg/L). Cette teneur correspond à environ 10 fois la limite de quantification instrumentale de 0,05 mg/kg.

Le rendement de récupération du traceur est calculé en comparant la valeur obtenue dans l'extrait (au moyen de la droite d'étalonnage) par rapport à la valeur théorique.

Pour savoir si ce rendement est à prendre en compte pour calculer la valeur de la chlordécone, 22 sols et sables sont dopés de 0,25 à 10 mg/kg en CLD (figure 13). Les taux de récupération du CLD sont calculées avec et sans prise en compte du rendement du traceur.

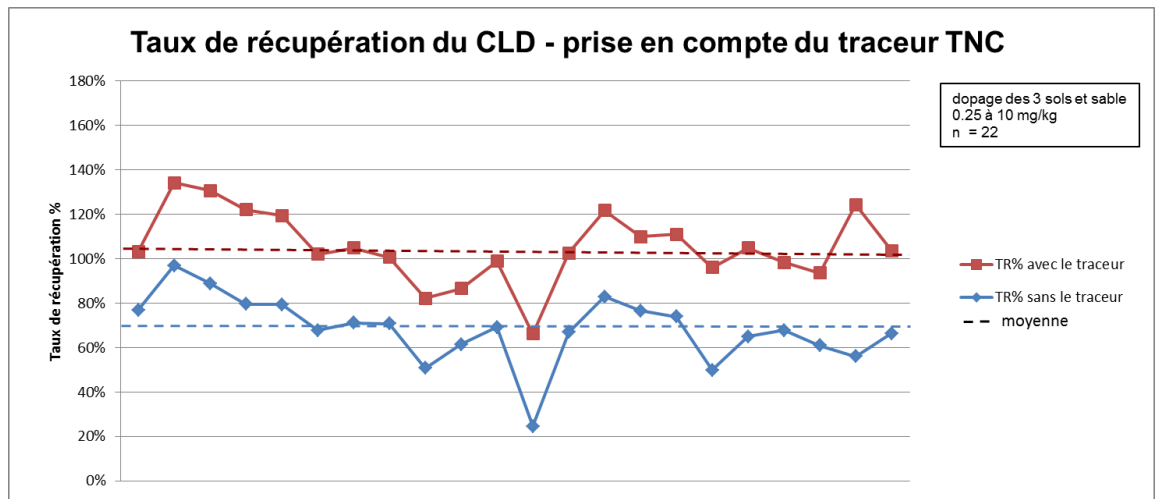


Figure 13 : Taux de récupération du CLD avec/sans prise en compte du traceur (TNC).

Les teneurs en CLD avec correction par le traceur sont voisines de la valeur de dopage avec un taux de récupération moyen de 106 % (± 16 %) ; sans la prise en compte du traceur, le taux de récupération moyen est de 68 % (± 15 %).

Le rendement du traceur est pris en compte dans le calcul de la teneur en CLD.

- **Comportement des composés en chromatographie gazeuse : ajouts dosés et agents protecteurs**

La chlordécone et ses produits de dégradation déchlorés ont un comportement très spécifique dans le système de chromatographie gazeuse (injecteur et colonne). Ce comportement doit être identique pour le standard interne pour quantifier correctement ces composés.

En présence de matrices chargées telles que celles des extraits de sol, des composants de la matrice se fixent sur des sites de l'insert du port d'injection GC et sur la colonne chromatographique (silanol), augmentant les réponses des composés recherchés par rapport aux réponses des analytes en solution dans un solvant seul.

En effet, les analytes en absence de matrice vont se fixer eux-mêmes sur l'insert/colonne ; en présence de matrice, celle-ci joue le rôle de « protection » vis-à-vis des sites de fixation en prenant la place des composés d'intérêt.

Par conséquent, les teneurs retrouvées dans la matrice sont erronées si on les quantifie avec un standard interne non adapté qui ne se comporte pas comme la chlordécone (cf. figure 15).

Ce phénomène peut être supprimé par passivation du système et l'injection d'un extrait de sol chargé avant analyse de la série d'échantillons. Cependant ce phénomène réapparaît au fur et à mesure des injections des étalons et il faut recommencer la passivation. Ce procédé n'est donc pas retenu.

La technique la plus connue pour limiter ces effets est l'utilisation des ajouts dosés consistant à ajouter avant analyse une solution connue des composés d'intérêt en quantité croissante dans plusieurs fractions de l'extrait (technique longue et contraignante). Depuis 2003 (1^{ère} publication sur le sujet Anastassiades *et al.*, 2003), une autre technique a été développée et consiste à ajouter des agents protectants dans l'extrait (Mastovska *et al.*, 2005).

En ajoutant ces « agents protectants » (sucre) à la fois dans les solutions d'étalonnage et dans les extraits « matrice », on induit le même « effet matrice » dans les deux cas. On devient donc maître du phénomène et on ne dépend plus des constituants de la matrice.

La mise en place des agents protectants nécessite dans un premier temps de choisir l'agent protectant qui sera le plus efficace pour la chlordécone et son produit de dégradation dont on possède l'étalon analytique. Mastovska *et al.* (2005) ont évalué l'efficacité de huit agents de protection selon la région d'élution du composé. Ce composé sera ajouté pour une teneur de 1 g/L dans les extraits de sol et la gamme d'étalonnage (Mastovska *et al.*, 2005).

Il faut cependant prendre soin de vérifier que la chlordécone ne réagit pas avec l'agent protectant pour former le kepol. Cet effet est mentionné par Soine *et al.* (1983) et

Huckins (1982) qui montrent la réaction de la chlordécone avec le solvant d'analyse dans l'injecteur GC.

Dans notre cas, l'alcool (D-sorbitol) n'est pas le solvant d'analyse mais l'agent protectant (4 fonctions – OH) ajouté dans l'extrait.

L'utilisation d'un agent protectant nécessite de changer le solvant d'analyse pour solubiliser ces composés très polaires (alcool) dans l'extrait final. Ce solvant d'analyse adapté à l'agent protectant est composé d'acétonitrile et d'une faible quantité d'eau (utilisée pour dissoudre l'agent protectant). Par contre, les solvants d'extraction (hexane et acétone) et des standards commercialisés (cyclohexane, acétone, isoctane) ne sont pas compatibles (non miscibles) avec l'acétonitrile. Une évaporation sera donc nécessaire pour un transfert dans l'acétonitrile des extraits de sol et de la gamme d'étalonnage. La méthode d'injection est également à revoir puisque le volume d'expansion dans l'injecteur GC est plus important avec l'acétonitrile (et quelques 1,5 % d'eau) que le solvant utilisé classiquement. Il sera nécessaire d'optimiser ce volume d'expansion en modifiant les paramètres de l'injecteur (pression de pulse, temps de pulse et volume injecté). Le faible pourcentage d'eau (1,5 %) dans les extraits/gamme d'étalonnage ne nécessite pas son élimination à l'injection (mode PTV split solvant) et n'entraînera pas de dégradation de la colonne.

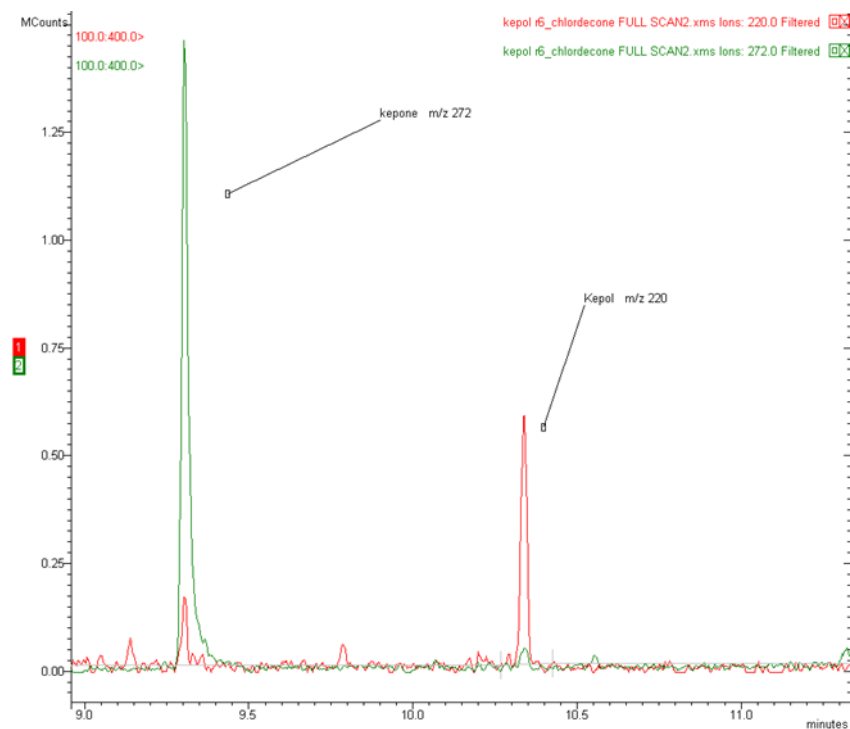


Figure 14 : Présence de kepol (m/z 220) à 10,3 min après injection d'un extrait de sol contenant du CLD (1,4 mg/kg) et ajout d'un agent protectant (D-sorbitol).

Plusieurs paramètres peuvent mettre en évidence l'effet des agents protectants : le modèle de la régression de la courbe d'étalonnage (quadratique/linéaire), la traînée du

pic chromatographique et les rapports des valeurs des pentes entre solvant et matrice de sol (Mastovska *et al.*, 2005 ; Poole, 2007).

Malgré un certain nombre de modification pour évaluer la méthode des agents protectants (méthode injection, solvant d'analyse), les tests ne sont pas concluants puisque l'on constate la formation du képol (ou chlordécol) par réaction des alcools avec la chlordécone (figure 14).

La méthode des agents protectants est donc abandonnée et des essais ont été réalisés par la méthode des ajouts dosés.

- **Choix du standard interne**

Choix du composé

Le standard interne a pour objectif de mimer la molécule d'intérêt pour « supprimer » les effets éventuels lors de l'analyse et de s'affranchir des variations liées à l'injection (température, volume injecté) et à des dérives de l'appareil.

Le composé 2,2',5,6'-Tetrachlorobiphenyl (CB53) est utilisé comme standard interne pour les composés chlorés (cf. Application Note 709 Application book CHROMPACK, p. 169). Il a comme formule $C_{12}H_6Cl_4$; il ne contient que quatre chlores et il ne possède pas de fonction cétone.

Devant le comportement de la chlordécone, nous avons cherché un autre standard plus représentatif de la molécule d'intérêt. Le meilleur choix de standard interne consiste à employer la molécule d'intérêt marquée sur un ou plusieurs atomes, afin de les différencier en spectrométrie de masse. La chlordécone C^{13} est commercialisée. Cet étalon a donc été testé en vue de servir de standard interne pour quantifier la chlordécone et la chlordécone-5bhydro.

Nous avons évalué le comportement de ces deux standards par injection de cinq étalons, cinq extraits de sol Andosol, cinq extraits de sol Nitisol et cinq extraits de sol Ferralsol contenant 50 µg/L en CB53 et 200 µg/L en CLD13 (figure 15).

Le CB53 est peu impacté par la matrice et ses aires relatives sont homogènes avec un coefficient de variation de 8 %.

Le coefficient de variation de la CLD13 est de 34 %. Dans les extraits de sols, son aire diminue jusqu'à 60 % par rapport à la moyenne des 5 standards. Cette variation de signal signifie donc que la CLD13 (ainsi que le CLD) a un comportement différent dans le solvant et dans un extrait de matrice. Le CB53 n'a pas le même comportement que la CLD13 et n'est pas influencé par la présence de la matrice « extrait de sol ».

La CLD13 se révèle donc être le mieux placé par rapport au CB53 pour mimer la molécule d'intérêt et donc de supprimer les effets éventuels lors de l'analyse de la CLD.

L'étalon interne CB53 sera par contre utilisé en standard interne pour quantifier le traceur transnonachlore (utilisé pour quantifier les rendements d'extractions).

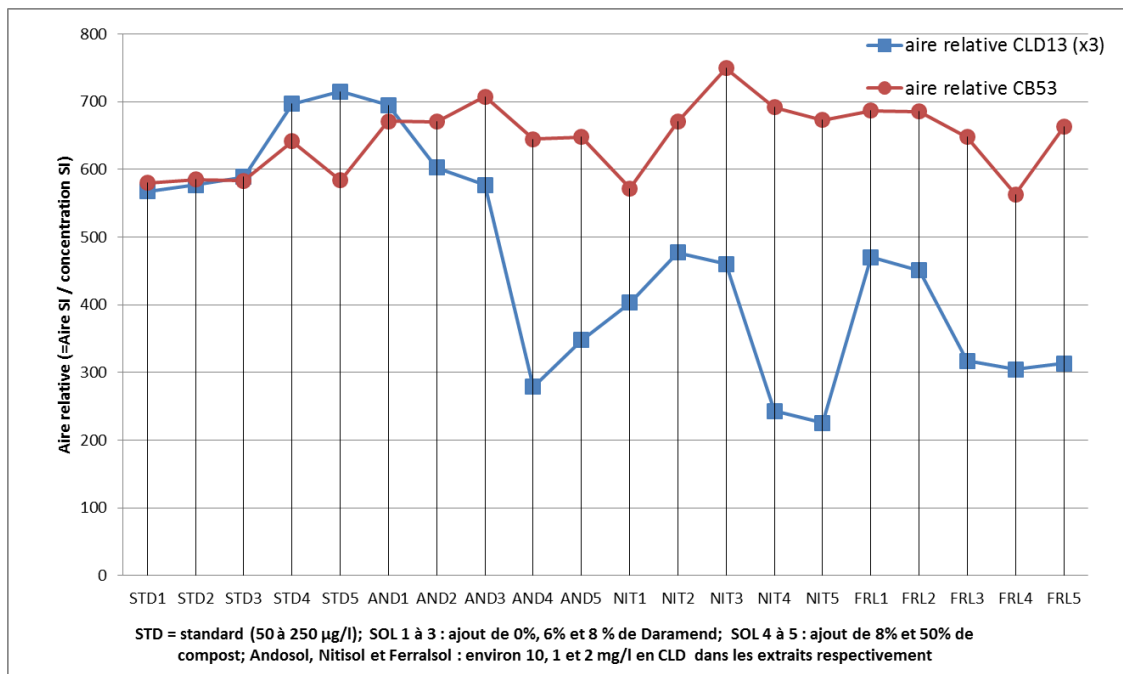


Figure 15 : Influence de la matrice sur l'aire des standards interne CB53 et CLD13.

- **Choix des paramètres de détection du CLDC13 et CLD en spectrométrie de masse**

Du fait de la détection par GC-MS en impact électronique (ionisation du composé avec des électrons), les spectres de masse des composés fournissent de nombreux fragments (ions produits). Le fragment le plus intense pour la chlordécone (ainsi que la chlordécone-5bhydro) et la chlordécone C¹³ correspond au fragment ¹²C₅Cl₆ et ¹³C₅Cl₆. Le tableau suivant (tableau 11) exprime l'abondance de chaque composé en fonction des m/z recherchés.

Les CLD et CLD13 présentent des ions de mêmes masses (m/z de 275 à 283).

Le choix des masses m/z pour quantifier la CLD13 est à définir puisque certaines masses peuvent interférer avec les masses spécifiques de la CLD qui coélué avec son composé marqué.

Les masses les plus importantes/intenses du CLD13 qui interfèrent très peu avec celles de la chlordécone (inférieures à 1 %) sont m/z 279 et 281.

Les ions fils majoritaires obtenus par fragmentation des ions précurseurs m/z 279 et 281 sont les m/z 244 et 246 respectivement. Les deux transitions SRM (selected reaction monitoring) sont donc : 279 > 244 et 281 > 246 pour la chlordécone C¹³.

Lors de la recherche de la chlordécone C¹³, la masse 279 issue de la chlordécone non marqué interfèrera pour 0,455 % du signal chlordécone en chlordécone C¹³.

m/z ¹² C ₅ Cl ₆ Chlordécone	Correspondance : m/z ¹³ C ₅ Cl ₆ =m/z ¹² C ₅ Cl ₆ + 5 Chlordécone C ¹³	Abondance %
270 [M] ⁺	275 [M] ⁺	52,0
271	276	2,90
272	277	100,0
273	278	5,56
274	279	80,0
275	280	4,44
276	281	34,2
277	282	1,90
278	283	8,21
279	284	0,455
280		1,06
281		0,058
282		0,057
283		0,003

Tableau 11 : m/z spécifique de la CLD et CLD13 pour le fragment C₅Cl₆ obtenu en impact électronique.

La masse 281 interfère pour 0,058 % du signal chlordécone en chlordécone C¹³.

Pour la teneur la plus haute en chlordécone dans la gamme d'étalonnage, 250 µg/L, le signal en chlordécone C¹³ sera surestimé de :

- 250 x 0,455 % = 1,1 µg/L pour la masse 279 soit une surestimation de 0,57 % en CLD13 ;
- 250 x 0,058 % = 0,1 µg/L pour la masse 281 soit une surestimation de 0,07 % en CLD13.

Ces valeurs sont négligeables par rapport à la teneur en CLD13 (200 µg/L).

Pour une teneur plus élevée que 250 µg/L en chlordécone (pour quantifier la chlordécone-5bhydro, l'extrait est injecté sans dilution préalable, la teneur la plus élevée en CLD est à 10mg/L dans le sol AND), la chlordécone interfère la chlordécone C¹³ :

- 10 000 x 0,455 % = 45,5 µg/L pour la masse 279 soit une surestimation de 22,8 % en CLD13 ;
- 10 000 x 0,058 % = 5,8 µg/L pour la masse 281 soit une surestimation de 2,3 % en CLD13.

La transition 279 > 244 ne pourra donc pas être utilisée pour quantifier la CLD dans le sol AND.

La transition 281 > 246 sera légèrement surestimée mais reste négligeable (206 µg/L au lieu de 200 µg/L).

Les transitions SRM de quantification et de confirmation pour la chlordécone C¹³ sont 281 > 246 et 279 > 244, respectivement.

La chlordécone C¹³ a été testée dans le cas où l'on souhaite quantifier la chlordécone-5bhydro dans les extraits de sol NIT/FRL/AND, c'est-à-dire sans dilution de l'extrait. Dans ce cas, la chlordécone est à une teneur approximative de 1, 2 et 10 mg/L dans l'extrait. Le standard interne est ajouté à 200 µg/L.

- **La chlordécone seule (figure 16)**

Pour une concentration en chlordécone inférieure ou égale à 10 mg/L, la CLD13 n'est pas détectée (transition 281 > 246).

Seule la CLD est détectée (transition 272 > 237) et permet de confirmer qu'il n'y a pas d'interférence entre la CLD et la CLD13.

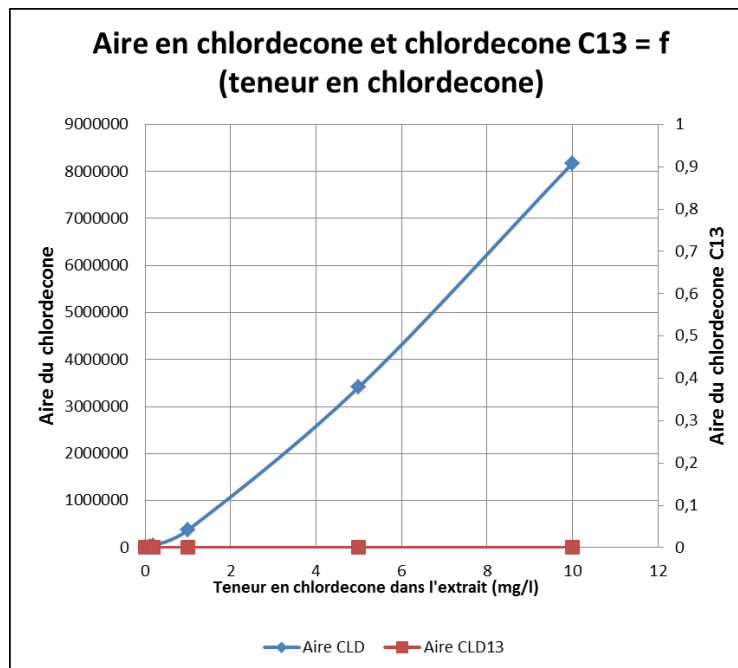


Figure 16 : Détermination de l'aire retrouvée en chlordécone et CLD13 en fonction de la teneur en chlordécone injectée.

- **La chlordécone C¹³ seule**

Un standard contenant uniquement de la CLD13 (200 µg/L) est injecté.

Seule la CLD13 est détectée et permet de confirmer qu'il n'y a pas d'interférence entre la CLD13 et la CLD.

• **En mélange : chlordécone et CLD13**

Six standards contenant de 0 à 10 mg/L en CLD et une concentration fixe de 0,4 mg/L en CLD13 sont analysés (tableau 12).

Concentration chlordécone (mg/L)	Concentration CLD13 (mg/L)	Aire chlordécone retrouvée	Aire CLD13 retrouvée	Aire due à l'interférence du CLD m/z 281 (0,058 %)
0	0,2	0	19000	0
0,1	0,2	25 666	19660	15
0,2	0,2	56 230	19600	33
1,0	0,2	436 480	26344	250
5,0	0,2	3 287 000	40747	1901
10,0	0,2	7 937 000	44020	4600

Tableau 12 : Aire de la CLD13 retrouvée en fonction de la CLD ajoutée (0 à 10 mg/L).

Contrairement aux conclusions des deux tests préalables (CLD13 non détecté pour tes teneurs élevées en chlordécone jusqu'à 10mg/L, aire constante en CLD13 pour un extrait de CLD13 seul à 0,4 mg/L), l'aire du CLD13 augmente pour une teneur élevée en chlordécone > 1 mg/L (figure 17).

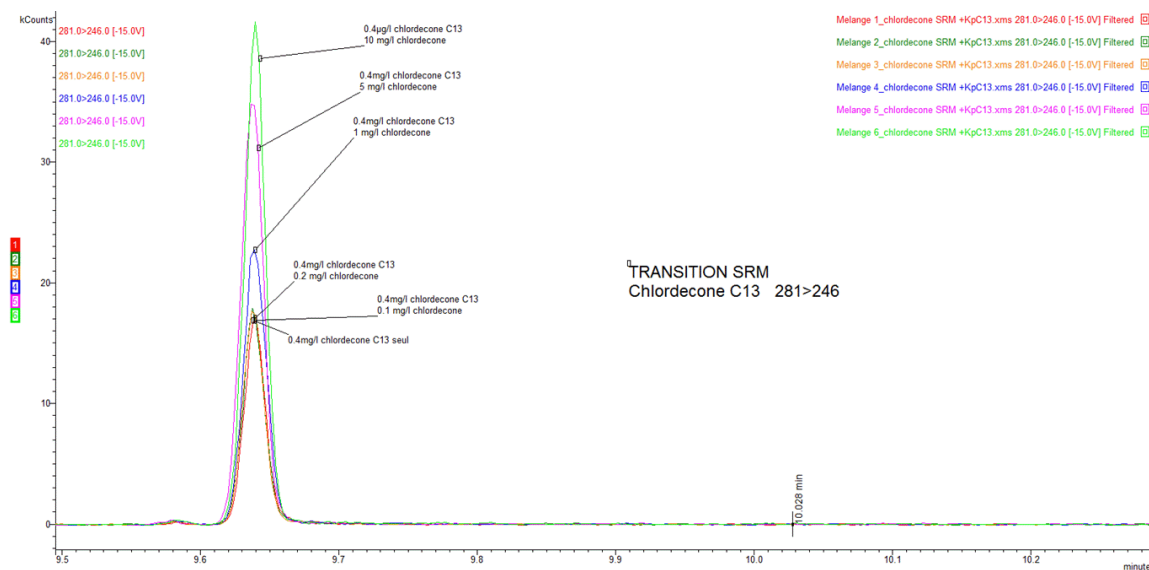


Figure 17 : Évolution de l'intensité du pic de la chlordécone C13 en fonction de l'ajout de la chlordécone (0 à 10 mg/L) pour une même teneur en chlordécone C13 (0,4 mg/L).

Cette augmentation de signal du CLD13 en présence d'une teneur élevée en chlordécone (> 1 mg/L) est expliquée par le fait que la chlordécone à partir de cette teneur joue le rôle « d'agent protectant ».

La chlordécone se fixe sur des sites de l'insert du port d'injection GC et sur la colonne chromatographique (silanol) et par là même augmentent la réponse du CLD13 comparés à sa réponse en solution seul.

Ce phénomène permet seulement de mettre en évidence le comportement de la chlordécone dans le système de chromatographie gazeuse et l'importance du choix du standard interne.

Cet effet n'interfère pas pour la quantification de la chlordécone et chlordécone-5b-hydro puisque ces deux composés seront quantifiés dans une gamme de 0 à 250 µg/L soit des teneurs où le phénomène d'augmentation du signal en CLD13 n'est pas observé.

- **Nécessité des ajouts dosés**

Afin d'évaluer si les effets de matrice sont bien pris en compte avec l'emploi de la chlordécone C¹³, les teneurs en CLD obtenues par une quantification de l'extrait par étalonnage dans le solvant ont été comparées avec celles obtenues par la méthode des ajouts dosés (trois niveaux de concentration ajoutés dans l'extrait).

Cet essai a été conduit avec les échantillons dont la matrice est la plus chargée, à savoir les sols Nitisol, Ferralsol et Andosol auxquels ont été ajoutés 6 et 12 % de Daramend®, simulant trois et six cycles de traitement ; le procédé Biogénie a été simulé par l'ajout de 8 % et 50 % de compost. Tous les sols ont été extraits dans les 48 h après l'ajout des amendements.

Le temps de contact des ajouts de traitement (48 h) au sol n'est pas suffisant pour initier la dégradation.

Pour l'étalonnage avec la chlordécone C¹³, on quantifie la chlordécone dans les cinq extraits de chacun des sols (deux valeurs de Daramend®, deux valeurs de compost, et le sol initial non traité) et on calcule la moyenne et écart-type des cinq résultats.

Pour les ajouts dosés, chacun des cinq extraits est fractionné en quatre : la première fraction n'a aucun ajout, alors qu'on ajoute dans les trois dernières fractions une quantité croissante de chlordécone. Le composé est quantifié en prenant en compte la valeur de la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite formée par ces quatre points. La moyenne et l'écart-type des cinq résultats pour chacun des sols sont ensuite calculés.

Les moyennes des cinq teneurs retrouvées dans les sols pour chaque méthode de quantification sont illustrées à la figure 18.

Les résultats obtenus sur les trois types de sols (figure 18) montrent que l'emploi de la CLD13 suffit pour corriger les effets de matrice. Le recours aux ajouts dosés dans l'extrait n'est donc pas nécessaire pour les analyses de la chlordécone.

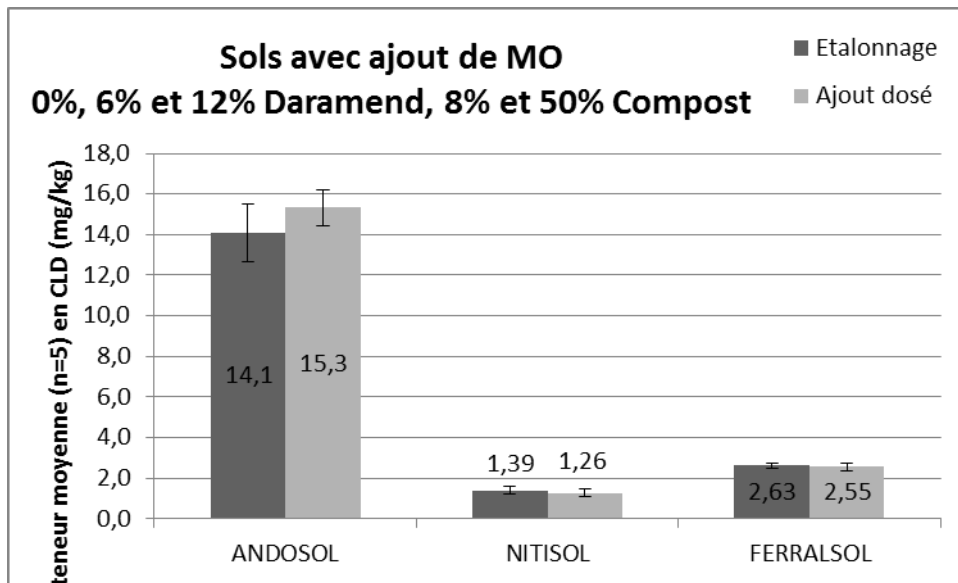


Figure 18 : Teneur moyenne retrouvée (n = 5) par quantification sur base de l'étalon interne CLD13 et par méthode des ajouts dosés dans les trois sols avec ajout de matière organique (barre d'erreur = écart-type associé des cinq valeurs).

La même démarche a été effectuée pour la chlordécone-5bhydro dans le seul sol contenant ce composé : l'andosol. Cet essai est conduit sur deux sols Andosols dont les teneurs en CLD-5bhydro et ajout de traitement Daramend® (0 % pour le sol 1 et 12 % pour le sol 2) sont différents. L'ensemble des essais sont réalisés en triplicat (figure 19).

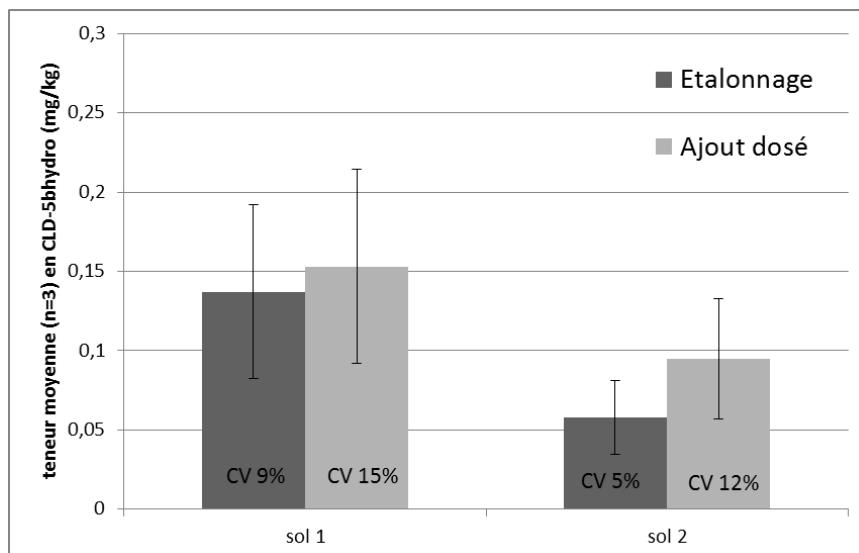


Figure 19 : Moyenne des teneurs retrouvées (n = 3) par étalonnage et ajout dosé en CLD-5bhydro dans un sol Andosol sans ajout de traitement (sol 1) et un autre sol Andosol avec ajout de 12 % du traitement Daramend® (sol 2) avec prise en compte de l'incertitude à 40 % pour ce niveau de concentration.

Le critère de comparaison des deux méthodes est différent de celle de la CLD puisque les teneurs pour la chlordécone-5bhydro sont plus faibles et donc l'incertitude est plus élevée. Par conséquent, une incertitude de 40 % est prise en compte sur les valeurs retrouvées.

Les résultats obtenus par les deux méthodes de quantification ne sont pas significativement différents pour les deux sols avec la prise en compte de 40 % en incertitude de mesure pour ce niveau de concentration. Les coefficients de variation obtenus par analyse en triplicat des sols sont tous inférieures à 15 %.

Le recours aux ajouts dosés dans l'extrait n'est donc pas nécessaire pour la quantification de la chlordécone et CLD-5bhydro.

- **Estimation de la limite de quantification instrumentale de la chlordécone dans le solvant**

Une gamme d'étalonnage de 15 µg/L à 200 µg/L est préparée dans le cyclohexane.

Le modèle de la gamme d'étalonnage (figure 20) est linéaire pour le domaine de 15 à 200 µg/L.

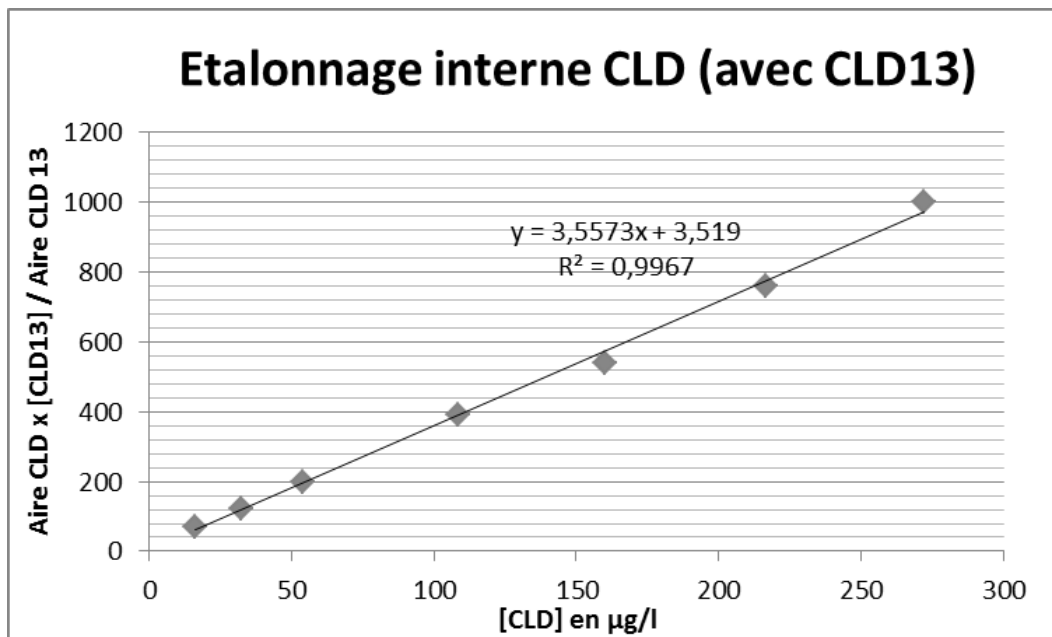


Figure 20 : Étalonnage interne de la CLD avec le standard interne CLD13.

Le 1^{er} point de gamme (15,7 µg/L) est ensuite injecté 10 fois (tableau 13).

Les biais pour la chlordécone entre la concentration préparée et retrouvée sont tous inférieurs ou égaux à 15 %. Le coefficient de variation des dix injections du standard à 15 µg/L est de 7 %.

La limite de quantification dans le sol ramené à l'extrait doit être supérieure au point bas de la gamme d'étalonnage. La valeur choisie est donc de 25 µg/L dans l'extrait. Compte tenu des prises d'essai, cette teneur de 25 µg/L correspond à 0,05 mg/kg dans le sol.

Numéro de l'injection	Concentration préparée (µg/L)	Concentration retrouvée (µg/L)	Biais %
inj1	15,7	17,2	9 %
inj2	15,7	16,5	5 %
inj3	15,7	15,0	-4 %
inj4	15,7	15,0	-5 %
inj5	15,7	14,9	-5 %
inj6	15,7	14,6	-7 %
inj7	15,7	14,2	-9 %
inj8	15,7	14,4	-8 %
inj9	15,7	14,0	-10 %
inj10	15,7	14,1	-10 %

Tableau 13 : Teneur retrouvée et biais % observé pour 10 injections successives d'un standard à 15,7 µg/L en CLD.

La limite de quantification instrumentale de la chlordécone est donc estimée par calcul à partir de cette concentration à 0,05 mg/kg. Ce type de détermination ne tient toutefois pas compte des problèmes de rendement d'extraction, d'interférences matricielles et autres artefacts.

- **Stabilité du système d'injection**

Pour s'assurer de la répétabilité de la mesure obtenue par GC/MSMS, un extrait de sol (Ferralsol) est injecté 10 fois de suite juste après une gamme d'étalonnage.

La moyenne obtenue pour la quantification de la chlordécone avec le standard interne chlordécone C¹³ est de 2,68 ± 0,06 mg/kg, ce qui conduit à un coefficient de variation de 2 % qui confirme la stabilité du système pour des extraits de sol.

b) Essais d'extraction

- **Efficacité de l'extraction dans une matrice « simple/propre »**

Un sable de fontainebleau est dopé en chlordécone à trois niveaux de concentration : 0,1, 1 et 10 mg/kg en triplicat pour s'assurer que la récupération en chlordécone dans une matrice « propre » est satisfaisante. Les niveaux de dopage choisis correspondent à la gamme susceptible d'être rencontrée dans les trois types de sol.

Matrice	Dopage (mg/kg)	Teneur retrouvée (mg/kg)	Taux de récupération %
Niveau 1	0,080	0,087	110 %
	0,069	0,076	111 %
	0,069	0,093	134 %
Niveau 2	0,847	0,816	96 %
	0,841	0,889	106 %
	0,809	0,800	99 %
Niveau 3	8,66	8,12	94 %
	7,83	9,64	123 %
	8,19	8,54	104 %

Tableau 14 : Taux de récupération de la CLD dans les Sables de Fontainebleau après dopage à 0,1, 1 et 10 mg/kg.

Les taux de récupération de la CLD (tableau 14) sont compris entre 94 % et 123 % pour les dopages à 1 et 10 mg/kg. Les valeurs sont comprises entre 110 et 134 % pour les dopages de 0,1 mg/kg (2 fois la limite de quantification instrumentale).

Ces résultats sont similaires aux incertitudes déterminés par la validation pour ces domaines de concentration.

L'efficacité de l'extraction dans une matrice « simple/propre » est donc confirmée.

- **Extraction jusqu'à épuisement des sols de l'étude**

Pour s'assurer que le solvant soit capable d'extraire en une fois l'ensemble des composés d'intérêt sans être saturé, 5 g de chacun des trois sols sont extraits trois fois de suite. Chaque extrait est analysé.

La chlordécone est présente dans la première extraction uniquement. Ces échantillons contiennent 1,2, 2,6 et 12,0 mg/kg pour les sols Nitisol, Ferralsol et Andosol, respectivement. L'absence de détection de chlordécone dans les deuxième et troisième extractions démontre qu'une seule extraction est suffisante et que le solvant d'extraction (hexane/acétone) n'est pas saturé lors de la première extraction, malgré les concentrations élevées présentes dans les sols étudiés.

- **Cas des sols Andosols : fermeture de la microporosité des sols Andosols**

Le sol Andosol est particulier car il contient des allophanes. La fermeture de la nanoporosité de ces sols par séchage serait susceptible de rendre plus difficile l'extraction de la chlordécone. Bien que l'influence du séchage sur la nanoporosité ne se marque à pression atmosphérique qu'à des températures supérieures à 100 °C (T. Woignier, communication personnelle à C. Mouvet, avril 2011), l'effet du séchage à 40 °C a été testé. Le taux d'humidité initial du sol brut est de 60 %.

Un échantillon d'Andosol brut est fractionné en 2 pour une extraction après séchage/broyage et une extraction sur le brut. Les données granulométriques montrent une teneur totale en argile de $23,6 \pm 0,5$ % (n = 3) ; la teneur en allophane n'a pas pu

être déterminée, car elle nécessite des outils et méthodologies qui n'ont pu être mobilisées dans la présente étude.

Les extraits récupérés de l'ASE présentent deux phases dans le cas de l'extraction du sol brut humide. Une première avec de l'hexane et acétone, et la deuxième avec de l'eau et acétone. La phase semi-aqueuse (20 mL) est évaporée sous flux d'azote jusqu'à élimination complète de l'acétone et est extraite par extraction liquide-liquide avec ajout de 2 fois 10 mL d'hexane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées avant analyse (cf. tableau 15).

Andosol	Teneur en chlordécone (mg/kg)
BRUT 1	14,4
BRUT 2	14,8
BRUT 3	14,4
SEC 1	12,6
SEC 2	12,7
SEC 3	12,2

Tableau 15 : Teneur en chlordécone dans l'andosol humide (Brut) et après séchage (Sec).

Compte tenu de l'incertitude ($k = 2$) de 20 % de la chlordécone, les valeurs ne sont pas significativement différentes (tableau 16).

Andosol	Teneur moyenne en chlordécone mg/kg, (n = 3)	Incertitude associée (k = 2)
BRUT	14,5	$\pm 2,9$
SEC	12,5	$\pm 2,5$

Tableau 16 : Teneur moyenne en chlordécone dans les sols bruts et après séchage et l'incertitude associée.

Les extractions seront donc réalisées sur le sol séché à 40 °C pour l'Andosol et les deux autres sols.

3.1.2. Validation

La validation de la méthode est réalisée en utilisant les principes de la norme NF T90210 mai 2009 : « Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire ». L'équivalent de cette norme pour les sols n'existe pas.

a) Étude de la fonction d'étalonnage

Sept niveaux de concentrations (15, 30, 50, 100, 150, 200 et 250 µg/L) pour la chlordécone, chlordécone-5bhydro et transnonachlore sont injectés en cinq répétitions.

Chaque répétition est préparée à partir de solutions indépendantes. Le plan d'expériences de type A (norme NF T-90-210) est appliqué et permet d'évaluer la fonction d'étalonnage dans un domaine d'étalonnage par un test d'adéquation ou une comparaison :

- soit en comparant l'erreur de modèle observée par rapport à l'erreur expérimentale observée ;
- soit en comparant les biais observés à des EMA.

b) Étude de l'étalonnage avec un test d'adéquation

Le plan d'expérience de type A (norme NF T-90-210) est appliqué en considérant uniquement cinq niveaux de concentrations soit 15, 30, 100, 200 et 250 µg/L.

Les étalonnages, retraités par le logiciel, sont des régressions linéaires pondérées en $1/x$.

Le test d'adéquation du modèle linéaire est vérifié pour valider le modèle de régression et le domaine d'étalonnage pour l'ensemble des composés.

Les calculs sont réalisés en portant les concentrations recalculées (obtenues par calcul avec la droite d'étalonnage) par rapport aux concentrations théoriques (figure 21).

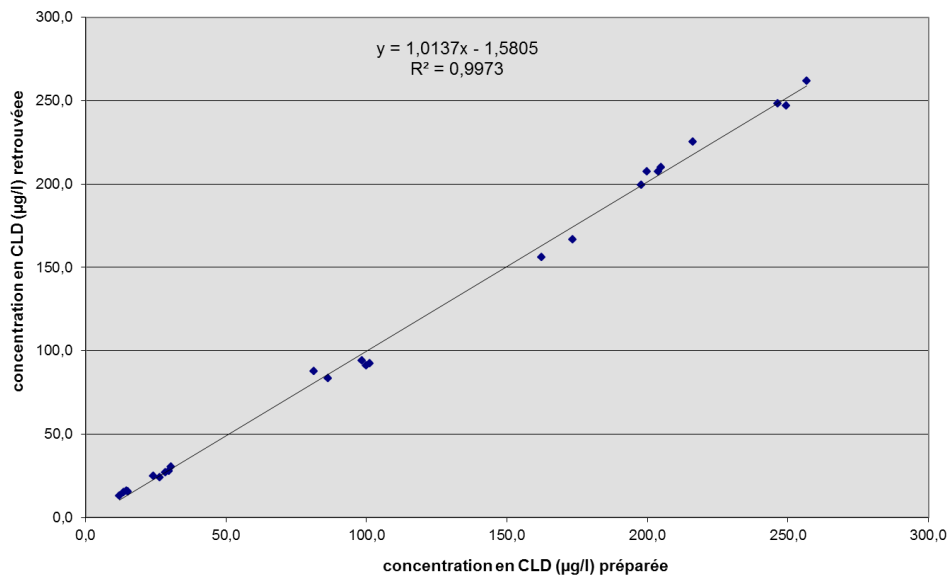


Figure 21 : Concentration en CLD retrouvée (ordonnée) par la droite d'étalonnage en fonction de la teneur préparée (abscisse).

Les calculs pour la validation de la gamme d'étalonnage sont issus de la norme NF T 90-210 et s'appuient sur la valeur du coefficient de corrélation R^2 et s'écrivent $F_{\text{calculé}}$. Les résultats sont présentés dans le tableau 17.

Composés	Source de variation	Fcalculé	Valeur critique au risque $\alpha = 1\%$
CLD	Régression	899,17	8,10
	Erreur de modèle	-5,90	4,94
CLD-5bhydro	Régression	3288,99	8,10
	Erreur de modèle	-4,46	4,94
Transnonachlore	Régression	2622,51	8,10
	Erreur de modèle	-4,78	4,94

Tableau 17 : Valeurs du $F_{calculé}$ et de sa valeur critique au risque α de 1 %.

Le modèle de régression est acceptable si $F_{calculé}$ de la régression est supérieur à la valeur critique. Le domaine d'étalonnage est validé si le $F_{calculé}$ de l'erreur de modèle est inférieur à la valeur critique. Le domaine d'étalonnage de 15 à 250 $\mu\text{g/L}$ et le modèle de régression linéaire sont validés pour tous les composés.

c) Étude de l'étalonnage avec des Ecart Maximaux Autorisés (EMA)

Il s'agit de vérifier que tous les biais observés (écart entre concentration retrouvée et préparée) sur chaque étalon analysé sont acceptables à partir d'un EMA pour chaque composé.

Les sept niveaux de concentrations sont pris en compte de 15 $\mu\text{g/L}$ à 250 $\mu\text{g/L}$.

Les biais observés sont illustrés aux figures 22, 23 et 24 selon les composés en fonction du niveau de concentration.

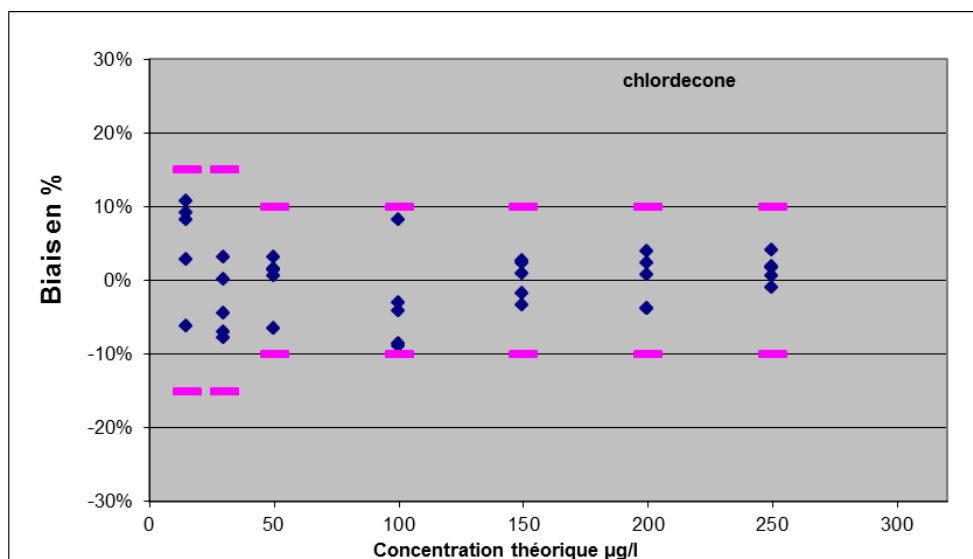


Figure 22 : Biais observés (en %) pour l'étude de l'étalonnage de la chlordécone.

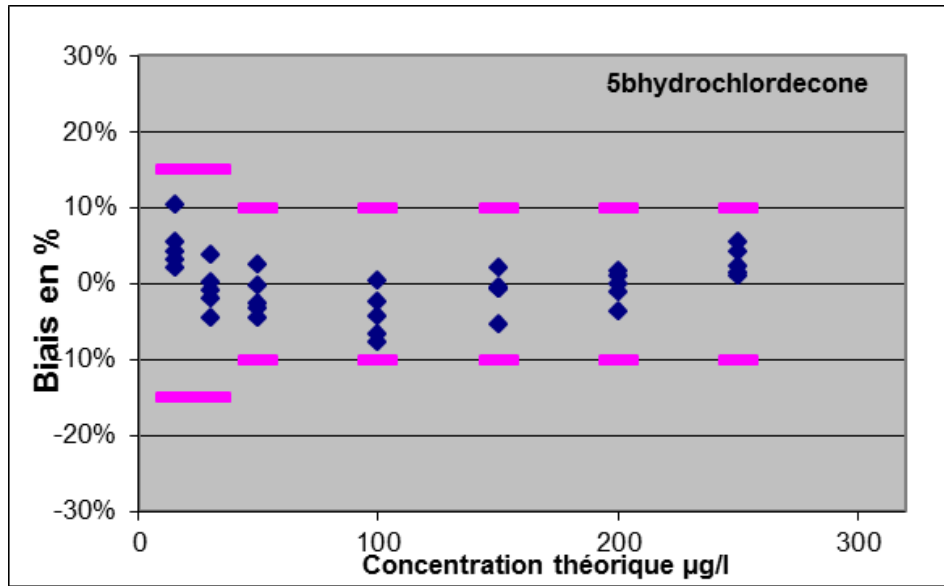


Figure 23 : Biais observés (en %) pour l'étude de l'étalonnage de la chlordécone-5bhydro.

