

— RAPPORT FINAL —  
*Version finale*

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE D'ÉVALUATION DE LA MOBILITÉ ET DE LA  
BIODISPONIBILITÉ DES ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES D'UN SOL

*préparé pour :*

PROGRAMME D'AIDE À LA RECHERCHE ET AU DÉVELOPPEMENT EN  
ENVIRONNEMENT (PARDE)

*par :*

Pr Louise Deschênes, Ph.D.  
Raynald Chassé, Ph.D.\*  
Marcel Giroux, M.Sc.†  
Christian Bastien, M.Sc.\*  
Lucie Jean, B. Sc.  
Valérie Bécaert, ing. stag., Ph.D.  
Geneviève Martineau, ing., M.Sc.A.  
Gérald Côté, M.Sc.\*

Chaire industrielle en assainissement et gestion des sites  
Département de génie chimique  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL  
C.P. 6079, succursale Centre-Ville  
Montréal (Québec) H3C 3A7

\* CENTRE D'EXPERTISE ET D'ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC (CEAEQ)  
Complexe Scientifique  
2700, rue Einstein, bureau E-2-220  
Sainte-Foy (Québec) G1P 3W8

† INSTITUT DE RECHERCHE ET DE DÉVELOPPEMENT EN AGROENVIRONNEMENT INC (IRDA)  
Complexe scientifique  
2700, rue Einstein, bureau B-1-205  
Sainte-Foy (Québec) G1P 3W8

Mars 2006

---

Pr Louise Deschênes, Ph.D.  
Directrice du projet



## RÉSUMÉ

En accord avec la convention de contribution financière conclue avec le PARDE, ce rapport fait état du résultat des travaux réalisés dans ce projet de développement d'une méthode d'évaluation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments traces métalliques (ÉTM) dans un sol et de sa validation partielle. Ce rapport présente donc un résumé des résultats qui ont fait l'objet des rapports d'étape 1 et 2 déposés en décembre 2003 et décembre 2004 ainsi que les résultats des travaux qui ont été réalisés pour compléter le projet.

Les travaux de la première phase de développement ont été réalisés sur des échantillons de sol auxquels a été ajoutée une concentration connue de cuivre afin de maîtriser le maximum de facteurs dans le but d'établir adéquatement les limites analytiques des méthodes mises à l'épreuve. Les activités prévues à cette phase ont toutes été réalisées selon le devis initial.

Les travaux de la seconde phase de validation ont eu pour objectif de relativiser l'information obtenue par les outils développés à la phase 1 en fonction notamment de l'âge de la contamination. Ainsi, dans une première étape, la sensibilité et la précision des outils qui ont été développés ou testés ont été évaluées en modifiant les conditions environnementales des sols à l'étude par l'apport de matières exogènes plus ou moins chargées en ÉTM. Dans une seconde étape, la validation fait intervenir des échantillons de sols prélevés dans le milieu et ayant reçu des apports en ÉTM depuis de nombreuses années.



# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES ACRONYMES ET SYMBOLES.....	XV
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 PROBLÉMATIQUE.....	1
1.2 OBJECTIFS.....	3
1.3 DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL.....	3
<b>2. PHASE 1 - DÉVELOPPEMENT.....</b>	<b>5</b>
2.1 DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE MESURE DE LA MOBILITÉ DES ÉTM.....	5
2.1.1 <i>Comparaison des méthodes d'extraction chimique des ÉTM dans les sols.....</i>	<i>5</i>
2.1.1.1 Méthodologie de mesure des ÉTM dans les sols.....	5
2.1.1.2 Mesure des ÉTM dans les sols avec les membranes échangeuses d'ions.....	6
2.1.1.3 Méthodologie de détermination des ÉTM avec les MEI.....	6
2.1.1.4 Résultats du cuivre.....	7
2.1.1.5 Résultats du zinc.....	12
2.1.1.6 Résultats du manganèse.....	16
2.1.1.7 Résultats du cadmium.....	19
2.1.1.8 Résultats du plomb.....	22
2.1.1.9 Résultats du Nickel.....	25
2.1.1.10 Résultats du Chrome.....	28
2.1.1.11 Résultats du Cobalt.....	31
2.1.1.12 Conclusions.....	35
2.1.2 <i>Mesure des transferts des ÉTM in situ.....</i>	<i>35</i>
2.1.2.1 Méthodologie de mesure des transferts des ÉTM in situ.....	35
2.1.2.2 Concentrations et charges en ÉTM.....	38
2.1.2.3 Bilan des ÉTM.....	38
2.1.2.4 Analyse des ÉTM des sols.....	42
2.1.3 <i>Essais en serre.....</i>	<i>47</i>
2.1.3.1 Méthodologie des essais avec le dactyle pelotonné.....	48
2.1.3.2 Résultats de corrélation entre la concentration dans les tissus, les prélèvements du dactyle pelotonné et les analyses chimiques.....	48
2.1.3.3 Conclusions.....	50
2.2 DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE MESURE DE LA BIODISPONIBILITÉ DES ÉTM.....	51
2.2.1 <i>Mesure de la stabilité des fonctions enzymatiques d'un sol.....</i>	<i>51</i>
2.2.1.1 Choix des enzymes.....	53
2.2.1.2 Méthodologie - Caractérisation des différents sols.....	55
2.2.1.3 Méthodologie - Suivi de la biodiversité génétique et de la densité microbienne.....	56
2.2.1.4 Méthodologie - Mode de perturbation de la flore.....	57
2.2.1.5 Présentation de la méthode de mesure RSSI.....	59
2.2.1.6 RSSI simplifié.....	60
2.2.1.7 Résultats- Caractérisation des différents sols.....	62
2.2.1.8 Mise au point de la méthode.....	66
2.2.1.9 Application de la méthode à des sols contaminés.....	72
2.2.2 <i>Mesure de la biodisponibilité des contaminants à l'aide de tests de toxicité en laboratoire.....</i>	<i>85</i>
2.2.2.1 Choix des tests de toxicité.....	86
2.2.2.2 Développement des tests de toxicité - Méthodologie.....	89

2.2.2.3	Tests de toxicité utilisés.....	91
2.2.2.4	Sols à l'essai .....	93
2.2.2.5	Analyses physico-chimiques.....	94
2.2.2.6	Résultats des analyses physico-chimiques des loams .....	94
2.2.2.7	Tests de toxicité avec le ver de terre.....	95
2.2.2.8	Tests de toxicité avec l'orge .....	97
2.2.2.9	Tests de toxicité avec la daphnie .....	98
2.2.2.10	Conclusion.....	99
<b>3.</b>	<b>ÉLABORATION DE LA MÉTHODE D'ÉVALUATION .....</b>	<b>101</b>
<b>4.</b>	<b>PHASE 2-VALIDATION.....</b>	<b>104</b>
4.1	SOLS CONTAMINÉS PAR DES AMENDEMENTS EN LABORATOIRE.....	104
4.1.1	<i>Caractérisation chimique des sols amendés avec des matières exogènes .....</i>	<i>104</i>
4.1.2	<i>Tests de toxicité des sols amendés en matières exogènes .....</i>	<i>109</i>
4.1.2.1	Test de toxicité avec le ver de terre .....	109
4.1.2.2	Tests de toxicité avec l'orge .....	110
4.1.2.3	Tests de toxicité avec la daphnie .....	111
4.1.3	<i>Essais enzymatiques du sol loam amendés avec les matières exogènes .....</i>	<i>112</i>
4.1.3.1	Impact d'une perturbation sur les enzymes du sol loam amendé en matières exogènes .....	112
4.1.3.2	Impact de la perturbation sur la flore microbienne du sol loam amendé en matières exogènes.....	113
4.2	SOLS CONTAMINÉS PAR DES AMENDEMENTS SUR LE TERRAIN (VIEILLISSEMENT DE LA CONTAMINATION).....	116
4.2.1	<i>Validation de la méthode de mesure chimique de la mobilité des ÉTM .....</i>	<i>116</i>
4.2.1.1	Intérêt de tester la méthode sur des sols in situ .....	116
4.2.1.2	Historique et caractéristiques des sols étudiés .....	116
4.2.1.3	Mesures de mobilités des ÉTM dans les sols amendés .....	117
4.2.2	<i>Validation des critères d'interprétation pour Cu et Zn labiles.....</i>	<i>118</i>
4.2.2.1	Validation de la procédure analytique (première étape) .....	119
4.2.2.2	Validation de la procédure analytique (deuxième étape).....	123
4.2.2.3	Validation de la procédure analytique (troisième étape).....	129
<b>5.</b>	<b>CONCLUSION - MÉTHODE D'ÉVALUATION DE LA MOBILITÉ ET DE LA BIODISPONIBILITÉ DES ÉTM D'UN SOL.....</b>	<b>135</b>
<b>6.</b>	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>137</b>
	<b>ANNEXE A : ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DE 64 SOLS .....</b>	<b>1</b>
	<b>ANNEXE B : BILAN DES ÉTM.....</b>	<b>1</b>
<b>7.</b>	<b>.....</b>	<b>1</b>
7.1.1.1	Charges en ÉTM provenant des engrais minéraux et des engrais de ferme .....	4
7.1.1.2	Concentrations et exportations des ÉTM par les récoltes .....	7
7.1.1.3	Concentrations et charges en ÉTM des eaux de drainage .....	9
7.1.1.4	Concentrations et charges en ÉTM des eaux de ruissellement.....	17
	<b>ANNEXE C : PROTOCOLES ASSOCIÉS AUX ESSAIS ENZYMATIQUES .....</b>	<b>1</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 2.1 : Résumé des méthodes d'extraction chimiques employées pour l'évaluation des ÉTM dans les sols .....	6
Tableau 2.2 : Teneurs et distributions du cuivre mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle ..	11
Tableau 2.3 : Matrice des corrélations du cuivre extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle.....	12
Tableau 2.4 : Teneurs et distributions du zinc mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle ..	15
Tableau 2.5 : Matrice des corrélations du zinc extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle.....	16
Tableau 2.6 : Teneurs et distributions du manganèse mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle ..	18
Tableau 2.7 : Matrice des corrélations du manganèse extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle.....	19
Tableau 2.8 : Teneurs et distributions du cadmium mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle ..	21
Tableau 2.9 : Matrice des corrélations du cadmium extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle.....	22
Tableau 2.10 : Teneurs et distributions du plomb mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle ..	24
Tableau 2.11 : Matrice des corrélations du plomb extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle.....	25
Tableau 2.12 : Teneurs et distributions du nickel mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle ..	27
Tableau 2.13 : Matrice des corrélations du nickel extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle.....	28

Tableau 2.14 : Teneurs et distributions du chrome mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle..	30
Tableau 2.15 : Matrice des corrélations du chrome extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle.....	31
Tableau 2.16 : Teneurs et distributions du cobalt mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle..	33
Tableau 2.17 : Matrice des corrélations du cobalt extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle.....	34
Tableau 2.18 : Caractéristiques physiques et chimiques des sols des parcelles .....	37
Tableau 2.19 : Bilan des éléments apportés et perdus dans la prairie selon les modes de fertilisation .....	40
Tableau 2.20 : Bilan des éléments apportés et perdus dans le champ de maïs-grain selon les modes de fertilisation.....	42
Tableau 2.21 : Teneur en ÉTM totaux des sols selon les modes de fertilisation de la prairie après 10 ans d'application d'engrais.....	44
Tableau 2.22 : Teneur en ÉTM labiles des sols extraits avec Mehlich-3 selon les modes de fertilisation de la prairie après 10 ans d'application d'engrais .....	45
Tableau 2.23 : Teneur en ÉTM totaux des sols selon les modes de fertilisation du champ de maïs-grain après 10 ans d'application d'engrais.....	46
Tableau 2.24 : Teneur en ÉTM labiles des sols extraits avec Mehlich-3 selon les modes de fertilisation du champ de maïs-grain après 10 ans d'application d'engrais.....	46
Tableau 2.25 : Enzymes représentant chacun des cycles biogéochimiques .....	53
Tableau 2.26 : Analyses chimiques, physiques et biologiques à effectuer sur le sol utilisé pour la mise au point de la méthode.....	56
Tableau 2.27 : Coefficients de corrélation $r^2$ évalués selon le test de Pearson entre le RSSI original (golden standard) et les différentes combinaisons employées pour le calcul des RSSI simplifiés, n=277 .....	62
Tableau 2.28 : Propriétés physico-chimiques des sols utilisés lors de la mise au point de la méthode.....	63
Tableau 2.29 : Caractérisations physico-chimiques et enzymatiques des mélanges de 7 % et 14 % M.O.....	64



Tableau 2.30 : Caractérisation du sol utilisé pour l'application de la méthode.....	65
Tableau 2.31 : <i>Relative Soil Stability Index</i> (RSSI) des enzymes phosphatases acide et basique .....	68
Tableau 2.32 : <i>Relative Soil Stability Index</i> (RSSI) de l'activité enzymatique du sol 7 % M.O. pour la perturbation par dessiccation à 60°C.....	74
Tableau 2.33 : <i>Relative Soil Stability Index</i> (RSSI) de l'activité enzymatique du sol 14 % M.O. pour la perturbation par dessiccation à 60°C. ....	75
Tableau 2.34 : <i>Relative Soil Stability Index</i> (RSSI) de l'activité enzymatique du sol loam pour la perturbation par dessiccation à 60°C. ....	80
Tableau 2.35 : <i>Relative Soil Stability Index</i> (RSSI) de l'activité enzymatique du sol limoneux sablonneux pour la perturbation par dessiccation à 60°C.....	84
Tableau 2.36 : Concentration en cuivre total, échangeable (Mehlich-3) et soluble pour le loam sableux, le loam et loam argileux à l'étude .....	95
Tableau 2.37 : Résultat de l'analyse de la granulométrie, de la capacité d'échange cationique et du pourcentage en matière organique pour le loam sableux comparativement aux deux autres sols à l'étude.....	95
Tableau 2.38 : Résultats obtenus pour les tests de létalité, d'évitement et de reproduction avec le ver de terre <i>Eisenia andrei</i> pour le loam sableux, le loam et le loam argileux.....	96
Tableau 2.39 : Résultats des tests sur la germination et la croissance de l'orge ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sur 7 et 14 jours .....	98
Tableau 2.40 : Résultats des tests de létalité et de reproduction sur la daphnie ( <i>Daphnia magna</i> ) .....	99
Tableau 3.1 : Classification des sols selon leur teneur en ÉTM mesurée avec la méthode Mehlich-3.....	102
Tableau 4.1 : Caractérisation chimique des matières exogènes servant à l'étude.....	105
Tableau 4.2 : Concentration en métaux totaux et labiles (Mehlich-3) des sols sans et avec amendement .....	106
Tableau 4.3 : Concentration en cuivre total et des différentes fractions des sols amendés en ÉTM.....	109
Tableau 4.4 : Résultats obtenus pour les tests de létalité, d'évitement et de reproduction avec le ver de terre <i>Eisenia andrei</i> pour les trois sols amendés.....	110
Tableau 4.5 : Résultats des tests sur la germination et la croissance de l'orge ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sur 14 jours .....	111

Tableau 4.6 : Résultats des tests de létalité sur la daphnie ( <i>Daphnia magna</i> ).....	111
Tableau 4.7 : <i>Relative Soil Stability Index</i> (RSSI) de l'activité enzymatique du loam amendé en matières exogènes pour la perturbation par dessiccation à 60°C.....	113
Tableau 4.8 : Distribution percentile du cuivre et du zinc labiles (Mehlich-3) dans la couche arable des sols du Québec, selon les trois groupes de sol.....	118
Tableau 4.9 : Classification révisée (pour Cu et Zn) de leur teneur en ÉTM labiles des sols, mesurée avec la méthode Mehlich-3 .....	119
Tableau 4.10 : Doses annuelles et cumulatives de lisiers de porcs appliquées sur les parcelles pendant 25 ans, selon les traitements.....	120
Tableau 4.11 : Teneur en ÉTM labiles des sols (méthode Mehlich-3) après 25 ans d'application de lisiers de porcs selon les doses apportées et les couches de sols .....	121
Tableau 4.12 : Teneur en cuivre dans les sols après 25 ans d'application de lisiers de porcs selon les doses apportées et les couches de sol.....	124
Tableau 4.13 : Teneur en zinc dans les sols après 25 ans d'application de lisiers de porcs selon les doses apportées et les couches de sol.....	125
Tableau 4.14 : Concentration en métaux totaux et labiles (Mehlich-3) des sols sans et avec amendement .....	130
Tableau 4.15 : Concentration en cuivre total et des différentes fractions des sols lisier 25 ans et industriel .....	130
Tableau 4.16 : Résultats obtenus pour les tests de létalité, d'évitement et de reproduction avec le ver de terre <i>Eisenia andrei</i> pour le loam lisier 25 ans et le sol industriel.....	131
Tableau 4.17 : Résultats des tests sur la germination et la croissance de l'orge ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sur 14 jours pour les sols loam lisier 25 ans et industriel.....	132
Tableau 4.18 : Résultats des tests de létalité sur la daphnie ( <i>Daphnia magna</i> ).....	132
Tableau 4.19 : <i>Relative Soil Stability Index</i> (RSSI) de l'activité enzymatique du loam amendé en lisier de porcs (25 ans) pour la perturbation par dessiccation à 60°C.....	133
Tableau A.1 : Description et caractérisation physico-chimique des 64 sols à l'étude .....	3
Tableau B.1 : Concentration en ÉTM de divers engrais minéraux commerciaux.....	3
Tableau B.2 : Concentrations en ÉTM des engrais minéraux et organiques appliqués dans la prairie.....	4
Tableau B.3 : Concentrations en ÉTM des engrais minéraux et organiques appliqués dans le champ de maïs-grain .....	4

Tableau B.4: Charges en ÉTM des engrais minéraux et organiques appliqués dans la prairie .	6
Tableau B.5 : Charges en ÉTM des engrais minéraux et organiques appliqués dans le champ de maïs-grain.....	7
Tableau B.6 : Exportation des ÉTM par les récoltes de la prairie.....	8
Tableau B.7 : Exportation des ÉTM par la récolte du maïs-grain .....	9
Tableau B.8 : Concentrations moyennes pondérées des éléments totaux dans l'eau des drains souterrains de la prairie.....	10
Tableau B.9 : Charge des éléments totaux perdus dans l'eau des drains souterrains de la prairie.....	11
Tableau B.10 : Concentrations moyennes pondérées des éléments solubles dans l'eau des drains souterrains de la prairie .....	12
Tableau B.11 : Charge des éléments solubles perdus dans l'eau des drains souterrains de la prairie .....	13
Tableau B.12 : Concentrations moyennes pondérées des éléments totaux dans l'eau des drains souterrains du champ de maïs-grain .....	14
Tableau B.13 : Charge des éléments totaux perdus dans l'eau des drains souterrains du champ de maïs-grain.....	15
Tableau B.14 : Concentrations moyennes pondérées des éléments solubles dans l'eau des drains souterrains du champ de maïs-grain.....	16
Tableau B.15 : Charge des éléments solubles perdus dans l'eau des drains souterrains du champ de maïs-grain.....	17
Tableau B.16 : Concentration moyenne pondérée des éléments totaux ruisselés dans la prairie .....	18
Tableau B.17 : Charge des éléments totaux ruisselés dans la prairie .....	18
Tableau B.18 : Concentration moyenne pondérée des éléments solubles ruisselés dans la prairie .....	19
Tableau B.19 : Charge des éléments solubles ruisselés dans la prairie .....	19
Tableau B.20 : Concentration moyenne pondérée des éléments totaux ruisselés dans le maïs-grain .....	20
Tableau B.21 : Charge des éléments totaux ruisselés dans le maïs-grain.....	20

Tableau B.22 : Concentration moyenne pondérée des éléments solubles ruisselés dans le maïs-grain .....	20
Tableau B.23 : Charge des éléments solubles ruisselés dans le maïs-grain .....	21

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 2.1 : Représentation schématique du calcul de l'index RSSI.....	60
Figure 2.2: Illustration des points d'échantillonnage effectués lors des essais de perturbations pour la création de la courbe du sol témoin (non-perturbé) et du sol perturbé.....	61
Figure 2.3 : Suivi des phosphatases acide et basique pour les cinq perturbations.....	67
Figure 2.4 Densité bactérienne exprimée en pourcentage en fonction de la résistance (T1) et la récupération (T3 et T6) .....	69
Figure 2.5 : Profils DGGE de l'ARN 16S amplifié de l'ADN extrait de sol non-contaminé perturbé par 2 cycles de gel-dégel. ....	70
Figure 2.6 : Profils DGGE de l'ARN 16S amplifié de l'ADN extrait de sol non-contaminé perturbé par dessiccation à 60°C. ....	71
Figure 2.7 : Profils DGGE de l'ARN 16S amplifié de l'ADN extrait du sol non-contaminé perturbé par une dessiccation à 95°C pendant 24h.....	72
Figure 2.8: L'effet de la dessiccation à 60°C sur l'activité enzymatique des sols contaminé au 2,4-D (□) et non contaminé (■).....	73
Figure 2.9 : Densité bactérienne des sols à 7 et 14 % M.O. non-contaminés et contaminés au 2,4-D (50mg/kg sol sec) en fonction du temps.....	76
Figure 2.10 : Profils DGGE et leurs dendrogrammes respectifs comparant les communautés perturbées par dessiccation à 60°C des sols. A) 7 % MO et B) 14 % MO.....	77
Figure 2.11 : Activité de la phosphatase basique d'un sol limoneux contaminé au Cu pour la perturbation par dessiccation à 60°C. ....	78
Figure 2.12 : Activité enzymatique suivant une perturbation par dessiccation à 60°C exprimée en pourcentage de diminution de l'activité enzymatique par rapport au sol témoin (sol non perturbé) en fonction du temps. ....	79
Figure 2.13 : Profils DGGE et dendrogramme comparant les communautés des sols non-contaminé et contaminé à 200 mg Cu/kg sol sec, perturbé par dessiccation à 60°C. ....	81
Figure 2.14 : L'effet de la dessiccation à 60°C sur l'activité enzymatique des sols contaminé au cuivre 200 mg/kg sol sec (□) et non contaminé (■). ....	83
Figure 2.15 : Stratégie d'évaluation de la qualité d'un sol. ....	87
Figure 2.16 : Courbe concentrations-réponses pour le test de létalité avec le ver de terre pour le loam.....	97

Figure 3.1. Schéma conceptuel d'une méthode d'évaluation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments traces métalliques d'un sol.....	101
Figure 4.1 Profils DGGE comparant les communautés des loams non-contaminé et contaminé au lisier de porcs, perturbé par dessiccation à 60°C. ....	114
Figure 4.2 Profils DGGE comparant les communautés des loams non-contaminé et contaminé aux boues municipales, perturbé par dessiccation à 60°C. ....	114
Figure 4.3 Profils DGGE comparant les communautés des loams non-contaminé et contaminé aux boues papetières, perturbé par dessiccation à 60°C. ....	115
Figure 4.4 : Profils DGGE comparant les communautés des loams non-contaminé et contaminé au lisier de porcs (25 ans), perturbé par dessiccation à 60°C. ....	134

## LISTE DES ACRONYMES ET SYMBOLES

ADN	Acide désoxyribonucléique
AE	Activité Enzymatique
ARN	Acide ribonucléique
Cd	Cadmium
CEAEQ	Centre d'expertise et d'analyse environnementale du Québec
CEC	Capacité d'échange cationique
C-N	Carbone -azote
Co	Cobalt
COT	Carbone organique total
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
CuSO <sub>4</sub>	Sulfate de cuivre anhydre
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
ÉTM	Éléments traces métalliques
HCl	Acide chlorhydrique
IRDA	Institut de recherche et de développement en agroenvironnement
M.O.	Matière organique
MDDEP	Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs
MEI	Membrane échangeuse d'ions
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
Mn	Manganèse
N	Normal
NaCl	Chlorure de sodium
Ni	Nickel
PARDE	Programme d'aide à la recherche et au développement en environnement
Pb	Plomb
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PPSRTC	Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés
RSSI	<i>Relative Soil Stability Index</i>
SAS	Statistical Analysis System
T	Temps
TAE	Tris, acide acétique, EDTA
Zn	Zinc





## INTRODUCTION

La Chaire industrielle en assainissement et gestion des sites en partenariat avec le Centre d'expertise et d'analyse environnementale du Québec (CEAEQ) et l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA) réalisent conjointement ce projet de recherche intitulé « *Développement d'une méthode d'évaluation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments traces métalliques d'un sol* ». Une grande part du financement de ce projet origine d'une subvention du Programme d'aide à la recherche et au développement en environnement (PARDE) du Ministère de l'environnement du Québec, accordée à la Chaire industrielle en assainissement et gestion des sites de l'École Polytechnique de Montréal en 2002.

Le projet a été divisé en deux phases, chacune devant faire l'objet d'un rapport d'étape auprès des responsables du PARDE. Le premier rapport, déposé en décembre 2003, faisait état des travaux réalisés jusqu'en novembre 2003 et concernait l'essentiel des activités prévues à la première phase de développement. Un second rapport a été déposé en décembre 2004 et résumait l'avancement des travaux réalisés jusqu'à son dépôt. Pour son compte, ce rapport final englobe les résultats du projet en entier.

### 1.1 PROBLÉMATIQUE

Le sol est une matrice complexe composée de minéraux, de matières organiques, d'eau, d'air et d'autres gaz. Il constitue un habitat hétérogène tant sur le plan vertical qu'horizontal. Il représente un support et une source d'éléments nutritifs pour la végétation, la microflore (bactéries, champignons, etc.) et la microfaune (invertébrés, etc.). De plus, il est le lieu de décomposition de la matière organique et du recyclage des éléments nutritifs.

La présence de contaminants, dont celle des éléments traces métalliques (ÉTM), dans un sol donne lieu à des interactions complexes avec la matrice qui sont contrôlées par de nombreux processus incluant les mécanismes d'oxydo-réduction et de complexation avec les fractions organiques et inorganiques, les réactions de précipitation et de dissolution ainsi que des réactions d'adsorption et de désorption (McLean et Bledsoe, 1992). Ainsi, les ÉTM se retrouveront, dépendamment des interrelations qui existent entre ces processus en fonction du milieu environnant, sous la forme d'ions libres ou de complexes solubles dans la phase aqueuse, occupant des sites d'échanges sur des constituants inorganiques du sol, spécifiquement adsorbés (par des liens ioniques ou covalents) sur la fraction inorganique, associés (complexation, adsorption) avec la matière organique insoluble ou colloïdale, précipités sous la forme d'un métal pur ou non ou encore présents dans la structure primaire ou secondaire des minéraux du sol (Zagury *et al.*, 2002). La détermination du fractionnement des formes chimiques du métal représente donc un moyen clé pour étudier la mobilité des ÉTM.

La mobilité des ÉTM dans un sol, et par conséquent leur biodisponibilité et leur toxicité potentielles, sont non seulement contrôlées par les propriétés physico-chimiques de ces substances ou par les caractéristiques physico-chimiques du sol mais aussi par la présence d'organismes vivants et leurs propriétés physiologiques. Le développement des dernières

années de nouvelles techniques de biologie moléculaire appliquées à des échantillons de sol a démontré l'extrême diversité des communautés microbiennes (Matheson *et al.*, 1997). Ces communautés, tout comme celles des organismes plus évolués tels les invertébrés et les plantes, changent les conditions environnementales et modifient la distribution des ÉTM dans le sol augmentant ou diminuant ainsi leur mobilité, leur biodisponibilité et leur toxicité (Kelsey et Alexander, 1997; Richnow *et al.*, 1997; Zagury *et al.*, 2002). Par conséquent, la présence des ÉTM comme tout autre contaminant dans un sol est susceptible de causer des effets directs ou indirects à plus ou moins long terme sur les organismes vivants et de modifier la dynamique ainsi que l'équilibre des processus vitaux du sol.

Depuis de nombreuses années, des matières exogènes sont déposées sur les sols afin de servir de matière fertilisante (engrais chimiques, lisiers, fumier, boues de stations d'épuration municipales ou industrielles), de matériel de stabilisation (scories, laitiers, stériles miniers) ou encore comme voie d'élimination (déchets, sols contaminés) ou pour le témoin biologique (pesticides). L'apport de ces matières exogènes en quantités importantes et parfois ayant diverses origines sur une même parcelle de sol, peut potentiellement perturber l'équilibre dynamique des processus vitaux du sol non seulement en étant une source d'ÉTM mais aussi en modifiant potentiellement les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du sol récepteur.

À l'heure actuelle, la connaissance des mécanismes de transfert et de transport à travers les compartiments environnementaux (mobilité) ainsi que celle de la biodisponibilité et la toxicité des éléments traces métalliques dans un sol est très limitée et est encore plus incomplète lorsqu'on est en présence d'un apport de matières exogènes. Ceci peut s'expliquer non seulement par la complexité des mécanismes d'interactions en présence, mais aussi par le peu d'outils dont disposent les chercheurs et les laboratoires pour étudier et estimer cette disponibilité. Tel que le précisent Zagury *et al.* (2002), les approches par extractions chimiques représentent des outils utiles pour évaluer la mobilité et la biodisponibilité potentielles des contaminants organiques ou inorganiques. Cependant, ces méthodes chimiques doivent encore être développées afin d'obtenir des méthodes standardisées qui permettent de quantifier avec plus de précision les fractions biodisponibles. De plus, ces méthodes fournissent une information limitée en présence d'une contamination complexe et elles intègrent peu ou pas le comportement à long terme. Les méthodes ou outils basés sur l'utilisation d'organismes biologiques représentent une alternative et une approche complémentaire aux approches chimiques.

Afin de mieux guider le choix des mesures encadrant la protection des sols, il est donc essentiel d'estimer de manière plus précise l'exposition des composantes de l'écosystème et les effets qui peuvent résulter de la présence des ÉTM dans les sols. Le développement de nouvelles connaissances sur la mobilité et la biodisponibilité de ces éléments traces a des conséquences directes sur la gestion des terrains contaminés ou encore la valorisation des matières résiduelles.

## 1.2 OBJECTIFS

L'objectif du projet est de développer et valider une méthode d'évaluation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments traces métalliques (ÉTM) d'un sol qui permettra d'une part, de rendre compte des multiples interactions qui conditionnent la biodisponibilité et le niveau d'exposition des espèces vivantes et, d'autre part, de prendre en considération les mécanismes de transport et de transfert des ÉTM à travers les différents compartiments du sol.

Les objectifs spécifiques sont :

1. développer une méthode analytique d'estimation de la mobilité des ÉTM basée sur la comparaison de diverses approches (fractionnement chimique, résines échangeuses d'ions...);
2. mesurer les transferts et les accumulations des ÉTM dans les sols suite à des apports répétés à long terme;
3. développer un outil de mesure de la stabilité des fonctions enzymatiques d'un sol et d'évaluer sa capacité à révéler la présence d'une perturbation résultant d'un apport de matières exogènes;
4. développer un outil intégrateur d'évaluation de la biodisponibilité des ÉTM basés sur des tests de toxicité.

## 1.3 DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

Le projet est divisé en deux phases. Les travaux de la première phase de développement ont essentiellement été réalisés en laboratoire et en serre et étaient divisés en plusieurs étapes et activités. Chacune de ces étapes visait le développement et l'optimisation d'outils nécessaires à l'élaboration de la méthode d'évaluation de la mobilité et de la biodisponibilité des ÉTM dans un sol. Ainsi, différentes méthodes chimiques permettant d'estimer la mobilité des ÉTM par l'entremise de leur concentration dans différentes fractions du sol ont été analysées principalement par l'IRDA (section 2.1). Parallèlement à ces travaux, le CEAEQ, d'une part, et la Polytechnique de Montréal, d'autre part, ont respectivement évalué la sensibilité de certains tests de toxicité (section 2.2.2) et développer une approche de mesure de l'activité enzymatique des microorganismes du sol (section 2.2.1) dans le but de proposer une approche d'évaluation de la biodisponibilité des ÉTM dans un sol. Ces travaux ont mené à l'élaboration d'une méthode d'évaluation de la mobilité et de la biodisponibilité des ÉTM dans un sol (section 3).

La seconde phase de validation implique des travaux réalisés en laboratoire et aux champs sur des sols contaminés au cuivre. L'objectif de la seconde phase était de valider l'information obtenue lors de la première phase. La sensibilité et la précision de la méthode qui a été développée ont été évaluées d'une part, en modifiant les conditions environnementales des sols à l'étude par l'apport de matières exogènes plus ou moins chargées en ÉTM (section 4.1) et, d'autre part, en les appliquant à des sols dont l'historique de la contamination est connue et remonte à plusieurs décennies (section 4.2). Une critique de la méthode proposée est présentée à la section 5.

La méthodologie spécifique aux activités réalisées à chaque phase et étapes sous-jacentes est détaillée dans chacune des sections les décrivant.

## PHASE 1 - DÉVELOPPEMENT

L'enjeu lié au développement d'une approche d'évaluation de la disponibilité des ÉTM dans un sol est de fournir des protocoles adéquats qui intègrent une évaluation expérimentale à la fois du comportement environnemental des contaminants ainsi que de leur biodisponibilité.

Cette section fait état des travaux de la première phase, soit celle de développement. Ces travaux ont été réalisés essentiellement en laboratoire et en serre et sont présentés en trois volets.

### 2.1 DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE MESURE DE LA MOBILITÉ DES ÉTM

#### 2.1.1 Comparaison des méthodes d'extraction chimique des ÉTM dans les sols

Il existe plusieurs méthodes d'extraction, mises au point pour mesurer les métaux traces labiles du sol (Mehlich, 1984; Black, 1965). Elles visent toutes à intégrer en une seule extraction la fraction labile, contribuant aux équilibres sol-solution. Dans la première étape de ce projet, diverses méthodes chimiques basées sur le fractionnement des ÉTM ont été comparées et mises en relation entre elles et avec les prélèvements des plantes dans le but d'établir un lien entre la mobilité des ÉTM et la biodisponibilité pour les plantes. Plusieurs de ces méthodes sont utilisées en agriculture pour mesurer la disponibilité du cuivre pour les cultures. Le niveau critique d'intervention pour corriger les carences de cuivre dans les sols est de 0,6 mg/kg pour la méthode Mehlich-3 et de 0,8 mg/kg pour la méthode HCl 0,1 N. Pour le niveau excessif, on ne dispose pas de critères précis actuellement avec ces méthodes.

Cette section présente les résultats des méthodes d'extraction chimique des ÉTM dans les sols ainsi que ceux associés à de nouveaux essais réalisés avec des membranes échangeuses d'ions (MEI) et les prélèvements des plantes. L'étude de corrélation et de régression est également présentée afin d'établir des relations entre les méthodes chimiques d'analyse des ÉTM, l'adsorption sur les résines membranes échangeuses d'ions (MEI), leur flux et les propriétés des sols.

##### 2.1.1.1 Méthodologie de mesure des ÉTM dans les sols

La détermination des éléments traces métalliques (ÉTM) de différentes fractions de la couche arable a été effectuée dans 64 séries de sols agricoles provenant de plusieurs régions et représentant une gamme variée de textures, de pH, de matières organiques et de capacité d'échange cationique dans le but de connaître les teneurs en ÉTM du fond pédogéochimique des sols au Québec (voir Tableau A.1 de l'annexe A). Les ÉTM considérés dans cette étude sont le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le cadmium (Cd), le plomb (Pb), le nickel (Ni), le chrome (Cr) et le cobalt (Co). Ils ont été extraits à l'aide de différents agents d'extraction, afin de mettre en évidence des fractions spécifiques dans les sols. Les ÉTM totaux (1), occlus dans les oxydes (2), liés aux matières organiques (3), labiles (4) et facilement échangeables (5) ont été caractérisés avec les méthodes d'extraction chimique citées au Tableau 2.1.

**Tableau 2.1 : Résumé des méthodes d'extraction chimiques employées pour l'évaluation des ÉTM dans les sols**

Fraction ÉTM étudiée	Méthode d'extraction chimique	Référence
(1) ÉTM totaux	Procédure EPA (HCl + HNO <sub>3</sub> )	EPA (1996)
(2) Occlus dans les oxydes	Extraits à l'oxalate acide d'ammonium	McKeague, J. A. 1977; Quian <i>et al.</i> , 2003
(3) Liés aux matières organiques	Extraits au pyrophosphate de potassium	McKeague, J. A. 1977; Quian <i>et al.</i> , 2003
(4) Labile	Extraits selon trois méthodes : a) Mehlich-3 (Acide acétique + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + NH <sub>4</sub> F+HNO <sub>3</sub> +EDTA) b) DTPA-TEA c) HCl 0,1 N	a) Tran et Simard, 1993; b) Liang et Karamanos, 1993; c) Black, 1965
(5) Solubles et facilement échangeables (fraction mobile)	Extraits à l'acétate d'ammonium 1,0 N à pH 7,0	Simard, 1993

### 2.1.1.2 Mesure des ÉTM dans les sols avec les membranes échangeuses d'ions

La technique de détermination des éléments chimiques labiles des sols par adsorption-désorption sur des résines ou des membranes échangeuses d'ions (MEI) est utilisée en agriculture depuis quelques années. Elle s'est montrée très appropriée pour déterminer la disponibilité de l'azote et du phosphore des sols pour plusieurs cultures. L'objectif de l'étude est de comparer les résultats analytiques des ÉTM mesurés par la technique MEI avec ceux obtenus par les méthodes chimiques utilisées dans cette étude : ÉTM acétate, Mehlich-3, HCl, DTPA-TEA, oxalate, pyrophosphate et teneur totale.

Lorsque la détermination des ÉTM a été possible, des calculs de statistiques descriptives ont été effectués : moyenne, écart-type, médiane et distribution percentile par rapport aux teneurs en ÉTM mesurées dans 64 séries de sol du Québec. Aussi, pour chaque métal étudié une matrice de corrélation a été établie entre les résultats des ÉTM adsorbés par les MEI et ceux extraits à l'aide des cinq méthodes d'extraction chimique précédemment mentionnées.

### 2.1.1.3 Méthodologie de détermination des ÉTM avec les MEI

Des pots de 1 litre ont été remplis de 800 g de sol provenant de la couche arable de 64 séries de sol du Québec. Ces sols étaient les mêmes que ceux utilisés pour la comparaison des méthodes chimiques et pour l'essai en serre. Les membranes d'échange utilisées étaient du type cationique et provenaient de la compagnie Ionics (n° Catalogue : 5201679) de Watertown, MA. Elles étaient chargées négativement et pouvaient donc adsorber uniquement les cations. Les MEI avaient une superficie de 31 cm<sup>2</sup> de surface externe. Elles ont été saturées par trempage dans une solution de LiCl 1 N pendant 2 heures et incorporées aux sols à la verticale à 8 cm de la surface. Trois répétitions ont été utilisées. Les sols ont été placés dans une chambre d'incubation maintenue à 20°C pendant 14 jours. L'humidité du sol a été ajustée à 80 % de leur capacité de rétention en eau. À la fin de la période d'incubation, les

MEI ont été retirées et lavées avec de l'eau déminéralisée pour enlever les particules de sol. La désorption a été faite en plaçant les MEI dans une solution de HCl 0,5 N et en agitant pendant 2 heures. La solution a été filtrée avec un papier filtre Whatman n° 42 et le dosage des ÉTM a été fait par spectrométrie d'émission au plasma de marque Perkin Elmer modèle 4030 DV. Les résultats des ÉTM adsorbés par les MEI sont exprimés en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  pour la période de 14 jours.

#### 2.1.1.4 Résultats du cuivre

Tisdale *et al.* (1985) mentionnent que le cuivre se retrouve sous plusieurs formes dans les sols. Les réseaux cristallographiques des minéraux primaires et secondaires en contiennent. Cette forme est très stable. Elle représente en grande partie la fraction dite résiduelle, celle qui n'est pas extraite par les méthodes chimiques sélectives. On trouve également du cuivre co-précipité ou occlus dans la fraction des oxydes libres du sol. Le cuivre peut aussi se lier aux matières organiques. Il peut se fixer sur des sites d'adsorption spécifique ou sur le complexe d'échange cationique. Une faible partie se retrouve dans la solution du sol sous forme ionique ou complexée.

L'oxalate acide d'ammonium extrait préférentiellement le cuivre occlus ou précipité sous forme d'oxydes libres. L'extraction au pyrophosphate de potassium met en solution principalement les formes liées aux matières organiques. La fraction labile représente la partie du cuivre des différentes fractions du sol susceptibles d'équilibrer la fraction mobile (soluble et facilement échangeable). Diverses méthodes chimiques puisant sélectivement dans les différentes fractions du cuivre du sol ont été développées pour fournir le pool labile. Les méthodes Mehlich-3, HCl 0,1N, le chélat DTPA-TEA et les membranes échangeuses d'ions (MEI) ont été utilisées et comparées entre elles. Pour le cuivre mobile, une extraction à l'acétate d'ammonium 1 N à pH 7 a été utilisée pour mesurer les fractions solubles et facilement échangeables.

Différentes fractions du cuivre doivent donc être caractérisées pour avoir une bonne compréhension de la répartition de cet élément dans les sols et pour établir sa mobilité. Comme les extractifs chimiques ne sont pas totalement sélectifs, la répartition dans les différentes fractions comporte une certaine marge d'erreur.

- **Cuivre total**

La teneur moyenne en Cu total des sols étudiés s'établit à 19,2 mg/kg avec des extrêmes allant de 2,2 à 53,4 mg/kg (Tableau 2.2). Giroux *et al.* (1992) ont démontré que les sols argileux ont des teneurs plus élevées en ÉTM que les loams ou les sables. La teneur en cuivre total corrèle assez bien avec le cuivre extrait avec les autres méthodes chimiques, à l'exception du cuivre échangeable. Les corrélations entre le cuivre total et les autres méthodes sont relativement bonnes, variant entre 0,62 et 0,74, sauf pour le cuivre acétate où elle est très faible avec seulement 0,28 (Tableau 2.3).

- **Cuivre oxalate**

La teneur moyenne des sols est de 4,8 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,7 et 23,8 mg/kg (Tableau 2.2). C'est une fraction relativement abondante dans les sols. La solubilité de ces oxydes est faible en milieu oxydant mais elle s'accroît en milieu réducteur. Les oxydes cuivreux sont plus solubles que les oxydes cuivriques. Le potentiel d'oxydo-réduction des sols va donc affecter la solubilité du cuivre. Elle est plus élevée en sols acides qu'en sols neutres et basiques. Le rapport moyen Cu-oxalate/Cu-total est de 25,1 %. Ce rapport permet de connaître la proportion du cuivre accumulée dans les sols sous forme d'oxydes libres. Les corrélations entre le Cu oxalate et les autres méthodes sont bonnes, variant de 0,74 à 0,97 sauf pour le cuivre acétate avec  $r = 0,58$  (Tableau 2.3).

- **Cuivre pyrophosphate**

La teneur moyenne dans les sols est de 3,6 mg/kg avec des valeurs extrêmes variant entre 1,3 et 13,1 mg/kg (Tableau 2.2). Le rapport moyen Cu-pyrophosphate/Cu-total est de 18,6 %. Il s'agit aussi de formes relativement abondantes dans les sols. La solubilité des formes organiques va dépendre beaucoup du pH. Dans les sols podzolisés acides, les métaux se complexent aux matières humiques et fulviques solubles et migrent vers les couches inférieures du profil de sols pour former ce qu'on appelle des horizons B podzoliques. Ce processus de podzolisation est actif seulement en sols acides et le chaulage arrête sa progression mais les sols conservent les caractéristiques de leur pédogénèse, d'où l'importance de la caractérisation pédologique des sols. Dans les sols avec un pH de 6 ou plus, la solubilité des acides humiques et fulviques est faible à cause de la présence de calcium qui stabilise ces molécules. Le cuivre aura tendance à se fixer aux molécules organiques et à demeurer dans la couche arable des sols. Une partie du cuivre est intégrée à l'intérieur des humus lors du processus d'humification et devient non mobile. Une autre partie se fixe en surface des colloïdes organiques en se liant aux radicaux carboxyle et hydroxyle présents. L'énergie de liaison entre le cuivre et les colloïdes organiques est assez élevée de sorte que la mobilité de cette fraction est modérée. Une partie du cuivre se lie aux acides organiques (citriques, oxaliques et autres molécules organiques complexantes) et se retrouve dans la solution du sol sous forme de complexes ou de chélats. La méthode d'extraction au pyrophosphate renseigne sur l'accumulation du cuivre lié à plusieurs fractions de la matière organique des sols. C'est une fraction importante à considérer pour caractériser l'accumulation du cuivre dans les sols. Le cuivre extrait au pyrophosphate corrèle très bien ( $r = 0,85$  à  $0,96$ ) avec le cuivre extrait avec la plupart des méthodes chimiques utilisées et assez bien avec Cu acétate ( $r = 0,64$ ) et Cu total ( $r = 0,74$ ) (Tableau 2.3). Un équilibre semble exister entre les différentes fractions du cuivre dans les sols.

- **Cuivre labile**

Trois méthodes ont été utilisées et comparées entre elles pour extraire le cuivre labile dans les sols. Giroux *et al.* (1992) suggèrent une valeur critique maximale de 8 mg/kg de cuivre basée sur la distribution du cuivre extrait par la méthode Mehlich-3 dans les sols du Québec.

La teneur en Cu-Mehlich-3 des sols de notre étude est en moyenne de 2,2 mg/kg avec des valeurs extrêmes allant de 0,5 à 12,4 mg/kg (Tableau 2.2). Le rapport moyen de Cu-Mehlich-



3/Cu-total est en moyenne de 11,4 %. Le rapport du cuivre labile/cuivre-total peut aider à identifier les sols présentant la plus grande mobilité en métaux et suivre l'évolution de cette fraction dans les sols. Les applications répétées de cuivre aux sols pourraient accroître plus rapidement la teneur en Cu labile que celle en Cu total et augmenter ainsi significativement ce rapport. Ceci fera l'objet d'une vérification dans une étape à venir.

Les trois méthodes d'extraction utilisées se sont montrées sensibles à détecter l'accumulation du cuivre labile dans les sols. Pour la méthode HCl 0,1 N, la teneur moyenne du cuivre dans les sols est de 2,4 mg/kg avec des valeurs extrêmes variant de 0,5 à 9,0 mg/kg (Tableau 2.2). Les deux méthodes sont très corrélées entre elles.

$$\text{Cu-HCl} = 1,08 \text{ Cu-Mehlich-3} + 0,08 \quad r = 0,92$$

La méthode DTPA-TEA, extrait en moyenne 1,6 mg/kg de cuivre avec des valeurs allant de 0,3 à 7,9 mg/kg (Tableau 2.2). Les résultats sont très corrélés avec ceux de la méthode Mehlich-3 (Tableau 2.3).

$$\text{Cu-DTPA-TEA} = 0,90 \text{ Cu-Mehlich-3} - 0,33 \quad r = 0,95$$

La méthode DTPA-TEA corrèle également très bien avec la méthode HCl.

$$\text{Cu-DTPA} = 0,78 \text{ Cu-HCl} - 0,26 \quad r = 0,94$$

Ces trois méthodes sont aussi valables pour caractériser la fraction labile du cuivre dans les sols. Comme la méthode Mehlich-3 est la plus utilisée pour l'analyse des sols agricoles au Québec, ceci représente un avantage pour cette méthode car il sera plus facile et moins coûteux d'obtenir les résultats du cuivre labile avec cette méthode. Les corrélations entre le cuivre labile et le cuivre total sont plutôt modérées ( $r = 0,62$  à  $0,67$ ) selon les méthodes (Tableau 2.3). Il en va de même pour les corrélations entre le cuivre labile et Cu acétate ( $r = 0,59$  à  $0,66$ ).

Le cuivre extrait par la technique des MEI est très faible, en moyenne de  $0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  avec un minimum de  $0,01$  et un maximum de  $0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Tableau 2.2). Les corrélations entre les teneurs de Cu adsorbées sur les MEI et celles extraites par les méthodes chimiques sont non significatives pour tous les ÉTM (Tableau 2.3). Les très faibles teneurs de Cu-MEI limitent la précision des analyses, ce qui peut expliquer l'absence de corrélation entre les méthodes chimiques et les MEI. Le contenu en Cu-MEI des sols se situe parfois sous la limite de détection du plasma utilisé. Les faibles teneurs de Cu-MEI ne nous permettent pas de comparer les résultats avec une bonne fiabilité. Une technique de dosage avec un appareil plus sensible est requise pour la détermination du cuivre avec les membranes échangeuses d'ions.

- **Cuivre résiduel**

On peut avoir un estimé du cuivre résiduel présent dans les structures minérales du sol par différence entre le cuivre total et le cuivre extrait à l'oxalate plus celui extrait au pyrophosphate. Ce cuivre résiduel représente en moyenne 56,3 % du cuivre total des sols. Ces résultats concordent avec ceux de Quian *et al.* (2003) qui ont effectué un fractionnement

du cuivre et du zinc dans des sols traités aux lisiers de porcs en Saskatchewan et ils ont obtenu une proportion semblable de cuivre résiduel.

- **Cuivre mobile**

Les formes de cuivre mobile dans les sols comprennent le cuivre soluble et le cuivre facilement échangeable. Cette fraction devait initialement être caractérisée par une extraction au nitrate de calcium 0,5 M. Cette solution exige une dilution lors du dosage au plasma car elle comporte une concentration en sel trop élevée. Cette dilution fait en sorte que les concentrations du cuivre et des autres métaux se situent sous la limite de détection. Il n'est pas possible de fournir les résultats des teneurs en ÉTM par spectrométrie d'émission au plasma avec cette méthode. Nous avons donc utilisé l'extraction à l'acétate d'ammonium 1 N à pH 7. Aucune dilution n'est requise mais cette méthode extrait plus faiblement les métaux de sorte que les teneurs en cuivre soluble et facilement échangeable se situent parfois sous la limite de détection. La teneur moyenne en Cu acétate des sols étudiés est de 0,02 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0 et 0,1 mg/kg. Les sols qui montrent les teneurs les plus élevées en cuivre labile mesurées par Cu-Mehlich-3, Cu-HCl ou Cu-DTPA-TEA montrent également les teneurs en cuivre acétate les plus élevées. Il existe une corrélation modérée entre les fractions mobiles et les fractions labiles ( $r = 0,59$  à  $0,66$ ) (Tableau 2.3). Ceci démontre que l'accumulation du cuivre labile dans les sols pourrait affecter les fractions solubles et facilement échangeables. Le rapport moyen de Cu-acétate/Cu-total des sols étudiés est de 0,10 %. Les corrélations entre le Cu extrait avec les diverses méthodes chimiques et Cu acétate varient entre 0,58 et 0,66 (Tableau 2.3). La corrélation entre Cu total et Cu acétate est par contre très faible ( $r = 0,28$ ).