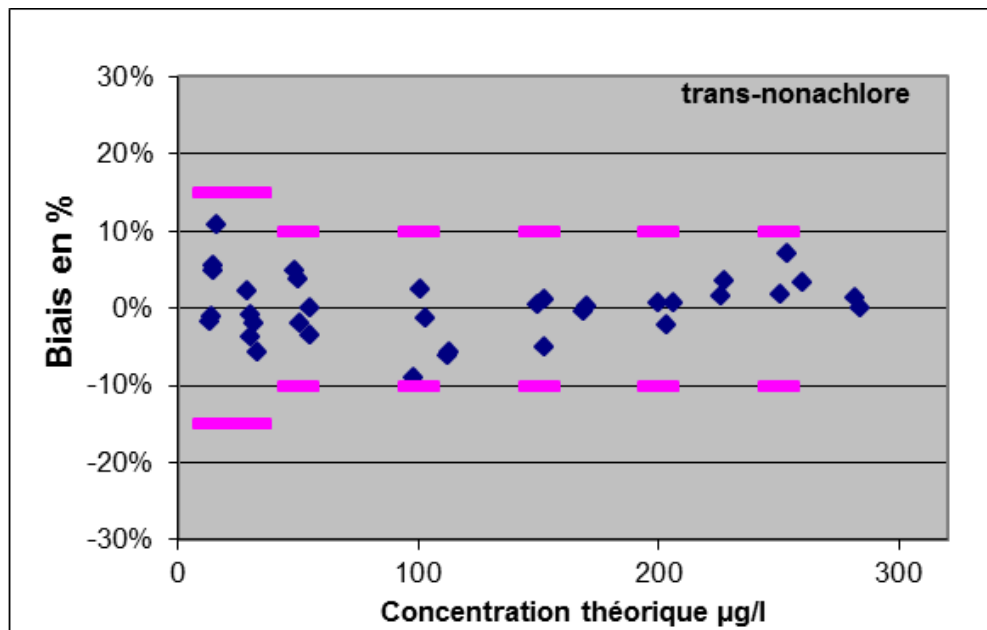


Figure 24 : Biais observés (en %) pour l'étude de l'étalonnage du transnonachlore.

Le biais maximal observé pour les étalonnages est de 11 % pour tous les composés et les niveaux de concentration. Cette valeur est correcte par rapport à d'autres validations de l'étude de l'étalonnage réalisées dans le laboratoire.

Les valeurs d'EMA étant identique pour les trois composés, une seule valeur d'EMA (arrondie au multiple de 5) sur les points d'étalonnage pour le contrôle de l'étalonnage en routine est prise en compte (tableau 18).

Etalonnage	15 à 30 µg/L	> 30 µg/L
Ecart maximal retenu	15 %	10 %

Tableau 18 : EMA autorisés sur les points d'étalonnage.

Les points de gamme en dehors de ces critères ne seront pas pris en compte.

- **Étude de la répétabilité et de la reproductibilité**

Un plan d'expérience, de type profil d'exactitude, est mis en place pour valider au mieux la répétabilité et reproductibilité. Il s'agit d'analyser la variance et calculer des variabilités intra et inter-série conformément à la norme T90-210.

Des sols naturels d'origines différentes, Nitisol, Ferralsol et Andosol correspondant à trois niveaux de concentration différents en chlordécone (1,1, 2 et 16,1 mg/kg), sont analysés sans ajout de matière organique exogène. Il s'agit des sols contrôlés des traitements Daramend® et Biogénie.

La répétabilité (résultat d'essai obtenu par la même méthode, même opérateur, même équipement et même jour) sera prise en compte en doublant l'extraction (deux extractions sur deux échantillons du même lot) sur les trois sols (cf. norme NF-T 90-210). La reproductibilité est prise en compte en réalisant cette série d'extraction à cinq dates différentes.

Les analyses sont faites de façon indépendante entre chacune des cinq séries d'analyse (préparation d'un nouvel étalonnage avec une solution fille différente).

La chlordécone-5bhydro est présente uniquement dans le sol Andosol. Le test de répétabilité et reproductibilité est donc réalisé sur ce seul sol et à un seul niveau de concentration (0,160 mg/kg), celui mesuré dans cet échantillon.

Un traitement statistique a été utilisé pour permettre de déterminer le coefficient de variation de la fidélité intermédiaire (prise en compte de la répétabilité et des essais inter-séries). Ce traitement suit la norme T90-210.

Le tableau 19 suivant reprend les différents résultats de la chlordécone et chlordécone-5bhydro :

n° série	CLD en mg/kg						CLD-5BH en mg/kg	
	Nitisol		Ferralsol		Andosol		Andosol	
	r1	r2	r1	r2	r1	r2	r1	r2
Série 1	1	1,1	1,9	1,93	15,9	15,2	0,155	0,177
Série 2	1,09	1,06	2,06	1,88	16,1	14,7	0,159	0,146
Série 3	1,25	1,24	1,89	1,97	19,2	16,4	0,227	0,189
Série 4	1,14	1,04	2,07	2,13	16,4	14,7	0,134	0,109
Série 5	1,23	1,2	2,09	2,17	18,6	17,1	0,164	0,16

avec : r1, r2 répétabilité 1 et 2

Tableau 19 : Teneurs en chlordécone et chlordécone-5bhydro dans les trois sols obtenues en répétabilité (extraction doublé) et en reproductibilité (cinq jours différents = cinq séries).

Les variations en répétabilité, reproductibilité et fidélité intermédiaire sont calculés (tableau 20) à partir de l'ensemble de ces résultats.

Paramètre statistique	CLD en mg/kg			CLD-5BH en mg/kg
	Nitisol	Ferralsol	Andosol	Andosol
Moyenne (n=10)	1,14	2,01	16,1	0,162
S_r / CV_r	0,05 / 4 %	0,07 / 4 %	1,3 / 8 %	0,017 / 10 %
S_R / CV_R	0,08 / 7 %	0,09 / 4 %	0,7 / 4 %	0,029 / 18 %
S_{Fi} / CV_{Fi}	0,09 / 8 %	0,11 / 6 %	1,5 / 9 %	0,033 / 20 %

avec : S_r , écart-type de répétabilité ; S_R écart-type inter-série ; S_{Fi} écart-type de fidélité intermédiaire ; CV_r coefficient de variation de répétabilité ; CV_R coefficient inter-série ; CV_{Fi} coefficient de variation de fidélité intermédiaire.

Tableau 20 : Variabilité des résultats de la chlordécone et chlordécone-5bhydro dans les trois sols en répétabilité (extraction doublée), reproductibilité (cinq jours différents) et fidélité intermédiaire (repet/repro).

Les coefficients de variations de fidélité intermédiaire (répétabilité et reproductibilité) sont inférieurs à 10 % pour les trois niveaux de concentrations en CLD (1, 2 et 16 mg/kg) dans les trois sols.

Le coefficient de variation du chlordécone-5bhydro est plus élevé avec 20 % pour une teneur de 0,15 mg/kg.

Les incertitudes ($k = 2$) arrondies à partir de ces résultats sont : 15 %, 10 % et 20 % pour les sols Nitisol, Ferralsol et Andosol pour une teneur de 1 à 16 mg/kg.

L'incertitude ($k = 2$) est estimée à 40 % pour une teneur de 0,15 mg/kg (soit trois fois la limite de quantification instrumentale).

- **Étude de l'efficacité de l'extraction**

L'efficacité de l'extraction est évaluée par dopage d'échantillons non contaminés, prélevés en Martinique spécialement pour cette occasion avec l'appui logistique et scientifique de l'IRD et du CIRAD du PRAM (tous nos remerciements à L. Rangon, T. Woignier et H. Macarie). L'analyse de ces échantillons a montré des teneurs en chlordécone inférieures à 0,05 mg/kg pour le Nitisol et l'Andosol, mais une teneur non négligeable, 0,23 mg/kg, pour le Ferralsol.

Le dopage est réalisé par ajout d'une solution à 2,5 et 50 mg/L de la chlordécone (dans l'acétone) dans 5 g de sol contenu dans la cellule d'extraction PFE. Le volume ajouté est dépendant de la valeur de dopage du sol (0,1 à 1 mL).

Les niveaux de dopage correspondent aux ordres de grandeur des teneurs retrouvées dans les sols du projet : 0,1 à 1 mg/kg pour les sols NIT et FRL, et 10mg/kg pour le sol AND.

Pour comparer l'efficacité de l'extraction sur ces trois sols, des niveaux de dopage doivent être en commun. Les niveaux 10 mg/kg pour les sols NIT et FRL et 1 mg/kg pour le sol AND sont ajoutés dans ce but.

Pour le Nitisol et le Ferralsol, les dopages sont réalisés sur cinq niveaux de concentration de 0,1 à 10 mg/kg en duplicat.

Pour l'Andosol, les teneurs en CLD du sol sont réalisés sur deux niveaux de concentration de 1 à 10 mg/kg en duplicat.

Les résultats par sol sont donnés aux tableaux 21 à 23.

Le rendement d'extraction moyen est de 123 % \pm 15 % pour un dopage de 0,1 à 10 mg/kg dans le Nitisol. Les valeurs les plus élevées sont pour les niveaux de dopages les plus faibles.

Le rendement d'extraction moyen est de 113 % \pm 20 % pour un dopage de 0,1 à 10 mg/kg dans le Ferralsol.

Dopage en CLD (mg/kg)	Teneur retrouvée (mg/kg)	Taux de récupération du CLD %
0,12	0,16	138 %
0,11	0,16	140 %
0,26	0,35	133 %
0,27	0,28	103 %
0,53	0,71	134 %
0,50	0,65	131 %
1,08	1,31	122 %
1,11	1,33	119 %
9,60	9,80	102 %
9,89	10,37	105 %

Tableau 21 : Taux de récupération de la chlordécone dans le Nitisol (deux réplicats par niveau).

Dopage en CLD (mg/kg)	Teneur retrouvée (mg/kg)	Taux de récupération du CLD %
0,11	0,12	107 %
0,11	0,12	110 %
0,26	0,34	132 %
0,26	0,17	66 %
0,51	0,69	136 %
0,49	0,65	134 %
1,19	1,22	103 %
1,03	1,25	122 %
9,86	10,84	110 %
9,44	10,48	111 %

Tableau 22 : Taux de récupération de la chlordécone dans le Ferralsol (deux réplicats par niveau).

Dopage en CLD (mg/kg)	Teneur retrouvée (mg/kg)	Taux de récupération du CLD %
1,13	1,14	101 %
1,07	0,88	82 %
9,58	8,29	87 %
10,00	9,88	99 %

Tableau 23 : Taux de récupération de la chlordécone dans l'Andosol (deux répliquats par niveau).

Le rendement d'extraction moyen est de 92 % ± 9 % pour un dopage de 1 à 10 mg/kg dans l'Andosol.

- **Nitisol, Ferralsol et Andosol**

Pour évaluer l'efficacité de l'extraction sur les trois sols et l'ensemble des niveaux de concentration, des biais (%) sont calculés pour l'ensemble des données et sont comparés entre eux (Biais % = (teneur retrouvée – teneur théorique) x 100 / teneur théorique).

Les incertitudes estimées (40 % pour une teneur de l'ordre de 0,15 mg/kg et de 20 % (incertitude la plus élevée des trois sols) pour des teneurs de 1 à 16 mg/kg) sont comparées aux biais observés pour évaluer l'efficacité de la méthode sur le domaine de 0,1 à 10 mg/kg des trois sols (figure 25).

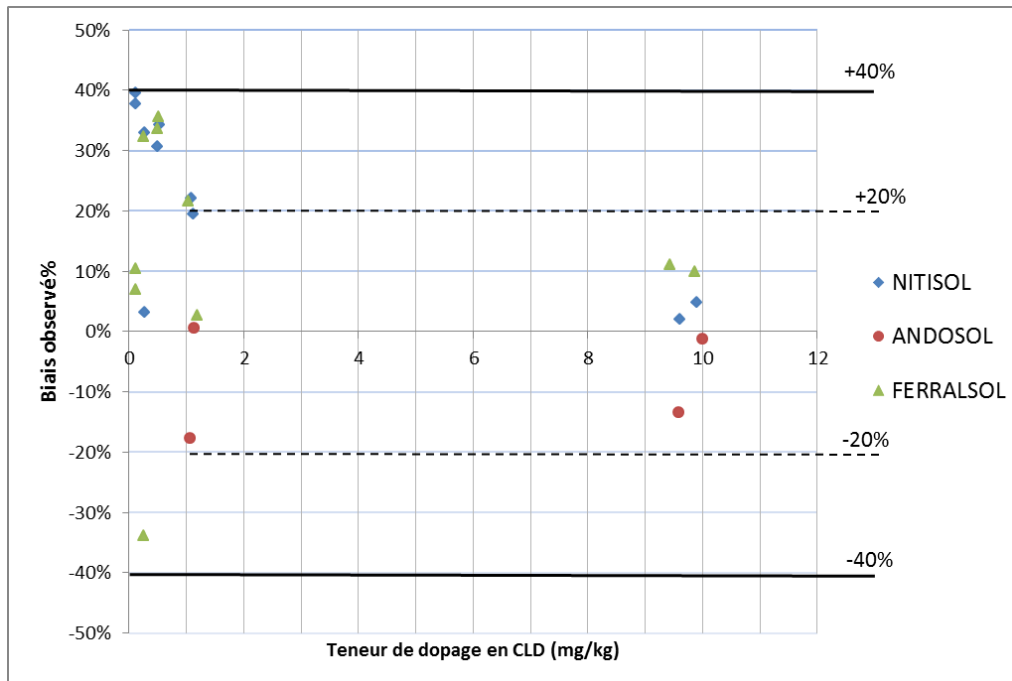


Figure 25 : Biais observés en fonction du type de sol et de la teneur en CLD.

L'ensemble des biais sont compris entre ± 40 % pour les dopages de 0,1 à 0,5 mg/kg pour les trois sols.

L'ensemble des biais sont compris entre ± 20 % pour les dopages de 1 à 10 mg/kg pour la plupart des sols Nitisol, Ferralsol et Andosol. L'incertitude de mesure de 20 % ne prend pas en compte l'incertitude du dopage en CLD (estimée à 2 %).

L'ensemble des dopages en CLD réalisés sur les trois sols sont retrouvés en prenant en compte les incertitudes de mesure. La méthode est efficace et aucune correction ne sera prise en compte pour corriger la teneur en chlordécone.

- **Étude de la spécificité**

Les essais réalisés pendant la pré-validation « nécessité des ajouts dosés » ont permis dans un premier temps d'évaluer la spécificité de la méthode pour les trois sols étudiés lorsqu'ils sont soumis à des ajouts de matière organique exogène. Une comparaison de ces teneurs en chlordécone a été réalisée par une quantification de l'extrait par étalonnage dans le solvant et par la méthode des ajouts dosés (trois niveaux de concentration de dopage + l'extrait direct non dopé).

Les résultats ont montré que les ajouts dosés ne sont pas nécessaires et que l'utilisation de la CLD C13 comme étalon interne est suffisante pour prendre en compte les effets de matrice.

Cette spécificité est également évaluée en comparant les résultats de l'efficacité de l'extraction sur les trois sols dans le domaine des teneurs des sols du projet. La méthode est considérée efficace pour l'ensemble des sols.

La spécificité est ensuite évaluée en comparant l'influence de l'ajout de matière organique due aux procédés de traitement (Biogénie 8 et 50 % en compost, et Daramend[®] 6 %, 12 % et 20 %) sur la détermination de la teneur en CLD dans les trois sols.

Tous les sols sont préparés le même jour à partir d'une souche identique de chacun des sols.

La dilution par l'ajout de matière organique est prise en compte dans les résultats.

Les résultats pour chacun des sols sont donnés aux tableaux 24, 25 et 26.

Sol Andosol	Teneur en chlordécone (mg/kg)	Teneur en chlordécone-5bhydro (mg/kg)
0 %	14,3	0,143
6 % Daramend®	14,0	0,116
12 % Daramend®	15,9	0,129
20 % Daramend®	17,0	0,173
8 % compost	13,5	0,117
50 % compost	18,0	0,152

Tableau 24 : Teneur en CLD mesurée sans et avec ajout de matière organique exogène dans l'andosol.

Sol Nitisol	Teneur en chlordécone (mg/kg)	Teneur en chlordécone-5bhydro (mg/kg)
0 %	1,29	< 0,05
6 % Daramend®	1,11	< 0,05
12 % Daramend®	1,08	< 0,05
20 % Daramend®	1,15	< 0,05
8 % compost	1,12	< 0,05
50 % compost	1,29	< 0,05

Tableau 25 : Teneur en CLD mesurée sans et avec ajout de matière organique exogène dans le nitisol.

Sol Ferralsol	Teneur en chlordécone (mg/kg)	Teneur en chlordécone-5bhydro (mg/kg)
0 %	2,12	< 0,05
6 % Daramend®	2,24	< 0,05
12 % Daramend®	2,44	< 0,05
20 % Daramend®	2,40	< 0,05
8 % compost	2,80	< 0,05
50 % compost	2,52	< 0,05

Tableau 26 : Teneur en CLD mesurée sans et avec ajout de matière organique exogène dans le ferralsol.

Les résultats sont représentés graphiquement (figures 26, 27, 28 et 29) en y ajoutant l'incertitude ($k = 2$) de la répétabilité/reproductibilité de la méthode, soit pour la chlordécone 20 % pour l'andosol, 15 % pour le nitisol et 10 % pour le ferralsol, et 40 % pour la chlordécone-5bhydro dans l'andosol.

L'ensemble des teneurs dans les trois sols avec ajout de matière organique sont équivalentes à la teneur du sol natif (sans ajout) puisque ces valeurs (avec l'incertitude associée) sont comprises dans la barre d'incertitude du sol sans ajout (0 %).

La méthode est donc considérée spécifique pour les trois sols avec les ajouts de matière organique du procédé Daramend® et Biogénie.

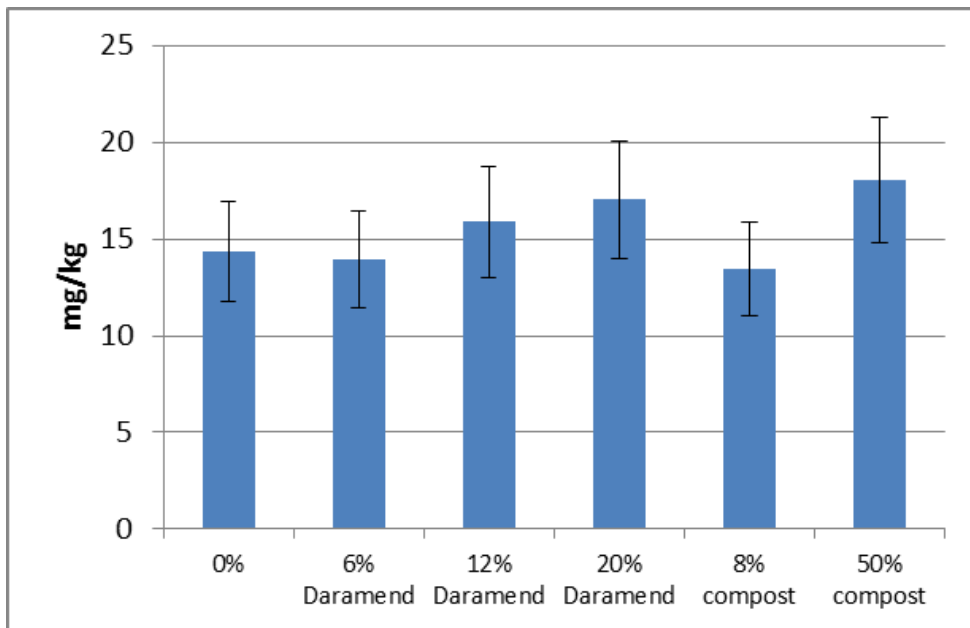


Figure 26 : Teneur en CLD mesurée dans l'andosol sans et avec ajout de matière organique (barre d'erreur = 20 %).

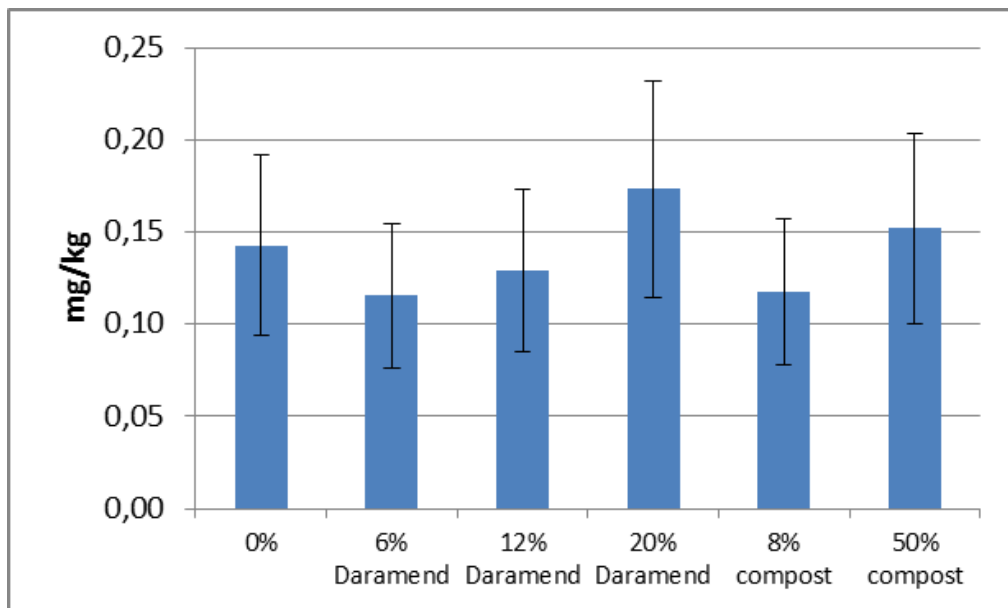


Figure 27 : Teneur en CLD-5bhydro mesurée dans l'andosol sans et avec ajout de matière organique (barre d'erreur = 40 %).

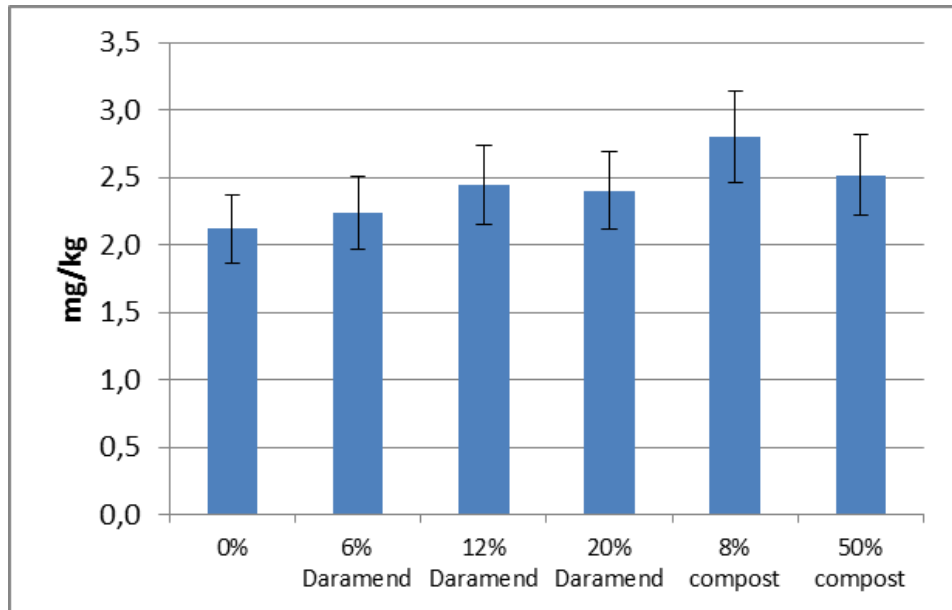


Figure 28 : Teneur en CLD mesurée dans le ferral sol sans et avec ajout de matière organique (barre d'erreur = 10 %).

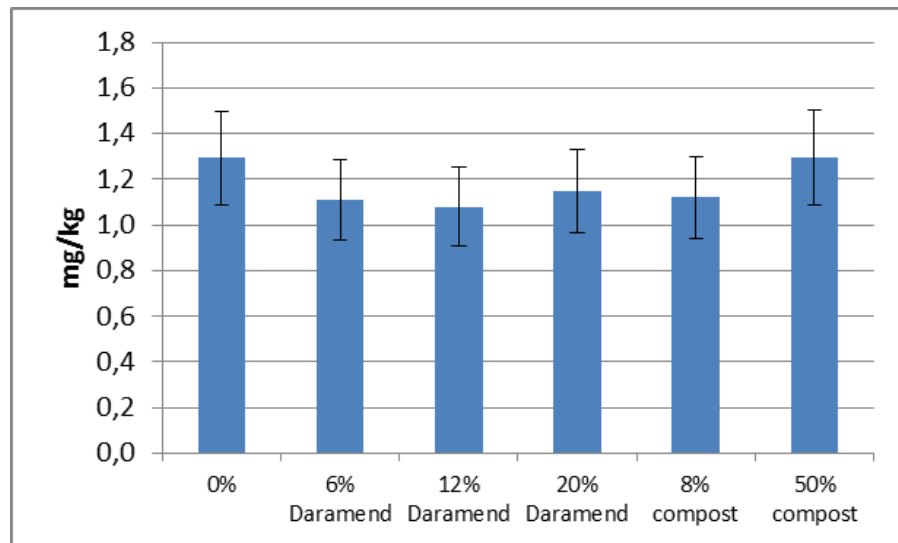


Figure 29 : Teneur en CLD mesurée dans le nitisol sans et avec ajout de matière organique (barre d'erreur = 15 %).

- **Évaluation de la limite de quantification**

La limite de quantification instrumentale est de 0,05 mg/kg en chlordécone. Cette limite de quantification n'a pas pu être validée complètement, pour des raisons de calendrier, avec des sols réels du projet. Elle sera déterminée dans le cadre de la seconde convention liant le MEDDTL/DGPR/BPED et le BRGM sur le sujet chlordécone ; le rapport de cette étude est prévu en juin 2012.

L'objectif est de vérifier qu'une limite de quantification estimée est acceptable. L'acceptabilité est basée par convention sur son exactitude, évaluée par dopage des sols à sa valeur estimée.

Pour évaluer si cette limite de quantification instrumentale est bien choisie, les résultats obtenus lors du test de l'efficacité de l'extraction sont utilisés (dopages à 0,1 et 0,25 mg/kg, tableau 27).

Sol	Dopage en chlordécone (mg/kg)	Teneur retrouvée (mg/kg)	Rendement d'extraction %
Nitisol	0,12	0,17	138 %
	0,11	0,16	140 %
	0,27	0,35	133 %
	0,27	0,28	103 %
Ferralsol	0,11	0,12	107 %
	0,11	0,12	110 %
	0,26	0,34	132 %
	0,26	0,17	66 %

Tableau 27 : Rendement d'extraction après dopage à 0,1 et 0,25 mg/kg en CLD du sol NIT et FRL.

Les rendements pour ces huit extractions réalisées à des concentrations égales à 2 fois (0,1 mg/kg) et 5 fois (0,25 mg/kg) la limite de quantification instrumentale sont compris entre 66 % et 140 %.

L'incertitude ($k = 2$) évaluée à partir de l'efficacité de la répétabilité/reproductibilité sur l'andosol pour la chlordécone-5bhydro a été évaluée à 40 % pour une teneur de 0,15 mg/kg. L'incertitude est moindre (10 à 20 %) pour des teneurs 10 à 100 fois plus élevées, telles que celles observées pour la chlordécone dans l'andosol.

En prenant en compte cette valeur d'incertitude, l'ensemble des ajouts retrouvés pour le dopage du nitisol et ferralsol à 0,1 et 0,25 mg/kg sont compris dans cette valeur d'incertitude de 40 %. L'exactitude est donc vérifiée à ces concentrations pour ces deux sols.

La norme NF T 90-210 fait référence à un écart maximal acceptable de 60 % de la LQ. Cette valeur est bien supérieure à l'incertitude pris en compte dans notre cas (40 %) pour évaluer l'exactitude du résultat à 0,1 et 0,25 mg/kg.

Les résultats obtenus pour évaluer la limite de quantification semblent montrer que la limite de quantification de 0,05 mg/kg est réaliste.

- **Détermination de l'incertitude**

L'incertitude a été évaluée lors de l'évaluation de la répétabilité/reproductibilité sur les trois sols en CLD et CLD-5bhydro. Ces valeurs arrondies sont de 15 %, 10 % et 20 % pour les sols nitisol (1 mg/kg), ferralsol (2 mg/kg) et andosol (16 mg/kg) respectivement.

L'incertitude de 20 % a été prise en compte pour valider la méthode lors du test d'efficacité. L'incertitude globale pour une teneur de 1 à 16 mg/kg est donc estimée à 20 %. L'incertitude pour une teneur faible de 0,15 mg/kg est évaluée à 40 %.

3.2. CARACTÉRISATIONS DES SOLS

3.2.1. Paramètres physico-chimiques majeurs

Les résultats (tableau 28) montrent une très bonne homogénéité des lots de sols générés par le préconditionnement, avec des coefficients de variation inférieurs à 6 % pour les paramètres physico-chimiques, et au maximum de 17 % pour le paramètre « sable fin » dans le ferralsol.

L'andosol se caractérise par une très forte teneur en matière organique, 13,4 % (environ 4 fois supérieure à celle des deux autres sols), un pH franchement acide : 4,8 pour le pH KCl, 5,3 pour le pH eau (les deux autres sols ont des pH KCl compris entre 4,9 et 5,2, et des pH eau entre 5,6 et 6,1) et une CEC de 38 meq/100 g, 2,2 fois supérieure à celle du ferralsol, et 1,4 fois supérieure à celle du nitisol, bien que la teneur en argile granulométrique de l'andosol soit nettement inférieure à celle du ferralsol et du nitisol.

Sol	CEC meq/100 g	pH eau	pH KCl	CaCO3 %	mat. org. %	N total %	C/N argiles %	limons		sables		Al % sec	Fe % sec	
								limons fins %	limons gros %	sables fins %	sables gros %			
Andosol 1	36,7	5,3	4,8	<0,1	13,6	0,7	11	23,9	18,9	25,3	7,2	11,2	9,2	7,4
Andosol 2	39,9	5,3	4,8	0,2	13,2	0,7	11,2	23,0	20,2	29,0	5,3	9,1	9,2	7,9
Andosol 3	35,8	5,3	4,8	0,2	13,5	0,7	11,3	23,8	20,0	26,8	6,3	9,3	8,9	7,5
<i>moyenne</i>	37,5	5,3	4,8	0,2	13,4	0,7	11,2	23,6	19,7	27,0	6,3	9,9	9,1	7,6
<i>écart-type</i>	2,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2	0,5	0,7	1,9	1,0	1,2	0,2	0,3
<i>CV (%)</i>	5,8	0,0	0,0	0,0	1,5	2,5	1,4	2,1	3,6	6,9	15,2	11,7	2,3	3,3
Ferralsol 1	16,9	5,5	4,9	<0,1	3,8	0,2	9,7	57,8	16,7	15,0	3,0	3,7	11,2	11,2
Ferralsol 2	17,6	5,6	4,8	<0,1	3,8	0,2	10,7	61,8	16,3	11,0	2,2	5,0	11,7	10,9
Ferralsol 3	17,2	5,6	4,9	<0,1	4,0	0,2	11	57,7	16,2	15,0	3,0	4,1	11,7	11,4
<i>moyenne</i>	17,2	5,6	4,9	<0,1	3,9	0,2	10,5	59,1	16,4	13,7	2,7	4,3	11,5	11,1
<i>écart-type</i>	0,4	0,1	0,1	<0,1	0,1	0,0	0,7	2,3	0,3	2,3	0,5	0,7	0,3	0,3
<i>CV (%)</i>	2,0	1,0	1,2		3,0	5,3	6,5	4,0	1,6	16,9	16,9	15,6	2,5	2,4
Nitisol 1	27,0	6,1	5,2	0,2	3,7	0,2	11,6	37,2	24,2	18,0	6,7	9,9	10,4	9,0
Nitisol 2	27,0	6,1	5,2	<0,1	3,7	0,2	10,9	39,3	24,8	16,3	6,6	9,2	10,6	9,0
Nitisol 3	27,0	6,1	5,2	<0,1	3,7	0,2	11,4	36,8	25,6	17,8	7,4	8,8	10,2	9,5
<i>moyenne</i>	27,0	6,1	5,2	0,2	3,7	0,2	11,3	37,8	24,9	17,4	6,9	9,3	10,4	9,2
<i>écart-type</i>	0,0	0,0	0,0	<0,1	0,0	0,0	0,4	1,3	0,7	0,9	0,4	0,6	0,2	0,3
<i>CV (%)</i>	0,0	0,0	0,0		0,0	11,4	3,2	3,6	2,8	5,4	6,3	6,0	2,0	3,1

Tableau 28 : Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur trois réplicats de chacun des trois sols après pré-conditionnement manuel (démontage, enlèvement des racines et cailloux).

3.2.2. Teneurs initiales en chlordécone

Les analyses confirment la contamination des parcelles échantillonnées, avec des concentrations en chlordécone de $15,92 \pm 0,84$ mg/kg ($n = 3$) pour l'andosol, $1,71 \pm 0,05$ mg/kg ($n = 3$) pour le ferralsol, et $1,02 \pm 0,06$ mg/kg ($n = 3$) pour le nitisol. Toutes ces valeurs dépassent, pour le sol correspondant, les concentrations susceptibles d'engendrer un fort risque de dépassement des teneurs maximales admissibles dans les productions végétales (Cabidoche *et al.*, 2006). La variabilité des triplicats est nettement supérieure à celle observée pour les paramètres physico-chimiques majeurs ; cette plus forte hétérogénéité peut résulter à la fois de la variabilité intrinsèque de la distribution de la chlordécone même dans des sols broyés à $< 250 \mu\text{m}$, et de la variabilité des analyses de chlordécone dans les sols.

3.2.3. Teneurs en pesticides autres que la chlordécone

Une prestation analytique commanditée au LDA26 a consisté en l'analyse de 226 pesticides (cf. ann. 5) dans les sols contrôles avant le début des procédés de traitement (contrôle cycle 0). Seul le HCH Alpha et le HCH Beta sont retrouvés (0,02 mg/kg) dans un des triplicats du sol Ferralsol. Le diuron n'est pas détecté alors qu'il était, sur base des pratiques agricoles en Guadeloupe, susceptible d'être présent. Les limites de quantification fournies par le LDA sont de 0,01 mg/kg pour le HCH Alpha et Beta, et 0.05 mg/kg pour le diuron.

3.3. PROCÉDÉ ISCR DARAMEND MIS EN ŒUVRE AVEC LES SOCIÉTÉS VALGO/ADVENTUS

L'ISCR (*In Situ* Chemical Reduction) est une technique qui combine les processus physiques, chimiques et microbiologiques pour créer des très fortes conditions réductrices dans le sol ($E_h < 500$ mV) de façon à stimuler une déchloration rapide et complète des solvants organiques et autres composés récalcitrants (Abbey *et al.*, 2003 ; Dolfing *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2010 ; Phillips *et al.*, 2004, 2005, 2006 ; Seech *et al.*, 2008).

3.3.1. Suivi de la teneur en oxygène dans les gaz des sols

Des sondes ont été installées dans les mésocosmes afin de suivre l'évolution de la teneur en oxygène au cours du traitement. Celles-ci ont été mises en place au début de la phase anaérobie du cycle 3. La teneur en oxygène dans le sol à une profondeur de -60 cm augmente en fonction du temps (il passe de 0,47 % à 5,69 % en trois semaines) dans le cas de l'andosol (figure 30). La teneur en oxygène à 10 cm de la surface du mésocosme augmente de 2 % à 8,39 % en 3 semaines. Au cours de ce cycle, les conditions d'anaérobiose ne se sont pas maintenues. Par contre, la mise en aérobie du sol est efficace car la teneur en oxygène aussi bien à 10 cm qu'à 60 cm de profondeur est comprise entre 18 et 20 %.

Pour le cycle 4, la difficulté de maintenir des conditions d'anaérobiose est accentuée car après 3 semaines, la teneur en oxygène à 60 cm de profondeur est comprise entre 7,9 et 10,7 %. À 10 cm de la surface du mésocosme, la teneur en oxygène est comprise entre 10 et 12 %. Par contre, pour les deux derniers cycles, les conditions d'anaérobiose se sont maintenues avec une teneur en oxygène inférieure à 2 % en fin de phase anaérobie.

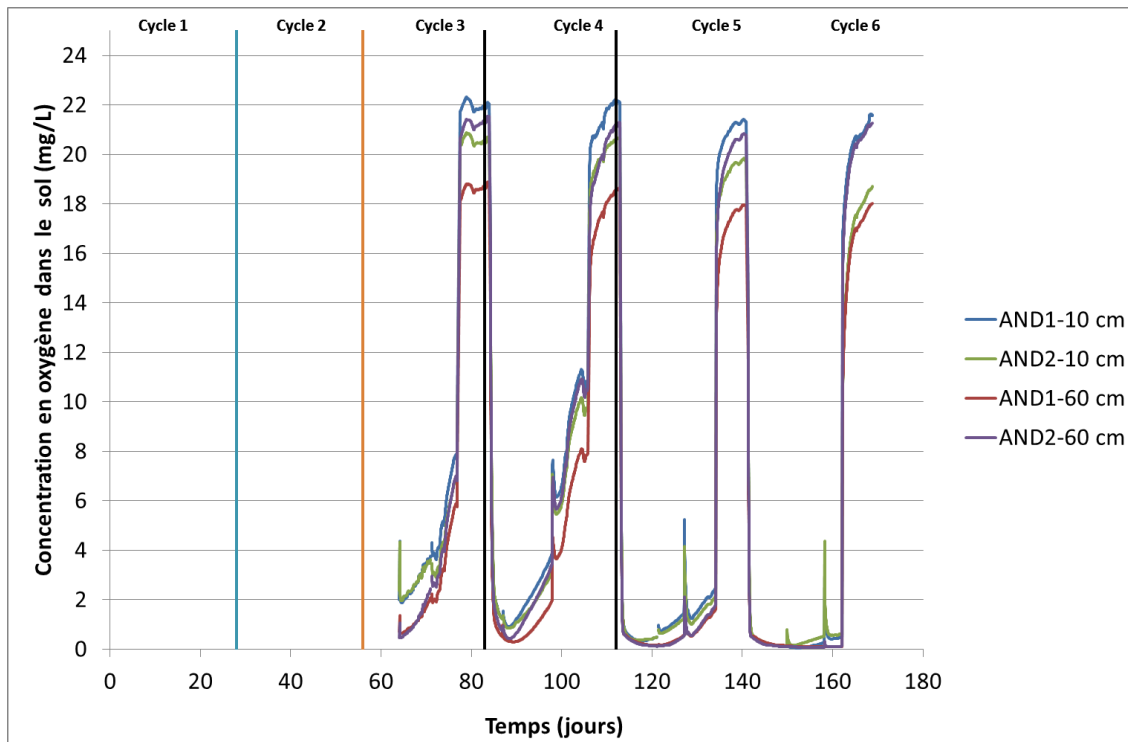


Figure 30 : Évolution de la teneur en oxygène dans l'andosol traité par DARAMEND® au cours du temps à deux profondeurs (-10 cm et -60 cm par rapport à la surface du sol dans le mésocosme).

Dans le cas du ferralsol (figure 31) et du nitisol (figure 32), la teneur en oxygène dans le mésocosme quelle que soit la profondeur, est proche de 0 % ce qui reflète bien la mise en anaérobiose du sol durant les phases anaérobies.

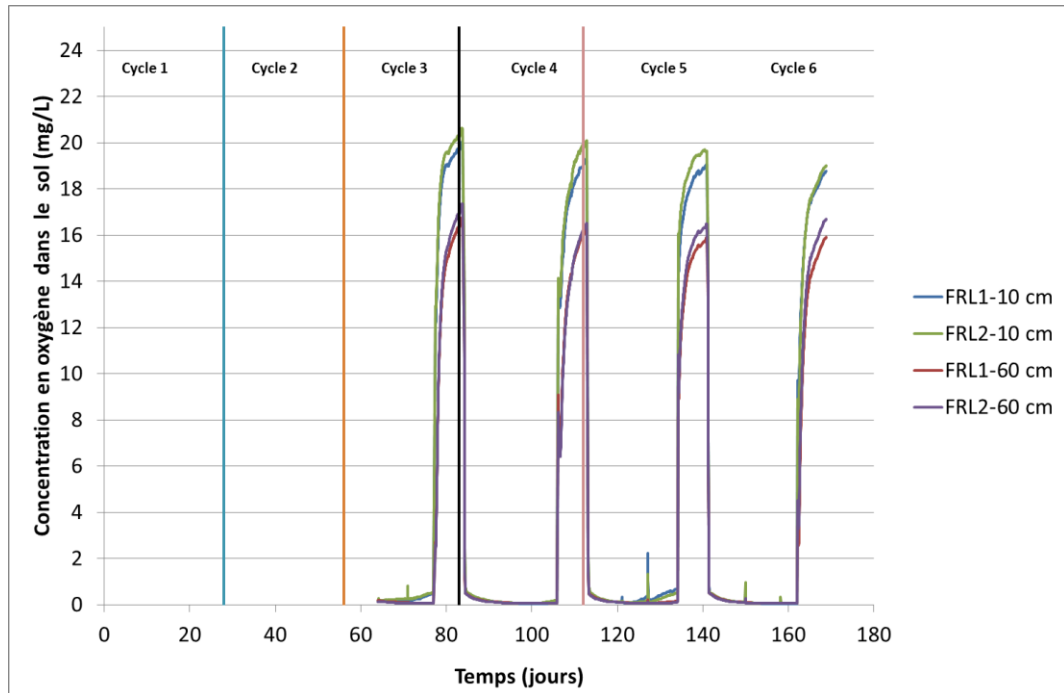


Figure 31 : Évolution de la teneur en oxygène dans le ferral sol traité par DARAMEND® au cours du temps à deux profondeurs (-10 cm et -60 cm par rapport à la surface du sol dans le mésocosme).

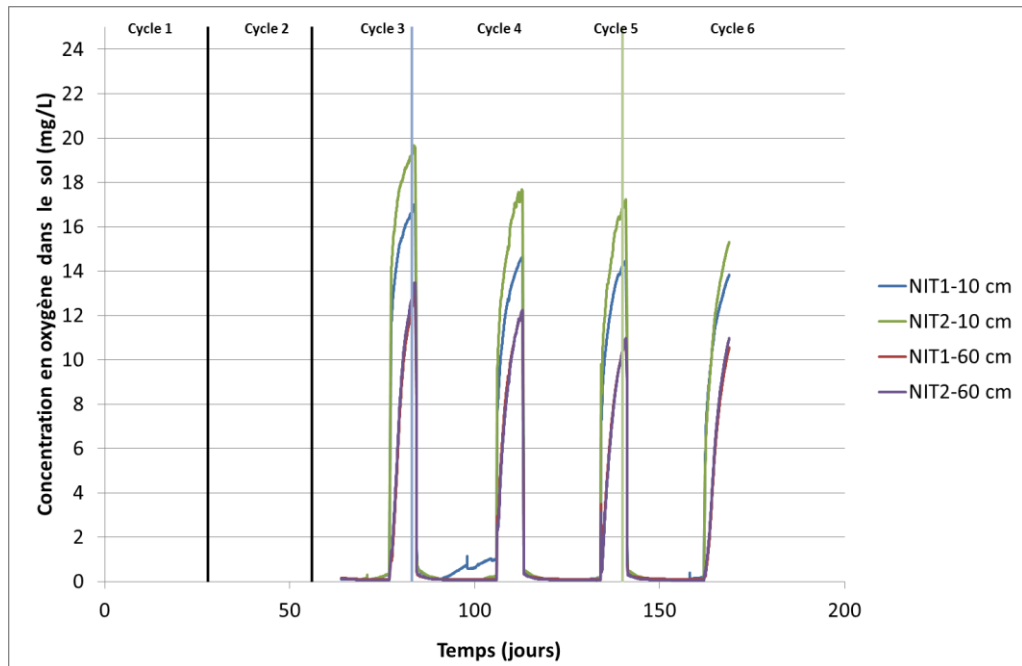


Figure 32 : Évolution de la teneur en oxygène dans le nitisol traité par DARAMEND® au cours du temps à 2 profondeurs (-10 cm et -60 cm par rapport à la surface du sol dans le mésocosme).

3.3.2. Suivi physico-chimique

a) Évolution temporelle du potentiel redox à 10 cm de profondeur

Dans les sols témoins (AND, FRL et NIT), le potentiel redox se situe en moyenne autour de +600 mV. Les sols témoins sont oxiques durant toute la durée du traitement. Ils n'ont pas subi de remaniements et leur humidité a été maintenue à l'humidité initiale par vaporisation d'eau sur la surface du sol.

Sur la figure 33 est reportée l'évolution du potentiel redox mesuré en triplicats dans les 6 mésocosmes à 10 cm sous la surface du sol et à 10 cm du bord du fût.

Des ajouts de Daramend[®] à 2 % (pds/pds) ont été réalisés à chaque début de cycle anaérobie. Pour le premier cycle, 2 % de Fer Zéro Valent (FZV) ont été ajoutés en plus afin de maximiser les chances d'atteindre des conditions très réductrices dans les sols. Une semaine après l'ajout de Daramend[®] et de FZV, le potentiel redox chute à -320 mV pour AND Dara, -336 mV pour NIT Dara, et -337 mV pour FRL Dara. Dans le cas du sol AND, le potentiel remonte à partir de la 2^e semaine et se stabilise à -200 mV. Le potentiel redox remonte fortement pour le sol FRL (-100 mV après trois semaines d'incubation). Seul le sol NIT a un potentiel redox qui se maintient à -300 mV. Durant la semaine d'aérobiose, les sols sont en conditions oxydantes (Eh compris entre 500 et 600 mV) (figure 33).

Au début de la phase anaérobie du 2^e cycle, en complément des 2 % de Daramend[®], un ajout de poudre de Zn⁰ (300 ppm) et d'eau pour atteindre 90 % de la CAC ont été réalisés afin de provoquer des conditions plus réductrices que lors du 1^{er} cycle. Cette modification du protocole n'a pas eu l'effet escompté puisque le potentiel redox ne descend qu'à -62 mV au bout d'une semaine pour les sols NIT et FRL et remonte rapidement à 200 mV pour le sol FRL. Par contre, le sol NIT se maintient autour de 0 mV durant les trois semaines d'anaérobiose. Dans le cas du sol AND, le potentiel chute faiblement et reste compris entre 320 et 460 mV. Ces valeurs de potentiel redox ne sont pas celles escomptées par rapport à celles observées dans les applications classiques de la technologie Daramend[®], aux alentours de -500 mV.

Au début de la phase anaérobie du cycle 3, en complément des 2 % de Daramend[®], 1 % de Fe⁰ (pds/pds) et de l'eau pour atteindre 90 % de la Capacité Au Champ (CAC) ont été ajoutés afin d'apporter des surfaces réactives de Fe⁰ supplémentaires. Effectivement dans le cas des sols FRL et NIT, le potentiel redox chute à des valeurs proches de celles observées pour le cycle 1 (-219 mV pour FRL et -160 mV pour NIT) mais ces valeurs sont loin des -500 mV visés et ne sont pas stables sur la durée de la phase anaérobiose. Aucun effet de ce second ajout de Fe⁰ (en complément de celui contenu dans le Daramend) n'a été observé pour le sol AND dont le potentiel redox est resté positif autour de 200 mV. Ce dernier résultat est corrélé à l'augmentation continue de la teneur en oxygène dans le mésocosme aussi à -60 cm qu'à 10 cm de profondeur (figure 30).

Lors du démarrage du cycle 4, en complément de l'ajout habituel de 2 % de Daramend[®], l'humidité du sol a été augmentée pour atteindre 100 % de la CAC dans

les trois sols traités. Cette saturation des sols n'entraîne pas de chute notable du Eh qui reste dans les valeurs positives, toujours plus faibles pour les sols FRL et NIT que pour le sol AND. Après l'ajout d'eau, le sol AND est devenu très pâteux. Par contre, les sols FRL et NIT ont, après le binage mécanique rotatif et l'ajout d'eau combiné, une structure en boulettes avec une surface très humide et collante mais le centre de la boulette est ferme (peu/pas perméable à l'eau).

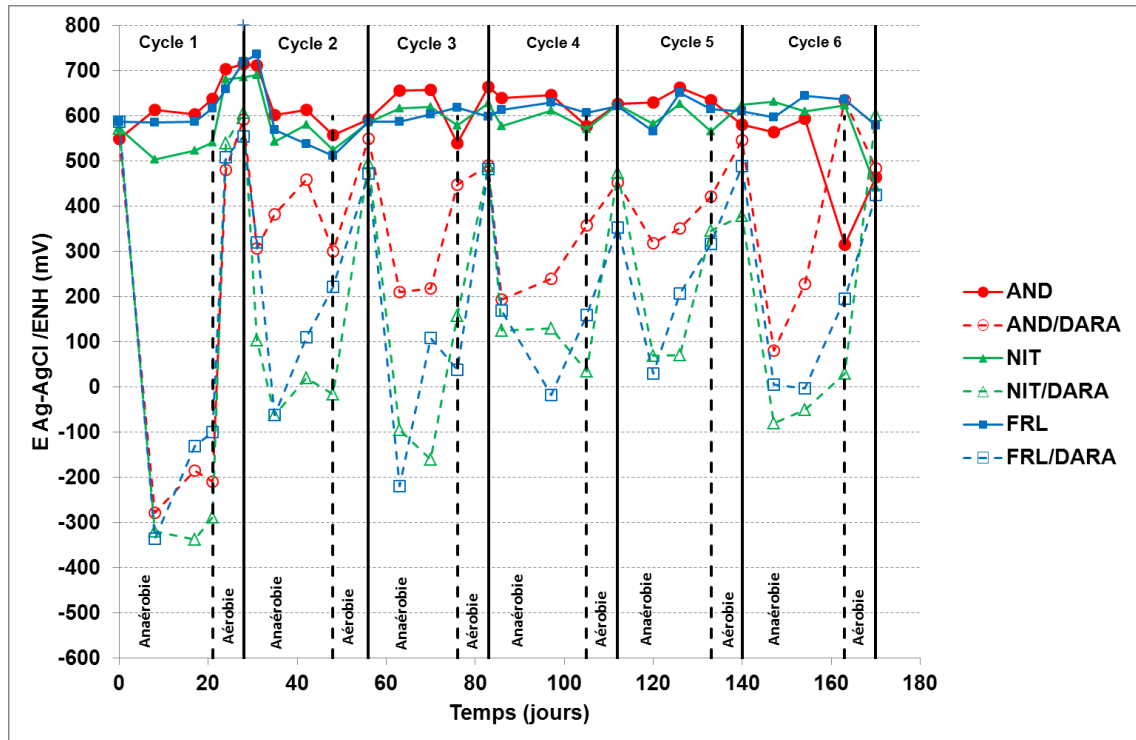


Figure 33 : Évolution du potentiel d'oxydo-réduction moyen à 10 cm de profondeur dans les trois sols traité (AND/DARA ; NIT/DARA ; FRL/DARA) et Témoin (AND, NIT, FRL) au cours de l'essai de traitabilité (six cycles successifs d'une alternance de phase anaérobie et aérobie). (trois mesures indépendantes ; la forte variabilité - cf. Tableau 29, Tableau 30 et Tableau 31 - engendre des écart-types qui n'ont pas été reportés par souci de lisibilité). Les valeurs de potentiel ont été corrigées par rapport à l'Electrode Normale à Hydrogène (ENH).

Malgré les 2 % de Daramend rajoutés en début de cycle 5, les potentiels redox (Eh) ne chutent que faiblement une semaine après l'ajout de Daramend puis remontent pour atteindre la valeur initiale. Le sol AND reste dans des conditions oxiques avec des redox entre +300 et +420 mV durant toute la 5^e phase anaérobie. Les sols FRL-DARA et NIT-DARA sont dans des conditions dites d' « anaérobiose facultative » entre +30 mV et +300 mV, domaine des équilibres $\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}(\text{OH})_3$.

Lors du 6^e et dernier cycle, l'ajout habituel de 2 % de Daramend entraîne une baisse du potentiel redox plus importante que pour les deux cycles précédents. Les valeurs de Eh sont respectivement de + 80, + 5 et - 80 mV pour les sols AND-DARA, FRL-DARA et NIT-DARA après une semaine de phase anaérobie. Le potentiel Eh remonte rapidement dans le sol AND au cours des deux semaines suivantes maintenues pourtant en anaérobiose, et le sol se retrouve en conditions oxiques (550 mV) en fin de

phase visant à l'anaérobie. Par contre, pour le sol NIT-DARA, le Eh remonte lentement et atteint + 30 mV après trois semaines de phase anaérobie. Le Eh dans le sol FRL-DARA remonte à + 200 mV après deux semaines de phase anaérobie.

Lors de toutes les phases aérobies de chacun des trois sols, le potentiel redox remonte à des valeurs franchement positives, supérieures à + 400 mV. Les valeurs après la semaine de phase aérobie de chaque cycle restent par contre inférieures aux valeurs mesurées dans les fûts témoins sans ajout de Daramend.

Il faut noter qu'il y a une grande variabilité lors de la mesure du potentiel redox à trois endroits du mésocosme. Ainsi pour le sol AND-DARA (Tableau 29), la dispersion relative des mesures exprimée par le Coefficient de Variation (CV) est comprise entre 2,5 % et 143,8 %.

Cycle N°	Semaine après le début de la phase anaérobie	Potentiel redox (Eh/ENH) (mV)			Moyenne ± ect (mV)	CV (%)
1	1	-280	-262	-290	-278 ± 14	5,1
	2	-276	-259	-19	-185 ± 144	77,6
	3	-213	-247	-167	-205 ± 40	19,2
2	1	465	367	88	306 ± 196	63,9
	1,5	390	206	396	382 ± 18	4,7
	2	473	245	435	460 ± 22	4,7
3	3	-49	263	453	300 ± 303	101,2
	1	455	-127	303	210 ± 302	143,8
	2	122	481	51	218 ± 231	106,0
4	3	433	488	424	448 ± 35	7,7
	1	177	237	171	195 ± 36	18,8
	2	311	268	143	240 ± 87	36,3
5	3	291	389	392	357 ± 57	16,1
	1	280	285	390	318 ± 62	19,5
	2	398	334	321	351 ± 41	11,8
6	3	408	399	458	421 ± 32	7,5
	1	19	133	90	80 ± 58	71,8
	2	236	88	363	229 ± 138	60,2
	3	639	650	619	636 ± 16	2,5

Tableau 29 : Variabilité des trois mesures de potentiel redox (Eh/Electrode Normale à Hydrogène - ENH) effectuées en différents points de coordonnées XY mais toujours à -10 cm de la surface du mésocosme AND-DARA durant les phases anaérobies des six cycles de traitement du procédé Daramend.

Le Coefficient de Variation, CV (%) est un indice de la dispersion relative ; ect = écart-type.

La dispersion relative des mesures de potentiel redox effectuées dans le mésocosme FRL-DARA est encore plus grande ; elle varie de 1 % à 3 074 % (Tableau 30).

La dispersion relative des mesures de potentiel redox pour le mésocosme NIT-DARA est comprise entre 1,2 et 698,9 % (Tableau 31).

Ces résultats montrent que les conditions d'oxydo-réduction des sols sur les dix premiers centimètres de profondeur peuvent être très hétérogènes, avec des zones franchement oxydantes voisines de zones franchement réductrices. Dans le

mésocosme NIT-DARA (Tableau 31) au cycle 5 par exemple, des valeurs d'Eh de -100, -112 et +428 mV ont été mesurées à seulement 10-15 cm les unes des autres.

Cycle N°	Semaine après le début de la phase anaérobie	Potentiel redox (Eh/ENH) (mV)			Moyenne ± ect (mV)	CV (%)
1	1	-289	-382	-335	-336 ± 47	13,8
	2	-205	-155	-33	-131 ± 88	67,3
	3	-87	-107	-104	-100 ± 11	10,8
2	1	362	279	321	320 ± 42	13,0
	1,5	18	-200	-2	-62 ± 121	195,0
	2	232	10	90	110 ± 112	102,0
3	3	196	195	277	222 ± 47	21,2
	1	-222	-196	-238	-219 ± 21	9,7
	2	114	63	151	109 ± 44	40,6
4	3	166	-164	115	39 ± 178	460,9
	1	168	171	168	169 ± 2	1,0
	2	76	-80	-49	-18 ± 83	455,6
5	3	168	104	207	159 ± 52	32,7
	1	-18	64	43	29 ± 43	145,8
	2	335	311	-24	207 ± 201	97,0
6	3	239	402	310	317 ± 82	25,8
	1	-5	54	-32	5 ± 44	844,7
	2	-85	16	63	-2 ± 76	3074,1
	3	247	188	151	195 ± 48	24,8

Tableau 30 : Variabilité des trois mesures de potentiel redox (Eh/ Electrode Normale à Hydrogène - ENH) effectuées en différents points de coordonnées XY mais toujours à -10 cm de la surface du mésocosme FRL-DARA durant les phases anaérobies des six cycles de traitement du procédé Daramend.

Le Coefficient de Variation, CV (%) est un indice de la dispersion relative ; ect = écart-type.

Cycle N°	Semaine après le début de la phase anaérobie	Potentiel redox (Eh/ENH) (mV)			Moyenne ± ect (mV)	CV (%)
1	1	-320	-340	-298	-320±21	6,6
	2	-333	-336	-341	-337±4	1,2
	3	-287	-292	-284	-288±4	1,4
2	1	235	-83	160	104±166	160,5
	1,5	18	-200	-2	-62±212	195,0
	2	30	17	15	20±8	40,3
3	3	70	-140	24	-16±110	698,9
	1	-51	-143	-88	-94±46	49,0
	2	-254	-134	-92	-160±84	52,4
4	3	330	267	-125	157±247	157,2
	1	162	103	110	125±32	25,9
	2	170	51	171	130±69	53,0
5	3	-11	-21	139	35±90	254,6
	1	12	113	85	70±52	75,0
	2	-100	-112	428	72±308	431,0
6	3	329	407	306	347±53	15,3
	1	-211	-8	-21	-80±114	141,2
	2	46	-17	-179	-50±116	230,0
	3	51	30	10	30±21	68,6

Tableau 31 : Variabilité des trois mesures de potentiel redox (Eh/ Electrode Normale à Hydrogène - ENH) effectuées à -10 cm de la surface du mésocosme NIT-DARA durant les phases anaérobies des six cycles de traitement du procédé Daramend.

Indice de la dispersion relative (Coefficient de Variation, CV, %).

Les sols ont été homogénéisés avant la mise en mésocosme mais les sols FRL et NIT ont de plus en plus pris une structure en boulettes (de quelques millimètres à 1-2 centimètres de diamètre) au fur et à mesure des cycles successifs (teneurs en eau très élevées et binage rotatif) ce qui a pu contribuer à l'hétérogénéité mise en évidence par les mesures de potentiel redox. Pour l'andosol, aucune explication de la variabilité n'est particulièrement évidente.

Ces valeurs peu négatives du Eh ne correspondant pas à ce qui était attendu, des mesures de potentiel redox complémentaires ont été réalisées à différentes profondeurs lors de la vidange des mésocosmes traités avant chaque début de phase aérobie ou anaérobie. La littérature scientifique disponible ne fournit malheureusement pas de valeurs redox résultant d'un procédé de type Daramend appliqué à des sols, valeurs auxquelles les nôtres pourraient être comparées.

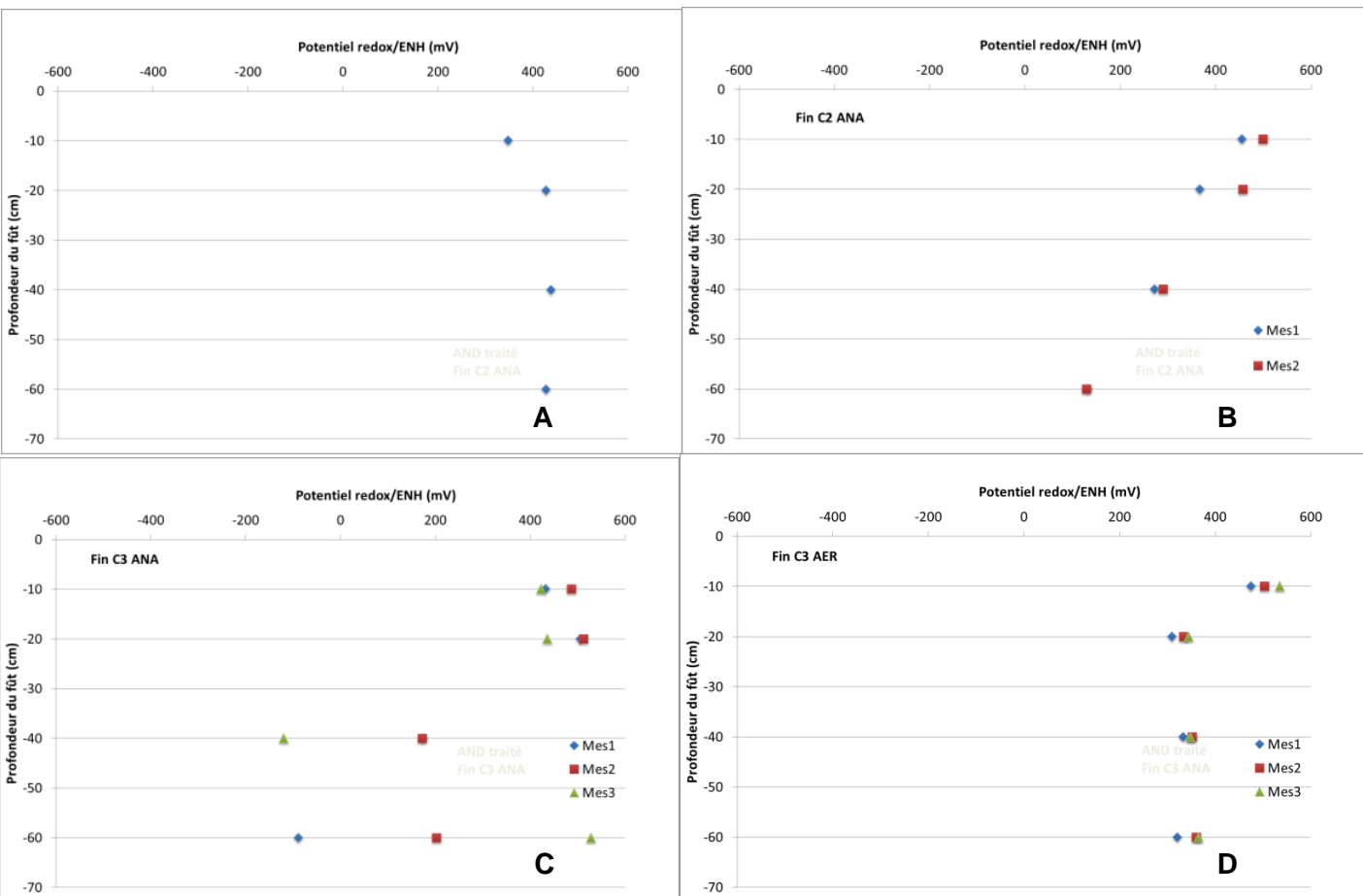
b) Évolution temporelle du potentiel redox à différentes profondeurs dans l'andosol traité

Le potentiel redox a été mesuré lors des fins de phase anaérobie et aérobie à différentes hauteurs du mésocosme (Figure 34). En fin de cycle 1 (Figure 34A), la valeur de potentiel est homogène (+200 mV) sur toute la hauteur du profil. En fin de phase anaérobie (cycle 2), une chute du Eh est observée et corrélée avec la profondeur mais les valeurs restent dans la zone positive (+130 mV à -60 cm de profondeur, Figure 34B). L'installation de conditions anaérobies est mise en évidence en fin de phase anaérobie (cycle 3) à partir de -40 cm de profondeur.

En effet, lors du démontage du mésocosme, une zonation colorée a été observée avec à partir de -40 cm, un sol de couleur grise à grise foncée (Figure 34C). La mise en aérobie du sol contrôlée par la mesure du potentiel redox (Figure 34D) montre que le sol est en condition oxique (potentiel > 250 mV). La même Figure 34 zonation colorée du sol est observée à la fin de la phase anaérobie du cycle 4 mais les valeurs de potentiels sont de l'ordre de + 50 mV (Figure 34D). En fin de cycle 4, malgré un brassage du sol, la saturation du sol à 100 % de la CAC n'a pas permis d'obtenir un sol homogène sur la hauteur du mésocosme. En fin de phase anaérobie (cycle 6), le sol peut être coupé en trois zones (couleur marron jusqu'à -40 cm, grise jusqu'à -60 cm et gris-foncé-noir au-delà).

c) Évolution temporelle du potentiel redox à différentes profondeurs dans le ferralsol traité

Le suivi du potentiel redox sur la hauteur du mésocosme FRL-DARA lors de sa vidange manuelle par couches successives révèle l'établissement de conditions réductrices dans la moitié la plus profonde du mésocosme en fin de phase anaérobie du cycle 3 (Figure 35B) où les valeurs d'Eh sont de -300 mV. Une gradation de couleur du sol a également été observée : des zones grises claires à gris foncé sont présentes dans la tranche -20 à -40 cm et deviennent noires pour la tranche 40-60 cm. Pour les phases anaérobies des cycles 4 (Figure 35C) et 6 (Figure 35E), le potentiel redox se trouve plus élevé dans des conditions d'anaérobie facultative voire même oxique.



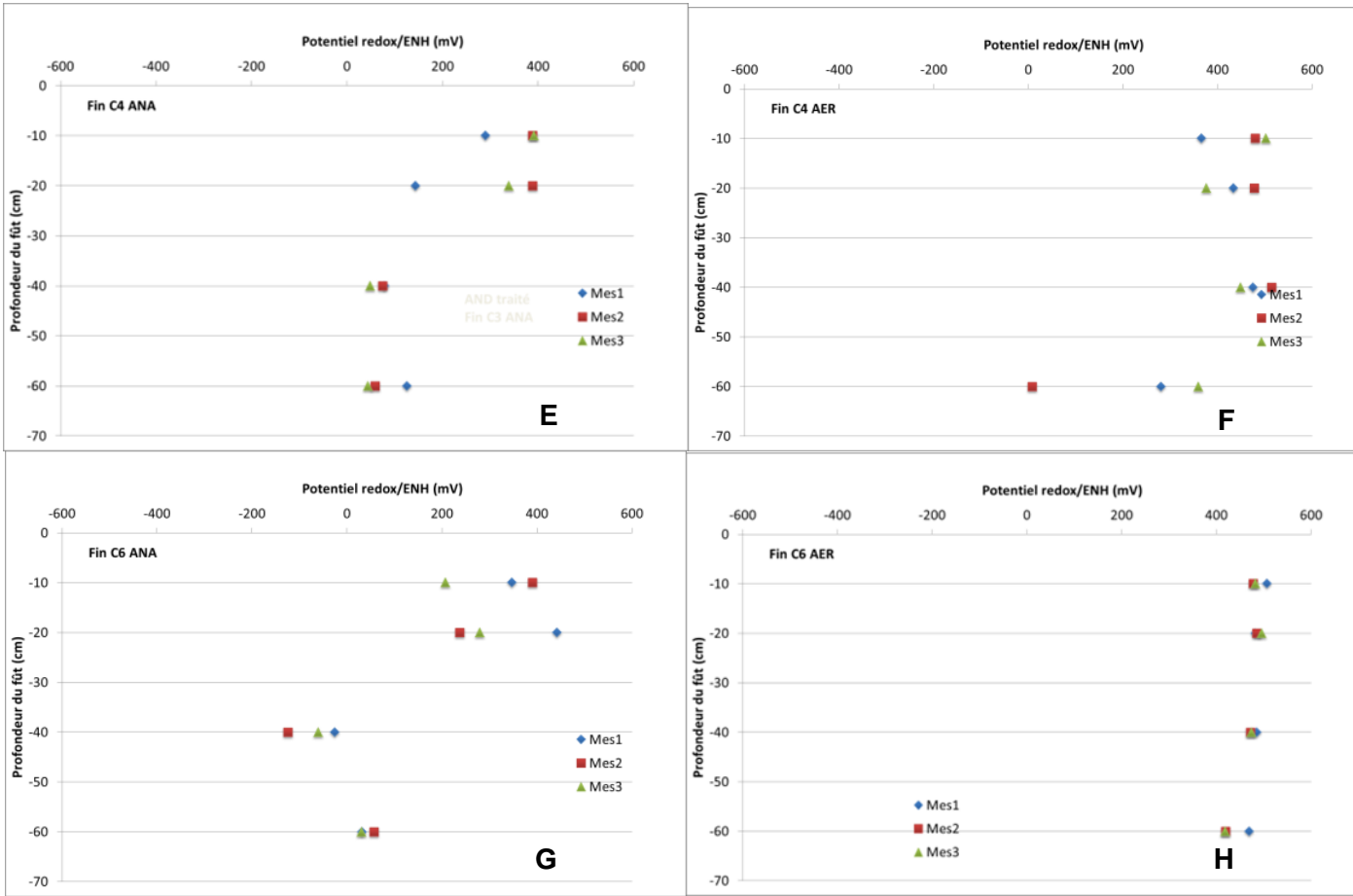
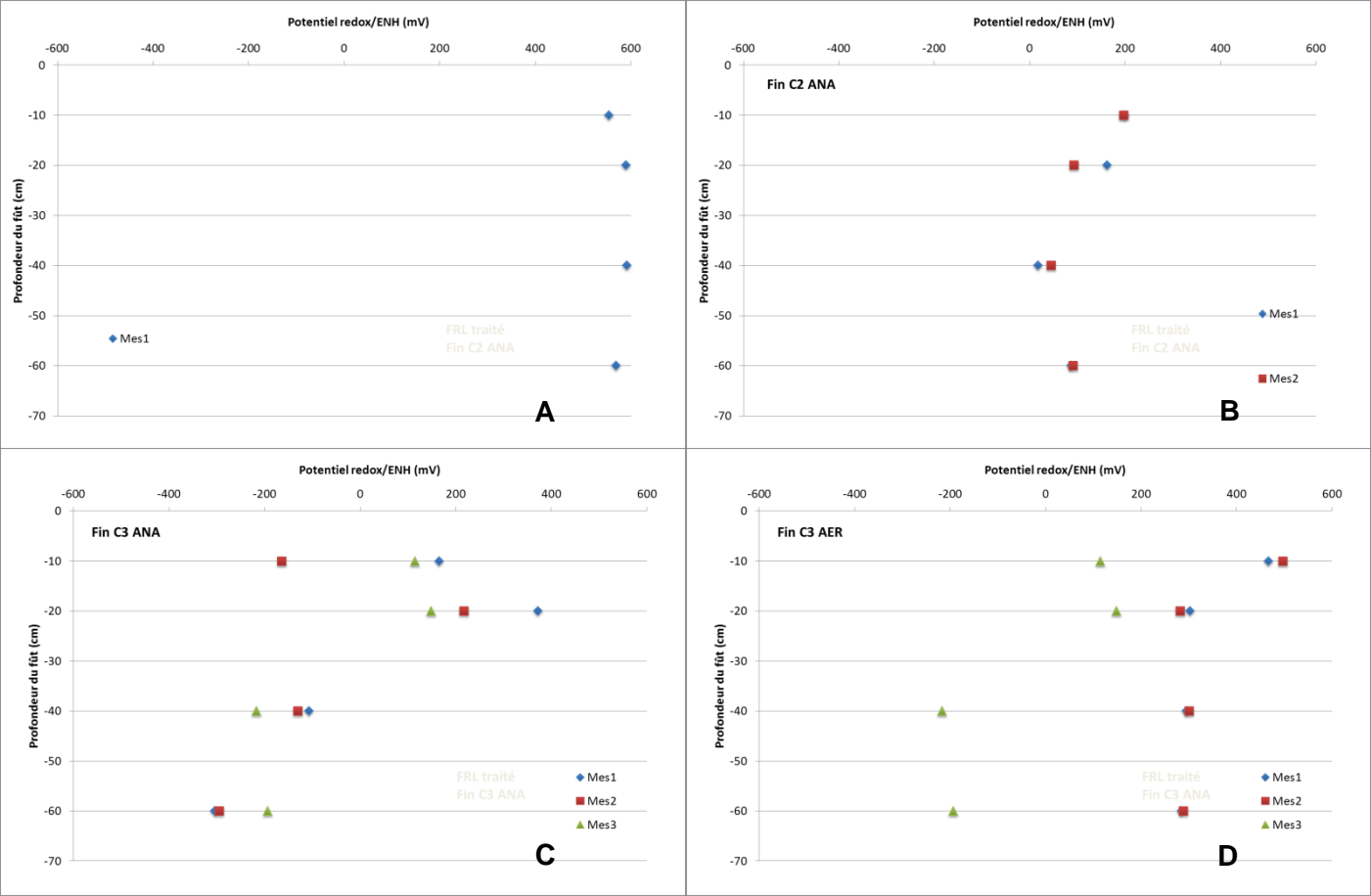


Figure 34 : Potentiel redox à différentes profondeurs et à différentes phases du traitement (figures A à H) de l'andosol (AND-DARA). Les valeurs de potentiel ont été corrigées par rapport à l'Electrode Normale à Hydrogène (ENH).



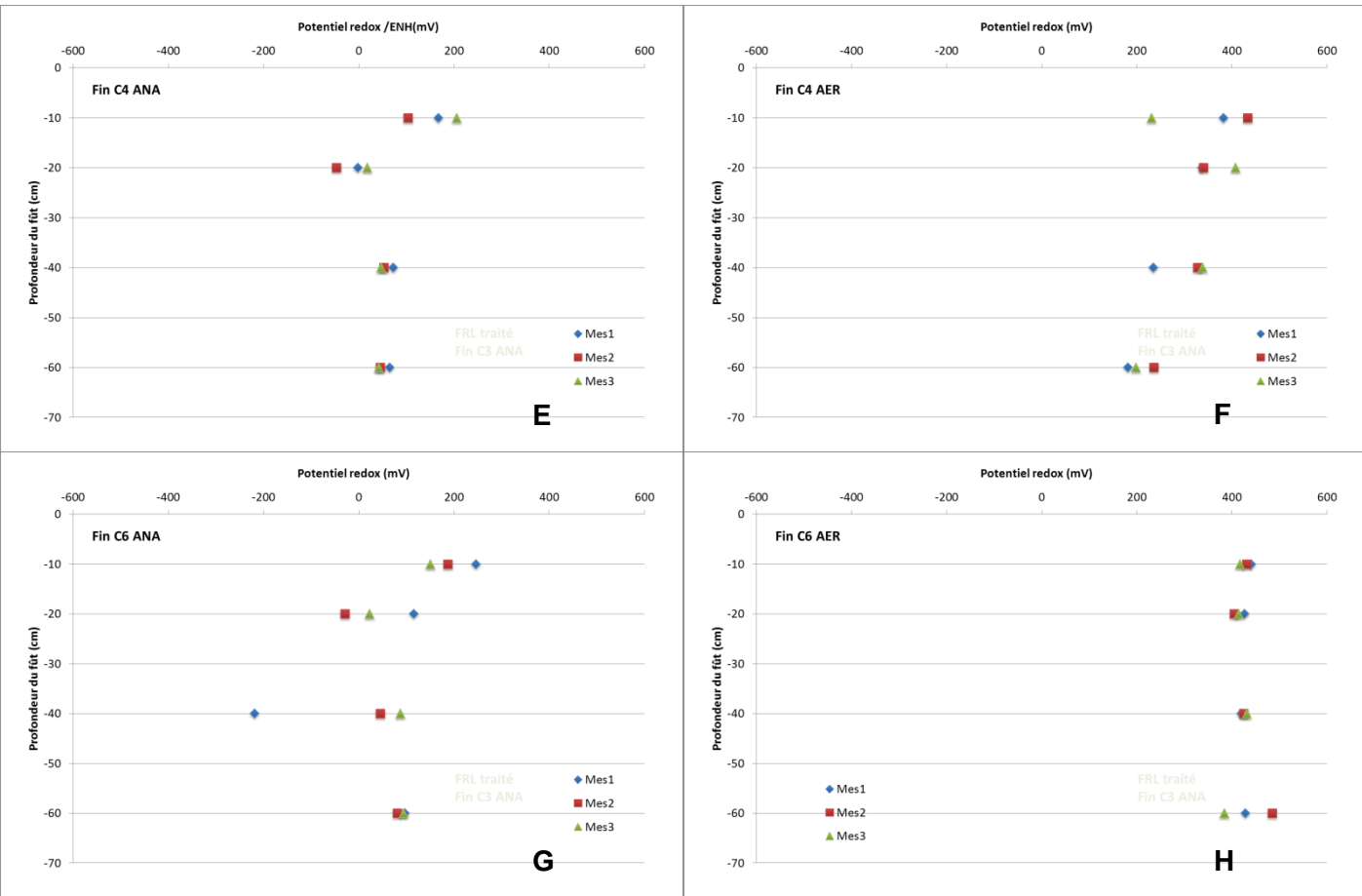
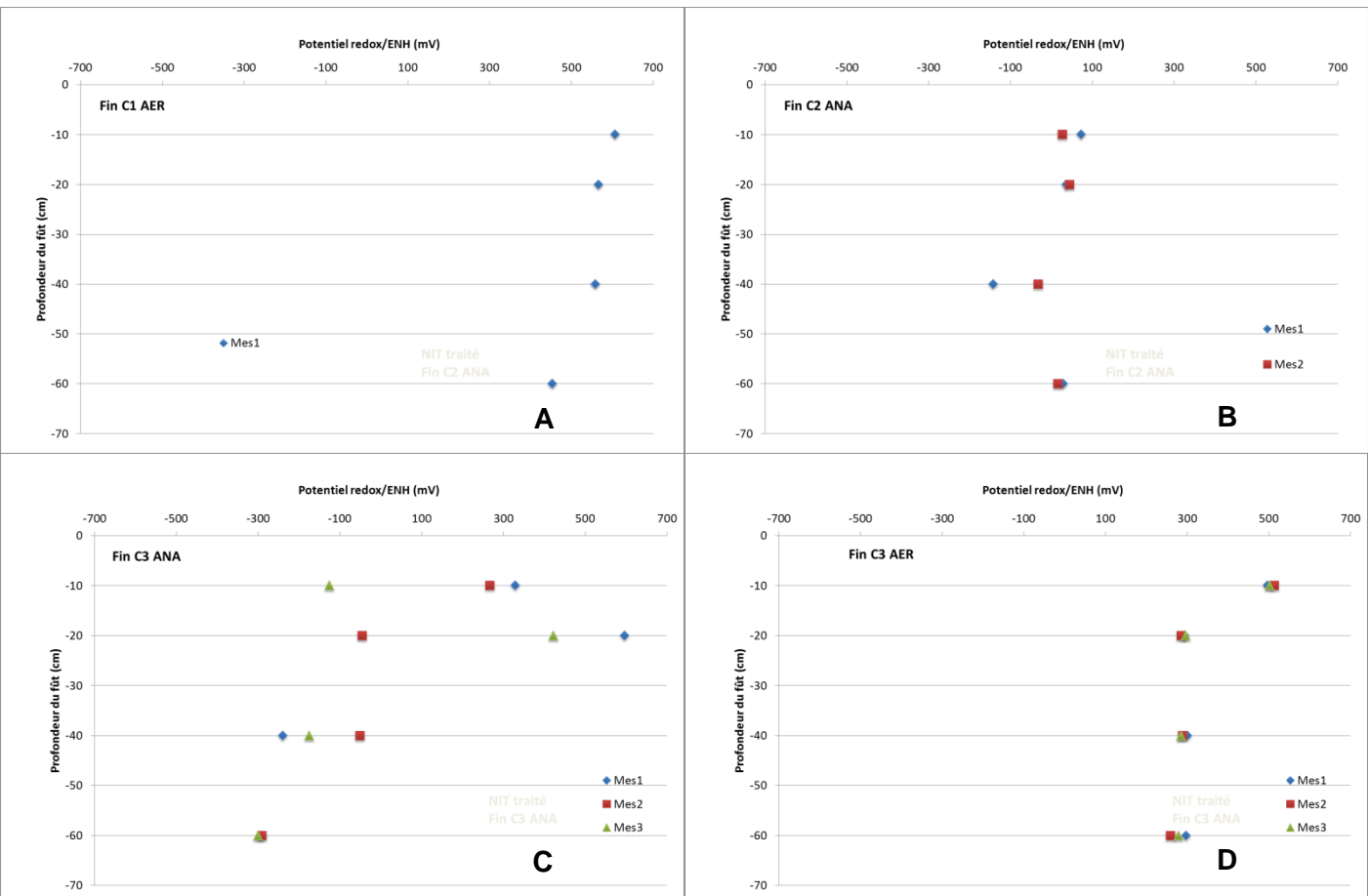


Figure 35 : Potentiel redox à différentes profondeurs et à différentes phases du traitement (figures A à H) de l'andosol (FRL-DARA). Les valeurs de potentiel ont été corrigées par rapport à l'Electrode Normale à Hydrogène (ENH).



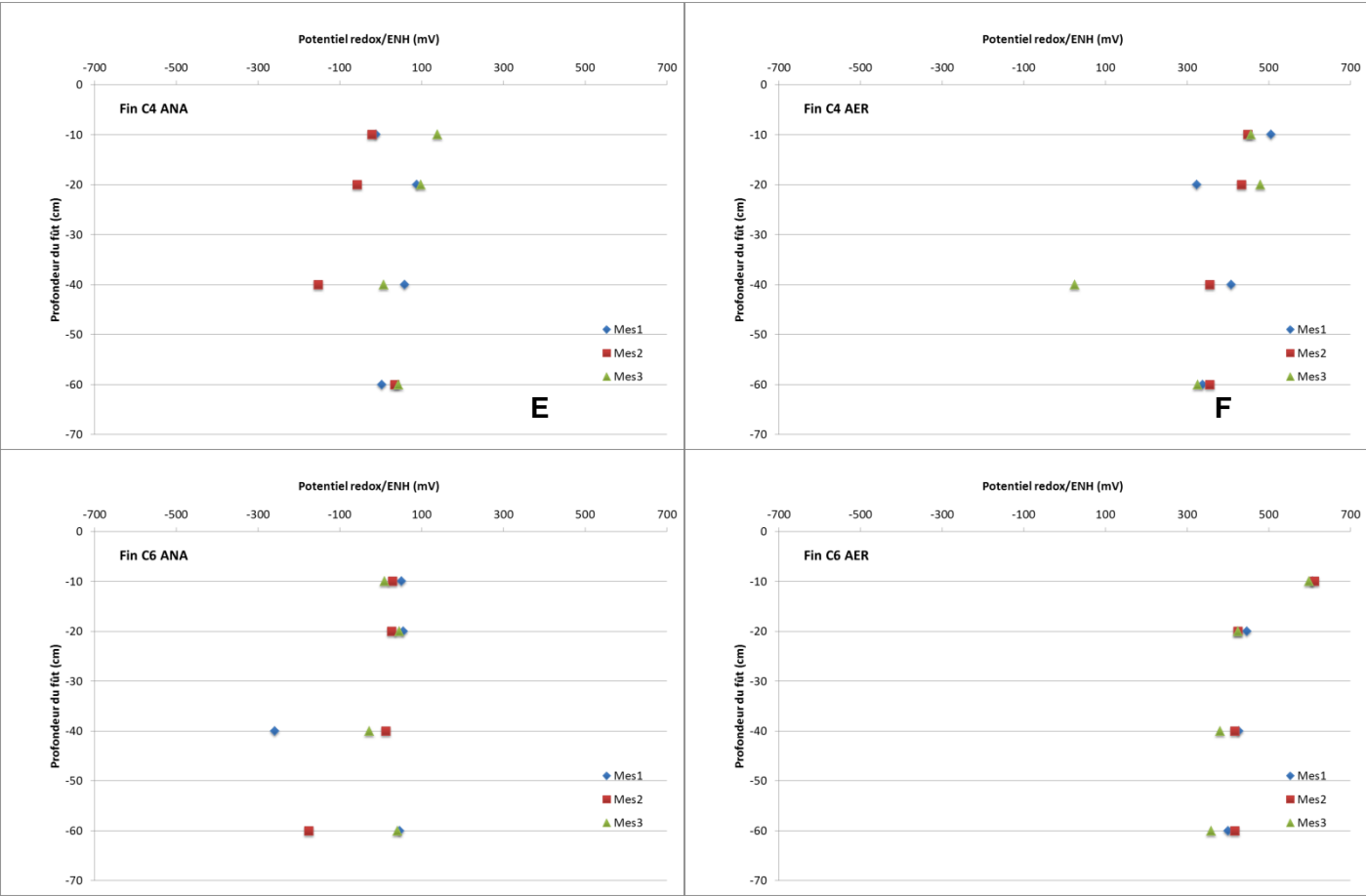


Figure 36 : Potentiel redox à différentes profondeurs et à différentes phases du traitement de l'andosol (NIT-DARA). Les valeurs de potentiel ont été corrigées par rapport à l'Electrode Normale à Hydrogène (ENH).

d) Évolution temporelle du potentiel redox à différentes profondeurs dans le nitisol traité

Les mêmes observations que pour le Ferralsol peuvent être faites pour le Nitisol. En fin de phase anaérobie du cycle 3, une zone réductrice est mise en évidence à partir de la profondeur -40 cm avec des zones de sol de couleur grise à noire (Figure 36B). Les trois mesures effectuées à la même profondeur (MES 1 à 3) montrent la grande variabilité spatiale latérale du redox à l'échelle décimétrique.

La littérature scientifique permet de comparer nos résultats à ceux d'autres études. Un sol industriel (prélevé à 70 cm de profondeur et composé d'un mélange de particules grossières, 47 % de < 76 µm) faiblement contaminé par des explosifs (2,4,6-trinitrotoluène, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetraazine dont les concentrations sont comprises entre 120 et 1340 mg/kg sol sec) et des métaux a été traité par la technologie Daramend® (2 % (poids sec/poids sec). Les expériences ont été réalisées en microcosmes de sol de 250 g, pH ajusté entre 6,5 et 8,0, et à 80 % de la capacité au champ. La chute du potentiel redox observée après 6 semaines d'incubation, passant de 300 mV à 200 mV, n'a pas permis une chute du potentiel suffisante. Par contre, le second ajout de Fer Zéro Valent après onze semaines a permis une chute graduelle du potentiel pour atteindre le potentiel de - 400 mV/SHE au bout de vingt semaines (Dalgren *et al.*, 2009).

D'après les auteurs, la chute de potentiel plus faible que celle attendue pourrait être due à une accumulation sur les surfaces actives de Fe⁰ de produits de dégradation ou d'autres composés de la solution du sol. La diminution des surfaces réactives entraînerait une diminution de l'efficacité de la corrosion du fer et de ce fait ralentirait la baisse du potentiel redox. Du fait du décalage temporel de la chute du potentiel redox dans le sol, une dégradation effective des explosifs par le procédé DARAMEND® s'est mise en place à partir de la 11^{ème} semaine et atteint son maximum de dégradation en fin d'expérience (26 semaines).

L'effet réducteur du Fe⁰ est dépendant de la zone de surface disponible du fer. Dans notre étude, la grande quantité de Fe⁰ apportée n'a apparemment pas fourni de surface réactive suffisante pour assurer une baisse forte et rémanente du potentiel redox pendant les phases d'anaérobie.

3.3.3. Suivi des concentrations en chlordécone, 5b-hydrochlordécone et dihydrochlordécone

Des analyses quantitatives de la chlordécone et de la 5b-hydrochlordécone ont été réalisées à T0 et à la fin de chaque phase anaérobie/aérobie des cycles 1, 3, 4 et 6 dans les sols traités et les sols témoins. Une recherche qualitative de la dihydrochlordécone a aussi été effectuée.

Des analyses ont été effectuées à partir de l'amendement Daramend® lui-même. La chlordécone et la chlordécone-5bhydro ne sont pas détectés (pour une limite de quantification instrumentale de 0,05 mg/kg).

a) L'andosol

La concentration initiale moyenne en chlordécone dans l'andosol est de $15,9 \pm 0,8$ mg/kg sol sec (Figure 37).

Les concentrations en chlordécone dans l'andosol non traité (AND Témoin) fluctuent au cours du temps et sont comprises entre $10,0 \pm 0,3$ et $18,7$ mg/kg sol sec. Cette variabilité peut résulter d'une part de l'hétérogénéité du sol malgré le soin apporté à l'homogénéisation des sols, et d'autre part de la variabilité analytique. La moyenne des concentrations des 16 échantillons contrôles de l'Andosol prélevés au cours des 6 mois de traitement est de $13,3$ mg/kg ($\pm 2,8$, CV % 21 %) pour la chlordécone et de $0,146$ mg/kg ($\pm 0,05$, CV % 34 %) pour la chlordécone-5bhydro.

Après les phases anaérobie et aérobie du cycle 1, les concentrations en chlordécone sont respectivement de $13,2$ et $15,5$ mg/kg sol sec dans le sol AND-DARA. Compte tenu de l'écart-type important des concentrations en chlordécone à T0, les concentrations en chlordécone dans le sol traité AND-DARA après le cycle 1 ne peuvent être considérées différentes du sol témoin. À la fin du cycle 3, les concentrations en chlordécone sont aussi du même ordre de grandeur que dans les témoins. C'est à partir du cycle 4 qu'une diminution significative de la concentration en chlordécone est observée dans le sol traité : elle chute à $8,7 \pm 0,1$ mg/kg et se stabilise jusqu'à la fin du cycle 6.

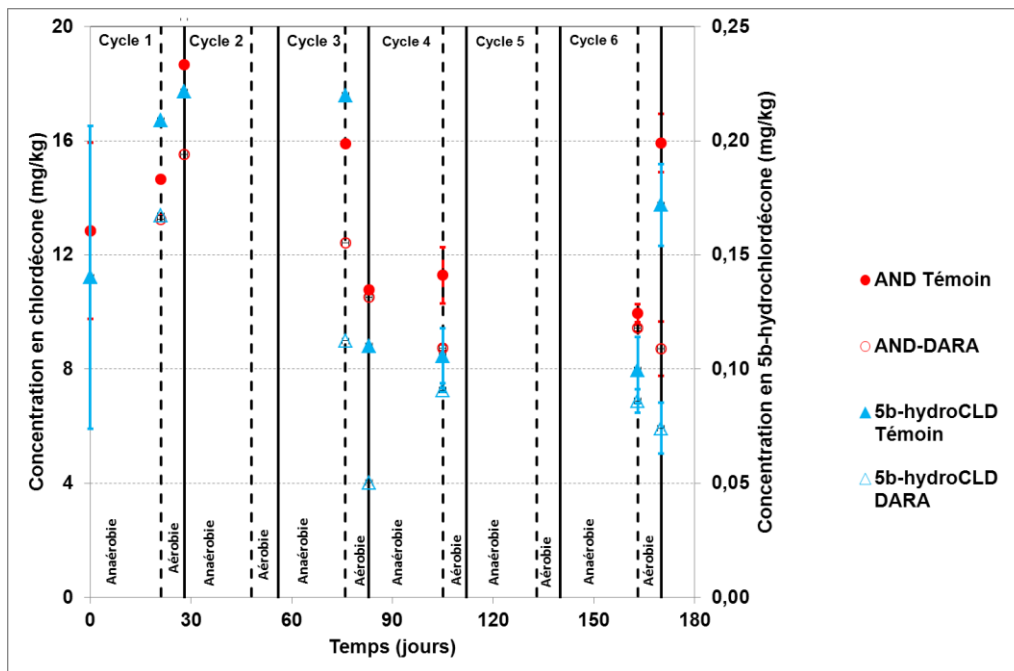


Figure 37 : Évolution en fonction du temps des concentrations en chlordécone et en 5b-hydrochlordécone dans l'andosol traité (AND-DARA) et non traité (AND Témoin).

Les analyses à T0 et aux cycles 4 et 6 ont été réalisées en triplicats.

La 5b-hydrochlordécone est quantifiée dans tous les échantillons, témoins et traités, mais à des concentrations qui ne dépassent pas 0,25 mg/kg. Il est particulièrement

intéressant de noter que les concentrations dans le sol traité ont tendance à être inférieures à celles mesurées aux mêmes moments dans le sol témoin non traité. Il ne s'agit donc pas d'un produit de transformation formé de manière significative par le procédé, ou s'il s'en forme suite au traitement, elle ne s'accumule pas (elle peut n'être qu'un intermédiaire transformé en un autre produit secondaire).

La dihydrochlordécone n'est détectée (pour mémoire : la quantification de la dihydrochlordécone est impossible, faute de standard) que dans les échantillons traités. Des analyses sont en cours sur un temps intermédiaire au cours du traitement pour essayer de voir si l'aire du pic évolue de manière significative, l'hypothèse d'une certaine accumulation de ce produit déchloré méritant d'être envisagée. Ces résultats seront présentés dans un rapport ultérieur avec les résultats des recherches d'autres produits de transformation (képol et chlordécone ayant perdu plus de deux chlores).

La figure 38 montre l'évolution des concentrations en chlordécone normée (C/C_0) par rapport à l'évolution du potentiel redox dans l'Andosol. À la fin du cycle 1, malgré un potentiel redox faible (-200 mV/ENH), la concentration en chlordécone ne chute pas. Le potentiel redox dans les cycles 2 à 5 reste positif (de l'ordre de 300 mV) et la concentration en chlordécone varie peu.

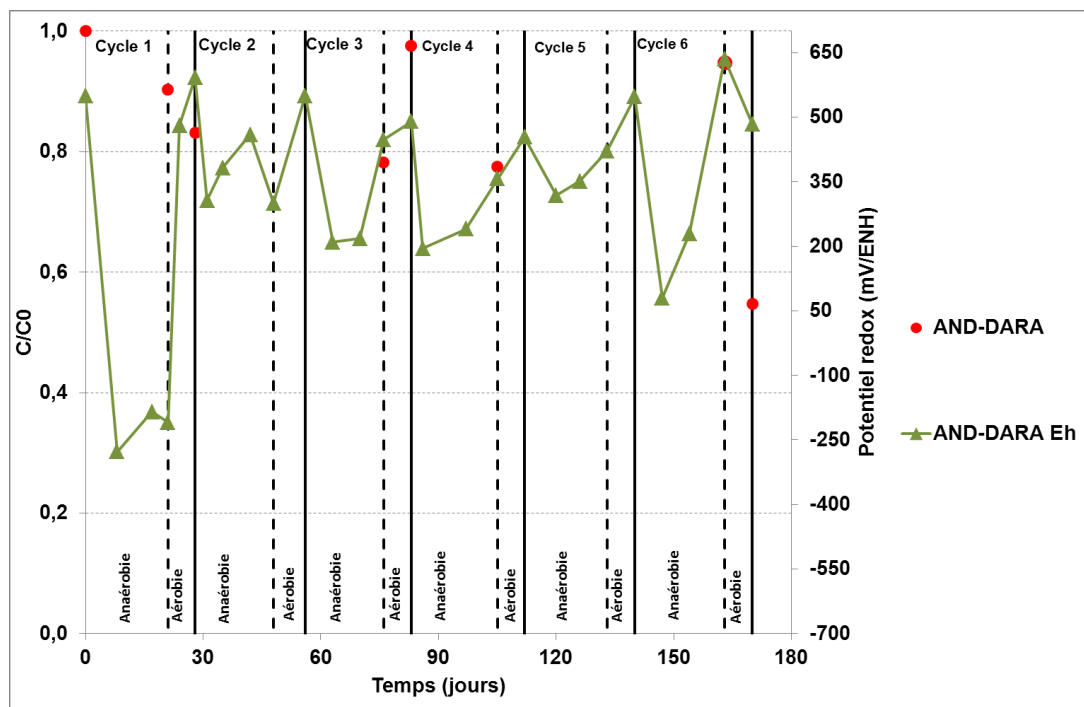


Figure 38 : Relation entre l'évolution du potentiel redox et la concentration en chlordécone normée (C/C_0) dans l'andosol traité par le procédé Daramend® (AND-DARA).
 C_0 et C sont les concentrations respectives dans les mésocosmes témoins et traités au temps.

En fin de phase anaérobie des cycles 4 et 6, des analyses de la concentration en chlordécone et en 5b-hydrochlordécone dans l'échantillon composite représentatif de l'ensemble du mésocosme et dans un échantillon dans la zone de couleur grise ont été

réalisées afin de voir si la dégradation de la chlordécone dans la zone supposée comme étant plus réductrice était particulièrement forte (tableau 32). C'est une zone visuellement repérée même si elle ne correspond pas forcément à une zone avec Eh négatif.

Cycle/Phase	Origine de l'échantillon	Chlordécone (mg/kg sol sec)	5b-hydrochlordécone (mg/kg sol sec)
4/ANA	Zone la plus réduite (-133 mV/ENH)	8,74 ± 0,11	0,09 ± 0,00
	Composite de toutes les zones	9,44 ± 0,12	0,09 ± 0,01
6/ANA	(233 à -334 mV/ENH)	9,67 ± 0,69	0,09 ± 0,00
	Zone la plus réduite (-170 mV/ENH)		

Tableau 32 : Comparaison des concentrations en chlordécone et en 5b-hydrochlordécone dans les échantillons composite et de la zone réductrice en fin de phase anérobie des cycles 4 et 6 pour le sol AND-DARA.

Les analyses ont été réalisées en triplicats.

La comparaison des valeurs pour le cycle 6 révèle que les concentrations en chlordécone dans l'échantillon composite et dans l'échantillon Z3 (40 à 60 cm de profondeur) ne sont pas différentes. Ces résultats laissent supposer que dans les zones supérieures (Z1 et Z2), les concentrations en chlordécone sont du même ordre de grandeur que celles de la zone 3. La présence de zones moins oxiques dans le tiers inférieur du mésocosme ne semble pas améliorer la dégradation de la chlordécone contrairement au concept sur lequel est basé l'ISCR/Daramend.

Le métabolite 5b-hydrochlordécone est détecté, à des très bas niveaux non quantifiables, dans les échantillons témoins et traités. Par contre la dihydrochlordécone n'est détectée (elle n'est pas quantifiable vu l'absence de standard) que dans les sols traités.

b) Le ferralsol

La concentration initiale en chlordécone dans le ferralsol est 4,7 fois plus faible que celle de l'andosol ($2,75 \pm 0,03$ mg/kg sol sec). La 5b-hydrochlordécone n'a pas été détectée dans le ferralsol ($< 0,05$ mg/kg sol sec) (Figure 39). La concentration en chlordécone dans le sol témoin fluctue au cours du temps et est le plus souvent inférieure à la concentration initiale, sauf en fin de phase ANA du cycle 3 où la concentration est de 8 % supérieure à la concentration initiale. Ces fluctuations traduisent l'effet cumulé de l'hétérogénéité du sol et de la variabilité de la chaîne analytique d'extraction, concentration et analyse. La moyenne des 16 contrôles du Ferralsol analysés pendant les six mois de traitement est de 2,2 mg/kg avec un écart-type de 0,5 mg/kg. Le coefficient de variation est de 22 %.