**Tableau 2.2 : Teneurs et distributions du cuivre mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle**

Méthodes	Cuivre				Percentiles				
	Moy.	É-T(±)	Min.	Max.	25	50	75	95	99
<b>MEI</b> <b>µg/cm²</b>	0,02	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03
<u>Fraction mobile (soluble)</u>									
<b>Acétate</b> <b>mg/kg</b>	0,02	0,02	0,00	0,10	0,01	0,03	0,06	0,07	0,08
<u>Fraction labile</u>									
<b>Mehlich-3</b> <b>mg/kg</b>	2,2	1,7	0,5	12,4	1,3	1,9	2,8	3,7	8,0
<b>HCl</b> <b>mg/kg</b>	2,4	1,4	0,5	9,0	1,3	2,2	3,0	4,5	7,1
<b>DTPA</b> <b>mg/kg</b>	1,6	1,2	0,3	7,9	0,8	1,4	2,0	3,2	5,7
<u>Fraction occlue dans les oxydes</u>									
<b>Oxalate</b> <b>mg/kg</b>	4,8	3,6	0,7	23,8	2,5	4,3	6,3	10,3	16,5
<u>Fraction liée aux matières organiques</u>									
<b>Pyrophos.</b> <b>mg/kg</b>	3,6	2,0	1,3	13,1	2,3	3,0	4,2	7,3	10,2
<u>Cuivre total</u>									
<b>Total</b> <b>mg/kg</b>	19,2	10,8	2,2	53,4	11,1	17,3	24,7	39,4	47,9
<u>Dans les végétaux</u>									
<b>Concentration</b> <b>mg/kg</b>	9,2	2,3	6,1	17,8	7,9	8,9	10,1	12,4	17,4
<b>Prélèvement</b> <b>µg/pot</b>	132	49	53	286	99	121	154	215	278

**Tableau 2.3 : Matrice des corrélations du cuivre extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle**

Cuivre	MEI	Soluble	Fraction labile			Dans oxydes	Lié à MO	Total	Végétaux	
		Acétate	Mehlich-3	HCl	DTPA-TEA	Oxalate	Pyro		Concentration	Prélèvement
MEI	1									
Acétate	0,12	1								
Mehlich-3	0,13	0,59**	1							
HCl	0,07	0,64**	0,92**	1						
DTPA-TEA	0,14	0,66**	0,95**	0,93**	1					
Oxalate	0,18	0,58**	0,95**	0,90**	0,97**	1				
Pyro	0,13	0,64**	0,88**	0,85**	0,95**	0,96**	1			
Total	0,23	0,28*	0,62**	0,65**	0,67**	0,74**	0,70**	1		
Concentration	0,19	0,08	0,24	0,31*	0,26*	0,24	0,23	0,26*	1	
Prélèvement	0,14	0,50**	0,45**	0,54**	0,59**	0,55**	0,60**	0,47**	0,53**	1

\* : significatif à p=0,05

\*\* : significatif à p=0,01

#### 2.1.1.5 Résultats du zinc

D'après Tisdale *et al.* (1985), le zinc se retrouve dans les sols inclus dans le réseau cristallographique des minéraux primaires et secondaires, occlus ou co-précipités sous formes d'oxydes libres, complexés ou inclus dans les matières organiques. On en retrouve aussi de faibles quantités sous forme échangeable à la surface des minéraux argileux ou dans la solution du sol sous formes ioniques ou complexées.

- **Zinc total**

La teneur moyenne en zinc total des sols étudiés est de 62,8 mg/kg avec des valeurs extrêmes variant de 15,5 à 117,1 mg/kg (Tableau 2.4). D'après Giroux *et al.* (1992), les sols argileux ont généralement des teneurs plus élevées que les loams et les sables. Le zinc occupe une part importante dans la composition des argiles et de certains autres minéraux présents dans les sols. Le zinc total est peu corrélé avec celui des méthodes d'extraction sélectives (Tableau 2.5). La teneur totale ne renseigne donc pas sur la mobilité de cet élément dans les sols ni sur les formes présentes.

- **Zinc oxalate**

La teneur moyenne des sols en zinc extrait à l'oxalate est de 5,0 mg/kg avec des extrêmes allant de 2,0 à 15,4 mg/kg (Tableau 2.4). Cette méthode extrait préférentiellement les formes oxydes libres. Elle caractérise une fraction importante du zinc présent dans les sols sous

forme minérale et non intégrée aux réseaux cristallographiques. La teneur en zinc-oxalate corrèle assez bien avec le Zn extrait par les diverses méthodes chimiques mais pas avec le zinc total (Tableau 2.5). L'accumulation du zinc mesurée avec cette méthode est plus en lien avec la fraction labile des sols. Le rapport moyen de Zn oxalate/Zn total est de 8,0 %. Ce rapport peut être utile pour caractériser les accumulations à la fraction des oxydes libres des sols. Cette fraction du zinc contribuerait aux équilibres entre les différentes fractions du zinc dans les sols.

- **Zinc pyrophosphate**

La teneur en zinc extrait au pyrophosphate est de 3,7 mg/kg avec des extrêmes variant de 1,1 à 8,0 mg/kg (Tableau 2.4). Cette méthode extrait préférentiellement les formes liées aux matières organiques. Le rapport moyen de Zn-pyro/Zn-total est en moyenne de 5,8 %. Ce rapport peut être utile pour caractériser des accumulations dans les fractions organiques des sols. Le zinc-pyrophosphate corrèle assez bien avec le zinc extrait par les autres méthodes sauf le zinc total et le zinc-HCl (Tableau 2.5). Ceci démontre l'intérêt de mesurer l'accumulation en zinc de la fraction organique car elle est pourrait être impliquée dans les équilibres entre les différentes fractions de cet élément dans les sols.

- **Zinc labile**

Les trois méthodes d'évaluation du zinc labile mesuré avec Mehlich-3, HCl et DTPA-TEA, corrélaient très bien entre elles (Tableau 2.5). La teneur moyenne du zinc-Mehlich-3 est de 1,8 avec des valeurs extrêmes allant de 0,8 à 9,0 mg/kg (Tableau 2.4). Les niveaux critiques d'intervention pour corriger les carences par des applications de zinc aux cultures sont de 1,8 mg/kg de zinc-Mehlich-3 dans les sols légèrement acides et de 2,8 mg/kg dans les sols neutres ou légèrement basiques. Quelques-uns des sols étudiés sont donc carencés en zinc. Le rapport moyen d'extraction de Zn-Mehlich-3/Zn-total est de 2,9. Ce rapport peut constituer un indice intéressant afin de suivre l'enrichissement du zinc des sols. Les applications de métaux aux sols ont comme effet de les faire passer dans des compartiments où ils sont de plus en plus mobiles. L'accroissement de la fraction labile du zinc est alors plus marqué que l'accroissement du zinc total, de sorte que le rapport Zn-Mehlich-3/Zn-total peut se révéler un indicateur utile pour juger des équilibres et de la mobilité du zinc dans les sols.

Le zinc extrait avec HCl est en moyenne de 3,3 mg/kg avec des extrêmes variant de 1,1 à 12,6 mg/kg (Tableau 2.4). Le rapport moyen d'extraction de Zn-HCl/Zn-total est de 5,3. Il s'agit d'une autre méthode d'évaluation du zinc labile, bien corrélée avec le zinc Mehlich-3 ( $r = 0,83$ ). Au Québec, il est plus facile et moins coûteux d'obtenir les résultats analytiques avec la méthode Mehlich-3.

Pour la méthode DTPA-TEA, la teneur moyenne des sols étudiés est de 1,1 mg/kg avec des extrêmes allant de 0,4 à 4,8 mg/kg (Tableau 2.4). Cette dernière méthode extrait moins de zinc que la méthode Mehlich-3 et HCl. Le rapport moyen de Zn-DTPA/Zn-total est de 1,7 %. Il existe une bonne corrélation entre ces trois méthodes (Tableau 2.5). La méthode Mehlich-3 et la méthode DTPA sont particulièrement bien corrélées.

$$\text{Zn-HCl} = 1,368 \text{ Zn-Mehlich-3} + 0,83 \quad r = 0,83$$

$$\text{Zn-DTPA} = 0,536 \text{ Zn-Mehlich-3} + 0,10 \quad r = 0,95$$

$$\text{Zn-DTPA} = 0,305 \text{ Zn-HCl} + 0,06 \quad r = 0,84$$

Le zinc dosé par la technique des MEI présente une moyenne de 0,10 µg/cm<sup>2</sup> avec un minimum de 0,02 et un maximum de 0,25 µg/cm<sup>2</sup> (Tableau 2.4). Les teneurs en Zn avec les MEI sont relativement faibles et dans certains cas trop basses pour un dosage précis des concentrations avec le type de plasma utilisé. Les corrélations entre les valeurs MEI et les méthodes chimiques sont significatives pour la fraction soluble et échangeable Zn-acétate ( $r = 0,31^*$ ), la fraction labile Zn-Mehlich-3 ( $r = 0,25^*$ ), la fraction dans les oxydes Zn-oxalate ( $r = 0,30^*$ ) et la fraction liée à la matière organique Zn-pyrophosphate ( $r = 0,51^{**}$ ) (Tableau 2.5).

- **Zinc résiduel**

On peut avoir un estimé du zinc résiduel présent dans la structure minérale du sol par différence entre le zinc total et le zinc extrait à l'oxalate plus celui extrait au pyrophosphate. Plus de 80 % du zinc serait dans cette fraction résiduelle. Cette proportion se compare à celle obtenue par Quian *et al.* (2003) au cours d'une expérience sur le fractionnement du zinc dans les sols suite aux apports de lisier de porcs en Saskatchewan.

- **Zinc mobile**

Pour caractériser le zinc soluble et facilement échangeable, représentant la fraction mobile, nous avons utilisé la méthode d'extraction à l'acétate d'ammonium 1 N. La teneur moyenne du zinc acétate des sols étudiés est de 0,02 mg/kg avec des extrêmes allant de 0 à 0,25 mg/kg (Tableau 2.4). Le rapport moyen d'extraction de Zn-acétate/Zn-total est de 0,03 %. Très peu de zinc mobile se retrouve dans les sols agricoles. L'accumulation de zinc dans la fraction mobile, représentée par les formes solubles et facilement échangeables, signifie un accroissement de la bio-disponibilité. La teneur en zinc extrait à l'acétate d'ammonium et la proportion de Zn-acétate/Zn-total sont des indicateurs intéressants pour caractériser la mobilité de cet élément dans les sols. Le zinc acétate corrèle assez bien avec Zn extrait par les autres méthodes chimiques, sauf Zn total (Tableau 2.5).

**Tableau 2.4 : Teneurs et distributions du zinc mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle**

Méthodes	Zinc				Percentiles				
	Moy.	É-T(±)	Min.	Max.	25	50	75	95	99
<b>MEI</b> <b>µg/cm<sup>2</sup></b>	0,10	0,05	0,02	0,25	0,06	0,09	0,12	0,20	0,23
<u>Fraction mobile (soluble)</u>									
<b>Acétate</b> <b>mg/kg</b>	0,02	0,04	0,00	0,25	0,01	0,04	0,09	0,12	0,18
<u>Fraction labile</u>									
<b>Mehlich-3</b> <b>mg/kg</b>	1,8	1,1	0,8	9,0	1,3	1,6	2,1	2,8	5,8
<b>HCl</b> <b>mg/kg</b>	3,3	1,8	1,1	12,6	2,2	2,9	4,0	5,8	9,7
<b>DTPA</b> <b>mg/kg</b>	1,1	0,6	0,4	4,8	0,7	1,0	1,2	1,8	3,2
<u>Fraction occlue dans les oxydes</u>									
<b>Oxalate</b> <b>mg/kg</b>	5,0	2,1	2,0	15,4	3,8	4,7	5,4	7,9	12,4
<u>Fraction liée aux matières organiques</u>									
<b>Pyrophos.</b> <b>mg/kg</b>	3,7	1,4	1,1	8,0	2,8	3,5	4,1	6,3	7,6
<u>Zinc total</u>									
<b>Total</b> <b>mg/kg</b>	62,8	24,7	15,5	117,1	44,1	57,9	83,0	104,5	115,4
<u>Dans les végétaux</u>									
<b>Concentration</b> <b>mg/kg</b>	24,7	6,4	11,2	39,3	21,1	23,8	29,2	34,9	38,1
<b>Prélèvement</b> <b>µg/pot</b>	351	120	99	667	275	319	409	563	622

**Tableau 2.5 : Matrice des corrélations du zinc extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle**

Zinc	MEI	Soluble	Fraction labile			Dans oxydes	Lié à MO	Total	Végétaux	
		Acétate	Mehlich-3	HCl	DTPA-TEA	Oxalate	Pyro		Concentration	Prélèvement
MEI	1									
Acétate	0,31*	1								
Mehlich-3	0,25*	0,81**	1							
HCl	0,04	0,74**	0,83**	1						
DTPA-TEA	0,21	0,85**	0,95**	0,88**	1					
Oxalate	0,30*	0,71**	0,85**	0,75**	0,84**	1				
Pyro	0,51**	0,63**	0,57**	0,42**	0,66**	0,72**	1			
Total	0,04	0,13	0,00	0,32*	0,18	0,24	0,47**	1		
Concentration	0,32*	0,06	0,02	0,05	0,02	0,11	0,03	0,04	1	
Prélèvement	0,34**	0,24	0,15	0,23	0,28*	0,13	0,38**	0,49**	0,58**	1

\* : significatif à p=0,05

\*\* : significatif à p=0,01

### 2.1.1.6 Résultats du manganèse

D'après Tisdale *et al.* (1985), la concentration moyenne en manganèse dans les sols est de 600 mg/kg avec un écart de 20 à 3000 mg/kg. On le retrouve sous plusieurs formes. C'est un constituant de plusieurs minéraux primaires et secondaires. Les formes oxydes sont également abondantes. Selon le pH du sol et le potentiel Redox, on retrouve les formes MnO, Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ou MnO<sub>2</sub>. La solubilité des formes réduites est plus élevée et se retrouve dans les sols acides. Le manganèse se retrouve aussi sous des formes liées aux matières organiques. Il peut alors être complexé fortement. La disponibilité du manganèse pour les cultures est plus réduite dans les sols riches en matière organique et de pH neutre ou basique. Le manganèse peut se retrouver sur le complexe d'échange cationique des sols et dans la solution du sol. Le chaulage des sols, en modifiant le pH, va affecter grandement les équilibres sol-solution et permettre de contrôler la disponibilité de cet élément dans les sols agricoles. Plusieurs propriétés des sols (pH, matière organique et potentiel Redox) doivent être prises en compte pour mesurer la mobilité du manganèse du sol. Ceci s'applique également aux autres ÉTM mais le phénomène est particulièrement marqué dans le cas du manganèse.

- **Manganèse total**

La teneur moyenne en manganèse total des sols étudiés est de 428 mg/kg, avec des extrêmes variant de 84 à 979 mg/kg (Tableau 2.6). Il n'y a pas de critères relatifs aux concentrations critiques de cet élément dans les sols agricoles. Les corrélations entre le Mn total et les autres méthodes vont de modérées à très bonnes (Tableau 2.7).



- **Manganèse oxalate**

La teneur moyenne du manganèse extrait à l'oxalate est de 228 mg/kg avec des extrêmes variant entre 32,3 et 576 mg/kg (Tableau 2.6). Le rapport moyen d'extraction du Mn-oxalate/Mn-total est de 53,3 %. Ceci démontre que les oxydes libres de manganèse représentent souvent la principale forme de cet élément dans les sols. Ces oxydes sont étroitement en contact avec la solution du sol. L'extraction à l'oxalate permet de connaître l'accumulation de ces oxydes, ce qui représente un intérêt certain dans la détermination de l'accumulation de cet élément dans la fraction minérale des sols. Les bonnes corrélations entre le Mn oxalate et les autres méthodes démontrent l'importance des oxydes libres dans les équilibres du sol (Tableau 2.7).

- **Manganèse pyrophosphate**

La teneur moyenne en manganèse extrait au pyrophosphate est de 69,1 mg/kg avec des extrêmes variant de 14,0 à 208 mg/kg (Tableau 2.6). Le rapport moyen d'extraction de Mn-pyro/Mn total est de 16,1 %. Les formes de manganèse liées aux matières organiques du sol peuvent donc être assez abondantes. L'extraction au pyrophosphate permet de connaître l'accumulation du Mn dans les fractions organiques. C'est donc une détermination importante à effectuer pour caractériser cet élément dans les sols. Les corrélations généralement assez élevées entre le Mn-pyro et les autres méthodes démontrent l'importance de caractériser cette fraction (Tableau 2.7).

- **Manganèse résiduel**

On peut avoir un estimé du manganèse résiduel présent dans les minéraux du sol, par différence entre le Mn total et le Mn oxalate plus le Mn-pyro. La teneur moyenne des formes résiduelles est de 130,9 mg/kg, soit près de 30,6 % du manganèse total. Pour cet élément, les formes résiduelles, incluses dans les minéraux primaires et secondaires des sols ne représentent pas la forme dominante.

- **Manganèse labile**

La teneur moyenne en Mn-Mehlich-3 des sols est de 29,0 mg/kg avec des extrêmes variant entre 4,3 et 129 mg/kg (Tableau 2.6). Le rapport moyen d'extraction de Mn-Mehlich-3/Mn-total est de 6,8 %. Ce rapport peut être utile pour identifier la proportion du manganèse sous forme labile dans les sols. Le Mn-Mehlich-3 corrèle bien avec Mn-HCl ( $r = 0,84$ ). La corrélation entre Mn Mehlich-3 et Mn DTPA-TEA est de ( $r = 0,68$ ) (Tableau 2.7).

$$\text{Mn HCl} = 1,191 \text{ Mn Mehlich-3} + 18,82 \quad r = 0,84$$

$$\text{Mn DTPA} = 0,425 \text{ Mn Mehlich-3} + 4,25 \quad r = 0,68$$

$$\text{Mn DTPA} = 0,341 \text{ Mn HCl} - 1,59r = 0,78$$

La teneur moyenne en manganèse extrait avec HCl est de 52,7 mg/kg avec des extrêmes variant de 11,4 à 125 mg/kg (Tableau 2.6). Le rapport moyen d'extraction de Mn-HCl/Mn total est de 12,3 %. La teneur moyenne en Mn-DTPA des sols est de 16,4 mg/kg avec des

extrêmes variant de 2,2 à 47,2 mg/kg (Tableau 2.6). Le rapport moyen d'extraction de Mn-DTPA/Mn-HCl est de 3,83 %.

Le manganèse dosé par la technique des MEI est en moyenne de 5,4 µg/cm<sup>2</sup> avec un minimum de 0,4 et un maximum de 23,3 µg/cm<sup>2</sup>. (Tableau 2.6). Les teneurs de Mn extrait par la technique des MEI sont plus élevées que celles des autres ÉTM et ne posent pas de problème de détermination avec le plasma utilisé. Les corrélations entre les valeurs de Mn-MEI et celles extraites par les méthodes chimiques sont significatives pour toutes les méthodes, variant de  $r = 0,38^{**}$  à  $0,60^{**}$ , sauf pour Mn total avec  $r = 0,23$  (Tableau 2.7).

- **Manganèse mobile**

La teneur moyenne en manganèse extrait à l'acétate d'ammonium est de 7,8 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,60 et 23,8 mg/kg. Cette méthode mesure le Mn soluble et le Mn facilement échangeable; elle représente la fraction mobile dans les sols. Les variations entre les sols sont importantes. Le rapport moyen d'extraction de Mn-acétate/Mn-total est de 1,8 %. La matrice des corrélations montre que le Mn-acétate corrèle très bien avec le Mn-DTPA ( $r = 0,97$ ) et assez bien avec Mn-Mehlich-3 ( $r = 0,58$ ), Mn-HCl ( $r = 0,67$ ), Mn-oxalate ( $r = 0,75$ ), Mn-pyro ( $r = 0,57$ ) et Mn-total ( $r = 0,76$ ) (Tableau 2.7).

**Tableau 2.6 : Teneurs et distributions du manganèse mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle**

Méthodes	Manganèse				Percentiles				
	Moy.	É-T(±)	Min.	Max.	25	50	75	95	99
<b>MEI</b> µg/cm <sup>2</sup>	5,4	5,6	0,4	23,4	1,4	4,1	6,8	16,2	23,3
<u>Fraction mobile (soluble)</u>									
<b>Acétate</b> mg/kg	7,8	6,1	0,6	23,8	3,0	5,9	11,4	20,0	23,4
<u>Fraction labile</u>									
<b>Mehlich-3</b> mg/kg	29,0	20,4	4,3	129	15,2	25,3	35,0	60,0	98,6
<b>HCl</b> mg/kg	52,7	25,1	11,4	125	29,3	56,6	69,9	91,0	109
<b>DTPA</b> mg/kg	16,4	10,9	2,2	47,2	7,5	14,3	24,2	34,3	42,6
<u>Fraction occlue dans les oxydes</u>									
<b>Oxalate</b> mg/kg	228	139,2	32,3	576	111,6	207,9	294,9	508,4	563
<u>Fraction liée aux matières organiques</u>									
<b>Pyrophos.</b> mg/kg	69,1	43,4	14,0	208	39,8	52,9	91,5	149,3	181
<u>Manganèse total</u>									
<b>Total</b> mg/kg	428	214,2	84	979	246,6	419,8	513,3	793,4	977
<u>Dans les végétaux</u>									
<b>Concentration</b> mg/kg	365,9	210,4	96,4	1168,4	204,3	320,4	473,3	705,7	1020
<b>Prélèvement</b> µg/pot	5224	3152	1052	15425	3063	4539	6455	11288	14197

**Tableau 2.7 : Matrice des corrélations du manganèse extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle**

Manganèse	MEI	Soluble	Fraction labile			Dans oxydes	Lié à MO	Total	Végétaux	
		Acétate	Mehlich-3	HCl	DTPA-TEA	Oxalate	Pyro		Concentration	Prélèvement
MEI	1									
Acétate	0,38**	1								
Mehlich-3	0,47**	0,58**	1							
HCl	0,34**	0,67**	0,84**	1						
DTPA-TEA	0,43**	0,97**	0,68**	0,78**	1					
Oxalate	0,42**	0,75**	0,70**	0,68**	0,74**	1				
Pyro	0,60**	0,57**	0,88**	0,77**	0,67**	0,73**	1			
Total	0,23	0,76**	0,49**	0,63**	0,72**	0,88**	0,51**	1		
Concentration	0,62**	0,31*	0,35**	0,10	0,29*	0,39**	0,49**	0,16	1	
Prélèvement	0,59**	0,50**	0,44**	0,28*	0,49**	0,48**	0,56**	0,31*	0,91**	1

\* : significatif à p=0,05

\*\* : significatif à p=0,01

### 2.1.1.7 Résultats du cadmium

- **Cadmium total**

La teneur moyenne en cadmium total des sols étudiés est de 0,43 mg/kg avec des extrêmes allant de 0,13 à 0,78 mg/kg (Tableau 2.8). Giroux *et al.* (1992) ont établi à 1,2 mg/kg dans les sols légers et 2,4 mg/kg dans les sols lourds, les niveaux critiques de cadmium dans les sols du Québec à partir de leur distribution dans les sols. Il semble que tous les sols de cette étude respectent ces critères et ne présentent pas de problèmes particuliers d'accumulation en cadmium.

- **Cadmium oxalate**

Le dosage du cadmium à l'oxalate n'a pu être effectué. Le cadmium précipite en présence d'oxalate et il n'est pas possible d'extraire ni de doser correctement le cadmium avec cette méthode.

- **Cadmium pyrophosphate**

La teneur moyenne en cadmium extrait au pyrophosphate est de 0,07 mg/kg avec des extrêmes allant de 0,02 à 0,15 mg/kg. Le rapport moyen de Cd-pyro/Cd-total est de 15,3 %. Les corrélations élevées entre le Cd-pyro et le Cd-Mehlich-3 ( $r = 0,74$ ), le Cd-HCl ( $r = 0,89$ ),

le Cd-DTPA ( $r = 0,87$ ) et le Cd-acétate ( $r = 0,76$ ), nous montrent que l'accumulation de Cd liée aux fractions organiques est en équilibre avec celle des autres fractions dans les sols.

- **Cadmium labile**

La teneur moyenne en Cd-Mehlich-3 des sols étudiés est de 0,08 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,03 et 0,35 mg/kg. Le rapport d'extraction moyen de Cd-Mehlich-3/Cd total est de 17,3 %. Il semble que la méthode Mehlich-3 puisse extraire une proportion élevée du cadmium total des sols. Le cadmium Mehlich-3 corrèle assez bien avec les autres méthodes sauf le Cd total (Tableau 2.9). La teneur moyenne en cadmium des sols extrait avec HCl est de 0,11 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,04 et 0,21. Le rapport moyen d'extraction de Cd-HCl/Cd-total est de 24,9 %. Les corrélations entre Cd-HCl et les autres méthodes vont de bonnes à très bonnes (Tableau 2.9). La teneur moyenne des sols en cadmium extrait avec DTPA-TEA est de 0,07 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,02 et 0,14 mg/kg. Le rapport moyen d'extraction de Cd-DTPA/Cd-total est de 15,3 %. La proportion du Cd labile par rapport au Cd total est plus élevée que pour les autres ÉTM. Une plus grande proportion du cadmium est labile peut être impliquée dans les équilibres sol-solution, malgré des teneurs totales relativement faibles dans les sols. Les corrélations entre Cd-DTPA et les autres méthodes sont très bonnes sauf pour Cd total (Tableau 2.9).

Les teneurs en cadmium déterminées par la technique des MEI sont trop faibles pour un dosage précis des concentrations avec le type de plasma utilisé (Tableau 2.8). Les corrélations entre les valeurs Cd-MEI et les méthodes chimiques ne peuvent donc être établies (Tableau 2.9). Une technique de dosage avec un appareil plus sensible est requise pour la détermination du cadmium avec les membranes échangeuses d'ions.

- **Cadmium mobile**

La teneur moyenne en cadmium des sols extrait à l'acétate est de 0,02 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,01 et 0,05 mg/kg. Le rapport moyen d'extraction de Cd acétate/Cd total est de 5,0 %. Ce rapport est plus élevé pour le cadmium que pour les autres ÉTM. Ceci signifie que les sols ont moins d'aptitude à fixer ou complexer le cadmium; il peut se retrouver plus facilement en solution ou en position échangeable et devenir plus facilement disponible. Compte tenu de sa grande toxicité et de sa plus grande mobilité, il faut accorder une importance particulière aux applications et aux teneurs en cadmium dans les sols. Les corrélations entre Cd acétate et les autres méthodes vont de bonnes à très bonnes (Tableau 2.9).

**Tableau 2.8 : Teneurs et distributions du cadmium mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle**

Méthodes	Cadmium				Percentiles					
	Moy.	É-T(±)	Min.	Max.	25	50	75	95	99	
<b>MEI</b> <b>µg/cm<sup>2</sup></b>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
<u>Fraction mobile (soluble)</u>										
<b>Acétate</b> <b>mg/kg</b>	0,02	0,01	0,01	0,05	0,01	0,02	0,03	0,04	0,04	
<u>Fraction labile</u>										
<b>Mehlich-3</b> <b>mg/kg</b>	0,08	0,05	0,03	0,35	0,05	0,07	0,10	0,12	0,24	
<b>HCl</b> <b>mg/kg</b>	0,11	0,04	0,04	0,21	0,08	0,10	0,13	0,18	0,20	
<b>DTPA</b> <b>mg/kg</b>	0,07	0,03	0,02	0,14	0,04	0,07	0,08	0,11	0,13	
<u>Fraction occlue dans les oxydes</u>										
<b>Oxalate</b> <b>mg/kg</b>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
<u>Fraction liée aux matières organiques</u>										
<b>Pyrophos.</b> <b>mg/kg</b>	0,07	0,04	0,02	0,15	0,04	0,07	0,08	0,12	0,13	
<u>Cadmium total</u>										
<b>Total</b> <b>mg/kg</b>	0,43	0,14	0,13	0,78	0,34	0,43	0,52	0,68	0,73	
<u>Dans les végétaux</u>										
<b>Concentration</b> <b>mg/kg</b>	0,18	0,07	0,10	0,43	0,14	0,17	0,21	0,33	0,41	
<b>Prélèvement</b> <b>µg/pot</b>	2,6	1,1	1,0	6,0	1,8	2,5	3,1	4,6	5,9	

**Tableau 2.9 : Matrice des corrélations du cadmium extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle**

Cadmium	MEI	Soluble	Fraction labile			Dans oxydes	Lié à MO	Total	Végétaux	
		Acétate	Mehlich-3	HCl	DTPA-TEA	Oxalate	Pyro		Concentration	Prélèvement
MEI	1									
Acétate	--	1								
Mehlich-3	--	0,74**	1							
HCl	--	0,77*	0,81**	1						
DTPA-TEA	--	0,78**	0,81**	0,94**	1					
Oxalate	--	--	--	--	--	1				
Pyro	--	0,76**	0,74**	0,89**	0,87**	--	1			
Total	--	0,58**	0,42**	0,69**	0,61**	--	0,59**	1		
Concentration	--	0,22	0,30*	0,13	0,15	--	0,16	0,10	1	
Prélèvement	--	0,58**	0,58**	0,51**	0,54**	--	0,53**	0,27*	0,75**	1

\* : significatif à p=0,05

\*\* : significatif à p=0,01

#### 2.1.1.8 Résultats du plomb

D'après Keeney et Wildung (1977), le plomb peut être présent dans les minéraux primaires et secondaires des sols. Ces formes sont immobiles. Il est aussi un élément très réactif avec les constituants minéraux et organiques du sol. La précipitation et l'occlusion aux oxydes minéraux du sol, la fixation et l'adsorption fortes sur des sites spécifiques, la complexation avec les matières organiques sont les principales fractions du plomb dans les sols. Le plomb en solution et en position facilement échangeable est très faible dans les sols.

- **Plomb total**

La teneur moyenne en plomb total des sols étudiés est de 9,9 mg/kg avec des extrêmes variant entre 3,3 et 18,4 mg/kg. Les sols argileux en contiennent plus que les autres sols.

- **Plomb oxalate**

Le plomb précipite en présence d'oxalate et il n'est pas possible d'extraire ni de doser le plomb avec cet extractif.

- **Plomb pyrophosphate**

La teneur moyenne du plomb extrait au pyrophosphate est de 1,3 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,2 et 4,4 mg/kg. Le rapport moyen d'extraction du Pb-pyro/Pb total est de

12,7 %. L'accumulation du plomb dans les sols va augmenter la fraction du plomb liée à la matière organique et accroître la proportion Pb-pyro/Pb total. Ces valeurs peuvent être utiles pour mesurer le niveau de contamination des formes organiques des sols.

- **Plomb labile**

Les trois méthodes utilisées pour caractériser le plomb labile des sols sont Mehlich-3, HCl 0,1 N et le chélat DTPA-TEA. Ces méthodes vont puiser dans les différentes fractions du plomb du sol pour extraire la fraction du plomb susceptible d'équilibrer les formes solubles et échangeables dites mobiles. Les méthodes Mehlich-3 et HCl sont fortement corrélées entre elles ( $r = 0,90$ ). Pour la méthode Mehlich-3, la teneur moyenne des sols est de 2,2 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,7 et 8,0 mg/kg (Tableau 2.10). Le rapport moyen d'extraction de Pb Mehlich-3/Pb total est de 22,3 %. Pour la méthode HCl, la teneur moyenne des sols est de 1,7 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,6 et 5,8 mg/kg. Le rapport moyen d'extraction de Pb HCl/Pb total est de 17,2 %. La méthode DTPA-TEA extrait moins de plomb que les deux autres méthodes avec une teneur moyenne dans les sols de 1,3 mg/kg et des extrêmes variant entre 0,3 et 2,7 mg/kg. Le rapport moyen d'extraction de Pb DTPA/Pb total est de 13,0 %. La corrélation entre Pb DTPA et Pb Mehlich-3 est de  $r = 0,72$  et celle entre Pb DTPA et Pb HCl de  $r = 0,66$  (Tableau 2.11). Les corrélations entre le plomb labile et les autres méthodes vont de modérées à bonnes.

- **Plomb mobile**

Le plomb mobile dans les sols a été extrait à l'acétate d'ammonium. Il représente la fraction soluble et celle facilement échangeable. La teneur moyenne des sols en plomb acétate est de 0,01 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0 et 0,04 mg/kg. Le rapport moyen d'extraction de Pb acétate/Pb total est de 0,1 %. Ceci démontre que très peu de plomb mobile se retrouve dans les sols. La grande capacité de fixation de cet élément par les sols fait en sorte qu'on en retrouve très peu dans la fraction mobile. Les corrélations entre les formes mobiles extraites à l'acétate et celles labiles extraites avec Mehlich-3 ( $r = 0,35$ ), avec HCl ( $r = 0,51$ ) et avec DTPA ( $r = 0,37$ ) sont faibles.

Les teneurs en plomb déterminées par la technique des MEI sont trop faibles pour un dosage précis avec le type de plasma utilisé. Les corrélations entre les valeurs Pb-MEI et les méthodes chimiques ne peuvent donc être établies. Une technique de dosage avec un appareil plus sensible est requise pour la détermination du plomb avec les membranes échangeuses d'ions. Un rappel des résultats antérieurs obtenus avec les méthodes d'extraction chimique est néanmoins présenté dans les Tableau 2.10 et Tableau 2.11.

**Tableau 2.10 : Teneurs et distributions du plomb mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle**

Méthodes	Plomb				Percentiles					
	Moy.	É-T(±)	Min.	Max.	25	50	75	95	99	
<b>MEI</b> <b>µg/cm<sup>2</sup></b>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
<u>Fraction mobile (soluble)</u>										
<b>Acétate</b> <b>mg/kg</b>	0,01	0,01	0,00	0,04	0,00	0,01	0,01	0,03	0,03	
<u>Fraction labile</u>										
<b>Mehlich-3</b> <b>mg/kg</b>	2,2	1,1	0,7	8,0	1,6	2,1	2,6	3,4	5,7	
<b>HCl</b> <b>mg/kg</b>	1,7	0,9	0,6	5,8	1,0	1,7	2,0	3,0	4,4	
<b>DTPA</b> <b>mg/kg</b>	1,3	0,6	0,3	2,7	0,9	1,3	1,6	2,4	2,6	
<u>Fraction occlue dans les oxydes</u>										
<b>Oxalate</b> <b>mg/kg</b>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
<u>Fraction liée aux matières organiques</u>										
<b>Pyrophos.</b> <b>mg/kg</b>	1,3	0,8	0,2	4,4	0,7	0,9	1,8	2,8	3,6	
<u>Plomb total</u>										
<b>Total</b> <b>mg/kg</b>	9,9	3,4	3,3	18,4	7,4	9,7	12,2	15,3	17,2	
<u>Dans les végétaux</u>										
<b>Concentration</b> <b>mg/kg</b>	0,02	0,13	0,00	0,29	0,00	0,01	0,03	0,17	0,27	
<b>Prélèvement</b> <b>µg/pot</b>	0,20	1,7	0,1	5,07	0,1	0,2	0,53	2,0	4,7	



**Tableau 2.11 : Matrice des corrélations du plomb extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle**

Plomb	MEI	Soluble	Fraction labile			Dans oxydes	Lié à MO	Total	Végétaux	
		Acétate	Mehlich-3	HCl	DTPA-TEA	Oxalate	Pyro		Concentration	Prélèvement
MEI	1									
Acétate	--	1								
Mehlich-3	--	0,35**	1							
HCl	--	0,51**	0,90**	1						
DTPA-TEA	--	0,37**	0,72**	0,66**	1					
Oxalate	--	--	--	--	--	1				
Pyro	--	0,37**	0,45**	0,57**	0,44**	--	1			
Total	--	0,30*	0,56**	0,50**	0,75**	--	0,50**	1		
Concentration	--	0,05	0,01	0,02	0,19	--	0,15	0,02	1	
Prélèvement	--	0,07	0,06	0,02	0,18	--	0,13	0,03	0,95**	1

\* : significatif à p=0,05

\*\* : significatif à p=0,01

#### 2.1.1.9 Résultats du Nickel

Pour le nickel, les formes présentes dans les sols sont les mêmes que pour plusieurs autres métaux. On en trouve dans les minéraux primaires et secondaires des sols. Le nickel se trouve également en occlusion dans les oxydes. Il complexe avec les matières organiques. Il peut être adsorbé sur les sites d'échange des minéraux argileux et de la matière organique.

- **Nickel total**

La teneur moyenne en nickel total des sols étudiés est de 25,4 mg/kg avec des extrêmes variant entre 3,3 et 56,7 mg/kg (Tableau 2.12). Certains sols du Québec où on trouve des minéraux ultrabasiques sont naturellement riches en nickel. Les sols très argileux en renferment également une quantité appréciable.

- **Nickel oxalate**

La teneur moyenne en nickel des sols extraits à l'oxalate est de 1,9 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,3 et 6,3 mg/kg (Tableau 2.12). Le rapport moyen de Ni oxalate/Ni total est de 7,5 %. Les formes de nickel liées aux oxydes sont assez faibles dans les sols. Ce rapport peut être utile pour déterminer des cas d'accumulation dans la fraction minérale des sols. Le Ni oxalate corrèle très bien avec le Ni Mehlich-3, HCl, DTPA et pyrophosphate mais assez peu avec le Ni total (Tableau 2.13). Ceci démontre l'intérêt de caractériser la fraction de Ni liée aux oxydes dans les sols car il semble que ces formes contribuent aux équilibres du sol.

- **Nickel pyrophosphate**

La teneur moyenne en nickel extrait au pyrophosphate des sols étudiés est de 0,9 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,2 et 3,9 mg/kg (Tableau 2.12). Le rapport moyen d'extraction de Ni-pyro/Ni total est de 3,5 %. Il semble qu'on retrouve généralement assez peu de nickel lié aux matières organiques des sols. L'accroissement de ce rapport peut toutefois mettre en évidence des cas d'accumulation de nickel dans la fraction organique des sols. Le Ni-pyro corrèle très bien avec les méthodes d'extraction Mehlich-3, HCl, DTPA et oxalate mais assez peu avec le Ni total (Tableau 2.13). Ceci démontre l'intérêt de caractériser les formes de Ni liées aux matières organiques dans les sols car ces formes semblent contribuer aux équilibres du sol.

- **Nickel résiduel**

Le nickel présent dans le réseau cristallographique des minéraux primaires et secondaires des sols est la fraction la plus abondante dans les sols. On peut avoir un estimé de ces formes résiduelles par la différence entre le nickel total et le nickel extrait à l'oxalate plus celui extrait au pyrophosphate. La teneur moyenne de Ni résiduel est de 22,6 mg/kg. Le rapport moyen de Ni résiduel/Ni total est de 89,0 %. Ceci démontre que les formes immobiles, incluses dans les minéraux du sol sont très dominantes.

- **Nickel labile**

La teneur moyenne en nickel des sols extrait avec la méthode Mehlich-3 est de 0,5 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,1 et 2,5 mg/kg (Tableau 2.12). Le rapport moyen d'extraction de Ni Mehlich-3/Ni total est de 2,0 %. La teneur des sols en Ni Mehlich-3 corrèle très bien avec celle de Ni HCl ( $r = 0,91$ ) et Ni DTPA ( $r = 0,90$ ) (Tableau 2.13). La méthode d'extraction avec HCl extrait cependant plus de Ni que les méthodes Mehlich-3 et DTPA. La teneur moyenne de Ni HCl est de 0,9 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,1 et 4,3 mg/kg (Tableau 2.12). Le rapport moyen d'extraction de Ni HCl/Ni total est de 3,5 %. Le Ni HCl corrèle très bien avec le Ni DTPA ( $r = 0,97$ ). La teneur moyenne des sols en Ni DTPA est de 0,5 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,05 et 2,5 mg/kg (Tableau 2.12). Le rapport moyen d'extraction de Ni DTPA/Ni total est de 2,0 %. Le Ni DTPA corrèle très bien avec les autres méthodes étudiées, sauf Ni total (Tableau 2.13).

Le nickel dosé par la technique des MEI présente une moyenne de 0,03  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  avec un minimum de 0,00 et un maximum de 0,14  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Tableau 2.12). Les teneurs sont parfois trop faibles pour un dosage précis des concentrations avec le type de plasma utilisé. Les corrélations entre Ni-MEI et les méthodes chimiques sont significatives sauf pour Ni total (Tableau 2.13).

- **Nickel mobile**

Il n'a pas été possible de doser le nickel extrait à l'acétate d'ammonium, représentant les formes solubles et facilement échangeables. Les concentrations sont trop faibles et inférieures à la limite de détection.

**Tableau 2.12 : Teneurs et distributions du nickel mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle**

Méthodes	Nickel				Percentiles					
	Moy.	É-T(±)	Min.	Max.	25	50	75	95	99	
<b>MEI</b> <b>µg/cm<sup>2</sup></b>	0,03	0,02	0,00	0,14	0,02	0,03	0,04	0,07	0,10	
<u>Fraction mobile (soluble)</u>										
<b>Acétate</b> <b>mg/kg</b>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
<u>Fraction labile</u>										
<b>Mehlich-3</b> <b>mg/kg</b>	0,5	0,4	0,1	2,5	0,3	0,4	0,6	1,1	2,1	
<b>HCl</b> <b>mg/kg</b>	0,9	0,8	0,1	4,3	0,4	0,7	1,1	2,4	3,6	
<b>DTPA</b> <b>mg/kg</b>	0,5	0,4	0,05	2,5	0,2	0,3	0,5	1,0	2,1	
<u>Fraction occlue dans les oxydes</u>										
<b>Oxalate</b> <b>mg/kg</b>	1,9	1,4	0,3	6,3	1,0	1,5	2,3	5,3	6,2	
<u>Fraction liée aux matières organiques</u>										
<b>Pyrophos.</b> <b>mg/kg</b>	0,9	0,7	0,2	3,9	0,4	0,7	1,1	2,1	3,3	
<u>Nickel total</u>										
<b>Total</b> <b>mg/kg</b>	25,4	13,5	3,3	56,7	15,3	23,3	33,8	51,8	56,6	
<u>Dans les végétaux</u>										
<b>Concentration</b> <b>mg/kg</b>	2,0	1,0	0,7	5,0	1,3	1,7	2,4	4,0	4,8	
<b>Prélèvement</b> <b>µg/pot</b>	29	17	8,4	76	15,4	23,4	37	63	74	

**Tableau 2.13 : Matrice des corrélations du nickel extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle**

Nickel	MEI	Soluble		Fraction labile			Dans oxydes	Lié à MO	Total	Végétaux	
		Acétate	Mehlich-3	HCl	DTPA-TEA	Oxalate	Pyro	Concentration		Prélèvement	
MEI	1										
Acétate	--	1									
Mehlich-3	0,48**	--	1								
HCl	0,25*	--	0,91**	1							
DTPA-TEA	0,36**	--	0,90**	0,97**	1						
Oxalate	0,25*	--	0,88**	0,92**	0,84**	1					
Pyro	0,30*	--	0,80**	0,85**	0,84**	0,88**	1				
Total	0,12	--	0,44**	0,58**	0,53**	0,64**	0,54**	1			
Concentration	0,54**	--	0,49**	0,27*	0,28*	0,37**	0,34**	0,09	1		
Prélèvement	0,50**	--	0,56**	0,46**	0,48**	0,49**	0,50**	0,23	0,87**	1	

\* : significatif à p=0,05

\*\* : significatif à p=0,01

#### 2.1.1.10 Résultats du Chrome

Le chrome se retrouve dans les sols sous forme de minéraux comme la chromite ( $\text{Fe Cr}_2\text{O}_4$ ). On en trouve complexé avec les fractions organiques et présentes en occlusion dans les fractions oxydes. Il peut s'en trouver sur le complexe d'échange sous forme  $\text{Cr}^{+++}$ . Contrairement à plusieurs métaux, le chrome se trouve aussi sous forme anionique, principalement des chromates ( $\text{CrO}_4^-$ ) dans les sols.

- **Chrome total**

La teneur moyenne en chrome total des sols étudiés est de 38,7 mg/kg avec des extrêmes variant entre 6,3 et 109,4 mg/kg (Tableau 2.14). Certains sols contiennent des quantités appréciables de chrome, probablement des chromites, en association avec la serpentine et l'olivine.

- **Chrome labile**

La teneur moyenne en chrome extrait avec la méthode Mehlich-3 est de 0,3 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,09 et 1,0 mg/kg (Tableau 2.14). Le rapport moyen d'extraction de Cr Mehlich-3/Cr total est de 0,8 %. Une faible portion du chrome se trouve sous forme labile dans les sols. Le Cr Mehlich-3 corrèle bien avec Cr HCl ( $r = 0,78$ ) et Cr oxalate ( $r = 0,76$ ) et un peu moins bien avec Cr DTPA-TEA ( $r = 0,66$ ) et Cr pyrophosphate ( $r = 0,61$ ) (Tableau 2.15). La teneur moyenne en chrome extrait avec la méthode HCl est de 0,4 mg/kg avec des

extrêmes variant entre 0,1 et 0,9 mg/kg (Tableau 2.14). Le rapport moyen d'extraction Cr HCl/Cr total est de 0,98 %. La teneur moyenne de Cr DTPA est de 0,03 mg/kg avec des extrêmes variant de 0 à 0,05 mg/kg (Tableau 2.14). Cette méthode extrait très faiblement le chrome. La présence du chrome sous forme de chromates dans les sols n'est pas adaptée à l'extraction par chélation au DTPA. C'est sans doute ce qui explique la faible capacité d'extraction de cette méthode. Elle ne serait donc pas appropriée pour la détermination du chrome dans les sols.

Les teneurs en chrome déterminées par la technique des MEI sont trop faibles pour un dosage précis avec le type de plasma utilisé. Les corrélations entre les valeurs Cr-MEI et les méthodes chimiques ne peuvent donc être établies. Une technique de dosage avec un appareil plus sensible est requise pour la détermination du chrome avec les membranes échangeuses d'ions. Ces très faibles teneurs de Cr MEI peuvent s'expliquer par le fait que le chrome dans les sols se trouve en bonne partie sous forme de chromate ( $\text{CrO}_4^{--}$ ) qui est un anion. Le chrome sous cette forme n'est pas adsorbé par les membranes cationiques chargées négativement.

- **Chrome mobile**

Le chrome soluble et échangeable extrait à l'acétate d'ammonium à pH 7 est en trop faible concentration pour être dosé au plasma dans la majorité des sols étudiés.

- **Chrome oxalate**

La teneur moyenne en chrome extrait à l'oxalate est de 3,2 mg/kg avec des extrêmes variant entre 1,0 et 8,8 mg/kg (Tableau 2.14). Le rapport moyen Cr oxalate/Cr total est de 8,3 %. Le Cr oxalate corrèle bien avec Cr Mehlich-3, Cr HCl et Cr pyrophosphate, mais moins bien avec Cr DTPA (Tableau 2.15).

- **Chrome pyrophosphate**

La teneur moyenne en chrome extrait au pyrophosphate est de 2,5 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,3 et 9,2 mg/kg (Tableau 2.14). Le rapport moyen Cr pyrophosphate/Cr total est de 6,5 %. L'accroissement de ce rapport peut mettre en évidence des cas d'accumulation dans la fraction organique des sols. Le Cr pyrophosphate corrèle bien avec Cr Mehlich-3, Cr HCl et Cr oxalate mais moins bien avec Cr DTPA et Cr total (Tableau 2.15).

- **Chrome résiduel**

Le chrome résiduel présent dans les minéraux primaires et secondaires des sols représente la fraction la plus importante dans le sol. La fraction résiduelle mesurée par la différence entre le chrome total et le chrome oxalate plus le chrome pyrophosphate est en moyenne de 33,0 mg/kg soit 85 % du chrome total.

**Tableau 2.14 : Teneurs et distributions du chrome mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle**

Méthodes	Chrome				Percentiles				
	Moy.	É-T(±)	Min.	Max.	25	50	75	95	99
<b>MEI</b> <b>µg/cm<sup>2</sup></b>	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<u>Fraction mobile (soluble)</u>									
<b>Acétate</b> <b>mg/kg</b>	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<u>Fraction labile</u>									
<b>Mehlich-3</b> <b>mg/kg</b>	0,3	0,15	0,09	1,0	0,21	0,27	0,42	0,50	0,75
<b>HCl</b> <b>mg/kg</b>	0,4	0,20	0,1	0,9	0,22	0,36	0,53	0,74	0,86
<b>DTPA</b> <b>mg/kg</b>	0,03	0,01	0,00	0,05	0,02	0,03	0,04	0,05	0,05
<u>Fraction occlue dans les oxydes</u>									
<b>Oxalate</b> <b>mg/kg</b>	3,2	1,6	1,0	8,8	1,9	2,9	4,1	5,9	7,6
<u>Fraction liée aux matières organiques</u>									
<b>Pyrophos.</b> <b>mg/kg</b>	2,5	1,7	0,3	9,2	1,2	2,2	3,2	5,3	7,6
<u>Chrome total</u>									
<b>Total</b> <b>mg/kg</b>	38,7	28,7	6,3	109,4	18,8	27,8	56,2	97,4	109,0
<u>Dans les végétaux</u>									
<b>Concentration</b> <b>mg/kg</b>	0,21	0,11	0,10	0,84	0,15	0,20	0,23	0,36	0,67
<b>Prélèvement</b> <b>µg/pot</b>	2,9	1,2	1,3	7,8	2,2	2,6	3,6	4,8	6,6

**Tableau 2.15 : Matrice des corrélations du chrome extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle**

Chrome	MEI	Soluble		Fraction labile		Dans oxydes	Lié à MO	Total	Végétaux	
		Acétate	Mehlich-3	HCl	DTPA-TEA	Oxalate	Pyro		Concentration	Prélèvement
MEI	1									
Acétate	--	1								
Mehlich-3	--	--	1							
HCl	--	--	0,78**	1						
DTPA-TEA	--	--	0,66**	0,71**	1					
Oxalate	--	--	0,76**	0,78**	0,54**	1				
Pyro	--	--	0,61**	0,71**	0,57**	0,78**	1			
Total	--	--	0,60**	0,82**	0,78**	0,70**	0,57**	1		
Concentration	--	--	0,19	0,32*	0,26*	0,12	0,25*	0,24	1	
Prélèvement	--	--	0,17	0,20	0,04	0,05	0,04	0,08	0,79**	1

\* : significatif à p=0,05

\*\* : significatif à p=0,01

#### 2.1.1.11 Résultats du Cobalt

Les formes du cobalt dans les sols sont similaires à celles du cuivre, du manganèse et du zinc. On en trouve une quantité appréciable dans certains minéraux primaires du sol. Il complexe facilement avec les matières organiques. On en trouve en occlusion dans la fraction des oxydes minéraux. Il se fixe fortement aux argiles. On en trouve peu en position échangeable et dans la solution du sol.

- **Cobalt total**

La teneur moyenne en cobalt total des sols étudiés est de 12,0 mg/kg avec des extrêmes variant entre 2,7 et 28,3 mg/kg (Tableau 2.16). Tisdale *et al.* (1985) mentionnent que la teneur moyenne des sols est d'environ 8 mg/kg mais qu'elle peut varier selon les régions entre 1 et 70 mg/kg.

- **Cobalt oxalate**

La teneur moyenne en cobalt extrait à l'oxalate des sols étudiés est de 2,8 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,3 et 8,5 mg/kg (Tableau 2.16). Le rapport moyen de Co oxalate/Co total est de 23,1 %. Le cobalt dans les fractions oxydes est relativement abondant dans les sols. La corrélation entre Co oxalate et Co total est élevée (r = 0,82). Elle est également assez bonne entre Co oxalate et Co acétate (r = 0,66). Elle est assez modérée pour les autres méthodes (Tableau 2.17).

- **Cobalt pyrophosphate**

La teneur moyenne en cobalt extrait au pyrophosphate des sols étudiés est de 0,6 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,1 et 1,4 mg/kg (Tableau 2.16). Le rapport moyen Co-pyro/Co total est de 4,9 %. On retrouve généralement assez peu de cobalt dans les fractions organiques. Les corrélations entre Co-pyro et les autres méthodes sont modérées ( $r = 0,42$  à  $r = 0,52$ ) (Tableau 2.17).

- **Cobalt résiduel**

Le cobalt présent dans le réseau cristallographique des minéraux primaires et secondaires des sols constitue des formes immobiles. On peut avoir un estimé de ces formes résiduelles par la différence entre le cobalt total et le cobalt oxalate plus celui extrait au pyrophosphate. La teneur moyenne de Co résiduel est de 8,7 mg/kg, soit 72,1 % du cobalt total. Ces formes résiduelles représentent la principale fraction du cobalt des sols.

- **Cobalt labile**

La teneur en cobalt extrait avec la méthode Mehlich-3 est de 0,3 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,03 et 1,8 mg/kg (Tableau 2.16). Le rapport moyen d'extraction de Co Mehlich-3/ Co total est de 2,2 %. La teneur des sols en Co Mehlich-3 corrèle assez peu avec celle des autres méthodes (Tableau 2.17). La teneur moyenne en cobalt extrait avec la méthode HCl est en moyenne de 0,7 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,07 et 1,8 mg/kg (Tableau 2.16). Elle extrait 2 à 3 fois plus de cobalt que la méthode Mehlich-3 et environ 10 fois plus que la méthode DTPA-TEA. Le rapport moyen Co HCl/Co total est de 5,8 %. Le Co HCl corrèle assez bien avec le Co DTPA ( $r = 0,74$ ) et le Co total ( $r = 0,68$ ) et moins bien avec les autres méthodes (Tableau 2.17). La teneur moyenne de Co extrait au DTPA est de 0,07 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,01 et 0,22 mg/kg (Tableau 2.16). Le rapport moyen d'extraction de Co DTPA/ Co total est de 0,6 %. Le cobalt extrait avec DTPA corrèle très bien avec Co acétate ( $r = 0,87$ ), Co HCl ( $r = 0,74$ ) et Co total ( $r = 0,72$ ). Les corrélations avec les autres méthodes sont modérées (Tableau 2.17).

Le cobalt dosé par la technique des MEI donne en moyenne 0,03  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  avec un minimum de 0,00 et un maximum de 0,15  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Tableau 2.16). Les teneurs sont parfois trop faibles pour un dosage précis des concentrations avec le type de plasma utilisé. Les corrélations entre les valeurs Co-MEI et celles extraites par les méthodes chimiques sont significatives pour la fraction soluble et échangeable Co-acétate ( $r = 0,32^*$ ), la fraction labile Co-Mehlich-3 ( $r = 0,35^{**}$ ) et Co-DTPA ( $r = 0,25^*$ ) et la fraction liée à la matière organique Co-pyro ( $r = 0,37^{**}$ ) (Tableau 2.17).

- **Cobalt mobile**

Il y a très peu de cobalt extractible à l'acétate dans les sols agricoles étudiés. La teneur moyenne des sols est de 0,01 mg/kg avec des extrêmes variant entre 0,00 et 0,04 mg/kg (Tableau 2.16). Le rapport moyen d'extraction de Co acétate/Co total est de 0,11 %. Le cobalt extrait à l'acétate corrèle très bien avec Co DTPA-TEA ( $r = 0,87$ ), Co total ( $r = 0,75$ )



et Co oxalate ( $r = 0,66$ ). Les corrélations avec les autres méthodes sont moins élevées (Tableau 2.17).

**Tableau 2.16 : Teneurs et distributions du cobalt mesurées dans les sols selon différentes méthodes d'analyse et mesures des concentrations et des prélèvements par le dactyle**

Méthodes	Cobalt				Percentiles					
	Moy.	É-T(±)	Min.	Max.	25	50	75	95	99	
<b>MEI</b> <b>µg/cm²</b>	0,03	0,03	0,00	0,15	0,01	0,02	0,04	0,07	0,12	
<u>Fraction mobile (soluble)</u>										
<b>Acétate</b> <b>mg/kg</b>	0,01	0,01	0,00	0,04	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	
<u>Fraction labile</u>										
<b>Mehlich-3</b> <b>mg/kg</b>	0,3	0,25	0,03	1,8	0,15	0,22	0,29	0,56	1,18	
<b>HCl</b> <b>mg/kg</b>	0,7	0,39	0,07	1,8	0,42	0,70	0,88	1,42	1,72	
<b>DTPA</b> <b>mg/kg</b>	0,07	0,05	0,01	0,22	0,04	0,06	0,11	0,16	0,19	
<u>Fraction occlue dans les oxydes</u>										
<b>Oxalate</b> <b>mg/kg</b>	2,8	1,9	0,3	8,5	1,3	2,4	3,5	5,9	8,3	
<u>Fraction liée aux matières organiques</u>										
<b>Pyrophos.</b> <b>mg/kg</b>	0,6	0,28	0,1	1,4	0,42	0,59	0,74	1,07	1,26	
<u>Cobalt total</u>										
<b>Total</b> <b>mg/kg</b>	12,0	6,2	2,7	28,3	7,8	10,3	14,9	23,7	27,6	
<u>Dans les végétaux</u>										
<b>Concentration</b> <b>mg/kg</b>	0,79	0,85	0,24	6,41	0,44	0,61	0,81	1,79	5,9	
<b>Prélèvement</b> <b>µg/pot</b>	11	13	2	98	6	8	13	23	78	

**Tableau 2.17 : Matrice des corrélations du cobalt extrait avec les méthodes d'extraction chimique, les membranes échangeuses d'ions (MEI), les concentrations et les prélèvements par le dactyle**

Cobalt	MEI	Soluble	Fraction labile			Dans oxydes	Lié à MO	Total	Végétaux	
		Acétate	Mehlich-3	HCl	DTPA-TEA	Oxalate	Pyro		Concentration	Prélèvement
<b>MEI</b>	1									
<b>Acétate</b>	0,32*	1								
<b>Mehlich-3</b>	0,35**	0,14	1							
<b>HCl</b>	0,03	0,52**	0,24	1						
<b>DTPA-TEA</b>	0,25*	0,87**	0,18	0,74**	1					
<b>Oxalate</b>	0,15	0,66**	0,18	0,46**	0,53**	1				
<b>Pyro</b>	0,37**	0,44**	0,47**	0,50**	0,53**	0,48**	1			
<b>Total</b>	0,01	0,76**	0,01	0,68**	0,72**	0,82**	0,42**	1		
<b>Concentration</b>	0,33**	0,11	0,02	0,10	0,02	0,04	0,06	0,03	1	
<b>Prélèvement</b>	0,31**	0,24	0,03	0,01	0,15	0,10	0,17	0,06	0,97**	1

\* : significatif à p=0,05

\*\* : significatif à p=0,01

### 2.1.1.12 Conclusions

Les résultats sur la comparaison des méthodes d'extraction ont démontré qu'il existe généralement une bonne relation entre les ÉTM contenus dans les diverses fractions des sols. La détermination des ÉTM de la fraction labile permet de déterminer la quantité d'un élément en mesure d'équilibrer la solution du sol. Il est possible d'établir la répartition des ÉTM d'un sol par une procédure de fractionnement et de déterminer s'il exerce un contrôle approprié de leur mobilité. Des critères, basés sur la distribution des ÉTM dans 64 séries de sols du Québec, ont été établis à cette fin.

L'étude sur le dosage des ÉTM par la technique des MEI ne s'est pas montrée très concluante. Les ÉTM sont très fortement retenus par les sols, sont peu mobiles et diffusent très peu. Les quantités adsorbées sur les MEI sont alors très faibles et se situent souvent sous la limite de détection du plasma utilisé. Ainsi, le cadmium, le plomb et le chrome adsorbés par les MEI n'ont pu être analysés, à cause de leur trop faible teneur sur les MEI. De plus, les teneurs en cuivre, zinc, nickel et cobalt ont été assez souvent sous de la limite de détection du plasma utilisé, ce qui a limité la fiabilité des résultats. Seul le manganèse n'a posé aucun problème de détermination par les MEI. Il apparaît donc que ce genre d'étude nécessite l'utilisation d'un appareil de dosage encore plus sensible que les plasmas fonctionnant par spectrométrie d'émission : les appareils par spectrométrie de masse au plasma, avec une limite de détection plus basse, seraient plus appropriés à l'étude des ÉTM par la technique des membranes échangeuses d'ions. À l'issue de ces essais, il est donc impossible de nous prononcer sur la valeur de cette technique de dosage des ÉTM pour Cd, Pb et Cr. Pour les éléments Cu, Zn et Ni, des critères ont été établis, avec une précision assez faible. Cependant, les teneurs en manganèse extrait par les MEI sont plus élevés que pour les autres ÉTM. La précision des résultats est meilleure et les corrélations avec les méthodes chimiques sont plus élevées pour Mn.

### 2.1.2 Mesure des transferts des ÉTM *in situ*

Cette activité a pour objectif l'étude des changements dans la mobilité, le fractionnement, les flux et l'absorption des ÉTM pour les plantes, suite à des applications répétées de matières exogènes. Les applications répétées de matières fertilisantes peuvent changer le profil de fractionnement des ÉTM dans les sols. Les métaux peuvent migrer en profondeur, s'accumuler dans la couche arable, être prélevés par les récoltes ou être transportés par les eaux de ruissellement. On ignore également les équilibres qui vont s'établir à long terme dans les sols. C'est donc dans le but de mieux comprendre ce qu'il advient à long terme des ÉTM appliqués aux sols que cette étude a été effectuée.

#### 2.1.2.1 Méthodologie de mesure des transferts des ÉTM *in situ*

Cette étude s'est déroulée en 2002 sur les deux sites de l'Observatoire de la qualité des sols du Québec à Saint-Lambert de Lauzon. Des parcelles expérimentales sont en place dans ces champs depuis 10 ans et sont soumises à des modes de fertilisation et des systèmes culturaux différents. Nous avons choisi ces sites parce qu'ils sont instrumentés de systèmes de captage des eaux de drainage souterrain et de ruissellement de surface et que les données agronomiques nécessaires au suivi des ÉTM sont connues. Il s'agit d'établir le bilan annuel

des apports et des pertes des ÉTM pour deux cultures, prairie et maïs-grain, selon des modes de fertilisation avec des engrais minéraux et organiques. Un suivi analytique des ÉTM totaux et labiles mesurés avec la méthode Mehlich-3 a également été effectué afin de vérifier l'aptitude de ces méthodes à révéler les accumulations dans les sols agricoles après 10 ans de cultures sous les divers modes de fertilisation.

Le premier site est une prairie de luzerne-mil, constitué de quatre parcelles de 2240 m<sup>2</sup>. Chaque parcelle reçoit une fertilisation différente, soit une fumure minérale, du fumier de bovins laitiers, du fumier de poulets et du lisier de porcs. Les engrais sont appliqués en juin après la première coupe de foin. Il s'agit d'un loam limoneux de la série Le Bras. Le second site est un champ de maïs-grain, constitué de trois parcelles de 1100 m<sup>2</sup>. Chaque parcelle reçoit une fumure différente, soit une fumure minérale, du lisier de porcs ou du fumier de bovins laitiers. L'épandage des engrais se fait au printemps en pré-semis incorporé. Une quantité d'azote minéral de 50 kg/ha est appliqué comme fumure de démarrage au semis dans toutes les parcelles. Les engrais appliqués ont été analysés pour leur teneur en éléments nutritifs et en ÉTM. Une calibration précise des doses d'épandage est effectuée pour chaque parcelle de sorte qu'il est possible d'établir les charges d'ÉTM appliquées par hectare. La texture du sol correspond à un loam limono-argileux de la série Le Bras. Le travail du sol est effectué par un labour conventionnel à 20 cm de profondeur à l'automne et complété par un passage de herse à disque et d'un vibroculteur au printemps. La description des propriétés physiques et chimiques est présentée au Tableau 2.18.

La précipitation moyenne annuelle mesurée à la station d'Environnement Canada de Scott, située la plus près à 7 km du site expérimental, est de 1126 mm pour la précipitation totale, dont 252 mm sous forme solide. Pour l'année 2002, les précipitations pendant la période de mesure, du ruissellement allant du début avril à la fin novembre, ont été de 652 mm, valeur près de la normale de 682 mm malgré un été particulièrement sec. Elles ont provoqué peu de ruissellement. Durant cette période, les précipitations ont été de faible intensité et de récurrence inférieure à 2 ans. La période de la fonte des neiges est celle qui a produit le plus de ruissellement. Globalement, le ruissellement de 2002 a été faible.

**Tableau 2.18 : Caractéristiques physiques et chimiques des sols des parcelles**

Description des types de fumure	Superficies des parcelles	Pente (%)	M.O. (%)	pH	Mehlich-3			
					P (mg/kg)	K (mg/kg)	Al (mg/kg)	P/Al (%)
<b>Prairie</b>								
Fumure minérale	2240	2,8	2,64	6,15	21	63	1286	1,63
Fumier de bovins laitiers	2240	2,5	3,07	6,20	17	81	1277	1,33
Fumier de poulets	2240	1,8	3,29	6,28	46	64	1286	3,58
Lisier de porcs	2240	1,1	2,99	6,49	33	64	1237	2,67
<b>Maïs-grain</b>								
Fumure minérale	1150	0,7	2,70	6,66	33	82	1184	2,79
Fumier de bovins laitiers	1140	0,5	4,48	5,98	25	331	1390	1,80
Lisier de porcs	1100	0,7	2,61	6,97	31	92	781	3,97

- **Collecte et mesure des eaux des drains souterrains**

Chaque parcelle comporte deux lignes de drains souterrains espacées de 7 mètres. Les lignes sont conduites vers des puits où se trouvent des instruments de mesure du volume et des échantillonneurs d'eau. La mesure du volume des eaux de drainage est réalisée à l'aide d'augets à bascule d'un litre reliés à un compteur électronique. Une petite fraction de l'eau drainée est dirigée en continu par un tube de 0,5 mm de diamètre vers un contenant de 4 L dans lequel sont prélevés des échantillons de 500 ml une fois par semaine. Ces échantillons sont envoyés au laboratoire d'analyse des sols et des eaux de l'IRDA pour leur détermination hebdomadaire en ÉTM totaux et solubles. La charge des ÉTM perdus aux drains est calculée en multipliant le volume d'eau hebdomadaire par la teneur en ÉTM des échantillons. Les charges annuelles et saisonnières sont établies en cumulant les charges hebdomadaires pour la saison ou l'année. Les données présentées vont du 1er janvier 2002 au 31 décembre 2002.

- **Collecte et mesure des eaux de ruissellement de surface**

Une équipe de recherche du Département des sols et génie agroalimentaire de l'Université Laval (Gallichand et Goulet) a procédé à l'instrumentation des parcelles pour la mesure des eaux de ruissellement. La parcelle fertilisée au fumier de bovins dans le champ de maïs-grain n'a pas été instrumentée pour la mesure des eaux de ruissellement. Grâce à leurs installations, nous avons pu bénéficier dans le cadre de ce projet des analyses des eaux de surface. Chaque parcelle est entourée d'une petite digue en terre de 15 cm, pour éviter l'arrivée d'eau de l'extérieur des parcelles. À l'exutoire de chaque parcelle, des installations de captage et de mesure des eaux de ruissellement sont en place dans un cabanon isolé. Ces instruments comprennent une trappe à sédiments munie d'un déversoir triangulaire de 10 degrés d'angle. Une sonde ultrasonique mesure en continu la hauteur de l'eau dans le

réservoir et envoie le signal à un ordinateur qui convertit ces données en volume d'eau ruisselée. Un signal est également envoyé à un système électronique d'échantillonnage qui procède au prélèvement des eaux proportionnellement au débit ruisselé. Les échantillons sont conservés à 4°C avant leur analyse pour les ÉTM solubles et totaux. La période de mesure pour le ruissellement va du début avril à la fin novembre. Certaines difficultés de fonctionnement du système de mesure du ruissellement en début de saison nous amènent à fournir un estimé de la lame de ruissellement de 4 cm pour la prairie et de 6 cm pour le maïs-grain. Il n'est pas possible de la préciser davantage pour chacune des parcelles. Des données de ruissellement recueillies sur le même sol pendant la même période par une autre équipe de recherche, nous indiquent qu'il s'agit d'une valeur moyenne réaliste pour la période (Coté, D., 2003).

- **Exportation par les récoltes**

Pour la prairie, deux coupes de foin sont effectuées annuellement. Pour chacune des coupes, une détermination du rendement est effectuée en récoltant à l'aide d'une fourragère une superficie de 20 m<sup>2</sup>. La quantité de matière sèche produite par hectare pour chacune des coupes est établie et un échantillon est envoyé au laboratoire pour la détermination de la teneur en ÉTM totaux des fourrages. Une calcination suivie de la reprise des cendres à l'acide chlorhydrique permet la mise en solution des ÉTM qui sont dosés au plasma Perkin Elmer modèle 4300 DV. Les exportations par les récoltes sont mesurées en multipliant le rendement par la teneur en ÉTM de la récolte. Pour le maïs-grain, la superficie totale de chaque parcelle est récoltée par une moissonneuse-batteuse commerciale et le rendement en grains est calculé sur une base de matière sèche. Les grains sont analysés pour leur teneur en ÉTM par calcination et reprise des cendres. Les exportations par les grains sont calculées en multipliant le rendement par la teneur en ÉTM des grains. Nous avons également mesuré le rendement des tiges et leur teneur en ÉTM pour établir la quantité qui retourne aux sols lors du battage.

- **Bilan des ÉTM**

Le bilan est établi par différence entre les entrées (apport par les engrais) et les sorties (exportation par les récoltes, pertes aux drains et pertes dans les eaux de ruissellement). Une valeur positive est associée à une accumulation dans les sols.

#### *2.1.2.2 Concentrations et charges en ÉTM*

Les différentes concentrations et charges en ÉTM retrouvées dans les engrais minéraux et les engrais organiques, les concentrations et exportations des ÉTM par les récoltes, concentrations et charges des eaux de drainage ainsi que les concentrations et charges en ÉTM des eaux de ruissellement sont mesurées et annexées au rapport (Annexe B). La section qui suit ne présente que le bilan de ces derniers.

#### *2.1.2.3 Bilan des ÉTM*

Sans prétendre avoir mesuré le bilan global des ÉTM, les données prises sur les ÉTM des engrais, des cultures, des eaux de drainage souterrain et de ruissellement représentent des

postes importants du bilan des ÉTM dans les systèmes agricoles. Nous avons établi la différence entre les ÉTM totaux qui entrent dans les parcelles avec les fumures minérales et avec les engrais de ferme et ceux qui en sortent avec les récoltes, les eaux de drainage souterrain et de ruissellement dans une prairie et dans un champ de maïs-grain.

- **Prairie**

La prairie fertilisée avec la fumure minérale a montré un bilan négatif pour tous les ÉTM analysés (Tableau 2.19). Ceci signifie qu'il sort des champs plus d'ÉTM qu'il en entre. La différence est particulièrement importante pour le zinc (-223,2 g/ha), pour le manganèse (-273 g/ha) et pour le cuivre (-80,1 g/ha). Ces éléments sont essentiels en petite quantité pour le développement des plantes et des déficiences sont rapportées occasionnellement sur les cultures au Québec. Les champs qui sont fertilisés uniquement avec des fumures minérales sont plus à risque de démontrer des carences en ces éléments si les sols n'en sont pas bien pourvus.

La parcelle fertilisée au fumier de bovins laitiers montre un bilan négatif ou près de l'équilibre pour plusieurs ÉTM (Ni, Pb, Co, Cr et Cd). Ces éléments ne présentent donc pas de problématique d'accumulation dans les sols. Le bilan est positif pour le zinc (+ 445,1 g/ha), pour le manganèse (+390,4 g/ha) et pour le cuivre (72,9 g/ha). La situation est la même pour le fumier de poulets avec des bilans positifs pour le zinc de +165,7 g/ha, de +618,1 g/ha pour le manganèse et de +118,8 g/ha pour le cuivre. Il est à noter que ce bilan positif a été obtenu avec des doses d'épandage de seulement 3,6 t/ha alors qu'en pratique il s'applique souvent des doses de 15 t/ha et plus. Des cas d'enrichissement important en cuivre et en zinc des sols fertilisés à long terme avec du fumier de volailles sont rapportés dans la littérature (Kingery *et al.* 1994). La parcelle fertilisée au lisier de porcs montre des bilans négatifs ou près de l'équilibre pour tous les ÉTM à l'exception du zinc (+1 781 g/ha), du manganèse (+826 g/ha) et du cuivre (+1 291 g/ha). Le lisier de porcs utilisé provenait du fond d'une fosse et avait une teneur plus élevée que la moyenne en ces trois éléments. Ceci démontre que l'application de lisiers, du moins ceux riches en zinc, manganèse et cuivre, peut apporter aux sols des quantités très en excès des exportations de ces éléments, ce qui pourrait enrichir les sols et accroître la disponibilité des ÉTM dans les sols.

**Tableau 2.19 : Bilan des éléments apportés et perdus dans la prairie selon les modes de fertilisation**

	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Ni (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)	
<b>Fumure minérale</b>	Apport des engrais	0,85	37	7,2	1,3	0,39	9,07	0,33	0,08
	Exportation de la récolte	74	263	125	10,24	1,03	1,34	3,06	0,40
	Exportation des drains	4,78	31,4	98,1	4,44	0,31	3,43	0,89	1,71
	Exportation du ruissellement	2,16	16	7,3	1,80	0,02	1,31	0,39	1,02
	<b>Bilan 2002</b>	<b>-80,1</b>	<b>-273</b>	<b>-223</b>	<b>-15,2</b>	<b>-0,97</b>	<b>2,99</b>	<b>-4,01</b>	<b>-3,05</b>
<b>Fumier de bovins laitiers</b>	Apport des engrais	212	706	818	30	0,98	37	4,55	0,81
	Exportation de la récolte	115	231	174	6,39	0,34	1,79	5,88	1,24
	Exportation des drains	20,45	61,0	176,8	32,97	0,86	24,81	8,86	7,79
	Exportation du ruissellement	3,68	24	22,1	3,87	0,09	2,47	0,81	1,49
	<b>Bilan 2002</b>	<b>72,9</b>	<b>390</b>	<b>445</b>	<b>-13,2</b>	<b>-0,31</b>	<b>7,93</b>	<b>-11,0</b>	<b>-9,71</b>
<b>Fumier de poulets</b>	Apport des engrais	252	934	733	26	1,08	25	6,03	1,26
	Exportation de la récolte	119	259	219	6,00	0,56	1,80	9,25	0,86
	Exportation des drains	11,84	41,6	340	20	0,53	17,08	5,46	5,09
	Exportation du ruissellement	2,36	15	8,1	1,81	0,05	1,00	0,46	2,07
	<b>Bilan 2002</b>	<b>119</b>	<b>618</b>	<b>166</b>	<b>-1,8</b>	<b>-0,06</b>	<b>5,12</b>	<b>-9,14</b>	<b>-6,76</b>
<b>Lisier de porcs</b>	Apport des engrais	1451	1180	2285	40	1,54	22	5,38	0
	Exportation de la récolte	121	271	224	8,82	0,59	1,63	6,23	0,41
	Exportation des drains	16,93	43,3	246,7	22,04	0,58	17,83	4,94	6,19
	Exportation du ruissellement	21,25	40	32,8	4,42	0,07	2,82	1,05	1,83
	<b>Bilan 2002</b>	<b>1292</b>	<b>826</b>	<b>1781</b>	<b>4,7</b>	<b>0,30</b>	<b>-0,28</b>	<b>-6,84</b>	<b>-8,43</b>



- **Maïs-grain**

Comme pour la prairie, le champ de maïs-grain fertilisé avec la fumure minérale a montré un bilan négatif pour tous les ÉTM analysés (Tableau 2.20). Pour les oligo-éléments requis par les plantes, les bilans sont de -438 g/ha pour le zinc, de -4097 g/ha pour le manganèse et de -127 g/ha pour le cuivre. La fumure minérale est donc de nature à fournir un bilan négatif des oligo-éléments obligeant à un suivi analytique des sols et à des apports éventuels d'éléments mineurs aux cultures.

Dans le cas de la parcelle fertilisée au lisier de porcs, les bilans des ÉTM sont négatifs à l'exception du zinc (+2954 g/ha) et du cuivre (+2136 g/ha) (Tableau 2.20). Le bilan fortement positif du zinc et du cuivre pourrait potentiellement créer un accroissement de la teneur totale et labile de ces éléments dans les sols, suite à des applications répétées à long terme.

La parcelle fertilisée au fumier de bovins laitiers montre également un bilan positif pour le cuivre (+431 g/ha) et le zinc (1169 g/ha), mais le bilan des autres ÉTM est négatif. Le cuivre et le zinc sont donc les deux seuls éléments à présenter un bilan fortement positif avec les engrais organiques. Le cas du manganèse est particulier. Les apports de cet élément par les engrais organiques sont importants, mais les pertes aux drains et dans les eaux de ruissellement sont d'autant plus importantes, de sorte que le bilan de cet élément est négatif.

**Tableau 2.20 : Bilan des éléments apportés et perdus dans le champ de maïs-grain selon les modes de fertilisation**

		Cu	Mn	Zn	Ni	Cd	Cr	Co	Pb
		(g/ha)	(g/ha)	(g/ha)	(g/ha)	(g/ha)	(g/ha)	(g/ha)	(g/ha)
<b>Fumier de bovins laitiers</b>	Apport des engrais	557	1607	1574	70	2,08	82	24,05	0,05
	Exportation de la récolte	20	27	100	1,70	0,00	0,80	0,50	0,60
	Exportation des drains	105,6	2938	305	187	2,53	130	58	48
	Exportation du ruissellement *	--	--	--	--	--	--	--	--
	<b>Bilan 2002</b>	<b>431</b>	<b>-1358</b>	<b>1169</b>	<b>-119</b>	<b>-0,45</b>	<b>-49</b>	<b>-35</b>	<b>-49</b>
<b>Lisier de porcs</b>	Apport des engrais	2295	1848	3548	56	2,75	36	8,39	0,05
	Exportation de la récolte	24	26	113	1,90	0,00	0,70	0,60	0,30
	Exportation des drains	55	1050	184	92	1,39	69	27	26
	Exportation du ruissellement	80,0	1284	297	62	1,9	101	38	42
	<b>Bilan 2002</b>	<b>2136</b>	<b>-512</b>	<b>2954</b>	<b>-100</b>	<b>-0,56</b>	<b>-135</b>	<b>-57</b>	<b>-69</b>
<b>Fumure minérale</b>	Apport des engrais	3,69	67	13,2	2,35	0,7	16,3	0,6	0,22
	Exportation de la récolte	21	21	71	1,60	0,00	0,60	0,40	0,30
	Exportation des drains	51	2937	156	90	1,54	62	28	24
	Exportation du ruissellement	58	1206	224	60	1,8	97	36	41
	<b>Bilan 2002</b>	<b>-127</b>	<b>-4097</b>	<b>-438</b>	<b>-149</b>	<b>-2,64</b>	<b>-143</b>	<b>-64</b>	<b>-65</b>

\* : Parcelle non instrumentée pour le captage des eaux de ruissellement.

#### 2.1.2.4 Analyse des ÉTM des sols

- **Prairie**

Afin de mesurer l'effet à long terme des applications d'engrais minéraux et organiques dans les sols, nous avons analysé la teneur en ÉTM totaux et labiles (Mehlich-3) jusqu'à 80 cm. Ces parcelles sont en place depuis 10 ans et ont été fertilisées annuellement de la même façon. Le bilan annuel et la composition en ÉTM des engrais minéraux et organiques ne sont cependant connus que pour 2002. Rappelons que le bilan des ÉTM dans la prairie pour Zn, Cu et Mn est positif avec les engrais de ferme et négatif avec la fumure minérale. Des différences dans les analyses de sol après 10 ans selon les modes de fertilisation devraient donc être notées.

La teneur en ÉTM totaux est sensiblement la même pour tous les ÉTM, peu importe le mode de fertilisation (Tableau 2.21). Elle est plus élevée en profondeur, sans lien avec la fertilisation. L'analyse des ÉTM totaux ne permet pas de conclure que les bilans positifs de Zn, Cu et Mn des parcelles fertilisées avec les engrais organiques ont modifié de façon appréciable la teneur totale en ces éléments dans les sols. Cette méthode se montre peu sensible au suivi de l'évolution des ÉTM des sols agricoles.

Certains ÉTM labiles tels le cuivre et le zinc des sols mesurés par la méthode Mehlich-3 dans la couche arable (0-20 cm) sont par contre différents entre les traitements avec fumure minérale ceux avec fumure organiques (Tableau 2.22). Les teneurs Mehlich-3 de la couche arable, pour la fumure minérale et le lisier de porcs, sont respectivement de 0,77 et 1,98 pour le zinc, de 1,02 et 2,17 pour le cuivre, de 22,8 et 34,4 pour le manganèse et de 0,37 et 0,74 pour le cobalt. Les autres ÉTM montrent moins de différence selon les modes de fertilisation. Plus en profondeur, les teneurs en ÉTM pour une même couche de sol sont comparables. La méthode Mehlich-3 est donc plus sensible pour le suivi des sols que l'analyse des ÉTM totaux. Elle met en évidence une fraction des ÉTM en mesure de contribuer plus significativement aux équilibres sol-solution. Dix années d'apports de lisiers ont peu affecté les teneurs totales en cuivre, zinc et manganèse, mais ils ont affecté la fraction labile mesurée avec la méthode Mehlich-3.

**Tableau 2.21 : Teneur en ÉTM totaux des sols selon les modes de fertilisation de la prairie après 10 ans d'application d'engrais**

	<b>Prof.</b>	<b>Cu</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>	<b>Ni</b>	<b>Cd</b>	<b>Cr</b>	<b>Co</b>	<b>Pb</b>
	<b>(cm)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>	<b>(mg/kg)</b>
<b>Fumure minérale</b>	<b>0-20</b>	15,2	420	56	30	0,557	27	12	13
	<b>20-40</b>	24,1	476	61	36	0,577	29	15	14
	<b>40-60</b>	23,3	499	67	44	0,605	32	15	13
	<b>60-80</b>	29,0	515	68	43	0,591	31	15	13
<b>Fumier de bovins</b>	<b>0-20</b>	14,1	363	57	26	0,560	25	10	13
	<b>20-40</b>	19,6	477	61	38	0,581	29	14	13
	<b>40-60</b>	25,2	510	65	45	0,606	31	15	13
	<b>60-80</b>	29,2	545	69	47	0,600	33	16	13
<b>Fumier de poulets</b>	<b>0-20</b>	14,7	360	60	28	0,562	26	11	13
	<b>20-40</b>	17,6	456	60	35	0,604	29	14	13
	<b>40-60</b>	20,9	514	63	42	0,621	31	15	13
	<b>60-80</b>	23,8	521	68	47	0,627	33	15	13
<b>Lisier de porcs</b>	<b>0-20</b>	19,1	406	60	34	0,610	27	12	11
	<b>20-40</b>	20,5	463	60	39	0,651	30	13	12
	<b>40-60</b>	26,4	619	66	47	0,666	41	18	11
	<b>60-80</b>	22,3	523	66	42	0,695	33	15	13

**Tableau 2.22 : Teneur en ÉTM labiles des sols extraits avec Mehlich-3 selon les modes de fertilisation de la prairie après 10 ans d'application d'engrais**

	Prof.	Cu	Mn	Zn	Ni	Cd	Cr	Co	Pb
	(cm)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
Fumure minérale	0-20	1,020	22,8	0,773	0,424	0,035	0,264	0,373	1,872
	20-40	0,941	44,2	0,815	0,667	0,027	0,310	0,573	1,936
	40-60	0,981	50,2	1,054	1,284	0,014	0,365	1,226	1,933
	60-80	0,884	52,2	1,221	1,468	0,012	0,378	1,201	1,861
Fumier de bovins	0-20	1,131	16,5	1,437	0,389	0,039	0,223	0,302	1,851
	20-40	0,849	30,4	0,923	0,673	0,021	0,274	0,698	1,796
	40-60	0,784	47,9	1,033	1,186	0,011	0,342	1,235	1,751
	60-80	0,827	47,5	1,133	1,279	0,009	0,358	1,171	1,837
Fumier de poulets	0-20	1,363	21,1	2,095	0,433	0,045	0,228	0,383	2,141
	20-40	0,919	30,8	0,934	0,535	0,025	0,276	0,791	1,892
	40-60	0,983	51,9	0,972	1,123	0,019	0,317	1,324	1,911
	60-80	1,119	61,8	1,117	1,756	0,020	0,352	1,348	2,193
Lisier de porcs	0-20	2,174	34,4	1,980	0,689	0,039	0,248	0,742	2,124
	20-40	1,654	44,9	1,025	0,468	0,026	0,322	0,982	1,999
	40-60	0,894	47,8	1,054	1,501	0,011	0,324	1,152	1,954
	60-80	0,899	44,3	1,101	1,139	0,009	0,374	1,061	2,004

- **Maïs-grain**

Dans le champ de maïs-grain fertilisé selon une fumure minérale, du lisier de porcs et du fumier de bovins pendant 10 ans, les teneurs en ÉTM sont assez semblables selon les modes de fertilisation pour une même couche de sol (Tableau 2.23). Les bilans du zinc, du cuivre et du manganèse sont pourtant fortement positifs avec les engrais de ferme. L'analyse des ÉTM totaux ne semble pas en mesure de fournir des valeurs suffisamment sensibles pour un suivi à long terme des ÉTM dans les sols agricoles.

La méthode Mehlich-3 montre davantage de différences entre les teneurs en ÉTM dans la couche arable selon les modes de fertilisation (Tableau 2.24). Les teneurs Mehlich-3 de la couche arable, pour la fumure minérale et le lisier de porcs, sont respectivement de 0,88 et 2,88 pour le zinc, de 1,64 et 2,70 pour le cuivre et de 32 et 50 pour le manganèse. Les autres ÉTM montrent moins de différences selon les modes de fertilisation. Plus en profondeur, les différences entre les modes de fertilisation sont moindres. C'est donc principalement dans la couche arable des sols que doit s'effectuer le suivi des ÉTM. La méthode Mehlich-3 a la sensibilité voulue pour révéler les différences selon les modes de fertilisation.

**Tableau 2.23 : Teneur en ÉTM totaux des sols selon les modes de fertilisation du champ de maïs-grain après 10 ans d'application d'engrais**

	Prof.	Cu	Mn	Zn	Ni	Cd	Cr	Co	Pb
	(cm)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
Fumier de bovins	0-20	14,09	363	54,51	24,54	0,67	24,95	9,77	13,47
	20-40	19,74	488	59,13	36,32	0,69	29,83	15,85	12,95
	40-60	26,54	624	71,67	54,36	0,79	35,34	18,55	13,03
	60-80	25,89	584	73,45	51,69	0,76	34,87	17,30	12,75
Lisier de porcs	0-20	15,40	402	58,20	28,00	0,62	23,64	10,79	12,53
	20-40	13,39	408	51,11	29,61	0,59	24,59	11,33	11,61
	40-60	16,12	495	59,35	36,41	0,62	27,63	13,40	12
	60-80	22,34	549	69,32	45,38	0,69	32,47	15,24	12,42
Fumure minérale	0-20	15,97	344	47,01	26,73	0,52	22,81	9,56	11,80
	20-40	18,00	478	54,26	37,37	0,61	28,09	13,34	11,50
	40-60	23,79	514	63,45	47,74	0,67	33,04	14,76	12,66
	60-80	22,70	602	67,09	47,01	0,77	32,62	15,79	12,53

**Tableau 2.24 : Teneur en ÉTM labiles des sols extraits avec Mehlich-3 selon les modes de fertilisation du champ de maïs-grain après 10 ans d'application d'engrais**

	Prof.	Cu	Mn	Zn	Ni	Cd	Cr	Co	Pb
	(cm)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
Fumier de bovins	0-20	1,88	11,6	1,72	0,48	0,05	0,22	0,20	2,16
	20-40	1,51	23,0	0,87	0,49	0,02	0,27	0,63	2,02
	40-60	0,83	35,4	0,96	0,91	0,01	0,32	0,78	1,66
	60-80	0,82	34,7	1,08	0,98	0,01	0,38	0,78	1,83
Lisier de porcs	0-20	2,70	50	2,88	1,04	0,05	0,27	0,69	2,76
	20-40	1,36	46	0,97	0,94	0,03	0,30	0,74	2,24
	40-60	1,63	83	1,28	1,63	0,03	0,38	1,24	2
	60-80	1,30	90	1,36	2,34	0,02	0,37	1,73	2,47
Fumure minérale	0-20	1,64	32	0,88	0,76	0,04	0,25	0,53	2,33
	20-40	1,14	62	0,81	1,17	0,02	0,31	1,21	2,10
	40-60	1,02	63	1,00	2,16	0,01	0,36	1,27	2,01
	60-80	0,95	77	1,16	2,09	0,02	0,36	1,66	2,16

Le bilan annuel des apports et des pertes des ÉTM a été mesuré pour deux cultures : prairie mil-trèfle et maïs-grain fertilisés avec une fumure minérale. Il montre que tous les ÉTM analysés ont un bilan négatif et ne présentent pas de problématique particulière d'accumulation dans les sols. Au contraire, un déficit en certains oligo-éléments requis par les plantes, tels que Zn, Mn et Cu a été observé. Pour les engrais de ferme, le bilan de plusieurs ÉTM est négatif ou près de l'équilibre, tant dans la prairie que dans le champ de maïs-grain. Les éléments Ni, Pb, Co, Cr, et Cd ne présentent pas un bilan pouvant provoquer des problèmes d'accumulation dans les sols ou les cultures. Le zinc et le cuivre ont un bilan positif pour tous les traitements avec les engrais de ferme, particulièrement pour le lisier de porcs riche en ces éléments. Ces éléments font l'objet d'ajout substantiel dans les rations animales, particulièrement pour le porc et la volaille. Les rejets de ces éléments dans le fumier de volailles et le lisier de porcs sont élevés de sorte que les concentrations de ces deux éléments sont au niveau C2 selon les critères des matières résiduelles fertilisantes du MDDEP. Les charges de cuivre et de zinc, qui résultent des apports de fumier de poulets et de lisiers de porcs, représentent des apports suffisants pour affecter de façon significative le bilan de ces éléments. Les excès du bilan annuel du zinc (+ 2957 g/ha) et de cuivre (+ 2137 g/ha) avec le lisier de porcs dans le maïs-grain nous indiquent que des accumulations de ces éléments sont très susceptibles de modifier les teneurs en Zn et Cu labiles mesurées avec Mehlich-3 dans la couche arable. L'analyse des ÉTM totaux des sols est cependant peu affectée par les apports des ÉTM provenant des engrais de ferme. Cette méthode est peu sensible pour mettre en évidence les accumulations des ÉTM provenant des applications d'engrais à moyen et long terme. La méthode Mehlich-3 s'est montrée beaucoup plus sensible.

### 2.1.3 Essais en serre

L'objectif de cette étape de travaux en serre était de relativiser l'information obtenue par la méthode développée pour une application en laboratoire en fonction d'une échelle de temps compatible avec le cycle de vie de certains organismes telles les plantes. Le dactyle pelotonné, une plante fourragère, a été choisi dans le but d'étudier les relations entre les concentrations dans les tissus végétaux (« Concentration »), le prélèvement d'ÉTM par les plantes (« Prélèvement ») et les analyses chimiques du sol. Les résultats de corrélation entre la concentration dans les tissus, les prélèvements du dactyle pelotonné et les analyses chimiques du présent rapport sont présentés à même les tableaux des paragraphes précédents dans la section « Comparaison des méthodes d'extraction chimique des ÉTM dans les sols », et ce, afin de ne pas alourdir inutilement le contenu du rapport.

Les végétaux, par leur système racinaire abondant, sont en contact avec les particules et la solution du sol. Les concentrations en éléments chimiques des plantes et les prélèvements peuvent refléter la disponibilité et la mobilité des éléments chimiques dans les sols, particulièrement pour les éléments majeurs, l'azote, le phosphore et le potassium. Pour les ÉTM, les relations entre les concentrations dans les tissus végétaux et les analyses chimiques du sol demeurent assez complexes, car elles impliquent une multitude d'interactions entre les propriétés physico-chimiques des sols et la mobilité. Nous avons donc entrepris une expérience pour comparer les concentrations dans les tissus et les prélèvements par les plantes (rendement x concentration) des ÉTM d'une plante fourragère, le dactyle pelotonné

(*Dactylis glomerata* L.) avec les teneurs dans les sols mesurées avec divers extractifs chimiques.

#### *2.1.3.1 Méthodologie des essais avec le dactyle pelotonné*

Des pots d'un litre, remplis de 800 g de sol prélevé dans la couche arable des 64 séries de sols du Québec, de propriétés chimiques très contrastantes, ont été ensemencés avec du dactyle. Un apport d'engrais minéral a été fait à chacun des pots en appliquant en solution 75 mg/kg de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et K<sub>2</sub>O sous forme de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et de KCl. La période de croissance a duré 2 mois et les plants ont été coupés au stade de l'épiaison. La biomasse aérienne a été séchée et pesée.

Les ÉTM des tissus végétaux ont été extraits par une solution d'acide nitrique concentrée et chauffée aux micro-ondes. La détermination des teneurs en ÉTM a été effectuée par émission au plasma sur appareil Perkin Elmer. Les concentrations en Cu, Zn, Mn, Ni, Cd, Cr, Co, et Pb dans les plants et les prélèvements par les plants (rendement x concentration) ont été déterminées. Une étude de corrélation a été réalisée entre les concentrations et les prélèvements en ÉTM des plantes et les teneurs dans les sols mesurées par les diverses méthodes chimiques étudiées et les membranes échangeuses d'ions.

#### *2.1.3.2 Résultats de corrélation entre la concentration dans les tissus, les prélèvements du dactyle pelotonné et les analyses chimiques*

- **Cuivre**

Le cuivre extrait par les membranes échangeuses d'ions ne s'est pas montré corrélé avec les concentrations ni les prélèvements en cuivre du dactyle (Tableau 2.3). Les teneurs en cuivre des MEI étant trop faibles, ceci a causé des problèmes de détermination et d'imprécision des résultats. Pour les méthodes chimiques, les coefficients de corrélation avec les prélèvements du cuivre sont assez bons, variant de 0,45\*\* à 0,60\*\*. Parmi les méthodes de détermination du cuivre labile, la méthode par chélation au DTPA-TEA ( $r = 0,59^{**}$ ) s'est montrée supérieure à la méthode Mehlich-3 ( $r = 0,45^{**}$ ) et la méthode HCl 0,1N ( $r = 0,54^{**}$ ). Les fractions du cuivre présentes sous forme organique (Cu-pyro) et sous forme oxyde (Cu-oxalate) ont été significativement corrélées avec les prélèvements avec  $r = 0,60^{**}$  et  $r = 0,55^{**}$  respectivement. Le cuivre dans ces deux fractions serait en lien avec les équilibres physico-chimiques du sol, affectant ainsi l'absorption du cuivre par les plantes. Le cuivre mobile, déterminé par l'acétate d'ammonium a fourni un coefficient de corrélation de  $r = 0,50^{**}$  avec les prélèvements en Cu des plants de dactyle. Malgré de faibles teneurs en cuivre échangeable, cette fraction hautement disponible affecte significativement les prélèvements par les plantes. Les méthodes chimiques sont aptes à rendre compte de l'absorption du cuivre par le dactyle.



- **Zinc**

Les corrélations entre le zinc extrait par les membranes échangeuses d'ions, les concentrations en Zn dans les plants de dactyle ( $r = 0,32^*$ ) et les prélèvements Zn ( $r = 0,34^{**}$ ) sont significatives mais assez faibles (Tableau 2.5). Pour toutes les méthodes chimiques, les corrélations avec la concentration en Zn des plants sont non significatives. Pour les prélèvements en Zn, les corrélations sont significatives uniquement pour la fraction liée à la matière organique Zn-pyro ( $r = 0,38^{**}$ ), Zn-DTPA ( $r = 0,28^*$ ) et Zn- total ( $r = 0,49^{**}$ ). Les méthodes chimiques sont donc peu aptes à prédire l'absorption du zinc par le dactyle.

- **Manganèse**

Le manganèse extrait avec les MEI corrèle bien avec les concentrations en Mn du dactyle ( $r = 0,62^{**}$ ) et avec les prélèvements de Mn ( $r = 0,59^{**}$ ) (Tableau 2.7). Les corrélations entre les méthodes chimiques et les concentrations sont assez faibles. Elles varient de  $r = 0,10$  à  $r = 0,49^{**}$ . Elles sont plus élevées pour les prélèvements, variant de  $r = 0,28^*$  à  $r = 0,56^{**}$ . La fraction organique extraite au pyrophosphate est bien corrélée avec les prélèvements ( $r = 0,56^{**}$ ). La fraction des oxydes extraite à l'oxalate est également corrélée avec les prélèvements ( $r = 0,48^{**}$ ). Pour Mn labile, la méthode DTPA-TEA est la plus corrélée avec  $r = 0,49^{**}$ , suivie de Mehlich-3 avec  $r = 0,44^{**}$  et de la méthode HCl 0,1 N avec  $r = 0,28^*$ . La fraction mobile, facilement échangeable extraite à l'acétate d'ammonium, est bien corrélée avec les prélèvements de Mn ( $r = 0,50^{**}$ ). Plusieurs autres facteurs ont une influence sur la mobilité du Mn. Le pH et le potentiel rédox des sols sont deux facteurs particulièrement importants qui affectent la solubilité des formes présentes dans les sols. Les corrélations simples rapportées entre les prélèvements et les méthodes chimiques ne tiennent pas compte de ces deux paramètres. Les méthodes chimiques sont assez bien reliées à l'absorption du manganèse par le dactyle.

- **Cadmium**

Les corrélations entre les concentrations de cadmium dans le dactyle et le cadmium extrait par les MEI et les toutes les méthodes sont très faibles (Tableau 2.9). Elles sont plus élevées pour les prélèvements de Cd, allant de  $r = 0,27^*$  pour Cd total à  $r = 0,58^{**}$  pour la fraction soluble et échangeable (Cd-acétate) et labile (Cd-Mehlich-3). La fraction liée à la matière organique, cadmium-pyro, est bien corrélée avec les prélèvements ( $r = 0,53^{**}$ ).

- **Nickel**

Le nickel extrait avec les MEI corrèle bien avec les concentrations en Ni du dactyle ( $r = 0,54^{**}$ ) et avec les prélèvements de Ni ( $r = 0,50^{**}$ ) (Tableau 2.13). Les corrélations entre les méthodes chimiques et les concentrations de Ni du dactyle vont de  $r = 0,09$  pour Ni total à  $0,49^{**}$  pour Ni labile (Mehlich-3). Les méthodes chimiques sont bien corrélées avec les prélèvements de Ni. Elles vont de  $r = 0,23$  pour Ni total à  $r = 0,56^{**}$  pour Ni labile (Mehlich-3). Les formes organiques extraites au pyrophosphate ont montré une corrélation

de  $r = 0,50^{**}$  avec les prélèvements de Ni et pour les formes oxydes extraites à l'oxalate ( $r = 0,49^{**}$ ). Les différentes fractions étudiées ont donc une incidence sur l'absorption du nickel par le dactyle.

- **Chrome**

Les corrélations entre les membranes d'échange, les concentrations et les prélèvements de Cr du dactyle n'ont pu être établies car il n'a pas été possible de déterminer les teneurs en Cr extrait par les MEI, à cause des concentrations trop faibles (Tableau 2.15). Une bonne partie du chrome se trouve sous forme chromate (anion) et ne peut se fixer sur les membranes d'échange cationique. En ce qui concerne les méthodes chimiques, les corrélations sont faibles avec les concentrations et les prélèvements de Cr par le dactyle. Les méthodes chimiques sont donc faiblement reliées à l'absorption du chrome par le dactyle.

- **Cobalt**

Les concentrations entre les MEI, les prélèvements ( $r = 0,31^{**}$ ) et les concentrations ( $r = 0,33^{**}$ ) sont faibles mais significatives (Tableau 2.17). Pour toutes les méthodes chimiques, les corrélations avec les concentrations et les prélèvements de Co du dactyle sont nulles. Les méthodes chimiques sont donc peu reliées à l'absorption du cobalt par le dactyle.

- **Plomb**

Les teneurs en Pb sur les membranes échangeuses d'ions n'ont pu être mesurées. Les méthodes chimiques n'ont pas fourni de corrélation significative avec les concentrations et les prélèvements de plomb par le dactyle (Tableau 2.11)

### *2.1.3.3 Conclusions*

L'absorption des ÉTM est influencée par plusieurs facteurs. Une simple analyse chimique ne fournit qu'une explication partielle de la disponibilité et de la mobilité des ÉTM dans les sols. Tout l'environnement physico-chimique du sol affecte la solubilité des formes minérales présentes. Le pH et le potentiel rédox des sols sont particulièrement reconnus pour affecter la disponibilité de plusieurs ÉTM. Dans ce contexte, les niveaux de corrélation entre la teneur d'un ÉTM extrait chimiquement dans un sol et les prélèvements par une plante ne peuvent être que modérés.

L'approche de mesure de la disponibilité des ÉTM par des extractions chimiques en lien avec les prélèvements en ÉTM du dactyle a donné des résultats variables selon les éléments. Les résultats peuvent être considérés comme concluants pour Cu, Mn, Ni et Cd. Il existe en effet une corrélation significative entre l'extraction chimique de ces ÉTM et l'absorption de ces ÉTM par le dactyle. Par contre pour les éléments Zn, Co, Cr et Pb, les résultats ne sont pas concluants. Il existe en effet peu de lien entre l'extraction chimique des ÉTM et l'absorption par le dactyle. Il ne faut pas en conclure pour autant que l'extraction chimique est sans valeur. D'autres facteurs ont vraisemblablement beaucoup d'effets sur la disponibilité. Il est

également possible qu'une barrière sol-plante régularise l'absorption de ces ÉTM. Cependant, la validation de cette hypothèse exige un schéma expérimental dépassant grandement les ressources matérielles, financières et temporelles allouées à ce projet. Par conséquent, nous avons opté pour une approche de validation incluant des sols ayant fait l'objet d'une contamination sur plusieurs années et dont l'historique est connue. Ainsi, la comparaison des résultats des mesures réalisées sur les échantillons de sol contaminés en laboratoire et provenant des mêmes parcelles ayant fait l'objet d'un apport sur plus de 25 ans de matières résiduelles riches en ÉTM représente une information exceptionnelle pour valider la méthode qui est développée. Tel qu'indiqué dans l'un des rapports d'étapes précédents et entendu, les essais en serre tel que initialement prévus à la demande de subvention ont donc été remplacés par des essais sur un sol contaminé depuis plus de 25 ans. De plus, nous avons appliqué l'approche à un sol ayant subi un apport en cuivre sur une période de plus de 50 ans.

## **2.2 DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE MESURE DE LA BIODISPONIBILITÉ DES ÉTM**

La biodisponibilité est abordée par deux approches complémentaires. La première concerne le développement d'un outil basé sur la mesure de la stabilité des fonctions enzymatiques d'un sol face à des perturbations tel que la présence d'ÉTM sur la base des concepts de résistance et de récupération (Griffiths *et al.*, 2001). La seconde aborde la biodisponibilité par une approche basée sur des tests de toxicité.

Chacune de ces approches fait l'objet d'une activité dont les résultats sont présentés dans cette seconde partie du rapport.