Les mesures les plus fiables dans les sols témoins ont été effectuées, en fin d'expérimentation, à partir d'un échantillon composite de 5 kg au lieu des 150 g utilisés en routine. La valeur moyenne obtenue est de $1,7 \pm 0,1$ mg/kg sol sec, ce qui est en très bon accord avec les valeurs mesurées aux différents temps. Cette analyse sur un très gros lot composite n'a pu être effectuée aux différents temps car, sans aboutir à

des masses de sols ingérables, elle n'est pas compatible avec la règle du génie des procédés qui stipule que la somme des prises d'essai effectuées à la fin de l'étude ne doit pas dépasser 10 % de la masse initiale du pilote expérimental.

La concentration en chlordécone chute très significativement (70 % de diminution) dès le cycle 1 dans le sol traité (FRL-DARA), puis oscille autour d'une valeur moyenne de 0,66 mg/kg sol sec jusqu'à la fin de la phase anaérobie du cycle 6. Une diminution importante supplémentaire de la concentration est observée en fin de traitement (phase AER du cycle 6) : la dernière semaine d'aérobie entraîne 23 % de dégradation de la chlordécone. Une diminution relative analogue est observée au cycle 3 entre les fins de phase anaérobie et aérobie. Dans le cas du ferralsol, l'alternance des phases semble donc avoir un effet positif sur la diminution des concentrations en chlordécone.

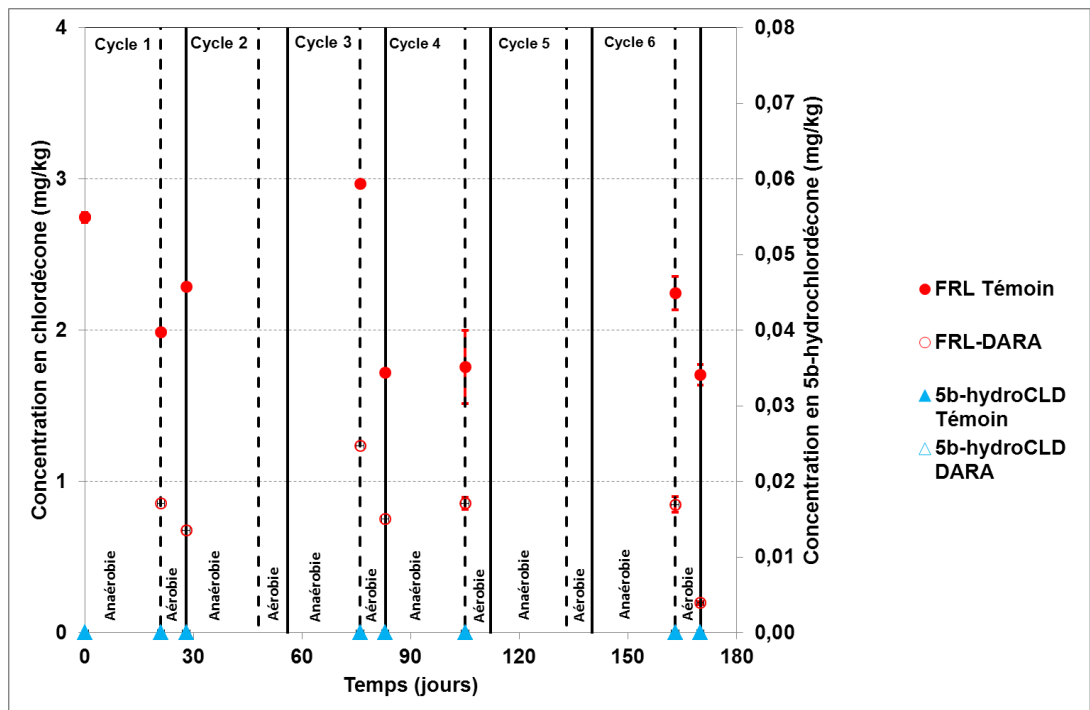


Figure 39 : Évolution en fonction du temps des concentrations en chlordécone et en 5b-hydrochlordécone dans le ferralsol traité (FRL-DARA) et non traité (FRL Témoin).

Les analyses à T0 et aux cycles 4 et 6 ont été réalisées en triplicats.

La figure 38 montre la relation entre l'évolution du potentiel redox et la concentration en chlordécone au cours du temps. La forte chute de la concentration en chlordécone dans le ferralsol est corrélée à un potentiel redox inférieur à -300 mV après la phase anaérobie du cycle 1. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Kim *et al.* (2008) qui ont observé une déchloration de l'atrazine dans les sols traités par du Fe^0 lorsque le potentiel redox était maintenu à des valeurs inférieures à -300 mV. Les auteurs n'ont pas réalisé d'expérimentations pour des potentiels redox supérieurs à -300 mV. Dans notre étude, l'incapacité à maintenir le potentiel redox à des valeurs < -300 mV durant les cycles 2 à 5 ne permet pas un abattement supplémentaire de la chlordécone par rapport à l'effet obtenu après un seul cycle de traitement. L'abattement de la

concentration en chlordécone en fin de traitement durant la phase aérobie, sans que le redox ne redescende à des valeurs de l'ordre de - 300 mV, est peut être liée à une dégradation par voie microbienne aérobie.

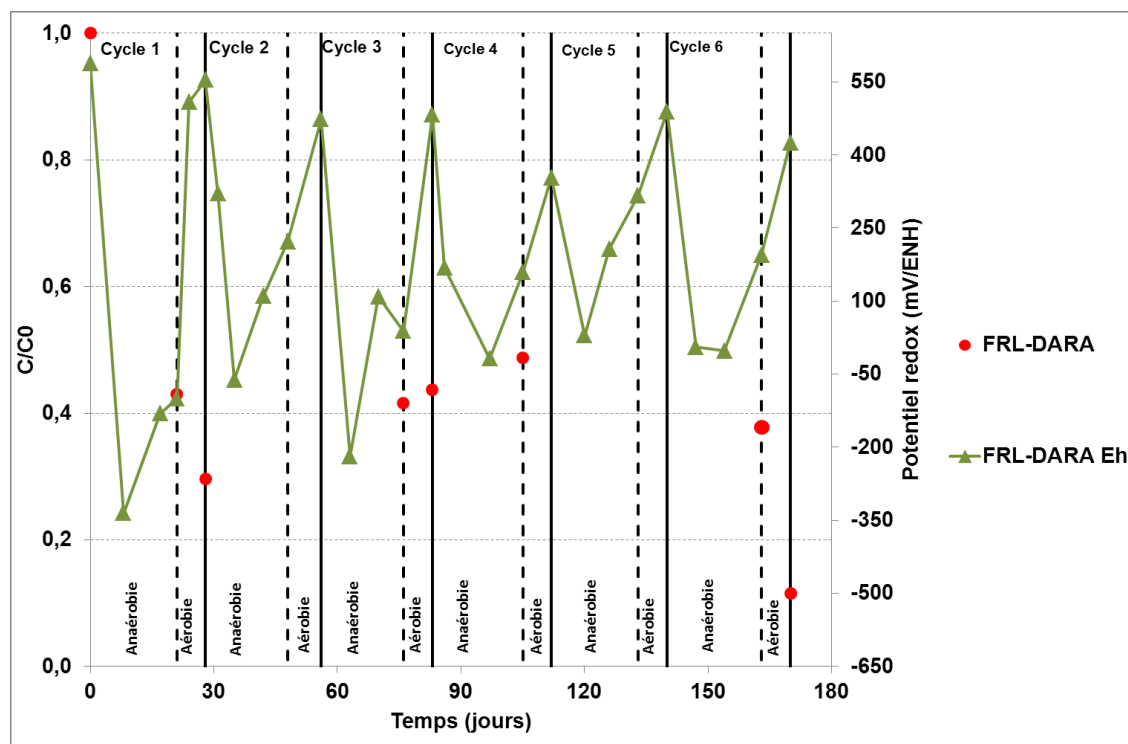


Figure 40 : Relation entre l'évolution du potentiel redox et la concentration en chlordécone normée (C/C₀) dans le ferralsol traité par le procédé Daramend® (FRL-DARA).
C₀ et C sont les concentrations respectives dans les mésocosmes témoins et traités au temps t.

Cycle /Phase	Echantillon	Chlordécone (mg/kg sol sec)	5b-hydrochlordécone (mg/kg sol sec)
4/ANA	Zone la plus réduite (-157 mV/ENH)	0,86 ± 0,04	<0,05
	Composite (37 à -238 mV/ENH)	0,85 ± 0,05	<0,05
6/ANA	Zone la plus réduite (-238 mV/ENH)	0,86 ± 0,03	<0,05

Tableau 33 : Comparaison des concentrations en chlordécone et en 5b-hydrochlordécone dans les échantillons composite et de la zone réductrice en fin de phase anérobie des cycles 4 et 6 pour le sol FRL-DARA.
Les analyses ont été réalisées en triplicats.

Le tableau 33 montre que, comme pour l'andosol, les concentrations en chlordécone et en 5b-hydrochlordécone dans la zone la plus réductrice (Z3) ne sont pas différentes de celles de l'échantillon composite intégrant toute la hauteur du profil, donc les zones les plus réductrices et les plus oxydantes.

Le métabolite 5b-hydrochlordécone est détecté à des très bas niveaux non quantifiables (plus faibles que dans l'andosol), dans les échantillons témoins et traités, avec une aire de pic plus faible dans le sol traité que dans le contrôle. Par contre, la dihydrochlordécone n'est détectée (elle n'est pas quantifiable vu l'absence de standard) que dans les sols traités.

c) Le nitisol

La concentration en chlordécone dans le sol témoin fluctue au cours de l'expérience, comme pour les deux sols précédents, avec des concentrations supérieures de 4 à 58 % par rapport à la concentration initiale, hormis pour les deux valeurs de fin de cycle 3 et fin de phase anaérobie du cycle 4 qui sont inférieures de 5 et 25 % (figure 41).

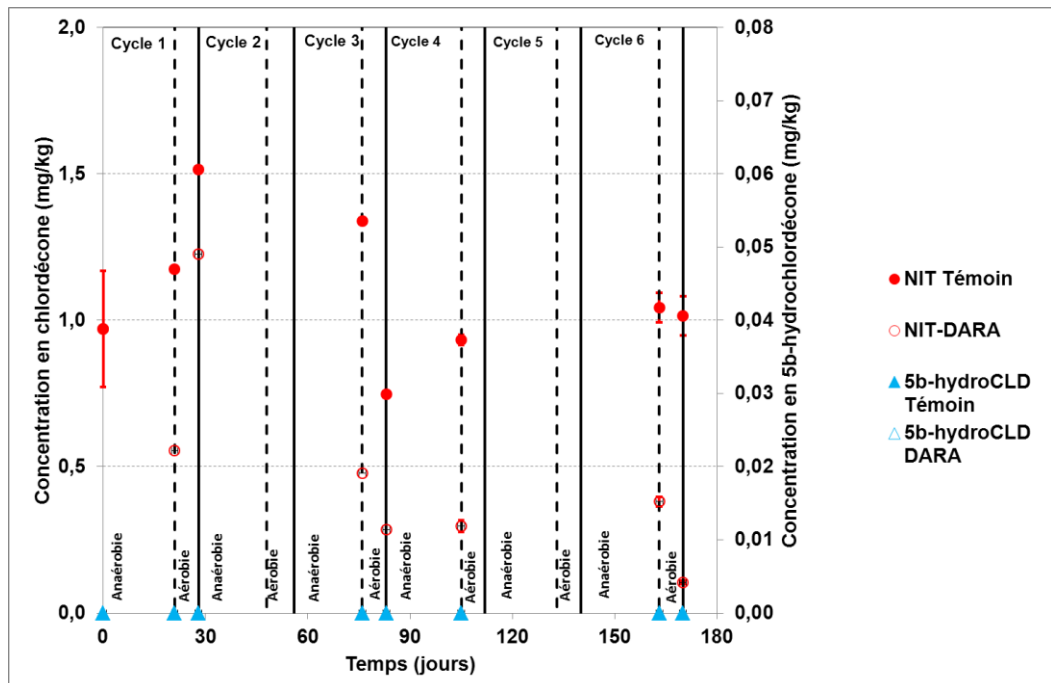


Figure 41 : Évolution des concentrations en chlordécone et en 5b-hydrochlordécone dans le nitisol traité (NIT-DARA) et non traité (NIT Témoin).

Les analyses à T0 et aux cycles 4 et 6 ont été réalisées en triplicats.

La moyenne des 16 contrôles du Nitisol prélevés au cours des 6 mois de traitement est de 1,1 mg/kg avec un écart-type de 0,2 mg/kg. Le coefficient de variation est de 21 %.

Dans le sol traité (NIT-DARA), la concentration en chlordécone chute fortement (-50 %) après la phase anaérobie du cycle 1 puis remonte (+ 30 %) d'une manière inexplicable après la semaine d'aérobie (fin de cycle 1). L'augmentation des valeurs en fin de phase aérobie de ce cycle sont des « outliers » par rapport à l'ensemble des autres valeurs.

Le métabolite 5b-hydrochlordécone est détecté à des très bas niveaux non quantifiables (plus faibles que dans l'andosol, analogues à ceux du ferralsol), dans les échantillons témoins et traités, avec une aire de pic plus faible dans le sol traité que dans le contrôle. Par contre, la di-hydrochlordécone n'est détectée (elle n'est pas quantifiable vu l'absence de standard) que dans les sols traités.

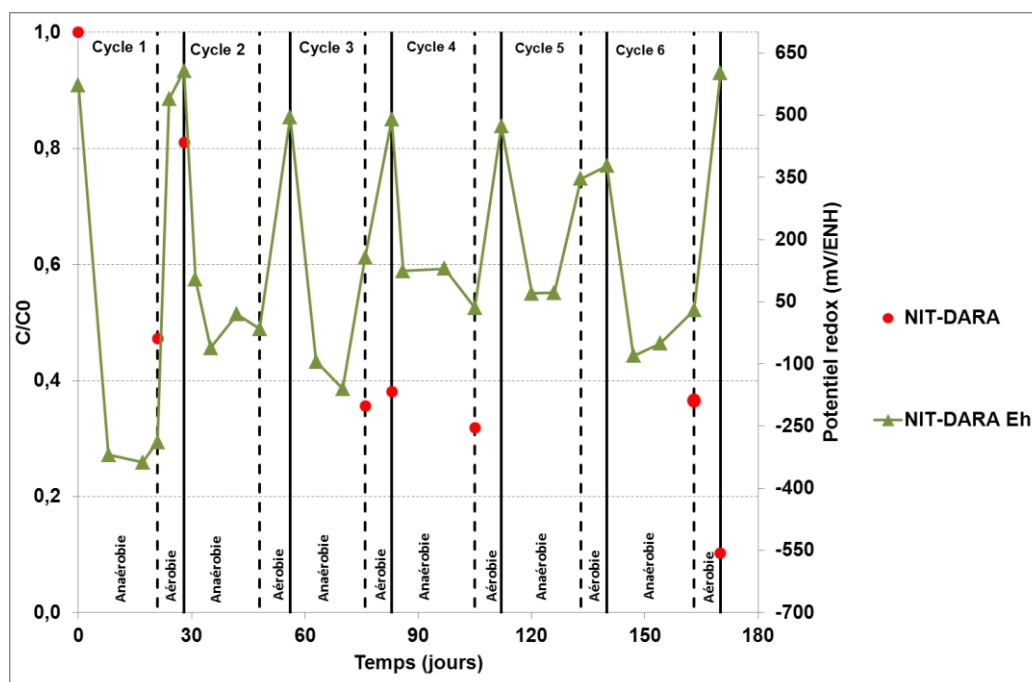


Figure 42 : Relation entre l'évolution du potentiel redox et la concentration en chlordécone normée (C/C₀) dans le nitisol traité par le procédé Daramend® (NIT-DARA). C₀ et C sont les concentrations respectives dans les mésocosmes témoins et traités au temps t.

d) Taux de dégradation de la chlordécone

Le taux de dégradation de la chlordécone dans les sols traités a été calculé en déterminant le rapport suivant dont les valeurs sont reportées sur la Figure 43 :

$$\text{Taux de dégradation (\%)} = 1 - \frac{[\text{chlordécone (sol traité) à } T_n]}{[\text{chlordécone (sol témoin) à } T_n]}$$

Pour l'andosol, les taux de dégradation les plus fréquemment observés sont entre 10 et 20 %, avec une valeur de 45 % en fin de traitement. Pour les deux autres sols Ferralsol (FRL-DARA) et Nitisol (NIT-DARA), les taux de dégradation sont nettement meilleurs ; ils fluctuent d'environ 15 % autour d'une valeur moyenne de 60 % (sauf NIT fin de cycle 1, avec seulement 20 % d'abattement) dès le 1^{er} cycle, et atteignent en fin de traitement 88,9 % pour FRL et 89,7 % pour NIT. Ces très bons taux, mesurés à partir des résultats des analyses effectuées sur le gros composite de 5 kg prélevé en fin de traitement, sont particulièrement fiables.

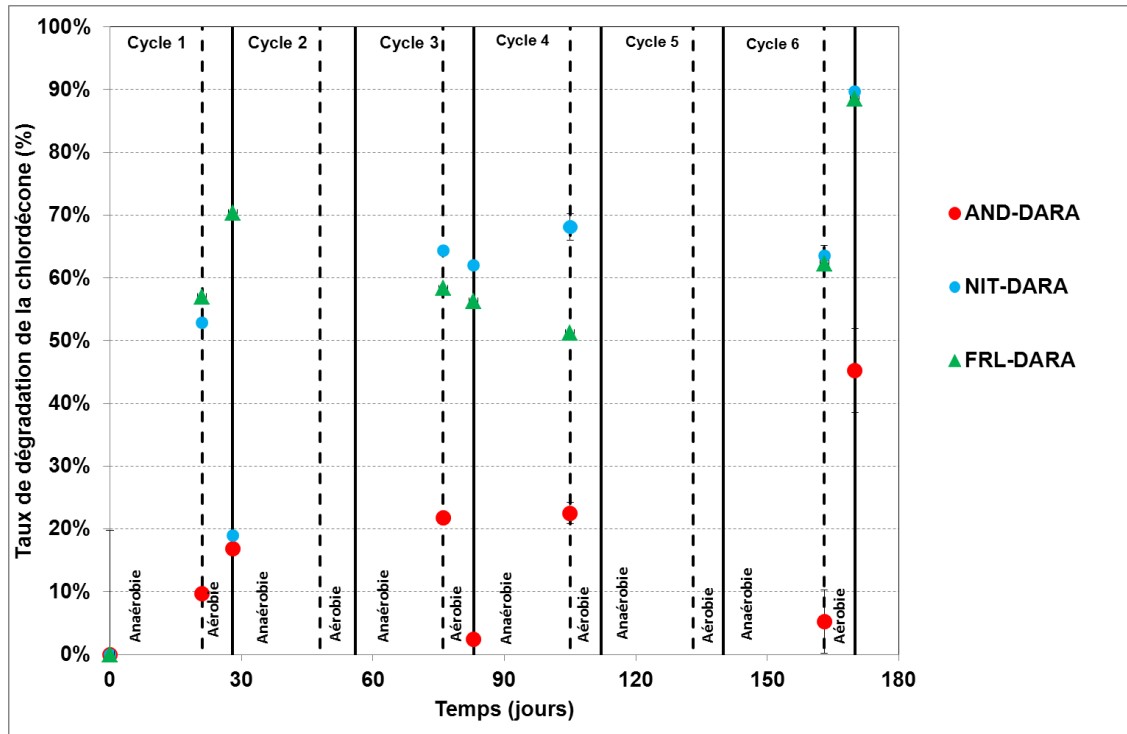


Figure 43 : Évolution du taux de dégradation de la chlordécone dans les sols traités (-DARA) au cours de la succession des cycles de traitement.

Le traitement de ferralsol et nitisol prélevés sous bananeraie en Guadeloupe avec le produit commercial Daramend® additionné à certaines reprises d'une source supplémentaire de Fer zéro valent et soumettant les sols à une succession de phases anaérobie et aérobie permet un abattement très significatif de la concentration en chlordécone. L'abattement est moindre pour l'andosol.

Les concentrations maximales admissibles en chlordécone dans les sols sont de 0,25 mg/kg pour les jardins et 0,1 mg/kg pour les cultures commercialisées (Cabidoche *et al.*, 2006). Après 6 mois de traitement, la concentration résiduelle dans le Nitisol, 0,1 mg/kg, rendrait donc à nouveau possible ces deux usages du sol.

Pour le Ferralsol, le traitement permet de respecter la valeur maximale admissible pour les jardins. Dans le cas de l'Andosol, la concentration résiduelle après traitement reste 5 à 9 fois plus élevée que les valeurs maximales admissibles (Tableau 34). Il faut rappeler que les trois sols étudiés présentaient au départ des taux de contamination particulièrement élevés (un des critères du choix des parcelles effectué par Y.M. Cabidoche).

Sol Traité	Concentration résiduelle en fin de traitement (mg/kg)	Respect de la concentration en chlordécone maximale admissible pour les jardins (<0,25 mg/kg) ?	Respect de la concentration en chlordécone maximale admissible pour les cultures commercialisables (<0,1 mg/kg) ?
Andosol	8,72 ± 0,95	NON	NON
Ferralsol	0,19 ± 0,01	OUI	NON
Nitisol	0,10 ± 0,06	OUI	OUI

Tableau 34 : Concentrations résiduelles en chlordécone en fin de traitement pour les trois sols comparées aux concentrations maximales admissibles dans les sols selon l'usage (jardin, cultures commercialisables).

3.3.4. Suivi microbiologique

a) Dénombrements bactériens

Des dénombrements de bactéries hétérotrophes cultivables correspondant aux métabolismes aérobie, anaérobie et ferri-réducteur ont été effectués dans les sols traités en fin de phase anaérobie et aérobie des cycles 1, 4 et 6 du traitement Daramend. Dans les sols témoins non traités, ces dénombrements ont été effectués aux dates correspondant à la fin de phases anaérobies des sols traités.

- Les sols témoins

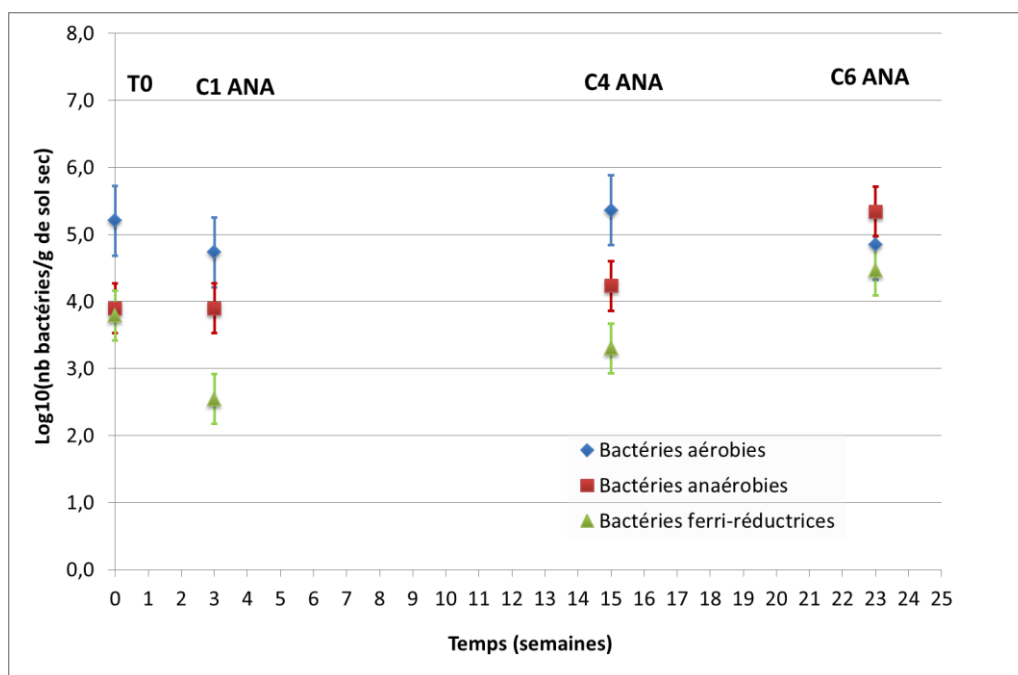


Figure 44 : Dénombrements bactériens (aérobies, anaérobies et ferri-réductrices) dans l'andosol non traité à T0 et aux temps correspondant aux fins de la phase anaérobie des cycles C1, C4 et C6 du sol traité DARAMEND®.

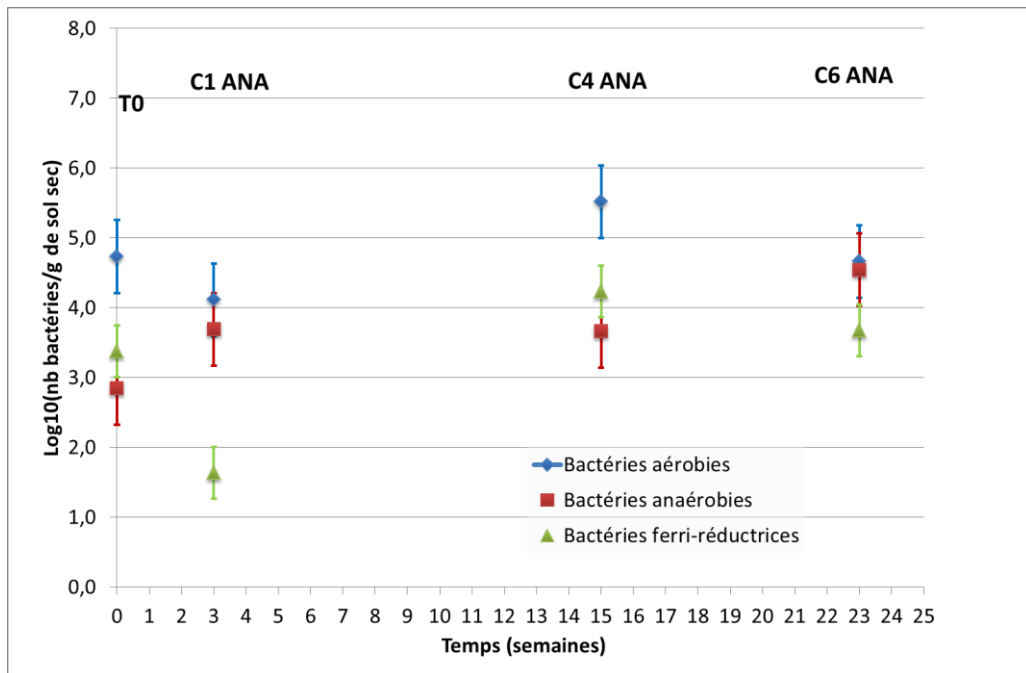


Figure 45 : Dénombrements bactériens (aérobies, anaérobies et ferri-réductrices) dans le ferrisol non traité à T0 et aux temps correspondant aux fins de la phase anaérobie des cycles C1, C4 et C6 du sol traité DARAMEND®.

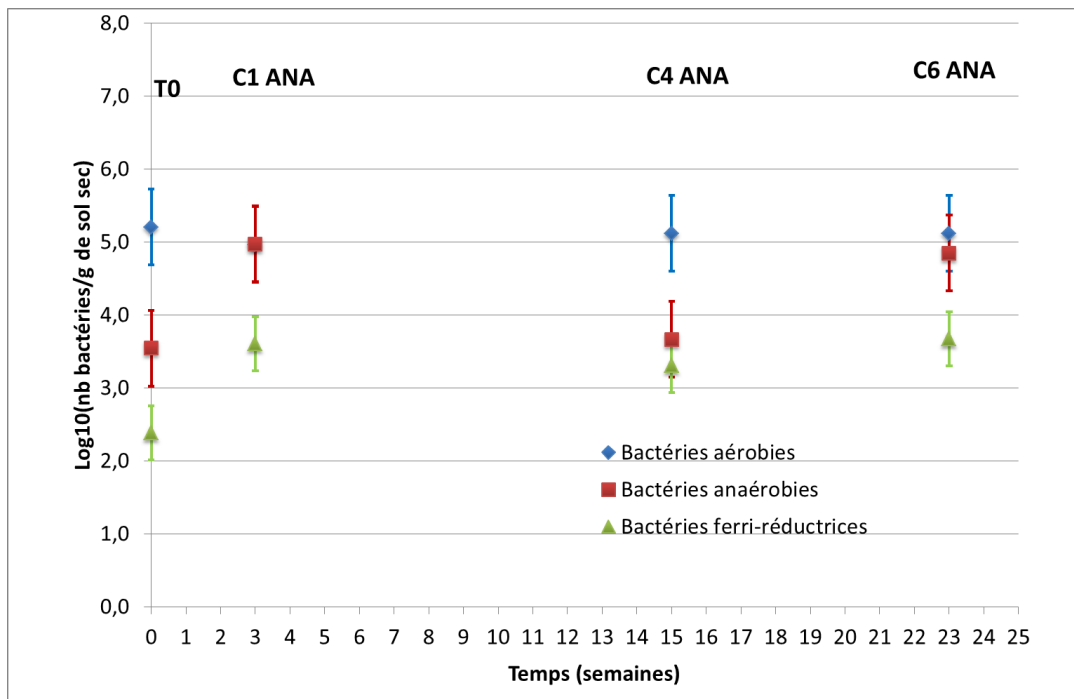


Figure 46 : Dénombrements bactériens (aérobies, anaérobies et ferri-réductrices) dans le nitisol non traité à T0 et aux temps correspondant aux fins de la phase anaérobie des cycles C1, C4 et C6 du sol traité DARAMEND®.

Le nombre de bactéries hétérotrophes aérobies dans l'andosol non traité reste constant au cours des six mois de traitement ($7,0 \times 10^4$ à $2,3 \times 10^5$ bactéries/g sol sec ; Figure 44). Par contre, les nombres de bactéries hétérotrophes anaérobies et de bactéries ferri-réductrices augmentent au cours du temps ($7,3 \times 10^3$ à $2,5 \times 10^5$ bactéries/g sol sec pour les bactéries anaérobies et $6,2 \times 10^3$ à $2,9 \times 10^4$ bactéries/g sol sec pour les bactéries ferri-réductrices).

Dans le ferralsol (Figure 45), les seules variations significatives, en tenant compte de la variabilité des triplicats, sont l'augmentation des aérobies après 15 semaines et la diminution des ferri-réductrices après trois semaines. Toutefois, les effectifs au T final (23 semaines) sont, hormis pour les anaérobies, très semblables aux valeurs mesurées au T zéro.

Dans le nitisol (Figure 46), seules deux variations significatives, en tenant compte de la variabilité des triplicats, sont observées. D'une part l'augmentation des ferri-réductrices après trois semaines et le maintien de cette population à un niveau supérieur à celui mesuré au départ. D'autre part, la fluctuation des anaérobies, qui sont, en fin d'expérience, plus nombreuses qu'au départ.

- **L'andosol traité**

L'andosol, avant traitement, contient $1,6 \times 10^5$ bactéries aérobies/g sol sec qui est une valeur proche des données de la littérature (Figure 47). La mise en anaérobiose après ajout de produit DARAMEND® suivie d'une phase aérobie entraîne une augmentation du nombre de bactéries aérobies (respectivement $1,03 \times 10^6$ et $2,3 \times 10^6$ bactéries/g sol sec). L'apport de matière organique contenue dans le produit DARAMEND® a probablement stimulé leur croissance.

L'andosol soumis au traitement contient au départ $3,5 \times 10^3$ bactéries anaérobies/g sol sec. La mise en anaérobiose et l'ajout d'amendements organiques contenu dans le produit DARAMEND® a entraîné une multiplication de leur nombre par un facteur de 100 au cours du cycle 1 ($1,7 \times 10^5$ et $7,0 \times 10^5$ bactéries/g sol sec pour respectivement les fins de phase anaérobie et aérobie du cycle 1). Le nombre chute de l'ordre d'un facteur 100 en fin de phase anaérobie du cycle 4 malgré un ajout d'amendement organique effectué au début de chaque phase anaérobie et d'eau pour le maintien des conditions anaérobies. Il faut toutefois noter qu'en fin de cycle 3, l'humidité du sol a été amenée de à 120 % de la CAC (au lieu de 90 % auparavant) entraînant une sursaturation du sol. Il est probable qu'une partie des bactéries anaérobies (les moins strictement anaérobies) aient été négativement impactées par ce changement de conditions physiques. En fin de cycle 6, le nombre de bactéries anaérobies atteint les valeurs observées pour le cycle 1 ($2,2 \times 10^5$ et $4,9 \times 10^5$ bactéries/g sols sec pour respectivement les phases anaérobies et aérobies du cycle 6).

Le nombre de bactéries ferri-réductrices est de $6,2 \times 10^3$ bactéries/g sol sec avant le traitement et augmente d'une puissance de 10 en fin de phase anaérobie du cycle 1 (Figure 47) en raison de conditions favorables à leur développement (ajout d'une source de Fer zéro valent, d'amendement organiques et d'eau). En fin de cycle 1, la mise en aérobie du sol n'entraîne pas de diminution significative de leur nombre du

fait de la durée courte de cette phase. Par contre, il est à noter que la succession de phases anaérobies/aérobie accompagnée d'ajout de DARAMEND® entraîne une stimulation de la croissance des bactéries ferri-réductrices avec la multiplication par un facteur 10 (par rapport au cycle 1) de leur nombre en fin de phase anaérobie du cycle 4. En fin de cycle 6, leur nombre a été multiplié par un facteur 100 par rapport au T0.

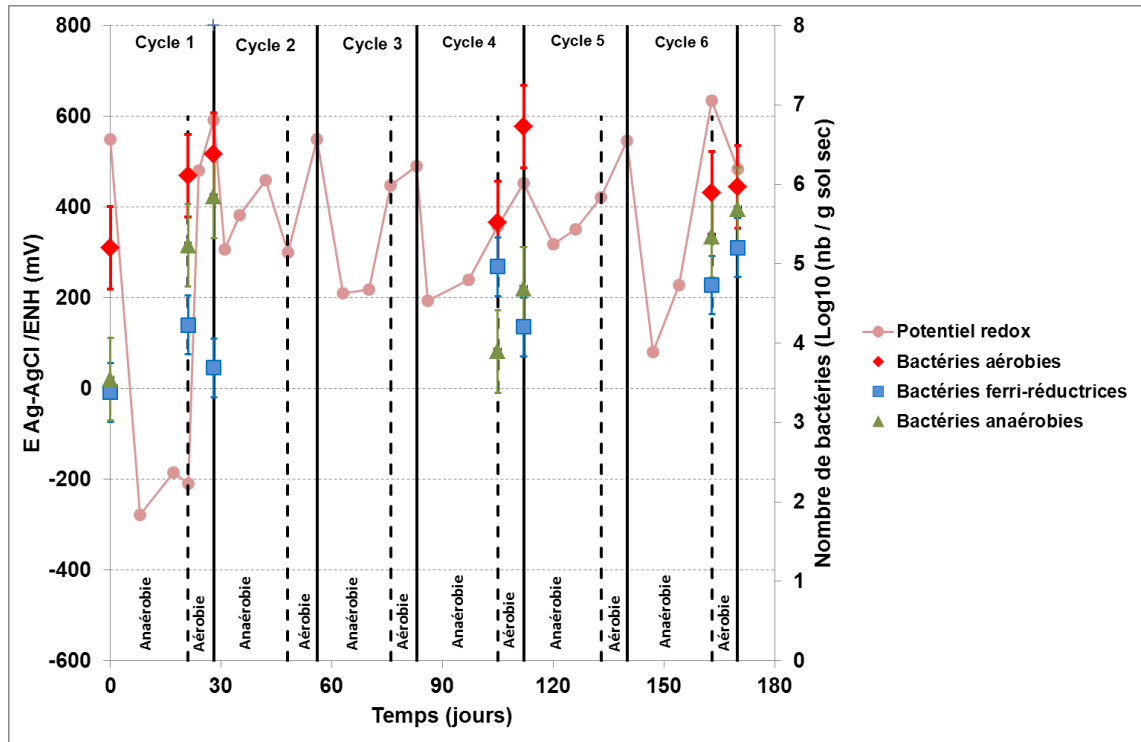


Figure 47 : Relation entre le potentiel redox (mesuré à 10 cm de profondeur) et les dénombrements des bactéries hétérotrophes aérobies, anaérobies et ferri-réductrices au cours du traitement de l'andosol par le procédé DARAMEND® (AND-DARA).

• Le ferralsol traité

Les nombres de bactéries aérobies ($2,4 \times 10^4$ / g sol sec), anaérobies ($1,6 \times 10^3$ / g sol sec) et ferri-réductrices ($2,4 \times 10^3$ / g sol sec) dans le ferralsol est du même ordre de grandeur que ceux de l'andosol (Figure 48).

Au bout de trois semaines d'anaérobie (fin de phase anaérobie du cycle 1), malgré un potentiel redox bas (-380 mV/ENH) reflétant un sol anoxique, le nombre de bactéries aérobies ne chute pas mais augmente même d'un facteur 10. Il est possible que les bactéries aérobies dénombrées aient un métabolisme aérobique facultatif qui les rend capables de se maintenir en conditions anoxiques, ou qu'il y ait des micro-niches qui restent aérobies au sein des agrégats de sol. Le nombre de bactéries aérobies est à nouveau multiplié par un facteur 10 après une semaine de phase aérobie (cycle 1). Après la phase anaérobie du cycle 4, leur nombre est à nouveau multiplié par un facteur 10 et se maintient autour de 3×10^7 après la phase aérobie de ce même cycle, et entre 8×10^6 et 3×10^7 durant le cycle 6.

Il n'y a pas de relation nette entre le potentiel redox et l'évolution du nombre de bactéries anaérobies dans le cas du ferralsol. Pour le cycle 1, une augmentation d'une puissance de 10 est effectivement observée après trois semaines de mise en anaérobiose du sol. Par contre, le nombre d'anaérobies chute à $3,3 \times 10^3$ bactéries/g de sol sec après la phase anaérobie du cycle 4, puis augmente à nouveau d'un facteur 10 en fin de phase anaérobie du cycle 6, atteignant alors une valeur environ 100 fois supérieure à celle mesurée à t zéro.

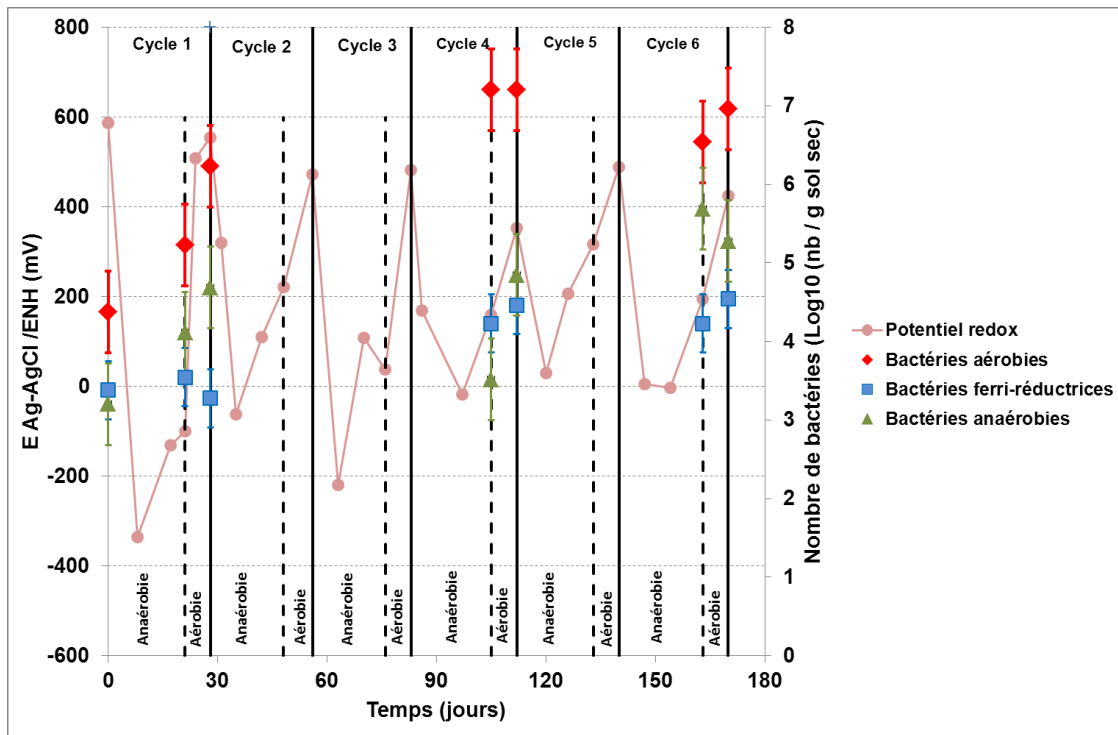


Figure 48 : Relation entre le potentiel redox et les dénombrements des bactéries hétérotrophes aérobies, anaérobies et ferri-réductrices au cours du traitement du ferralsol par le procédé DARAMEND® (FRL-DARA).

Le nombre de bactéries ferri-réductrices augmente comme le nombre de bactéries anaérobies (facteur 9) après la phase anaérobie du cycle 1. Leur nombre n'évolue pas significativement pendant le cycle 4 et il augmente après trois semaines de phase anaérobie du cycle 6 (facteur 8 par rapport à T0).

• Le nitisol traité

Comme pour le ferralsol, une augmentation d'un facteur de 10 du nombre de bactéries aérobies est observée après trois semaines de traitement (Figure 49). Leur nombre reste ensuite, en tenant compte de la variabilité des triplicats, globalement stable.

Le nombre de bactéries anaérobies augmente lui aussi d'un facteur de 10 à 100 après les phases anaérobies et aérobies du cycle 1, suite à l'apport de substrat organique et inorganiques (l'oxydation du Fer zéro valent introduit forme du Fe(III) qui est un

substrat pour les bactéries ferri-réductrices) via DARAMEND® et un potentiel redox bas (-300 mV/ENH).

Comme pour les bactéries anaérobies, le nombre de bactéries ferri-réductrices augmente après trois semaines de phase anaérobie (Cycle 1) puis se stabilise sur la durée du traitement (Figure 49). De même, il n'y a pas de relation évidente entre l'évolution du potentiel redox et celui des bactéries aérobie et anaérobies.

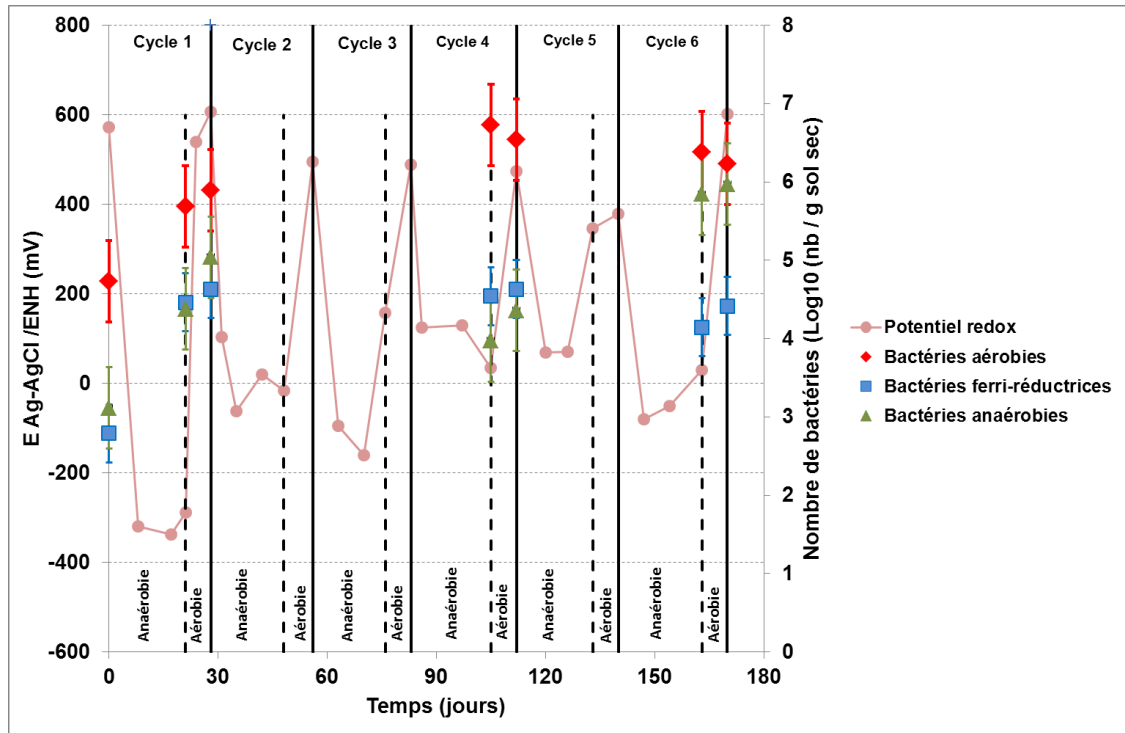


Figure 49 : Relation entre le potentiel redox et les dénombrements des bactéries hétérotrophes aérobies, anaérobies et ferri-réductrices au cours du traitement du nitisol par le procédé DARAMEND® (NIT-DARA).

L'augmentation du nombre de bactéries à la fin du cycle 1 est corrélée avec la diminution de la concentration en chlordécone dans le sol au même temps. De plus, la relative stabilisation du nombre de bactéries après les cycles 4 et 6 est aussi mise en évidence pour l'analyse de la chlordécone.

Des analyses plus approfondies de la communauté bactérienne, notamment au niveau de la détection et la quantification de gènes impliquées dans la déchloration réductrice de composés chlorés tels que le lindane et les PCB, permettraient, en faisant une analogie certes discutable entre ces organochlorés et la chlordécone, de mieux connaître le potentiel bactérien de dégradation de la chlordécone dans les sols étudiés.

b) Activités potentielles de réduction

La dénitrification, par laquelle les composés azotés oxydés (NO_3^- , NO_2^-) sont réduits en composés gazeux (NO , N_2O et N_2), est un processus majeur dans le cycle de l'azote. Les communautés dénitrifiantes sont affectées par les conditions physico-chimiques du sol telles que la température, l'humidité, le pH et le substrat (NO_3^- , carbone organique). De plus, des expositions à des éléments métalliques tels que le cadmium, le cuivre, le zinc et l'argent ont un effet néfastes sur ces communautés (Guo *et al.*, 2011).

L'inhibition sélective de différentes étapes dans le processus de dénitrification dans les sols va entraîner une perturbation du cycle de l'azote. Il a été montré que la réduction des NO_2^- est plus sensible que celle de la réduction des NO_3^- , ce qui peut entraîner une accumulation de NO_2^- en cas d'inhibition de la dénitrification. De même, une inhibition sélective des enzymes NO réductase ou N_2O réductase par les métaux lourds va augmenter les émissions de NO ou N_2O par les sols. Des perturbations de l'activité dénitrifiante peuvent résulter du traitement par le Daramend, avec des impacts négatifs sur les fonctions des sols. Cette activité a donc été suivie à différents moments dans les sols traités et les sols témoins non traités.

Dans les trois sols, l'activité potentielle (en opposition à « réelle » car elle est mesurée ici dans des conditions optimales) dénitrifiante est augmentée dans les sols traités par rapport aux sols témoins (Figure 50).

En ce qui concerne l'andosol, la production de N_2O est détectée durant les deux premières heures de la cinétique ensuite elle devient nulle. Les nitrates sont réduits mais sans accumulation transitoire de NO_2^- (Figure 51). Les résultats relatifs à l'Andosol sont à prendre avec précaution car les cinétiques de réduction des nitrates, des nitrites et de production de N_2O ne sont pas classiques. Par exemple, pour les ferralsol et Nitisol, la cinétique de réduction des nitrates s'accompagne d'une phase transitoire d'apparition des nitrites suivie de la phase de production de N_2O . Celui-ci s'accumule dans la fiole car la présence d'acétylène bloque la réduction ultime du N_2O en N_2 (Figure 52 et Figure 53).

Une stimulation de l'activité dénitrifiante est observée après quatre cycles d'alternance de phase anaérobie/aérobie avec ajout d'amendement de Fer Zéro Valent et de substrats organiques. Cette activité diminue en fin de phase anaérobie du dernier cycle (cycle 6) par rapport au cycle 4 mais, pour le ferralsol, reste supérieure à la valeur du sol non traité.

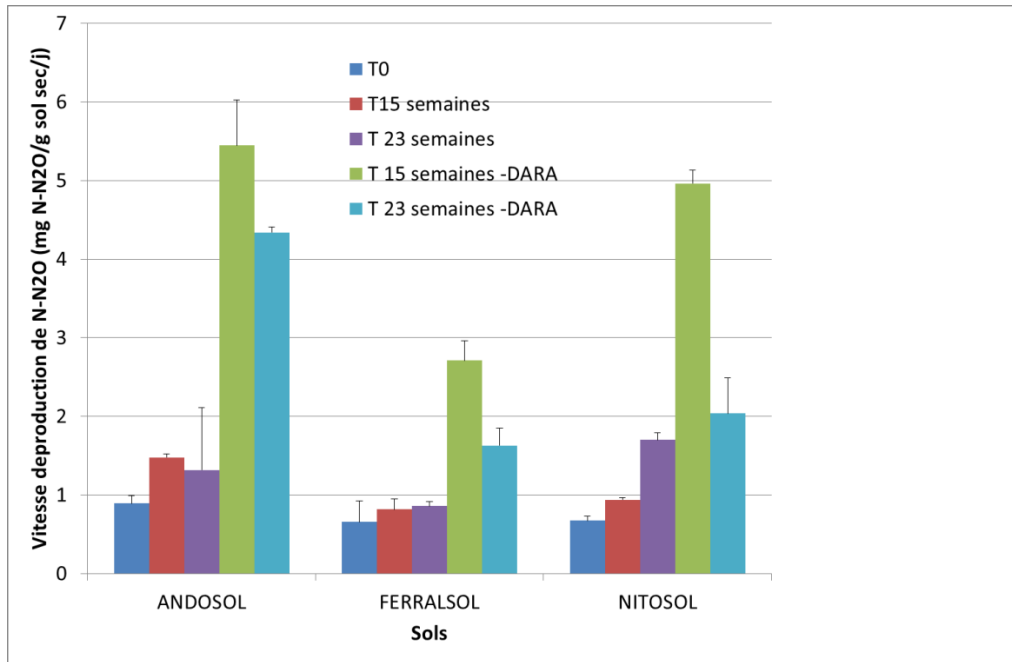


Figure 50 : Comparaison des vitesses de production de N₂O entre les sols traités (-DARA) et non traités à T0 et à la fin des phases anaérobies des cycles 4 (15 semaines de traitement) et 6 (23 semaines de traitement).

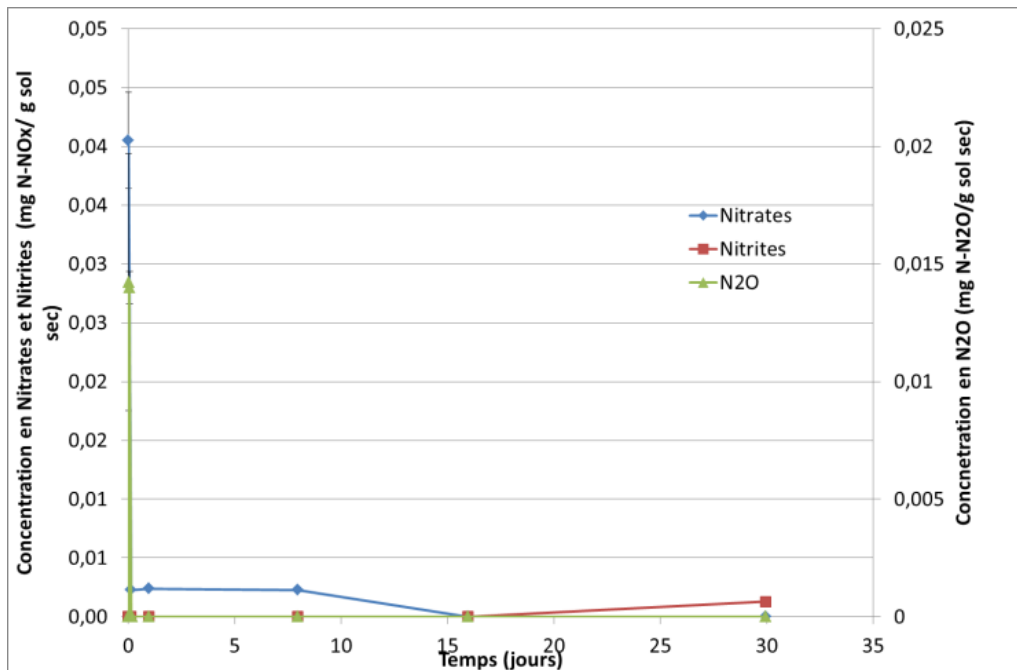


Figure 51 : Cinétiques de mesure de l'activité dénitrifiante potentielle dans le sol AND-DARA après 15 semaines de traitement.

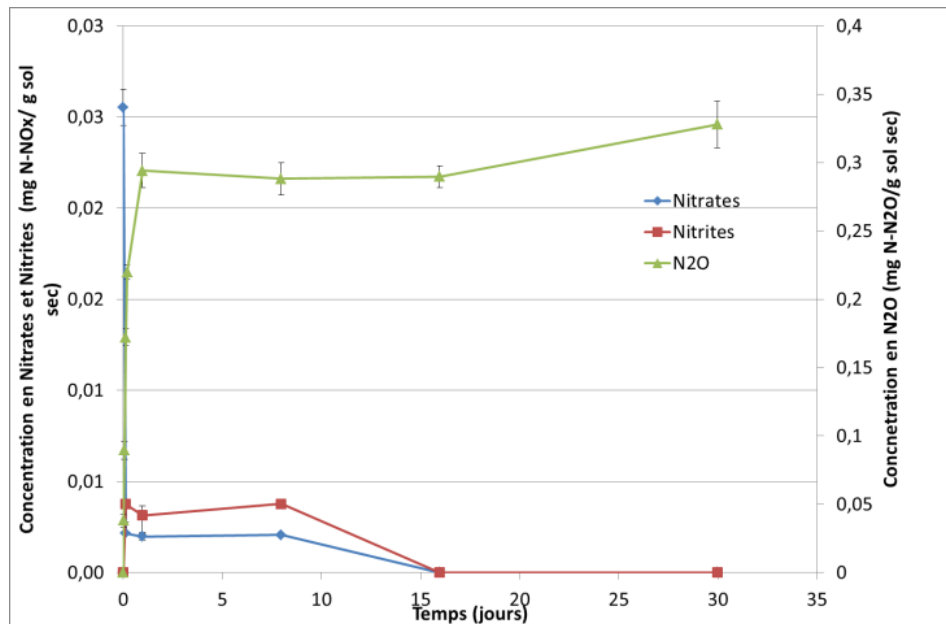


Figure 52 : Cinétiques de mesure de l'activité dénitrifiante potentielle dans le sol FRL-DARA après 15 semaines de traitement.

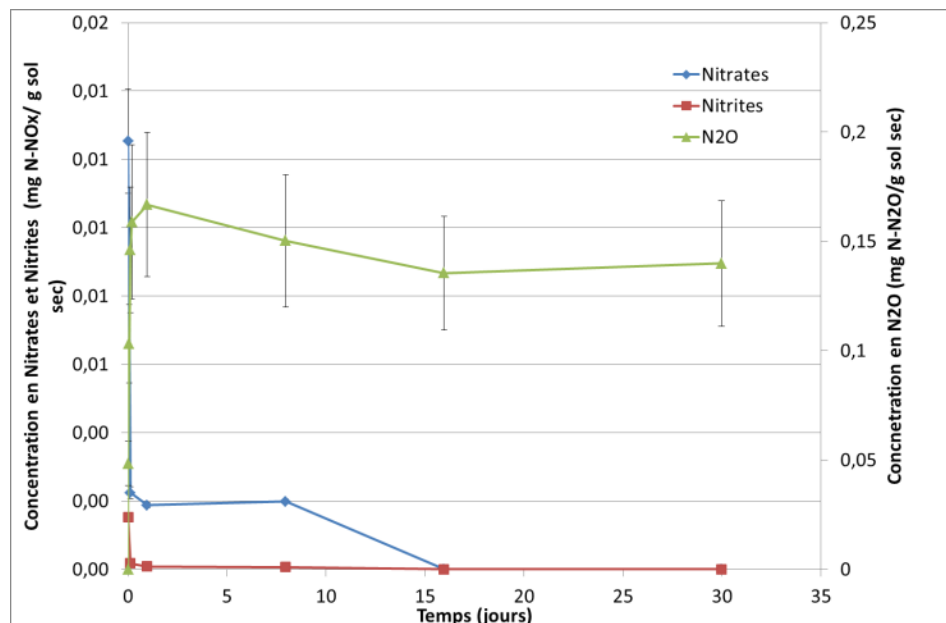


Figure 53 : Cinétiques de mesure de l'activité dénitrifiante potentielle dans le sol NIT-DARA après 15 semaines de traitement.

L'activité potentielle de réduction du Fe(III) en Fe(II) a été mesurée à T0, en fin de phases anaérobies des cycles 1, 4 et 6 des sols traités (-DARA). En parallèle, le même suivi a été réalisé aux mêmes temps sur les sols des mésocosmes non traités. Pour les trois sols des mésocosmes non traités, l'activité de ferri-réduction reste stable au cours des six mois de traitement (figure 54). En fin de phase anaérobie du cycle 1,

malgré l'apport conjoint de DARAMEND® et de Fe⁰ dans les sols et une mise en anaérobiose, l'activité ferri-réductrice n'a pas été fortement stimulée par ces apports. Par contre, le nombre de bactéries ferri-réductrices a lui été multiplié par un facteur 10 entre la fin de la phase anaérobie du cycle 1 (T 3 semaines) et le T0.

Pour l'andosol traité, une forte activité ferri-réductrice est observée après six mois de traitement, celle-ci a été multipliée par 10 entre les cycles 4 et 6. Pour le ferralsol traité, la stimulation de l'activité ferri-réductrice est beaucoup moins visible et n'est significative qu'en fin de phase anaérobie du cycle 6. Dans le cas du nitisol traité, une stimulation de l'activité ferri-réductrice du même ordre de grandeur que pour l'andosol est observée à T 15 semaines puis décroît à T 23 semaines.

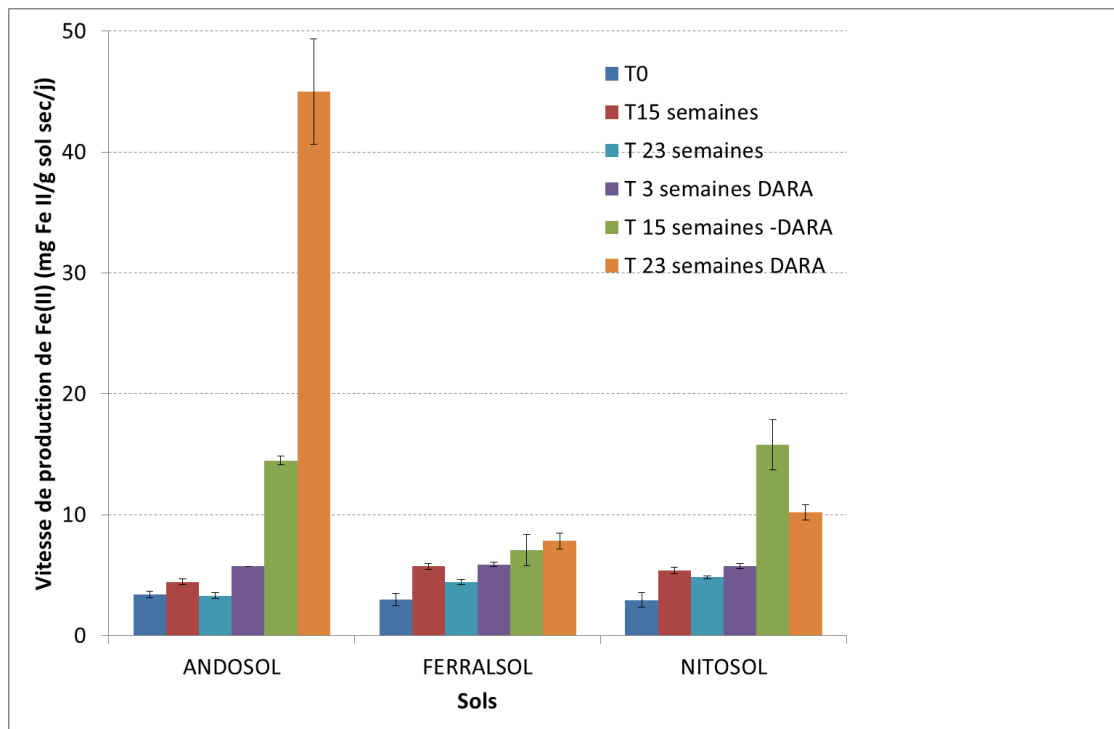


Figure 54 : Comparaison des vitesses de production de Fe(II) entre les sols traités (-DARA) et non traités à T0 et à la fin des phases anaérobies des cycles 4 (15 semaines de traitement) et 6 (23 semaines de traitement).

L'activité sulfato-réductrice potentielle a été mesurée en fin des phases anaérobies des cycles 1, 4 et 6 et en parallèle sur les sols témoins aux mêmes temps (figure 55). Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) vont utiliser le sulfate comme accepteur terminal d'électron et des composés carbonés de faible poids moléculaires (PM) comme source de carbone (acétate, lactate, pyruvate, alcools de faible PM...), afin de former du CO₂ (ou de l'acétate) et de l'hydrogène sulfuré en conditions anaérobies strictes, c'est-à-dire qu'elles sont inhibées par la présence d'O₂.

Dans les sols témoins (andosol et ferralsol), la vitesse de consommation des sulfates ne varie pas au cours du temps. Par contre, la vitesse de consommation des sulfates dans le nitisol augmente d'un facteur 2 au bout de deux semaines.

D'une manière générale, pour les trois sols traités, une stimulation de la vitesse de consommation des sulfates est enregistrée en fin de phase anaérobie du cycle 4 (T 15 semaines), puis celle-ci chute en fin de phase anaérobie du cycle 6 (T 23 semaines). Dans le cas de l'andosol traité, cette vitesse devient très importante par rapport au même sol non traité (facteur x5) après la phase anaérobie du cycle 4 (T 15 semaines) puis chute après la phase anaérobie du cycle 6. Pour le ferralsol, la vitesse de consommation des sulfates est multipliée par un facteur de 1,5 (T 15 semaines). Pour le nitisol, la vitesse est multipliée par un facteur 4 à T 15 semaines. Les vitesses de consommation entre le sol traité et non traité sont similaires après 23 semaines.

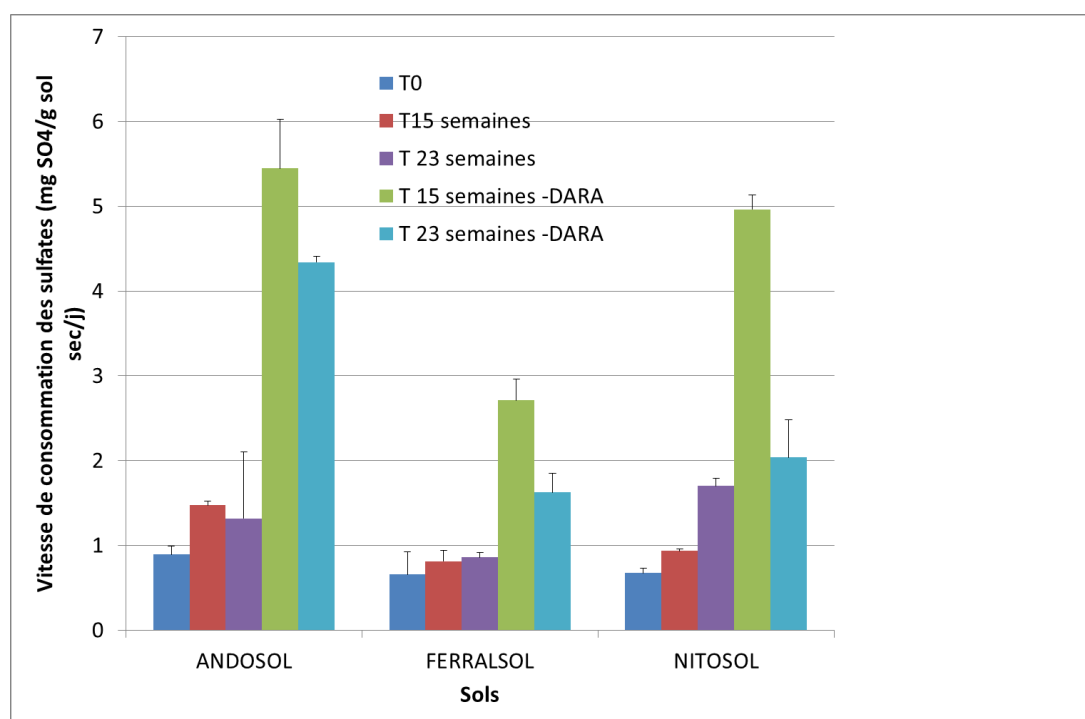


Figure 55 : Comparaison des vitesses de consommation des sulfates entre les sols traités (-DARA) et non traités à T0 et à la fin des phases anaérobies des cycles 4 (15 semaines de traitement) et 6 (23 semaines de traitement).

En résumé, pour l'andosol le traitement DARAMEND engendre une stimulation des activités ferri- et sulfato-réductrices après les phases anaérobies des cycles 4 et 6. Par contre, la mesure de l'activité dénitrifiante, telle que réalisée dans le cadre de ce projet, ne permet pas de conclure à une stimulation ou non.

Pour le ferralsol, le traitement DARAMEND engendre une stimulation des activités dénitrifiante et sulfato-réductrices après les phases anaérobies des cycles 4 et 6. Par contre, l'activité de ferri-réduction n'est que très légèrement stimulée.

Pour le nitisol, le traitement DARAMEND engendre une stimulation des activités dénitrifiante, ferri-réductrice et sulfato-réductrice, essentiellement après la phase anaérobie du cycle 4.

Pour les trois sols traités, la stimulation est moindre en fin de phase anaérobie du cycle 6.

3.3.5. Étude de la structure génétique des communautés bactériennes des trois sols guadeloupéens avant le début de l'application du procédé ISCR.

a) Biomasse microbienne totale : quantification de l'ADN extrait

Le protocole d'extraction d'ADN de sol utilisé dans cette étude, basé sur une modification de la norme PR NF ISO 11063, a permis d'obtenir pour tous les triplicats provenant du ferralsol et du nitisol de l'ADN de haut poids moléculaire, non dégradé et suffisamment concentré pour servir de matrice aux amplifications par PCR de l'ADNr 16S.

La quantité d'ADN extrait est estimée par quantification sur gel d'agarose à 10,4 (\pm 0,6) μ g d'ADN/g de sol sec pour le ferralsol et à 7,7 (\pm 3,0) μ g d'ADN/g de sol sec pour le nitisol. Les quantités d'ADN extrait de ces deux parcelles ne montrent pas de différence significative ($p > 0,05$).

Dequiedt *et al.* (2009) ont montré que pour les 1016 sols européens analysés dans le cadre du Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS) les quantités d'ADN extraits varient de 0,1 à 41,1 μ g d'ADN/g de sol sec avec une moyenne de 8,9 μ g d'ADN/g de sol sec. De plus, la quantification de l'ADN microbien est considérée comme une mesure de la biomasse microbienne totale du sol (Marstorp *et al.*, 2000 ; Leckie *et al.*, 2004 ; Gangneux *et al.*, 2009 ; Dequiedt *et al.*, 2009). Les quantités d'ADN estimées à partir du ferralsol et du nitisol guadeloupéens sont cohérentes avec les valeurs décrites par Dequiedt *et al.* (2009), même si la comparaison entre des données obtenues à partir de sols guadeloupéens et « européens » doit être prudente.

Pour l'andosol provenant de Guadeloupe, ni la norme PR NF ISO 11063 modifiée ni l'utilisation d'un kit commercial (FastDNA[®] spin kit for Soil, MP Biomedicals, France) n'ont permis d'obtenir de l'ADN. L'extraction directe de l'ADN (sans étape de séparation des bactéries de la matrice sol) des andosols qui sont relativement ubiquistes (100 millions d'hectare à travers le monde), est décrite comme très difficile (Herrera et Cockell, 2007 ; Saeki *et al.*, 2010 ; Saeki et Sakai, 2009 ; Takada-Hoshino et Matsumoto, 2004, ; Ikeda *et al.*, 2008). L'ADN lysé lors de l'extraction est adsorbé sur les particules de sols par différents mécanismes (Saeki et Sakai, 2009). Les andosols possèdent des propriétés particulières attribuées aux « produits amorphes » (allophatiques) de leurs colloïdes minéraux et organo-minéraux. Les allophanes et les oxydes de fer et d'aluminium non cristallins contribueraient majoritairement à l'adsorption de l'ADN dans les andosols (Saeki *et al.*, 2008 ; Saeki et Sakai, 2009). Ces études ont permis de développer des protocoles basés sur l'ajout d'un compétiteur de l'ADN (Ikeda *et al.*, 2008 ; Takada-Hoshino et Matsumoto, 2004) qui améliore les rendements d'extraction directe de l'ADN des andosols.

À partir des différentes données bibliographiques, différents adjuvants ont été testés et un protocole d'extraction spécifique a été optimisé afin d'extraire directement l'ADN de l'andosol provenant de Guadeloupe. Ce travail sera valorisé par une note dans une revue à comité de lecture et n'est donc pas détaillé dans ce rapport.

Avec le protocole optimisé, la quantité d'ADN extrait pour l'andosol est estimée à 23,3 ($\pm 0,4$) μg d'ADN/g de sol sec. Elle est significativement plus élevée que celle observée pour le nitisol et le ferralsol ($p < 0,05$). Cette valeur élevée peut résulter de la présence de l'adjuvant dans le protocole d'extraction d'ADN. Toutefois, l'ajout de l'adjuvant n'a pas permis d'augmenter les rendements d'extraction dans le cas notamment du nitisol (données non communiquées) par rapport au protocole initial. Les quantités élevées d'ADN extrait pour l'andosol sont à rapprocher de la structure physique de ce sol caractérisée par la présence d'allophanes : des argiles ayant une porosité et un volume poreux de deux à quatre fois plus importants que les autres sols. La surface poreuse peut atteindre plus de 100 m^2/g (Woignier, 2007). La structure fine des sols présente des habitats favorables au développement microbien, contribue à une protection plus élevée contre la dessiccation et une diffusion des gaz toxiques, et assure une meilleure disponibilité du carbone et de l'azote (Ranjard *et al.*, 2001). Boudot *et al.* (1986) ont spécifiquement démontré l'exceptionnelle capacité des sols à allophanes dans la fixation du carbone et de l'azote apporté par les plantes.

L'andosol étudié contient 13,4 % de matières organiques. Cette forte teneur rend nécessaire la répétition des étapes de purification de l'ADN (paragraphe 2.7.5.b) afin d'éliminer les substances humiques, fulviques... résultant de la dégradation de la matière organique, co-extraites avec l'ADN, et qui sont des inhibiteurs connus de certaines réactions enzymatiques (inhibition des réactions PCR). Une étape supplémentaire de purification est également nécessaire afin d'éliminer les traces de l'adjuvant introduit dans la solution de lyse. Toutes ces étapes induisent une perte importante de matériel génétique (supérieure à 70 %) à la fin des traitements. Le caractère aléatoire des pertes de matériel génétique, rapporté pour différentes méthodes de purification (Ranjard *et al.*, 1998 ; Dequiedt, communication personnelle) atténue le biais systématique qui pourrait être lié à la méthode d'extraction de l'ADN de l'andosol. L'ADN purifié obtenu à partir de l'andosol antillais a donc servi de matrice aux amplifications par PCR de l'ADNr 16S.

En termes pédologiques, une chronoséquence est décrite pour le passage des andosols vers les ferralsols, via les nitisols, correspondant, à partir d'un même matériau volcanique, à l'altération des allophanes et la formation de nouveaux minéraux en fonction de la durée et des modifications des conditions pédoclimatiques (Référentiel pédologique, 2008). L'ajout d'adjuvant dans la solution de lyse lors de l'extraction de l'ADN du nitisol n'a pas permis d'augmenter les rendements d'extraction d'ADN pour ce sol (test t de student, $p > 0,05$, données non communiquées). L'adsorption de l'ADN décrite pour les andosols n'a pas été observée pour le nitisol ce qui suggère l'absence, ou la moindre présence, des supports d'adsorption d'ADN, dont les allophanes, dans ce sol. Au contraire, l'ajout d'une quantité trop importante de l'adjuvant utilisé pour l'extraction de l'ADN de l'andosol pourrait conduire à une diminution des rendements d'extraction pour le nitisol et le ferralsol.

b) Structure des communautés bactériennes : analyse par PCR-t-RFLP de l'ADNr 16S

Les empreintes moléculaires des communautés bactériennes obtenues par PCR-t-RFLP de l'ADNr 16S pour les trois sols à partir de trois extractions indépendantes d'ADN réalisées directement à partir des sols bruts (non tamisés) sont rapportées sur la figure 56.

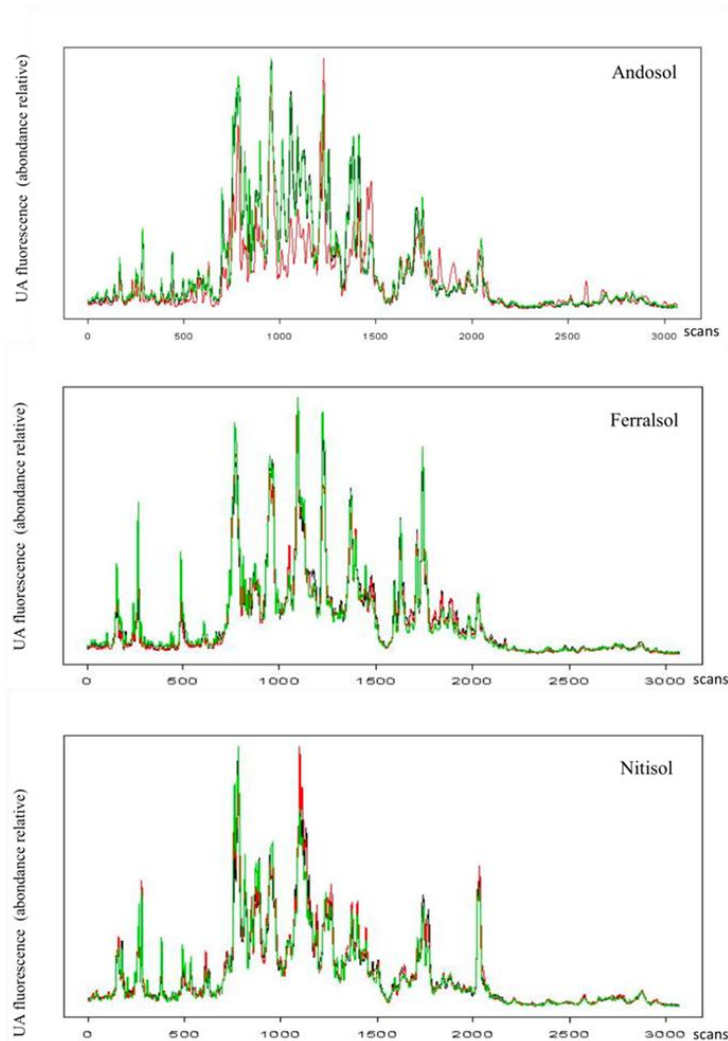


Figure 56 : Profils t-RFLP des fragments de l'ADNr 16S amplifiés par PCR à partir de l'ADN extrait directement des trois sols guadeloupéens étudiés (superposition des trois extractions indépendantes réalisées sur chaque sol).

Les profils obtenus à partir du ferralsol et du nitisol sont complexes et reproductibles (figure 56). Toutefois, des différences significatives sont observables pour ces deux sols, ce qui indique que la structure génétique des communautés bactériennes est différente et spécifique de chacun de ces deux sols. La dominance d'une ou deux espèces n'est pas observée.

L'obtention d'empreintes génétiques des communautés bactériennes pour un andosol guadeloupéen souligne l'efficacité du protocole développé spécifiquement par le BRGM pour l'extraction de l'ADN de ce type de sol. Les empreintes génétiques obtenues pour les trois réplicats sont également complexes et révèlent la grande diversité de la communauté bactérienne de ce sol.

Pour les andosols, la reproductibilité des empreintes génétiques de la communauté bactérienne est moins bonne que celle observée avec le ferralsol et le nitisol. Une étape de pré-traitement supplémentaire (séchage à l'air de courte durée avant tamisage) avant l'extraction de l'ADN pourrait être optimisée (Référentiel pédologique, 2008 ; Colmet-Daage *et al.*, 1972). Par ailleurs, la multiplication des étapes de purification des ADN extraits des andosols peut elle-aussi conduire à l'hétérogénéité des résultats. Toutefois, les empreintes de l'andosol présentent des différences significatives avec les empreintes génétiques obtenues pour les deux autres sols (ferralsol et nitisol). La structure génétique de la communauté bactérienne de l'andosol apparaît également spécifique de ce sol.

L'analyse visuelle des chromatogrammes de la figure 56 montre également que de nombreux pics sont communs aux profils des trois sols, indiquant la présence d'espèces bactériennes identiques dans ces trois sols.

Les profils obtenus par CE-PCR-t-RFLP ont été analysés en termes de présence/absence/intensité relative des pics. Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée à partir des matrices de co-variance obtenues, afin d'ordonner dans un plan factoriel les communautés bactériennes selon la similarité de leur structure génétique.

La structure génétique de la communauté bactérienne d'un échantillon est ainsi représentée par la projection d'un point sur un plan factoriel. La position relative des points représentatifs des différents échantillons permet d'apprécier les différences ou similitudes entre les différents sols. Le plan factoriel est composé de trois ellipses statistiques qui englobent chacune les trois répétitions indépendantes pour chaque sol (Figure 58) en représentant des intervalles de confiance à 90 %.

Les deux premiers facteurs de l'ACP réalisée sur les données de PCR-t-RFLP des trois sols représentent 61,8 % de la variance des données (Figure 58). Le plan factoriel présenté sur la Figure 58 montre que les ellipses correspondant aux communautés bactériennes des trois sols ne sont pas superposées. L'ellipse de la structure génétique de la communauté bactérienne de l'andosol est discriminée (PC1 = 35,2 %) des ellipses correspondant au ferralsol et au nitisol, elles-mêmes bien discriminées entre elles. Les communautés bactériennes des trois sols étudiés sont donc bien distinctes. Toutefois, les résultats semblent indiquer une similitude plus importante entre la communauté bactérienne du ferralsol et celle du nitisol par opposition avec la communauté bactérienne de l'andosol. Ce résultat statistique confirme l'analyse visuelle des profils t-RFLP (Figure 56).

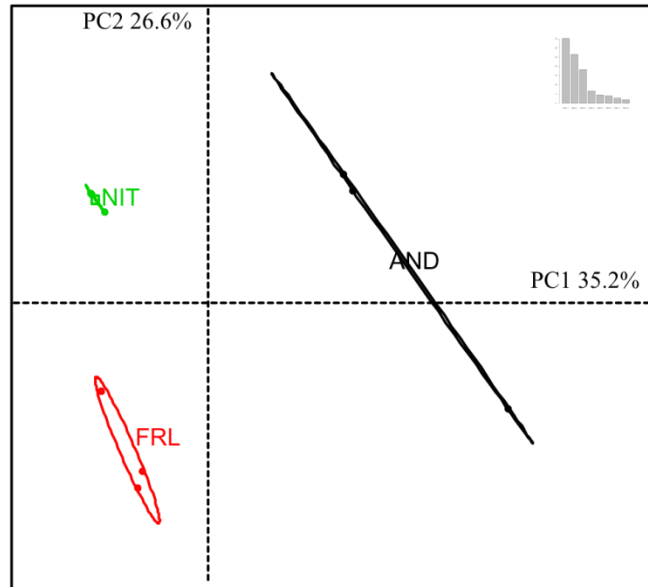


Figure 57 : Analyse en composante principale (PC1xPC2) des profils obtenus par PCR-t-RFLP de l'ADNr16S, après extraction de l'ADN directement du sol total, à partir de trois répétitions indépendantes, pour les différents sols guadeloupéens étudiés : andosol (AND), ferralsol (FRL) et nitrosol (NIT).

Les ellipses représentent des intervalles de confiance de 90 %.
Le diagramme des valeurs propres de l'ACP a été inséré en haut, à droite sur la figure.

c) Co-inertie : relation entre les caractéristiques physico-chimiques des trois sols guadeloupéens et la structure génétique des communautés bactériennes de ces sols

Une analyse en co-inertie entre les données physico-chimiques des trois sols (paragraphe 3.2.1) et les données de diversité génétique obtenue par t-RFLP (ADNr 16S) a été réalisée sur la base d'une analyse en composantes principales centrée réduite de ces deux groupes de données (Figure 58). Cette méthode d'analyse multivariée permet d'analyser et de représenter simultanément deux tableaux de données et de décrire leurs similitudes (Dray *et al.*, 2003). L'analyse en co-inertie effectue un rapprochement entre les axes principaux observés sur l'analyse séparée des deux tableaux de données par des méthodes factorielles, en les projetant dans un nouvel espace commun choisi de telle manière que les nouveaux scores issus des deux tableaux présentent une co-variance maximale. Les données ont été analysées avec ADE4, un package du logiciel R (Thioulouse *et al.*, 1997).

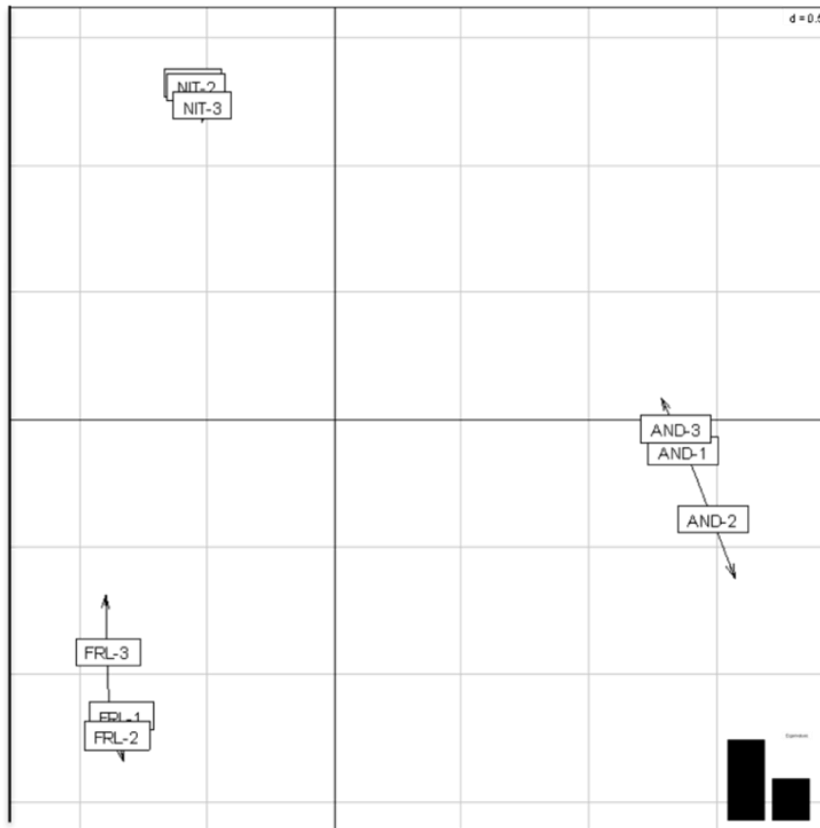


Figure 58 : Co-inertie : relation entre les caractéristiques physico-chimiques (origine des flèches) et la structure génétique des communautés bactériennes (tête des flèches) des trois sols.

Plus les flèches sont courtes, meilleure est la concordance entre les deux projections des données physico-chimiques et de diversité génétique. Le diagramme des valeurs propres de l'ACP a été inséré en bas, à droite sur la figure.

Les ACP individuelles réalisées à partir des données physico-chimiques et de diversité génétique ont conduit à la sélection des deux premières composantes pour chacune des deux analyses, reprenant respectivement 100 % (figure non présentée) et 61,8 % (PC1+PC2 de la Figure 57) de la variabilité totale des données. La corrélation, obtenue par l'analyse en co-inertie, entre les scores des données physico-chimiques et de diversité génétique est de 0,996 pour le premier axe de la co-inertie (PC1) et 0,969 pour le second (PC2).

Un test de Monte-Carlo a été effectué permettant de vérifier la significativité de ces valeurs de corrélation. La méthode consiste à réaliser de nombreuses permutations des échantillons (ligne des tableaux), suivies par le re-calcul de la co-inertie totale. En comparant la co-inertie totale obtenue dans l'analyse normale avec les co-inerties obtenues après permutations aléatoires, une estimation de la probabilité de rencontrer une situation semblable à celle observée sans relation entre les deux tableaux de données est attribuée. Avec 1 000 permutations, le test de Monte-Carlo réalisé sur les deux matrices de données est significatif ($p < 0,005$). Ce résultat indique l'existence d'une co-structure significative entre les données physico-chimiques et la structure génétique des communautés bactériennes des trois sols guadeloupéens étudiés. Les

axes 1 et 2 peuvent être utilisés pour interpréter les relations entre la diversité des communautés bactériennes et les caractéristiques physico-chimiques des trois sols guadeloupéens.

La représentation des échantillons des trois sols guadeloupéens (ANDosol, FeRraLsol, NITisol) ne montre pas de différences entre le plan de l'ACP initiale (Figure 57) et le plan de co-inertie (Figure 58). Sur le plan de co-inertie, l'andosol est significativement distinct (axe1) des deux autres sols, eux-mêmes différenciés selon l'axe 2.

La figure 59 permet de mettre en évidence les paramètres physico-chimiques impliqués dans la discrimination de la structure génétique des communautés bactériennes des trois sols.

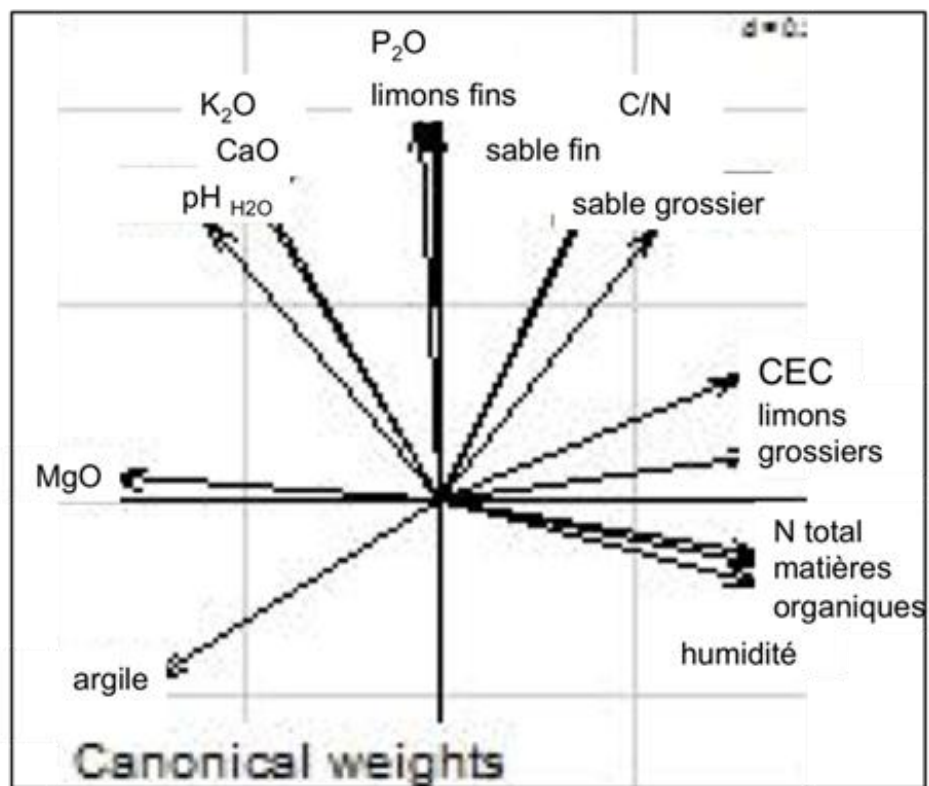


Figure 59 : Contribution de chaque paramètre physico-chimique dans la discrimination de la structure génétique des communautés bactériennes des trois sols guadeloupéens.

L'analyse en co-inertie montre que les caractéristiques physico-chimiques les plus en relation avec la structure génétique des communautés bactériennes sont pour le nitisol le $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$, CaO et K_2O , et pour le ferralsol la teneur élevée en argile mais très faible en sable (grossiers et fins), ainsi qu'un faible ratio C/N.

Pour l'andosol, les caractéristiques physico-chimiques les plus en relation avec la structure génétique des communautés bactériennes sont des teneurs élevées en matière organique et azote total ainsi qu'une humidité très importante. Ce résultat est cohérent avec les travaux de Boudot *et al.* (1986) qui insistent sur la capacité

exceptionnelle des sols à allophane dans la fixation du carbone et de l'azote apporté par les plantes. Par ailleurs, les travaux de Feller et Beare (1997) ont montré que les propriétés de structure (agrégation et porosité) des allophanes sont totalement dépendantes de l'état hydrique du matériau. Une détermination fine des types d'argiles contenues dans les trois sols est envisagée.

d) Conclusions

La technique de CE-PCR-t-RFLP (Capillary Electrophoresis- Polymerase Chain Reaction-Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) se révèle un outil adapté à l'étude de la structure génétique des communautés bactériennes des trois sols guadeloupéens avant le début du traitement ISCR.

Les résultats montrent que la structure génétique de la communauté bactérienne est spécifique de chaque sol. L'impact du procédé ISCR sur les communautés microbiennes pourrait donc être spécifique de chacun de ces trois sols.

3.3.6. Étude de la communauté bactérienne du nitisol au cours du procédé ISCR.

Trois dates ont été retenues pour le suivi de l'impact du procédé ISCR sur le nitisol : la fin du 1^{er} cycle, correspondant à la fin du premier mois de traitement (ajout de Daramend[®] suivi de trois semaines en conditions d'anaérobiose + 1 semaine en conditions d'aérobiose) afin de voir si le procédé avait un impact rapide sur la communauté microbienne; la fin du 4^e cycle ou 4^e mois correspondant à une date intermédiaire entre le début et la fin du traitement, et la fin du 6^e cycle (ou 6^e mois) correspondant à la fin du traitement ISCR.

Les biomasses microbienne et bactérienne totales ainsi que la structure des communautés bactériennes ont été étudiées à partir du nitisol témoin et du nitisol soumis au traitement ISCR.

Les analyses moléculaires ont été réalisées à partir des échantillons de sol conservés à -20 °C.

a) Biomasse microbienne totale : quantification de l'ADN extrait

À partir de la norme PR NF ISO 11063 modifiée, de l'ADN de haut poids moléculaire, non dégradé et suffisamment concentré pour servir de matrice aux amplifications par PCR de l'ADNr 16S a été obtenu pour tous les triplicats provenant du nitisol témoin.

De même, de l'ADN de haut poids moléculaire a été extrait du nitisol traité par le procédé ISCR. Toutefois, pour les trois dates de prélèvement analysées, l'ADN extrait présentait des traces de dégradation, conséquence d'une lyse physique trop importante pour ces sols. La quantification par gel d'agarose et la comparaison avec l'ADN du nitisol témoin n'ont pas pu être appliquées. Une méthode de quantification, plus sensible, basée sur un marquage au Sybr Green I (Invitrogen, USA) a été utilisée après optimisation de la méthode afin de minimiser l'interférence entre l'agent

intercalant des bases de l'ADN et les acides humiques présents dans les échantillons (Zipper *et al.*, 2003).

Les quantités d'ADN extrait sont rapportées dans la figure 60. Un test de Friedman (test non paramétrique de comparaison de données appariées) a révélé des différences significatives au seuil de 5 % en fonction du traitement du sol et de la date d'analyse. Un test de comparaison deux à deux de Wilcoxon (au seuil de 5 %) a ensuite permis de révéler les différences significatives pour chaque point de prélèvement.

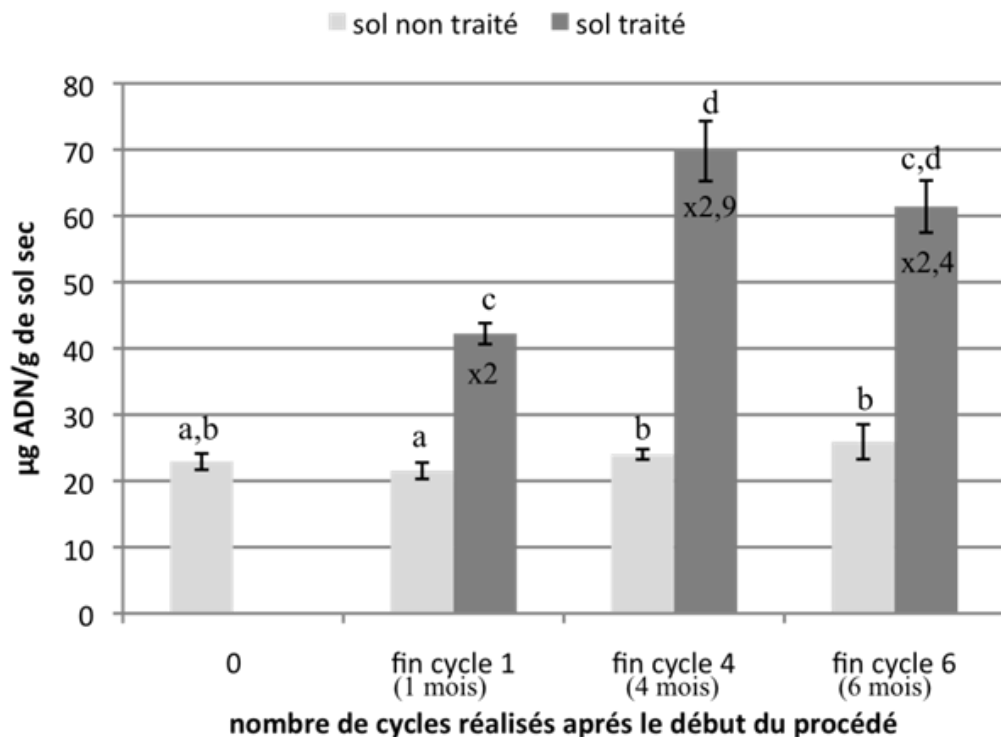


Figure 60 : Biomasse microbienne totale estimée par la quantité d'ADN extrait du nitisol témoin et du nitisol traité par le procédé ISCR (moyenne de trois répétitions indépendantes) à différentes dates au cours du traitement.

Les lettres (a, b, c, d) assignées à chaque valeur représentent les groupes définis par l'analyse statistique (tests de Friedman puis de Wilcoxon, $p < 0,05$). Les valeurs d'un même groupe ne sont pas significativement différentes les unes des autres.

La biomasse microbienne totale estimée par la quantité d'ADN extrait est stable pour le nitisol témoin au cours des six mois d'analyses, avec une valeur moyenne de 23,6 ($\pm 1,6$) µg d'ADN/g de sol sec (dosage par fluorimétrie).

Dès la fin du premier cycle de traitement ISCR, la quantité d'ADN extrait est multiplié par 2 par rapport au sol témoin, indiquant une réactivité de la communauté microbienne suite au traitement (incorporation d'un mélange de source de carbone et de fer zéro valant). À la fin du cycle 4, la biomasse microbienne est multiplié par 2,9

par rapport au témoin, avec 69,8 ($\pm 9,0$) μg d'ADN/g de sol sec. La biomasse microbienne la plus importante est enregistrée à la fin des cycles 4 et 6. La quantité d'ADN extrait pour le sol traité à la fin du cycle 4 et à la fin du cycle 6 ne montre pas de différence significative (tests de Friedman puis de Wilcoxon, $p > 0,05$), indiquant une stabilité de la biomasse microbienne totale à la fin du procédé.

b) Biomasse bactérienne totale : quantification de l'ADNr 16S par PCR quantitative (qPCR)

Des quantifications par PCR (qPCR ou quantitative Polymerase Chain Reaction) du nombre de copies du gène codant l'ARNr 16S ont été réalisées à chaque date de prélèvement pour les deux conditions étudiées (sol témoin vs sol traité). La technique de qPCR est basée sur la détection et la quantification d'un «émetteur» fluorescent (Sybr Green) pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité de produits amplifiés durant la réaction. Cette quantité est elle-même dépendante du nombre de copies du gène initialement présentes dans l'échantillon d'ADN.

Le gène codant pour l'ADNr 16S étant commun à toutes les bactéries, sa quantification à partir d'ADN extrait d'un environnement donné renseigne sur la densité des bactéries dans cet environnement. Toutefois, le nombre de copies d'ADNr 16S quantifiés ne peut pas être directement corrélé au nombre de bactéries présentes dans les différentes fractions en raison de la présence de multicopies de ce gène ribosomique chez certaines espèces bactériennes (Fogel *et al.*, 1999).

Les amorces 341F (5'CCTACGGGAGGCAGCAG3') et 534R (5'ATTACCGCGGCTGCTGGCA3') ont été utilisées selon le protocole de qPCR décrit dans la norme PR NF ISO 11063 avec un thermocycleur MyiQ iCycler Real Time thermocycler (Bio-Rad, France) et l'iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, France). La présence d'inhibiteurs de la qPCR a été recherchée en ajoutant de l'ADN plasmidique contrôle dans les échantillons d'ADN de sol.

Les résultats de qPCR obtenus à partir des ADN extraits du nitisol témoin et du nitisol traité par le procédé ISCR pour chaque date sont présentés dans le Tableau 35. L'efficacité (notée E) de la réaction de qPCR était de 92,4 %, signifiant que sur les cycles d'amplification considérés comme quantitatifs, presque tous les brins matrices ont servi à donner une copie complète de l'amplicon.

Afin d'évaluer l'impact du procédé sur la communauté bactérienne au cours du temps, les nombres de copies d'ADN 16S/g de sol sec ont été comparés en utilisant le test non paramétrique de Friedman suivi d'un test de Wilcoxon avec le logiciel R.

Le nombre de copies d'ADNr 16S par g de sol sec est stable pour le nitisol témoin avec une valeur moyenne de $4,62 (\pm 0,56) \times 10^9$ au cours des six mois d'analyses.

Dès la fin du premier cycle du procédé ISCR, le nombre de copies d'ADNr 16S par g de sol sec est multiplié par 4,1 indiquant une réactivité de la communauté bactérienne suite au traitement. À la fin du cycle 4, la biomasse bactérienne totale atteint 5,45

($\pm 0,95$) $\times 10^{10}$ copies d'ADNr 16S par g de sol sec pour le sol traité. À la fin du procédé, la biomasse bactérienne n'est pas significativement différente ($p > 0,05$) de celle mesurée à la fin du 4^e cycle. À la fin du 6^e cycle, la biomasse bactérienne pour le sol traité par le procédé ISCR est 14,8 fois plus élevée que la biomasse microbienne du sol non traité.