### **2.2.1 Mesure de la stabilité des fonctions enzymatiques d'un sol**

Dans le domaine de la restauration des sols, le rôle écologique du sol est souvent oublié lors de l'évaluation de la qualité d'une restauration. Il est bien établi que les microorganismes du sol et leurs enzymes jouent un rôle essentiel dans les cycles biochimiques des nutriments et dans la stabilisation des structures du sol. Pourtant, aucun test écotoxicologique ne permet encore d'évaluer l'état fonctionnel de la flore microbienne d'un sol contaminé ou restauré. L'évaluation de la stabilité de l'activité enzymatique d'un sol pourrait devenir un indice intégrateur de l'état des fonctions vitales du sol. La présente section de l'étude développe donc une approche permettant de mesurer l'impact d'une perturbation sur l'activité enzymatique d'un sol en quantifiant la résistance et la récupération des fonctions vitales de la flore microbienne du sol. Ainsi, la qualité d'une restauration ou la gravité d'une contamination pourra être évaluée au niveau microbiologique. La fonction principale d'un sol a été identifiée dans la littérature comme étant sa participation essentielle dans le cycle de la vie. Ce rôle, majoritairement attribué à la microflore, consiste à transformer la matière organique en inorganique par ce que l'on appelle les cycles biogéochimiques. L'état de ces cycles peut être représenté par la capacité de la flore à produire les enzymes nécessaires à leur continuation. En bref, la méthode développée a pour objectif de répondre à la question : « Le sol restauré ou contaminé peut-il encore effectuer ses fonctions principales et participer aux cycles des nutriments ? » C'est la stabilité de l'activité d'enzymes clefs des cycles biogéochimiques (C, N, S, P) qui est utilisée dans cette méthode afin d'évaluer l'état de santé de la microflore du sol.

Lors de l'étude de la restauration d'un sol sur une longue période de temps, il est clair que les capacités du système à accomplir une fonction clef au temps « t » ne sont pas nécessairement représentatives de sa faculté à maintenir l'intégrité de cette fonction dans le temps, particulièrement après une perturbation. Selon la littérature, la stabilité des propriétés d'un sol face à des perturbations implique à la fois les concepts de résistance et de récupération (Griffiths *et al.*, 2001). La résistance (voir équation 2-1) est définie comme étant la capacité d'un sol à supporter les effets immédiats suite à une perturbation, alors que la récupération (voir équation 2-2) est définie comme étant la capacité du sol à retourner à son état initial suite à une perturbation (Seybold *et al.*, 1999). La résistance d'un sol est inversement proportionnelle à la perte de son intégrité fonctionnelle suite à une perturbation, alors que la récupération est proportionnelle au recouvrement de cette intégrité fonctionnelle (Herrick et Wander, 1998).

$$R_s = \frac{P_0}{C_0} \times 100\% \quad \text{Équation 2-1}$$

$$R_c = \frac{P_x}{C_x} \times 100\% \quad \text{Équation 2-2}$$

où :

Rs : Indice de résistance

Rc : Indice de récupération

C<sub>0</sub> : valeur du sol témoin (non-perturbé) au temps zéro

P<sub>0</sub> : valeur du sol perturbé au temps zéro

C<sub>x</sub> : valeur du sol témoin (non-perturbé) au temps x

P<sub>x</sub> : valeur du sol perturbé au temps x

La biodiversité est une propriété importante du sol dans sa capacité à récupérer d'une perturbation (Pankhurst, 1997). En effet, plus la diversité de microorganismes est grande, plus la communauté possède des moyens de se réorganiser afin de continuer à effectuer les fonctions vitales du sol. Afin de mettre en évidence cette particularité, la diversité génétique du sol est étudiée et mise en relation avec la stabilité fonctionnelle du sol. La technique de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) est utilisée afin de décrire les patrons génétiques dominants du sol à différents moments de la récupération suite à une perturbation.

La mise au point de cette méthode de mesure de la stabilité des fonctions enzymatique est faite en 5 étapes :

- 1) Choisir les enzymes clefs, représentatifs des différents cycles.
- 2) Déterminer le type de perturbation qui permet le mieux de mesurer l'état fonctionnel du sol.
- 3) Tester cette perturbation sur un sol contaminé et un sol propre afin de mettre au point un indice de stabilité des fonctions enzymatiques du sol. La contamination qui sera utilisée lors de cette étape sera de type organique afin de ne pas avoir d'interférence au niveau de l'inhibition de l'activité enzymatique. En effet, l'impact d'une contamination organique sur l'activité enzymatique provient de son impact sur

la flore microbienne. À l’opposé, une contamination aux métaux lourds a un impact direct sur les enzymes en plus d’avoir un impact sur la flore microbienne.

- 4) Valider la méthode, suite à sa mise au point, sur une contamination aux métaux lourds.
- 5) Développer une méthode d’analyse simplifiée des données afin de transformer la méthode en un outil pratique, utilisable lors de l’évaluation écotoxicologique d’un sol.

### 2.2.1.1 Choix des enzymes

Les cycles du carbone et de l’azote sont caractérisés par le travail de plusieurs enzymes. C’est pourquoi deux représentants de chacun de ces cycles ont été testés alors qu’une seule enzyme des cycles du phosphore et du soufre ne fut expérimentée. Le principal critère de sélection des enzymes est leur représentativité de l’état des cycles biogéochimiques, ainsi que la reconnaissance des méthodes de mesures. Puis, les limites liées à la faisabilité des méthodes analytiques a été prises en considération. Les enzymes qui furent retenues sont celles sensibles aux perturbations et liées à une fonction importante. Les choix ont été basés sur la littérature disponible. Étant donné qu’il est difficile, voire impossible d’extraire efficacement les enzymes d’un sol afin de les quantifier, c’est le potentiel d’activité enzymatique qui a été mesuré dans des conditions optimales.

Le Tableau 2.25 présente une synthèse des enzymes qui ont été retenues suite à une revue de la littérature. Leur méthode de mesure est annexée au rapport (Annexe C).

**Tableau 2.25 : Enzymes représentant chacun des cycles biogéochimiques**

Cycles/enzymes	Substrat utilisé	Taille de l’échantillon	Référence
<b>Carbone</b>			
Xylanase	Xylane	5 g	(Von Mersi et Schinner 1996) et (Strobl et Traunmüller 1996)
β-Glucosidase	β-glucosido-saligenin	5 g	
<b>Azote</b>			
Protéase	Caséine	1 g	(Kandeler 1996)
Uréease	Urée	5 g	(Kandeler 1996)
<b>Phosphore</b>			
Phosphatase acide et basique	p-nitrophenyl phosphate	1 g	(Margesin 1996)
<b>Soufre</b>			
Arylsulfatase	p-nitrophenylsulfate	1 g	(Strobl et Traunmüller 1996)

- **Cycle du carbone**

#### **Xylanase**

La Xylanase est responsable de catalyser la première étape de la dégradation du xylane, un polymère naturel au même titre que la cellulose mais plus facilement assimilable. La méthode décrite a une limite de détection de 2,8 µg glucose/g sec, ce qui la rend très sensible. L'activité de la cellulase est faible dans les sols arables, c'est pourquoi la mesure de l'activité de la xylanase est préférée.

### **β-Glucosidase**

Dans la nature, cette enzyme est retrouvée dans les bactéries et les champignons ainsi que dans les sols. C'est elle qui est responsable de la dernière étape de la transformation de la cellulose en glucose.

La méthodologie employée pour ces enzymes est décrite dans les Protocole 1 et Protocole 2 qui sont annexés au rapport (Annexe C).

- **Cycle de l'azote**

### **Protéase**

Pendant la dégradation des protéines contenues dans le sol, les protéases extracellulaires produisent des oligopeptides à partir de ces protéines. Dès leur production par les cellules, les protéases s'adsorbent à la matière organique (M.O.) du sol. Ces enzymes immobilisées démontrent une grande résistance à la protéolyse. Toutefois, les protéases sont inhibées par la dessiccation.

### **Uréase**

L'uréase est l'enzyme la plus étudiée, principalement à cause de son importance en agriculture puisqu'elle agit sur les liens C-N de l'urée, qui est un fertilisant.

La méthodologie employée pour ces enzymes est décrite dans les Protocole 3 et Protocole 4 qui sont annexés au rapport (Annexe C).

- **Cycle du phosphore**

### **Phosphatases acide ou basique**

Afin que le phosphore soit assimilable par les plantes, il faut que les composés organiques contenant le phosphore soient minéralisés par les phosphatases en orthophosphate. Ce sont des enzymes produites par induction principalement sous des conditions de faible disponibilité de phosphore. La phosphatase produite sous conditions alcalines ne peut provenir que des microorganismes du sol puisqu'elle n'est pas excrétée par les racines de plantes.

La méthodologie employée est décrite dans le Protocole 6 annexé au rapport (Annexe B).

- **Cycle du soufre**

Les sulfatases sont produites principalement par les microorganismes. Dans le sol, elles sont présentes comme exo-enzymes, et sont intimement liées à la matière organique.

La méthodologie employée est décrite dans le Protocole 5 qui est annexé au rapport (Annexe C).

#### *2.2.1.2 Méthodologie - Caractérisation des différents sols*

La mise au point de la méthode de mesure de la stabilité des fonctions enzymatiques a été réalisée à l'aide d'un sol propre. Le choix du mode de perturbation a été fait en utilisant ce même sol. Une fois le mode de perturbation choisie, la méthode a été testée sur ce sol et trois autres sols en ajoutant soit une contamination organique (le 2,4-D) ou inorganique (le cuivre). Les sols présélectionnés ont été caractérisés afin de vérifier s'ils correspondaient aux besoins de l'étude. De plus, lors de cette étape, les méthodes de mesures d'activités enzymatiques ont été testées et évaluées pour leur rapidité d'exécution, leur reproductibilité et leur sensibilité.

##### *Principe de la contamination au 2,4-D :*

Le sol a été contaminé en le séchant d'abord à l'air libre dans une hotte stérile, puis en le réhumidifiant à 60 % de leur CRC à l'aide d'une solution de 640 mg/L de 2,4-D dissous dans de l'eau stérile. Le sol a ensuite été incubé à la noirceur à 20 °C pour une période de trois jours.

##### *Principe de la contamination au cuivre :*

Le sol a été contaminé en laboratoire avec sulfate de cuivre anhydre (CuSO<sub>4</sub>) selon le protocole développé par le CEAEQ (voir la section 2.2.2.4).

- **Préparation initiale des sols pour la mise au point de la méthode**

La présence de matière organique a une influence importante sur l'activité de la flore d'un sol, mais aussi sur l'activité des enzymes qu'elle produit. La présence de nutriments permettra une croissance ou une maintenance microbienne et stimulera la sécrétion de certaines enzymes comme la phosphatase qui est sécrétée lorsqu'il y a carence de phosphate inorganique (Schinner *et al.*, 1996). La quantité de nutriments dans les sols a une influence sur l'activité enzymatique. Toutefois, plusieurs études soulignent que le lien n'est pas direct ni proportionnel (Kandeler *et al.*, 1996; Leiros *et al.*, 1999; Margesin *et al.*, 2000; Brohon *et al.*, 2001). La matière organique sert aussi de support pour les enzymes extracellulaires qui constituent un moyen de stabilisation des fonctions de la microflore lors de stress intenses (Pascual *et al.*, 2002). C'est pour ces raisons que lors de la mise au point de la méthode quatre concentrations de matière organique (M.O.) ont été testées (3,3 %, 4,3 %, 7 % et 14 % M.O.). Parmi ces sols, deux d'entre eux avec des contenus en M.O. de 7 % et 14 % ont été obtenus en mélangeant de la terre noire de jardin et du sable en des proportions différentes.

Des échantillons de terre noire et de sable ont été analysés afin de déterminer leurs contenus en azote total, carbone total, phosphate total, ions sulfure, leur pH et leur granulométrie. Le Tableau 2.26 décrit les analyses effectuées pour la caractérisation des sols.

**Tableau 2.26 : Analyses chimiques, physiques et biologiques à effectuer sur le sol utilisé pour la mise au point de la méthode**

Analyses	Méthodes	Références
Granulométrie	Protocole standard basé sur la distribution selon la taille des particules et par hydrométrie.	ASTM D421, D422, D1140, D2217, E11 (ASTM 1990)
CRC	Protocole basé sur le drainage par gravité	ASTM D2980-71 (ASTM, 1996)
Contenu en C.O.T.	Méthode basée sur la combustion à 500 °C d'un échantillon sec et sa perte de poids consécutive	ASTM D2974 (ASTM 1988)
pH	Effectué par potentiométrie (électrode Orion perpHect) selon le protocole standard ASTM	ASTM D4972 (ASTM 1989)
Contenu en N, P et S	N : Azote Kjeldhal P: Phosphore total S: Iodate Titration methode	(APHA <i>et al.</i> , 1998) (O'Halloran 1993) ASTM.

Le troisième et le quatrième sol utilisé pour la mise au point de la méthode sont les mêmes que ceux utilisés pour les tests écotoxicologiques décrits au chapitre 2.2.2.6 (voir Tableau 2.37). Ceci permettra, en plus de valider la méthode avec une contamination inorganique, de faire un lien entre la biodisponibilité, les réponses écotoxiques et la stabilité des fonctions enzymatiques. Il s'agit donc d'un loam sableux tamisé à 2 mm avec un pourcentage de matière organique de 3,3 % M.O. et d'un loam tamisé à 2 mm avec un pourcentage de 4,3 % M.O. L'humidité des sols seront aussi amenée à 60 % de sa capacité de rétention au champ (CRC) pour les essais.

- **Stérilisation du sol**

Une portion de chaque sol a été stérilisée par  $\gamma$ -radiation en recevant une dose de 60 kG d'une source de  $^{60}\text{Co}$  (MDS Nordion, Québec, Canada). Les radiations  $\gamma$  sont considérées comme étant le mode de stérilisation le moins dérangerant pour les propriétés physiques et chimiques du sol (Lensi *et al.*, 1991). Toutefois, toutes les méthodes de stérilisation connues incluant la radiation, sont reconnues pour dénaturer les enzymes du sol (Burns, 1972). Or, les résultats devront donc être interprétés avec précaution.

### 2.2.1.3 Méthodologie - Suivi de la biodiversité génétique et de la densité microbienne

La technique de biologie moléculaire de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), qui permet la séparation des brins d'ADN des différentes espèces bactériennes, a été utilisée lors de différentes étapes de l'étude afin de mesurer la diversité génétique de la flore et ainsi en évaluer sa stabilité, dans le but de la comparer à la stabilité des fonctions enzymatiques.



Cette technique permet de produire un patron des espèces dominantes de la flore du sol. Les patrons dominants d'un même sol pourront être comparés à différents temps des tests de perturbation. Les changements de biodiversité génétique peuvent ainsi être suivis de façon qualitative.

L'ADN des micro-organismes des sols fut extrait selon la méthodologie décrite dans le Protocole 14 annexé au rapport. La biodiversité génétique a ensuite été suivie par PCR et DGGE. Des amorces universelles 16S rDNA eubacterial ont été synthétisées par le Gene Assembler Plus (Amersham Pharmacia). Les amplifications PCR ont été effectuées dans des volumes de réaction de 50 µL avec 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 200 µM dNTP, 10 pmol de chaque amorce, et 2.5 U de Taq DNA polymérase (Amersham Pharmacia). L'ADN du sol (10–100 ng) a été ajouté à un mélange PCR pré-chauffé à 80°C et amplifié en utilisant la méthode « Touch down ». La DGGE a été effectuée avec le système Dcode de Bio-Rad (Mississauga, Ont, Canada). Le produit PCR a été soumis à l'électrophorèse avec des gels polyacrylamide dans un tampon TAE pour 16 heures à 100 volts et 60°C. Le gel a été coloré au bromure d'éthidium.

La concentration microbienne est évaluée par la méthode de compte viable direct avec le kit *Baclight*<sup>TM</sup> viability. L'extraction des bactéries s'est faite à partir d'échantillons de sol dans 95 mL de solution NaCl (8.5 g/L) et 30 billes de verre de 2 mm de diamètre. Les bouteilles ont été secouées pendant 30 minutes à l'aide d'un « *wrist-action shaker* ». Un volume de 30 µL de solution stock *Baclight*<sup>TM</sup> a été ajouté à 1 mL d'une dilution de la solution de bactéries extraites. Suite à une période d'incubation de 15 minutes, l'échantillon coloré est filtré à travers un filtre de polycarbonate noir Nucleopore de 0,2 µm. Sous microscopie à épifluorescence, les cellules viables étaient vertes alors que les mortes étaient rouges.

#### 2.2.1.4 Méthodologie - Mode de perturbation de la flore

**La stabilité des fonctions d'une flore étant caractérisée par sa capacité à récupérer suite à une perturbation, il importe de bien définir la perturbation. En effet, dans le cadre de ce projet, une perturbation a été appliquée au sol afin de pouvoir en évaluer l'impact.** Il était primordial de déterminer un mode de perturbation qui était représentatif de ce qu'une flore bactérienne d'un sol pourrait subir afin que ce test ait une signification écotoxicologique. L'objectif initial étant de développer un outil mathématique qui permettrait d'évaluer la santé d'un sol à partir de l'évaluation des fonctions enzymatiques suite à une perturbation, afin de comparer l'effet de la contamination par rapport à un sol témoin (sol non-contaminé prélevé au même endroit avec les mêmes particularités physiques).

Suite à une revue de la littérature, trois types de perturbations ont été retenus : le gel-dégel (-20°C, 7 jours et 21°C, 24 h), l'effet dessiccateur d'un incendie (95°C, 24 h) et l'application d'herbicide (25 mg/kg de 2,4-D).

Pour réaliser ces essais, deux enzymes ont été suivies : la phosphatase acide et alcaline, car ce sont des enzymes sensibles dont les mesures sont relativement rapides et reproductibles, mettant en évidence deux sources d'enzymes effectuant le même travail. De plus, les perturbations ont été appliquées sur un sol propre.

**Une seule concentration de matière organique (M.O.) a été utilisée lors du choix de la perturbation.** Le mélange à 7 % de M.O. a été choisi puisque c'est une concentration qui est plus fréquente dans les sols, mais aussi parce qu'une concentration élevée de M.O. pourrait produire des interférences lors de mesure par colorimétrie.

La densité microbienne a été suivie lors des essais, et des échantillons de sol ont été conservés (congélation à -20°C) dans le but d'en extraire l'ADN et de produire des profils de biodiversité génétique par DGGE au cours des travaux. Les réacteurs consistaient en des bocaux stériles de verre de 1,5 L dans lesquels 300 g de sol humide y étaient déposés. Les réacteurs étaient entreposés avant et après perturbation à la noirceur à la température de la pièce et mélangés régulièrement.

- **Perturbation par gel**

L'absence de neige durant des périodes de gel entraîne des températures du sol sous le point de congélation. Une telle situation représente un stress naturel sur la flore microbienne de ce sol.

Des essais préliminaires ont été effectués afin de déterminer la température ainsi que la période de gel qui reproduiraient une perturbation plausible pour le climat local. Au Canada, des essais de gel-dégel sont effectués sur les matériaux qui constituent les routes et autoroutes afin de vérifier leur solidité et durabilité. Ces tests sont effectués à des températures de -20 °C (gel) et de 20 °C (dégel) (Simonsen et Isacson 2001). Il arrive toutefois dans la pratique que cette température atteigne -30 °C pour une courte période.

**Résumé du protocole de gel-dégel :**

Les tests sont effectués avec le mélange de sol de 7 % M.O. Un gel-dégel simple (1 cycle) puis un multiple (2 cycles) ont été étudiés en utilisant des températures de -20 °C (pour 24 h) et de 20 °C (pour 24 h). Deux types de témoins ont été effectués, un biotique et l'autre abiotique. Le témoin biotique n'a pas subi de période de gel. Le témoin abiotique, quant à lui, consiste en un sol irradié dont la flore a été tuée. Celui-ci a subi les périodes de gel et représente la persistance des enzymes initiales extra et intracellulaires présentes dans le sol une fois irradié.

Après la période prescrite de gel, les échantillons de sols sont incubés à la noirceur à 20 °C pour 24 h, tel que recommandé par (Degens *et al.*, 2001). Les mesures de densité microbienne ainsi que des potentiels d'activités enzymatiques sont ensuite faites à intervalles réguliers (24 h, puis 48 h après la période de récupération rapide).

- **Perturbation par dessiccation simulant un incendie ou une canicule**

L'assèchement d'un sol perturbe peu la flore d'un sol puisque la majorité des bactéries y sont résistantes. De plus, la dessiccation d'un sol à température ambiante, aussi appelée « air drying », est une méthode de conservation d'échantillons pour l'étude des enzymes extracellulaires (Simek et Webster 2000). C'est en fait l'application d'une température « **extrême** » qui représente une perturbation autant pour la flore microbienne que pour la stabilité des enzymes non immobilisées. Cette perturbation est moins représentative du

quotidien des sols, mais se rapproche de l'effet d'un incendie. Les incendies de faible intensité peuvent induire une température de 160 °C aux sols de surface (Choromanska et DeLuca 2002). Toutefois, à cette température, un impact sur la composition chimique des sols a été constaté. À des températures supérieures à 50 °C, les microorganismes thermosensibles sont majoritairement tués. À plus de 70 °C, c'est la végétation qui est directement touchée. Schinner (1983) propose d'exposer le sol à 95 °C pour un séchage optimal sans que le contenu chimique du sol soit affecté. Cette température est atteinte à quelques centimètres de la surface lors d'incendies de faible intensité. En période de canicule, des sols secs sans couvert végétal, peuvent facilement atteindre 65°C (Davis *et al*, 2003). Lorsqu'il s'agit de terres noires, la température de celles-ci peut monter jusqu'à 70°C.

Une perturbation de séchage au four à 95°C pendant 24 hrs a été retenue pour simuler les effets d'un incendie, alors qu'une perturbation de séchage au four à 60°C pendant 24 hrs a été retenue pour simuler l'effet d'une vague de chaleur.

### **Résumé du protocole de dessiccation:**

Les tests ont été effectués sur un sol à 7 % de M.O. Le sol a été asséché à 60°C ou à 95 °C pendant 24 h. Deux témoins sont effectués, un biotique et l'autre abiotique. Le témoin biotique n'a pas subi de période de chauffage. Le témoin abiotique consiste en un sol irradié, dont la flore a été tuée. Celui-ci a subi les périodes de chauffage et représente la persistance des enzymes initiale extra et intracellulaires. Après la période prescrite de chauffage, les échantillons de sols sont rapidement réhumidifiés avec de l'eau stérile à 60 % de leur CRC, puis incubés à la noirceur à 20 °C. Dès que les sols ont retrouvé leur teneur en eau initiale, les mesures de densité microbienne ainsi que les potentiels d'activités enzymatiques sont faites à intervalles réguliers (24 h puis 48 h).

- **Perturbation par ajout d'herbicide**

Selon Martens et Bremner (1993), des concentrations de 5-50 mg de 2,4-D/kg de sol peuvent se retrouver dans les sols soumis à l'épandage de cet herbicide. Un seul ajout de 50 mg de 2,4-D/kg de sol a été fait.

### **Résumé du protocole de contamination :**

Le sol est séché à l'air libre et réhumidifié, à l'aide d'une solution de 2,4-D dissous dans de l'eau stérile, à 60 % de leur CRC, puis incubé à la noirceur à 20 °C. Deux témoins sont effectués, un biotique et l'autre abiotique. Le témoin biotique est réhumidifié avec de l'eau stérile. Le témoin abiotique consiste en un sol irradié, dont la flore a été tuée. Dès que les sols ont retrouvé leur teneur en eau initiale, les mesures de densité microbienne ainsi que des potentiels d'activités enzymatiques sont faites à intervalles réguliers (24 h puis 48 h).

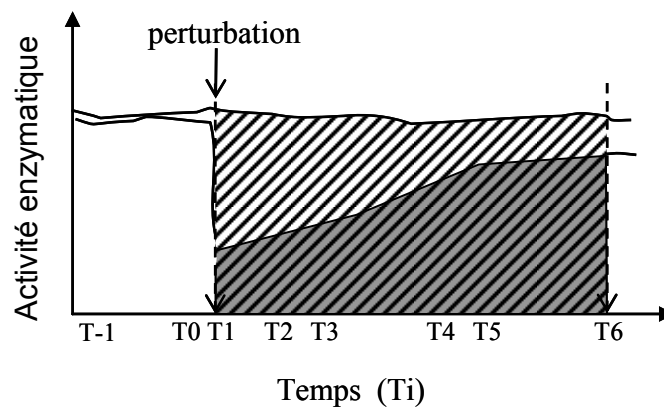
#### *2.2.1.5 Présentation de la méthode de mesure RSSI*

La section qui suit présente une méthode permettant d'évaluer la stabilité des fonctions du sol. Ces fonctions sont exécutées par des enzymes spécifiques en réponse à différents types de perturbations environnementales. Cette méthode produit un index unique, appelé *Relative Soil Stability Index* (RSSI), qui compare la capacité du sol à effectuer une certaine quantité de

travail, exprimée par la transformation de substrat, suite à l'application d'une perturbation par rapport à ce que le même sol transformerait sans être perturbé. C'est par sa capacité à résister et à récupérer en se réorganisant que la stabilité de la flore microbienne du sol est évaluée.

L'équation 2.3 présente le calcul de l'index RSSI sous sa forme mathématique et la Figure 2.1 en donne une représentation schématique. Cet index est obtenu en divisant la valeur de l'aire sous la courbe de l'activité enzymatique entre le temps T1 (juste après la perturbation) et le T6 (13 jours après perturbation) du sol perturbé (section grise de la Figure 2.1) par la valeur de l'aire sous la courbe de l'activité enzymatique entre le T1 et le T6 du sol témoin (l'aire hachurée de la Figure 2.1).

$$RSSI = \frac{\int_{T1}^{T6} AE_{perturbé}(t) dt}{\int_{T1}^{T6} AE_{témoin}(t) dt} \times 100\% \quad \text{Équation 2-3}$$



**Figure 2.1 : Représentation schématique du calcul de l'index RSSI.**

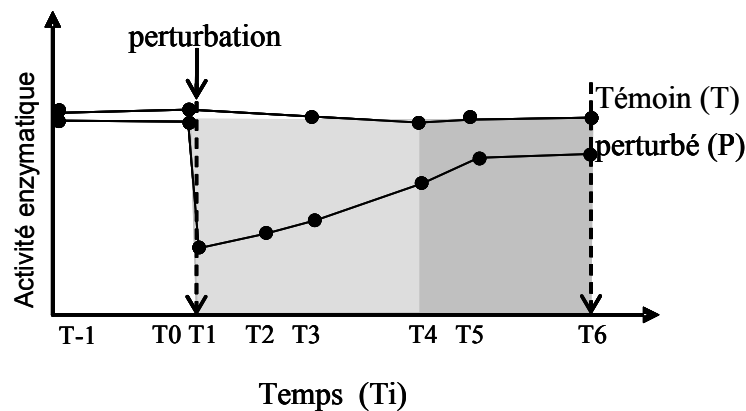
Lorsqu'on obtient une valeur de RSSI égale à 100%, ceci démontre que l'impact observé au niveau de l'activité enzymatique globale du sol suite à une perturbation est équivalent à celui observé pour le sol non perturbé. À l'opposé, quand l'activité enzymatique du sol est complètement inhibée par la perturbation, on obtient alors une valeur de RSSI égale à 0%. Ainsi, la valeur de RSSI offre une étendue se situant entre 0 et 100%. Cette valeur de RSSI reflète le pourcentage du travail exécuté dans des conditions optimales par le sol perturbé par rapport au sol non perturbé (sol témoin).

#### 2.2.1.6 RSSI simplifié

**Afin de pouvoir faciliter l'utilisation de l'outil RSSI, la réduction du temps d'analyse a été envisagée. L'objectif de cette étape de simplification est de réduire le nombre de points d'échantillonnage nécessaire au calcul d'un RSSI, sans pour autant réduire la sensibilité de l'outil.** Pour vérifier la faisabilité de cette simplification ainsi que pour

déterminer quels sont les points d'échantillonnage déterminants dans le calcul du RSSI, une analyse statistique a été effectuée en se servant des essais réalisés sur les sols que l'on retrouve à la section 2.2.1.9.

Différentes combinaisons de points servant au calcul des aires sous les courbes des sols perturbés et non perturbé a été effectuée. La Figure 2.2 présente les points ayant servis aux calculs des aires définissant le RSSI.



**Figure 2.2: Illustration des points d'échantillonnage effectués lors des essais de perturbations pour la création de la courbe du sol témoin (non-perturbé) et du sol perturbé.**

*La période de récupération de 13 jours est en gris foncé et la période de récupération de 5 jours est en gris pâle.*

La liste des combinaisons de points utilisés pour les calculs simplifiés des aires sous les courbes est présentée dans le Tableau 2.27. Aucun point de la courbe témoin n'a été utilisé pour le calcul des RSSI simplifiés. L'estimation de l'aire sous la courbe du sol témoin se faisait en utilisant le  $T_0$  de la courbe perturbée seulement (aires grises sur la Figure 2.2). Deux périodes de récupération ont été testées pour les calculs de RSSI simplifiés: 5 jours et 13 jours. L'échantillon statistique était composé de 240 éléments, i.e. des courbes résultant de tests de perturbation. Ces tests de perturbations ont été effectués sur 3 sols différents (sol à 7 % M.O., sol à 14 % M.O. et un loam à 4,3 % M.O.), à l'aide de 5 perturbations différentes (gel-dégel 1 cycle, gel-dégel 2 cycles, dessiccation à 60°C, dessiccation à 95°C et application d'herbicide), avec 2 contaminations (2,4-D et Cu) en suivant 6 enzymes différentes (phosphatase acide et alcaline, uréase, protéase, arylsulfatase et  $\beta$ -glucosidase).

Les résultats des RSSI simplifiés obtenus pour chacune des combinaisons ont été comparés aux valeurs des RSSI originaux. Celui-ci est qualifié de "golden standard" puisqu'il représente la valeur la plus exacte disponible. La série de valeurs de RSSI simplifiés a été comparée à l'aide d'un test de Pearson à la série de valeurs de RSSI originaux afin de mesurer le degré de corrélation entre les deux séries. La série de RSSI simplifiés montrant le degré de corrélation le plus élevé avec la série de RSSI originaux sera celle qui permettra la même différenciation entre sols, perturbations et contaminations.

Le Tableau 2.27 montre les résultats des tests de Pearson sous forme de coefficients de corrélation ( $r^2$ ). La combinaison montrant la meilleure corrélation avec le RSSI original est le RSSI-8, se servant de 4 points d'échantillonnage sur une période de récupération de 5 jours.

**Tableau 2.27 : Coefficients de corrélation  $r^2$  évalués selon le test de Pearson entre le RSSI original (golden standard) et les différentes combinaisons employées pour le calcul des RSSI simplifiés, n=277**

	Points utilisés pour le calcul	$r^2$ de Pearson
RSSI-1	T1, T2, T3, T4, T6	0,976
RSSI-2	T1, T2, T3, T6	0,968
RSSI-3	T1, T2, T4, T6	0,973
RSSI-4	T1, T3, T6	0,936
RSSI-5	T1, T4, T6	0,963
RSSI-6	T1, T2, T6	0,938
RSSI-7	T1, T6	0,890
<b>RSSI-8</b>	<b>T1, T2, T3, T4</b>	<b>0,981</b>
RSSI-9	T1, T3, T4	0,932
RSSI-10	T1, T4	0,912

Afin de vérifier si cette méthode simplifiée de calcul de RSSI possède la même capacité de différenciation entre les sols contaminés et les sols sains, une analyse de variance de type ANOVA a été effectuée sur les résultats de chacun des enzymes des deux RSSI. Cependant, ce test n'a pu être effectué qu'avec les données relatives à la contamination au 2,4-D. Dans les deux cas (avec le RSSI original et le RSSI-8), une différenciation significative a pu être faite entre le sol propre et le sol contaminé pour l'uréase, la  $\beta$ -glucosidase et l'arylsulfatase, démontrant un degré de sensibilité similaire pour les 2 types de calcul. Ainsi, dans le contexte où une autre étude d'évaluation des effets toxiques du niveau trophique microbien serait réalisée l'utilisation de l'outil RSSI simplifié serait envisagée. Cependant, pour les besoins de l'étude, le calcul de RSSI sera présenté avec l'ensemble des points.

#### 2.2.1.7 Résultats- Caractérisation des différents sols

- **Contamination du sol**

Pour les besoins de l'étude, comme nous cherchons à avoir une réponse toxique de la part du sol, une contamination de 50 mg/kg (valeur théorique) a été choisie. En effet, les effets toxiques létaux sur les organismes terrestres sont observables à partir de concentrations de 272 mg/kg ( $DL_{50}$  pour les oiseaux) et l'inhibition de la croissance de plantes est observée à des concentrations de 10 mg/kg (83% d'inhibition *P.sativum*). Les concentrations expérimentales mesurées furent de 35 mg 2,4-D/kg sol sec pour le sol 7 % M.O. et de 39 mg 2,4-D/kg sol sec pour le sol 14 % M.O. Ces concentrations demeurent tout de même assez élevées pour observer une réponse toxique de la part du sol.

- **Caractérisation des sols**

Les sols choisis pour tester les essais avec une contamination organique ont été tamisés à 2 mm et le mélange des sols s'est fait de façon à obtenir des contenus en carbone organique total (COT) de 5 et 10 % (valeurs théoriques). Ces deux sols choisis ne contiennent pas d'argile afin de limiter les différentes interactions possibles entre les molécules de sol et les enzymes lors de la mise au point de la méthode. Ces concentrations correspondent à l'étendue des concentrations en COT contenu dans les sols de la région de Montréal. Le Tableau 2.28 présente les propriétés physico-chimiques des deux sols utilisés lors de la phase de mise au point de la méthode.

**Tableau 2.28 : Propriétés physico-chimiques des sols utilisés lors de la mise au point de la méthode**

Analyse	Terre noire	Sable
Azote total Kjeldahl	7700 mg/kg	36 mg/kg
Carbone organique total	27 %	0,11 %
Chlorures	860 mg/kg	< 2,0 mg/kg
Phosphore total	1100 mg/kg	710 mg/kg
Sulfate (soluble)	560 mg/kg	6,0 mg/kg
CRC	70 % w/w	10 % w/w
PH	6,8	8,1
Humidité	52 %	1,4 %

Des mélanges de terre noire et de sable ont été faits afin d'obtenir les concentrations de matière organique désirées. Pour la mise au point de la méthode, des mélanges de M.O. de 7 % et 14 % (valeurs expérimentales) ont été utilisés. Afin de favoriser l'activité microbienne et ainsi de bien mesurer l'impact des perturbations imposées aux sols, l'humidité des sols est amenée à 60 % de leur CRC. Les sols ainsi mélangés sont incubés à la noirceur et à la température ambiante ( $20 \pm 1$  °C) jusqu'à ce que la flore soit acclimatée et stable. Les caractéristiques physico-chimiques et enzymatiques de ces mélanges sont présentées dans le Tableau 2.29.

**Tableau 2.29 : Caractérisations physico-chimiques et enzymatiques des mélanges de 7 % et 14 % M.O.**

Propriétés	Valeurs du 7 % M.O.	Valeurs du 14 % M.O.
Azote total Kjeldahl	1400 mg/kg	2850 mg/kg
Carbone organique total	7,4 % (w/w)	13,9 % (w/w)
Chlorures	180 mg/kg	N/A
Phosphore Total	600 mg/kg	850 mg/kg
Sulfates (solubles)	130 mg/kg	N/A
PH	6,9	7,3
Capacité de rétention au champ	30 % de contenu en eau	56 % de contenu en eau
Activité enzymatique		
phosphatase acide	95,8 µg p-nitrophenol/g sol h	223,7 µg p-nitrophenol/g sol h
phosphatase alcaline	91,5 µg p-nitrophenol/g sol h	195,4 µg p-nitrophenol/g sol h
uréase	13,8 µg N/ g sol 2h	24,3 µg N/ g sol 2h
Sulfatase	9,4 µg p-nitrophenol/g sol h	17,1 µg p-nitrophenol/g sol h
Protéase	150,7 µg tyrosine/g sol 2h	220,3 µg tyrosine/g sol 2h
β-glucosidase	30,8 µg p-nitrophenol/g sol h	60,2 µg p-nitrophenol/g sol h

N/A: non-analysé

En général, l'activité enzymatique des enzymes à l'étude est suffisamment élevée pour la mise au point de la méthode. Une inhibition de l'activité enzymatique est observée pour le mélange 7 % M.O par rapport au mélange 14 % M.O, ceci démontrant l'influence de la M.O. sur l'activité enzymatique d'un sol.

Le troisième et quatrième sol choisi pour tester les essais servant à la mise au point de la méthode sont des sols avec des contenus en matière organique de 3,3 % et 4,3 % M.O. et en argile de 10 % et 27 % et une contamination inorganique (cuivre). Les sols utilisés pour cette section de l'étude ont été caractérisés au niveau de ses propriétés physico-chimiques ainsi qu'au niveau de son potentiel d'activité enzymatique. Il s'agit donc d'un loam et d'un loam sableux tous deux contaminés à 200 mg Cu/kg de sol sec. Le Tableau 2.30 présente les résultats de cette caractérisation pour les deux sols.



**Tableau 2.30 : Caractérisation du sol utilisé pour l'application de la méthode**

Propriétés	Loam contaminé à 200 mg/kg de Cu	Loam sableux contaminé à 200 mg/kg de Cu
Ph	5,31	5,66
Carbone organique total	4,3 % (w/w)	3,3 % (w/w)
Capacité de rétention au champ	49 % de contenu en eau (w/w)	63 % de contenu en eau (w/w)
Humidité avant traitement	6 %	8,5 %
Activité enzymatique		
phosphatase acide	2,1 µg p-nitrophenol/g sol h	129,0 µg p-nitrophenol/g sol h
phosphatase alcaline	0,4 µg p-nitrophenol/g sol h	35,8 µg p-nitrophenol/g sol h
uréase	Aucune activité	---
protéase	---	110,1 µg tyrosine/g sol 2h
β-glucosidase	---	70,5 µg p-nitrophenol/g sol h
sulfatase	---	24,4 µg p-nitrophenol/g sol h

L'activité enzymatique du sol loam a été mesurée uniquement pour trois enzymes : les deux types de phosphatases et l'uréase. L'activité enzymatique des phosphatases était assez faible, mais permettait tout de même qu'un test de perturbation soit effectué sur ce sol pour le suivi de ces enzymes. L'activité de l'uréase, quant à elle, fut complètement inhibée par la contamination au cuivre, ce phénomène est également rapporté par Leca *et al.*(2000). La présence de métaux est souvent une source de désactivation des capacités de transformation de substrat des enzymes produites par la microflore (Tabatabai 1994).

Pour le loam sableux, l'activité enzymatique était suffisamment élevée pour tester la méthode développée sur l'ensemble des enzymes mise à l'exception de l'uréase qui n'a pas été retenue pour la suite de l'étude pour la raison mentionnée dans le paragraphe précédent.

- **Stérilisation des sols**

La stérilisation des sols n'a été que partielle. Pour chaque sol irradié, une certaine quantité de microorganismes pouvait être dénombrée par microscopie (résultats non-montrés). Rappelons que la méthode de dénombrement par microscopie est une méthode très sensible qui permet de détecter toute bactérie présente. Or, la dose de  $\gamma$ -radiation la plus élevée a été utilisée pour traiter les sols sans que le sol ne puisse être complètement stérilisé. Ainsi, ces sols ne peuvent donc pas servir de témoins abiotiques puisqu'une certaine activité microbienne y fut détectée.

Plusieurs méthodes telles que l'autoclavage et l'ajout de produits chimiques toxiques peuvent être employées comme moyen de stérilisation des sols. Cependant, ces méthodes altèrent la composition initiale des sols. En effet, la stérilisation par autoclavage modifie les caractéristiques de la matière organique et l'ajout d'azoture de sodium ou de  $HgCl_2$  change le contenu chimique des sols (Wolf et Skipper 1994). Pour ces raisons, ces deux techniques

furent donc exclues de l'étude. En conséquence, les tests de perturbations sont présentés sans témoin abiotique et l'activité résiduelle des enzymes n'est donc pas mesurée.

#### 2.2.1.8 Mise au point de la méthode

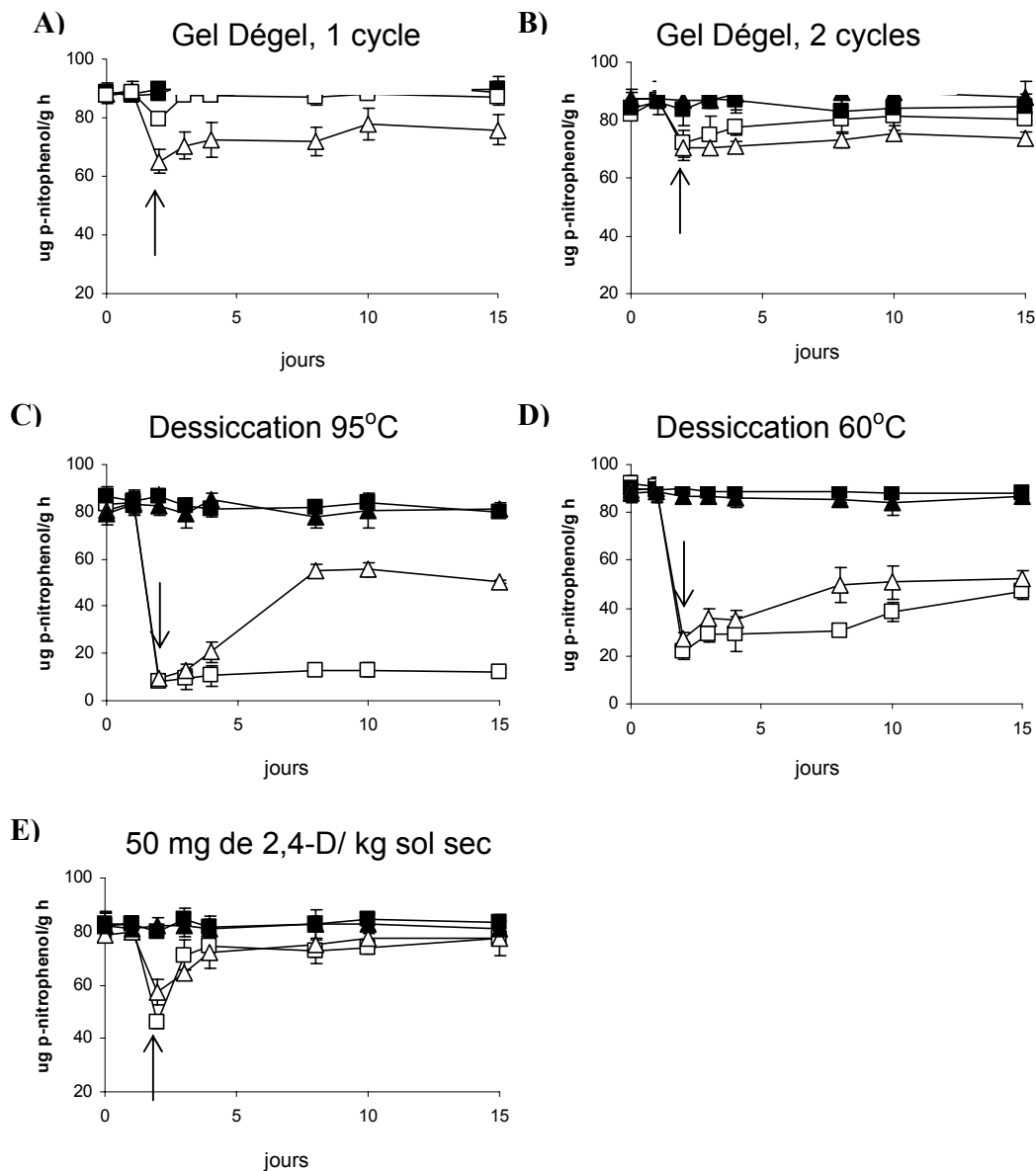
La méthode a été mise au point avec un premier groupe d'enzymes, puis a été testée dans la suite des travaux sur les autres enzymes. Le premier groupe comprenait les enzymes les plus sensibles : les phosphatases. Des échantillons de sols supplémentaires ont été recueillis pour pouvoir évaluer la biodiversité génétique et quantifier l'ADN microbien des sols (méthode décrite par Dell'Anno *et al.*, 1998).

- **Modes de perturbation, impacts sur la stabilité enzymatique**

Afin de vérifier la validité de l'indice, celui-ci a été comparé aux mesures de résistance et de récupération. Des phosphatases acide et basique ont été choisies pour démontrer le potentiel du RSSI et trois types de perturbations ont été employés, à savoir le gel-dégel (-20°C pour 24h, 20°C pour 1 et 2 cycles de 24h), le feu ou des impacts de vagues de chaleur (simulés respectivement par le séchage au four à 95°C pour 24h et à 60°C pour 24h) et application d'herbicide (50 mg 2,4-D /kg de sol sec). La réponse aux différentes perturbations a été suivie par des mesures colorimétriques de l'activité des phosphatases acide et basique. Les protocoles correspondants à chacune des perturbations utilisées ainsi que ceux se rattachant aux mesures colorimétriques des enzymes sont présentés à l'annexe B de ce rapport.

La Figure 2.3 présente le suivi de l'activité enzymatique des phosphatases acide et basique dans le sol de référence (sol à 7 % M.O.) suite à différentes perturbations.

L'activité enzymatique des phosphatases du sol témoin (non perturbé) est demeurée constante pendant la durée de l'expérience. La valeur moyenne de l'activité des phosphatases acide et basique se situait autour de  $86 \pm 3$   $\mu\text{g } p\text{-nitrophenol/g}$  de sol sec. Il n'y a pas de différence significative entre l'activité enzymatique des phosphatases acide et basique pour les différentes perturbations employées, à l'exception de la perturbation gel-dégel 1 cycle, où une résistance plus élevée de l'ordre de 25 % pour l'activité de la phosphatase acide par rapport à la phosphatase basique a été observée.



**Figure 2.3 : Suivi des phosphatases acide et basique pour les cinq perturbations.**

A) gel-dégel unique, B) gel-dégel 2 cycles, C) dessiccation à 95°C, D) dessiccation à 60°C et E) ajout de 50mg de 2,4-D/kg de sol. Les ▲ et ■ représentent respectivement les enzymes phosphatases basique et acide pour les sols non perturbés qui servent de témoin, et les △ et □ pour les sols perturbés. Les flèches indiquent le dernier point avant la perturbation.

La perturbation par le gel-dégel est celle qui est la plus courante dans la réalité québécoise. Bien que les effets d'un gel aient été évidents, les résultats montrent que l'impact de cette perturbation sur la communauté microbienne n'est pas assez important pour être facilement utilisable dans un outil mathématique (Figure 2.3, A et B). À l'opposé, la perturbation par dessiccation à température élevée représente une réalité québécoise moins courante, mais son impact sur la microflore est marqué et plus facilement utilisable dans un outil mathématique (Figure 2.3, C).

**Tableau 2.31 : *Relative Soil Stability Index* (RSSI) des enzymes phosphatases acide et basique**

Enzymes	Perturbations	Résistance (%)	Récupération finale (%)	Vitesse de récupération max (% d <sup>-1</sup> )	RSSI (%)
Phosphatase acide	Gel-dégel (1)	90 ± 2.3	98 ± 2.9	8 ± 4.6	97 ± 0.8
	Gel-dégel (2)	85 ± 4.4	95 ± 4.7	6 ± 3.0	93 ± 5.1
	Dessiccation 95	6 ± 4.0	15 ± 1.6	4 ± 2.9	14 ± 1.9
	Dessiccation 60	24 ± 3.4	49 ± 3.3	9 ± 5.3	38 ± 2.9
	2,4-D	58 ± 3.8	97 ± 6.5	28 ± 9.4	87 ± 2.6
Phosphatase basique	Gel-dégel (1)	72 ± 3.1	88 ± 5.7	5 ± 3.0	83 ± 3.2
	Gel-dégel (2)	81 ± 7.6	84 ± 7.6	2 ± 3.2	82 ± 4.7
	Dessiccation 95	12 ± 2.8	63 ± 3.2	10 ± 1.0	50 ± 6.8
	Dessiccation 60	31 ± 2.7	56 ± 3.7	11 ± 3.8	52 ± 7.7
	2,4-D	71 ± 5.2	95 ± 2.7	11 ± 3.1	90 ± 3.2

L'application d'une perturbation par un ajout unique de 2,4-D à une concentration de 50 mg/kg a permis de déterminer que l'impact initial (résistance) de la contamination sur l'activité enzymatique est observable pendant seulement 3 jours. Le mode de perturbation par dessiccation à 60°C a été testé parce qu'il représente la température du sol en temps de sécheresse durant la période estivale au Québec. Les résultats obtenus montrent un impact intermédiaire sur la microflore, ce qui s'avère intéressant pour le développement de l'outil.

Le Tableau 2.31 présente la résistance, la récupération, le taux de récupération maximal en plus du RSSI pour chacune des phosphatases en lien avec les différentes perturbations étudiées. Les sols ayant subi une dessiccation montrent une résistance beaucoup plus faible que ceux ayant subi un gel-dégel ou une application d'herbicide 2,4-D. En effet, la phosphatase acide est l'enzyme la plus affectée par la dessiccation à 95°C. Le rapport de résistance observé était de 6 % et la récupération finale a atteint seulement 15 %. Pour le même mode de perturbation, une récupération de 63 % pour la phosphatase basique a été obtenue. À l'opposé, la perturbation par gel-dégel provoque un impact beaucoup moindre, avec une résistance et une récupération supérieures à 72 % pour les phosphatases.

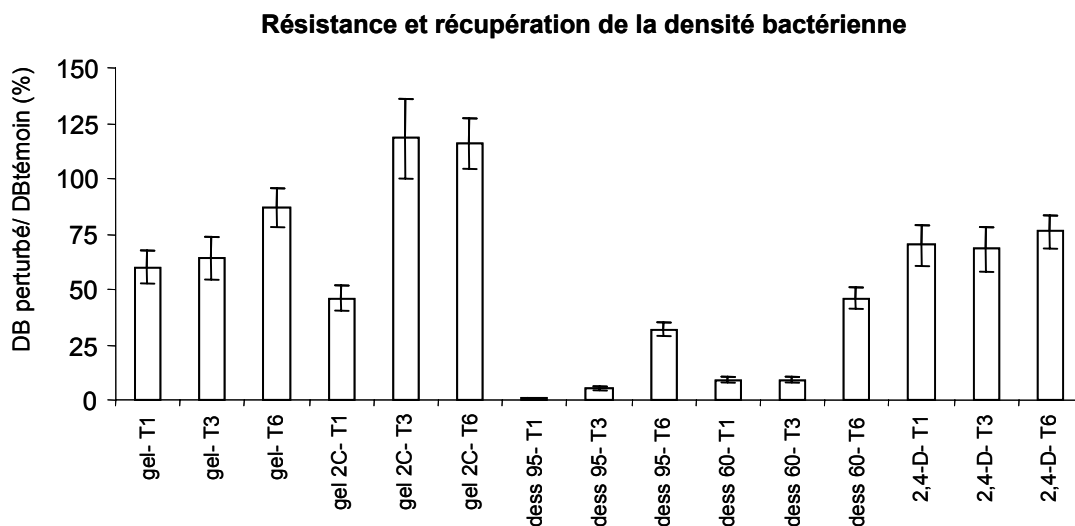
**Le RSSI décrit adéquatement la façon dont la communauté du sol répond aux différentes perturbations dans son environnement.** Ainsi, en ce qui a trait à la stabilité du sol, les mêmes conclusions peuvent être tirées en observant les valeurs de RSSI, de résistance, de récupération et de vitesse de récupération. Les perturbations de gel-dégel ont eu peu d'impact sur l'activité des phosphatases. La valeur de RSSI obtenue est de plus de 82 %. L'impact des perturbations gel-dégel était plus prononcé sur la phosphatase basique (RSSI minimale de 82 %) que sur la phosphatase acide (RSSI de 93 %). Contrairement au mode de perturbation par dessiccation à 95°C, l'impact était plus marqué sur l'activité de la phosphatase acide (RSSI minimal de 10 %) que sur la phosphatase basique (RSSI minimal de

50 %). En regroupant les différents types de perturbations par ordre de sévérité, la relation suivante est donc obtenue :

Dessiccation à 95°C > Dessiccation à 60°C > Application de 2,4-D = Gel-dégel 2 cycles > Gel-dégel 1 cycle

- **Impact de la perturbation sur la diversité microbienne**

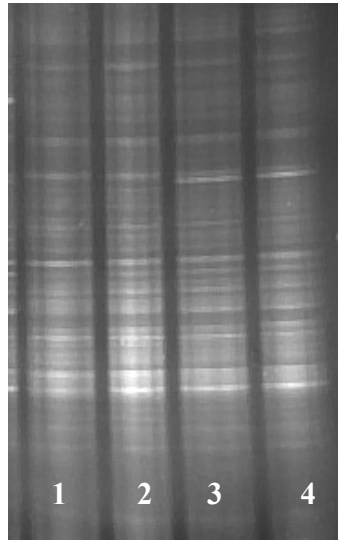
La densité bactérienne du sol a été évaluée durant les tests de perturbation. La Figure 2.4 présente la densité bactérienne, exprimée en pourcentage (rapport de la densité bactérienne du sol perturbé sur la densité bactérienne du sol témoin (non perturbé)), pour la résistance (T1) et la récupération (T3 et T6). Les modes de perturbation par dessiccations, à 60°C et 95°C, entraînent une diminution marquée de la densité bactérienne avec des valeurs inférieures de 10 % du sol témoin après les perturbations. De plus, la récupération suite à une dessiccation à 95°C demeure inférieure à 50 %. La perturbation par gel-dégel entraîne également une diminution de la densité bactérienne du sol. Le pourcentage de résistance de la densité bactérienne pour le gel-dégel 2 cycles est plus faible que celui observé pour le gel-dégel 1 cycle. Cependant, la récupération de la densité bactérienne pour le gel-dégel 2 cycles est plus importante que le gel-dégel 1 cycle et celle du sol non perturbé puisqu'une récupération supérieure à 100 % est observée. Enfin, l'application de 2,4-D a le moins d'effet sur la densité microbienne puisqu'une résistance de l'ordre de 70 % et une faible récupération ont été notées.