Cycle du traitement	Durée du traitement	Nombre de copies ADNr 16S par gramme de sol sec				
		Nitisol témoin (T)		Nitisol traité procédé ISCR (P)		
0		4.23 (± 0.24) $\times 10^9$	a			
fin cycle 1	1 mois	3.97 (± 0.46) $\times 10^9$	a	1.62 (± 0.11) $\times 10^{10}$	b	x 4,1
fin cycle 4	4 mois	5.38 (± 0.93) $\times 10^9$	a	5.45 (± 0.95) $\times 10^{10}$	b	x 10,1
fin cycle 6	6 mois	4.91 (± 0.30) $\times 10^9$	a	7.27 (± 1.23) $\times 10^{10}$	b	x 14,8

Tableau 35 : Biomasse bactérienne totale estimée par la quantification du nombre de copies du gène codant l'ADNr 16S (moyenne de trois répétitions indépendantes) à différentes dates au cours du traitement.

Les lettres (a, b) assignées à chaque valeur représentent les groupes définis par l'analyse statistique (tests de Friedman puis de Wilcoxon, $p < 0,05$). Les valeurs d'un même groupe ne sont pas significativement différentes les unes des autres.

Ces résultats sont à rapprocher des dénombrements de bactéries cultivables où après la fin de phase anaérobie du cycle 1, les nombres de bactéries aérobies, anaérobies étaient multipliés par un facteur 10 (tableau 36). Par contre, le nombre de bactéries ferri-réductrices reste stable au cours du traitement. Effectivement, les dénombrements de bactéries cultivables n'augmentent pas de façon significative après les cycles 4 et 6, comme cela a été observé pour la quantification de l'ADN du sol et celui de l'ADN 16S.

Sol	Cycle	Témoin	Traité
Bactéries aérobies (nb / g sol sec)	T0	$1,6 \times 10^5$	$5,4 \times 10^4$
	1	$9,2 \times 10^4$	$4,9 \times 10^5$
	4	$1,3 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$
	6	$1,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$
Bactéries anaérobies (nb / g sol sec)	T0	$3,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$
	1	$9,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$
	4	$4,6 \times 10^3$	$9,4 \times 10^4$
	6	$7,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^5$
Bactéries ferri-réductrices (nb / g sol sec)	T0	$2,4 \times 10^2$	$6,2 \times 10^4$
	1	$4,0 \times 10^3$	$2,9 \times 10^4$
	4	$2,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^4$
	6	$4,7 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$

Tableau 36 : Dénombrements de bactéries aérobies et anaérobies cultivables dans le nitisol à T0 en fin de phase anaérobie des cycles 1, 4 et 6 pour les sols non traité (Témoin) et traité par le procédé ISCR.

c) Structure des communautés bactériennes : analyse par PCR-t-RFLP de l'ADNr 16S

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée à partir des matrices de co-variance créées suite à l'analyse des profils T-RFLP des communautés

bactériennes du nitisol témoin et nitisol traité par le procédé ISCR obtenus à différentes dates au cours du traitement (Figure 61).

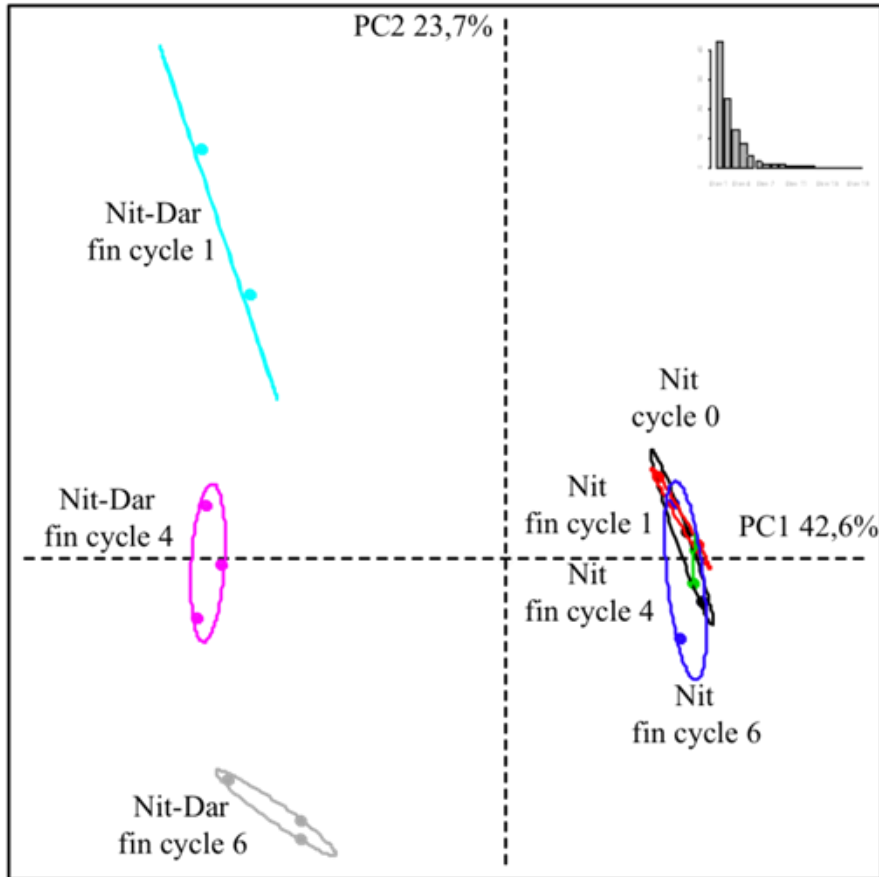


Figure 61 : Analyse en composante principale (PC1xPC2) des profils obtenus par PCR-t-RFLP de l'ADNr16S, après extraction de l'ADN directement du sol total, à partir de trois répétitions indépendantes, pour le nitisol témoin (Nit) et de nitisol traité par le procédé ISCR (Nit-Dar) à différentes dates au cours du traitement : avant le début du procédé (cycle 0), à la fin du 1^{er} cycle, du 4^e cycle et du 6^e cycle.

Les ellipses représentent des intervalles de confiance de 90 %.

Le diagramme des valeurs propres de l'ACP a été inséré en haut, à droite sur la figure.

Les deux premiers facteurs de l'ACP réalisée sur les données de PCR-t-RFLP représentent 66,3 % de la variance des données (Figure 61). Les ellipses correspondant aux communautés bactériennes des différents prélèvements de sol témoin (Nit) sont superposées. La structure génétique de la communauté bactérienne du nitisol témoin (Nit) n'a donc pas significativement évoluée au cours des six mois d'incubation.

Par contre, les ellipses des communautés bactériennes de nitisol témoin sont discriminées (PC1 = 42,6 %) des ellipses correspondant au nitisol traité par le procédé ISCR (Nit-dar). Un impact du procédé sur la structure génétique de la communauté

bactérienne du nitisol est clairement démontré. Par ailleurs, les ellipses correspondant aux différentes dates d'analyse (fin du 1^{er} cycle, fin du 4^e cycle et fin du 6^e cycle) du nitisol traité sont discriminées entre elles (PC2 = 23,7%), indiquant un impact progressif du procédé sur la communauté bactérienne du nitisol. L'analyse visuelle des profils (Figure 62) montre une réduction de la diversité bactérienne avec une diminution du nombre de pics, depuis le sol initial (T = 0) jusqu'au sol traité à la fin du cycle 6 pour lequel la dominance de quelques espèces est clairement observée.

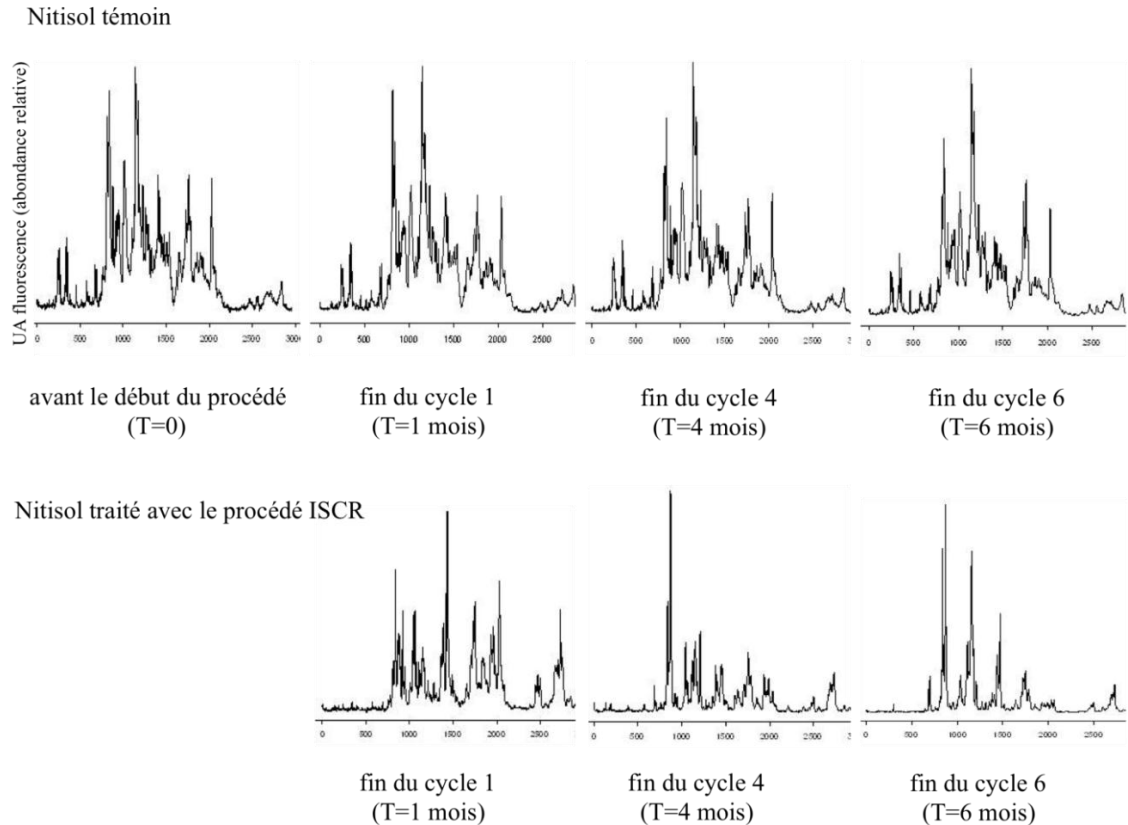


Figure 62 : Profils t-RFLP des fragments de l'ADNr 16S amplifiés par PCR à partir de l'ADN extrait directement du nitisol témoin et du nitisol traité à trois dates au cours du traitement.

d) Conclusions

Un impact significatif du procédé ISCR sur les biomasses microbienne et bactérienne totales du nitisol a été démontré. L'augmentation des biomasses microbienne et bactérienne totales est observée dès la fin du premier cycle du procédé ISCR (ajout de Daramend, trois semaines d'incubation en anaérobiose suivies par une semaine d'incubation en aérobie). Les valeurs se stabilisent à la fin du 6^e cycle.

Le procédé ISCR conduit à une réduction progressive de la complexité de la structure génétique de la communauté bactérienne du nitisol.

3.4. PROCÉDÉS PAR COMPOSTAGE MIS EN ŒUVRE AVEC LA SOCIÉTÉ BIOGÉNIE

3.4.1. Traitement par simulation de compostage

a) Évolution de la concentration en oxygène et température

- **Mésocosme 1 : Andosol**

Suite à la mise en traitement du mésocosme 1, il y a eu une hausse importante de la température passant de près de 22 °C à 45-50 °C durant la première semaine de traitement. Par la suite, la température a diminué progressivement pour redescendre près de 30 °C aux alentours de la 3^e semaine de traitement. Durant cette même période, il y a eu une forte consommation d'oxygène avec l'obtention d'une concentration minimale de 6,5 % observée le 3 octobre 2010, soit 2 jours après le démarrage et ce, sachant que le système était en mode de ventilation continue d'aspiration d'air dans le sol. Il y a eu ensuite une augmentation régulière du pourcentage d'oxygène présent dans les pores du sol jusqu'à une concentration approximative de 18 % après trois semaines de traitement.

Ces paramètres indiquent qu'il y a eu une forte activité microbienne en début de traitement. Par la suite, la température s'est maintenue à celle de la chambre d'incubation (30 °C) et a redescendu en-dessous de la température ambiante suivant le premier prélèvement à la 7^e semaine de brassage avec une température avoisinant 24-25 °C. Cet écart de température est probablement dû au phénomène d'évaporation de l'eau contenue dans le sol. En effet, l'air ambiant qui contient moins d'humidité que celui contenu dans les pores des sols a tendance à prendre l'eau du sol lors de son passage dans la matrice. Cela a habituellement pour effet de diminuer la température dans le sol. Il est à noter que la température ambiante (local expérimental) détectée par le thermocouple de l'air ambiant de la base d'acquisition de données, a diminué d'approximativement 3 °C quelques jours suivant le premier brassage (21 novembre 2010).

La figure 63 présente l'évolution de la température et des concentrations en oxygène dans le mésocosme 1.

Chaque période de prélèvements de sol (semaines 7, 14 et 20) est marquée par une diminution de température. Cela s'explique par le fait que le sol est remanié à l'extérieur de la chambre d'incubation pour effectuer les prélèvements.

Durant la 1^{re} semaine de traitement, la concentration en oxygène semble plus faible à 20 cm de profondeur qu'à 8 cm avec une différence de près de 4 %. Cela démontre qu'il y a consommation de l'oxygène se retrouvant dans l'air provenant de la surface du sol jusqu'au fond du mésocosme où l'air est aspiré (air ambiant traversant le sol du dessus jusqu'au-dessous). Par contre, après 2 semaines, cette différence s'amenuise jusqu'à présenter des concentrations similaires.

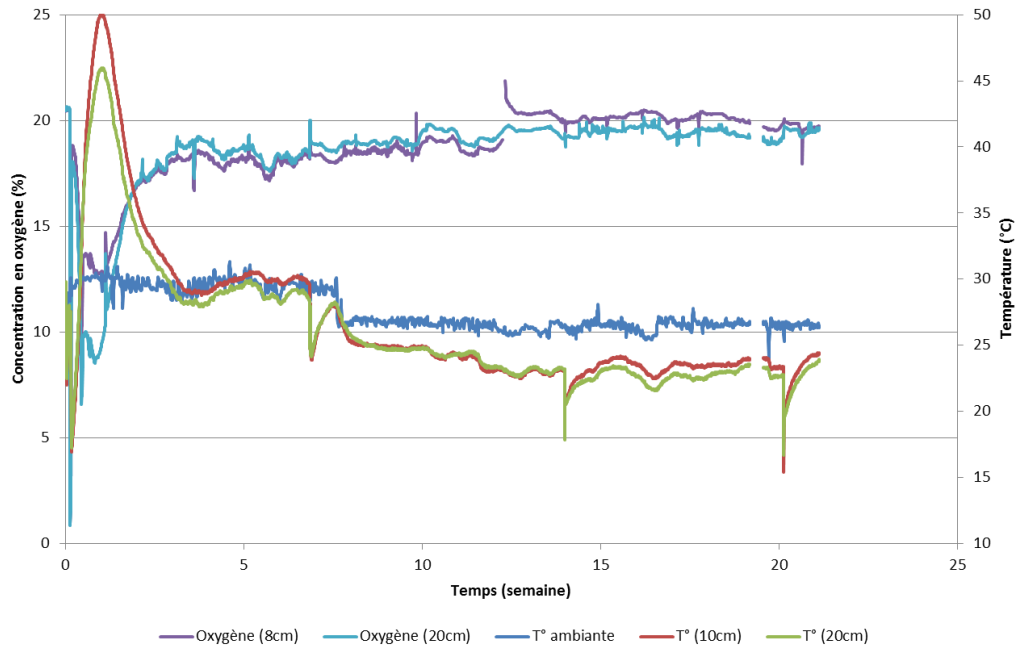


Figure 63 : Évolution de la température et de la concentration en oxygène dans le Mésocosme 1 (andosol).

- **Mésocosme 3 : Nitisol**

Les fluctuations des températures et des concentrations en oxygène dans le mésocosme contenant le nitisol (mésocosme 3) sont similaires au traitement de l'andosol. En effet, on remarque une forte activité microbienne en début de traitement avec l'atteinte d'une concentration en oxygène inférieure à 2 % et d'une température maximale entre 47 °C et 49 °C au cours de la première semaine de traitement. Par la suite, la concentration en oxygène a augmenté rapidement à 18 % dans l'espace d'une semaine et la température a diminué à près de 30 °C aux alentours de la 3^e semaine de traitement.

Il est possible que même à de fortes concentrations en carbone organique total, il ne semble pas y avoir suffisamment de composés organiques biodisponibles pour stimuler l'activité microbienne et engendrer de faibles teneurs en oxygène des gaz des sols. La figure 64 présente l'évolution des concentrations en oxygène et de la température dans le mésocosme 3.

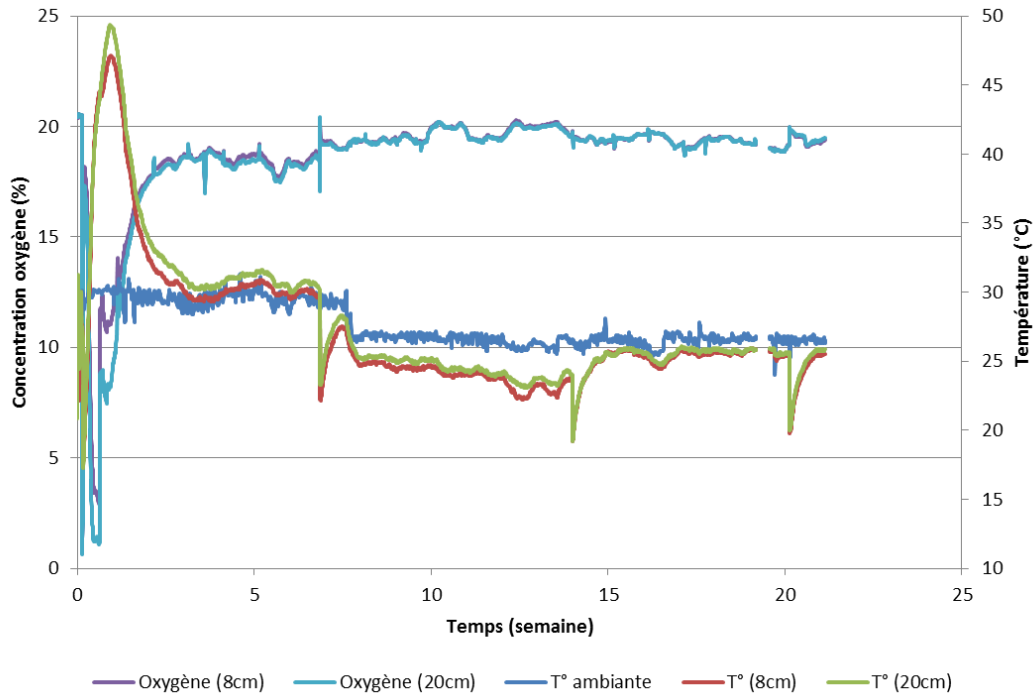


Figure 64 : Évolution de la concentration en oxygène et de la température dans le Mésocosme 3 (nitisol).

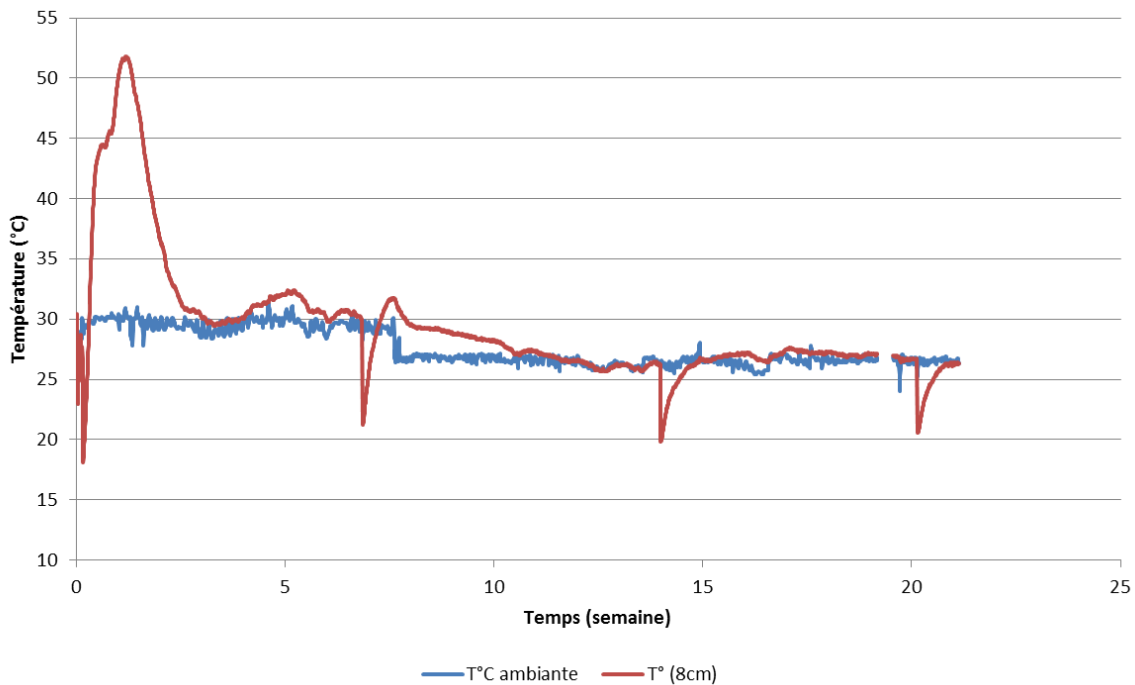


Figure 65 : Évolution de la concentration en oxygène et de la température dans le Mésocosme 5 (ferralsol).

- **Mésocosme 5 : Ferralsol**

Le mésocosme contenant le ferralsol n'a pas été suivi pour la concentration en oxygène. Par contre, l'évolution de la température permet de constater que ce paramètre présente le même profil que les deux autres mésocosmes en simulation de compostage. La température du sol a atteint une valeur de près de 52 °C après une semaine de traitement puis diminue jusqu'à 30 °C après 17 jours d'incubation. Par la suite, la température est demeurée sensiblement similaire à la température ambiante, c'est-à-dire à près de 30 °C jusqu'à la 7^e semaine de traitement et 26 -27 °C jusqu'à la 21^e semaine de traitement. La figure 65 présente l'évolution de la température du Mésocosme 5.

b) Évolution des dénombrements bactériens

Les dénombrements des microflores totales aérobie et anaérobie ont été réalisés sur des échantillons de 50-75 g de sol conditionné en flacons stériles et envoyés au laboratoire prestataire (Wessling) en glacière avec pains de glace et livraison dans les 24 h suivant les prélèvements. La préparation de l'échantillon avant analyse est réalisée selon la norme FD CEN/TR 15215-1 (avril 2006) « Détection et dénombrement de *Salmonella* spp. dans les boues, les sols, les amendements du sol, les supports de culture et les biodéchets ». Les analyses de la flore totale aérobie et anaérobie sont réalisées selon la norme EN ISO 6222 « Qualité de l'eau – dénombrement des micro-organismes revivifiables – Comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture nutritif gélosé ».

Les échantillons de sol en compostage ont été prélevés après 7, 14, 20 et 27 semaines de traitement en condition aérobie. L'évolution de la microflore anaérobie et aérobie en fonction du temps est sensiblement la même pour les trois types de sol (Tableau 37 et Figure 66).

La microflore aérobie totale diminue tout au long de l'expérience, en particulier entre le T₀ (1^{er} octobre 2010) et la 7^e semaine (17 novembre 2010) avec une baisse de facteurs 15, 2 et 8 pour l'andosol, le nitisol et le ferralsol respectivement. En fin d'expérience, la microflore aérobie totale est plus faible qu'à T₀ d'un facteur 30 pour l'andosol, 38 pour le nitisol et 43 pour le ferralsol. Toutes les densités restent toutefois supérieures à 1,8 x 10⁷ UFC/g. Les décomptes microbiens élevés en début de traitement sont probablement dus aux microorganismes présents dans le compost végétal ajouté à un ratio volumique de 115-125 % de volume de sol. Certains de ces microorganismes ne se sont pas adaptés au milieu, ce qui pourrait expliquer la décroissance en début de traitement.

La microflore anaérobie totale diminue également au cours de l'expérience, en particulier entre le T₀ (1^{er} octobre 2010) et la 7^e semaine (17 novembre 2010) avec une chute d'un facteur 176 pour l'andosol, 33 pour le nitisol et 448 pour le ferralsol. La densité reste ensuite assez stable aux alentours de 10⁶ UFC/g jusqu'à la fin du traitement. Le compost végétal ajouté en début de traitement augmente la densité microbienne au départ de l'essai. Suite à une période prolongée de la condition

aérobie, il y a eu décroissance de la microflore anaérobie jusqu'à une certaine stabilisation entre $7,5 \times 10^5$ et $1,4 \times 10^6$ UFC/g en fin de traitement.

Date de prélèvement	Temps de traitement (semaines)	Andosol		Nitisol		Ferralsol	
		Microflore totale aérobie (UFC/g)	Microflore totale anaérobie (UFC/g)	Microflore totale aérobie (UFC/g)	Microflore totale anaérobie (UFC/g)	Microflore totale aérobie (UFC/g)	Microflore totale anaérobie (UFC/g)
01-oct-10	0	1,5E+09	1,3E+08	1,7E+09	1,5E+08	7,7E+08	1,3E+08
17-nov-10	7	1,0E+08	7,4E+05	1,0E+09	4,6E+06	9,3E+07	2,9E+05
06-janv-11	14	1,4E+08	3,4E+05	8,8E+07	4,0E+06	2,6E+07	3,6E+06
07-avr-11	27	5,0E+07	1,3E+06	4,5E+07	1,4E+06	1,8E+07	7,5E+05

Tableau 37 : Évolution en fonction du temps des densités des microflore totale aérobie et anaérobie dans les sols traités par compostage avec ajout initial de 115-125 % de compost en volume.

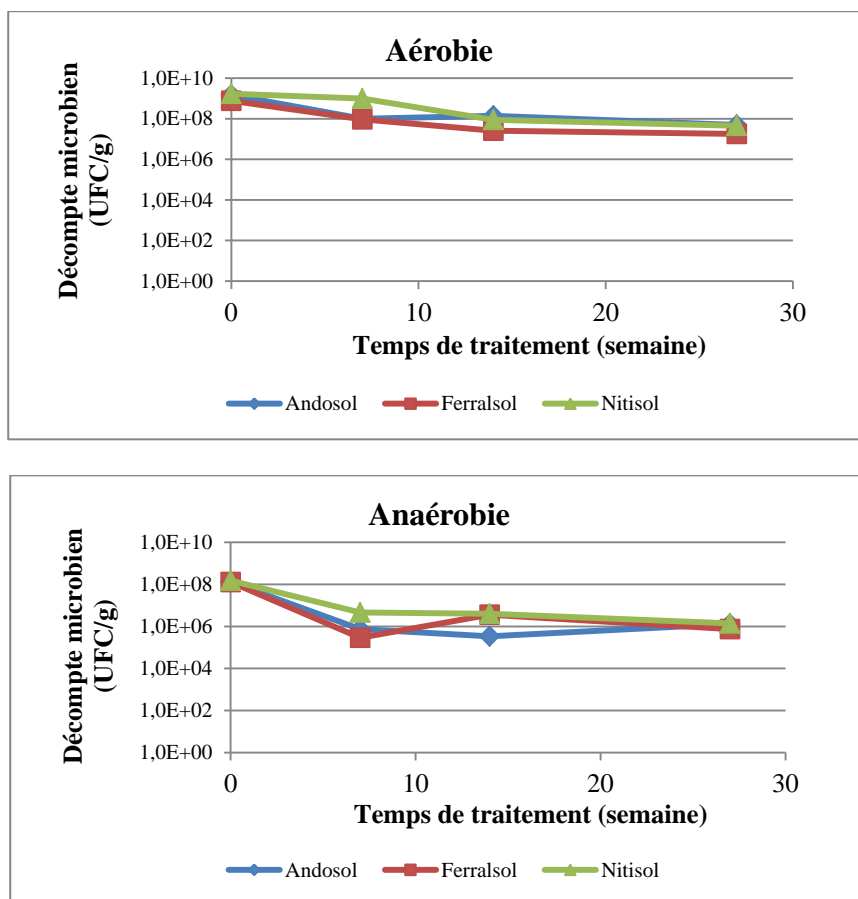


Figure 66 : Évolution des dénombrements pour les microflore aérobie et anaérobie.

c) Suivi des paramètres analytiques majeurs (hors chlordécone)

De manière générale, les résultats analytiques semblent démontrer des valeurs adéquates pour permettre la croissance microbienne responsable de la dégradation des composés organiques se retrouvant dans les sols (Tableau 38). Ainsi, on retrouve des valeurs de pH près de la neutralité, une conductivité électrique peu élevée, une présence d'azote total et de phosphore relativement élevée, une concentration en nitrates permettant l'obtention de concentrations supérieures à 500 mg N/L d'eau dans le sol. Les sols conditionnés présentent donc des concentrations non limitatives pour la croissance microbienne.

Les analyses des paramètres de suivi pour les mésocosmes en simulation de compostage indiquent une forte hétérogénéité due probablement à la forte concentration en amendement organique ajouté en début de traitement (115-125 % volume) qui rend difficile l'obtention d'échantillons homogènes. En effet, les échantillons prélevés présentent des concentrations fluctuant presque du simple au double d'un temps de traitement à un autre et ce, sans aucune modification apportée à la matrice.

Prenons l'exemple du carbone organique total et de l'azote total dans le mésocosme 1 qui avait initialement des concentrations de 9,4 % en COT et 1,6 % en azote total. La concentration en COT a augmenté à 16 % et a diminué à 0,6% en azote après 14 semaines de traitement et les concentrations finales sont de 15 % en COT et 1,1 % en azote et ce, sans avoir ajouté une source de nutriments en cours de projet. Ainsi, on observe un ratio C/N de 6 au départ et un ratio de 28 à la 14^e semaine. Ce phénomène est également présent dans les mésocosmes 3 et 5. Il est difficile de déterminer le ratio C/N réel dû aux variations entre les prélèvements. Il aurait été préférable d'utiliser un peu moins de compost végétal et plus de composés organiques liquides, ce qui aurait probablement diminué la variabilité causée par une hétérogénéité de la matrice solide ajoutée. Il aurait également été préférable d'avoir pu ajouter des quantités importantes de mélasse et ainsi augmenter le ratio C/N.

Paramètres	Unité	Mésocosme 1 (Andosol)				
		T=0	T=7	T=14	T=20	T=27
		05-oct-10	18-nov-10	06-janv-11	18-févr-11	07-avr-11
Carbone organique total	mg/kg	94000	128000	160000	140000	150000
Nitrate	mg/kg (N-NO ₃)	<2,3	95	147	248	197
Azote total	mg/kg (MS)	15600	23400	5500	12000	11000
Ratio C/N	---	6	5	28	11	13
Phosphore assimilable	g/kg	0,58	0,47	0,45	0,46	0,41
Sulfate	mg/kg (MS-A)	1900	2100	1100	2100	1100
Matière sèche	%	47	44,4	44,2	44,4	44
pH	---	7,4	7,9	7,4	7,5	7,5
Conductivité électrique	uS/cm	n.a.	970	1040	1400	1073
MFT aérobie	CFU/g	1,5E+09	1,0E+08	1,4E+08	9,9E+07	5,0E+07
MFT anaérobie	CFU/g	1,3E+08	7,4E+05	3,4E+05	1,1E+06	1,3E+06
Paramètres	Unité	Mésocosme 3 (Nitisol)				
		T=0	T=7	T=14	T=20	T=27
		05-oct-10	18-nov-10	06-janv-11	18-févr-11	07-avr-11
Carbone organique total	mg/kg	46000	73000	73000	62000	60000
Nitrate	mg/kg (N-NO ₃)	<2,3	156	219	1100	206
Azote total	mg/kg (MS)	5150	9780	3900	6840	5100
Ratio C/N	---	8,9	7,3	17,7	7,8	11,3
Phosphore assimilable	g/kg	0,60	0,62	0,80	0,55	0,40
Sulfate	mg/kg (MS-A)	600	780	<100	910	600
Matière sèche	%	65,2	62,8	71,7	64,9	63
pH	---	7,2	7,6	7,5	7,5	7,2
Conductivité électrique	uS/cm	n.a.	780	1040	900	756
MFT aérobie	CFU/g	1,7E+09	1,0E+09	8,8E+07	6,5E+07	4,5E+07
MFT anaérobie	CFU/g	1,5E+08	4,6E+06	4,0E+06	1,3E+06	1,4E+06
Paramètres	Unité	Mésocosme 5 (Ferralsol)				
		T=0	T=7	T=14	T=20	T=27
		05-oct-10	18-nov-10	06-janv-11	18-févr-11	07-avr-11
Carbone organique total	mg/kg	52000	74000	57000	62000	79000
Nitrate	mg/kg (N-NO ₃)	5,36	8,8	271	316	497
Azote total	mg/kg (MS)	11500	8530	4000	5210	4600
Ratio C/N	---	4,5	8,7	13,3	11,2	15,5
Phosphore assimilable	g/kg	0,25	0,42	0,49	0,274	0,26
Sulfate	mg/kg (MS-A)	870	900	300	980	1100
Matière sèche	%	61,6	59,7	61,3	63	60
pH	---	7,6	8	7,6	7,3	7,3
Conductivité électrique	uS/cm	n.a.	660	760	1000	1011
MFT aérobie	CFU/g	7,7E+08	9,3E+07	2,6E+07	1,80E+07	1,8E+07
MFT anaérobie	CFU/g	1,3E+08	2,9E+05	3,6E+06	1,10E+06	7,5E+05

MFT : microflore totale

Tableau 38 : Évolution des différents paramètres analytiques relatifs à l'activité microbienne pour les mésocosmes en simulation de compostage.

d) Évolution de la chlordécone

Les analyses du chlordécone dans les sols conditionnés ont été réalisées au BRGM. L'ajout de fortes quantités de matière organique dans le sol a nécessité une longue mise au point pour tenir compte des interférences causées par la matrice. Les résultats de chlordécone n'ont été disponibles qu'après l'arrêt des traitements, au début de juin 2011, ne permettant pas d'effectuer, sur base de résultats en chlordécone, des modifications aux différents traitements en cours d'expérimentation.

Basés sur les résultats d'analyses du chlordécone corrigés en fonction de la masse de matière organique ajoutée, aucune réduction des concentrations du polluant n'a été constatée dans les trois mésocosmes en simulation par compostage (Tableau 39). Quoique certains résultats obtenus à certains temps intermédiaires du traitement présentent des réductions de la concentration du chlordécone, les résultats obtenus à la fin du traitement sont supérieurs aux valeurs initiales de l'ordre de 66 % pour le Mésocosme 1, 40 % pour le Mésocosme 3 et 28 % pour le Mésocosme 5. Cette augmentation de la concentration par rapport à la valeur initiale est inexpliquée. Les valeurs observées au t final résultent toutefois de 3 réplicats indépendants alors que les valeurs plus faibles observées en cours de procédé ne représentent qu'un seul réplicat et sont donc moins représentatives. Il aurait été utile de procéder systématiquement au prélèvement et à l'analyse complètement indépendante de trois réplicats mais les moyens disponibles pour l'étude ne l'ont pas permis.

La concentration initiale dans l'andosol de 13,3 mg/kg est 11 fois plus élevée que celle dans le nitisol, 1,2 mg/kg, et 5,8 fois plus forte que celle dans le ferralsol, 2,3 mg/kg. Le coefficient de variation des analyses initiales en triplicata sont de 14 %, 17 % et de 22 % respectivement. Les coefficients de variation des analyses finales, respectivement de 4 % pour le Mésocosme 1, 2 % pour le Mésocosme 3 et 7 % pour le Mésocosme 5, sont plus faibles que ceux de départ. Il est possible que la dégradation de certains composés organiques autres que la chlordécone en cours de traitement ait amélioré les conditions d'extraction et d'analyse du chlordécone.

La 5b-hydrochlordécone est quantifiée dans six échantillons sur neuf de l'andosol, avec une concentration de 0,6 mg/kg à la fin du cycle 1, puis des teneurs comprises entre 0,1 et 0,2 mg/kg. Les différences entre les sols traités et les sols témoins ne sont pas significatives. La 5b-hydrochlordécone n'est quantifiée dans aucun échantillon de ferralsol et nitisol.

La dihydrochlordécone n'est détectée dans aucun échantillon traité d'aucun des trois sols. Ces résultats confirment le manque d'efficacité du traitement vis-à-vis de la déchloration de la chlordécone.

Le traitement biologique par simulation de compostage n'a pas permis d'observer une diminution des concentrations en chlordécone. En effet, les concentrations finales du polluant dans les sols en fin de traitement (27 semaines) sont supérieures aux concentrations initiales de l'ordre de 66 % pour l'andosol avec des concentrations initiales de 13,3 mg/kg et finale de 22,1 mg/kg, de 40 % pour le nitisol avec des concentrations initiales de 1,2 mg/kg et finale de 1,7 mg/kg et de 28 % pour le ferralsol

avec des concentrations initiales de 2,3 mg/kg et finale de 2,9 mg/kg. Cette augmentation des concentrations est inexplicable mais le manque d'effet du traitement envers la chlordécone est confirmé par l'absence de détection de mono- et dihydrochlordécone, les deux produits de transformation déchlorés de la chlordécone que l'on peut actuellement identifier de manière formelle.

Paramètre	Unité	Mésocosme 1 (Andosol)								
		T=0			T=7	T=14	T=20	T=27		
		α	β	χ	α	α	α	α	β	χ
Concentration	mg/kg	14,1	11,2	14,6	16,4	12,2	12	21	22	24
Concentration moyenne	mg/kg	13,3			16,4	12,2	12	22,1		
Taux d'abattement	%	---			-23%	8%	13%	-66%		

Paramètre	Unité	Mésocosme 3 (Nitisol)								
		T=0			T=7	T=14	T=20	T=27		
		α	β	χ	α	α	α	α	β	χ
Concentration	mg/kg	1,1	1,1	1,5	1,1	0,74	1	1,6	1,7	1,8
Concentration moyenne	mg/kg	1,2			1,1	0,74	1	1,7		
Taux d'abattement	%	---			9%	39%	21%	-40%		

Paramètre	Unité	Mésocosme 5 (Ferralsol)								
		T=0			T=7	T=14	T=20	T=27		
		α	β	χ	α	α	α	α	β	χ
Concentration	mg/kg	2,8	1,9	2,2	2,4	1,94	1,9	2,7	2,9	3,1
Concentration moyenne	mg/kg	2,3			2,39	1,94	1,9	2,9		
Taux d'abattement	%	---			-5%	15%	17%	-28%		

Tableau 39 : Évolution en fonction du temps (*T* en semaines) des concentrations en chlordécone (CLD) dans les mésocosmes 1, 3 et 5 (α , β et χ : répliqués analytiques provenant d'échantillons indépendants).

Le taux d'abattement correspond au rapport entre la concentration mesurées au temps *T* et la concentration initiale mesurée à *T* = 0.

Les conditions de traitement n'ont pas permis d'atteindre une activité de compostage habituelle où l'on observe une forte activité microbienne (traduite par une consommation d'oxygène) soutenue pendant une longue période. Il aurait été préférable d'utiliser uniquement une source de compost frais au début du traitement et de pouvoir ajouter des doses importantes de nutriments organiques biodisponibles, telle la mélasse, à des doses supérieures à 0,1 % massique, afin d'obtenir une activité microbienne qui aurait augmenté la température des sols à près de 50 °C.

Ces ajouts n'ont pu être possibles puisqu'il y avait une forte incertitude reliée à la faisabilité de quantifier la chlordécone dans des sols conditionnés avec de forts ajouts d'amendements organiques. Il aurait également été préférable d'être en mesure de contrôler complètement l'analyse de la chlordécone dans ces matrices exceptionnellement chargées avant de débiter les essais afin d'apporter des actions correctives requises optimisant les conditions de compostage.

Les conditions mises en œuvre avaient toutefois été déterminées sur la base d'expériences analogues de décontamination de sols, et les ajouts de mélasse n'étaient pas prévus au départ. Il faut donc voir dans les résultats une preuve supplémentaire (la littérature scientifique traite du sujet) du caractère extrêmement récalcitrant de la chlordécone.

3.4.2. Traitement par alternance de phases anaérobie/aérobie avec ajout de compost

a) Évolution de la concentration en oxygène et de la température

- **Mésocosme 2 : Andosol**

Lors de la première phase anaérobie, la température dans le sol du mésocosme 2 n'a pas atteint une valeur supérieure à celle ambiante (Figure 67). En fait, la température initiale du sol (16,3 °C) a augmenté jusqu'à 30 °C en l'espace d'une semaine de traitement.

Par la suite, la température a légèrement diminué jusqu'à la 4^e semaine où une diminution significative de la température a été observée suite à une alternance de phase en aérobie. Le prélèvement à la 4^e semaine et l'activation de l'aération dans le sol ont fait diminuer la température du sol de près de 4 °C puis la température a augmenté graduellement jusqu'à une valeur de 28,5 °C. Cette augmentation n'est pas nécessairement due à une activité microbienne mais plutôt à un équilibre avec le milieu ambiant. La température du sol durant la 2^e phase anaérobie a diminué jusqu'à une valeur de près de 24 °C avant la seconde séquence aérobie et est descendue à 23 °C durant cette phase. Finalement, la température du mésocosme s'est maintenue à environ 23 °C.

En ce qui concerne la concentration en oxygène, une forte consommation de l'oxygène est constatée durant les deux premières semaines de traitement avec l'atteinte d'une concentration de près de 2 % entre le 6 et le 17 octobre (Figure 67). La concentration a ensuite augmenté jusqu'à près de 9 % avant la séquence aérobie forcée du 26 octobre (semaine 4). Lorsque l'aération du mésocosme a eu lieu, la concentration a immédiatement augmenté à une concentration entre 19 % et 20 % selon la profondeur de la sonde dans le sol. La concentration en oxygène semble légèrement plus élevée au fond du mésocosme que dans le milieu de celui-ci.

Suite à la remise en mésocosme après le prélèvement, une purge en azote a été effectuée de manière à réduire la concentration en oxygène dans le sol. Une remontée très rapide de la concentration en oxygène fut remarquée après 1 semaine de traitement (16 %). Il a donc été décidé d'effectuer des purges d'azote afin de chasser l'oxygène contenu dans les sols. Il y a eu quatre autres séquences de purge à l'azote,

où la concentration en oxygène était redescendue en dessous de 1 %, qui ont été effectuées avant la remise en condition aérobie et à chaque fois la concentration en oxygène remontait aux alentours de 13 %. Le mésocosme ne semble donc pas suffisamment étanche et permet la diffusion de l'oxygène de l'air ambiant qui pénètre dans le sol.

Suite à la seconde phase aérobie et au prélèvement après 14 semaines de traitement, un ajout de mélasse à raison de 0,1 % massique a été effectué afin de rendre disponible une source de carbone facilement biodisponible. Cette petite quantité de composés organiques a permis de maintenir la concentration en oxygène inférieure à 5 % pendant près de trois jours.

Une plus grande quantité de mélasse aurait probablement permis de maintenir la condition anoxique plus longtemps, mais le besoin de limiter les interférences au niveau de l'analyse du chlordécone susceptibles d'être causées par ces ajouts supplémentaires de matière organique n'a pas permis de vérifier cette hypothèse.

Un second ajout de mélasse à 0,1 % massique a été effectué après le prélèvement de la 20^e semaine de traitement. La purge en azote lors de la remise en traitement en phase anaérobie de la 20^e semaine ne semble pas avoir réduit la concentration en oxygène dans le sol autant que les précédentes purges où l'atteinte d'une concentration inférieure à 5 % était observée. Il aurait fallu purger jusqu'à l'atteinte d'un pourcentage habituel de 1-2 % en oxygène. Contrairement au premier ajout de mélasse, ce deuxième ajout ne semble pas avoir eu un impact sur la consommation de l'oxygène. En effet, l'augmentation de l'oxygène s'est faite presque immédiatement après l'arrêt de l'injection d'azote. Il est possible que la quantité de mélasse ajoutée ait été trop faible pour remarquer une différence, indiquant que le maintien de la faible concentration d'oxygène observé après 14 semaines (1^{er} ajout) ne soit pas nécessairement relié à la mélasse. La figure 67 présente l'évolution de la température et de l'oxygène dans le sol.

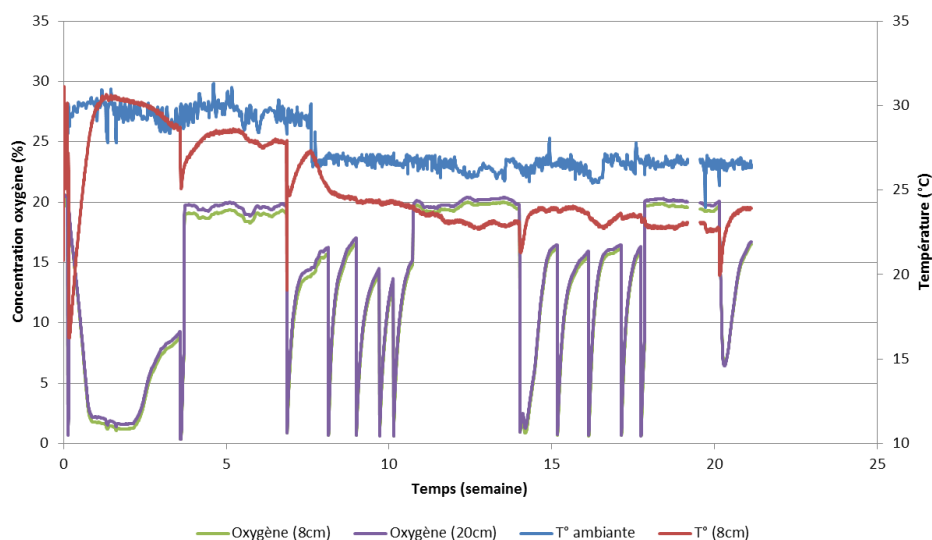


Figure 67 : Évolution de la concentration en oxygène et de la température dans le Mésocosme 2 (andosol).

- **Mésocosme 4 : Nitisol**

L'évolution de la température et de la concentration en oxygène dans le Mésocosme 4 contenant le nitisol est similaire, à quelques exceptions près, au traitement de l'andosol (Mésocosme 2). Il y eut une hausse de la température jusqu'à 33,4 °C et une consommation d'oxygène (5,8 %, plus faible que dans l'andosol) durant la première semaine de traitement (Figure 68). Les valeurs des concentrations en oxygène, suite aux purges d'azote lors de la 2^e phase en anaérobie, étaient plus élevées que dans l'essai du Mésocosme 2 (andosol).

Les hausses d'oxygène lors de la 3^e phase en anaérobie étaient moins élevées avec des valeurs avoisinantes à 13 % tandis que celles observées dans le Mésocosme 2 étaient supérieures à 15 %. Cela indique que le Mésocosme 4 était peut-être moins perméable à l'oxygène contenu dans l'air ambiant.

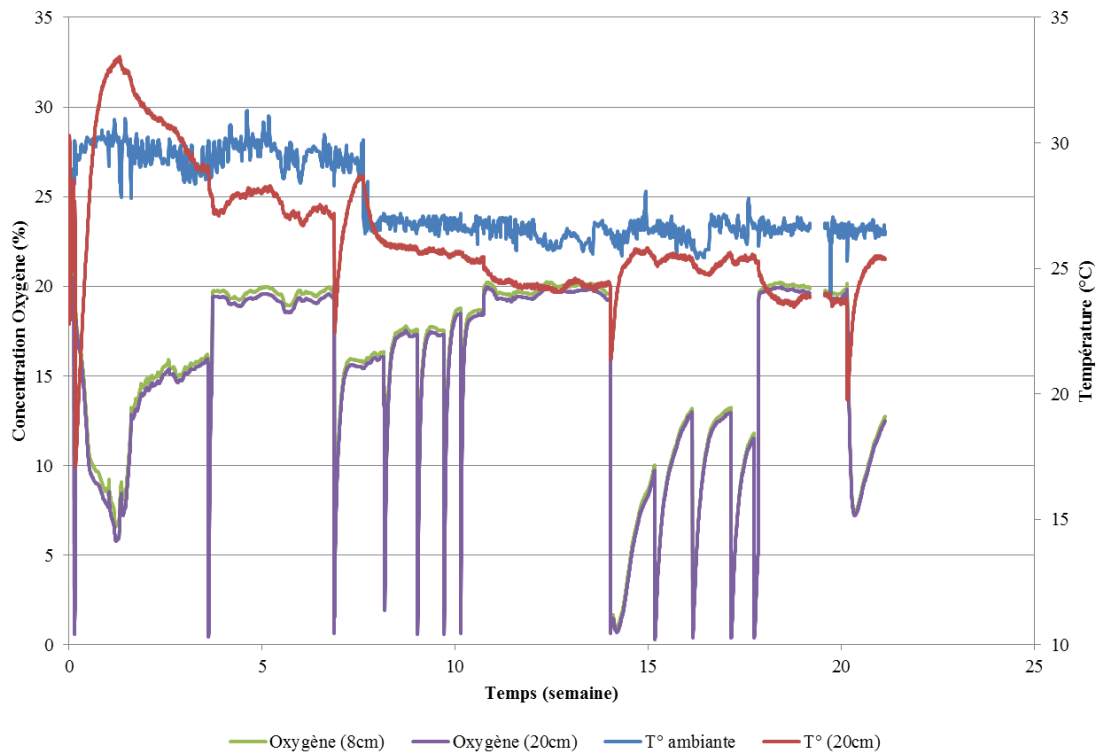


Figure 68 : Évolution de la concentration en oxygène et de la température dans le Mésocosme 4 (nitisol).