**Figure 2.4 Densité bactérienne exprimée en pourcentage en fonction de la résistance (T1) et la récupération (T3 et T6)**

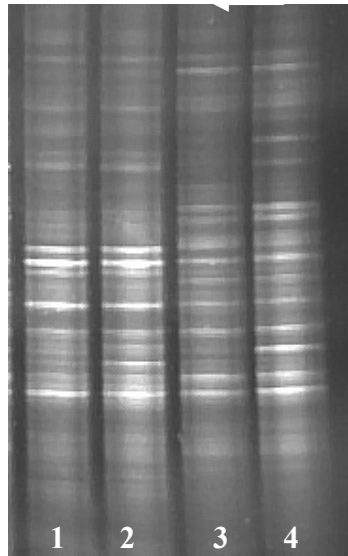
Gel et gel 2C correspondent respectivement aux modes de perturbation gel-dégel 1 cycle et 2 cycles. Dess 95 et Dess 60 correspondent aux modes de perturbation par dessiccation à 95°C et à 60°C. 2,4-D correspond à la perturbation par ajout d'herbicide 50 mg/kg sol sec.

La migration d'ADN amplifié sur gel DGGE permet d'identifier le patron dominant de la flore bactérienne du sol. La Figure 2.5 présente les profils de la diversité microbienne du sol organique 7 % M.O. non contaminé, suivi d'une perturbation par 2 cycles gel-dégel. Dans l'ensemble, il n'y a pas d'impact sur la diversité de la flore microbienne lorsqu'une perturbation par gel-dégel 2 cycles est employée.



**Figure 2.5 : Profils DGGE de l'ARN 16S amplifié de l'ADN extrait de sol non-contaminé perturbé par 2 cycles de gel-dégel.**

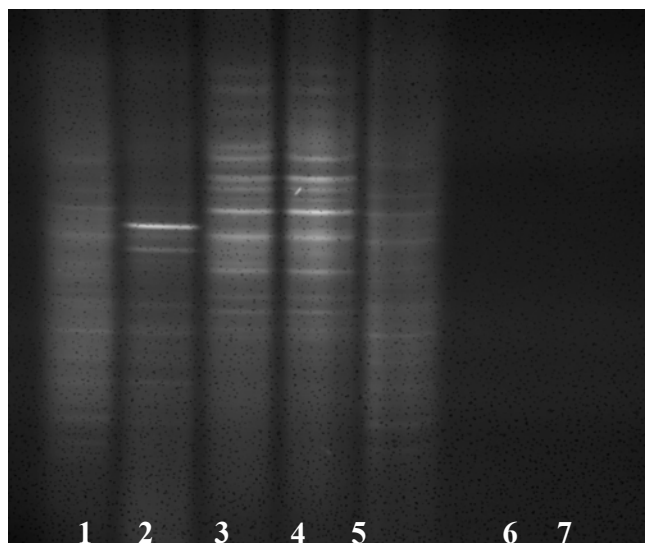
*Ligne 1 : Jour 0 du sol avant perturbation. Ligne 2 : Jour 1 du sol juste après la perturbation. Ligne 3 : Jour 3 du sol perturbé. Ligne 4 : Jour 14 du sol perturbé.*



**Figure 2.6 : Profils DGGE de l'ARN 16S amplifié de l'ADN extrait de sol non-contaminé perturbé par dessiccation à 60°C.**

*Lignes 1 : Jour 0 du sol avant perturbation. Ligne 2 : Jour 1 du sol juste après la perturbation. Ligne 3 : Jour 3 du sol perturbé. Ligne 4 : Jour 14 du sol perturbé.*

La Figure 2.6 présente le patron de diversité microbienne du sol 7 % M.O. non contaminé pour la perturbation par dessiccation à 60°C. Une fois soumis à la perturbation, une différence entre les profils DGGE a été notée. En effet, l'apparition de bandes supplémentaires pour les puits 3 et 4 montre des profils de diversité plus importants dans chacun des puits. Dans l'ensemble, c'est le puits 4 qui révèle la plus grande diversité microbienne. Ces résultats suggèrent que la perturbation par dessiccation à 60°C favorise la réorganisation de la flore en augmentant sa diversité microbienne.



**Figure 2.7 : Profils DGGE de l'ARN 16S amplifié de l'ADN extrait du sol non-contaminé perturbé par une dessiccation à 95°C pendant 24h.**

*Ligne 1:* Sol avant perturbation, jour 1. *Ligne 2:* sol juste après la perturbation, jour 4. *Ligne 3:* sol perturbé, jour 5. *Lignes 4 et 5:* sol perturbé et non perturbé respectivement, jour 15. *Ligne 6* témoin extraction d'ADN. *Ligne 7 :* témoin PCR.

La Figure 2.7 présente l'évolution de la flore affectée par la perturbation de dessiccation à 95°C, i.e. la perturbation la plus sévère. Les lignes 3 et 4 montrent à quel point la flore est perturbée au niveau de sa diversité génétique lorsqu'on la compare au patron initial de la ligne 1. Malgré tout, elle a réussi à s'adapter afin de continuer à produire de la phosphatase alcaline de la même façon qu'avant la perturbation, tel qu'observable à la Figure 2.3. Voici donc les premiers indices distinguant la diversité génétique de la diversité fonctionnelle.

**Suite aux observations faites à partir de la densité bactérienne et des profils DGGE pour les différentes perturbations employées, la perturbation par dessiccation à température modérée a été retenue comme mode de perturbation et a été utilisée lors de la prochaine étape de l'étude, consistant à valider les réponses d'un sol sain et d'un sol contaminé à une perturbation, en posant l'hypothèse que l'impact de la dessiccation à 60°C sur une flore exposée à un contaminant est plus important.**

#### *2.2.1.9 Application de la méthode à des sols contaminés*

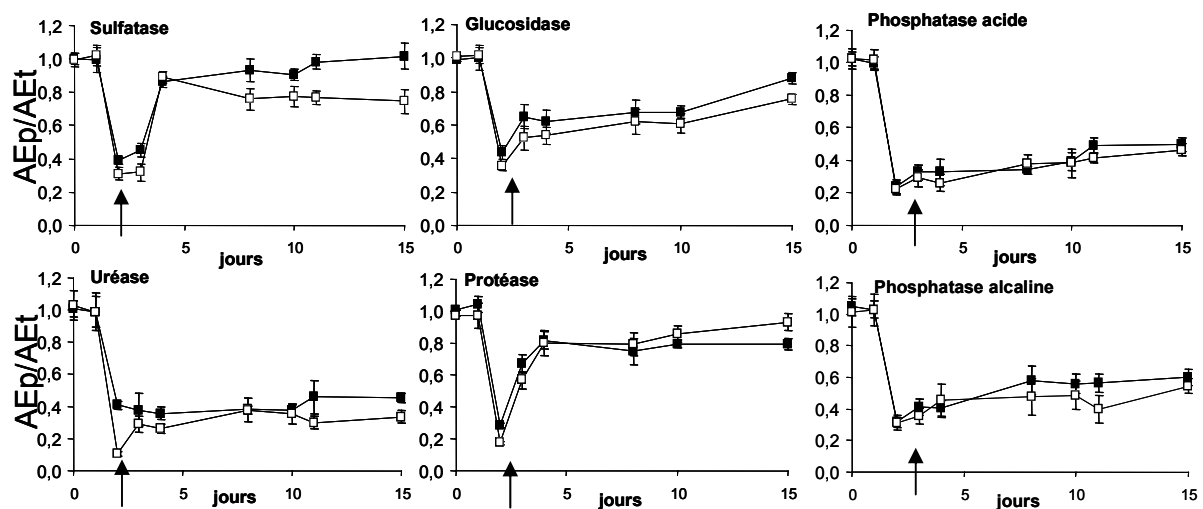
Suite aux résultats obtenus lors des tests de différentes perturbations, l'étape suivante consistait à vérifier si le suivi de l'impact de la perturbation retenue **permettait d'évaluer l'état de la flore microbienne d'un sol contaminé par rapport au sol non-contaminé**. Pour ce faire, des tests de perturbation ont été appliqués à la fois sur un sol contaminé et non-contaminé. Il fallait vérifier si une perturbation a un impact sur la structure de la communauté microbienne. C'est par la capacité de réorganisation de celle-ci que la stabilité de la flore microbienne du sol a été évaluée.



- Sol contaminé au 2,4-D (7 % M.O.)

### Impact d'une perturbation sur les cycles biogéochimiques

La Figure 2.8 présente le suivi de l'activité enzymatique d'un sol perturbé (AEp) sur l'activité enzymatique dans le sol non perturbé (AEt). Les réponses enzymatiques du sol contaminé (formes blanches) sont comparées aux réponses du sol propre (formes noires). Les enzymes les plus affectées par la perturbation sont les phosphatases et l'uréase. Les phosphatases ont montré une faible récupération pendant les 13 jours suivant la perturbation. L'activité potentielle de l'uréase a eu une plus grande résistance initiale lors de la perturbation pour le sol non contaminé, mais son activité est demeurée constante et elle n'a pas récupéré dans le temps. L'arylsulfatase et la protéase ont récupéré plus de 80% de leur capacité initiale et ce seulement après 3 jours suivant la perturbation. La  $\beta$ -glucosidase, quant à elle, a récupéré seulement après 13 jours. Toutes les enzymes ont conservé entre 20 et 40 % de leur activité potentielle initiale après la perturbation. Seulement 2 des 6 enzymes examinées, l'uréase et la protéase, ont montré une résistance plus élevée dans le sol non contaminé. Cependant, l'activité résiduelle juste après la perturbation de l'activité enzymatique de l'uréase pour le sol non contaminé était 4 fois supérieure au sol contaminé. Les rapports de rétablissement étaient semblables pour les sols non contaminé et contaminé à l'exception des enzymes arylsulfatase, uréase et glucosidase, pour lesquelles la récupération était plus faible pour le sol contaminé.



**Figure 2.8: L'effet de la dessiccation à 60°C sur l'activité enzymatique des sols contaminé au 2,4-D (□) et non contaminé (■).**

Les résultats sont exprimés à partir du ratio de l'activité enzymatique du sol perturbé sur le sol témoin (non perturbé). Les flèches indiquent les premiers échantillons suivant la perturbation.

Rappelons que la valeur RSSI indique la proportion de l'activité potentielle des enzymes du sol perturbé par rapport au sol témoin (non perturbé). Ainsi, plus la valeur RSSI est élevée, plus la stabilité des fonctions enzymatiques du sol est augmentée. Les enzymes les plus

stables lors de la dessiccation à 60°C en présence de sol non contaminé étaient l'arylsulfatase (RSSI de 87 %), la protéase (RSSI de 77 %) et la  $\beta$ -glucosidase (RSSI de 71 %). Dans l'ensemble, les résultats des valeurs de RSSI sont plus élevés pour le sol non contaminé, à l'exception des enzymes phosphatases et protéase.

**Tableau 2.32 : *Relative Soil Stability Index* (RSSI) de l'activité enzymatique du sol 7 % M.O. pour la perturbation par dessiccation à 60°C.**

Enzyme	RSSI (%)	
	Sol non contaminé	Sol contaminé
Phosphatase acide	38 $\pm$ 2 a	36 $\pm$ 3 a
Phosphatase basique	41 $\pm$ 5 a	44 $\pm$ 3 a
Arylsulfatase	87 $\pm$ 2 a	75 $\pm$ 3 b
Uréase	38 $\pm$ 3 a	32 $\pm$ 2 b
Protéase	77 $\pm$ 4 a	79 $\pm$ 4 a
$\beta$ -glucosidase	71 $\pm$ 3 a	60 $\pm$ 3 b

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écarts-types. Ces derniers sont calculés pour n=6.

Pour une même enzyme, les valeurs de RSSI suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p < 0.01$ )

- **Sol contaminé au 2,4-D (14 % M.O.)**

Le Tableau 2.32 indique les valeurs de RSSI obtenues pour les sols contaminé au 2,4-D et non-contaminé pour l'ensemble des enzymes testées pour un contenu en M.O de 14 %. Cette fois, les enzymes les plus stables lors de la dessiccation à 60°C en présence de sol non contaminé étaient l'arylsulfatase (RSSI de 91 %) et la protéase (RSSI de 123 %). L'application d'une perturbation par dessiccation à 60°C pour ce sol avec un contenu en M.O de 14 % stimule l'activité de la protéase, et ce pour les sols contaminé et non-contaminé. Les valeurs de RSSI obtenues sont respectivement de 101 % et de 123 %. Cette augmentation du potentiel de l'activité de la protéase réside dans le fait que le contenu en matière organique stimule la croissance des micro-organismes (voir Figure 2.9 aux jours 1, 4 et 15). La croissance des micro-organismes est régulée par la présence d'acides aminés disponibles. Or, ces acides aminés sont également régulés par la quantité de protéases présente dans le sol, ce qui justifie donc leur augmentation une fois soumise à une perturbation.

L'activité des phosphatases et de la  $\beta$ -glucosidase n'a pas démontré de différence significative entre les sols contaminé au 2,4-D et non-contaminé. Cependant, la présence de 2,4-D a influencé les valeurs de RSSI de l'arylsulfatase, de l'uréase et de la protéase en les diminuant. Ainsi, la contamination au 2,4-D au sein d'un sol semble affecté certaines enzymes impliquées dans les cycles de l'azote (protéase et uréase) et du soufre (arylsulfatase).

**Tableau 2.33 : *Relative Soil Stability Index* (RSSI) de l'activité enzymatique du sol 14 % M.O. pour la perturbation par dessiccation à 60°C.**

Enzyme	RSSI (%)	
	Sol non contaminé	Sol contaminé
Phosphatase acide	47 ± 1 a	45 ± 3 a
Phosphatase basique	55 ± 4 a	55 ± 3 a
Arylsulfatase	91 ± 4 a	80 ± 5 b
Uréase	39 ± 3 a	31 ± 2 b
Protéase	123 ± 8 a	101 ± 4 b
β-glucosidase	49 ± 3 a	42 ± 5 a

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écarts-types. Ces derniers sont calculés pour n=6.

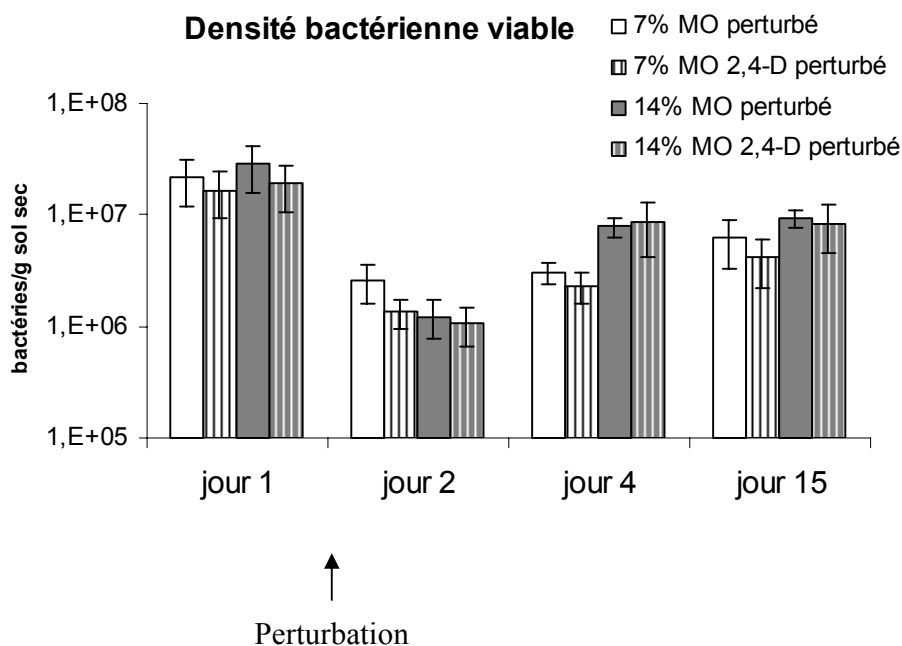
Pour une même enzyme, les valeurs de RSSI suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p < 0.01$ )

### **Influence de la matière organique**

Les Tableau 2.32 et Tableau 2.33 rapportent les valeurs de RSSI des sols contaminés au 2,4-D et non-contaminés pour deux pourcentages de M.O. (7 % et 14 %). Le RSSI indique l'activité potentielle des enzymes d'un sol perturbé par rapport à un sol non-perturbé et donne des informations additionnelles lorsqu'un même sol est testé en faisant varier un seul paramètre comme le contenu en matière organique. En comparant les valeurs de RSSI des Tableau 2.32 et Tableau 2.33, on constate qu'un contenu plus élevé en matière organique a fait augmenter de manière significative les résultats de RSSI pour plusieurs enzymes notamment pour les phosphatases acide et alcaline, l'arylsulfatase et la protéase. L'uréase, quant à elle, ne semble pas affectée par la concentration en M.O. À l'opposé, l'activité de la β-glucosidase est diminuée lorsque la concentration en M.O passe de 7 à 14 % de M.O. Les mécanismes enzymatiques impliqués dans la synthèse de ces enzymes extracellulaires semblent être affectés par le contenu en M.O. et une étude approfondie de ces derniers permettraient d'expliquer entre autre la diminution observée pour l'activité enzymatique de la β-glucosidase.

### **Impact de la perturbation sur la diversité microbienne des sols 7 et 14 % M.O**

La Figure 2.9 présente les résultats de la densité bactérienne des cellules viables pour les sols contaminés au 2,4-D et non-contaminés pour les deux concentrations de matière organique (7 et 14 % M.O). Au temps initial, la densité bactérienne est similaire pour les sols contaminés et non-contaminés, et ce, pour les deux concentrations de matières organiques testées. Une fois soumise à une perturbation par dessiccation à 60°C, la densité bactérienne a diminué de dix fois de sa valeur initiale. La résistance bactérienne semble être légèrement plus élevée pour le sol 7 % M.O. La récupération qui se traduit par les valeurs de densité bactérienne obtenues aux jours 4 et 15 était plus élevée dans le sol 14 % M.O. que dans le sol 7 % M.O. La matière organique, étant considérée comme un apport important de nutriments au sein d'un sol, a joué un rôle pour la stimulation de la croissance bactérienne lorsqu'un sol est soumis à une perturbation par dessiccation.



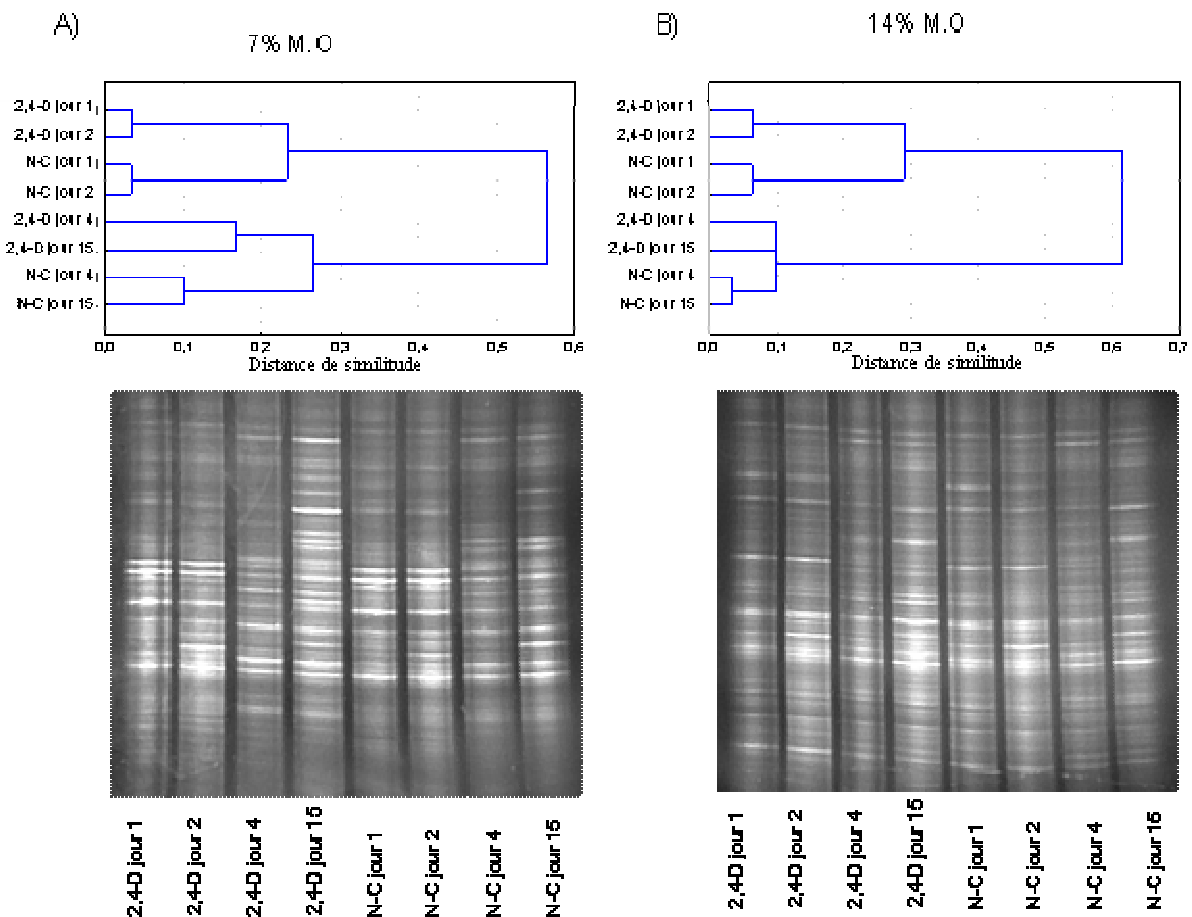
**Figure 2.9 : Densité bactérienne des sols à 7 et 14 % M.O. non-contaminés et contaminés au 2,4-D (50mg/kg sol sec) en fonction du temps.**

*Jour 1* : densité bactérienne avant la perturbation par dessiccation à 60°C. *Jour 2* : densité bactérienne juste après la perturbation. *Jour 4* : densité bactérienne 2 jours après la perturbation. *Jour 15* : densité bactérienne 13 jours après la perturbation.

La Figure 2.10 présente les patrons de diversité microbienne des sols à 7 % et 14 % de M.O. ainsi que leurs dendrogrammes respectifs pour une perturbation par dessiccation à 60°C. Après une observation visuelle des bandes obtenues pour le sol de 7 % M.O. (Figure 2.10 A) et le sol de 14% M.O. (Figure 2.10 B), on constate que les bandes dominantes dans les deux sols avec ou sans la contamination sont similaires. Cependant, une augmentation du nombre de bandes dominantes au quinzième jour pour les sols contaminés au 2,4-D à 7 % et 14 % M.O. a été observée. Ces résultats suggèrent que la présence d'une contamination au 2,4-D dans un sol force une réorganisation de la flore microbienne les deux semaines suivant la perturbation.

Les profils DGGE ont été groupés selon l'algorithme de Ward et du pourcentage de dissimilitude, afin d'évaluer le degré de similitude des espèces observées dans le gel. Les dendrogrammes obtenus sont montrés sur la Figure 2.10. En abscisse, on retrouve la distance de similitude de l'unité taxonomique du patron dominant. Plus la valeur se rapproche de l'origine, plus l'unité taxonomique est similaire. La comparaison des dendrogrammes des sols 7 % et 14 % M.O. nous montre que le pourcentage de matière organique a influencé l'impact de la contamination au 2,4-D sur la variation de la communauté microbienne dans les sols une fois soumis à une perturbation. Dans les deux sols, deux embranchements principaux ont été observés, un pour les échantillons provenant du jour 1 et du jour 2 pour les sols contaminé et non-contaminé et l'autre pour les jours 4 et 15 pour les sols contaminé au 2,4-D et non-contaminé. Pour le sol 7 % M.O., ces embranchements se subdivisent de nouveau en deux groupes : un regroupant les sols contaminés entre eux et l'autre les sols non-contaminés. Pour le sol 14 % M.O., ces embranchements se subdivisent également en deux

groupes pour les jours 1 et 2, mais en trois groupes pour les jours 4 et 15. Ainsi, des différences dans le modèle groupant les échantillons perturbés provenant des sols de 7 % et de 14% M.O. pour les jours 4 et 15 ont été notées. Ces résultats suggèrent que le pourcentage de matière organique n'affecte pas la biodiversité des sols à l'étude. Cependant, une augmentation du pourcentage de matière organique réduit l'impact de la contamination au 2,4-D sur la stabilité de la biodiversité.



**Figure 2.10 : Profils DGGE et leurs dendrogrammes respectifs comparant les communautés perturbées par dessiccation à 60°C des sols. A) 7 % MO et B) 14 % MO.**

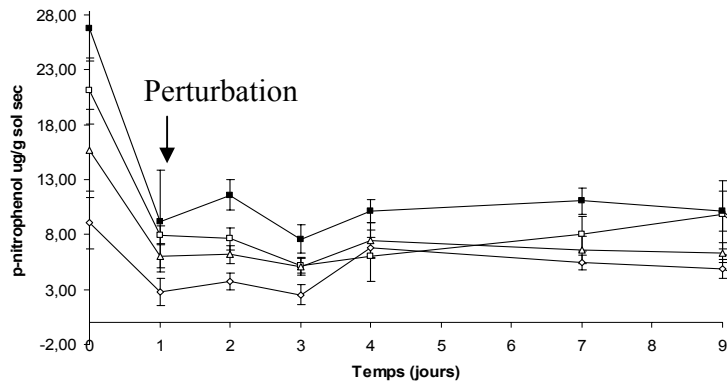
Ligne 1: Sol 2,4-D avant perturbation, jour 1. Ligne 2: sol 2,4-D juste après la perturbation, jour 2. Ligne 3: sol 2,4-D perturbé, jour 4. Ligne 4: Sol 2,4-D perturbé, jour 15. Ligne 5: Sol non-contaminé avant perturbation, jour 1. Ligne 6: sol non-contaminé juste après la perturbation, jour 2. Ligne 7: sol non-contaminé perturbé, jour 4. Ligne 8: Sol non-contaminé perturbé, jour 15.

- **Sols contaminés au cuivre**

*Choix du niveau de contamination en cuivre*

Dans le but d'évaluer l'impact d'une perturbation sur un sol ayant subi une contamination inorganique, un sol naturel non contaminé a été soumis à une contamination artificielle par

l'ajout dosé de sulfate de cuivre. Trois niveaux de contamination furent testés, soit : 200, 500 et 1000 mg Cu/kg sol sec. Un suivi enzymatique de la phosphatase basique a été réalisé. La Figure 2.11 présente les résultats obtenus pour l'activité de la phosphatase basique du sol contaminé à 200, 500 et 1000 ppm de Cu soumis à une perturbation par dessiccation à 60°C.



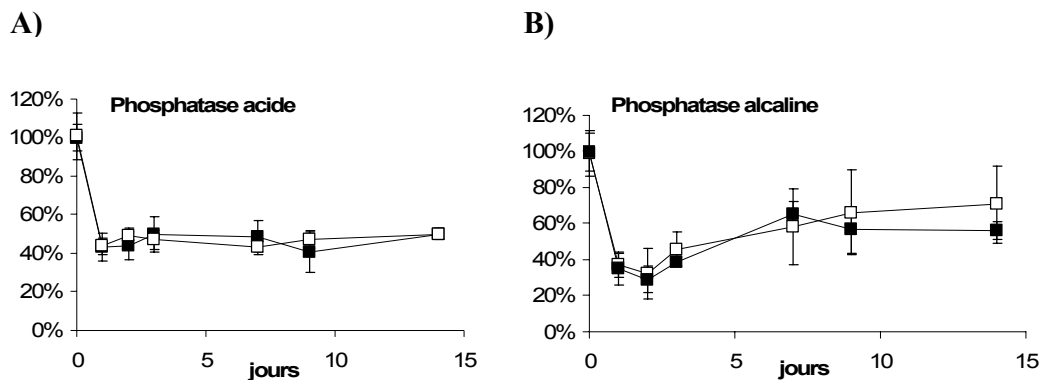
**Figure 2.11 : Activité de la phosphatase basique d'un sol limoneux contaminé au Cu pour la perturbation par dessiccation à 60°C.**

Les ■, □, Δ et ◇ correspondent respectivement aux sols témoin, contaminé à 200 mg Cu/ kg sol sec, à 500 mg Cu/ kg sol sec et à 1000 mg Cu/ kg sol sec.

Les résultats montrent une diminution de l'activité enzymatique initiale de la phosphatase basique lorsque la contamination du sol limoneux passe de 200 à 1 000 mg Cu/kg sol sec. Un impact sur l'activité enzymatique a été observé lorsque la concentration en Cu augmente dans le sol. Une fois les sols soumis à la dessiccation à 60°C, l'impact de cette perturbation a eu un effet notable sur l'activité enzymatique des sols. Toutefois, les résultats indiquent que la réponse enzymatique, suite à une perturbation, est similaire pour tous les niveaux de contamination. Étant donné que les tests de toxicité (voir section 2.2.2.6) ont révélé des effets toxiques pour une contamination de 200 ppm de Cu et qu'il pouvait être possible de retrouver une contamination de cet ordre dans les sols agricoles du Québec, c'est ce niveau de contamination qui fut retenu pour la suite de l'étude. Par ailleurs, la concentration choisie demeure tout de même supérieure au critère B de la Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés (PPSRTC).

### Mesure de la stabilité fonctionnelle du sol loam

La stabilité fonctionnelle d'un sol correspond à la capacité des enzymes à maintenir leur intégrité fonctionnelle dans les cycles biogéochimiques des sols. La Figure 2.12 présente l'activité enzymatique de deux enzymes (phosphatases acide et basique) exprimée en pourcentage de diminution de l'activité enzymatique en fonction du temps. À première vue, une différence entre la perte d'activité des enzymes des sols non-contaminé et contaminé au cuivre a été remarquée.



**Figure 2.12 : Activité enzymatique suivant une perturbation par dessiccation à 60°C exprimée en pourcentage de diminution de l'activité enzymatique par rapport au sol témoin (sol non perturbé) en fonction du temps.**

Sol limoneux non contaminé (formes noires) et Sol limoneux contaminé au Cu (200 mg Cu/kg sol sec) (formes blanches). A) phosphatase acide et B) la phosphatase alcaline.

Le Tableau 2.34 présente les valeurs de résistance, de récupération et de RSSI pour les phosphatases du sol loam pour la perturbation par dessiccation à 60°C. Pour l'activité des phosphatases, une résistance similaire pour les sols contaminé au cuivre et non contaminé a été notée. Les pourcentages de résistance pour les phosphatases acide et basique sont respectivement de 45 % et de 31 %. Malgré une résistance plus faible de la phosphatase basique, le rapport de récupération a été beaucoup plus important pour cette enzyme (plus de 68 %) comparativement à la phosphatase acide (50 %). Les valeurs de RSSI obtenues pour les phosphatases sont également équivalentes pour les sols contaminé au cuivre et non contaminé. Cependant, les valeurs de RSSI pour l'activité de la phosphatase acide sont plus faibles que celles obtenues pour la phosphatase basique. Ces résultats suggèrent que les enzymes au sein d'un sol ne sont pas toutes affectées de la même manière par la contamination et la perturbation. En général, les phosphatases, une fois soumises à une perturbation par dessiccation à 60°C, ne présentent pas de différence entre un sol sain et un sol contaminé pour ce type de sol. Ainsi, la présence d'une contamination au cuivre à 200 mg/kg n'affecte pas les fonctions enzymatiques du cycle du phosphore de ce loam.

**Tableau 2.34 : *Relative Soil Stability Index* (RSSI) de l'activité enzymatique du sol loam pour la perturbation par dessiccation à 60°C.**

Enzymes	Sol	Résistance (%)	Récupération (%)	RSSI (%)
Phosphatase acide	Non contaminé	45 ± 8	50 ± 6	48 ± 6
Phosphatase basique	Non contaminé	34 ± 4	68 ± 9	62 ± 5
Phosphatase acide	Contaminé au cuivre (200ppm)	45 ± 4	50 ± 2	49 ± 1
Phosphatase basique	Contaminé au cuivre (200ppm)	31 ± 4	76 ± 4	61 ± 4

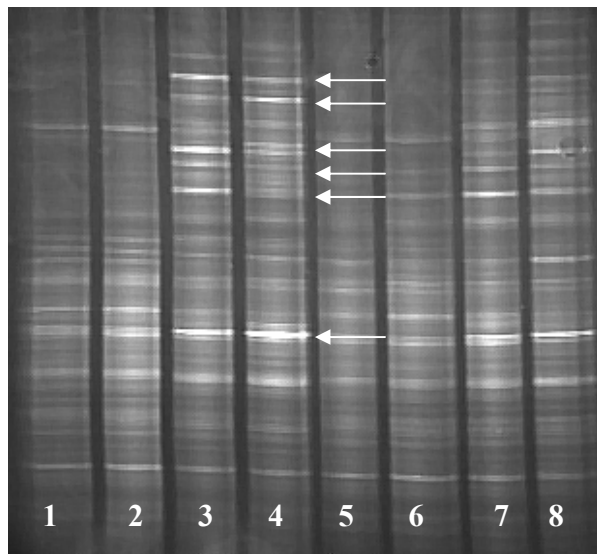
Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écarts-types. Ces derniers sont calculés pour n=6.

Le profil de la diversité microbienne apporte des informations supplémentaires quant à l'impact de la perturbation par dessiccation à 60°C pour les sols non contaminé et contaminé au cuivre. La Figure 2.13 présente le patron de diversité microbienne du sol loam ainsi que son dendrogramme. L'observation visuelle des bandes obtenues pour le sol (Figure 2.13 A)) montre que les profils de diversité des puits 1, 2, 5 et 6 sont similaires pour les sols non contaminé et contaminé au Cu (200 mg/kg de sol sec). Une fois soumis à la perturbation, une différence entre les profils DGGE a été notée. En effet, l'apparition de bandes supplémentaires pour les puits 3, 4, 7 et 8 montre des profils de diversité plus importants dans chacun des puits. Par ailleurs, des différences notables entre les sols contaminé et non-contaminé à partir du troisième jour suivant la perturbation ont également été observées. Pour les puits 3 et 4, correspondant au troisième et quatorzième jour, plusieurs bandes intenses (identifiée d'une flèche blanche) sont apparues dans le gel pour le sol contaminé au cuivre.

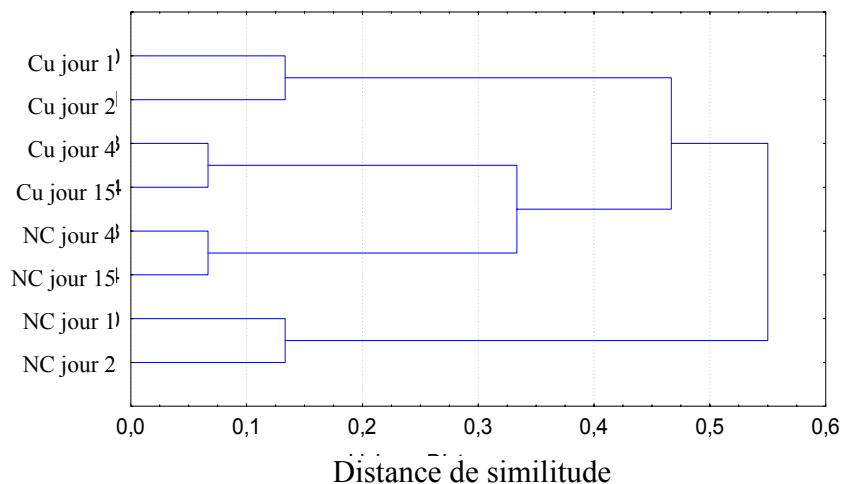
Une analyse détaillée des profils DGGE selon le regroupement de l'algorithme de Ward et du pourcentage de dissimilitude a été réalisée. Les dendrogrammes obtenus sont montrés sur la Figure 2.13 B). Trois embranchements principaux ont pu être détectés dans les analyses de profils de DGGE. Un premier embranchement composé de quatre échantillons (jour 4 et 15 du sol contaminé au cuivre et jour 4 et 15 du loam non-contaminé) a été regroupé en deux groupes (sols contaminé au cuivre versus non-contaminé). Les deux autres embranchements principaux ont été également séparés par la présence du contaminant : un qui est composé du jour 1 et du jour 2 pour le sol contaminé au Cu, et de l'autre du jour 1 et du jour 2 pour le sol non-contaminé. L'embranchement secondaire qui relie celles citées précédemment nous indique que la contamination au Cu a changé le patron dominant de la communauté microbienne. Par ailleurs, l'impact de la perturbation par dessiccation à 60°C a également exercé une pression plus importante au sein de la flore microbienne pour le sol contaminé. Ces résultats suggèrent donc que la contamination au cuivre, suivie de la perturbation par dessiccation à 60°C force la réorganisation de la flore en augmentant non seulement sa diversité microbienne, mais également une dominance pour certaines espèces présentes au sein du sol.



A)



B)

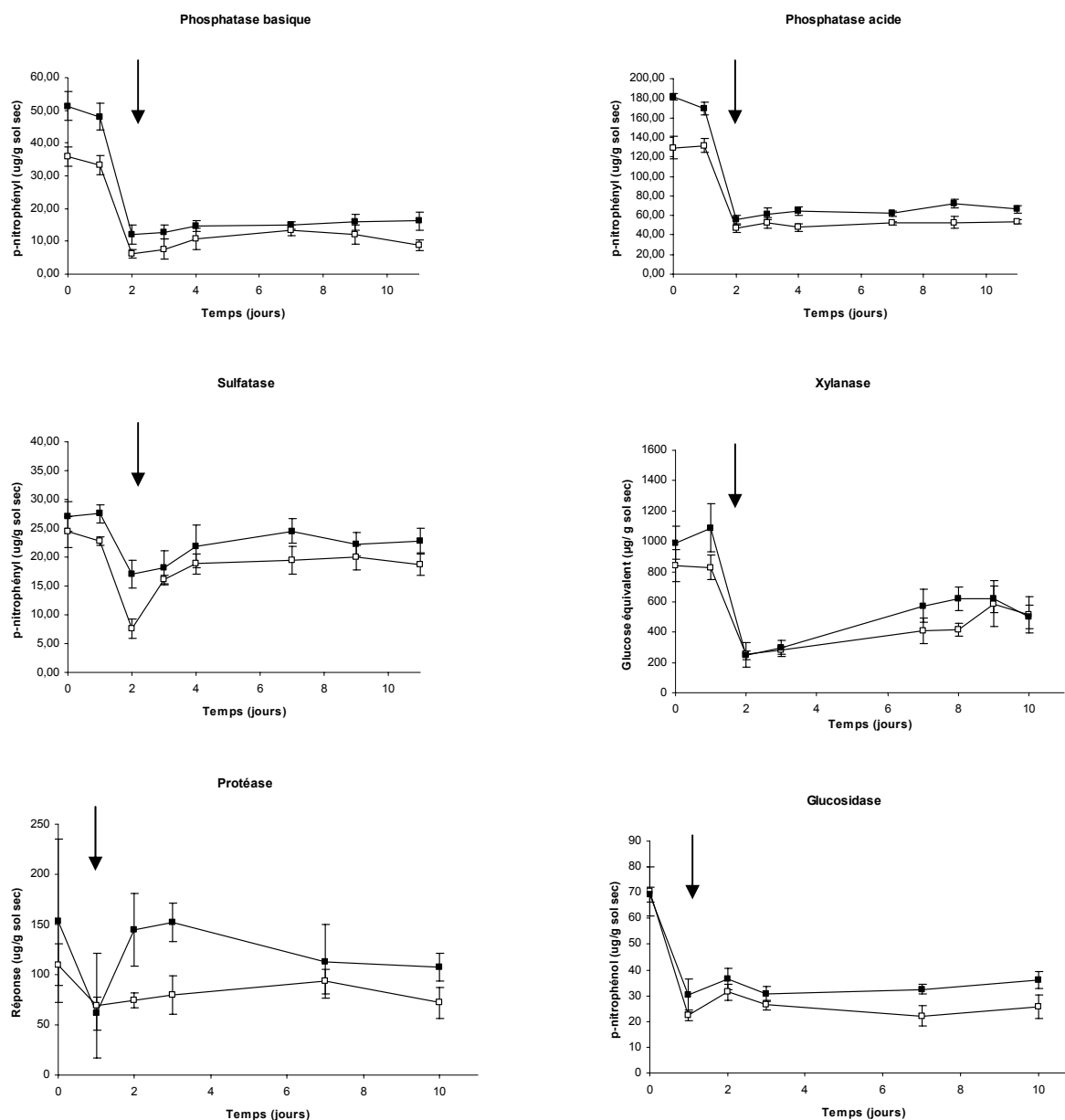


**Figure 2.13 : Profils DGGE et dendrogramme comparant les communautés des sols non-contaminé et contaminé à 200 mg Cu/kg sol sec, perturbé par dessiccation à 60°C.**  
*Lignes 1* : Jour 1 du sol contaminé avant perturbation. *Ligne 2* : Jour 2 du sol contaminé juste après la perturbation. *Ligne 3* : Jour 4 du sol contaminé. *Ligne 4* : Jour 15 du sol contaminé. *Ligne 5* : Jour 1 du sol non contaminé avant perturbation. *Ligne 6* : Jour 2 du sol non contaminé juste après perturbation. *Ligne 7* : Jour 4 du sol non contaminé. *Ligne 8* : Jour 15 du sol non contaminé.

### **Mesure de la stabilité fonctionnelle du loam sableux**

Dans l'unique but d'élaborer la méthode développée, un autre sol, le loam sableux contaminé au cuivre à 200 mg/kg de sol sec, a été testé avec l'ensemble des enzymes clés pour représenter les différents cycles biogéochimiques, i.e. celles associées aux cycles du carbone, du phosphore, du soufre et de l'azote.

La Figure 2.14 présente les analyses colorimétriques des différentes enzymes testées pour ce sol. Les enzymes les plus affectées par la perturbation sont les phosphatases, la xylanase et la  $\beta$ -glucosidase. La sulfatase et la protéase sont les enzymes les moins affectées par la perturbation par dessiccation à 60°C. La protéase, quant à elle, se démarque des autres enzymes pour sa récupération rapide dès le jour suivant la perturbation, et ce uniquement pour le sol non contaminé.



**Figure 2.14 : L'effet de la dessiccation à 60°C sur l'activité enzymatique des sols contaminé au cuivre 200 mg/kg sol sec (□) et non contaminé (■).**

Les flèches indiquent les premiers échantillons suivant la perturbation.

Le Tableau 2.35 rapporte les calculs de résistance et de récupération des enzymes étudiées. L'activité potentielle de l'arylsulfatase a montré une plus grande résistance initiale lors de la perturbation pour le sol non contaminé par rapport au sol contaminé au Cu. En effet, des résistances de 61 % pour le sol non-contaminé et 34 % pour le sol contaminé au Cu ont été observées. La phosphatase basique est l'enzyme qui présente les plus faibles résistance (19 %) et récupération (26 %). À l'opposé, l'arylsulfatase a récupéré à plus de 82 % de sa capacité initiale. Encore une fois, ces résultats suggèrent que les enzymes ne sont pas toutes

affectées de la même manière au sein d'un sol. Cette affirmation vient appuyer l'ensemble des observations réalisées jusqu'à maintenant pour le sol ayant subi une contamination organique (herbicide 2,4-D). Les valeurs de RSSI pour l'ensemble des enzymes étudiées se sont avérées similaires pour les sols non-contaminé et contaminé au cuivre, ce qui indique que la contamination présente (200 mg Cu/kg) ne semble pas affectée les cycles biogéochimiques dans ce sol.

**Tableau 2.35 : *Relative Soil Stability Index* (RSSI) de l'activité enzymatique du sol limoneux sablonneux pour la perturbation par dessiccation à 60°C.**

Enzyme	Sol	Résistance (%)	Récupération (%)	RSSI (%)
Phosphatase acide	Non contaminé	33 ± 3	39 ± 3	36 ± 3 <sup>a</sup>
Phosphatase acide	Contaminé au cuivre	36 ± 3	41 ± 4	39 ± 3 <sup>a</sup>
Phosphatase basique	Non contaminé	26 ± 5	34 ± 6	30 ± 5 <sup>a</sup>
Phosphatase basique	Contaminé au cuivre	19 ± 5	26 ± 4	32 ± 5 <sup>a</sup>
Arylsulfatase	Non contaminé	62 ± 8	85 ± 8	80 ± 4 <sup>a</sup>
Arylsulfatase	Contaminé au cuivre	33 ± 8	82 ± 10	77 ± 6 <sup>a</sup>
Xylanase	Non contaminé	23 ± 5	44 ± 10	39 ± 5 <sup>a</sup>
Xylanase	Contaminé au cuivre	34 ± 8	57 ± 11	45 ± 5 <sup>a</sup>
Protéase	Non contaminé	33 ± 8	74 ± 4	77 ± 4 <sup>a</sup>
Protéase	Contaminé au cuivre	44 ± 14	62 ± 9	74 ± 6 <sup>a</sup>
β-Glucosidase	Non contaminé	46 ± 11	46 ± 4	44 ± 2 <sup>a</sup>
β-Glucosidase	Contaminé au cuivre	41 ± 3	38 ± 8	41 ± 2 <sup>a</sup>

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écarts-types. Ces derniers sont calculés pour n=6.

Pour une même enzyme, les valeurs de RSSI suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p < 0.01$ )

Les essais de perturbation effectués sur les sols loam et loam sableux ont démontré l'applicabilité de la méthode à des sols contenant un pourcentage important d'argile et de limon. La contamination au cuivre de ces sols n'a pas eu d'impact global sur la stabilité des enzymes étudiés pour une contamination à 200 mg Cu/kg, malgré que 60 % du cuivre ajouté se retrouve sous une forme mobile ou labile (voir section 2.2.2.6). Toutefois, la stabilité globale des phosphatases est affectée selon les particularités physiques des loams étudiés. En effet, les valeurs de RSSI obtenues pour les phosphatases du loam sableux étaient plus faibles que celles obtenues pour le loam.

L'étude de l'évolution de la diversité microbienne suite à la perturbation a mis en évidence l'effet d'une contamination au cuivre sur la réorganisation de la flore dans le cas du sol loam. Il est ainsi possible de conclure que la présence du cuivre a eu un impact sur les mécanismes de résistance et de récupération des sols. **L'utilisation de la méthode d'évaluation de la stabilité enzymatique devient donc très pertinente dans un contexte de mesure de la biodisponibilité des ÉTM pour le développement de la méthode d'évaluation de la mobilité et de la biodisponibilité des ÉTM.**

## Conclusions des premières étapes des travaux de développement de la méthode

Ces observations soulignent l'importance qu'il faut accorder au type de perturbation choisie lors de l'application de la méthode d'évaluation de la stabilité enzymatique d'un sol. Le choix de la perturbation doit se faire selon les objectifs visés. Par exemple, si on cherche à en savoir plus sur les capacités de la flore microbienne, il est impératif de choisir une perturbation qui aura un impact sur celle-ci, par exemple une dessiccation à 60°C. Par contre, si on cherche à avoir une mesure ayant une signification réelle dans la vie courante, une perturbation régulière du sol, telle que le gel-dégel, doit être choisie. Enfin, si on veut comparer la santé de plusieurs sols afin de distinguer leurs capacités de résistance et de récupération, il faut choisir une perturbation qui affectera le plus de composantes différentes possibles du sol, comme la dessiccation à 60°C.

**L'utilisation de perturbations simulant des perturbations naturelles et d'une batterie d'activités enzymatiques du sol donne une signification réelle aux résultats des essais. Les résultats obtenus pour les différents sols non-contaminés et contaminés, contenant différentes proportions de matière organique et d'argile, ont permis de différencier la santé des sols contaminés par rapport aux sols non-contaminés.** Le principe de base de la méthode est très simple : un sol est perturbé et la réponse enzymatique est comparée à la réponse enzymatique d'un sol non perturbé. Les mesures d'activités enzymatiques sont issues de méthodes éprouvées et utilisées depuis plus de 20 ans (Schinner *et al.*, 1996). De plus, elles sont accessibles à la plupart des laboratoires. Les essais sont effectués sur une période de 2 semaines, dont 13 jours suivant l'application de la perturbation. Toutefois, le nombre d'enzymes testées lors de ces essais est limité par les temps de manipulations. **Enfin, la création de l'indice de stabilité relative des sols (RSSI) rend très simple l'interprétation des résultats de la méthode. Un seul chiffre décrit la stabilité relative d'un sol, permettant ainsi de comparer plusieurs sols sous plusieurs conditions de perturbation. De plus, la valeur du RSSI a une signification directe, elle représente le pourcentage de la capacité enzymatique qu'un sol garde suite à une perturbation par rapport à un sol non perturbé. Le RSSI présente aussi l'avantage d'intégrer les capacités de résistance, de récupération et de vitesse de récupération.**

### 2.2.2 Mesure de la biodisponibilité des contaminants à l'aide de tests de toxicité en laboratoire

L'utilisation de différents tests de toxicité permet une mesure globale qui rend compte de la complexité de la matrice et permet d'intégrer les aspects liés aux modes d'exposition qui diffèrent d'une espèce à l'autre. Cette approche présente l'avantage de fournir une mesure qui intègre les mécanismes d'interactions associés à la présence simultanée de plusieurs contaminants. Par contre, les tests usuellement utilisés concernent des effets à court terme Gladys *et al.* (2002). La signification écologique des réponses obtenues avec ces tests dans un tel contexte ne peut être démontrée et nécessite le développement de tests intégrant les notions d'exposition à long terme basées sur des effets sur la croissance et la capacité de reproduction des individus.

### 2.2.2.1 Choix des tests de toxicité

Hrudey *et al.* (1996) définit la biodisponibilité comme étant la fraction du contaminant qui sera absorbée à l'intérieur de l'organisme et qui peut entraîner une réponse toxique. De façon similaire, on peut définir la biodisponibilité comme la fraction de l'exposition totale au contaminant (eau, nourriture etc.) qui est disponible pour être absorbée (McKim, 1994). Ces définitions impliquent que la réponse biologique suite à une exposition à un contaminant soit à la fois dépendante de la présence du contaminant dans le milieu et de la capacité de l'organisme à l'intégrer à son métabolisme (Davies *et al.*, 1999). Ainsi par exemple, des invertébrés peuvent absorber des contaminants liés aux particules du sol ou à la matière organique. Le contaminant ne sera biodisponible que sous l'action des conditions physico-chimiques spécifiques de l'environnement gastrique ou intestinal (Ruby *et al.*, 1999) et qui lui permettront de passer du tractus gastro-intestinal au compartiment sanguin central.

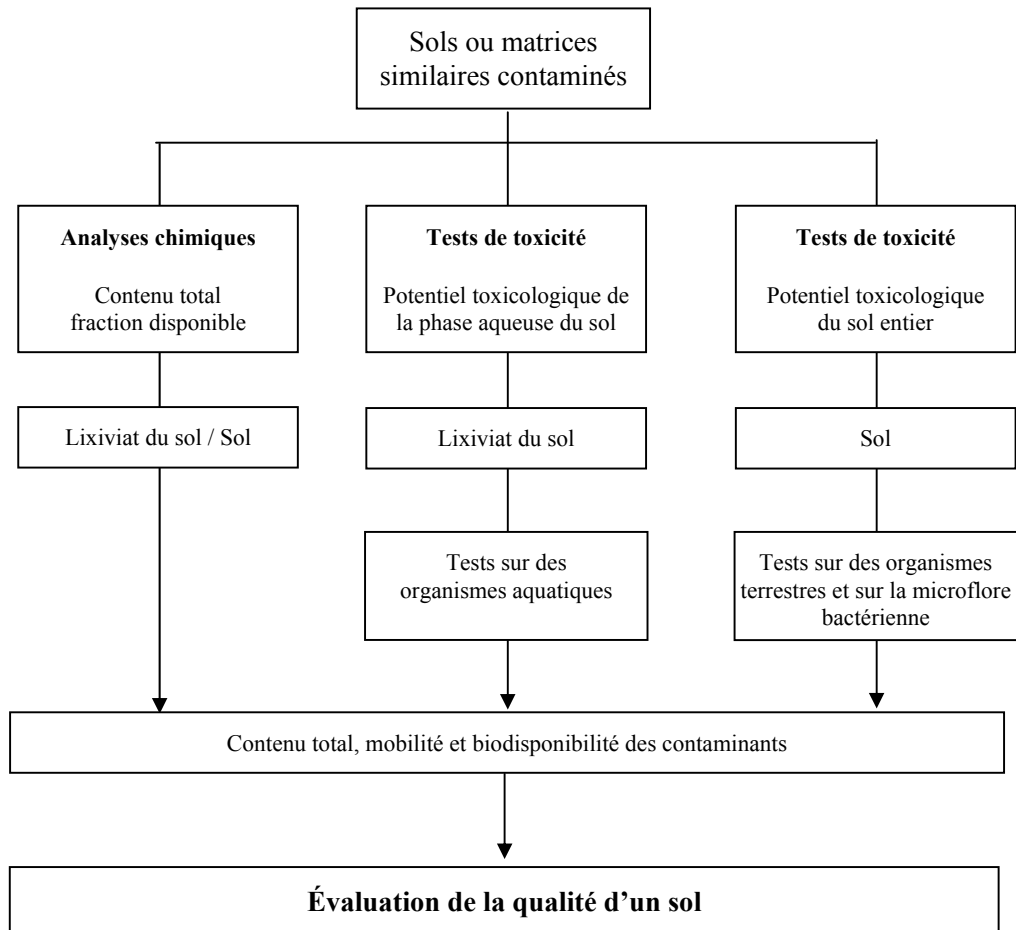
La biodisponibilité des contaminants dans le sol ou dans une matrice complexe telle que des matières résiduelles est donc modulée par un ensemble de processus physiques, chimiques et biologiques. Elle sera en bonne partie conditionnée par les interactions entre les contaminants et les différentes composantes du sol, mais aussi par la combinaison des voies de contamination et la sensibilité des récepteurs écologiques.

Ainsi, la texture du sol (% d'argile, de limon et de sable) influence directement la mobilité de l'eau et la rétention des cations, des anions et des contaminants. En effet, les argiles et la fraction de matières organiques agissent comme un absorbant du sol. Cette dernière fraction est également impliquée dans la rétention des éléments et la complexation. Par ailleurs, le pH conditionne le fractionnement chimique et la biodisponibilité, alors que la capacité d'échanges cationiques indique le potentiel du sol à retenir les ions chargés positivement. De plus, le pouvoir tampon du sol influence la mobilité des éléments métalliques chargés positivement, tandis que le niveau de saturation en bases et acides extractibles qui correspond aux proportions de cations basiques (Ca, Mg, K, Na) et acides (H, Al) affecte la productivité végétale du sol. À cette complexité d'actions entre les paramètres physico-chimiques du sol, on doit considérer les différents compartiments dans lesquels les contaminants peuvent être retrouvés. Ainsi, les contaminants peuvent être sous la forme dissoute, adsorbée aux particules de sol (ou plus spécifiquement aux argiles), complexée plus ou moins fortement avec la matière organique. Ainsi, par exemple, la mobilité des produits inorganiques sera particulièrement influencée par le pH ainsi que par le contenu en argile et en acides humiques du sol.

L'étude des phénomènes de mobilisation et d'évolution de la toxicité dans l'environnement permet de déterminer les processus prépondérants et les paramètres sensibles concernant la contamination de l'environnement. En se basant sur les principales voies de contamination et la connaissance des mécanismes de transfert et de transformation des contaminants, chaque phénomène peut être analysé dans l'objectif de dégager les modes de dispersion des contaminants. Une approche intégrée doit permettre non seulement de générer de l'information sur la mobilité et la toxicité, mais aussi sur l'aspect temporel de la contamination, les processus de relargage, la biodisponibilité, les voies d'exposition et les cibles biologiques potentielles.

À cet égard, l'évaluation de la qualité d'un sol ou d'une matrice complexe similaire doit impliquer la réalisation de tests de toxicité en plus de la caractérisation physico-chimique de ce dernier (Figure 2.15). La combinaison de la caractérisation chimique et toxicologique lors de l'évaluation de risque d'un sol procure beaucoup plus d'informations sur l'impact des contaminants sur le biote (Debus et Hund, 1997), à condition que les tests de toxicité utilisés soient représentatifs des différentes voies d'exposition. La mesure de la toxicité est généralement effectuée sur des organismes entiers et les effets toxiques peuvent être plus ou moins graves et permanents selon qu'ils affectent la survie, la croissance ou la reproduction.

Encore aujourd'hui, le nombre de tests biologiques disponibles pour la caractérisation toxicologique des sols est relativement limité. Quelques-uns sont standardisés (EPA 1988; ASTM 1997; ISO 1993, 1998; EC 2002a, 2002b; CEAEQ 2003) et disponibles dans les laboratoires. L'utilisation de tests standardisés a comme avantage d'uniformiser les conditions expérimentales et permet une meilleure comparaison des résultats entre les laboratoires (Fairbrother *et al.*, 1999).



**Figure 2.15 : Stratégie d'évaluation de la qualité d'un sol.**

(adaptée de Debus et Hund, 1997).

Les principaux tests de toxicité réalisés directement sur la matrice solide ou encore sur un lixiviat de cette matrice peuvent être grossièrement regroupés en trois grandes classes. La première classe concerne les invertébrés, dont les tests sur le ver de terre (*Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* et *Enchytraeus albidus*) (ISO 1993, 1998; ASTM 1997b; EC 2002; CEAEQ 2003c), la collembole (*Folsomia candida*) (ISO 1999) et la mite Gamasina (*Hypoaspis aculeifer*). Les protocoles actuels préconisent une durée d'exposition de 14 jours pour le test de létalité et de 56 jours pour le test de reproduction chez *Eisenia andrei* ou *Eisenia fetida*. Les vers de terre sont très utilisés en écotoxicologie terrestre, car ils ont une grande importance écologique pour le sol. Ils jouent un rôle important dans l'aération et l'amélioration de la texture du sol en ingérant les particules du sol. De plus, ils dégradent la matière organique en la rendant plus assimilable pour les autres organismes du sol (Saxe *et al.*, 2001; Edwards et Bohlen, 1996). Les vers de terre sont la composante majeure de la biomasse macrofaunique du sol tout en étant une source de nourriture importante pour les consommateurs secondaires, tels que les oiseaux et plusieurs petits mammifères (Morgan *et al.*, 2002; Laskowski *et al.*, 1988). Ces organismes sont ubiquitaires et sont présents dans divers milieux terrestres. De plus, ils ont la capacité d'assimiler les métaux, ce qui permet de les utiliser comme « biomoniteur » dans l'étude de la distribution spatiale et de l'effet des contaminants sur le milieu terrestre (Samiullah, 1990).

La seconde classe regroupe les plantes vasculaires, dont les tests sur la germination et la croissance (7 j, 14 j ou 21 j) chez l'orge (*Hordeum vulgare*) (EC 2002a; CEAEQ 2003g), la luzerne (*Medicago sativa*) (EC 2002a), le radis (*Raphanus sativus*) (EPA 1988), le cresson (*Lepidium sativum*) (EPA 1988) et certaines espèces fourragères (*Agropyron dasystachyum* (EC 2002a) et *Lolium perenne* ou « ryegrass » (Ec 2002a)). L'orge (*Hordeum vulgare*) est une graminée largement utilisée en agriculture et dans l'élevage d'animaux au Québec (M. Giroux, communication personnelle 2003). En écotoxicologie, l'utilisation de ce test sur la germination et la croissance est généralisée et il s'avère un test fiable, standardisé et relativement complet, portant sur plusieurs paramètres biologiques de la plante (Fairbrother *et al.*; 1999). Selon Fairbrother *et al.* (1999), les effets biologiques à privilégier sont : la longueur des racines et de la tige, le poids sec et humide de la tige et le poids sec et le poids humide de la plante entière. Selon J.P. Beddel (2003, communication personnelle), le ratio longueur de la tige/longueur des racines est également un indicateur intéressant d'un stress toxique. Un ratio s'éloignant de 1.0 indique que la plante est plus ou moins en stratégie de survie. Dans la méthode standardisée utilisée au CEAEQ (2003g), les paramètres sont sensiblement les mêmes que ceux recommandés par Fairbrother *et al.* (1999) (i.e. longueur des racines et de la tige ainsi que le poids sec et humide de la tige).

Finalement, la dernière classe de tests de toxicité usuellement utilisés, concerne les tests de toxicité aquatiques qui sont réalisés dans le but d'évaluer l'impact des contaminants présents dans la phase aqueuse du sol, tels que les tests de létalité avec la daphnie (*Daphnia magna*) (EPA 1988, 1994; ASTM 1997a; ISO 1998a, 1998b; EC 2000; CEAEQ 2003b) et la ceriodaphnie (*Ceriodaphnia dubia*).(EPA 1994; EC 1997). Le test avec l'algue verte *Selenastrum capricornutum* (EPA 1988, 1994a; ASTM 1998; EC 1997a; CEAEQ 2003a) et le test avec la bactérie bioluminescente *Vibrio fischeri* (test Microtox™ (BNQ 87) sont également utilisés pour la caractérisation toxicologique de l'eau interstitielle du sol (Fairbrother *et al.*, 1999) ou des eaux souterraines (Sheehan *et al.*, 2003) par exemples.



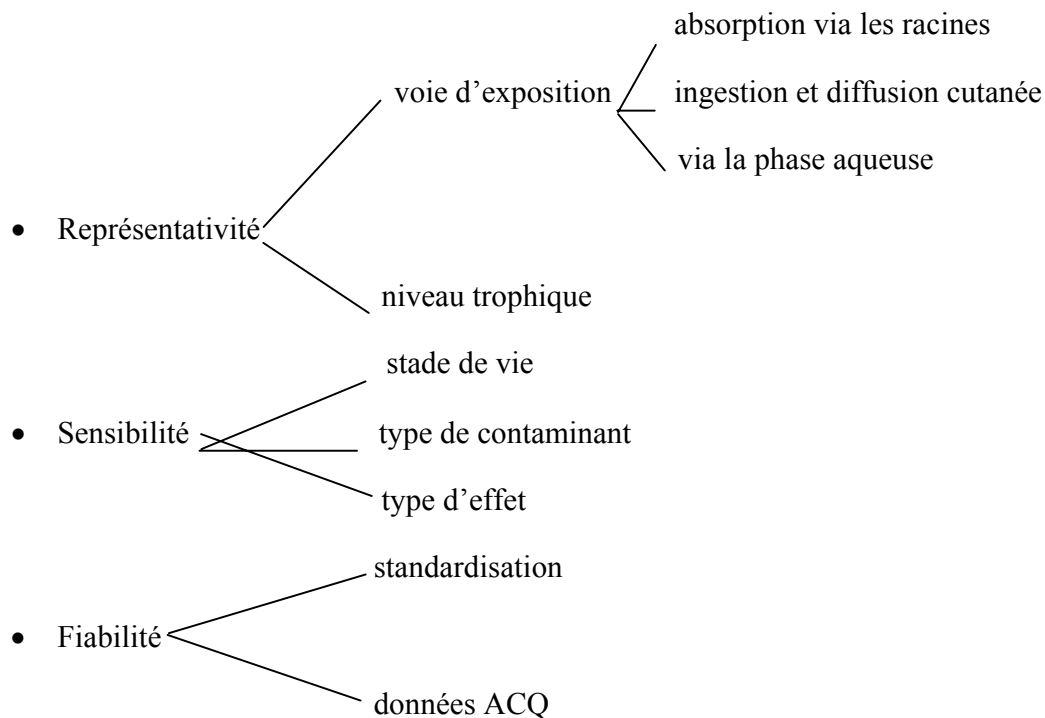
La plupart des tests de toxicité aquatiques sont sensibles, bien documentés et fiables, ce qui présente un avantage dans un contexte d'évaluation écotoxicologique des sols. Le test de létalité chez la daphnie est un test largement utilisé au Canada et en Europe, notamment à cause de sa grande sensibilité aux métaux (EC 2000). Ce test est fiable et n'est pas influencé par l'apport d'azote et de phosphore comme c'est le cas pour le test de toxicité avec l'algue verte *Selenastrum capricornutum*. Le test sur la reproduction de la daphnie (ISO 2000; EPA 1994) présente certains avantages dont une exposition de l'organisme sur plusieurs portées de daphnies permettant ainsi d'évaluer les effets sous-létaux d'un contaminant.

L'importance de combiner plusieurs tests de toxicité sous forme d'une batterie de tests fait largement consensus afin de représenter plusieurs niveaux trophiques et d'évaluer les différences de sensibilité des différents organismes (Keddy *et al.*, 1995; Bierkens *et al.*, 1998; Fairbrother *et al.*, 1999). Cependant, l'utilisation des tests de toxicité en concomitance avec les analyses chimiques n'est pas encore fréquente dans les études de risques (Belotti, 1998; Manz *et al.*, 1999; Menzie *et al.*, 2000; Mowat *et al.*, 2001) alors que l'élaboration de modèles de prédiction de la biodisponibilité des contaminants est souvent privilégiée (Peijnenburg *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2001; Saxe *et al.*, 2001).

#### 2.2.2.2 Développement des tests de toxicité - Méthodologie

Tel que décrit dans la section précédente, le nombre de tests de toxicité disponibles directement applicables au sol est relativement limité. Le test de toxicité aigu avec le ver de terre et celui de la germination et de la croissance de l'orge sont les tests les plus couramment utilisés pour l'évaluation de la toxicité d'un sol contaminé (Greene *et al.*, 1989). À ces tests s'ajoutent généralement des tests de toxicité aquatique (algues, poissons, Microtox, crustacés...) qui permettent de prendre en compte la présence de contaminants dans la phase aqueuse du sol.

L'examen préliminaire de la littérature nous a permis d'identifier les outils disponibles. Les critères de sélection ont été définis en fonction, d'une part, de la disponibilité du protocole (niveau de standardisation et applicabilité), mais aussi selon la réponse attendue en fonction de la matrice à l'étude, la sensibilité aux ÉTM, l'effet toxicologique (survie et reproduction) et la durée de l'exposition (effets à long terme). Selon Bastien et Martel (1995), les principaux critères de sélection d'un test de toxicité sont : la représentativité, la sensibilité et la fiabilité. Le lien (ou l'harmonisation) entre ces critères et la problématique des ÉTM pourrait être présenté comme suit :



Sur cette base, il a été possible d'identifier certains tests qui répondent aux besoins de ce projet. Les vers de terre sont de très bons organismes pour étudier la contamination environnementale, tant comme indicateur (sur le terrain) que pour effectuer des tests en laboratoire; ils sont omniprésents et sont relativement facile à maintenir en vie en conditions de laboratoire.

La sensibilité du test de reproduction du ver de terre réalisé sur 56 jours (ISO, 1998) a été mise en comparaison avec la réponse d'évitement de ce même organisme ainsi qu'avec sa capacité de survie (CEAEQ 2003c).

De même, les tests de germination et de croissance de plantes sont d'un grand intérêt puisqu'ils intègrent un ensemble de paramètres de mesure de survie et de croissance. Ces organismes prélèvent non seulement les éléments nutritifs et éventuellement les ÉTM sous forme dissoute ou complexée directement du sol, mais peuvent aussi modifier les conditions physico-chimiques du sol dans l'environnement immédiat du système racinaire et ainsi augmenter ou diminuer la biodisponibilité des ÉTM. La sensibilité des paramètres de mesure associés au test de germination et de croissance de l'orge (CEAEQ 2003g) a été testée.

Finalement, le test de toxicité avec un organisme aquatique telle la crustacée *Daphnia magna* a été utilisé pour estimer le niveau de toxicité de la phase aqueuse du sol. De la même façon que pour le ver de terre, la réponse toxicologique associée au test de reproduction 21 jours (ISO, 2000 : daphnie reproduction) avec cet organisme a été mise en relation avec la réponse du test de létalité (EC 2000).

### 2.2.2.3 Tests de toxicité utilisés

Les 3 tests utilisés sur le **ver de terre** (*Eisenia andrei*) sont les suivants :

- Létalité sur 7 et 14 jours (CEAEQ 2003c)
- Reproduction sur 56 jours (ISO 98b)
- Évitement sur 72 heures

Le test de létalité avec le ver de terre (CEAEQ 2003c) est un test qui s'échelonne sur 7 et 14 jours. Les vers sont placés dans des contenants opaques en plastique remplis avec 200 g de sol sec. Il y a cinq contenants par concentrations et dix vers par contenant (i.e. 50 vers par concentration). Le pourcentage d'humidité du sol est ajusté à approximativement 80 % du taux de rétention en eau du sol avant l'exposition. Les vers sont exposés (sans lumière) dans une chambre de croissance où l'humidité et la température sont contrôlées. Finalement, les vers vivants, après exposition, sont dénombrés pour ensuite calculer une  $CL_{50}$  après 7 jours et 14 jours sur les mêmes échantillons.

La sensibilité du test de létalité a été comparée à deux tests sous-létaux (tests sur la reproduction et sur l'évitement) lesquels ont fait l'objet d'essais d'optimisation et de validation. Le test sur la reproduction du ver de terre est un test qui s'échelonne sur 63 jours, avec une période d'acclimatation des vers de 7 jours avant l'exposition. Les vers ont été exposés à une gamme de dilutions en cuivre qui correspond à la valeur de la  $CL_{5-14j}$  du test de létalité et à quatre concentrations inférieures. Les vers sont placés dans des contenants opaques en plastique contenant 200 g de sol sec. Le pourcentage d'humidité du sol est ajusté à approximativement 80 % du taux de rétention en eau du sol avant l'exposition. Il y a 10 contenants par concentration et deux vers par contenant (i.e. 20 vers par concentration). Les vers sont exposés (sans lumière) dans une chambre de croissance où l'humidité et la température sont contrôlées. L'humidité du sol est ajustée à toutes les semaines pour corriger la perte en eau encourue lors de l'incubation. Au jour 28, les vers adultes sont retirés des milieux d'exposition, à condition qu'il y ait des cocons dans les contenants témoins. À chaque trois semaines, les vers sont nourris avec une nourriture commerciale pour l'élevage des vers de terre. Au jour 56, les vers juvéniles sont comptés et leur poids sec et leur poids humide sont mesurés. Finalement, le nombre de juvéniles vivants après 56 jours d'exposition est utilisé pour calculer la  $CI_{25}$  et la  $CI_{50}$ .

Pour sa part, le test d'évitement est en développement et un protocole est en voie de standardisation par Environnement Canada (2002). Des travaux de développement ont été réalisés au CEAEQ (Mathiot, 1996; Laliberté, 2001) relativement à cet essai et ont démontré une grande sensibilité de la réponse biologique. Des résultats de Stephenson *et al.* (2002) vont dans le même sens. Cet essai présente donc un potentiel intéressant dans le cadre de la présente étude. Les vers sont exposés à une gamme de dilutions en cuivre qui correspond à la valeur de la  $CL_{1-14j}$ , de la  $CL_{0,1-14j}$  du test de létalité et à d'autres concentrations inférieures. Le test d'évitement est un test d'une durée de 3 jours (ou 72 heures). Il est réalisé en triplicata dans des enceintes en plexiglas, divisés en six pointes de tarte. Des quantités de 400 g de sol humide naturel et contaminé sont placées en alternance dans chacun de ces compartiments. Le pourcentage d'humidité du sol est ajusté à approximativement 80 % du

taux de rétention en eau du sol avant l'exposition. Chaque enceinte contient 15 vers placés au centre au début de l'expérience. Les enceintes sont placées dans une chambre de croissance où l'humidité et la température sont contrôlées. Après 72 heures, la répartition des vers dans l'enceinte est notée afin de déterminer si les vers ont évité ou non.

Le test de toxicité utilisé sur **les plantes vasculaires** est le test sur l'**orge** (*Hordeum vulgare*) :

- Germination et croissance sur 7 jours (CEAEQ 2003g) et 14 jours

Le test sur la germination et la croissance de l'orge est un test d'une durée d'exposition de 7 jours que nous avons prolongé jusqu'à 14 jours. Les tests sont réalisés dans des contenants en plastique de 30 mL. Une quantité de 20 g de sol humide est ajoutée dans chaque contenant. Les tests sont réalisés en triplicata et dans chaque réplica, il y a cinq contenants en plastique. Dans chacun de ces contenants, une graine d'orge est ajoutée au sol. Le pourcentage d'humidité du sol est ajusté entre 80 et 85 % du taux de rétention en eau du sol avant l'exposition. Chaque réplicat est placé dans un sac pour éviter les pertes d'eau. Les graines d'orge sont incubées dans une chambre de croissance où la température, la luminosité et l'humidité sont contrôlées. Après 7 et 14 jours, les longueurs des racines et de la tige sont mesurées ainsi que le poids sec et le poids humide de la tige. Finalement, la  $CE_{50}$  pour la germination et les  $CI_{50}$  pour la croissance sont calculées. La prolongation de la durée d'exposition de 7 jours à 14 jours avait pour objectif de vérifier si le test gagnerait de la sensibilité avec le temps. Par ailleurs, des essais réalisés au CEAEQ ont mis en évidence une sensibilité relativement élevée du paramètre de mesure associé à la longueur des racines lorsque des graines étaient exposées à des matrices riches en phosphore et en azote telles des matières résiduelles fertilisantes. Une expérimentation sera réalisée ultérieurement afin de vérifier l'impact de ce facteur confondant sur la mesure de la toxicité des métaux. Cependant, un essai déjà réalisé avec une eau d'hydratation et une série de dilution à différentes concentrations d'azote et de phosphore nous indique que ces facteurs ne seraient pas associés à la diminution de la longueur des racines observée lors de l'exposition des graines d'orge aux métaux.

Finalement, les tests de toxicité utilisés pour les extraits liquides de sol sont les tests sur la **daphnie** (*Daphia magna*) :

- Létalité sur 48 heures (CEAEQ 2003b)
- Reproduction sur 10 jours et 21 jours (ISO 2000)

Le test de létalité sur la daphnie est d'une durée de 48 heures et il est réalisé sur le lixiviat à l'eau des sols à l'étude. Un test comprend 5 à 10 concentrations et 5 béchers en plastique de 220 ml par concentration. Dans chacun des béchers, 10 daphnies sont placées dans 150 mL de solution. Les daphnies sont incubées dans une chambre de croissance où la température et la luminosité sont contrôlées. Après 48 heures d'exposition, le nombre de daphnies vivantes dans chacun des traitements est compilé pour ensuite calculer la  $CL_{50}$ . Les résultats de cette méthode serviront à la validation du test de reproduction chez la daphnie. Avant le début de

ce test, la CL<sub>5</sub> 48h, la CL<sub>1</sub> 48h ainsi que la CL<sub>0,1</sub> 48h ont été déterminées pour établir les concentrations de base utilisées pour ce test sous-létal.

Le test de reproduction utilisé dans ce projet fait référence à la méthode sur 21 jours du document ISO (2000). Le test se fait sur le lixiviat à l'eau des trois sols dans des contenants transparents en plastique. Une quantité de 200 mL du lixiviat est utilisée pour les différents traitements. Des témoins avec de l'eau d'élevage sont aussi utilisés. Les différentes dilutions sont réalisées avec le lixiviat et de l'eau d'élevage. Il y a 10 réplicats par concentration et une daphnie par contenant. La solution d'exposition de chaque éprouvette est renouvelée aux deux jours. Quotidiennement, la daphnie est nourrie avec une importante biomasse d'algues (i.e. *Selenastrum capricornutum*). À partir du 8<sup>e</sup> jour d'exposition, les nouvelles daphnies (i.e. les néonates) sont comptabilisées jusqu'au 21<sup>e</sup> jour d'exposition. L'effet sur la reproduction a été mesuré à 10 jours et à 21 jours d'exposition afin de vérifier la possibilité de diminuer la durée d'exposition sans occasionner une perte de sensibilité de la méthode.

#### 2.2.2.4 Sols à l'essai

Trois textures de sols ont été retenues en fonction de leur représentativité des principaux groupes texturaux de sol communs en milieu agricole au Québec; soit un loam argileux, un loam limoneux et un loam sableux. Le contenu en matière organique des sols recherchés devaient être similaires et se situer à environ 4,0 %. Ces sols ont été prélevés le 17 avril 2003 pour le loam sableux à la ferme expérimentale de Deschambeault (IRDA), le 30 avril 2003 pour le loam limoneux à la ferme expérimentale de Saint-Lambert (IRDA) et le 9 mai 2003 pour le loam argileux à la ferme de Sainte-Croix-De-Lotbinière (Université Laval).

Une quantité de 80 kg de chaque sol a été prélevée avec une pelle ronde et placée dans des bacs en plastique d'une capacité de 120 kg afin d'y être mélangée. Seule la couche 0-25 centimètres de profondeur a été échantillonnée. En laboratoire, les sols ont été séchés et tamisés à 4 mm afin de les homogénéiser. Ils ont finalement été entreposés dans un sac en plastique fermé hermétiquement, placé dans une chaudière de 20 litres et à 4°C.

Sur la base d'une revue de littérature exhaustive (Trépanier et Renoux, 2002), les sols ont été contaminés à deux niveaux de concentration en cuivre afin d'obtenir un effet létal pour les organismes testés. Une première fraction de sol a été contaminée à 2 500 mg/kg de Cu pour les tests sur le ver de terre alors que 1 500 mg/kg de Cu ont été ajoutés à une seconde fraction pour les tests avec l'orge et pour le lixiviat des tests sur la daphnie. Nous avons développé un protocole de contamination des sols, spécifique aux besoins du projet, à partir de différents protocoles utilisés à la Division des Matériaux de référence du CEAEQ. La forme de cuivre utilisée pour la contamination de ces sols est le sulfate de cuivre anhydre (CuSO<sub>4</sub> M : 159,61 g/mole, fournisseur : *BDH Chemicals*). Le choix du cuivre dans cette phase de développement s'explique d'une part par sa toxicité reconnue pour les organismes testés notamment pour les végétaux (Trépanier et Renoux, 2002). D'autre part, sa présence dans l'environnement présente une préoccupation grandissante en agronomie et en gestion des sols contaminés. En effet, le cuivre est largement utilisé, principalement par les éleveurs de porc comme agent «probiotique» pour réduire les problèmes intestinaux. Une grande quantité de cuivre est ainsi éliminée dans le lisier et se retrouve dans les sols après l'épandage. Ainsi, des concentrations pouvant atteindre plus de 1000 mg/kg de Cu ont été

mesurées dans la fraction solide du lisier de porcs (Côté et Seydoux, 2003). Par ailleurs, en association avec l'arsenic et le chrome, le cuivre est utilisé pour la préservation du bois et se retrouve ainsi grandement distribué dans l'environnement.

L'évaluation de la toxicité du cuivre ajouté à différentes textures de sols à l'aide de tests de toxicité en laboratoire a donc été abordée dans cette première phase du projet par deux approches différentes mais complémentaires : la mise en contact direct de l'organisme avec le sol contaminé et la mise en contact indirect du contaminant mis en solution par l'intermédiaire d'une solution extractante, le cas échéant, l'eau. Dans les deux cas, un ensemble de paramètres de mesures sous-létaux ont été mis en comparaison à des paramètres de létalité et les limites de sensibilité de ces paramètres en fonction de la nature de la matrice ont aussi été étudiées.

Ainsi, la sensibilité du test de reproduction du ver de terre réalisé sur 56 jours (ISO, 1998b) a été comparée avec la réponse d'évitement de ce même organisme ainsi qu'avec sa capacité de survie (CEAEQ 2003c). De même, la sensibilité des paramètres de mesure associés au test de germination et de croissance de l'orge (CEAEQ 2003g) a été testée. Finalement, de la même façon que pour le ver de terre, la réponse toxicologique associée au test de reproduction 21 jours (ISO, 1998a) avec la daphnie a été mise en relation avec la réponse du test de toxicité de létalité et de mobilité (EC 2000).

#### *2.2.2.5 Analyses physico-chimiques*

En plus des analyses chimiques réalisées à l'IRDA sur plusieurs sols, certaines analyses ont été effectuées au CEAEQ afin de doser la concentration initiale totale en cuivre (CEAEQ 2003d) et la concentration nominale en cuivre mobile ou labile par la méthode Melihch III (CEAEQ 2003e) dans les deux niveaux de contamination des trois sols. Pour ces analyses, des échantillons de 50 g ont été envoyés en triplicata au laboratoire du CEAEQ (i.e. neufs échantillons au total). Un lixiviat (CEAEQ 2003h) de chacun des sols a aussi été analysé pour la mesure de la concentration totale et dissoute (CEAEQ 2003f) de cuivre (échantillons de 100 mL). Finalement, des analyses de granulométrie ont été réalisées à l'IRDA pour s'assurer que la texture des sols corresponde à la classification présumée des trois sols sélectionnés. Pour chacun des sols, un échantillon de 100 g a été envoyé au laboratoire de l'IRDA.

#### *2.2.2.6 Résultats des analyses physico-chimiques des loams*

Le Tableau 2.36 présente les résultats des mesures de concentrations du cuivre dans les trois sols à l'étude. Pour ces trois sols, les concentrations de cuivre total mesurées représentent entre 80 % et 90 % des concentrations ajoutées et varient peu d'une texture de sol à l'autre. Il en est de même pour la fraction mobile mesurée à l'aide de la méthode Mehlich-3, alors que cette fraction représente environ 61 % de la concentration en cuivre total. Par contre, les résultats des mesures du cuivre dissous, suite à une lixiviation à l'eau dans une proportion de 1 :10, indiquent qu'une faible proportion de ce cuivre total ou échangeable passe facilement dans l'eau sous forme dissoute et ce, de façon plus marquée pour le loam argileux. Le Tableau 2.37 présente les analyses de granulométrie, du dosage de la matière organique et de la mesure de la capacité d'échange cationique (CEC). Les deux premiers sols sont classés

«loam sableux» et «loam». Le troisième sol représente un sol de la grande classe texturale des argiles, plus précisément un loam argileux. Ce sol possède un plus grand pourcentage de matière organique (6,95 %) et une plus grande CEC (24,59 meq/100 g de sol) que les deux autres sols.

**Tableau 2.36 : Concentration en cuivre total, échangeable (Mehlich-3) et soluble pour le loam sableux, le loam et loam argileux à l'étude**

Sol	Concentration en cuivre					
	Totale (mg Cu/kg de sol sec)		Fraction échangeable (mg Cu/kg de sol sec)		Fraction soluble †	
	2500 mg/kg	1500 mg/kg	2500 mg/kg	1500 mg/kg	Cu dissous (mg/L)	Cu total (mg/L)
Loam sableux	1661 (1550-2120)*	1139 (1230-1310)	974 (1200-1300)	653 (740-820)	17,8	19,7
Loam	2137 (2080-2210)	1253 (1220-1310)	1300	797 (790-800)	39	42
Loam argileux	2250 (2070-2270)	1373 (1290-1500)	1300	783 (780-790)	2,4	5

\* Les valeurs entre parenthèses représentent le minimum et le maximum mesurés.

† lixiviat : dilution 1 :10

**Tableau 2.37 : Résultat de l'analyse de la granulométrie, de la capacité d'échange cationique et du pourcentage en matière organique pour le loam sableux comparativement aux deux autres sols à l'étude**

Sol	% Sable	% Limon	% Argile	CEC meq/100g	pH	% M.O.
Loam sableux	56	34	10	13,7	5,66	3,3
Loam	26	47	27	16,53	5,31	4,3
Loam argileux	11	43	46	24,59	6,41	6,95

Les résultats d'analyses physico-chimiques des sols à partir de la méthode Mehlich-3, ont montré que plus de 60 % du cuivre ajouté aux deux sols à l'étude était sous une forme mobile ou labile. Une fraction importante du cuivre total se retrouvait donc sous une forme potentiellement biodisponible.

#### 2.2.2.7 Tests de toxicité avec le ver de terre

Le Tableau 2.38 présente les résultats obtenus pour les tests de létalité, d'évitement et de reproduction avec le ver de terre *Eisenia andrei* pour le loam sableux, le loam et loam argileux. Pour le loam et le loam argileux, la durée d'exposition n'a pas d'impact significatif sur le taux de survie du ver de terre bien que la concentration létale est inférieure et que le

taux de mortalité est supérieur à 14 jours par rapport à 7 jours. Par contre, le niveau de toxicité observé pour le loam argileux ( $CL_{50} > 2250$  ppm) est beaucoup moins élevé que celui du loam ( $CL_{50}$  entre 765 et 1383 ppm). Contrairement aux deux autres sols, la durée d'exposition pour le loam sableux a un impact significatif sur le taux de survie du ver de terre.

Pour la mesure d'évitement, la réponse des vers démontre une grande sensibilité, même à de faibles concentrations en cuivre. En effet, 100 % des vers de terre ont eu un comportement d'évitement à des concentrations variant entre 85 mg/kg (loam) et 100 mg/kg (loam sableux) alors que plus de la moitié des vers évitaient le sol contaminé à des concentrations de 21 mg/kg et 22 mg/kg. La texture du sol ne semble pas affecter de façon importante le comportement du ver aux niveaux de contamination testés.

Par ailleurs, la mesure des effets de la contamination d'un sol par le cuivre sur la reproduction du ver de terre présente certaines difficultés en fonction de la texture du sol. Cependant, pour le loam, le test de reproduction s'est avéré sensible en diminuant de 25 % ( $CI_{25} = 14$  mg/kg) et de 50 % ( $CI_{50} = 115$  mg/kg) la production de jeunes chez le ver de terre à des concentrations du même ordre de grandeur que les concentrations ayant eu un effet comportemental significatif.

**Tableau 2.38 : Résultats obtenus pour les tests de létalité, d'évitement et de reproduction avec le ver de terre *Eisenia andrei* pour le loam sableux, le loam et le loam argileux**

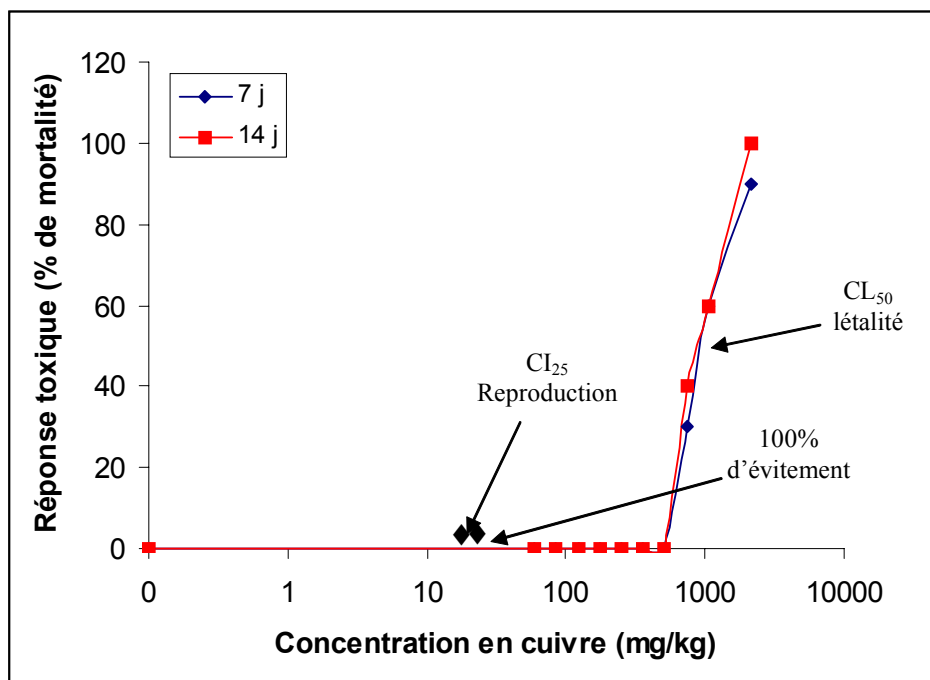
SOL	Létalité		Évitement	Reproduction <sup>1</sup>
	$CL_{50}$ 7j (mg/kg)	$CL_{50}$ 14j (mg/kg)	Pourcentage (%)	$CI_{50}$ 56j (mg/kg)
Loam sableux	1650 (1525-1750)	1150 (825-1325)	100 (100 mg/kg) 38 (25 mg/kg)	120
Loam	1025 (829 - 1383)	919 (765 - 1118)	100 (85 mg/kg) 96 (21 mg/kg)	115
Loam argileux	> 2250 15 % de mortalité	> 2250 45 % de mortalité	100 (90 mg/kg) 60 (22 mg/kg)	---

<sup>1</sup>  $CI_{50}$  calculée sur la base du nombre de juvéniles observé après 56 jours d'exposition

Au niveau des résultats obtenus avec le ver de terre (*Eisenia andrei*), le test sur la reproduction a présenté un niveau de sensibilité nettement supérieur à celui du test de létalité. Pour le test d'évitement, les résultats ont montré que les vers évitaient grandement et même à de faibles concentrations en cuivre. Finalement, tel qu'attendu, l'évitement est plus important dans le loam que dans les loams sableux et argileux. Avec le loam, il est intéressant de noter que les résultats obtenus pour le test d'évitement et pour la reproduction du ver de terre se situaient dans la même gamme de concentrations au niveau de l'effet, avec un niveau de sensibilité jusqu'à 10 fois plus élevé que le test de létalité pour le loam.



La Figure 2.16 présente graphiquement cette dernière observation. Cette figure présente les courbes concentrations-réponses des différents tests réalisés avec le ver de terre pour le loam. Elle montre clairement le niveau de sensibilité plus élevé des tests sur la reproduction et sur l'évitement du ver de terre par rapport au test de létalité. La valeur de la  $CL_{25}$  pour la reproduction se situe dans le même ordre de grandeur que le 100 % d'évitement. Enfin, la valeur de la  $CL_{50}$  est environ 10 fois supérieure aux valeurs de la  $CL_{25}$  et de l'évitement. Ces observations viennent appuyer des résultats obtenus lors d'études antérieures (Mathiot, 1996; Laliberté, 2001) qui mettaient en parallèle les réponses d'évitement et de létalité et démontraient que des niveaux de concentration qui commencent à provoquer la mortalité ou même des niveaux inférieurs provoquent une réaction d'évitement massive. Des relations semblables entre les réponses d'évitement, de mortalité et de reproduction ont également été rapportées pour plusieurs types de contaminants par Stephenson et al. (2002). Ces résultats tendent à démontrer que l'on peut accorder une signification écologique à la réponse d'évitement et utiliser ce type d'essai dans une démarche d'évaluation.



**Figure 2.16 : Courbe concentrations-réponses pour le test de létalité avec le ver de terre pour le loam.**

#### 2.2.2.8 Tests de toxicité avec l'orge

Le Tableau 2.39 présente les résultats des tests sur la germination et la croissance de l'orge sur 7 et 14 jours. Aux concentrations ajoutées dans les deux textures de sol, le cuivre n'a pas d'effet sur la germination de l'orge et semble aussi avoir peu d'effet sur la croissance dans le loam argileux. Par contre, la croissance des racines a été beaucoup plus affectée que celle de la tige pour le loam, ce qui se reflète par un rapport de la longueur de la tige sur celle des racines supérieur à 2. Cependant, le cuivre montre peu d'effet sur le poids sec et le poids humide du feuillage, observant même de la stimulation dans le loam argileux. Finalement, le

temps d'exposition (14 jours versus 7 jours) n'a pas eu d'impact significatif sur la croissance de l'orge.

**Tableau 2.39 : Résultats des tests sur la germination et la croissance de l'orge (*Hordeum vulgare*) sur 7 et 14 jours**

SOL	Temps (jours)	CE <sub>50</sub> germ.	CI <sub>50</sub> Tige	CI <sub>50</sub> Racines (mg Cu /kg sol sec)	CI <sub>50</sub> pds hum	CI <sub>50</sub> pds sec
Loam sableux	7	sans effet	>1139 49,7% d'inh ds 1139	502 (399 – 482)	1043 (889 – 1139)	1116 (N.C.)
	14	sans effet	>1139 42 % d'inh ds 1139	484 (427 – 550)	--	--
Loam	7	sans effet	877 (720 – 1027)	478 (405 – 527)	963 (916 – 1014)	1148 (1080 – 1218)
	14	sans effet	970 (910 – 1041)	333 (282 – 384)	--	--
Loam argileux	7	sans effet	>1373 37 % d'inh ds 1373	917	Stimul 25 %	Stimul 3 %
	14	sans effet	>1373 18 % d'inh ds 1373	>1373 44 % d'inh ds 1373	--	--

Les valeurs entre parenthèses représentent le minimum et le maximum mesurés.  
N.C. :non calculable

Au niveau des résultats obtenus pour l'orge (*Hordeum vulgare*), le paramètre le plus sensible a été la longueur des racines. Pour ce qui est des poids humides et secs du feuillage, les résultats ont montré une sensibilité comparable à ceux sur la longueur de la tige. Par ailleurs, le cuivre est plus toxique dans le loam que le loam argileux, puisqu'une légère stimulation dans les biomasses pour le loam argileux a été observée. Finalement, les résultats ont montré que le test standard du CEAEQ (2003) ne gagnait pas en sensibilité en prolongeant la durée d'exposition de 7 à 14 jours pour le cuivre. Pour la suite du projet, nous avons tout de même conservé une durée de 14 jours à l'essai de façon à maximiser la sensibilité aux autres types de contaminations éventuelles.

#### 2.2.2.9 Tests de toxicité avec la daphnie

Le Tableau 2.40 présente les résultats des tests de létalité et de reproduction sur la daphnie. Le lixiviat du loam argileux s'est avéré moins toxique que ceux des deux autres sols pour la daphnie après une exposition de 48 heures avec des concentrations létales pour 50 % des organismes de 92,0 µg/L. Compte tenu de la variabilité des résultats du test de reproduction mise en évidence lors des tests réalisés pour les deux premiers sols, les effets sur la

reproduction de la daphnie n'ont pas été déterminés pour le loam sableux et ce test a été abandonné pour la suite du projet.

**Tableau 2.40 : Résultats des tests de létalité et de reproduction sur la daphnie (*Daphnia magna*)**

Sol	Létalité CL <sub>50</sub> 48 h (µg/L)	Reproduction 10 j	Reproduction 21 j
		Inhibition (%)	
Loam sableux	34,7 (30,9 – 39,4)*	ND	ND
Loam	43,3 (38,6 – 48,7)*	100 (≈CL <sub>0,1</sub> à 143 µg/L)	21 (≈CL <sub>0,1</sub> à 143 µg/L)
		-25 % (≈CL <sub>1</sub> à 193 µg/L) 10 (≈CL <sub>5</sub> à 252 µg/L)	63 (≈CL <sub>1</sub> à 193 µg/L) 25 (≈CL <sub>5</sub> à 252 µg/L)
Loam argileux	92,0 (75,0 – 109,0)*	100 (≈CL <sub>0,1</sub> à 15µg/L)	75 (≈CL <sub>0,1</sub> à 15µg/L)
		32 (≈CL <sub>1</sub> à 39 µg/L)	37 (≈CL <sub>1</sub> à 39 µg/L)
		100 (≈CL <sub>5</sub> à 90 µg/L)	100 (≈CL <sub>5</sub> à 90 µg/L)

\*Les valeurs entre parenthèses représentent le minimum et le maximum mesurés.

ND : non déterminée

- : indique un effet positif

### 2.2.2.10 Conclusion

L'évaluation de la toxicité du cuivre ajoutée à différentes textures de sols à l'aide de tests de toxicité en laboratoire a donc été abordée dans cette activité de la première phase du projet par deux approches différentes mais complémentaires : la mise en contact direct de l'organisme avec le sol contaminé et la mise en contact indirect du contaminant mis en solution par l'intermédiaire d'une solution extractante, le cas échéant, l'eau. Dans les deux cas, un ensemble de paramètres de mesures sous-létaux ont été mis en comparaison à des paramètres de létalités et les limites de sensibilité de ces paramètres en fonction de la nature de la matrice ont aussi été étudiées.

**Tel que le démontrent nos résultats d'analyses physico-chimiques des sols à partir de la méthode Mehlich-3, plus de 60 % du cuivre ajouté aux trois sols à l'étude est sous une forme mobile ou labile. Une fraction importante du cuivre total se retrouve donc sous une forme potentiellement biodisponible.** Ce résultat n'est cependant pas surprenant puisqu'il est connu que le processus de séquestration des métaux dans les compartiments non-labiles du sol est lent et complexe (Lock et Janssen, 2003). Ce qui explique qu'en général la réponse toxique est plus élevée dans un sol artificiellement contaminé comparativement à celle observée dans un sol naturel dont la contamination a subi un vieillissement (Spurgeon et Hopkins ; 1995, 1999).

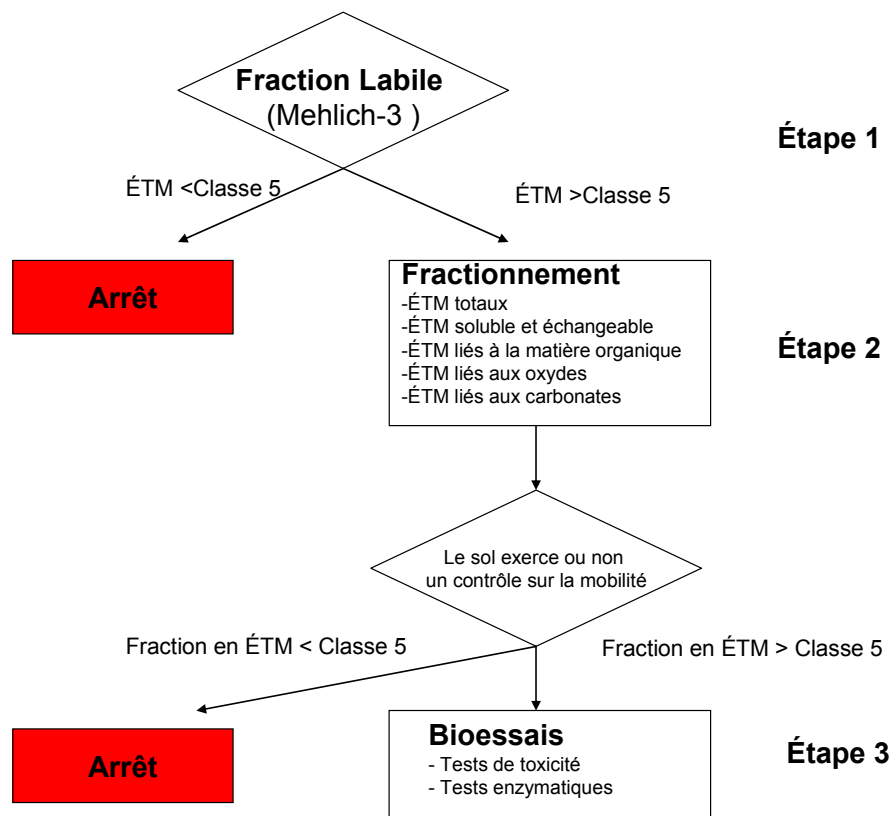
Le loam contaminé au cuivre présente un niveau de toxicité en général plus élevé que celui du loam argileux et ce, pour les trois organismes à l'étude. Puisqu'en général le pourcentage en matière organique et en argile sont les principaux facteurs qui influencent la mobilité et la

biodisponibilité du cuivre dans un sol (Allen *et al.*, 2001; Zagury *et al.*, 2002), il était probable d'obtenir un niveau de toxicité supérieur pour le loam sableux. Or, bien que cette tendance ait été notée pour les tests de toxicité avec la daphnie, le niveau de toxicité du loam sableux n'apparaît pas significativement différent de celui du loam tout en étant cependant toujours plus élevé que celui du loam argileux. Dans le sol, les interactions et les combinaisons possibles de tous ces facteurs font qu'il est très difficile de prévoir, à priori, la mobilité et donc la disponibilité des contaminants. En considérant le sol dans sa portion abiotique, plusieurs paramètres du sol influencent la mobilité et la biodisponibilité d'un contaminant (Zagury *et al.*, 2002). La matière organique joue certes un rôle principal dans la sorption des métaux. Par contre, la matière minérale et notamment les argiles du sol jouent aussi un rôle dans la sorption des composés ionisables tels les métaux lourds. Le rôle des argiles est d'autant plus important que la quantité de matière organique est faible. De plus, certaines argiles interviennent avec les hydroxydes métalliques du sol comme catalyseurs dans des phénomènes d'oxydation des contaminants. De son côté, le pH du sol fait varier la solubilité des métaux alors que la quantité et la nature des ions échangeables régées par la capacité d'échange cationique (CEC) peuvent modifier les équilibres de sorption (Zagury *et al.*, 2002; Mclean et Bledsoe, 1992). L'analyse des données de caractérisation chimique des sols démontre que la concentration réelle du cuivre ajoutée au loam sableux était inférieure à celles des deux autres sols. De même, les concentrations de Cu sous forme mobile ou labile se sont avérées moindres expliquant probablement les résultats observés.