- **Mésocosme 6 : Ferralsol**

L'évolution de la température dans le Mésocosme 6 est présentée à la Figure 69. La température a augmenté jusqu'à 34 °C durant la première semaine de traitement puis a graduellement baissé et a été maintenue aux conditions de température de la chambre d'incubation. Aucun suivi de l'oxygène n'a été réalisé dans ce mésocosme. Basée sur les valeurs de la température, l'activité microbienne semble avoir sensiblement été la même que dans les deux autres mésocosmes en traitement par alternance anaérobie/aérobie.

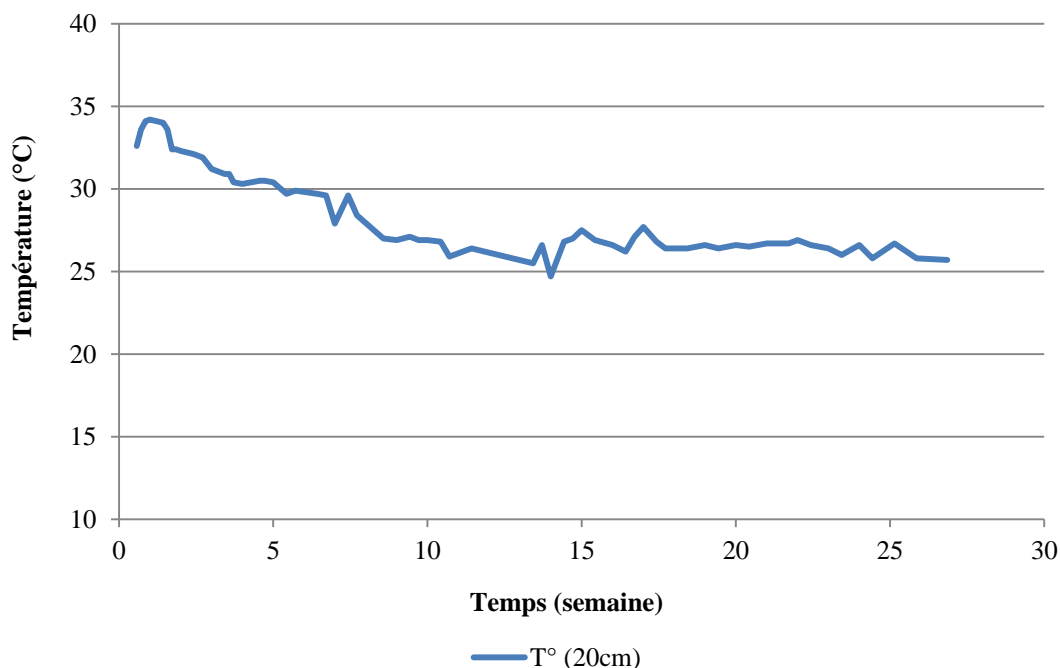


Figure 69 : Évolution de la température dans le Mésocosme 6 (ferralsol).

b) Évolution de la densité microbienne

L'évolution en fonction du temps des microflores aérobie et anaérobie est également semblable entre les trois différents sols traités (Tableau 40).

La microflore aérobie totale est très stable tout au long de l'expérience, hormis une très nette diminution après 25 jours (T = 4) d'expérience (47, 16 et 20 fois moins qu'au temps initial pour l'andosol, le nitisol et le ferralsol), diminution qui se répercute encore au 3^e temps (T = 14) de suivi pour le nitisol, mais pas ultérieurement.

Cette diminution du dénombrement bactérien pourrait être causée par une forte présence de microorganismes lors de l'ajout de compost végétal et l'impact d'une condition anaérobie durant les 4 premières semaines de traitement, ne favorisant pas la croissance des espèces aérobies strictes. Une remontée de la microflore est notable

entre la 5^e et la 7^e semaine de traitement où il y avait ventilation forcée dans les sols. En fin d'expérience, la microflore aérobie totale ne diffère que d'un facteur 2 de celles mesurées en début de traitement. Toutes les densités sont de l'ordre de 3 à 9×10^7 UFC/g.

La microflore anaérobie totale a été stable tout au long de l'expérience, hormis une très nette diminution après 25 jours d'expérience (120, 248 et 162 fois moins qu'au temps initial pour l'andosol, le nitisol et le ferralsol). Il y a eu une augmentation du dénombrement à la 7^e semaine de traitement dans l'andosol et le ferralsol.

Par contre, le dénombrement a diminué d'un facteur 4 entre la 4^e semaine et la 7^e semaine de traitement dans le nitisol. Cette diminution durant les premières semaines de traitement est probablement due à la forte concentration de microorganismes ajoutés en début de traitement avec le compost végétal qui n'ont pas nécessairement été capables de croître lors de la mise en traitement. Une stabilité des dénombrements est observée entre la 7^e et la 14^e semaine de traitement dans l'andosol et le ferralsol tandis qu'une augmentation de la densité microbienne est observée dans le nitisol. En fin d'expérience, la microflore anaérobie totale, de l'ordre de 1 à 6×10^6 UFC/g, est globalement plus faible d'un facteur 10 par rapport à celles mesurées en début de traitement. La figure 70 présente l'évolution des microflore aérobie et anaérobie durant le traitement.

Date de prélèvement	Temps de traitement (semaines)	Andosol		Nitisol		Ferralsol	
		Microflore totale aérobie (UFC/g)	Microflore totale anaérobie (UFC/g)	Microflore totale aérobie (UFC/g)	Microflore totale anaérobie (UFC/g)	Microflore totale aérobie (UFC/g)	Microflore totale anaérobie (UFC/g)
01-oct-10	0	3,4E+07	9,8E+06	5,9E+07	9,9E+07	1,50E+08	1,60E+07
26-oct-10	4	7,3E+05	8,2E+04	3,7E+06	4,0E+05	7,6E+06	9,9E+04
17-nov-10	7	6,0E+06	1,1E+06	5,1E+07	9,0E+04	8,0E+07	1,2E+06
06-janv-11	14	4,1E+07	1,8E+06	2,8E+06	2,5E+05	4,3E+07	1,3E+06
02-févr-11	18	8,1E+07	1,5E+06	4,1E+07	2,1E+06	5,8E+07	7,4E+05
18-mars-11	24	7,7E+07	3,7E+06	1,4E+08	1,8E+07	9,30E+07	1,00E+06
07-avr-11	27	5,5E+07	1,0E+06	2,9E+07	6,4E+06	9,50E+07	1,10E+06

Tableau 40 : Évolution en fonction du temps des densités des microflore totale aérobie et anaérobie dans les trois sols traités par alternance de phases aérobie et anaérobie après ajout initial de 12 % de compost en volume.

Les paramètres analytiques de suivi des concentrations en nutriments (azote, COT, phosphore) et autres paramètres du milieu (pH, conductivité électrique) sont présentés au Tableau 41. Tout comme les paramètres de suivi des mésocosmes en simulation de compostage, il y a une grande variabilité des résultats d'un temps de prélèvement à un autre. Il semble tout de même que les concentrations en nutriments et les valeurs de pH et de conductivité électriques soient favorables à la croissance microbienne optimale.

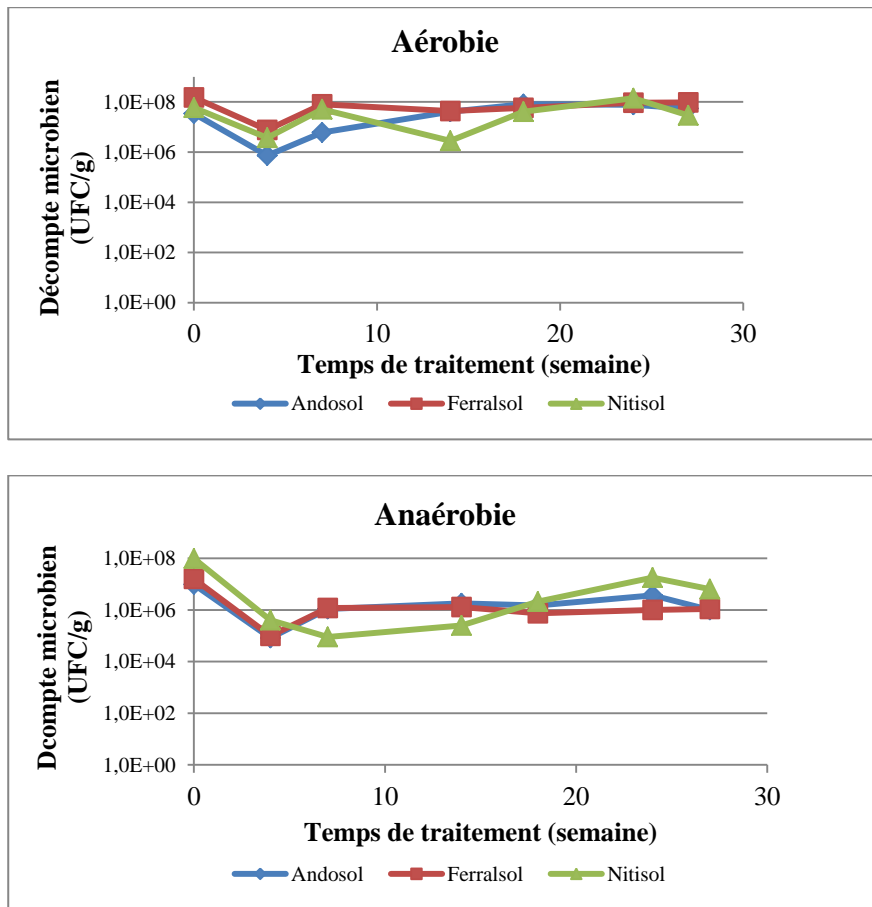


Figure 70 : Évolution des dénombrements de microflore aérobie et anaérobie.

Paramètres	Unité	Mésocosme 2 (Andosol)								
		T=0	T=4	T=7	T=14	T=18	T=20	T=24	T=27	
		05-oct-10	26-oct-10	18-nov-10	06-janv-11	02-févr-11	18-févr-11	18-mars-11	07-avr-11	
Carbone organique total	mg/kg	61000	--	109000	110000	79000	110000	130000	97000	
Nitrate	mg/kg (N-NO3)	350	--	632	813	840	835	881	651	
Azote total	mg/kg (MS)	9090	--	16800	3800	7740	9070	8200	9700	
Ratio C/N	---	6	--	6	24	9	11	14	9	
Phosphore assimilable	g/kg	0,15	--	0,11	0,11	0,08	0,21	0,12	0,16	
Sulfate	mg/kg (MS-A)	2000	--	2600	2700	3000	2300	3000	1600	
Matière sèche	%	41,1	--	40,4	43,8	40,3	39,9	40	41	
pH	---	7	--	6,9	7	6,7	6,9	6,9	7,2	
Conductivité électrique	uS/cm	n.a.	--	970	1150	1130	1300	910	875	
MFT aérobie	CFU/g	3,4E+07	7,3E+05	6,0E+06	4,1E+07	8,1E+07	6,5E+07	7,7E+07	5,5E+07	
MFT anaérobie	CFU/g	9,8E+06	8,2E+04	1,1E+06	1,8E+06	1,5E+06	1,2E+06	3,7E+06	1,0E+06	
Paramètres	Unité	Mésocosme 4 (Nitisol)								
		T=0	T=4	T=7	T=14	T=18	T=20	T=24	T=27	
		05-oct-10	26-oct-10	18-nov-10	06-janv-11	02-févr-11	18-févr-11	18-mars-11	07-avr-11	
Carbone organique total	mg/kg	20000	--	33000	40000	22000	34000	50000	39000	
Nitrate	mg/kg (N-NO3)	373	--	768	858	745	677	700	723	
Azote total	mg/kg (MS)	3500	--	8400	3200	2830	2880	2800	3200	
Ratio C/N	---	5,2	--	3,6	9,9	6,2	9,6	14,3	9,9	
Phosphore assimilable	g/kg	0,11	--	0,13	0,12	0,09	0,12	0,08	0,14	
Sulfate	mg/kg (MS-A)	330	--	1800	1100	870	850	1100	810	
Matière sèche	%	70,6	--	70,1	71,7	67,8	67,4	68	69	
pH	---	7,2	--	7,1	7	6,9	6,9	7,4	7,1	
Conductivité électrique	uS/cm	n.a.	--	1000	850	852	900	680	779	
MFT aérobie	CFU/g	5,9E+07	3,7E+06	5,1E+07	2,8E+06	4,1E+07	4,7E+07	1,4E+08	2,9E+07	
MFT anaérobie	CFU/g	9,9E+07	4,0E+05	9,0E+04	2,5E+05	2,1E+06	5,5E+06	1,8E+07	6,4E+06	
Paramètres	Unité	Mésocosme 6 (Ferralsol)								
		T=0	T=4	T=7	T=14	T=18	T=20	T=24	T=27	
		05-oct-10	26-oct-10	18-nov-10	06-janv-11	02-févr-11	18-févr-11	18-mars-11	07-avr-11	
Carbone organique total	mg/kg	28000	--	25000	29000	2700	33000	55000	28000	
Nitrate	mg/kg (N-NO3)	443	--	813	768	813	948	881	881	
Azote total	mg/kg (MS)	3860	--	7620	2800	3200	3490	2900	2900	
Ratio C/N	---	6,5	--	3,0	8,1	0,7	7,4	14,5	7,4	
Phosphore assimilable	g/kg	0,05	--	0,06	0,02	0,04	0,04	0,02	0,05	
Sulfate	mg/kg (MS-A)	1000	--	870	230	920	870	1200	870	
Matière sèche	%	68,5	--	69,1	69,3	66,9	66	67	67	
pH	---	7,6	--	7,2	7,2	7	7,1	7,4	7,2	
Conductivité électrique	uS/cm	n.a.	--	1010	850	913	1200	760	864	
MFT aérobie	CFU/g	1,5E+08	7,6E+06	8,0E+07	4,3E+07	5,8E+07	5,2E+07	9,3E+07	9,5E+07	
MFT anaérobie	CFU/g	1,6E+07	9,9E+04	1,2E+06	1,3E+06	7,4E+05	1,4E+06	1,0E+06	1,1E+06	

MFT : microflore totale

Tableau 41 : Évolution des différents paramètres analytiques relatifs à l'activité microbienne pour les mésocosmes en alternance de phases anaérobie/aérobie.

c) Évolution de la chlordécone

Tout comme les résultats de chlordécone obtenus pour les essais de compostage, une interférence a été observée initialement dans l'analyse de chlordécone dans les mésocosmes en alternance de phases anaérobie/aérobie, probablement causée par la présence de matière organique dans le compost végétal ajouté à raison de près de 10% volumique par rapport au sol. Suite aux ajustements de la méthode analytique, les différentes concentrations de chlordécone obtenues ne semblent pas indiquer une réduction lors des traitements (Tableau 42).

En effet, suite à 27 semaines de traitement, les concentrations en chlordécone dans les Mésocosmes 2 et 4 ont augmenté respectivement de 64 % (11,2 mg/kg à 18,3 mg/kg) et de 48 % (0,9 mg/kg à 1,4 mg/kg). Les concentrations dans le Mésocosme 6 présentent une diminution de l'ordre de 2 %. Certains résultats

d'analyses aux temps intermédiaires de traitement pour les trois traitements ont présenté de légères diminutions de concentrations, mais qui n'ont pas été confirmées lors de l'analyse finale en triplicata. Les résultats des dernières analyses réalisées pour déterminer l'évolution des concentrations en chlordécone dans les trois mésocosmes présentent de bons coefficients de variation pour chacun d'eux (4 %, 2 % et 7 %), permettant ainsi de supposer que la valeur moyenne finale est fiable.

La 5b-hydrochlordécone est quantifiée dans 10 échantillons sur 11 de l'andosol, avec des concentrations comprises entre 0,1 et 0,4 mg/kg, sans différences significatives entre les sols traités et les sols témoins. La 5b-hydrochlordécone n'est quantifiée dans aucun échantillon de ferralsol et nitisol.

La dihydrochlordécone n'est détectée dans aucun échantillon traité d'aucun des trois sols. Ces résultats confirment le manque d'efficacité du traitement vis-à-vis de la déchloration de la chlordécone.

Paramètre	Unité	Mésocosme 2 (Andosol)										
		T=0			T=4	T=7	T=11	T=14	T=20	T=27		
		α	β	χ	α	α	α	α	α	α	β	χ
Concentration	mg/kg	11,8	10,1	11,6	17,7	15,4	8,58	11,2	11,3	18	19	18
oncentration moyenne	mg/kg	11,2			17,7	15,4	8,58	11,2	11,3	18,3		
Taux d'abattement	%	---			-59%	-38%	23%	0%	-1%	-64%		
Paramètre	Unité	Mésocosme 4 (Nitisol)										
		T=0			T=4	T=7	T=11	T=14	T=20	T=27		
		α	β	χ	α	α	α	α	α	α	β	χ
Concentration	mg/kg	1,3	0,6	0,9	1,3	1,08	0,901	0,759	0,767	1,4	1,3	1,4
oncentration moyenne	mg/kg	0,9			1,28	1,08	0,901	0,759	0,767	1,4		
Taux d'abattement	%	---			-40%	-18%	2%	17%	16%	-48%		
Paramètre	Unité	Mésocosme 6 (Ferralsol)										
		T=0			T=4	T=7	T=11	T=14	T=20	T=27		
		α	β	χ	α	α	α	α	α	α	β	χ
Concentration	mg/kg	2,8	n.d.	n.d.	3,0	2,24	1,7	1,89	1,69	2,7	3	2,6
oncentration moyenne	mg/kg	2,8			2,99	2,24	1,7	1,89	1,69	2,8		
Taux d'abattement	%	---			-6%	21%	40%	33%	40%	2%		

n.d. :non disponible

Tableau 42 : Évolution en fonction du temps (T en semaines) des concentrations en chlordécone (CLD) dans les mésocosmes 1, 3 et 5 (α , β et χ : répliqués analytiques provenant d'échantillons indépendants).

Le taux d'abattement correspond au rapport entre la concentration mesurées au temps T et la concentration initiale mesurée à T = 0.

Le traitement biologique par alternance de phases anaérobie/aérobie n'a donc pas non plus permis d'observer de réduction de la concentration en chlordécone dans les trois mésocosmes à l'étude.

Les concentrations finales en chlordécone suivant 27 semaines de traitement sont supérieures aux concentrations initiales pour les deux sols, soit l'andosol avec une augmentation de 64 % avec des concentrations initiale de 11,2 mg/kg et finale de 18,3 mg/kg et le nitisol avec une augmentation de 48 % avec des concentrations initiale de 0,9 mg/kg et finale de 1,4 mg/kg. En ce qui concerne le ferralsol, il n'y a eu qu'une réduction de 2 % avec une concentration initiale de 2,8 mg/kg.

Les décomptes microbiens en conditions aérobie et anaérobie ont démontré qu'il y avait eu une baisse importante en début de traitement pour tous les traitements, excepté pour le Mésocosme 3 (nitisol aérobie), mais que les populations microbiennes se sont rapidement adaptées de sorte à se maintenir ou à augmenter légèrement en cours de traitement. Une source de carbone frais aurait probablement permis une plus grande croissance microbienne. Il faut toutefois noter qu'une activité bactérienne globale n'est nullement une garantie d'action sur un composé aussi récalcitrant que le chlordécone.

Les conditions de traitement pour l'alternance de phases anaérobie/aérobie n'ont pas été optimales afin de mesurer l'impact maximum d'une séquence anaérobie prolongée suivie d'une séquence aérobie plus courte. En fait, la condition anaérobie pour les Mésocosmes 2 (andosol) et 4 (nitisol) n'a été que de courte durée en début de traitement (approximativement deux semaines) lorsque la matière organique biodisponible était la plus élevée. Par la suite, il a été difficile de maintenir la condition anaérobie et ce, même en effectuant des purges à l'azote et en ajoutant de faibles quantités de mélasse (0,1 % massique). Le premier ajout de mélasse à la 14^e semaine de traitement semble avoir eu un faible impact sur l'activité microbienne dans le sol. En effet, une courte période anaérobie de deux jours a été observée avant une hausse de la concentration d'oxygène aux alentours de 15 %.

Des ajouts plus importants de mélasse auraient probablement permis de maintenir davantage la condition anaérobie. Sachant que la phase anaérobie n'a pu être maintenue et que celle-ci semble être nécessaire pour la déchlorination de la chlordécone, il n'est pas surprenant que les concentrations en chlordécone n'aient pas diminué. Les difficultés rencontrées dans l'atteinte et le maintien de conditions anaérobies traduisent une certaine spécificité du fonctionnement des sols étudiés.

4. Conclusions-Perspectives

4.1. DÉVELOPPEMENTS ANALYTIQUES

Les développements analytiques ont été effectués à partir des trois types de sols antillais utilisés dans les expériences de remédiation. La méthode développée fait appel à une extraction à chaud sous pression (Accelerated Solvent Extraction) avec l'ajout d'un traceur (le trans-nonachlore) pour déterminer les rendements d'extraction, dont il est tenu compte pour corriger les résultats. Les extraits, auxquels sont ajoutés la chlordécone-¹³C et le chlorobiphényle 53 comme étalons internes, sont analysés avec un chromatographe en phase gazeuse avec un détecteur de spectrométrie de masse triple quadripôle. La limite de quantification instrumentale pour la chlordécone est de 0,05 mg/kg. En outre, les paramètres suivants ont été quantifiés : fonction d'étalonnage, répétabilité, reproductibilité, efficacité de l'extraction, spécificité, et incertitude. La mono-hydrochlordécone (5b-hydrochlordécone) peut également être quantifiée ; la di-hydrochlordécone peut être identifiée par son spectre de masse inclus dans la bibliothèque de spectres mais ne peut être quantifiée, faute d'étalon analytique. De fortes interférences analytiques ont été observées dans les échantillons traités par les procédés de remédiation ; il s'agit très probablement d'effets induits par les fortes teneurs en matières organiques ajoutées aux sols par les procédés étudiés. La résolution de ces problèmes nécessite l'emploi de la chlordécone-¹³C.

4.2. TRAITEMENT PAR ISCR

Six mois de procédé d'ISCR-Daramend[®] permettent de diminuer de 90 % la teneur initiale en chlordécone du nitisol (passant de $1,1 \pm 0,2$ mg/kg, n = 16, à $0,10 \pm 0,06$ mg/kg, n = 3), de 95 % celle du ferralsol (passant de $2,2 \pm 0,5$ mg/kg, n = 16, à $0,12 \pm 0,01$ mg/kg, n = 3), et de 44 % celle de l'andosol (passant de $13,3 \pm 2,8$ mg/kg, n = 16, à $8,72 \pm 0,95$ mg/kg, n = 3). Des produits de transformation partiellement déchlorés sont observés ; la mono- hydrochlordécone (5b-hydrochlordécone) est présente au départ dans les trois sols mais ne peut être quantifiée que dans l'andosol, et sa concentration n'augmente pas suite au traitement. La dihydrochlordécone, qui ne peut être quantifiée faute d'étalon analytique, n'est détectée que dans les sols traités, jamais dans les témoins non traités. L'évolution du potentiel redox en fonction des cycles successifs d'ajout de Daramend[®] n'est pas ce qui est observé par ISCR dans d'autres types de sols. L'optimum du potentiel de l'ISCR n'a donc probablement pas été atteint et des travaux spécifiques sur le potentiel redox généré par le procédé dans les sols antillais devront être menés pour mieux comprendre comment agit le procédé et envisager son optimisation.

Les travaux consacrés aux activités microbiologiques de l'andosol traité par ISCR-Daramend[®] montrent une stimulation des activités ferri- et sulfato-réductrices après les phases anaérobies des cycles 4 et 6. Par contre, la mesure de l'activité dénitrifiante, telle que réalisée dans le cadre de ce projet, ne permet pas de conclure s'il y a ou non stimulation. Pour le ferralsol, le traitement Daramend[®] engendre une stimulation des activités dénitrifiante et sulfato-réductrice après les phases anaérobies des cycles

4 et 6. Par contre, l'activité de ferri-réduction n'est que très légèrement stimulée. Pour le nitisol, le traitement Daramend® engendre une stimulation des activités dénitrifiante, ferri-réductrice et sulfato-réductrice, essentiellement après la phase anaérobie du cycle 4.

La technique d'empreinte moléculaire utilisée (Capillary Electrophoresis- Polymerase Chain Reaction-Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) directement à partir de l'ADN extrait des sols et purifié selon une procédure développée spécifiquement pour le projet montre que la structure génétique de la communauté bactérienne des sols avant traitement est spécifique de chaque sol. L'étude plus fine du nitisol montre une augmentation significative des biomasses microbienne et bactérienne totales dès la fin du premier cycle du procédé ISCR ; les valeurs se stabilisent à la fin du 6^e cycle. Par ailleurs, le procédé ISCR conduit à une réduction progressive de la complexité de la structure génétique de la communauté bactérienne du nitisol.

Une augmentation significative des biomasses microbienne et bactérienne totales induite par le traitement ISCR-Daramend® a été observée pour le ferralsol et le nitisol (pour le nitisol, l'impact du procédé est observable dès la fin du premier cycle), quelle que soit la technique de mesure utilisée (bactéries cultivables et non cultivables). Les mesures de chlordécone et ses dérivés montrent également un effet du traitement dès la fin du 1^{er} cycle. En l'absence de données sur l'évolution de la chlordécone lors d'un traitement ISCR en conditions stériles, l'augmentation de la biomasse ne peut toutefois être actuellement considérée comme la cause de la diminution des concentrations en chlordécone. Il est très probable que la biomasse contribue à la transformation de la chlordécone, mais les mécanismes physico-chimiques engendrés par les conditions réductrices imposées aux sols peuvent également jouer un rôle déterminant.

Dès le premier cycle du procédé ISCR, une modification significative de la structure génétique de la communauté bactérienne du nitisol (les autres sols n'ont pu être étudiés dans la présente étude ; ils le seront dans une phase ultérieure) est observée. La répétition des cycles conduit à une diminution très nette de la diversité génétique du nitisol, avec la sélection et le développement de certaines espèces bactériennes. Cette modification est concomitante de la stimulation des activités de dénitrification et de sulfato-réduction après le cycle 4 ; un lien de cause à effet ne peut toutefois être établi.

4.3. TRAITEMENT PAR COMPOSTAGE CLASSIQUE ET PAR ALTERNANCE ANAÉROBIE/AÉROBIE AVEC AJOUT DE COMPOST

L'étude de traitabilité a permis de montrer qu'un traitement aérobie, à une température moyenne d'incubation de 26 °C, contenant du compost végétal à 12 % et 115-125 % volume et des conditions permettant la croissance microbienne (nutriments et humidité) ne permettait pas de réduire les concentrations de chlordécone et ce, dans les trois types de sol. Bien que les conditions opératoires n'aient pas été tout à fait optimales pour ce type de traitement, ces résultats mettent en avant les limitations de l'approche « compostage » dans le cas particulier de l'élimination de la chlordécone.

Les limites de l'efficacité du traitement biologique en cascade anaérobie/aérobie ont également été montrées, même si la condition anaérobie n'a pu être maîtrisée tout au long de l'expérimentation. Cette difficulté à conserver les conditions anaérobies avec des quantités limitées en carbone biodisponible suggère qu'il aurait probablement été préférable de faire des ajouts de quantités plus élevées d'amendements organiques liquides, telle la mélasse, afin de s'assurer du maintien d'une forte activité microbienne et ainsi de bonnes conditions d'opération. Avec l'ajout massif de matière organique facilement biodégradable, les concentrations en chlordécone auraient peut-être diminué dans ces conditions plus extrêmes, suite à la métabolisation de l'amendement organique par l'activité microbienne.

4.4. PERSPECTIVES

Les perspectives ouvertes par les résultats obtenus sont nombreuses et prometteuses. Un complément de développements analytiques permettra de suivre l'apparition et le devenir pendant le traitement ISCR-Daramend[®] de produits de transformation réduits sans déchloration (chlordécol), et de produits déchlorés de la chlordécone autre que les mono- et di-hydrochlordécone. Des compléments d'étude en microbiologie moléculaire (détection de bactéries spécialisées dans la déchloration réductrice, détection de gènes impliqués dans la dégradation de composés chlorés) permettront de mieux suivre l'évolution des structures génétiques des sols traités. D'un point de vue géochimique, des essais supplémentaires sont prévus pour améliorer le contrôle du potentiel rédox et pour tester l'emploi de matières premières locale (bagasse) en substitut éventuel de la composante végétale du produit commercial Daramend[®]. Enfin, la perspective de tests *in situ* aux Antilles peut être envisagée à court terme : les résultats présentés dans ce rapport méritent en effet d'être confrontés à la réalité du terrain, en prenant évidemment toutes les précautions requises. Ce dernier saut d'échelle permettra à l'horizon de 18-24 mois d'apporter une réponse de base, très argumentée, sur la faisabilité technique de la décontamination par ISCR- Daramend[®] des sols antillais chargés en chlordécone.

5. Remerciements

Les auteurs remercient la société Lovink Enertech b.v., P.O. Box 111, 7060 AC Terborg, en la personne de son responsable des achats, René van der Zee, qui a fourni gracieusement le fer zéro valent utilisé en plus de celui contenu dans le Daramend.

L'aide fournie par Y.M. Cabidoche (INRA Guadeloupe), pour l'identification des parcelles où ont été réalisés les prélèvements de sols, a également été très appréciée.

Les échantillons de sols non contaminés ont pu être prélevés en Martinique grâce à l'aide logistique et scientifique de l'IRD/CNRS, L. Rangon, T. Woignier et H. Macarie ; merci à eux.

6. Bibliographie

Abbey A.M.I., Beaudette L.A., Lee H. (2003) - Polychlorinated biphenyl (PCB) degradation and persistence of a gfp-marked *Ralstonia eutropha* H850 in PCB-contaminated soil. *Applied microbiology and biotechnology*. 63: p. 222-230.

Achard R., Perrier X., Chabrier C. et Lassoudière A. (2003) - Cartographie du risque de pollution des sols de Martinique par les organochlorés. Méthodologie d'échantillonnage à la parcelle. Rapport de Phase1. BRGM/RP-52464-FR, 35 p.

Achard R., Cabidoche Y.M., Caron A., Nelson R., Duféal D., Lafont A., Lesueur-Jannoyer M. (2007) - Contamination des racines et tubercules cultivés sur sol pollué par la chlordécone aux Antilles. *Les cahiers du Pram*. 7: p. 45-50.

Arrouays D., Jolivet C., Boulonne L., Bodineau G., Ratié C., Saby N., Grolleau E. (2003) - Le Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS) de France. *Etude et Gestion des Sols* : 10 : p. 241-250.

Bertrand J.A., Abarnou A., Bocquené G., Chiffolleau J.F., Reynal L. (2009) - Diagnostic de la contamination chimique de la faune halieutique des littoraux des Antilles françaises. Campagnes 2008 en Martinique et en Guadeloupe. Ifremer, Martinique. <http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2009/rapport-6896.pdf>. 136 p.

Borsetti A.P. and Roach J.A.G. (1978) - Identification of kepone alteration products in soil and mullet. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 20: p. 241-247.

Boudot J.P., Bel Hadj B.A., Choné T. (1986) - Carbon mineralization in Andosols and aluminium-rich highlands soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 18: p. 457-461.

Bousserrhine N. (1995) - Etude de paramètres de la réduction bactérienne du fer et application à la déferrification de minéraux industriels. Géomicrobiologie et biochimie microbienne. Thèse de l'Université de Nancy I.

Bousserrhine N., Gasser U., Jeanroy E. et Berthelin J. (1998) - Effect of aluminium substitution on ferri-reducing bacterial activity and dissolution of goethites. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Series IIA - Earth and Planetary Science* 326(9): p. 617-624.

Cabidoche Y.-M., Clermont-Dauphin C., Lafont A., Sansoulet J., Cattan P., Achard R., Caron A., Chabrier C. (2006) - Stockage dans les sols à charges variables et dissipation dans les eaux de zoocides organochlorés autrefois appliqués en bananeraies aux Antilles. Relation avec les systèmes de culture. Rapport final d'exécution, 101 p.

Cabidoche Y.-M., Jannoyer M., Vannière H. (2006) - Conclusions du Groupe d'Étude et de Prospective « Pollution par les organochlorés aux Antilles ». Aspects agronomiques. Contributions CIRAD INRA. 66 p.

Clostre F., Lesueur-Jannoyer M., Cabidoche Y.-M. (2010) - Conclusions de l'Atelier « Remédiation à la pollution par la chlordécone aux Antilles ». 32 p. Disponible à <http://www.observatoire-eau-martinique.fr/les-outils/base-documentaire/conclusions-de-2019atelier-abremediation-a-la-pollution-par-la-chlordecone-aux-antillesbb>

Colombano S., Blanc C., Guérin V., Chevrier B. en collaboration avec **Allier D., Dumon A., D'Hugues P. et Dictor M.-C.** (2009) - Examen des possibilités de traitement de la chlordécone dans les sols notamment sur les aires d'alimentation des captages d'eau potable. Rapport public, BRGM/RP-57708-FR, 207 p.

Colmet-Daage F., Gautheyrou J., Gautheyrou M. (1972) - Dispersion et étude des fractions fines de sols à allophane des Antilles et d'Amérique Latine. *Cah. ORSTOM*, sér. Pédo. X: p. 169-191.

Dalgren K.E., Waara S., Düker A., von Kronhelm T., van Hees P.A.W. (2009) - Anaerobic bioremediation of a soil with mixed contaminants: explosives degradation and influence on heavy metal distribution, monitored as changes in concentration and toxicity. *Water Air Soil Pollution*, 31: p. 202-301.

Dequiedt S., Lelièvre M., Jolivet C., Saby N.P.A., Martin M., Thioulouse J., Maron P.A., Mougé C., Chemidlin Prévost-Bouré N., Arrouays D., Lemanceau P., Ranjard L. (2009) - ECOMIC-RMQS: biogéographie microbienne à l'échelle de la France : état d'avancement et premiers résultats. *Etude et Gestion des Sols*. 16: p. 219-231.

Dolfing J., van Eekert M., Seech A., Vogan J., Mueller J. (2008) - *In situ* Chemical Reduction (ISCR) technologies: significance of low Eh reactions. *Soil & Sediment Contamination*, 17: p. 63-74.

Dray S., Chessel D., Thioulouse J. (2003) - Co-inertie analysis and the linking of ecological data tables. *Ecology*. 84: p. 3078-3089.

Epstein S. (1978) - Kepone - hazard evaluation. *The Science of the Total Environment*. 9: p. 1-62.

Feller C., Beare M.H. (1997) - Physical control of soil organic matter dynamics in the tropics. *Geoderma*; 79: p. 69-116.

Fogel, G.B., Collins C.R., Li J., Brunk C.F. 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb. Ecol.* 38: p. 93–113.

Fritz M. (2009) - L'autorisation du chlordécone en France 1968-1981. Rapport AFSSSET, 21 pp. http://www.observatoire-pesticides.fr/upload/bibliotheque/457291400429630296486151015810/autorisation_chlordecone_france_1968_1981.pdf

- Gangneux C., Akpa-Vinceslas M., Sauvage H., Desaire S., Houot S., Laval K.** (2009) - Fungal, bacterial and plant dsDNA contributions to soil total DNA extracted from agricultural silty soils : relationships with chloroform labile carbon. *Soil Biol. Biochem.* 43: p. 431-437.
- Guo G.X., Deng H., Qiao M., Mu Y.J., Zhu Y.G.** (2011) - Effect of pyrene on denitrification activity and abundance and composition of denitrifying community in an agricultural soil. *Environmental Pollution*, 159: p. 1886-1895.
- Herrera A., Cockell C.S.** (2007) - Exploring microbial diversity in volcanic environments: a review of methods in DNA extraction. *J. Microbiol. Methods.* 70: p. 1-12.
- Husson F., Josse J., Lê S.** (2008) - FactoMine R : an R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software.* 25: p. 1-18.
- Ikeda S., Tsurumaru H., Wakai S., Noritake C., Fujishiro K., Akasaka M., Ando K.** (2008) - Evaluation of the effects of different additives in improving the DNA extraction yield and quality from andosol. *Microbes Environ.* 23: p. 159-166
- INVS.** (2011) - Numéro thématique - Chlordécone aux Antilles : bilan actualisé des risques sanitaires. Bulletin épidémiologique hebdomadaire. 8 février 2011 / n° 3-4-5.
- Joly P.B.** (2010) - La saga du chlordécone aux Antilles françaises. Reconstruction chronologique 1968-2008. Rapport INRA Sens, 82 pp. http://www.observatoire-pesticides.fr/upload/bibliotheque/85217353078322242256849728077/saga_chlordeccone_antilles_francaises_1968_2008.pdf
- Kim G., Jeong W., Choe S.** (2008) - Dechlorination of atrazine using zero-valent iron (Fe⁰) under neutral pH conditions. *Journal of hazardous materials*, 155: p. 502-506.
- Kim S.C., Yang J.E., Ok Y.S., Sik Y.O., Skousen J., Kim D.G., Joo J.H.** (2010) - Accelerated Metolachlor Degradation in Soil by Zerovalent Iron and Compost Amendments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 84: p. 459-464.
- Kitts C.L.** (2001) - Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2: p. 17-25.
- Leckie S.E., Prescott C.E., Grayston S.J., Neufeld J.D., Mohn W.W.** (2004) - Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biol. Biochem.* 36: p. 529-532.
- Liu W.T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J.** (1997) - Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: p. 4516-4522.

Marsh T.L., Saxman P., Cole J., Tiedje J. (2000) - Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Aug;66(8): p. 3616-3620.

Marstorp H., Xin G., Ping G. (2000) - Relationship between dsDNA, chloroform labile C and ergostérol in soils of different organic matter contents and pH. *Soil Biol. Biochem.* 32: p. 879-882.

Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J.C. et al. (2001) - DNA extraction from soils : old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: p. 2354-2359.

Mastovska K., Lehotay S.J., Anastassiades M. (2005) - Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrixes. *Anal. chemistry*, 77 (2005), p. 8129-8137.

MEDD (Ministère de l'Écologie et du Développement Durable) (2007) - Annexe 2 : Comment identifier un site (potentiellement) pollué / Comment gérer un problème de site pollué / Modalité de gestion et de réaménagement des sites pollués, 53 p.

Michelland R., Dejean S., Combes S., Fortun-Lamothe L., Cauquil L. (2009) - StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Mol. Ecol. Resources.* 9: p. 1359-1363.

Monti D. and Coat S. (2007) - La contamination des espèces d'eau douce. *Les Cahiers du Pram.* 7: p. 29-33.

Multigner L., Ndong J.R., Giusti A., Romana M., Delacroix-Maillard H., Cordier S., et al. (2010) - Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 28: p. 3457-3462.

Nathanail J., Bardos P., Nathanail P. (2002) - Contaminated land management. Land Quality Press and EPP Publications, Londres, 467 p.

Norme ISO 10381-6. Qualité du sol - Lignes directrices pour la collecte, la manipulation et la conservation, dans des conditions aérobies, de sols destinés à l'évaluation en laboratoire des processus, de la biomasse et de la diversité microbiens.

Norme PR NF ISO 11063. Qualité du sol - Méthode pour extraire directement l'ADN d'échantillons de sol. 2010-06.

OPECST (Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologique) (2009) - RAPPORT sur les impacts de l'utilisation de la chlordécone et des pesticides aux Antilles : bilan et perspectives d'évolution, par M. Jean-Yves LE DÉAUT, député et Mme Catherine PROCACCIA, sénateur. 223 p. <http://www.senat.fr/rap/r08-487/r08-4871.pdf>

- Phillips T.M., Lee H., Trevors J.T. Seech A.G.** (2004) - Mineralization of hexachlorocyclohexane in soil during solid-phase bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 31: p. 216-222.
- Phillips T.M., Lee H., Trevors J.T., Seech A.G.** (2006) - Full-scale in situ bioremediation of hexachlorocyclohexane-contaminated soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81: p. 289-298.
- Phillips T.M., Seech A.G., Lee H., Trevors J.T.** (2005) - Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation*. 16: p. 363-392.
- Poole C.F.** (2007) - Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. Review. *Journal of Chromatography A*, 1158: p. 241-250.
- R Development Core Team.** (2004) - R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. <http://www.R-project.org>.
- Ranjard L., Dequiedt S., Lelièvre M., Maron P.A., Mougél C., Morin F., Lemanceau P.** (2009) - Platform GenoSol : a new tool for conserving and exploring soil microbial diversity. *Environ. Microbiol. Report*. 1: p. 97-99.
- Ranjard L., Lejon D., Mougél C., Scherer L., Merdinoglu D., Chaussod R.** (2003) - Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ. Microbiol.* 5: p. 1111-1120.
- Ranjard L., Poly F., Combrisson J., Richaume A., Nazaret S.** (1998) - A single procedure to recover DNA from the surface or inside aggregates and in various size fractions of soil suitable for PCR-based assays of bacterial communities. *Eur. J. Soil Biol.* 34: p. 89-97.
- Ranjard L., Richaume A.** (2001) - Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.* 152: p. 707-716.
- Référentiel pédologique.** (2008) - Baize D., Girard M.C. Association française pour l'étude du sol (AFES). Editions Quæ. Savoir faire. 405 p.
- Saeki K., Kunito T., Sakai M.** (2010) - Effects of pH, ionic strength, and solutes on DNA adsorption by andosols. *Biol Fertil Soils*. 46: p. 531-535.
- Saeki K., Kunito T., Sakai M.** (2011) - Effect of Tris-HCl buffer on DNA adsorption by a variety of soil constituents. *Microbes Environ.* 26: p. 88-91.
- Saeki K., Morisaki M., Sakai M.** (2008) - The contribution of soil constituents to adsorption of extracellular DNA by soils. *Microbes Environ.* 23: p. 353-355.

Saeki K., Sakai M. (2009) - The influence of soil organic matter on DNA adsorptions on andosols. *Microbes Environ.* 24: p. 175-179.

Seech A., Bolanos-Shaw K., Hill D., Molin J. (2008) - *In Situ* Bioremediation of pesticides in soil and groundwater. Remediation. DOI: 10.1002/rem.20193, p. 87-99.

Takada-Hoshino Y., Matsumoto N. (2004) - An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA. *Microbes Environ.* 19: p. 13-19.

Thioulouse J., Chessel D., Dolédec S., Oliver J.M. (1997) - Ade-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat Comput* 7: p. 75-83.

Tiedje J.M. (1982) - Denitrification. Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties_Agronomy Monograph no. 9 (2nd edition). ASA-SSSA, p. 1011-1026.

UNEP/POPS/POPRC.3/10 (2007) - Projet d'évaluation de la gestion des risques : chlordécone. 15 p.

WHO (1986) - International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 66. Kelevan, 16 p. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc66.htm>, visualisé le 2/2/2011.

Woignier T. (2007) - Relation entre la structure poreuse des sols à allophanes et le stockage du carbone : caractérisation expérimentale et modélisation. Rapport d'avancement IRD 2004-2007. 34 p.

Wollum II A.G. (1982) - Cultural methods of soil microorganisms. In Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties. *Agronomy Monograph* n° 9 (2nd edition), p. 781-802.

Zipper H., Buta C., Lämmle K., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. (2003) - Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by Sybr Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. *Nucl. Acids Res.* 31 : e39.

Annexe 1

Compte-rendu des opérations de prélèvement des sols dans les parcelles guadeloupéennes

28/05/2010 : Prélèvement de la parcelle FRL/SRD (Ferralsol), située à l'est de Sainte-Marie au lieu-dit « La Sarde ».

Condition météo : Nuageux avec pluie le matin. Sol relativement humide.

La parcelle concernée est en exploitation avec de jeunes pousses de bananiers. La terre a été fraîchement retournée pour la plantation.



Figure 1 : Vue sur la parcelle FRL/SRD.

Une zone d'environ 1 ha a été préalablement sélectionnée (Illustration 1) sous SIG. Cette zone sélectionnée présente une topographie en plateau sur les $\frac{3}{4}$ de sa surface située au nord. Plus au sud, la parcelle présente une légère pente descendante.

Le prélèvement concerne un poids total prévu de 400 kg frais sur 25 points d'échantillonnage. Le volume prélevé a été réparti dans 25 sacs d'environ 16 ± 1 kg chacun et conditionné dans six cantines.

Les prélèvements ont été effectués selon une maille carrée de 20 m de côté et à 10 m des bordures de la parcelle.

Deux prélèvements composites supplémentaires (5 kg environ) ont été extraits à raison de 200 g environ par point de prélèvement répartis dans 2 sacs destinés à certains tests spécifiques nécessaires avant le lancement des mésocosmes.

La Figure 2 présente le plan d'échantillonnage.



Figure 2 : Plan d'échantillonnage de la parcelle FRL/SRD sur fond Orthophoto 2004 de l'IGN.
 Trait Rouge = Limite parcellaire du BD_PARCELLAIRE de l'IGN (RGE 2004).
 Trait bleu = surface échantillonnée d'environ 1 ha.

Le tableau suivant présente les coordonnées GPS (précision ± 4 m) de chacun des points de prélèvements, exprimés dans le système géographique universel WGS84, projection UTM20N.

ID	NOM_ECH	X_WGS84	Y_WGS84
1	FRL/SRD_01	652732	1780808
2	FRL/SRD_02	652751	1780814
3	FRL/SRD_03	652768	1780820
4	FRL/SRD_04	652788	1780827
5	FRL/SRD_05	652807	1780834
6	FRL/SRD_06	652815	1780820
7	FRL/SRD_07	652796	1780809
8	FRL/SRD_08	652779	1780802
9	FRL/SRD_09	652759	1780794
10	FRL/SRD_10	652739	1780789
11	FRL/SRD_11	652742	1780769
12	FRL/SRD_12	652764	1780777
13	FRL/SRD_13	652786	1780783
14	FRL/SRD_14	652804	1780790
15	FRL/SRD_15	652818	1780797
16	FRL/SRD_16	652822	1780776
17	FRL/SRD_17	652805	1780768
18	FRL/SRD_18	652789	1780763
19	FRL/SRD_19	652768	1780754
20	FRL/SRD_20	652749	1780747
21	FRL/SRD_21	652753	1780733
22	FRL/SRD_22	652769	1780737
23	FRL/SRD_23	652786	1780743
24	FRL/SRD_24	652781	1780729
25	FRL/SRD_25	652763	1780723

Tableau 1 : Coordonnées GPS des points de prélèvements de la parcelle FRL/SRD en WGS84 UTM20N.

01/06/2010 : Prélèvement de la parcelle AND/HFN (Andosol Perhydraté) à l'Ouest de Capesterre au lieu-dit « Fédé ».

Condition météo : Nuageux avec pluie le matin. Sol relativement humide.

Une zone actuellement en jachère, d'environ 0,75 ha, a été sélectionnée (cf. Figure 3).



Figure 3 : Vue sur la parcelle AND/HFN.

Cette zone présente une topographie en pente vers le sud-est. Elle est située au milieu de parcelles bananières exploitées.

Le prélèvement concerne un poids total prévu de 550 kg frais sur 25 points d'échantillonnage. Le volume prélevé a été réparti dans 50 sacs (2 par point de prélèvement) d'environ 11 ± 1 kg) chacun et conditionné dans neuf cantines.

Les prélèvements ont été effectués selon une maille carrée de 17 m de côté et à 10 m des bordures de la parcelle.

Deux prélèvements composites supplémentaires (5 kg environ) ont été extraits à raison de 200 g environ par point de prélèvement répartis dans deux sacs destinés à certains tests spécifiques nécessaires avant le lancement des mésocosmes.

La Figure 4 présente le plan d'échantillonnage.

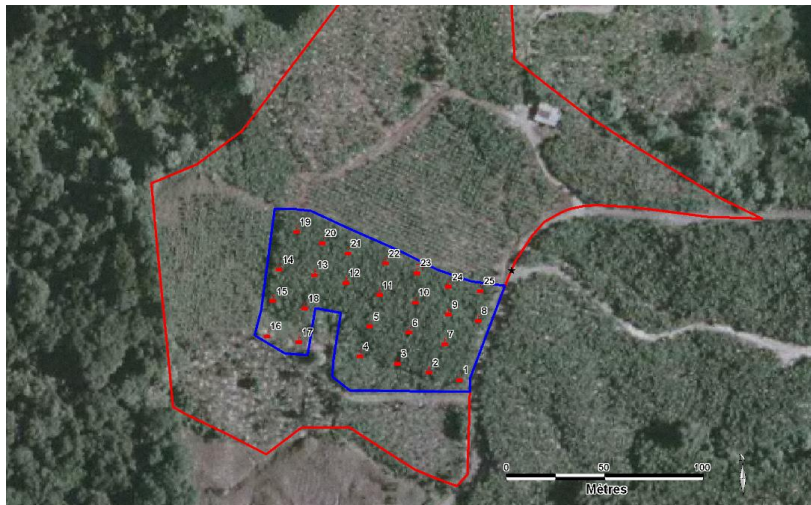


Figure 4 : Plan d'échantillonnage de la parcelle AND/HFN sur fond Orthophoto 2004 de l'IGN.
 Trait Rouge = Limite parcellaire du BD_PARCELLAIRE de l'IGN (RGE 2004).
 Trait bleu = surface échantillonnée d'environ 1 ha.