## ÉLABORATION DE LA MÉTHODE D'ÉVALUATION

Trois méthodes ont donc été développées lors de la première phase de ce projet. La première consiste à la mise au point d'une mesure chimique de la mobilité des ÉTM dans un sol basée sur un protocole d'analyses documentées du fractionnement des ÉTM dans les sols. Les deux autres méthodes proposent une approche de mesure de la biodisponibilité des ÉTM prenant en compte différents niveaux trophiques et voies d'exposition.

La section qui suit présente un schéma qui consiste à intégrer ces méthodes à l'intérieur d'une approche d'évaluation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments traces métalliques d'un sol. Ceci permettra d'une part, de rendre compte des multiples interactions qui conditionnent la biodisponibilité et le niveau d'exposition des espèces vivantes et, d'autre part, de prendre en considération les mécanismes de transport et de transfert des ÉTM à travers les différents compartiments du sol.



**Figure 3.1. Schéma conceptuel d'une méthode d'évaluation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments traces métalliques d'un sol**

La procédure choisie pour mesurer la mobilité des ÉTM dans les sols consiste premièrement à déterminer les teneurs labiles de ces ÉTM selon la méthode Mehlich-3. Des classes de distribution des ÉTM ont été établies à cet effet. Pour les ÉTM de classe 5 dont la teneur présente un dépassement du critère centile 99% des sols du Québec, une procédure de

fractionnement est proposée pour préciser la distribution des ÉTM dans les sols. Ce profil de fractionnement permet donc d'établir si les sols exercent ou non un contrôle adéquat de la mobilité des ÉTM. Lorsqu'un profil de mobilité important est observé, la biodisponibilité des ÉTM est vérifiée à l'aide de tests de toxicité et des tests enzymatiques.

La procédure proposée comporte donc trois étapes qui seront réalisées au besoin selon le niveau de mobilité des ÉTM obtenu et selon le besoin de caractériser avec plus de précision les accumulations des ÉTM dans les différentes fractions des sols.

La procédure analytique proposée se veut simple et elle s'appuie dans un premier temps sur le fractionnement chimique des ÉTM. La procédure complète a été développée à partir d'une contamination par le cuivre, mais elle peut être éventuellement s'appliquer aux éléments suivants : Mn, Zn, Co, Cr, Cd, Ni et Pb.

### • ÉTAPE 1

La première étape consiste à établir la teneur en ÉTM labiles des sols avec la méthode Mehlich-3 et de comparer cette teneur avec des classes de référence. Pour chaque ÉTM, cinq classes de teneur en ÉTM ont été établies en se basant sur leur distribution percentile dans les sols (section 2.1) suite aux travaux de la phase précédente. Cependant, les essais réalisés lors de la seconde phase de notre projet, dont les résultats sont présentés aux sections suivantes, nous ont amené à revoir légèrement à la hausse ces critères qui sont résumés au Tableau 3.1. Cette classification permet d'identifier le niveau d'accumulation des ÉTM labiles d'un sol donné. Nous avons opté pour la méthode Mehlich-3 parce qu'il est plus facile d'obtenir les résultats analytiques avec cette méthode et qu'elle s'est montrée sensible à l'accumulation de cuivre, de zinc et de manganèse provenant des applications des engrais organiques à long terme. La présente étude a démontré que les ÉTM extraits avec Mehlich-3 sont généralement bien corrélés avec les autres méthodes de mesure de la fraction labile et souvent avec les ÉTM présents dans les fractions échangeables, organiques ou minérales des sols.

**Tableau 3.1 : Classification des sols selon leur teneur en ÉTM mesurée avec la méthode Mehlich-3**

Classe	Distribution percentile	Mn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Co (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)
1	< 25	< 15,2	< 1,3	< 1,3	< 0,15	< 0,21	< 0,05	< 0,25	< 1,6
2	25 – 50	15,2–25,3	1,3–1,9	1,3–1,6	0,15–0,22	0,21–0,27	0,05–0,07	0,25–0,36	1,6–2,1
3	50 – 75	25,3–35,0	1,9–2,8	1,6–2,1	0,22–0,29	0,27–0,42	0,07–0,10	0,36–0,57	2,1–2,6
4	75 – 99	35,0–98,6	2,8–8,0	2,1–5,8	0,29–1,18	0,42–0,75	0,10–0,24	0,57–2,05	2,6–5,7
5	> 99	> 98,6	> 8,0	> 5,8	> 1,18	> 0,75	> 0,24	> 2,05	> 5,7

Pour les sols dont les teneurs extraites avec Mehlich-3 se situent dans les classes 1 à 4 inclusivement, les teneurs en ÉTM correspondent à des valeurs souvent mesurées dans les

sols agricoles. Ces teneurs ne correspondent pas à des niveaux inhabituels d'accumulation sur le plan de la mobilité des ÉTM dans les sols agricoles. Il n'est pas nécessaire de passer à l'étape 2.

Pour les sols dont la teneur en ÉTM d'un ou plusieurs métaux est de classe 5, c'est à dire supérieure au niveau percentile 99 % de la méthode Mehlich-3, un suivi plus détaillé peut être effectué pour juger plus adéquatement de la mobilité et de l'accumulation des ÉTM dans ce sol. La procédure est détaillée à l'étape 2.

- **ÉTAPE 2**

En deuxième étape, une caractérisation plus détaillée des ÉTM est effectuée pour déterminer les ÉTM de la fraction facilement échangeable, de la fraction organique et de la fraction oxyde et de la teneur totale. Un fractionnement des ÉTM et une distribution percentile des ÉTM pour chacune des fractions ont été réalisés et sont présentées dans cette étude à la section 4.2 de la phase 2. On peut ainsi savoir, par exemple, si la fraction facilement échangeable des ÉTM est accrue et si la fraction organique a été contaminée par des apports de produits. Une identification des causes de cet enrichissement devrait être recherchée. Ces teneurs sont-elles d'origine naturelle ou proviennent-elles d'apports anthropiques? Quelles pratiques agricoles ont pu permettre ces accumulations? L'analyse d'un sol témoin, servant de référence, est utile pour comparer les accumulations avec un sol non traité de même nature. L'analyse des couches inférieures du sol permet de comparer les accumulations en surface avec celles en profondeur. Si les ÉTM d'une ou plusieurs fractions dépassent le percentile 99 %, il est nécessaire de passer à l'étape 3.

- **ÉTAPE 3**

Pour les sols dont les ÉTM d'une ou plusieurs fractions sont de niveau 5, la biodisponibilité des ÉTM est vérifiée à l'aide de tests de toxicité et de la méthode développée pour vérifier le niveau de disfonctionnement enzymatique. La présente étude ne permet pas de définir des critères pour établir les paramètres de faible mobilité ou mobilité plus importante. Ces critères pourraient être définis spécifiquement en fonction de la problématique à l'étude sur la base de considérations tenant compte du niveau de précision recherché pour les besoins de l'étude.

## PHASE 2-VALIDATION

Les travaux de la première phase de développement ont été réalisés sur des échantillons de sol auxquels a été ajouté une concentration connue de cuivre afin de maîtriser le maximum de facteurs dans le but d'établir adéquatement les limites analytiques des méthodes mises à l'épreuve.

Les travaux de la seconde phase de validation sont présentés dans les sections suivantes. Ces travaux avaient pour objectif de relativiser l'information obtenue par les outils développés à la phase 1 en fonction notamment de l'âge de la contamination. Ainsi, dans une première étape, la sensibilité et la précision des outils qui ont été développés ou testés ont été évaluées en modifiant les conditions environnementales des sols à l'étude par l'apport de matières exogènes plus ou moins chargées en ÉTM. Dans une seconde étape, la validation a fait intervenir des échantillons de sols prélevés dans le milieu et ayant reçus des apports en ÉTM depuis de nombreuses années.

### 4.1 SOLS CONTAMINÉS PAR DES AMENDEMENTS EN LABORATOIRE

Trois matières exogènes ont été sélectionnées en fonction de leur contenu en ÉTM et de leurs caractéristiques biologiques et physico-chimiques (matière organique, pH, etc.). Ces matières sont représentatives de la très grande majorité des matières résiduelles actuellement épandues sur les terres agricoles du Québec ou encore utilisées pour la restauration de sites contaminés. Elles ont été mélangées aux 3 sols de la phase 1 à un taux d'épandage équivalent à 10 % sur base sèche, simulant ainsi des épandages successifs à long terme. Le protocole développé par le CEAEQ dans le cadre d'un projet de développement d'un critère toxicologique pour la valorisation des matières résiduelles fertilisantes a été utilisé pour ajouter les matières exogènes aux sols.

Les sections qui suivent présentent la caractérisation chimique de trois sols ayant subi des amendements avec matières exogènes dont un lisier de porcs, une boue municipale et une boue papetière. Cette caractérisation a été comparée avec les tests de toxicité qui ont été effectués sur l'ensemble de ces mêmes sols amendés. Finalement, ces données ont aussi été interprétées avec les résultats des essais enzymatiques qui ont été réalisés sur un seul de ces sols, le loam, avec les différents amendements.

#### 4.1.1 Caractérisation chimique des sols amendés avec des matières exogènes

Le Tableau 4.1 présente la caractérisation chimique du lisier de porcs, de la boue municipale et de la boue papetière. Dans l'ensemble, les trois matières exogènes retenues sont relativement riches en métaux, principalement en cuivre et en zinc et elles contiennent une forte proportion d'éléments fertilisants tels l'azote et le phosphore. Selon les critères de référence pour la valorisation des matières résiduelles fertilisantes (MENV, 2004), les boues seraient de catégorie C2 alors que le lisier comporte une concentration en métaux le classant dans la catégorie C1, bien que par convention les déjections animales de ferme tel le lisier de porcs ne sont pas considérées comme des matières résiduelles fertilisantes au sens de la loi.



En valeur totale, les trois matières contiennent des concentrations en cuivre à partir desquelles des effets toxiques ont été observées lors des essais par ajout dosé de cuivre.

**Tableau 4.1 : Caractérisation chimique des matières exogènes servant à l'étude**

Paramètres analysés	Catégorie		Lisier	Boue municipale	Boue papetière
	C1	C2	----- mg/kg base sèche -----		
Cuivre	400	1000	323	497 (480 - 530)	733
Zinc	700	1850	629	577 (550 - 600)	879
Manganèse	--	--	268	189 (180 - 200)	3 505
Cadmium	3,0	10	0,187	5	7,1
Mercure	0,8	5	--	0,82 (0,77 - 0,87)	0,2
Sélénium	2,0	14	--	9 (9 - 10)	0,6
Plomb	150	300	0,934	129 (123 - 139)	10
Chrome	210	1060	10,36	112 (111 - 112)	30,1
Cobalt	34	150	1,593	5 (5 - 6)	3,2
Arsenic	13	40	--	7	0,7
Aluminium	--	--	335	22 667 (22 000 - 23 000)	1
Nickel	62	180	14,20	36 (35 - 37)	27
Calcium	--	--	18 714	35 667 (35 000 - 36 000)	38 500
Magnésium	--	--	7 253	5067 (4900 - 5300)	2 300
Potassium	--	--	24 396	2867 (2800 - 3000)	500
Azote ammoniacal	--	--	40 758	1310 (1230 - 1390)	--
Nitrates+nitrites disponibles	--	--	--	10 (9 - 11)	100
Azote total Kjeldahl	--	--	76 286	25 667 (25 000 - 26 000)	21 900
Phosphore inorganique total	--	--	--	10 167 (9 700 - 10 700)	4 000
Phosphore total	--	--	13 187	12 633 (11 800 - 13 200)	--

( ) Les valeurs entre parenthèses représentent le minimum et le maximum mesurés

**Tableau 4.2 : Concentration en métaux totaux et labiles (Mehlich-3) des sols sans et avec amendement**

Sol	Amendement	Concentration en ÉTM									
		TOTAUX					Fraction labile				
		Zinc	Nickel	Cadmiu m	Chrom e	Plomb	Zinc	Nickel	Cadmiu m	Chrom e	Plomb
		(mg ÉTM/kg de sol sec)									
Loam sableux	Aucun	54,89 (± 0,56)	9,65 (± 0,32)	0,26 (± 0,02)	16,77 (± 0,19)	6,61 (± 0,26)	1,61 (± 0,06)	0,06 (± 0,00)	0,05 (± 0,00)	0,22 (± 0,00)	0,84 (± 0,01)
	Lisier	60,07 (± 0,52)	9,75 (± 0,31)	0,27 (± 0,02)	16,99 (± 0,13)	6,52 (± 0,04)	4,22 (± 0,20)	0,08 (± 0,00)	0,05 (± 0,00)	0,25 (± 0,03)	0,85 (± 0,02)
	Boue municipale	100,24 (± 1,50)	12,14 (± 0,05)	0,64 (± 0,02)	24,27 (± 0,27)	14,55 (± 0,16)	19,55 (± 3,67)	0,30 (± 0,06)	0,14 (± 0,02)	0,39 (± 0,03)	1,91 (± 0,15)
	Boue papetière	98,38 (± 2,91)	11,99 (± 0,31)	0,65 (± 0,05)	17,78 (± 0,17)	7,14 (± 0,20)	16,32 (± 0,54)	0,70 (± 0,02)	0,08 (± 0,00)	0,34 (± 0,01)	0,99 (± 0,03)
Loam	Aucun	53,25 (± 0,33)	23,85 (± 0,34)	0,28 (± 0,01)	24,97 (± 0,25)	13,08 (± 0,37)	1,84 (± 0,12)	0,35 (± 0,04)	0,04 (± 0,00)	0,20 (± 0,00)	1,67 (± 0,03)
	Lisier	56,11 (± 1,13)	23,82 (± 0,65)	0,29 (± 0,02)	24,53 (± 0,38)	12,78 (± 0,38)	3,70 (± 0,18)	0,32 (± 0,01)	0,04 (± 0,00)	0,21 (± 0,00)	1,57 (± 0,02)
	Boue municipale	107,81 (± 4,62)	26,09 (± 0,24)	0,78 (± 0,03)	33,40 (± 1,01)	22,06 (± 0,95)	24,52 (± 0,88)	0,56 (± 0,03)	0,17 (± 0,01)	0,42 (± 0,01)	2,86 (± 0,04)
	Boue papetière	95,33 (± 4,01)	25,11 (± 0,45)	0,61 (± 0,02)	25,24 (± 0,36)	13,39 (± 0,66)	14,74 (± 0,12)	0,79 (± 0,02)	0,08 (± 0,00)	0,32 (± 0,00)	1,80 (± 0,07)
Loam argileux	Aucun	40,85 (± 0,46)	17,91 (± 0,22)	0,28 (± 0,01)	25,72 (± 0,26)	14,41 (± 0,18)	1,08 (± 0,09)	0,44 (± 0,01)	0,07 (± 0,00)	0,32 (± 0,00)	2,76 (± 0,04)
	Lisier	50,79 (± 0,46)	19,23 (± 0,45)	0,27 (± 0,00)	26,11 (± 0,30)	15,03 (± 0,46)	2,79 (± 0,12)	0,35 (± 0,02)	0,06 (± 0,00)	0,30 (± 0,00)	2,19 (± 0,07)

	0,84)	0,13)			0,06)	0,16)	0,08)			0,05)
Boue municipale	93,53	21,21	0,72	33,59	23,02	29,35	0,65	0,21	0,51	3,54
	(± 1,14)	(± 0,60)	(± 0,01)	(± 1,22)	(± 0,49)	(± 2,56)	(± 0,04)	(± 0,01)	(± 0,02)	(± 0,11)
Boue papetière	69,19	20,26	0,48	27,56	15,02	12,95	0,68	0,09	0,43	2,55
	(± 0,17)	(± 0,45)	(± 0,02)	(± 0,49)	(± 0,22)	(± 0,13)	(± 0,02)	(± 0,00)	(± 0,01)	(± 0,04)

Le Tableau 4.2 présente les concentrations totales et la fraction labile (Mehlich-3) des principaux métaux analysés dans les sols avec et sans amendement. De façon générale, l'apport de lisier et de matières résiduelles fertilisantes aux 3 sols étudiés n'apporte pas un accroissement significatif des concentrations en ÉTM totaux à l'exception du zinc. Pour ce métal, l'apport est plus significatif avec l'ajout de boues par rapport à un amendement avec le lisier.

Pour la fraction labile des sols à l'étude (Tableau 4.2), l'apport de matières exogènes n'amène pas une augmentation significative des concentrations en cadmium, en chrome, en nickel et en plomb. Les valeurs varient entre 0,6 et 25 % pour les 3 sols sans amendements et de 0,8 à 29,2 % pour les sols amendés. Par contre, une augmentation significative des concentrations en zinc dans la fraction labile pour les sols amendés avec les boues a été observée et, dans une moindre mesure, avec le lisier de porcs. Cependant, les concentrations de zinc mesurées dans la fraction labile des sols amendés en matières fertilisantes dépassent la classe 5 selon la classification établie au Tableau 3.1, et ces teneurs correspondent à des niveaux inhabituels d'accumulation sur le plan de la mobilité des ÉTM dans les sols agricoles.

Le Tableau 4.3 présente les résultats de la mesure du cuivre dans les fractions totale et labile ainsi que dans les fractions mobile, liée aux oxydes et liée à la matière organique. L'ajout des boues dans une proportion de 10% V/V a eu pour effet d'augmenter significativement la concentration totale en cuivre alors que la concentration de ce métal dans le sol amendé avec le lisier de porcs n'est que très légèrement plus élevée par rapport à celle mesurée dans chacun des sols avant amendement.

Pour tous les sols avec ou sans amendement, le cuivre est principalement associé aux oxydes et à la matière organique ainsi que dans une moindre mesure à la fraction labile. La structure du sol a peu d'influence sur la disponibilité du cuivre et sa distribution dans les différentes fractions. Par contre, l'ajout de la boue municipale a augmenté la proportion relative de cuivre dans ces fractions par rapport aux sols non amendés alors que la boue de papetière en diminue les concentrations relatives.

**Tableau 4.3 : Concentration en cuivre total et des différentes fractions des sols amendés en ÉTM**

Sol	Amendement	Concentration en cuivre				
		Totaux	Fraction labile	Fraction mobile	Fraction dans les oxydes	Fraction liée à M.O.
		mg Cu/kg de sol sec				
Loam sableux	Aucun	8,19 ± 2,02	1,77 ± 0,18	0,09 ± 0,00	2,23 ± 0,33	1,36 ± 0,13
	Lisier	8,23 ± 0,37	1,77 ± 0,05	0,18 ± 0,01	4,11 ± 0,22	2,73 ± 0,23
	Boue municipale	45,92 ± 0,99	<b>9,08 ± 1,85</b>	1,96 ± 0,11	<b>24,05 ± 1,70</b>	<b>18,66 ± 1,13</b>
	Boue papetière	88,26 ± 15,47	1,15 ± 0,14	0,24 ± 0,02	3,43 ± 0,28	3,01 ± 0,37
Loam	Aucun	13,01 ± 0,21	1,25 ± 0,06	0,12 ± 0,01	2,69 ± 0,20	2,10 ± 0,22
	Lisier	15,50 ± 1,17	2,09 ± 0,17	0,21 ± 0,02	4,37 ± 0,25	4,52 ± 2,14
	Boue municipale	61,36 ± 5,97	<b>10,78 ± 0,10</b>	1,80 ± 0,27	<b>28,05 ± 0,74</b>	<b>25,06 ± 2,39</b>
	Boue papetière	73,80 ± 5,11	1,34 ± 0,06	0,24 ± 0,02	3,45 ± 0,12	3,56 ± 0,55
Loam argileux	Aucun	18,73 ± 0,27	3,27 ± 0,02	0,12 ± 0,01	7,14 ± 0,10	5,06 ± 0,38
	Lisier	21,61 ± 0,10	3,06 ± 0,10	0,22 ± 0,03	7,47 ± 0,27	5,58 ± 0,51
	Boue municipale	61,52 ± 1,49	<b>15,47 ± 1,30</b>	1,68 ± 0,29	<b>29,92 ± 2,72</b>	<b>24,94 ± 1,25</b>
	Boue papetière	36,49 ± 1,49	2,66 ± 0,9	0,23 ± 0,08	6,45 ± 0,30	4,93 ± 0,44

#### 4.1.2 Tests de toxicité des sols amendés en matières exogènes

##### 4.1.2.1 Test de toxicité avec le ver de terre

Le Tableau 4.4 présente les résultats obtenus pour les tests de létalité, d'évitement et de reproduction avec le ver de terre *Eisenia andrei*. Aucun effet sur la survie du ver de terre n'a été mesuré pour les trois amendements et les trois sols testés. Pour la mesure d'évitement, la réponse des vers démontre une grande sensibilité en ce qui concerne les boues municipales ou industrielles. Par contre, les vers semblent avoir une préférence marquée pour les sols amendés avec le lisier de porcs. La texture du sol ne semble pas affecter de façon importante le comportement du ver aux niveaux des contaminations testées.

Par ailleurs, la mesure des effets de la contamination des sols par les trois matières exogènes testées sur la reproduction du ver de terre ne permet à peu près pas de mettre en évidence des effets en fonction de la matrice ou de l'origine de la matière bien que le lisier semble avoir un effet positif sur la reproduction pour le loam sableux.

**Tableau 4.4 : Résultats obtenus pour les tests de létalité, d'évitement et de reproduction avec le ver de terre *Eisenia andrei* pour les trois sols amendés**

Sol	Amendement	Létalité	Évitement	Reproduction			
				nombre de cocons	nombre de juvéniles	Poids humide	Poids sec
				%Effet*			
Loam sableux	Lisier	Sans effet	-64 (0,035)	-64 (0,023)	-16 (0,529)	-78 (0,141)	-27 (0,554)
	Boue municipale	Sans effet	11 (0,020)	-19 (0,316)	30 (0,196)	-48 (0,196)	-48 (0,175)
	Boue papetière	4 (0,173)	78 (<0,001)	12 (0,694)	-5 (0,914)	37 (0,275)	18 (0,626)
Loam	Lisier	Sans effet	-100	22 (0,045)	9 (0,480)	31 (0,007)	39 (0,002)
	Boue municipale	Sans effet	96 (<0,01)	1 (0,469)	25 (0,125)	11 (0,332)	-1 (0,485)
	Boue papetière	Sans effet	56 (0,003)	34 (0,034)	20 (0,434)	-12 (0,758)	-37 (0,472)
Loam argileux	Lisier	2 (0,165)	-87 (0,010)	2 (0,940)	23 (0,565)	-8 (0,869)	-10 (0,850)
	Boue municipale	Sans effet	56 (0,008)	29 (0,087)	33 (0,078)	42 (0,028)	47 (0,019)
	Boue papetière	Sans effet	91 (<0,001)	86 (0,001)	48 (0,316)	-33 (0,676)	-41 (0,634)

\* Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'effet. La valeur entre ( ) représente le test de t (p=).

- : indique un effet positif

#### 4.1.2.2 Tests de toxicité avec l'orge

Le Tableau 4.5 présente les résultats des tests sur la germination et la croissance de l'orge sur 14 jours. À la concentration ajoutée correspondant à un taux d'épandage de 10 %, les matières exogènes testées n'ont pas d'effet sur la germination de l'orge. Par contre, les effets sur les paramètres de croissance sont beaucoup plus variables. L'analyse des données démontre tout de même un effet en général positif du lisier dans le cas du loam sableux alors que la boue de papetière est en général plus toxique que les deux autres matières exogènes.

**Tableau 4.5 : Résultats des tests sur la germination et la croissance de l'orge (*Hordeum vulgare*) sur 14 jours**

Sol	Amendement	Germination	Longueur des tiges	Longueur des racines	Poids humide	Poids sec
				% Effet*		
Loam sableux	Lisier	Sans effet	-31 (<0,001)	4 (0,633)	-166 (<0,001)	-86 (<0,001)
	Boue municipale	Sans effet	9 (0,017)	27 (<0,001)	-36 (0,061)	-13 (0,376)
	Boue papetière	8 (0,141)	18 (0,011)	10 (0,219)	17 (0,048)	2 (0,726)
Loam	Lisier	Sans effet	3 (0,709)	10 (0,191)	-22 (0,972)	Sans effet
	Boue municipale	Sans effet	9 (0,404)	24 (0,023)	-12 (0,952)	-15 (0,394)
	Boue papetière	Sans effet	11 (<0,001)	-10 (<0,007)	14 (0,010)	-15 (0,139)
Loam argileux	Lisier	4 (0,347)	16 (0,081)	28 (<0,001)	49 (0,963)	24 (0,962)
	Boue municipale	Sans effet	11 (0,014)	12 (0,033)	-15 (0,792)	2 (0,562)
	Boue papetière	Sans effet	25 (<0,001)	Sans effet	35 (0,001)	23 (0,008)

\* Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'effet. La valeur entre ( ) représente le test de t (p=).

- : indique un effet positif

#### 4.1.2.3 Tests de toxicité avec la daphnie

Le Tableau 4.6 présente les résultats des tests de létalité sur la daphnie. Les lixiviats des deux sols amendés avec les boues industrielles se sont avérés non toxiques pour la daphnie après une exposition de 48 heures. Par contre, le lixiviat provenant du sol amendé avec le lisier présente un niveau de toxicité significatif pour le loam sableux et le loam.

**Tableau 4.6 : Résultats des tests de létalité sur la daphnie (*Daphnia magna*)**

Sol	Amendement	Létalité 48 h
		% effet*
Loam sableux	Lisier	10 (0,028)
	Boue municipale	2 (0,174)
	Boue papetière	Sans effet
Loam	Lisier	82 (<0,001)
	Boue municipale	2 (0,174)
	Boue papetière	Sans effet
Loam argileux	Lisier	6 (0,086)
	Boue municipale	2 (0,174)
	Boue papetière	Sans effet

\* Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'effet. La valeur entre ( ) représente le test de t (p=).

Tel que l'indique le Tableau 4.2, les concentrations des ÉTM mesurés dans la fraction labile sont inférieures aux critères établis pour le Cadmium, le nickel, le chrome et le plomb. Par contre, selon ces mêmes critères, une caractérisation plus détaillée pour le cuivre dans le cas de la boue municipale et pour le zinc pour cette même boue ainsi que la boue de papetière serait nécessaire afin de mieux définir la distribution de ces métaux dans les différentes fractions du sol, afin de mieux prédire leur biodisponibilité. Tel que le démontre le Tableau 4.3, l'augmentation du cuivre à des concentrations supérieures au critère dans le cas de la boue municipale, correspond à une augmentation significative du cuivre dans les fractions occlus dans les oxydes et liées à la matière organique et, dans une moindre mesure, dans la fraction mobile. Pour les 2 autres matières exogènes, aucune différence significative entre les concentrations de cuivre mesurées dans les différentes fractions, à l'exception du cuivre total, n'a été notée par rapport aux sols de référence.

L'étude ne permet pas de corréler les résultats des tests de toxicité avec les résultats associés aux concentrations de cuivre ou de zinc plus élevées dans la fraction labile. **Par contre, une analyse qualitative de ces données met en lumière que de façon générale les sols amendés par les deux boues présentent un niveau de toxicité plus élevé à une concentration en ÉTM dans la fraction labile dépassant notre critère comparativement au lisier de porcs par exemple pour lequel le critère est respecté.** À la présence de ces métaux en concentrations plus élevées dans la fraction labile correspond donc une augmentation de la mobilité se reflétant par une augmentation apparente de leur biodisponibilité reflétée par les réponses toxicologiques observées.

#### 4.1.3 Essais enzymatiques du sol loam amendés avec les matières exogènes

Les mesures des fonctions enzymatiques ont été effectuées uniquement sur le sol loam, amendé par les trois matières exogènes retenues (4 sols en tout) et ce, pour des raisons de complexité technique (ampleur du travail impliqué).

La section qui suit présente donc les valeurs de RSSI obtenues pour les sols loam non-contaminé et loam amendé soit en lisier de porcs, en boue municipale et en boue papetière. Les patrons de diversité microbienne sont également présentés sous la forme de profils DGGE.

##### 4.1.3.1 Impact d'une perturbation sur les enzymes du sol loam amendé en matières exogènes

L'impact de la perturbation par dessiccation à 60°C sur le sol loam amendé en matières exogènes a été évalué avec le RSSI selon l'outil développé à la section 2.2.1 du présent rapport. Le Tableau 4.7 présente les valeurs de RSSI de quatre enzymes dont un représentant de chacun des cycles biogéochimiques soit le phosphore, le soufre, l'azote et le carbone.

En général, la stabilité fonctionnelle du loam est affectée par l'apport de lisier de porcs et de la boue municipale. En effet, les valeurs de RSSI obtenues pour le loam amendé en lisier de porcs pour les enzymes, phosphatase acide et  $\beta$ -glucosidase, sont respectivement de 40,0 % et 48,9 % par rapport au loam non-contaminé qui sont de 49,7 et 54,2 %. Pour le loam amendé



en boue municipale, trois des quatre enzymes ont subi un impact au niveau de l'activité enzymatique globale du sol suite à une perturbation. À l'opposé, la stabilité fonctionnelle du loam amendé en boue papetière fut augmentée avec une valeur de 54,5 % pour la phosphatase acide.

**Tableau 4.7 : *Relative Soil Stability Index* (RSSI) de l'activité enzymatique du loam amendé en matières exogènes pour la perturbation par dessiccation à 60°C.**

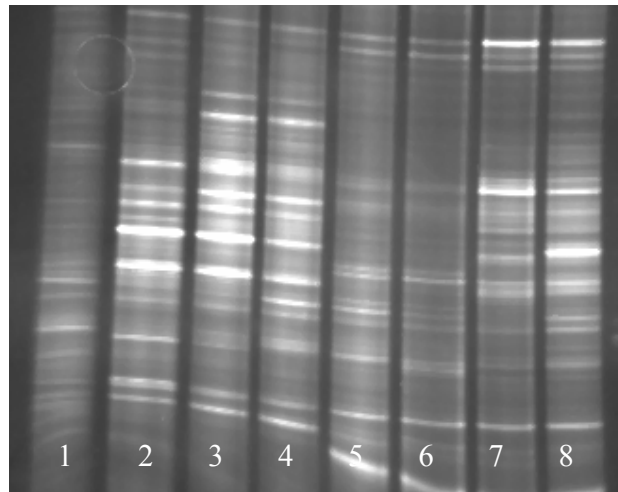
Enzyme	Sol non contaminé	Sol amendé Lisier de porcs	Sol amendé boue municipale	Sol amendé boue papetière
	RSSI (%)			
Phosphatase acide	49,7 ± 1,8	<b>40,0 ± 1,2</b>	<b>45,4 ± 0,9</b>	<b>54,5 ± 0,6</b>
Arylsulfatase	59,1 ± 1,6	58,4 ± 1,3	54,7 ± 2,7	64,3 ± 1,0
Protéase	56,2 ± 6,1	55,3 ± 2,9	<b>76,8 ± 4,9</b>	54,7 ± 5,2
β-glucosidase	54,2 ± 1,1	<b>48,9 ± 2,5</b>	<b>63,3 ± 3,1</b>	55,2 ± 0,7

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écarts-types. Ces derniers sont calculés pour n=3.

#### 4.1.3.2 Impact de la perturbation sur la flore microbienne du sol loam amendé en matières exogènes

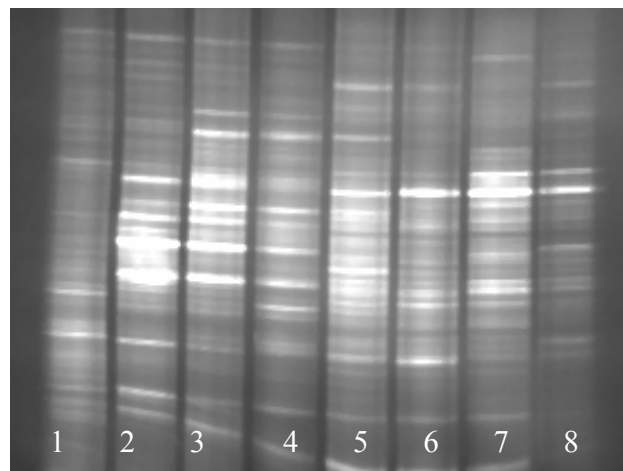
Le profil de diversité microbienne du loam amendé en lisier de porcs est présenté à la Figure 4.1. Le profil de diversité microbienne est différent lorsque les sols non-contaminé et amendé sont comparés. En effet, les puits 2, 3 et 4 montre des profils de bandes beaucoup plus intenses que ceux observés dans les puits 6, 7 et 8 pour le sol amendé en lisier. Ces bandes intenses correspondent à des micro-organismes que l'on nomme des r-stratégistes, micro-organismes dont la croissance rapide se démarque par rapport à l'ensemble de la communauté microbienne, et ces dernières sont beaucoup plus abondantes dans le sol non-contaminé. La flore microbienne du loam amendé en lisier semble plus affectée lorsqu'une perturbation par dessiccation à 60°C est appliquée au sol. En effet, la récupération de la diversité microbienne survient seulement 4 jours suivant la perturbation (puits 7 de la Figure 4.1).

La Figure 4.2 présente le profil de diversité microbienne du loam amendé en boue municipale. Le profil de bandes observé pour le sol non-contaminé est légèrement différent de celui du loam amendé en boue municipale. En effet, la diversité microbienne est moins importante dans le loam (puits 1, 2, 3 et 4). Or, l'apport de boue municipale au sol étudié semble augmenter la diversité microbienne qui, par le fait même, s'est traduit par une augmentation des fonctions enzymatiques (voir le Tableau 4.7) pour les enzymes, protéase et β-glucosidase.



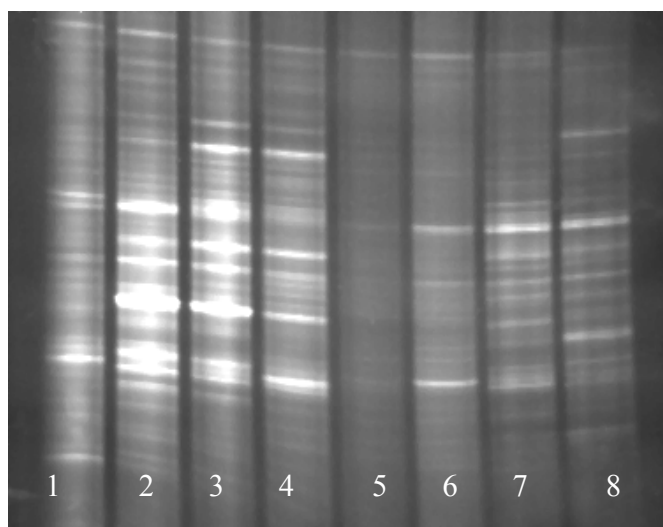
**Figure 4.1 Profils DGGE comparant les communautés des loams non-contaminé et contaminé au lisier de porcs, perturbé par dessiccation à 60°C.**

*Lignes 1* : Jour 1 du sol non contaminé avant perturbation. *Ligne 2* : Jour 2 du sol non contaminé juste après la perturbation. *Ligne 3* : Jour 4 du sol non contaminé. *Ligne 4* : Jour 15 du sol non contaminé. *Ligne 5* : Jour 1 du sol amendé avant perturbation. *Ligne 6* : Jour 2 du sol amendé juste après perturbation. *Ligne 7* : Jour 4 du sol amendé. *Ligne 8* : Jour 15 du sol amendé.



**Figure 4.2 Profils DGGE comparant les communautés des loams non-contaminé et contaminé aux boues municipales, perturbé par dessiccation à 60°C.**

*Lignes 1* : Jour 1 du sol non contaminé avant perturbation. *Ligne 2* : Jour 2 du sol non contaminé juste après la perturbation. *Ligne 3* : Jour 4 du sol non contaminé. *Ligne 4* : Jour 15 du sol non contaminé. *Ligne 5* : Jour 1 du sol amendé avant perturbation. *Ligne 6* : Jour 2 du sol amendé juste après perturbation. *Ligne 7* : Jour 4 du sol amendé. *Ligne 8* : Jour 15 du sol amendé.



**Figure 4.3 Profils DGGE comparant les communautés des loams non-contaminé et contaminé aux boues papetières, perturbé par dessiccation à 60°C.**

*Lignes 1* : Jour 1 du sol non contaminé avant perturbation. *Ligne 2* : Jour 2 du sol non contaminé juste après la perturbation. *Ligne 3* : Jour 4 du sol non contaminé. *Ligne 4* : Jour 15 du sol non contaminé. *Ligne 5* : Jour 1 du sol amendé avant perturbation. *Ligne 6* : Jour 2 du sol amendé juste après perturbation. *Ligne 7* : Jour 4 du sol amendé. *Ligne 8* : Jour 15 du sol amendé.

La diversité microbienne du loam amendé en boue papetière a également été analysée. La Figure 4.3 présente ce profil. Encore une fois, le profil de diversité microbienne se démarque par la présence de r-stratégistes uniquement pour le loam non-contaminé (puits 1, 2, 3 et 4). La récupération de la croissance des micro-organismes du loam amendé en boue papetière est beaucoup plus lente que celle observée pour loam non-contaminé. Cependant, la biodiversité, après 14 jours suivant la perturbation par dessiccation à 60°C, semble équivalente pour les deux loams (puits 4 et 8).

En faisant suite aux résultats présentés aux Tableau 4.2 et Tableau 4.3, les faibles teneurs mesurées de Cu et de Zn pour le loam amendé en lisier de porcs ne permettent pas de corrélérer les résultats obtenus avec ceux des RSSI. L'impact de la stabilité fonctionnelle s'est montré plus importante pour l'ajout de lisier de porcs dans ce sol. Or, cet impact est probablement associé à un autre phénomène tel que biologique.

Pour le loam amendé en boue municipale, les résultats des analyses chimiques ont montré des teneurs en Cu et en Zn des fractions labiles dépassant le critère établi au Tableau 3.1. Un impact sur la stabilité fonctionnelle de la phosphatase a été identifié. Toutefois, la présence de ces métaux ne semble pas avoir eu d'impact sur les cycles du carbone et de l'azote. Au contraire, la stabilité fonctionnelle de la protéase et  $\beta$ -glucosidase fut augmentée. Ces résultats s'avèrent tout à fait prévisibles puisque la boue municipale, malgré la présence de certains métaux, contient beaucoup de matières organiques et joue un rôle fertilisant pour les sols.

Enfin, pour le loam amendé en boue papetière, aucun impact sur la stabilité fonctionnelle globale de la flore n'a été observé. Seule une augmentation de la stabilité fonctionnelle de la phosphatase a été notée. Ainsi, la présence des métaux, le Cu et le Zn, en concentration plus abondante dans la boue papetière ne permet pas de corréler les résultats obtenus avec les teneurs mesurées dans le loam.

## **4.2 SOLS CONTAMINÉS PAR DES AMENDEMENTS SUR LE TERRAIN (VIEILLISSEMENT DE LA CONTAMINATION)**

Deux sols ont été échantillonnés pour cette étape. L'un de ces sols a été prélevé sur un site résidentiel ayant reçu pendant plus de cinquante ans des apports de contaminants inorganiques d'origine anthropique (principalement le cuivre, le zinc et l'arsenic).

Le second sol a été échantillonné sur les mêmes parcelles de terrain ayant fait l'objet de mesures de bilan de masse. Ces parcelles ont fait l'objet d'apports de lisiers de porc riches en ÉTM sur une période de plus de 25 ans.

La validation de la méthode de mesure chimique de la mobilité des ÉTM comporte deux aspects distincts soient la validation des critères d'interprétation et la validation de la méthode proprement dite. La méthode de mesure chimique avec le sol ayant fait l'objet d'apports de lisiers de porcs a donc été validée. La méthode d'évaluation de la biodisponibilité et de la mobilité a par la suite été appliquée à ce sol ainsi qu'au sol contaminé par une activité industrielle.

### **4.2.1 Validation de la méthode de mesure chimique de la mobilité des ÉTM**

#### *4.2.1.1 Intérêt de tester la méthode sur des sols in situ*

Afin de vérifier la validité de la procédure analytique proposée pour le suivi des ÉTM dans les sols (décrite à la section 3), elle a été appliquée à une expérience de longue durée d'épandage de lisiers de porcs. Le site d'expérimentation est celui mentionné plus tôt, situé à la station de recherche de l'IRDA de Saint-Lambert de Lauzon. Ce site a été soumis pendant 25 ans à l'application de lisiers de porcs à doses variables. Tran *et al.* (1996) ont rapporté sur ce site un enrichissement en cuivre et zinc du sol après 16 années d'application consécutive de lisiers. Il a reçu d'importants apports de cuivre et zinc, c'est pourquoi il est très approprié pour valider la procédure analytique de suivi de ces ÉTM.

#### *4.2.1.2 Historique et caractéristiques des sols étudiés*

L'expérimentation de longue durée a débuté en 1979 et portait sur l'application du lisier de porcs dans la production du maïs-ensilage et du maïs-grain dans la région de Québec sur un sol limoneux de la série Le Bras. Les parcelles en maïs ont été soumises à un travail réduit avec un chisel. Elles ont reçu annuellement pendant 20 ans des doses de lisiers de porcs de 0, 30, 60, 90 et 120 t/ha. Par la suite, pendant 5 ans, les doses ont été de 60 t/ha dans toutes les parcelles à l'exception du témoin sans lisier. Ce lisier provenait soit d'une maternité ou de porcs à l'engraissement. Les lisiers de maternité sont reconnus pour être particulièrement riches en zinc alors que les porcs à l'engraissement sont riches en cuivre. Le dispositif

expérimental est constitué de quatre blocs aléatoires complets avec cinq traitements comportant les quatre doses croissantes de lisiers et un témoin sans apport de lisier. Cette parcelle sans lisier était fertilisée uniquement avec des engrais minéraux NPK selon la dose recommandée dans le guide de fertilisation. L'application de lisiers s'est faite par injection à 10 cm de profondeur entre les rangs de maïs-ensilage de 1979 à 1984. Après 1984, le lisier a été appliqué en surface entre les rangs de maïs-grain et incorporé au sol par un sarcléur. À partir de 1999, les parcelles ont été cultivées en prairie de trèfle et de mil. Les lisiers ont été appliqués en surface du sol au moyen d'une rampe d'épandage.

#### *4.2.1.3 Mesures de mobilités des ÉTM dans les sols amendés*

Pour les fins de la présente étude, les sols du site expérimental décrit plus haut ont été caractérisés à l'automne 2003 pour leurs teneurs en ÉTM, après 25 ans d'apport consécutif de lisiers de porcs. Pour ce faire, la procédure d'analyse en trois étapes proposée a été appliquée. Les échantillons de sol à analyser ont été prélevés dans chaque parcelle et à cinq niveaux de profondeurs (0-10; 10-20; 20-30; 30-40 et 40-50 cm).

En première étape, la procédure prévoit l'analyse des ÉTM labiles des sols avec la méthode Mehlich-3 et l'identification des ÉTM présentant des accumulations au-delà du niveau percentile 99 % des sols, correspondant à la classe 5 du Tableau 4.9. Les ÉTM des sols ont donc été extraits avec la méthode Mehlich-3. Rappelons que cette méthode d'analyse de sols est celle en usage au Québec dans le secteur agricole et que chaque année elle sert à analyser plusieurs dizaines de milliers de sols. L'interprétation des résultats a été réalisée à l'aide des critères révisés présentés au Tableau 4.9. L'analyse statistique des teneurs en ÉTM selon les doses de lisiers et la profondeur a été effectuée à l'aide du logiciel SAS (Statistical Analysis System), selon la procédure de traitement statistique GLM, et ce, en prenant en compte 25 ans d'applications consécutives de lisiers.

En deuxième étape, la procédure analytique prévoit compléter le suivi des ÉTM avec d'autres méthodes analytiques afin de caractériser des fractions plus spécifiques dans les sols pour les sols de classe 5, présentant un dépassement des critères pour la méthode Mehlich-3. Pour ces ÉTM, les extractions à l'acétate d'ammonium, au pyrophosphate et à l'oxalate ont été faites afin de caractériser plus précisément la fraction soluble et échangeable, la fraction organique et la fraction oxyde des ÉTM. La détermination des ÉTM totaux a également été faite afin de mesurer l'accumulation globale des ÉTM excédant les critères.

En troisième étape, la procédure analytique prévoit examiner si les teneurs en ÉTM n'atteignent pas des seuils écotoxicologiques critiques, des niveaux de disfonctionnement enzymatique ou même des seuils environnementaux pouvant exiger la réhabilitation des sites. Une section de notre étude porte sur l'établissement des seuils écotoxicologiques et des niveaux de disfonctionnement enzymatique pour le cuivre. Ces seuils ne sont pas bien connus pour les autres ÉTM actuellement. Il faudra développer dans le futur ces critères pour tous les ÉTM. Cette étape n'a donc été réalisée que partiellement pour le cuivre.

#### 4.2.2 Validation des critères d'interprétation pour Cu et Zn labiles

Pour valider les critères d'interprétation établis, l'IRDA disposait de trois bases de données permettant d'établir la distribution du cuivre et du zinc labiles (Mehlich-3) dans la couche arable de sols provenant de toutes les régions agricoles du Québec. La distribution percentile a donc été établie dans ces trois groupes de sol :

- Groupe 1 : issu d'une étude réalisée à l'IRDA portant sur 6 301 échantillons de sols prélevés dans la couche arable lors de l'Inventaire des problèmes de dégradation des sols du Québec (Tabi *et al.*, 1990).
- Groupe 2 : issu du MAPAQ (Ministère Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec) qui dispose des résultats de 6 957 analyses de cuivre et zinc labiles (Mehlich-3) provenant des analyses de sol réalisées pour les agriculteurs par le laboratoire d'analyse Agri-direct.
- Groupe 3 : issu de la phase 1 de la présente étude, où les teneurs en ÉTM de la couche arable de 64 séries de sols du Québec ont été analysées.

Puisque le Québec compte plus de 600 séries de sol, il s'agissait ici de vérifier si la distribution du cuivre et du zinc labiles (Mehlich-3) des sols du groupe 3 se comparait avec celle obtenue sur des populations plus importantes de sols des groupes 1 et 2. Ainsi, à partir des résultats obtenus, il a été possible d'effectuer une révision des critères initialement proposés pour ces deux éléments (Cu et Zn).

**Tableau 4.8 : Distribution percentile du cuivre et du zinc labiles (Mehlich-3) dans la couche arable des sols du Québec, selon les trois groupes de sol**

Niveau percentile	Cuivre			Zinc		
	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
	----- (mg/kg) -----					
25	1,1	1,7	1,3	1,2	2,1	1,3
50	1,8	2,6	1,9	1,9	3,2	1,6
75	2,8	4,1	2,8	3,0	6,0	2,1
95	5,7	9,0	3,7	6,9	15,8	2,8
99	9,0	18,8	8,0	14,0	32,6	5,8

#### • Cuivre

La distribution percentile du cuivre des bases de données des groupes 1 et 3 indique des niveaux assez semblables pour ces deux groupes de sol (Tableau 4.8). Le niveau critique 99 % est de 9,0 mg/kg pour le groupe 1 et de 8,0 mg/kg pour le groupe 3. Ces deux distributions démontrent une faible proportion des sols avec un niveau d'accumulation de Cu élevé et sont sans doute plus révélatrices des teneurs naturelles dans les sols. Par contre, les sols du groupe 2 indiquent un niveau d'accumulation beaucoup plus important. Les résultats

proviennent des analyses de sol faites pour les agriculteurs. Une accumulation d'origine anthropique est davantage perceptible dans ce groupe. Les effets des apports anthropiques sont particulièrement évidents pour 5 % des échantillons analysés. Le seuil critique de 8 mg/kg semble un peu faible et nous proposons de le porter à la valeur correspondant au niveau percentile 99 % des sols du groupe 1 soit à 9,0 mg/kg. Le Tableau 4.9 présente la classification révisée des teneurs en cuivre labile (Mehlich-3) dans les sols du Québec. Le niveau critique de 9,0 mg Cu/kg est discriminant pour 5 % des sols du groupe 2 analysés pour les agriculteurs. Les teneurs au-delà de ce seuil sont considérées comme étant davantage d'origine anthropique que naturelle. Ceci ne signifie pas que ces sols ont subi des perturbations limitant leur fonctionnement ou leur productivité. L'objectif de l'étape 3 de la procédure proposée vise justement à vérifier à l'aide de tests de toxicité et de la mesure de dysfonctionnement enzymatique de la communauté microbienne la biodisponibilité de ces contaminants.

- **Zinc**

Pour le zinc, la distribution percentile des sols des trois études diffère substantiellement. Le seuil actuel de 5,8 mg Zn/kg est discriminant pour 7,1 % des sols du groupe 1, de 26,0 % des sols du groupe 2 et de 1 % des sols du groupe 3. Il apparaît trop sévère et il est proposé de le porter à la valeur correspondant au niveau 99% des sols du groupe 1, soit 14 mg Zn/kg. La classification du zinc labile (Mehlich-3) a donc été revue (Tableau 4.9). Au niveau critique de 14 mg/kg, 6,6 % des échantillons de sol analysés pour les agriculteurs excèdent le critère. Cette valeur permet de distinguer les niveaux d'accumulation naturelle et celle liée aux pratiques agricoles. Des études plus détaillées sont requises pour connaître à partir de quelle teneur des dysfonctionnements des sols ou des problèmes d'ordre agronomique sont perceptibles. Ces seuils ne sont pas connus actuellement pour le zinc.

**Tableau 4.9 : Classification révisée (pour Cu et Zn) de leur teneur en ÉTM labiles des sols, mesurée avec la méthode Mehlich-3**

Class e	Distributio n percentile	Mn	Cu	Zn	Co	Cr	Cd	Ni	Pb
		----- mg/kg -----							
1	< 25	< 15,2	< 1,1	< 1,2	< 0,15	< 0,21	< 0,05	< 0,25	< 1,6
2	25 – 50	15,2– 25,3	1,1–1,8	1,2–1,9	0,15– 0,22	0,21– 0,27	0,05– 0,07	0,25– 0,36	1,6–2,1
3	50 – 75	25,3– 35,0	1,8–2,8	1,9–3,0	0,22– 0,29	0,27– 0,42	0,07– 0,10	0,36– 0,57	2,1–2,6
4	75 – 99	35,0– 98,6	2,8–9,0	3,0–14,0	0,29– 1,18	0,42– 0,75	0,10– 0,24	0,57– 2,05	2,6–5,7
5	> 99	> 98,6	> 9,0	> 14,0	> 1,18	> 0,75	> 0,24	> 2,05	> 5,7

#### 4.2.2.1 Validation de la procédure analytique (première étape)

Il est prévu à la première étape de la procédure analytique d'examiner les teneurs de la fraction labile des ÉTM des sols avec la méthode Mehlich-3 et de comparer avec la

classification établie (Tableau 4.9). Pour les sols de classe 5, un suivi plus détaillé des ÉTM des sols peut être réalisé afin de caractériser plus précisément les accumulations dans les différentes fractions des sols. La procédure a donc été validée en analysant des sols soumis à un historique d'application de lisiers de porcs. Le Tableau 4.10 permet de connaître les doses cumulatives totales correspondantes.

**Tableau 4.10 : Doses annuelles et cumulatives de lisiers de porcs appliquées sur les parcelles pendant 25 ans, selon les traitements**

Traitements	Doses annuelles	Doses cumulatives
	----- t/ha -----	
1	0	0
2	30	900
3	60	1 500
4	90	2 100
5	120	2 700

Les doses annuelles présentées ont été appliquées pendant 20 ans. Par la suite, pour les traitements 2, 3, 4 et 5, une dose annuelle uniforme de 60 t/ha a été appliquée pendant 5 ans. Dans le texte, nous référons à ces doses annuelles de lisiers de porcs appliquées. Le Tableau 4.11 permet de connaître les doses cumulatives totales correspondantes.