Le tableau suivant présente les coordonnées GPS (précision ± 4 m) de chacun des points de prélèvements, exprimés dans le système géographique universel WGS84, projection UTM20N.

ID	NOM_ECH	X_WGS84	Y_WGS84
1	AND/HFN_01	647378	1776851
2	AND/HFN_02	647363	1776855
3	AND/HFN_03	647347	1776860
4	AND/HFN_04	647328	1776864
5	AND/HFN_05	647333	1776879
6	AND/HFN_06	647353	1776876
7	AND/HFN_07	647371	1776870
8	AND/HFN_08	647388	1776881
9	AND/HFN_09	647373	1776885
10	AND/HFN_10	647356	1776891
11	AND/HFN_11	647338	1776895
12	AND/HFN_12	647321	1776901
13	AND/HFN_13	647305	1776905
14	AND/HFN_14	647287	1776908
15	AND/HFN_15	647284	1776892
16	AND/HFN_16	647281	1776874
17	AND/HFN_17	647297	1776871
18	AND/HFN_18	647300	1776888
19	AND/HFN_19	647296	1776927
20	AND/HFN_20	647309	1776921
21	AND/HFN_21	647322	1776916
22	AND/HFN_22	647341	1776911
23	AND/HFN_23	647357	1776906
24	AND/HFN_24	647373	1776899
25	AND/HFN_25	647389	1776897

Tableau 2 : Coordonnées GPS des points de prélèvements de la parcelle AND/HFN en WGS84 UTM20N.

02/06/2010 : Prélèvement de la parcelle NIT/MNR (Nitisol), située au sud-ouest de Capesterre-Belle-Eau, Habitations Les Mineures.

Condition météo : Temps dégagé avec pluie la veille. Sol relativement humide (Arrosage automatique par « gouttes à gouttes »).

Une zone d'environ 0,8 ha a été préalablement sélectionnée (Figure 5) sous SIG.

Cette zone présente une topographie plane. Elle est située au milieu de parcelles bananières exploitées.



Figure 5 : Vue sur la parcelle NIT/MNR.

Le prélèvement concerne un poids total prévu de 400 kg frais sur 25 points d'échantillonnage. Le volume prélevé a été réparti dans 50 sacs (2 par point de prélèvement) d'environ 8 ± 1 kg) chacun et conditionné dans cinq cantines.

Les prélèvements ont été effectués selon une maille carrée de 17 m de côté et à 10 m des bordures de la parcelle.

Deux prélèvements composites supplémentaires (5 kg environ) ont été extraits à raison de 200 g environ par point de prélèvement répartis dans deux sacs destinés à certains tests spécifiques nécessaires avant le lancement des mésocosmes.

La Figure 6 présente le plan d'échantillonnage.



Figure 6 : Plan d'échantillonnage de la parcelle NIT/MNR sur fond Orthophoto 2004 de l'IGN.
Trait Rouge = Limite parcellaire du BD_PARCELLAIRE de l'IGN (RGE 2004).
Trait bleu = surface échantillonnée d'environ 1 ha.

Le tableau suivant présente les coordonnées GPS (précision ± 4 m) de chacun des points de prélèvements, exprimés dans le système géographique universel WGS84, projection UTM20N.

ID	NOM_ECH	X_WGS84	Y_WGS84
1	NIT/MNR_01	651362	1771841
2	NIT/MNR_02	651373	1771832
3	NIT/MNR_03	651388	1771820
4	NIT/MNR_04	651400	1771810
5	NIT/MNR_05	651413	1771796
6	NIT/MNR_06	651423	1771786
7	NIT/MNR_07	651399	1771787
8	NIT/MNR_08	651386	1771796
9	NIT/MNR_09	651376	1771808
10	NIT/MNR_10	651363	1771819
11	NIT/MNR_11	651352	1771830
12	NIT/MNR_12	651339	1771818
13	NIT/MNR_13	651353	1771807
14	NIT/MNR_14	651365	1771795
15	NIT/MNR_15	651376	1771783
16	NIT/MNR_16	651390	1771771
17	NIT/MNR_17	651403	1771759
18	NIT/MNR_18	651415	1771750
19	NIT/MNR_19	651428	1771737
20	NIT/MNR_20	651411	1771771
21	NIT/MNR_21	651425	1771760
22	NIT/MNR_22	651439	1771753
23	NIT/MNR_23	651450	1771764
24	NIT/MNR_24	651460	1771752
25	NIT/MNR_25	651436	1771775

Tableau 3 : Coordonnées GPS des points de prélèvements de la parcelle NIT/MNR en WGS84 UTM20N.

Annexe 2

**Photos des sols tels que prélevés,
avant le conditionnement manuel (élimination
des éléments grossiers, démottage, quartage)
réalisé avant le début des expérimentations**

Ferralsol



Nitisol



Andosol



Annexe 3

Étude de la faisabilité de synthèse chimique de la dihydrochlordécone (rapport artm1003 @rtMolécule)



SIRET n°449 357 300 00010

SARL @rtMolecule - 40 avenue du Recteur Pineau - 86022 POITIERS Cedex - France
☎/Fax +33 (0)5 49 45 41 21
e-mail : contact@artmolecule.fr – www.artmolecule.fr

Rapport

Préparé pour

BRGM Service MMA

3 avenue Claude Guillemin - 45060 ORLEANS Cedex 2 - France

**Etude de faisabilité de synthèse chimique
de la DIHYDROCHLORDECONE**

Référence de l'étude :

ARTM1003

A – Préambule

1 – Services

Le présent rapport décrit les différents essais et résultat obtenus correspondant à l'étude de faisabilité pour préparer la DIHYDROCHLORDECONE à partir de la KEPONE.

2 – Contacts

BRGM Service MMA
Mme Laurence AMALRIC
3 avenue Claude Guillemin
45060 ORLEANS Cedex 2
☎ +33 (0)2 38 64 34 92
e-mail : l.amalric@brgm.fr

@rtMolecule
Dr. Fabien ZUNINO
☎ +33 (0)5 49 45 41 21
e-mail : fabien.zunino@artmolecule.fr

3 – Historique

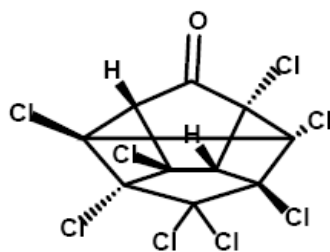
Devis ARTM1003	11/01/2010
Date du bon de commande du BRGM – réf 2010-105789 / 0	23/02/2010
Début de l'étude / @rtMolecule	02/03/2010
Arrêt de l'étude / @rtMolecule	14/04/2010

4 - Références pour cette étude

Etude : **ARTM1003**

Code produit **KZ1002**

5 – Formule de la DIHYDROCHLORDECONE



KZ1002

B – Stratégie de synthèse retenue pour ces essais

@rtMolecule ne disposant pas d'information suffisante pour s'engager directement dans la synthèse de la DIHYDROCHLORDECONE, la stratégie décrite ci-dessous est envisagée pour mener des essais de faisabilité

- Essais préliminaires
 - Réduction photochimique directement à partir de la kepone
- Analyses des bruts réactionnels
 - évaluation de la stabilité à la paillasse du composé obtenu
 - identification par GC-MS (ou LC-MS)
 - évaluation de la méthode de purification

C – Procédures expérimentales

1 – Procédures générales

Les solvants organiques sont achetés anhydres excepté les solvants suivants : Tetrahydrofuranne (THF) et diéthyl ether qui, avant utilisation, sont séchés par distillation sur sodium en présence de benzophénone.

Les réactions sont conduites sous atmosphère inerte (azote).

Les phases organiques obtenues lors des extractions sont séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et le solvant est éliminé sous pression réduite.

L'avancement des réactions est suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) de silice sur aluminium (Merck, 60F₂₅₄). Les plaques CCM sont révélées par fluorescence dans l'ultraviolet (254 nm) ou par trempage dans une solution d'acide phosphomolybdique avant révélation thermique.

Toutes les séparations sont réalisées par flash chromatographie sur gel de silice (Chromagel, Silice 60 ACC, 40-63µm) ou sur Combiflash.

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton et du carbone 13 sont enregistrés respectivement à 400 MHz et 100 MHz sur un spectromètre Bruker UltraShield 400 Mhz NMR en prenant le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne. Les spectres de masse sont réalisés sur un LC/MS Waters 3100 Mass detector.

Pour chaque essai les produits, résidus ou bruts réactionnels sont contrôlés par CCM, ¹H NMR et MS si nécessaire.

Les points de fusion sont déterminés avec un appareil STUART Melting Point Apparatus SMP3.

Les spectres HPLC sont obtenus sur une chaîne HPLC Waters avec un détecteur UV (barrette de diode) et un réfractomètre en série.

2 – Résultats

a – Essais de réduction photochimique de la képone

L'obtention de dihydrochlordécone par réduction directe de la képone est décrite dans la littérature mais le produit, identifié dans un mélange complexe, n'a pas été isolé à l'état pur par les auteurs^{1,2}.

Dans ces mêmes conditions de réduction photochimiques nous n'avons pas pu identifier la dihydrochlordécone dans les mélanges obtenus.

La complexité des bruts réactionnels, nous a conduits à essayer d'autres conditions de réduction pour améliorer la sélectivité de la réaction.

a – Essais de réduction de la képone avec un catalyseur au palladium.

Réf: #RB6-90 et #FB6-254

Pour ce premier essai, le couple réducteur palladium en présence de formiate d'ammonium a été utilisé³

La képone en solution dans le méthanol en présence de Pd/C (10%) et de formiate d'ammonium a été chauffé à 80°C pendant 90 minutes.

Après traitement du brut réactionnel et filtration sur silice, la RMN ainsi que la spectrométrie de masse indiquent la présence des produits de réduction mono et di-hydrogénolysés en mélange d'isomères. Le faible rendement et la complexité de ce brut ne permet pas d'envisager une séparation des différents composés formés.

Un second couple réducteur utilisant le palladium en présence d'un diène fréquemment utilisé⁴ comme réaction d'hydrogénation par transfert catalytique a conduit au même résultat non exploitable. En effet, la képone, en solution dans l'acétonitrile, en présence de Pd/C

¹ Biomedical Mass Spectrometry, vol. 5, N° 3, 1978, pp.232-237

² J. Agr. Food. Chem., Vol. 22, N°3, 1074, pp.442-445

³ Synthesis, N°13, 2003, pp.2023-2026

⁴ Tetrahedron Letters, 51, 2010, pp786-789

(10%) et de cyclohexadiène, après chauffage à 80°C durant une nuit, n'a pas permis d'obtenir le produit désiré.

Nous avons également observé que la fonction cétone de la képone réagit de façon très rapide avec les alcools comme le méthanol pour conduire à l'hémiacétal correspondant.

Ces échecs de réduction sélective nous ont conduit à essayer une lithiation de la képone en vue de faire un échange avec le proton d'un acide de Bronsted.

b – Essai de réduction de la képone à l'aide d'un organolithien.

Réf: #FC2-26

La képone en solution dans du THF anhydre est traitée par du butyllithium à basse température. Le mélange réactionnel est ensuite piégé sur de l'acide acétique.

Dans ces conditions nous obtenons principalement le produit de départ et des produits secondaires en mélange complexe dont la spectrométrie de masse ne permet pas d'identifier la présence de dihydrochlordécone.

3 – Conclusion

Les différentes méthodes de réduction de la képone mises en œuvre dans cette étude de faisabilité pour obtenir la dihydrochlordécone, ne nous ont pas permis de mettre au point une méthode efficace de production. Par conséquent nous ne sommes pas en mesure de vous proposer une étude pour la synthèse de dihydrochlordécone utilisable comme standard analytique.

Annexe 4

Liste des 226 molécules analysées par le LDA



laboratoires

ENVIRONNEMENT – SÉCURITÉ ALIMENTAIRE – AGRICULTURE
 AGRÈMENT DES MINISTÈRES CHARGÉS DE LA SANTÉ, DE L'AGRICULTURE
 ET DU DÉVELOPPEMENT DURABLE – MEMBRE DE AFNOR, RAEMA, AGLAE BIPEA, AGHTM

Nom du point de prelevement:

Dossier n° 227546 Echantillon n° 1677000

Code Sandre	Paramètre	Famille	Méthode	N° CAS	Résultat-unité	SQ(1)
Chlordécone		Nombre de molécules analysées: 2				
6577	Chlordécone 5b hydro (V)	I-Divers	CMO_MT06	53308-47-7	0.040 mg/kg	0.010
1866	Chlordécone (V)	I-Divers	CMO_MT06	143-50-0	1.500 mg/kg	0.010
Pesticides		Nombre de molécules analysées: 226				
1264	I20 2,4,5-T (V)	H-Aryloxyacides	CMO_MT06	93-76-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1141	T23 2,4-D (V)	H-Aryloxyacides	CMO_MT06	94-75-7	< 0.050 mg/kg	0.050
1142	2,4-DB (V)	H-Aryloxyacides	CMO_MT06	94-82-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1212	T23 2,4-MCPA (V)	H-Aryloxyacides	CMO_MT06	94-74-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1213	2,4-MCPB (V)	H-Aryloxyacides	CMO_MT06	94-81-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1903	T3 Acetochlor (V)	H-Amides	CMO_MT06	34256-82-1	< 0.020 mg/kg	0.020
1688	T3 Aclonifen (V)	H-Diphényl éthers	CMO_MT06	74070-46-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1310	Acrinathrine (V)	I-Norpyréthrates	CMO_MT06	101007-06-1	< 0.050 mg/kg	0.050
1101	T13 Alachlore (V)	H-Amides	CMO_MT06	15972-60-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1102	Aldicarbe (V)	I-Carbamates	CMO_MT06	116-06-3	< 0.020 mg/kg	0.020
1103	T1 Aldrine (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MT06	309-00-2	< 0.010 mg/kg	0.010
1697	Allethrine (V)	I-Pyréthroïdes de synthèse	CMO_MT06	584-79-2	< 0.010 mg/kg	0.010
1812	Alphaméthrine (V)	I-Pyréthroïdes de synthèse	CMO_MT06	67375-30-8	< 0.020 mg/kg	0.020
1104	Amétryne (V)	H-Triazines	CMO_MT06	834-12-8	< 0.020 mg/kg	0.020
1308	Amitraze (V)	I-Formamidines	CMO_MT06	33089-61-1	< 0.050 mg/kg	0.050
2013	Anthraquinone (V)	I-Divers	CMO_MT06	84-65-1	< 0.020 mg/kg	0.020
1107	T123 Atrazine (V)	H-Triazines	CMO_MT06	1912-24-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1108	T23 Atrazine déséthyl (V)	H-Triazines	CMO_MT06	6190-65-4	< 0.050 mg/kg	0.050
2015	Azaméthiphos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	35575-96-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1110	Azinphos éthyl (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	2642-71-9	< 0.100 mg/kg	0.100
1111	Azinphos méthyl (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	86-50-0	< 0.100 mg/kg	0.100
1951	T3 Azoxystrobin (V)	F-Strobilurines	CMO_MT06	131860-33-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1113	T2 Bentazone (V)	H-Diazines	CMO_MT06	25057-89-0	< 0.050 mg/kg	0.050
3209	Béta-cyfluthrine (V)	I-Pyréthroïdes de synthèse	CMO_MT06	68359-37-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1119	Bifénox (V)	H-Diphényl éthers	CMO_MT06	42576-02-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1120	Bifentrine (V)	I-Pyréthroïdes de synthèse	CMO_MT06	82657-04-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1502	Bioresméthrine (V)	I-Pyréthroïdes de synthèse	CMO_MT06	28434-01-7	< 0.050 mg/kg	0.050



laboratoires

ENVIRONNEMENT – SÉCURITÉ ALIMENTAIRE – AGRICULTURE
 AGRÈMENT DES MINISTÈRES CHARGÉS DE LA SANTÉ, DE L'AGRICULTURE
 ET DU DÉVELOPPEMENT DURABLE – MEMBRE DE AFNOR, RAEMA, AGLAE BIPEA, ASHTM

Nom du point de prelevement:

Dossier n° 227546 Echantillon n° 1677000

Code	Paramètre	Famille	Méthode	N° CAS	Résultat-unité	SQ(1)
Pesticides						
Nombre de molécules analysées: 226						
1529	Bitertanol (V)	F-Triazoles	CMO_MT06	55179-31-2	< 0.100 mg/kg	0.100
1686	T3 Bromacil (V)	H-Diazines	CMO_MT06	314-40-9	< 0.100 mg/kg	0.100
1123	Bromophos éthyl (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	4824-78-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1124	Bromophos méthyl (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	2104-96-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1685	Bromopropylate (V)	I-Carbinols	CMO_MT06	18181-80-1	< 0.020 mg/kg	0.020
1125	Bromoxynil (V)	H-Benzonitriles	CMO_MT06	1689-84-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1861	Bupirimate (V)	F-Diazines	CMO_MT06	41483-43-6	< 0.020 mg/kg	0.020
1126	Butraline (V)	H-Toluidines	CMO_MT06	33629-47-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1863	Cadusaphos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	95465-99-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1127	Captafol (V)	F-Dicarboximides	CMO_MT06	2425-06-1	< 0.050 mg/kg	0.050
1128	Captane (V)	F-Dicarboximides	CMO_MT06	133-06-2	< 0.050 mg/kg	0.050
1463	Carbaryl (V)	I-Carbamates	CMO_MT06	63-25-2	< 0.050 mg/kg	0.050
1129	T3 Carabendazime (V)	F-Carbamates	CMO_MT06	10605-21-7	< 0.050 mg/kg	0.050
1333	Carbétamide (V)	H-Carbamates	CMO_MT06	16118-49-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1130	T3 Carbofuran (V)	I-Carbamates	CMO_MT06	1563-66-2	< 0.050 mg/kg	0.050
1132	Chlordane (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MT06	57-74-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1756	Chlordane alpha (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MT06	5103-71-9	< 0.020 mg/kg	0.020
1757	Chlordane Béta (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MT06	5103-74-2	< 0.020 mg/kg	0.020
1464	T1 Chlorfenvinphos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	470-90-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1133	Chloridazone (V)	H-Diazines	CMO_MT06	1698-60-8	< 0.100 mg/kg	0.100
1134	T3 Chlorméphos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	24934-91-6	< 0.100 mg/kg	0.100
1473	Chlorothalonil (V)	F-Dérivés du benzène	CMO_MT06	1897-45-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1683	Chloroxuron (V)	H-Urées substituées	CMO_MT06	1982-47-4	< 0.100 mg/kg	0.100
1474	T3 Chlorpropham (V)	H-Carbamates	CMO_MT06	101-21-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1083	T1 Chlorpyriphos éthyl (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	2921-88-2	< 0.020 mg/kg	0.020
1540	T3 Chlorpyriphos méthyl (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	5598-13-0	< 0.020 mg/kg	0.020
1136	T3 Chlortoluron (V)	H-Urées substituées	CMO_MT06	15545-48-9	< 0.100 mg/kg	0.100
2017	T3 Clomazone (V)	H-Isoxazolidines	CMO_MT06	81777-89-1	< 0.050 mg/kg	0.050
1682	Coumaphos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	56-72-4	< 0.050 mg/kg	0.050
1137	Cyanazine (V)	H-Triazines	CMO_MT06	21725-46-2	< 0.050 mg/kg	0.050
1681	Cyfluthrine (V)	I-Pyréthrinoides de synthèse	CMO_MT06	68359-37-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1139	Cymoxanil (V)	F-Amines amides	CMO_MT06	57966-95-7	< 0.050 mg/kg	0.050



Nom du point de prelevement:

Dossier n° 227546 Echantillon n° 1677000

Code Sandre	Paramètre	Famille	Méthode	N° CAS	Résultat-unité	SQ(1)
Pesticides						
Nombre de molécules analysées: 226						
1140	Cyperméthrine (V)	I-Pyréthrioides de synthèse	CMO_MT06	52315-07-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1680	T3 Cyproconazol (V)	F-Triazoles	CMO_MT06	94361-06-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1359	T3 Cyprodinil (V)	F-Anilinoimidopyrimidines	CMO_MT06	121552-61-2	< 0.100 mg/kg	0.100
1143	T1 DDD-2,4' (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MT06	53-19-0	< 0.050 mg/kg	0.050
1144	T1 DDD-4,4' (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MT06	72-54-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1145	T1 DDE-2,4' (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MT06	3424-82-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1146	T1 DDE-4,4' (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MT06	72-55-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1147	T1 DDT-2,4' (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MT06	789-02-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1148	T1 DDT-4,4' (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MT06	50-29-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1149	T3 Deltaméthrine (V)	I-Pyréthrioides de synthèse	CMO_MT06	52918-63-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1156	Diallate (V)	H-Carbamates	CMO_MT06	2303-16-4	< 0.050 mg/kg	0.050
1157	Diazinon (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	333-41-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1480	T3 Dicamba (V)	H-Dérivés de l'acide benzoïque	CMO_MT06	1918-00-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1679	Dichlobenil (V)	H-Benzonitriles	CMO_MT06	1194-65-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1159	Dichlofenthion (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	97-17-6	< 0.020 mg/kg	0.020
1360	Dichlofluanide (V)	F-Sulfamides et dérivés soufrés	CMO_MT06	1085-98-9	< 0.050 mg/kg	0.050
2011	Dichloro benzamide 2,6 (V)	M-Métabolites	CMO_MT06	2008-58-4	< 0.050 mg/kg	0.050
1169	T23 Dichlorprop (V)	H-Aryloxyacides	CMO_MT06	120-36-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1170	T2 Dichlorvos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	62-73-7	< 0.050 mg/kg	0.050
1172	Dicofol (V)	I-Divers	CMO_MT06	115-32-2	< 0.050 mg/kg	0.050
1173	T1 Dieldrine (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MT06	60-57-1	< 0.010 mg/kg	0.010
1402	Diéthofencarbe (V)	F-Carbamates	CMO_MT06	87130-20-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1905	Difénoconazole (V)	F-Hétérocycles soufrés	CMO_MT06	119446-68-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1814	T3 Diflufenicanil (V)	H-Phénoxy nicotinilide	CMO_MT06	83164-33-4	< 0.050 mg/kg	0.050
1678	T3 Diméthénamide (V)	H-Amides	CMO_MT06	87674-68-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1175	Diméthoate (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	60-51-5	< 0.100 mg/kg	0.100
1403	T3 Diméthomorphe (V)	F-Morpholines	CMO_MT06	110488-70-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1490	DiNitroOrthoCrésol (DNOC) (V)	H-Dinitrophénols	CMO_MT06	534-52-1	< 0.050 mg/kg	0.050
5619	Dinocap (V)	F-Dérivés du phénol	CMO_MT06	39300-45-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1491	Dinosébe (V)	H-Dinitrophénols	CMO_MT06	88-85-7	< 0.050 mg/kg	0.050
1176	Dinoterbe (V)	H-Dinitrophénols	CMO_MT06	1420-07-1	< 0.050 mg/kg	0.050



Nom du point de prelevement:

Dossier n° 227546 Echantillon n° 1677000

Code Sandre	Paramètre	Famille	Méthode	N° CAS	Résultat-unité	SQ(1)
Pesticides		Nombre de molécules analysées: 226				
1492	Disulfoton (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	298-04-4	< 0.050 mg/kg	0.050
1966	Dithianon (V)	F-Divers	CMO_MTO6	3347-22-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1177	T1 Diuron (V)	H-Urées substituées	CMO_MTO6	330-54-1	< 0.050 mg/kg	0.050
1178	T123 Endosulfan Alpha (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	959-98-8	< 0.020 mg/kg	0.020
1179	T123 Endosulfan Béta (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	33213-65-9	< 0.020 mg/kg	0.020
1742	T123 Endosulfan Sulfate (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	1031-07-8	< 0.020 mg/kg	0.020
1181	T1 Endrine (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	72-20-8	< 0.010 mg/kg	0.010
1744	T3 Epoxyconazole (V)	F-Triazoles	CMO_MTO6	106325-08-0	< 0.050 mg/kg	0.050
1809	Esfenvalérate (V)	I-Pyréthriinoïdes de synthèse	CMO_MTO6	66230-04-4	< 0.040 mg/kg	0.040
1183	Ethion (Diethion) (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	563-12-2	< 0.020 mg/kg	0.020
1184	T3 Ethofumésate (V)	H-Dérivés du benzofuranne	CMO_MTO6	26225-79-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1495	Ethoprophos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	13194-48-4	< 0.050 mg/kg	0.050
2057	Fénamidone (V)	F-Divers	CMO_MTO6	161326-34-7	< 0.050 mg/kg	0.050
1185	Fénarimol (V)	F-Diazines	CMO_MTO6	60168-88-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1906	Fenbuconazole (V)	F-Triazoles	CMO_MTO6	114369-43-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1187	T23 Fénitrothion (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	122-14-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1967	T3 Fénoxycarbe (V)	I-Carbamates	CMO_MTO6	79127-80-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1188	Fenpropathrine (V)	I-Pyréthriinoïdes de synthèse	CMO_MTO6	64257-84-7	< 0.020 mg/kg	0.020
1190	Fenthion (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	55-38-9	< 0.050 mg/kg	0.050
2009	Fipronil (V)	I-Phénylpyrazoles	CMO_MTO6	1200068-37-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1939	Flazasulfuron (V)	H-Sulfonylurées	CMO_MTO6	104040-78-0	< 0.100 mg/kg	0.100
2022	T3 Fludioxonil (V)	F-Phénylpyrroles	CMO_MTO6	131341-86-1	< 0.100 mg/kg	0.100
1676	Flufénoxuron (V)	I-Acyl urées	CMO_MTO6	101463-69-8	< 0.050 mg/kg	0.050
2023	Flumioxazine (V)	H-N-phénylimides	CMO_MTO6	103361-09-7	< 0.050 mg/kg	0.050
2056	Fluquinconazole (V)	F-Triazoles	CMO_MTO6	114369-43-6	< 0.010 mg/kg	0.010
1675	Flurochloridone (V)	H-Pyrolidones	CMO_MTO6	61213-25-0	< 0.050 mg/kg	0.050
2008	Flurtamone (V)	H-Furanones	CMO_MTO6	96525-23-4	< 0.050 mg/kg	0.050
1194	T3 Flusilazole (V)	F-Triazoles	CMO_MTO6	85509-19-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1503	Flutriafol (V)	F-Triazoles	CMO_MTO6	76674-21-0	< 0.050 mg/kg	0.050
1192	Folpel (V)	F-Dicarboximides	CMO_MTO6	133-07-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1674	Fonofos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	944-22-9	< 0.020 mg/kg	0.020
2046	T1 HCH epsilon (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	6108-10-7	< 0.010 mg/kg	0.010



ENVIRONNEMENT – SÉCURITÉ ALIMENTAIRE – AGRICULTURE
 AGRÈMENT DES MINISTÈRES CHARGÉS DE LA SANTÉ, DE L'AGRICULTURE
 ET DU DÉVELOPPEMENT DURABLE – MEMBRE DE AFNOR, RAEMA, AGLAE BIPEA, AGHTM

Nom du point de prelevement:

Dossier n° 227546 Echantillon n° 1677000

Code Sandre	Paramètre	Famille	Méthode	N° CAS	Résultat-unité	SQ(1)
Pesticides		Nombre de molécules analysées: 226				
1203	T1 HCH Gamma (Lindane) (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	58-89-9	< 0.010 mg/kg	0.010
1200	T1 HCH Alpha (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	319-84-6	< 0.010 mg/kg	0.010
1201	T1 HCH Beta (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	319-85-7	< 0.010 mg/kg	0.010
1202	T1 HCH Delta (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	319-86-8	< 0.010 mg/kg	0.010
1197	Heptachlore (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	76-44-8	< 0.010 mg/kg	0.010
1198	Heptachlore époxyde (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	1024-57-3	< 0.010 mg/kg	0.010
1199	Hexachlorobenzène (*) (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	118-74-1	< 0.010 mg/kg	0.010
1405	T3 Hexaconazole (V)	F-Triazoles	CMO_MTO6	79983-71-4	< 0.050 mg/kg	0.050
1673	Hexazinone (V)	H-Triazinones	CMO_MTO6	51235-04-2	< 0.050 mg/kg	0.050
1911	Imazamétabenz-méthyl (V)	F-Imidazoles	CMO_MTO6	81405-85-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1877	T3 Imidaclopride (V)	I-Chloronicotines	CMO_MTO6	138261-41-3	< 0.050 mg/kg	0.050
5483	Indoxacarbe (V)	I-Divers	CMO_MTO6	173584-44-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1205	Ioxynil (V)	H-Benzonitriles	CMO_MTO6	1689-83-4	< 0.050 mg/kg	0.050
1206	T3 Iprodione (V)	F-Divers	CMO_MTO6	36734-19-7	< 0.020 mg/kg	0.020
1976	Isazofos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	42509-80-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1207	T1 Isodrine (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	465-73-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1208	T1 Isoproturon (V)	H-Urées substituées	CMO_MTO6	34123-59-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1672	Isoxaben (V)	H-Benzamides	CMO_MTO6	82558-50-7	< 0.050 mg/kg	0.050
1945	Isoxaflutole (V)	H-Isoxazoles	CMO_MTO6	14112-29-0	< 0.050 mg/kg	0.050
1950	T3 Kresoxim méthyl (V)	F-Strobilurines	CMO_MTO6	143390-89-0	< 0.050 mg/kg	0.050
1094	Lambda cyhalothrine (V)	I-Pyréthrinoïdes de synthèse	CMO_MTO6	91465-08-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1406	Lénacile (V)	H-Diazines	CMO_MTO6	2164-08-1	< 0.100 mg/kg	0.100
1209	T23 Linuron (V)	H-Urées substituées	CMO_MTO6	330-55-2	< 0.100 mg/kg	0.100
2026	Lufénuron (V)	I-Benzoyl urées	CMO_MTO6	103055-07-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1210	T23 Malathion (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	121-75-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1214	T23 Mecoprop (MCP) (V)	H-Aryloxyacides	CMO_MTO6	7085-19-0	< 0.100 mg/kg	0.100
1510	Mercaptodiméthur (V)	F-Dérivés du benzène	CMO_MTO6	2032-65-7	< 0.100 mg/kg	0.100
1706	T3 Métalaxyle (V)	F-Amines amides	CMO_MTO6	57837-19-1	< 0.050 mg/kg	0.050
1670	Métazachlore (V)	H-Amides	CMO_MTO6	67129-08-2	< 0.100 mg/kg	0.100
1217	Méthidathion (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	950-37-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1511	Méthoxychlore (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MTO6	72-43-5	< 0.020 mg/kg	0.020
1221	Métolachlore (R+S) (V)	H-Amides	CMO_MTO6	51218-45-2	< 0.050 mg/kg	0.050
1797	Metsulfuron méthyl (V)	H-Sulfonylurées	CMO_MTO6	74223-64-6	< 0.100 mg/kg	0.100



laboratoires

ENVIRONNEMENT – SÉCURITÉ ALIMENTAIRE – AGRICULTURE
 AGRÈMENT DES MINISTÈRES CHARGÉS DE LA SANTÉ, DE L'AGRICULTURE
 ET DU DÉVELOPPEMENT DURABLE – MEMBRE DE AFNOR, RAEMA, AGLAE BIPEA, AGHTM

Nom du point de prelevement:

Dossier n° 227546 Echantillon n° 1677000

Code Sandre	Paramètre	Famille	Méthode	N° CAS	Résultat-unité	SQ(1)
Pesticides						
Nombre de molécules analysées: 226						
1226	Mévinphos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	7786-34-7	< 0.100 mg/kg	0.100
5438	Mirex (V)	I-Organo-chlorés	CMO_MT06	2385-85-5	< 0.020 mg/kg	0.020
1227	T23 Monolinuron (V)	H-Urées substituées	CMO_MT06	1746-81-2	< 0.100 mg/kg	0.100
1228	Monuron (V)	H-Urées substituées	CMO_MT06	150-68-5	< 0.100 mg/kg	0.100
1881	Myclobutanyl (V)	F-Triazoles	CMO_MT06	88671-89-0	< 0.050 mg/kg	0.050
1516	Naled (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	300-76-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1519	T3 Napropamide (V)	H-Amides	CMO_MT06	15299-99-7	< 0.050 mg/kg	0.050
1669	T3 Norflurazon (V)	H-Diazines	CMO_MT06	27314-13-2	< 0.050 mg/kg	0.050
2737	Nor flurazon desméthyl (V)	H-Divers	CMO_MT06	23576-24-1	< 0.050 mg/kg	0.050
1668	Oryzalin (V)	H-Toluidines	CMO_MT06	19044-88-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1667	T3 Oxadiazon (V)	H-Dérivés de oxadiazole	CMO_MT06	19666-30-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1666	T3 Oxadixyl (V)	F-Amines amides	CMO_MT06	77732-09-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1232	Parathion éthyl (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	56-38-2	< 0.040 mg/kg	0.040
1233	Parathion méthyl (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	298-00-0	< 0.040 mg/kg	0.040
1762	Penconazole (V)	F-Triazoles	CMO_MT06	66246-88-6	< 0.020 mg/kg	0.020
1234	Pendimethaline (V)	H-Toluidines	CMO_MT06	40487-42-1	< 0.050 mg/kg	0.050
1235	T1 Pentachlorophéno (V)	H-Triazolines	CMO_MT06	87-86-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1888	T1 Pentachlorobenzène (V)	F-Dérivés du benzène	CMO_MT06	608-93-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1523	Perméthrine (V)	I-Pyréthrinoides de synthèse	CMO_MT06	52645-53-1	< 0.050 mg/kg	0.050
1525	Phorate (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	298-02-2	< 0.050 mg/kg	0.050
1237	Phosalone (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	2310-17-0	< 0.040 mg/kg	0.040
1971	Phosmet (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	732-11-6	< 0.020 mg/kg	0.020
1238	Phosphamidon (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	13171-21-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1665	T23 Phoxime (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	14816-18-3	< 0.100 mg/kg	0.100
1709	Piperonyl butoxide (V)	I-Divers	CMO_MT06	51-03-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1528	Pirimicarbe (V)	I-Carbamates	CMO_MT06	23103-98-2	< 0.050 mg/kg	0.050
1253	Prochloraze (V)	F-Imidazoles	CMO_MT06	67747-09-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1664	T3 Procymidone (V)	F-Dicarboximides	CMO_MT06	32809-16-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1710	Promecarbe (V)	I-Carbamates	CMO_MT06	28916-00-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1532	Propanil (V)	H-Amides	CMO_MT06	709-98-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1255	Propargite (V)	I-Sulfones et sulfonates	CMO_MT06	2312-35-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1256	Propazine (V)	H-Triazines	CMO_MT06	139-40-2	< 0.050 mg/kg	0.050
1533	Propétamphos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MT06	31218-83-4	< 0.050 mg/kg	0.050

Page 8 sur 10

HYDROCHEMPO_2 Rev 181110



laboratoires

ENVIRONNEMENT – SÉCURITÉ ALIMENTAIRE – AGRICULTURE
 AGRÈMENT DES MINISTÈRES CHARGÉS DE LA SANTÉ, DE L'AGRICULTURE
 ET DU DÉVELOPPEMENT DURABLE – MEMBRE DE AFNOR, RAEMA, AGLAE BIPEA, AGHTM

Nom du point de prelevement:

Dossier n° 227546 Echantillon n° 1677000

Code Sandre	Paramètre	Famille	Méthode	N° CAS	Résultat-unité	SQ(1)
Pesticides		Nombre de molécules analysées: 226				
1889	Prophénophos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	41138-08-7	< 0.050 mg/kg	0.050
1257	Propiconazole (V)	F-Triazoles	CMO_MTO6	60207-90-1	< 0.050 mg/kg	0.050
1535	Propoxur (V)	I-Carbamates	CMO_MTO6	114-26-1	< 0.100 mg/kg	0.100
1414	T3 Propyzamide (V)	H-Amides	CMO_MTO6	23950-58-5	< 0.050 mg/kg	0.050
1258	Pyrazophos (V)	F-Diazines	CMO_MTO6	13457-18-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1890	Pyridabène (V)	I-Acaricides	CMO_MTO6	96489-71-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1663	Pyrifénox (V)	F-Divers	CMO_MTO6	88283-41-4	< 0.100 mg/kg	0.100
1432	T3 Pyriméthanol (V)	F-Anilino-pyrimidines	CMO_MTO6	53112-28-0	< 0.050 mg/kg	0.050
1260	Pyrimiphos éthyl (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	23505-41-1	< 0.050 mg/kg	0.050
1261	Pyrimiphos méthyl (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	29232-93-7	< 0.050 mg/kg	0.050
1891	Quinalphos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	13593-03-8	< 0.050 mg/kg	0.050
2028	Quinoxifen (V)	F-Phénoxyquinoléines	CMO_MTO6	124495-18-7	< 0.050 mg/kg	0.050
1538	Quintozène (V)	F-Dérivés du benzène	CMO_MTO6	82-68-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1262	Secbuméton (V)	H-Triazines	CMO_MTO6	26259-45-0	< 0.050 mg/kg	0.050
1263	TI23 Simazine (V)	H-Triazines	CMO_MTO6	122-34-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1662	T3 Sulcotrione (V)	H-Tricétones	CMO_MTO6	99105-77-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1193	Tau-fluvalinate (V)	I-Pyréthroïdes de synthèse	CMO_MTO6	102851-06-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1694	T3 Tébuconazole (V)	F-Triazoles	CMO_MTO6	107534-96-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1895	Tébufénozide (V)	I-Benzhydrazides	CMO_MTO6	112410-23-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1896	Tébufenpyrad (V)	I-Acaricides	CMO_MTO6	119168-77-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1661	T3 Tébutame (V)	H-Amides	CMO_MTO6	35256-85-0	< 0.050 mg/kg	0.050
1897	Téflubenzuron (V)	I-Benzhydrazides	CMO_MTO6	83121-18-0	< 0.050 mg/kg	0.050
1898	Teméphos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	3383-96-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1659	Terbacile (V)	H-Diazines	CMO_MTO6	5902-51-2	< 0.050 mg/kg	0.050
1267	Terbuphos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	13071-79-9	< 0.050 mg/kg	0.050
1269	T3 Terbutryne (V)	H-Triazines	CMO_MTO6	886-50-0	< 0.050 mg/kg	0.050
1266	Terbuméton (V)	H-Triazines	CMO_MTO6	33693-04-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1268	T3 Terbutylazine (V)	H-Triazines	CMO_MTO6	5915-41-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1660	T3 Tétraconazole (V)	F-Triazoles	CMO_MTO6	112281-77-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1713	Thiabendazole (V)	F-Carbamates	CMO_MTO6	148-79-8	< 0.050 mg/kg	0.050
1093	Thiodicarbe (V)	I-Carbamates	CMO_MTO6	59669-26-0	< 0.050 mg/kg	0.050
1719	Tolylfluanide (V)	F-Sulfamides et dérivés soufrés	CMO_MTO6	731-27-1	< 0.050 mg/kg	0.050



ENVIRONNEMENT – SÉCURITÉ ALIMENTAIRE – AGRICULTURE
 AGRÈMENT DES MINISTÈRES CHARGÉS DE LA SANTÉ, DE L'AGRICULTURE
 ET DU DÉVELOPPEMENT DURABLE – MEMBRE DE AFNOR, RAEMA, AGLAE BIPEA, AGHTM

Nom du point de prelevement:

Dossier n° **227546** Echantillon n° **1677000**

Code Sandre	Paramètre	Famille	Méthode	N° CAS	Résultat-unité	SQ(1)
Pesticides		Nombre de molécules analysées: 226				
1658	Tralomethrine (V)	I-Pyréthrinoïdes de synthèse	CMO_MTO6	66841-25-6	< 0.050 mg/kg	0.050
1544	Triadimefon (V)	F-Triazoles	CMO_MTO6	43121-43-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1657	Triazophos (V)	I-Organo-phosphorés	CMO_MTO6	24017-47-8	< 0.100 mg/kg	0.100
1288	T3 Triclopyr (V)	H-Dérivés picoliniques	CMO_MTO6	55335-06-3	< 0.050 mg/kg	0.050
1289	T123 Trifluraline (V)	H-Toluidines	CMO_MTO6	1582-09-8	< 0.020 mg/kg	0.020
1291	Vinchlozoline (V)	F-Bicarboximides	CMO_MTO6	50471-44-8	< 0.020 mg/kg	0.020

Les résultats et commentaires ne concernent que l'échantillon soumis à l'analyse. Les incertitudes de mesure sont disponibles sur demande. La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous sa forme intégrale.

L'accréditation atteste de la compétence du laboratoire pour les seuls essais couverts par l'accréditation qui sont identifiés par une étoile :(*)

Pour déclarer ou non la conformité à la spécification, il n'a pas été tenu compte de l'incertitude associée au résultat

SQ(1): seuil de quantification-ND:non déterminé. CMA:Concentration maximum admissible pour la matrice prélevée.

(3): les commentaires et observations ne font pas partie de la portée d'accréditation.

(U): analyse réalisée dans l'antenne de UCEL: Laboratoire d'Analyses des Eaux de l'Ardèche;(V): analyse réalisée dans l'antenne de Valence

Analyse prise en charge par: BRGM ORLEANS

Analyse demandée par: BRGM ORLEANS

Autres destinataires:

Fin du rapport n° 1677000

Annexe 5

Compositions des milieux de culture

- **Dénombrement des bactéries anaérobies**

Milieu de dilution (g/L)

K ₂ HPO ₄	6,5 g
KH ₂ PO ₄	3,5 g
Na ₂ CO ₃	0,5 g
Cysteine-HCl, H ₂ O	0,5 g
Résazurine	1 mL solution stock 0,1%
Eau déminéralisée	1 000 mL

Le pH du milieu de dilution est ajusté à 6,9. Dans des flacons à plasma, sont ajoutés 90 mL (dilutions 10⁻¹ et 10⁻²) ou 18mL dans des flacons à pénicilline (dilutions 10⁻³ à 10⁻⁶) de solution saline et un bullage à l'N₂ est réalisé. Les flacons sont ensuite stérilisés par autoclavage 20 min à 120°C.

Milieu de culture (g/L)

Tryptic Soy Broth	30 g
Solution saline	1 000 mL

Solution saline (g/L)

K ₂ HPO ₄	0,56 g
KH ₂ PO ₄	0,33 g
Na ₂ CO ₃	0,22 g
Cysteine-HCl, H ₂ O	0,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,11 g
NaCl	0,53 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,22 g
FeCl ₃	0,005 g
Eau déminéralisée	1 000 mL

Le milieu de culture est réparti dans les tubes de Hungate à raison de 10 mL / tube. Un bullage sous N₂ est réalisé dans chacun des tubes. Les tubes sont stérilisés par autoclavage 20 min à 120°C.

- **Dénombrement des bactéries aérobies**

Milieu de dilution (pyrophosphate de sodium 0,1%) (3,7 mM)

Na ₄ P ₂ O ₇	1 g
Eau déminéralisée	1 000 mL

Le milieu de dilution est ajusté à pH 7,0.

Milieu de culture (g/L)

Tryptic Soy Broth	30 g
Eau déminéralisée	1 000 mL

- **Dénombrement des bactéries ferri-réductrices**

Milieu de culture

Solution de vitamines	10 mL
Solution oligo-éléments	10 mL
Lactate de Na	10 mM
Acétate de Na	10 mM
Formate de Na	10 mM
Glucose	10 mM
Na molybdate	0,4 mM
Eau	1 000 mL

Les solutions de lactate, d'acétate, de formate, de glucose, d'oligo-éléments et de molybdate de Na sont stérilisées par filtration (0,2µm) dans des flacons stérile puis purgés à l' N_2 stérile. Le milieu de culture est réparti à raison de 10 mL/tube dans des tubes de Hungate. Un bullage à l' N_2 stérile est réalisé dans chacun des tubes.

Le Fe(III)-NTA est l'accepteur d'électron et le molybdate de Na est un inhibiteur des BSR (Bactéries Sulfato-Réductrices).

Solution de vitamines

Biotine	2 mg
Acide folique	2 mg
Pyrodoxine HCl	10 mg
Riboflavine	5 mg
Thiamine	5 mg
Acide nicotinique	5 mg
Acide pantothénique	5 mg
Vitamine B12	0,1 g
Acide p-aminobenzoïque	5 mg
Acide thiotique	5 mg
Eau déminéralisée	1 000 mL

La solution est stérilisée par filtration à 0,2 µm dans un flacon stérile puis purgés à l' N_2 stérile.

Solution d'oligo-éléments

Na ₃ NTA	1,5 g
KH ₂ PO ₄	0,33 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
MnSO ₄ , H ₂ O	0,5 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,1 g
ZnCl ₂	0,13 g
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,1 g
AlK(SO ₄) ₂ , 12H ₂ O	0,1 g
H ₃ BO ₃	0,1 g
NiCl ₂ , 6 H ₂ O	0,24 g
Na ₂ WO ₄ , 2 H ₂ O	0,25 g
NaHCO ₃	2,5 g

KCl	0,1 g
NH ₄ Cl	0,25 g
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	0,6 g
Eau déminéralisée	1 000 mL

La solution est stérilisée par filtration à 0,2 µm dans un flacon stérile puis purgée à l'N₂ stérile. A la solution déjà prête, il faut rajouter le Na₂WO₄, 2 H₂O.

Solution stock de Fe(III)-NTA 100 mM

1,64 g de NaHCO₃ sont à dissoudre dans 80 mL d'eau MilliQ dégazée. 2,56 g de C₆H₆NO₆Na₃ (Na NTA) et 2,7 g de FeCl₃, 6H₂O sont ensuite ajoutés à la solution précédente. Le volume est ajusté à 100 mL. Le pH final de la solution est de 6,8. Le flacon est purgé à l'N₂. La solution stock est stérilisée par filtration dans une bouteille stérile.

- **Activité potentielle sulfato-réductrice**

Milieu de culture

Solution de vitamines	10 mL
Solution oligo-éléments	10 mL
Lactate de Na	10 mM
Acétate de Na	10 mM
Formate de Na	10 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	10 mM
Eau	1 000 mL

Les solutions de lactate, d'acétate, de formate sont stérilisées par filtration (0,2µm) dans des flacons stérile puis purgées à l'N₂ stérile.

Solution de vitamines

Biotine	2 mg
Acide folique	2 mg
Pyrodoxine HCl	10 mg
Riboflavine	5 mg
Thiamine	5 mg
Acide nicotinique	5 mg
Acide pantothénique	5 mg
Vitamine B12	0,1 g
Acide p-aminobenzoïque	5 mg
Acide thiotique	5 mg
Eau déminéralisée	1 000 mL

La solution est stérilisée par filtration à 0,2 µm dans un flacon stérile puis purgée à l'N₂ stérile.

Solution d'oligo-éléments

Na ₃ NTA	1,5 g
KH ₂ PO ₄	0,33 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
MnSO ₄ , H ₂ O	0,5 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,1 g
ZnCl ₂	0,13 g
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,1 g
AlK(SO ₄) ₂ , 12H ₂ O	0,1 g
H ₃ BO ₃	0,1 g
Na ₂ MoO ₄	0,25 g
NiCl ₂ , 6 H ₂ O	0,24 g
Na ₂ WO ₄ , 2 H ₂ O	0,25 g
NaHCO ₃	2,5 g
KCl	0,1 g
NH ₄ Cl	0,25 g
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	0,6 g
Eau déminéralisée	1 000 mL

La solution est stérilisée par filtration à 0,2 µm dans un flacon stérile puis purgée à l'N₂ stérile.

- **Activité potentielle ferri-réductrice**

Milieu de culture

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Extrait de levure	0,15 g
Glucose	10 g
Fe(III)-NTA	10 mM
Eau qsp	1 000 mL

Annexe 6

Dosage colorimétrique du Fe(II)

- **Préparation des solutions**

Tampon acétique 0,1 M (pH 4,5)

Dans une fiole jaugée de 1 litre, 8,2 g d'acétate de Na sont ajoutés ainsi que 990 mL d'eau déminéralisée. Le pH de la solution est ajusté à 4,5 par ajout d'acide acétique 100 %. Le volume est ajusté à 1 000 mL avec de l'eau déminéralisée.

Solution d'ortho-phénanthroline 0,5%

Dans une fiole jaugée de 100 mL, 0,5 g de phénanthroline sont dissous dans 50 mL de tampon acétique à l'aide de quelques gouttes d'HCL concentré. Le volume est complété à 100 mL avec de l'eau déminéralisée.

Préparation de la gamme étalon

La gamme étalon comprend 6 points et est réalisée dans des fioles jaugées de 25 mL : 0 à 5 mg/L Fe(II).

Etalon	Unité	0	1	2	3	4	5
Tampon acétique	mL	5	5	5	5	5	5
Phénanthroline	mL	1	1	1	1	1	1
Solution de Fe(II) 25mg/L	mL	0	1	2	3	4	5
Mélanger et laisser apparaître la coloration pendant 15 minutes							
Tampon acétique	mL	10	10	10	10	10	10
Eau déminéralisée	mL	Qsp 25 mL					

Pour l'échantillon à analyser :

Tampon acétique	mL	5
Phénanthroline	mL	1
Prise d'échantillon	mL	Volume < 9mL en fonction de la dilution souhaitée
Mélanger et laisser apparaître la coloration pendant 15 minutes		
Tampon acétique	mL	10
Eau déminéralisée	mL	Qsp 25 mL

La densité optique est mesurée dans des cuves de 1 mm à usage unique en plastique à 510 nm (spectrophotomètre HP 854).



Centre scientifique et technique
Service environnement industriel et procédés innovants
3, avenue Claude-Guillemin
BP 36009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 02 38 64 34 34