**Tableau 4.11 : Teneur en ÉTM labiles des sols (méthode Mehlich-3) après 25 ans d'application de lisiers de porcs selon les doses apportées et les couches de sols**

Couche de sol	Doses de lisiers	Teneurs en ÉTM labiles des sols extraits avec la méthode Mehlich-3							
		Cu	Zn	Mn	Ni	Cd	Cr	Co	Pb
-----mg/kg-----									
1 0-10 cm	0	1,15	0,83	12,50	0,33	0,05	0,20	0,15	1,97
	30	3,06	8,45	11,25	0,28	0,05	0,21	0,14	1,92
	60	4,12	12,61	15,34	0,37	0,06	0,19	0,14	2,12
	90	5,18	15,86	16,56	0,42	0,06	0,18	0,16	2,13
	120	6,23	16,40	16,63	0,40	0,06	0,22	0,16	1,89
2 10-20 cm	0	1,02	0,53	5,91	0,19	0,05	0,22	0,09	1,74
	30	2,54	5,40	9,11	0,23	0,05	0,23	0,13	1,83
	60	2,54	1,95	6,19	0,21	0,06	0,20	0,07	1,89
	90	3,69	4,47	8,20	0,28	0,06	0,18	0,09	1,97
	120	4,30	5,44	8,59	0,24	0,05	0,25	0,10	1,68
3 20-30 cm	0	0,89	0,45	10,53	0,16	0,03	0,24	0,34	1,26
	30	1,45	0,71	9,41	0,15	0,03	0,25	0,23	1,62
	60	1,02	0,55	1,98	0,17	0,03	0,31	0,04	1,40
	90	1,19	0,72	2,68	0,16	0,05	0,22	0,04	1,67
	120	1,64	1,03	6,47	0,14	0,04	0,27	0,12	1,53
4 30-40 cm	0	0,85	0,45	11,36	0,19	0,01	0,26	0,22	1,19
	30	0,96	0,43	17,17	0,15	0,01	0,19	0,52	1,23
	60	0,91	0,40	5,32	0,14	0,01	0,28	0,22	1,29
	90	1,05	0,53	7,41	0,13	0,02	0,24	0,26	1,54
	120	1,12	0,42	8,90	0,18	0,01	0,31	0,36	1,30
5 40-50 cm	0	0,87	0,51	20,01	0,32	0,01	0,20	0,41	1,18
	30	1,26	0,66	23,91	0,46	0,01	0,19	0,50	1,32
	60	1,10	0,44	12,29	0,27	0,01	0,29	0,28	0,99
	90	1,25	0,63	22,26	0,27	0,01	0,17	0,64	1,50
	120	1,22	0,60	19,25	0,29	0,01	0,21	0,57	1,26
<b>F doses</b>		85,1 **	153.5 **	0,21	0,04	4,57	1,07	0,39	2,8
<b>F couches</b>		135,4 **	191.6 **	9,1 **	10,0 **	99,4 **	3,4 **	6,62 *	19,6
<b>F doses * couches</b>		28,9 **	123.9 **	0,62	0,5	0,81	0,84	1,11	0,68

F signifie le test de Fisher pour l'analyse de variance de l'effet des doses, des couches de sol et de l'interaction doses X couches.

\* : significatif à p=0,05

\*\* : significatif à p=0,01

- **Cuivre- labile**

Pour le cuivre labile (Mehlich-3), un accroissement de la teneur dans la couche 0-10 et 10-20 a été observé, proportionnellement avec les doses d'application du lisier (Tableau 4.11). La teneur mesurée dans la couche de surface des parcelles témoins sans lisier est de 1,2 mg Cu/kg; avec la dose de 120 t/ha de lisiers, la teneur s'accroît à 6,2 mg Cu/kg. Elle n'excède pas le critère proposé de 9,0 mg Cu/ha, bien qu'un enrichissement très significatif soit mesuré (Tableau 4.11). L'influence des doses de lisiers se fait sentir également dans la couche 10-20 cm de sol et à un degré moindre dans la couche 20-30 cm. Plus en profondeur, les teneurs en Cu labile (Mehlich-3), varient de 0,7 à 1,2 mg Cu/kg et ne sont pas affectées par les doses de lisiers. Dans la couche 0-10 cm, le rapport de Cu labile (Mehlich-3)/Cu total s'accroît progressivement de 12,2 % dans les parcelles sans lisier à 29,6 % dans les parcelles avec 120 t/ha de lisiers. Le rapport moyen mesuré dans 64 séries de sols du Québec est de 11,4 %. **Les quantités et les proportions du cuivre labile dans la couche arable des sols sont donc affectées substantiellement par les doses de lisiers. Ces résultats valident la capacité de la méthode Mehlich-3 à mettre en évidence des cas d'accumulation de cuivre labile par les pratiques de fertilisation.**

Tran *et al.* (1996) ont établi que la charge annuelle de cuivre appliqué sur ce site a atteint 1,7 kg Cu/ha avec la dose de lisiers de 120 t/ha en 1996. La concentration moyenne du lisier était de 400 mg Cu/kg (base sèche). Les concentrations dans les lisiers et les charges de cuivre appliquées ont été suffisantes pour provoquer un accroissement très significatif des teneurs en cuivre de la couche arable. Bien que le seuil ne soit pas dépassé, nous effectuerons tout de même le suivi détaillé du cuivre dans les sols, tel que prévu à la deuxième étape de la procédure, afin de démontrer que la procédure proposée a la sensibilité voulue pour mettre en évidence les accumulations de cuivre dans les différentes fractions des sols.

- **Zinc labile**

Les teneurs en zinc labile (Mehlich-3) des parcelles s'accroissent proportionnellement avec la quantité de lisiers appliqués sur les parcelles et excèdent le seuil critique de 14,0 mg Zn/kg dans la couche 0-10 cm pour les doses de 90 et 120 t/ha de lisiers. Les teneurs s'accroissent progressivement de 0,8 mg Zn/kg dans les parcelles témoin, atteignant un maximum de 16,4 mg/kg avec la dose de 120 t/ha (Tableau 4.11). Dans la couche 10-20 cm, la teneur en zinc est de 0,53 mg/kg dans les parcelles témoin sans lisier et s'accroissent à 5,4 mg/kg avec la dose de 120 t/ha. Dans la couche 20-30 cm, les sols montrent peu d'accumulation. Au-delà de 30 cm, l'effet des apports de lisiers n'est plus perceptible sur la teneur en zinc labile (Mehlich-3) des sols qui, varie de 0,4 à 0,7 mg Zn/kg. Dans la couche 0-10 cm, le rapport de Zn labile (Mehlich-3) /Zn total est de 2,0 % dans les parcelles sans lisier et il s'accroît progressivement à 19,5 % dans les parcelles avec 120 t/ha de lisiers. Le rapport moyen mesuré dans la couche arable des 64 séries de sol du Québec est de 2,9 %. **Les apports de lisiers accroissent donc de façon très significative les quantités et les proportions de zinc labile dans la couche 0-10 cm des sols.** Un dépassement du critère est obtenu avec les doses de lisiers de 90 et 120 t/ha appliquées annuellement pendant 25 ans dans la couche 0-10 cm.

### **La méthode Mehlich-3 a donc la sensibilité voulue pour mettre en évidence des cas d'accumulation de Zn labile dans les sols suite aux pratiques de fertilisation.**

Tel que mentionné précédemment, les lisiers de porcs appliqués provenaient souvent d'une maternité située à proximité du site expérimental. Ce type de lisier est reconnu pour être particulièrement riche en zinc. Nous ne disposons pas des analyses de lisiers sur une base annuelle. Tran *et al.* (1996) ont établi que la charge de zinc appliquée sur ce site a atteint 6,6 kg Zn/ha avec la dose de lisiers de 120 t/ha en 1996. La concentration moyenne du lisier était de 1 571 mg Zn/kg (base sèche). Comme plusieurs parcelles excèdent le critère proposé, il a été choisi d'effectuer le suivi détaillé du zinc dans les sols tel que prévu à la deuxième étape de la procédure.

#### **• Autres ÉTM**

Les doses de lisiers n'ont pas eu d'effet significatif sur les teneurs en chrome, nickel, cadmium et plomb des sols avec la méthode Mehlich-3 (Tableau 4.11). Les seuils critiques ne sont pas dépassés. Aucun suivi ne sera fait à l'étape 2 pour ces ÉTM. Pour le manganèse, un enrichissement dans la couche 0-10 cm pour les doses de lisiers de 60, 90 et 120 t/ha a été observé. Cette augmentation ne dépasse pas le seuil critique de 98,6 mg Mn/kg. Nous n'effectuerons donc pas le suivi détaillé de leur teneur dans les sols, compte tenu que le seuil n'est pas dépassé et que cet élément ne fait généralement pas partie de la liste des ÉTM exigeant un suivi dans les sols.

#### **• Conclusions**

À la première étape de la procédure, il a donc été possible de mettre en évidence adéquatement les accumulations de cuivre et surtout de zinc provenant des épandages à long terme des lisiers de porcs. La méthode Mehlich-3 a été tout à fait capable de détecter les accumulations de Cu et Zn labiles provenant de ces épandages. Cette étude confirme le bien-fondé d'utiliser la méthode Mehlich-3 pour effectuer en premier le suivi des accumulations des ÉTM dans les sols. Il est ainsi possible d'obtenir rapidement une indication très valable du niveau de contamination des sols en ÉTM.

#### *4.2.2.2 Validation de la procédure analytique (deuxième étape)*

À la deuxième étape de la procédure analytique, il est prévu d'effectuer des mesures plus détaillées des ÉTM dans les sols présentant avec la méthode Mehlich-3 une accumulation au-delà du seuil critique. Seules les teneurs en zinc excèdent ce seuil. Mais comme les teneurs en cuivre montrent des signes évidents d'accumulations, il a été choisi de caractériser plus en détails les teneurs de ces deux éléments dans les sols selon la procédure prévue à la seconde étape. Le cuivre et le zinc dans les fractions échangeable, organique et oxyde des sols ont fait l'objet d'une analyse plus détaillée, dont les résultats sont présentés au Tableau 4.12 et au Tableau 4.13.

**Tableau 4.12 : Teneur en cuivre dans les sols après 25 ans d'application de lisiers de porcs selon les doses apportées et les couches de sol**

Couche de sol	Doses de lisiers	Fraction mobile	Labile	Liée à la MO	Dans oxydes	Total
		Acétate	Mehlich-3	Pyro	Oxalate	
-----mg Cu/kg-----						
<b>1</b> <b>0-10 cm</b>	<b>0</b>	0,068	1,151	1,732	3,174	9,437
	<b>30</b>	0,118	3,060	4,085	6,441	13,353
	<b>60</b>	0,151	4,117	5,788	8,466	14,773
	<b>90</b>	0,172	5,180	7,026	10,114	18,460
	<b>120</b>	0,220	6,229	8,012	11,856	21,016
<b>2</b> <b>10-20 cm</b>	<b>0</b>	0,067	1,021	1,722	2,774	8,085
	<b>30</b>	0,096	2,541	3,304	4,912	12,070
	<b>60</b>	0,100	2,543	3,873	5,745	10,485
	<b>90</b>	0,124	3,692	5,230	7,585	14,019
	<b>120</b>	0,170	4,304	6,013	8,803	15,601
<b>3</b> <b>20-30 cm</b>	<b>0</b>	0,080	0,887	1,544	2,404	9,328
	<b>30</b>	0,073	1,454	2,208	2,984	10,036
	<b>60</b>	0,091	1,023	1,859	2,707	8,185
	<b>90</b>	0,077	1,193	2,224	3,015	7,209
	<b>120</b>	0,109	1,637	2,691	3,724	10,806
<b>4</b> <b>30-40 cm</b>	<b>0</b>	0,115	0,852	1,536	2,668	16,740
	<b>30</b>	0,117	0,958	1,852	2,886	17,739
	<b>60</b>	0,103	0,913	1,543	2,150	11,808
	<b>90</b>	0,087	1,050	2,030	2,702	14,193
	<b>120</b>	0,139	1,118	2,498	3,182	15,615
<b>5</b> <b>40-50 cm</b>	<b>0</b>	0,129	0,866	1,561	2,795	20,762
	<b>30</b>	0,150	1,260	2,299	3,700	22,452
	<b>60</b>	0,119	1,099	1,818	2,935	17,213
	<b>90</b>	0,142	1,250	2,010	3,518	22,827
	<b>120</b>	0,147	1,223	2,250	3,722	20,167
<b>F doses</b>		8,7 *	85,1**	29,4**	42,7**	2,64 (10%)
<b>F couches</b>		19,7 **	135,4**	152,2**	134,8**	38,1**
<b>F doses * couches</b>		4,7 **	28,9**	41,8**	15,5**	2,1 (10%)

F signifie le test de Fisher pour l'analyse de variance de l'effet des doses, des couches de sol et de l'interaction doses X couches.

\* : significatif à p=0,05

\*\* : significatif à p=0,01

**Tableau 4.13 : Teneur en zinc dans les sols après 25 ans d'application de lisiers de porcs selon les doses apportées et les couches de sol**

Couche de sol	Doses de lisiers	Fraction mobile	Labile	Liée à la MO	Dans oxydes	Total
		Acétate	Mehlich-3	Pyro	Oxalate	
-----mg Zn/kg-----						
<b>1</b> <b>0-10 cm</b>	<b>0</b>	0,088	0,827	2,009	2,365	42,244
	<b>30</b>	0,431	8,455	12,189	15,803	69,021
	<b>60</b>	0,697	12,612	17,155	23,167	76,650
	<b>90</b>	0,808	15,860	21,011	32,486	86,130
	<b>120</b>	0,897	16,404	20,641	38,259	84,116
<b>2</b> <b>10-20 cm</b>	<b>0</b>	0,079	0,526	1,669	1,608	39,098
	<b>30</b>	0,284	5,401	7,401	9,346	59,047
	<b>60</b>	0,156	1,954	4,457	5,018	46,348
	<b>90</b>	0,265	4,474	8,034	9,666	61,012
	<b>120</b>	0,317	5,440	8,824	11,575	60,628
<b>3</b> <b>20-30 cm</b>	<b>0</b>	0,060	0,450	1,584	1,497	41,106
	<b>30</b>	0,077	0,708	1,914	2,145	46,330
	<b>60</b>	0,068	0,548	1,870	1,873	41,386
	<b>90</b>	0,087	0,716	2,428	2,388	37,492
	<b>120</b>	0,100	1,032	2,547	3,193	41,881
<b>4</b> <b>30-40 cm</b>	<b>0</b>	0,056	0,448	1,275	1,525	54,053
	<b>30</b>	0,057	0,428	0,998	1,237	53,567
	<b>60</b>	0,041	0,402	1,243	1,376	44,366
	<b>90</b>	0,050	0,533	1,791	1,913	51,517
	<b>120</b>	0,051	0,418	1,176	1,461	51,589
<b>5</b> <b>40-50 cm</b>	<b>0</b>	0,075	0,511	0,951	1,493	59,325
	<b>30</b>	0,078	0,662	1,081	1,835	60,636
	<b>60</b>	0,062	0,442	0,772	1,368	45,656
	<b>90</b>	0,088	0,627	1,164	1,673	61,606
	<b>120</b>	0,082	0,601	0,940	1,632	55,072
<b>F doses</b>		63,1**	153,5 **	125,1 **	69,5 **	6,3 *
<b>F couches</b>		215,3 **	191,6 **	259,3 **	140,1 **	64,1 **
<b>F doses * couches</b>		57,9 **	123,9 **	83,4 **	46,7 **	7,7 **

F signifie le test de Fisher pour l'analyse de variance de l'effet des doses, des couches de sol et de l'interaction doses X couches.

\* : significatif à p=0,05

\*\* : significatif à p=0,01

- **Cuivre et zinc – fraction soluble et échangeable**

En ce qui concerne la fraction soluble et échangeable de cuivre (extrait à l'acétate), les doses de lisiers ont eu un effet très significatif sur les teneurs dans les couches 0-10 et 10-20 cm (Tableau 4.12). Cette méthode met en évidence les formes de cuivre sur le complexe d'échange cationique. La valeur maximale de 0,25 mg Cu/kg est obtenue avec la dose de 120 t/ha dans la couche 0-10 cm. Le seuil critique pour la fraction soluble et échangeable Cu-acétate est de 0,08 mg Cu/kg. Ce seuil est dépassé dans la couche 0-10 cm pour toutes les doses de lisiers et dans la couche 10-20 cm par la dose 120 t/ha. Plus en profondeur, des teneurs de 0,13 à 0,15 mg/kg sont mesurées sans lien avec les apports de lisiers. Le fait que le seuil critique soit dépassé en profondeur est surprenant. Il est possible que des aspects pédologiques soient en cause : zones d'accumulation, potentiel rédox ou autres. Une teneur plus élevée en cuivre total est d'ailleurs observée en profondeur dans ce sol. Rappelons que le critère de 0,08 mg Cu-acétate a été établi à partir de sa distribution dans la couche arable des 64 séries de sols (horizon Ap) (voir Tableau 2.2). Il est possible que plus en profondeur, dans les horizons B, les teneurs naturelles en cuivre échangeable soient plus élevées. Il faudrait vraisemblablement porter le critère du cuivre acétate à 0,15 mg/kg. Un milieu plus réducteur peut avoir un effet sur la solubilité des formes réduites du cuivre. Le rapport de la fraction soluble et échangeable Cu-acétate/Cu total varie avec les doses de lisiers de 0,72 % (témoin sans lisier) dans les parcelles à 1,04 % avec 120 t/ha dans la couche 0-10 cm.

Pour la fraction soluble et échangeable de zinc (extrait à l'acétate d'ammonium), la teneur dans la couche 0-10 cm s'accroît graduellement avec les doses de lisiers de 0,09 à 0,90 mg Zn/kg avec la dose de 120 t/ha (Tableau 4.13). Le facteur d'enrichissement comparativement au témoin sans lisier dans la même couche de sol est de 10. Ceci confirme l'observation faite antérieurement que les apports de lisiers accroissent proportionnellement plus rapidement la teneur des fractions mobiles que la teneur totale dans les sols. Le seuil critique à 99% pour Zn échangeable est de 0,18 mg Zn/kg (voir Tableau 2.4). À l'exception du témoin, toutes les doses de lisiers ont provoqué un accroissement du Zn échangeable supérieur au seuil critique. La mobilité du zinc est accrue très significativement par des apports prolongés de lisiers. Les formes échangeables mesurées à l'acétate d'ammonium ont bien révélé cet accroissement de mobilité par rapport à celle du fond géochimique de ces parcelles. Le fait que les parcelles avec une faible dose de lisiers de 30 t/ha excèdent le critère de 0,18 mg Zn/kg indique que ce seuil risque d'être très discriminant pour les sols provenant du secteur porcin. Pour les couches de sol supérieures à 30 cm, les apports de lisiers n'ont pas affecté les teneurs en zinc échangeable. Les apports de lisiers ont augmenté le rapport de la fraction soluble et échangeable Zn acétate/Zn total de 0,21 % dans la parcelle témoin à 1,07 % avec la dose de 120 t/ha dans la couche 0-10 cm. Le rapport moyen mesuré dans la couche arable des 64 séries de sols du Québec est de 0,03 %.

**Le test à l'acétate d'ammonium est capable de révéler le cuivre et le zinc échangeable des sols suite aux apports de lisiers. Les seuils proposés pour ces éléments semblent sévères.**

- **Cuivre et zinc liés à la matière organique**

Les teneurs en cuivre extrait au pyrophosphate (la fraction liée à la matière organique) dans la couche 0-10 cm des sols varient de 1,7 mg Cu/kg dans la parcelle témoin sans lisier à 8,0 mg Cu/kg avec la dose de 120 t/ha (Tableau 4.12). Le seuil critique pour le cuivre-pyrophosphate est de 10,2 mg/kg. Dans la couche 10-20 cm, la teneur s'accroît de 1,7 à 6,0 mg Cu/kg pour les mêmes doses. Plus en profondeur, l'effet des doses de lisiers n'est plus significatif. Le cuivre extrait au pyrophosphate met davantage en évidence la fraction liée à la matière organique des sols. Une partie importante du cuivre apporté se retrouve donc associé à la matière organique des sols. Le rapport de la fraction liée à la matière organique Cu-pyro/Cu total s'est accru de 18,4 % dans la parcelle témoin sans lisier à 38,1 % avec une dose de 120 t/ha dans la couche 0-10 cm. Le rapport moyen mesuré dans la couche arable des 64 séries de sols du Québec non contaminé est de 18,6 %. L'accroissement de ce rapport est révélateur d'une contamination de la matière organique des sols par le cuivre.

Pour le zinc extrait au pyrophosphate, la teneur dans la couche 0-10 cm de la fraction organique s'accroît de 2,0 mg/kg (témoin sans lisier) dans les parcelles à 20,6 mg/kg avec la dose de 120 t/ha de lisiers (Tableau 4.13). La teneur critique pour Zn-pyrophosphate est de 7,6 mg/kg. Dans la couche 10-20 cm, la teneur s'accroît de 1,7 mg/kg dans la parcelle témoin à 8,8 mg/kg. Plus en profondeur, les apports de lisiers n'ont pas affecté les teneurs en Zn-pyro. Une part importante du zinc apporté se retrouve donc associée à la matière organique des sols. Le rapport de la fraction liée à la matière organique Zn pyro/Zn total s'est accru de 4,8 % dans la parcelle témoin sans lisier à 24,5 % avec la dose de 120 t/ha de lisiers. Ce rapport moyen dans la couche arable des 64 séries de sols du Québec non contaminé est de 5,8 %. L'accroissement de ce rapport est révélateur d'une contamination de la matière organique des sols par le zinc provenant des lisiers.

**L'extraction au pyrophosphate s'est montrée capable de révéler les accumulations de cuivre et zinc de la fraction organique des sols suite à l'épandage des lisiers de porcs. Le test de validation de cette méthode dans des parcelles ayant reçu à long terme des doses de lisiers riches en cuivre et zinc s'est donc montré concluant. Les seuils proposés sont adéquats.**

- **Cuivre et zinc – fraction occlue dans les oxydes**

La teneur en cuivre extrait à l'oxalate (la fraction oxydée) dans la couche 0-10 cm est très affectée par les doses de lisiers appliquées. Elle s'accroît progressivement de 3,2 mg/kg dans la parcelle témoin sans lisier à 11,9 mg/kg avec la dose de 120 t/ha (Tableau 4.12). Le seuil critique pour la fraction oxydée Cu-oxalate est de 16,5 mg/kg. Dans la couche 10-20 cm, les teneurs s'accroissent de 2,8 mg/kg (témoin sans lisier) dans les parcelles à 8,8 mg/kg avec la dose de 120 t/ha de lisiers. Plus en profondeur, l'effet des doses de lisiers n'est pas significatif. Le rapport de la fraction oxydée Cu-oxalate/Cu total s'accroît progressivement de 33,6 % (témoin sans lisier) à 56,4 % dans les parcelles avec 120 t/ha de lisiers. Le rapport moyen mesuré dans la couche arable des 64 séries de sol est de 25,1 %. L'extraction du Cu à l'oxalate met en évidence la fraction accumulée dans les oxydes libres du sol. Cette fraction très abondante est nettement enrichie dans la couche arable des sols par les apports de cuivre

provenant des lisiers. La proportion du Cu-oxalate/Cu total s'accroît substantiellement suite aux apports prolongés de lisiers de porcs et ce rapport peut servir à mettre en évidence des accumulations de la fraction oxyde dans les sols.

La teneur en zinc occlu dans les oxydes extrait à l'oxalate dans la couche 0-10 cm est également très affectée par les doses de lisiers appliquées. Elle s'accroît progressivement de 2,4 mg/kg dans la parcelle témoin sans lisier à 38,3 mg/kg avec la dose de 120 t/ha (Tableau 4.13). Le seuil critique pour la fraction oxydée Zn oxalate est de 12,4 mg/kg. Dans la couche 10-20 cm, les teneurs s'accroissent de 1,6 mg/kg (témoin sans lisier) à 11,6 mg/kg dans les parcelles avec la dose de 120 t/ha de lisiers. Dans la couche 20-30 cm, un enrichissement est mesuré avec les doses de 90 et 120 t/ha. Plus en profondeur, l'effet des doses de lisiers n'est pas significatif. Le rapport de la fraction oxydée Zn-oxalate/Zn total s'accroît progressivement de 5,6 % (témoin sans lisier) à 45,5 % dans les parcelles avec 120 t/ha de lisiers. Le rapport moyen mesuré dans la couche arable des 64 séries de sol est de 8,0 %. L'extraction du Zn à l'oxalate met en évidence la fraction accumulée dans les oxydes libres du sol. Cette fraction est nettement enrichie dans la couche arable des sols par les apports de zinc provenant des lisiers. La proportion du Zn-oxalate/Zn total s'accroît substantiellement suite aux apports prolongés de lisiers de porcs et ce rapport peut servir d'indice pour mettre en évidence des accumulations dans les sols.

**L'extraction à l'oxalate d'ammonium s'est montrée capable de révéler les accumulations de cuivre et de zinc provenant des lisiers. De par son mode d'action, cette méthode révèle les accumulations sous formes d'oxydes libres des sols. Le test de validation de cette méthode dans des parcelles ayant reçu à long terme des doses de lisiers riches en cuivre et en zinc s'est donc montré concluant. Les critères proposés sont adéquats.**

- **Cuivre et zinc total**

La teneur en cuivre total dans la couche 0-10 cm est très affectée par les doses de lisiers appliquées. Elle s'accroît progressivement de 9,4 mg/kg (témoin sans lisier) à 21,0 mg/kg dans les parcelles avec la dose de 120 t/ha (Tableau 4.12). Dans la couche 10-20 cm, les teneurs s'accroissent de 8,1 mg/kg (témoin sans lisier) à 15,6 mg/kg dans les parcelles avec la dose de 120 t/ha de lisiers. Plus en profondeur, les apports de lisiers n'ont pas affecté la teneur en cuivre total des sols. La teneur moyenne en Cu total mesuré dans la couche arable des 64 séries de sol est de 19,2 mg/kg. Ce sol avait une teneur initialement très faible en cuivre total. Les apports de lisiers de 90 et 120 t/ha ont augmenté les teneurs en cuivre dans la couche de surface près des teneurs moyennes dans les sols du Québec. Même si les teneurs en cuivre total dans les parcelles avec les fortes doses de lisiers se situent près de la moyenne des sols du Québec, ces parcelles ont démontré une accumulation très substantielle des fractions mobiles et labiles. Ce fait illustre que des sols peuvent avoir la même teneur en cuivre total mais des niveaux de mobilité et de contamination des différentes fractions des sols très différents. L'analyse des ÉTM totaux ne rend pas compte des aspects de mobilité, bien que la charge totale soit affectée par les apports de lisiers.



La teneur en zinc total dans la couche 0-10 cm est également très affectée par les doses de lisiers appliquées. Elle s'accroît progressivement de 42,2 mg/kg (témoin sans lisier) à 84,1 mg/kg dans les parcelles avec la dose de 120 t/ha (Tableau 4.13). Dans la couche 10-20 cm, les teneurs s'accroissent de 39,1 mg/kg (témoin sans lisier) à 60,6 mg/kg dans les parcelles avec lisiers. À partir de 30 cm aucun enrichissement n'est mesuré et l'effet des doses de lisiers n'est pas significatif. La teneur moyenne du zinc total mesuré dans la couche arable des 64 séries de sols du Québec est de 62,8 mg/kg. Ce sol était initialement plus faible que la moyenne et les apports de lisiers l'ont enrichi au-delà de la teneur moyenne. Le Zn total dans les sols est en relation avec les quantités totales appliquées par les lisiers mais pas avec la mobilité.

#### *4.2.2.3 Validation de la procédure analytique (troisième étape)*

À la troisième étape de la procédure, il est prévu d'établir si les teneurs en cuivre et zinc des différentes fractions du sol atteignent des niveaux pour lesquels des risques écotoxicologiques ou des dysfonctionnements enzymatiques sont probables, c'est-à-dire si ces niveaux sont associés à une biodisponibilité de ces ÉTM. Pour tous les ÉTM, les niveaux des sols de cette étude sont bien inférieurs aux critères du PPSRTC du MDDEP pour les milieux contaminés à l'exception de celui du site résidentiel pour lequel les concentrations en cuivre sont nettement supérieures au critère d'usage pour le milieu industriel.

##### *4.2.2.3.1 Application de l'approche avec les tests de toxicité au sol lisier 25 ans et à un sol industriel*

À l'image de la méthode chimique, la validité de la procédure analytique proposée pour l'évaluation de la biodisponibilité à l'aide des tests de toxicité, a été appliquée à une expérience de longue durée d'épandage de lisiers de porcs (sol lisier 25 ans) ainsi qu'à un sol prélevé sur un site ayant reçu pendant plus de cinquante ans des apports de contaminants inorganiques (principalement le cuivre) d'origine industriel (sol industriel).

Le sol industriel est un loam sableux dont la granulométrie est de 66% sable, 25% limon et 9% argile. Le pH de ce sol est de 7,9 et la proportion de matière organique est de 2,7%. Le Tableau 4.14 présente les concentrations de cuivre totales et les différentes fractions pour le sol industriel, le sol lisier 25 ans et le sol témoin du sol lisier 25 ans.

**Tableau 4.14 : Concentration en métaux totaux et labiles (Mehlich-3) des sols sans et avec amendement**

Sol	Concentration ÉTM									
	TOTAUX					Fraction labile				
	Zinc	Nickel	Cadmium	Chrome	Plomb	Zinc	Nickel	Cadmium	Chrome	Plomb
	(mg ÉTM/kg de sol sec)									
Lisier 25 ans	70,7 (± 0,9)	20,3 (± 0, 2)	0,29 (± 0,02)	22,9 (± 0,2)	13,3 (± 0,2)	7,68 (± 0,28)	0,35 (± 0,01)	0,06 (± 0,00)	0,22 (± 0,00)	1,87 (± 0,04)
Lisier 25 ans (témoin)	48,4 (± 1,7)	21,2 (± 0,6)	0,30 (± 0,01)	22,9 (± 0,2)	13,3 (± 0,2)	1,93 (± 0,06)	0,28 (± 0,01)	0,05 (± 0,00)	0,22 (± 0,01)	1,75 (± 0,05)
Industriel	224 (± 11)	26,1 (± 0,9)	2,6 (± 0,1)	20,1 (± 0,3)	242 (± 5)	25,7 (± 0,4)	0,91 (± 0,01)	0,78 (± 0,02)	0,15 (± 0,02)	23,3 (± 0,1)

En accord avec les conclusions déjà présentées dans les sections précédentes, l'apport de lisier n'a pas augmenté de façon significative les concentrations des métaux analysés (Tableau 4.14) à l'exception du zinc. Tel qu'attendu, l'apport significatif du zinc par le lisier résulte en une augmentation de la disponibilité de ce métal dans la fraction labile. Le sol industriel se caractérise quant à lui par des concentrations élevées en zinc et en plomb. Les concentrations de ces métaux dans la fraction labile représentent entre 9,6% et 11,5% des concentrations totales.

Le Tableau 4.15 présente les concentrations de cuivre mesurées dans les différentes fractions analysées. À l'image des autres métaux analysés, l'apport de lisier sur une période de 25 ans n'a pas eu d'impact sur la concentration totale de cuivre. Par contre, le cuivre est mobilisé principalement dans les fractions associées aux oxydes et liées à la matière organique. Par ailleurs, aux concentrations élevées de cuivre observées dans le sol industriel est associée une mobilisation significative de ce métal dans la fraction liée aux oxydes soit près de 50% de la concentration totale. Plus de 82% du cuivre contenu dans le sol industriel est sous une forme potentiellement disponible.

**Tableau 4.15 : Concentration en cuivre total et des différentes fractions des sols lisier 25 ans et industriel**

Sol	Concentration en cuivre				
	Totaux	Fraction labile	Fraction mobile	Fraction dans les oxydes	Fraction liée à M.O.
	mg Cu/kg de sol sec				
Lisier 25 ans (témoin)	13,4 ± 4,2	1,51 ± 0,06	0,11 ± 0,00	3,12 ± 0,29	2,23 ± 0,14
Lisier 25 ans	16,2 ± 0,6	4,15 ± 0,07	0,16 ± 0,01	7,88 ± 0,26	5,51 ± 0,26
Industriel	2965 ± 77	531 ± 2	66 ± 1	1442 ± 60	408 ± 25

- **Tests de toxicité avec le ver de terre**

Le Tableau 4.16 suivant présente les résultats des tests de toxicité réalisés avec le ver *Eisenia andrei* sur le sol ayant reçu des apports de lisier sur une période de 25 ans et sur le sol industriel. À la lumière des résultats obtenus lors des essais en laboratoire, le sol amendé en lisier 25 ans du lisier de porcs ne présente pas d'effet sur la survie du ver de terre. Au contraire, ce dernier semble le préférer par rapport au sol de référence utilisé pour les essais. La reproduction de ce ver est même favorisée par la présence de lisier par le nombre de cocons produits et par le nombre de juvéniles observé bien que le poids de ces derniers soit significativement affecté.

Par ailleurs, la survie sur 14 jours du ver de terre ne semble pas affectée par la présence de fortes concentrations en ÉTM (principalement en cuivre) dans le sol industriel bien que ce sol ait un impact très significatif sur sa reproduction et sur son comportement.

**Tableau 4.16 : Résultats obtenus pour les tests de létalité, d'évitement et de reproduction avec le ver de terre *Eisenia andrei* pour le loam lisier 25 ans et le sol industriel**

SOL	Létalité	Évitement	Reproduction			
			nombre de cocons	nombre de juvéniles	Poids humide	Poids sec
			%Effet*			
Loam 25 ans	Sans effet	-41 (0,004)	-30 (0,026)	-7,6 (0,335)	36 (0,012)	42 (0,009)
Sol industriel	Sans effet	100	Sans effet	99	98	98

\* Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'effet. La valeur entre ( ) représente le test de t (p=).

- : indique un effet positif

- **Tests de toxicité avec l'orge**

Le Tableau 4.17 présente les résultats des tests sur la germination et la croissance de l'orge. Les deux sols étudiés n'ont eu aucun effet négatif sur la germination et la croissance de l'orge.

**Tableau 4.17 : Résultats des tests sur la germination et la croissance de l'orge (*Hordeum vulgare*) sur 14 jours pour les sols loam lisier 25 ans et industriel**

SOL	Temps (jours)	CE <sub>50</sub> germ.	CI <sub>50</sub> Tige	CI <sub>50</sub> Racines	CI <sub>50</sub> pds hum	CI <sub>50</sub> pds sec
Loam 25 ans	14	0	-7 (0,578)	-4 (0,529)	-22 (0,118)	-6 (0,678)
Sol industriel	14	0	-32 (< 0,01)	-30 (0,004)	-47 (< 0,01)	-34 (0,012)

\* Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'effet. La valeur entre ( ) représente le test de t (p=).

- : indique un effet positif

- **Tests de toxicité avec la daphnie**

Tel que le présente le Tableau 4.18, 100 % des daphnies mises en présence d'un lixiviat du sol industriel n'ont pas survécu alors que le lixiviat du sol lisier 25 ans n'a eu qu'un effet très limité sur la survie de ce même organisme.

**Tableau 4.18 : Résultats des tests de létalité sur la daphnie (*Daphnia magna*)**

Sol	Létalité 48 h
	% effet*
Loam 25 ans	6 (0-20)
Sol industriel	100

\* Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'effet. La valeur entre ( ) représente le minimum et le maximum d'effet mesurés sur 5 échantillons.

#### 4.2.2.3.2 Application de l'approche avec les tests enzymatiques sur le loam amendé en lisier 25 ans

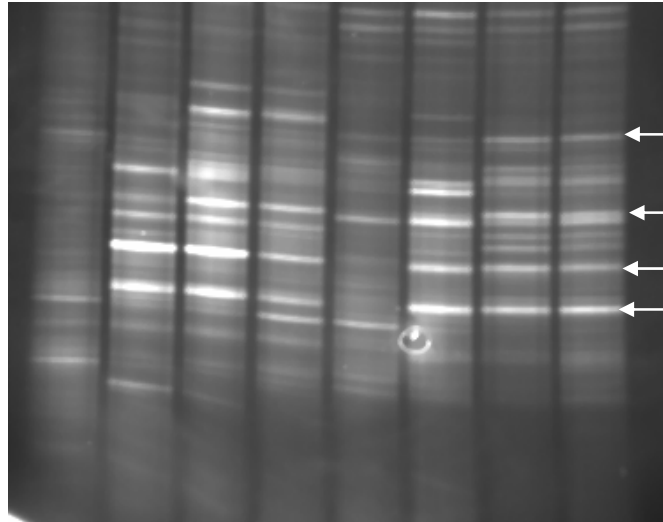
Les tests enzymatiques ont été réalisés uniquement sur le loam ayant reçu des apports en lisier sur une période de 25 ans. Le Tableau 4.19 présente les valeurs de RSSI uniquement pour quatre enzymes dont un représentant de chaque cycle biogéochimique.

**Tableau 4.19 : *Relative Soil Stability Index* (RSSI) de l'activité enzymatique du loam amendé en lisier de porcs (25 ans) pour la perturbation par dessiccation à 60°C.**

Enzyme	Sol non contaminé	Sol amendé 25 ans
	RSSI (%)	
Phosphatase acide	43,3 ± 0,8	40,9 ± 1,2
Arylsulfatase	37,5 ± 4,1	<b>48,2 ± 4,9</b>
Protéase	145,1 ± 6,2	<b>53,3 ± 11,4</b>
β-glucosidase	56,4 ± 2,5	58,1 ± 0,5

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écarts-types. Ces derniers sont calculés pour n=3.

Des différences notables entre les valeurs de RSSI des loams non-contaminé et amendé en lisier de porcs 25 ans ont été observées (voir Tableau 4.19). Deux des quatre enzymes étudiées sont affectées par les apports de lisier. Un impact important sur la stabilité fonctionnelle de la protéase a été noté. En effet, une valeur de RSSI de 53,3 % a été obtenue comparativement à celle du loam non-contaminé qui est de 145,1 %. À l'opposé, une augmentation de la stabilité fonctionnelle de l'arylsulfatase a été observée (passant de 37,5 % à 48,2 %) pour le loam amendé en lisiers 25 ans. Ces résultats suggèrent que l'apport de lisier de porcs sur une période de 25 ans produit un impact se traduisant par une perturbation des cycles biogéochimiques notamment ceux de l'azote et du soufre au loam étudié.



**Figure 4.4 : Profils DGGE comparant les communautés des loams non-contaminé et contaminé au lisier de porcs (25 ans), perturbé par dessiccation à 60°C.**

*Lignes 1* : Jour 1 du sol non contaminé avant perturbation. *Ligne 2* : Jour 2 du sol non contaminé juste après la perturbation. *Ligne 3* : Jour 4 du sol non contaminé. *Ligne 4* : Jour 15 du sol non contaminé. *Ligne 5* : Jour 1 du sol amendé avant perturbation. *Ligne 6* : Jour 2 du sol amendé juste après perturbation. *Ligne 7* : Jour 4 du sol amendé. *Ligne 8* : Jour 15 du sol amendé.

La Figure 2.1 présente le profil de diversité microbienne des loams non-contaminé et amendé en lisiers 25 ans. La biodiversité initiale du sol non-contaminé semble légèrement supérieure au sol traité aux lisiers de porcs. Toutefois, leur évolution suite à la perturbation est similaire. Plusieurs bandes dominantes vont se retrouver à la fois dans le sol propre et le sol traité aux lisiers de porcs (indiqué par des flèches blanches). Ces bandes correspondent probablement aux organismes r-stratégistes (croissance rapide) qui réagissent à la diminution de la densité microbienne pour stabiliser les fonctions microbiennes.

En comparant ces résultats avec ceux des analyses chimiques, une corrélation des résultats des analyses chimiques avec les effets toxiques observés au niveau trophique microbien ne peut être établie. Tout d'abord, les teneurs en cuivre de la fraction mobile (Tableau 4.15) ne permettent pas d'établir une corrélation entre les valeurs mesurées et l'effet toxique observé pour l'impact de la stabilité de la protéase. Malgré la faible mobilité du cuivre observée pour le loam amendé en lisiers 25 ans (0,16 Cu mg/kg comparativement au seuil établi qui est 0,08 Cu mg/kg), cette teneur en Cu ne semble pas être responsable des effets toxiques puisqu'une faible mobilité du cuivre (0,11 Cu mg/kg) fût également notée pour loam témoin. Pour ce qui est de la concentration des autres métaux présents dans le loam amendé en lisiers 25 ans, seul le Zn dépasse le percentile 99 % (>5,8 mg Zn/kg) dans la fraction labile. Or, les teneurs en Zn pourraient être responsables de cet impact observé pour la protéase. Des analyses chimiques plus approfondies de ce métal permettraient probablement de mettre en lumière ces résultats et d'établir des liens entre la mobilité, la biodisponibilité et les résultats enzymatiques.

## CONCLUSION - MÉTHODE D'ÉVALUATION DE LA MOBILITÉ ET DE LA BIODISPONIBILITÉ DES ÉTM D'UN SOL

La procédure de suivi de mobilité des ÉTM comporte trois étapes. La **première étape** consiste à déterminer la fraction labile avec la méthode Mehlich-3. Cette méthode s'est montrée plus sensible aux apports de métaux que la détermination de la teneur totale dans les sols. Des sols peuvent avoir une même teneur totale en ÉTM, mais une fraction labile très différente. De plus, les apports de matières fertilisantes ont comme effet d'accroître proportionnellement plus rapidement la fraction labile que la teneur totale dans les sols. Des critères ont été établis pour identifier les sols présentant une accumulation marquée d'ÉTM labiles d'origine anthropique. Cette méthode ne permet cependant pas de déterminer à elle seule si le sol exerce un contrôle adéquat de la mobilité des ÉTM. En effet, de nombreux facteurs chimiques, physico-chimiques et pédologiques peuvent affecter la mobilité des ÉTM dans les sols.

En **deuxième étape**, il est nécessaire de mesurer les paramètres des sols impliqués dans la mobilité des métaux et de compléter l'analyse des ÉTM en caractérisant différentes fractions des sols. Les fractions les plus importantes à caractériser sont la fraction organique, la fraction des oxydes libres et la fraction mobile (échangeable et soluble). Cette caractérisation devrait se faire également dans les couches inférieures du profil de sol ou sur un sol témoin de même nature pédologique afin de connaître les teneurs naturelles dans le sol et de mieux apprécier l'impact des apports sur la mobilité des ÉTM. Des critères ont été établis pour ces différentes fractions en se basant sur leur distribution percentile dans les sols.

Les sols présentant une accumulation marquée des ÉTM dans la fraction mobile, organique ou celle des oxydes libres devraient faire l'objet d'un suivi plus poussé par des tests toxicologiques ou enzymatiques en **troisième étape**. Dans cette étude, les liens entre la mobilité des ÉTM, mesurée par des tests chimiques et la biodisponibilité évaluée par des tests de toxicité ou enzymatiques n'ont été fait que pour le cuivre sur un nombre restreint de sols contaminés. Les résultats montrent des relations plus ou moins étroites entre la mobilité mesurée via des tests chimiques et la biodisponibilité estimée à l'aide des tests biologiques. Ces résultats ne sont pas surprenants. En effet, la biodisponibilité peut être définie comme étant la fraction du contaminant qui sera absorbée à l'intérieur de l'organisme et qui peut entraîner une réponse toxique (Hrudey *et al.*; 1996). De façon similaire, on peut aussi la définir comme la fraction de l'exposition totale au contaminant (eau, nourriture etc.) qui est disponible pour être absorbée (McKim, 1994). Ces définitions impliquent que la réponse biologique suite à une exposition à un contaminant soit à la fois dépendante de la présence du contaminant dans le milieu et de la capacité de l'organisme à l'intégrer à son métabolisme (Davies *et al.*, 1999). Par conséquent, la mesure de la biodisponibilité des contaminants dans le sol ou dans une matrice complexe telle que des matières résiduelles sera donc non seulement conditionnée par les interactions entre les contaminants et les différentes composantes du sol, mais aussi en bonne partie par la combinaison des voies de contamination et la sensibilité des récepteurs écologiques. Par conséquent, il est important de combiner plusieurs tests de toxicité sous forme d'une batterie de tests afin de représenter plusieurs niveaux trophiques et de prendre en considération les différences de sensibilité des différents organismes. L'utilisation des tests de toxicité en concomitance avec les analyses

chimiques procure beaucoup plus d'informations sur l'impact des contaminants sur le biote à condition que les tests de toxicité utilisés soient représentatifs des différentes voies d'exposition.

La mesure de la stabilité enzymatique s'est avérée quant à elle un outil assez sensible pouvant faire ressortir des effets toxiques au niveau trophique microbien du sol. Le principe de la méthode est basé sur le besoin d'un écosystème en santé de réagir suite à une perturbation pour continuer à effectuer ses tâches essentielles. Les enzymes effectuant les tâches de transformer les nutriments organiques en nutriments inorganiques et assimilables par les niveaux trophiques supérieurs, sont essentiels à l'écosystème terrestre. La capacité de ceux-ci à résister et récupérer d'une perturbation devient une mesure de l'état de santé du sol.

La méthode RSSI développée pour quantifier la stabilité enzymatique du sol a permis de différencier les sols propres des sols contaminés, puis elle a permis d'identifier des troubles potentiels d'ajouts de matière exogène contenant des ÉTM sur des sols sains. Ceci a été confirmé par l'étude de la stabilité enzymatique d'un sol traité depuis 25 ans par l'ajout de fertilisant sous forme de lisier contenant des ÉTM.

Les mécanismes régissant la résistance et la récupération de l'activité enzymatique dans un sol ayant subi un stress climatique sont encore peu compris. Ceci limite l'interprétation de certains résultats. Toutefois, c'est en continuant à tester différents sols que la méthode se raffinerait et permettrait d'identifier plus clairement les problèmes potentiels reliés à la perte ou à l'augmentation de la stabilité des fonctions enzymatiques. Jusqu'à présent, la combinaison de cette méthode avec l'étude de la biodiversité microbienne semble bien compléter les tests de toxicité standards testant les niveaux trophiques supérieurs.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allen, H.E., Impellitteri, C.A. and J.K. Saxe. (2001). Ecological risk assessment of heavy metals in soil : Prediction of heavy metal pore water concentrations and bioavailability of copper and zinc in soil. Final report. International Copper Association and International Lead Zinc Research Organization. University of Delaware. Newark, DE. 114 pages.
- APHA, AWWA et WEF, Eds. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, Publication office, APHA, Washington. ASTM. 1994. Standard practice for conducting early seedling growth tests. ASTM Designation E 1598-94. American Society for Testing and Materials. 7 pages.
- ASA (1965). Citrate-EDTA extraction dans Methods of soil analysis. Part 2. American Society of Agronomy. Number 9 Pages 1088-1089.
- ASTM (1988). Test method for organic matter content. Designation D 2974. Philadelphia, Pa.
- ASTM (1989). Standard test method for pH in soil. Designation D 4972. Philadelphia, Pa.
- ASTM (1990). Test method for particles-size analysis of soil. Designation D 422. Philadelphia, Pa.
- ASTM. 1997a. Standard guide for conducting *Daphnia magna* life-cycle toxicity tests. ASTM Designation E 1193-97. American Society for Testing and Materials. 18 pages.
- ASTM. 1997b. Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida*. ASTM Designation E 1676-97. American Society for Testing and Materials. 19 pages.
- ASTM. 1998. Standard practice for algal growth potential testing with *Selenastrum capricornutum*. ASTM Designation D 3978-80 (reapproved 1998). American Society for Testing and Materials. 5 pages.
- Baccouch, S., Chaoui, A. and E. El Ferjani. 1998. Nickel toxicity : effects on growth and metabolism of maize. *Journal of Plant Nutrition*. **21** : 577-588.
- Balasoïu, C.F., G.J. Zagury et L. Deschênes (2001). Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CAA-contaminated soils : influence of soil composition. *The Science of the Total Environ*. **280**:239-255.
- Bastien, C. et L. Martel. 1995. Sélection des tests de toxicité en milieu aquatique applicables aux sédiments contaminés. Développement d'outils et d'essais pour l'évaluation de la toxicité des sédiments. Projet de coopération Franco-Québécoise. Québec. 50 pages.
- Beddel, J.P. 2003. Communication personnelle. ENTPE. Lyon, France.

- Belotti, E. 1998. Assessment of a soil quality criterion by means of a field survey. *Applied Soil Ecology* **10**(1-2): 51-63.
- Bierkens, J, Klein, G., Corbisier, P., Van Den Heuvel, R. Verschaeve, L., Weltens, R. and G. Schoeters. 1998. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere* **37**(14-15): 2935-2947.
- Black, C.A. 1965. Methods of soil analysis: Chemical and microbiological properties. Agronomy 9. Am. Soc. of Argon. Madison Wisc.
- Brohon, B., Delolme, C. et R. Gourdon. 2001. Complementarity of bioassays and microbial activity measurments for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology & Biochemistry* **33**: (883-891).
- Bureau de Normalisation du Québec, 1987. Eaux - Détermination de la toxicité - Méthode avec la bactérie bioluminescente *Photobacterium phosphoreum*. Norme nationale du Canada, NQ 3600-205. <http://www.bnq.qc.ca/fr/publications.html>.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. 2003a. Détermination de la toxicité : Inhibition de la croissance chez l'algue *Selenastrum capricornutum*. MA. 500 – S.cap. 2.0. Ministère de l'environnement du Québec. 28 pages.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. 2003b. Détermination de la toxicité létale CL<sub>50</sub> 48h *Daphnia magna*. MA. 500 – D.mag. 1.0. Ministère de l'environnement du Québec. 25 pages.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. 2003c. Détermination de la toxicité létale chez le ver de terre (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*). MA. 500 – VTL 1.0. Ministère de l'environnement du Québec. 25 pages.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. 2003d. Détermination des métaux : méthode par spectrométrie de masse à source ionisante au plasma d'argon. MA. 200 – Mét. 1.1. Ministère de l'environnement du Québec. 37 pages.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. 2003e. Détermination des métaux assimilables : méthode par spectrométrie de masse à source ionisante au plasma d'argon. MA. 200 – Mét. ass. 1.0. Ministère de l'environnement du Québec. 16 pages.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. 2003f. Détermination des métaux dans l'eau et des métaux traces en conditions propres dans l'eau naturelle : méthode par spectrométrie au plasma d'argon. MA. 203 – Mét. 3.1. Ministère de l'environnement du Québec. 31 pages.

- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. 2003g. Inhibition de la germination et de la croissance chez les semences de végétaux. MA. 500 – GCR 1.0. Ministère de l'environnement du Québec. 28 pages.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. 2003h. Protocole de lixiviation applicable aux tests biologiques. MA. 500 – Lix. 1.0. Ministère de l'environnement du Québec. 21 pages.
- Choromanska, U. et T. H. DeLuca. 2002. Microbial activity and nitrogen mineralization in forest mineral soils following heating: evaluation of post-fire effects. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: (263-271).
- Côté, D. 2003. Communication personnelle.
- Côté, D. et S. Seydoux. 2003. Réflexions sur la stratification du lisier de porcs dans les fosses durant les chantiers d'épandage. 17<sup>e</sup> congrès de l'Association québécoise de spécialistes en sciences des sols. (AQSSS). Le sol et la biodiversité. 9 et 11 juin 2003. Université de Sherbrooke.
- Davies, N.A., Edwards, P.A., Lawrence, M.A.M., Taylor, M.G. and K. Simkiss. 1999. Influence of particle surfaces on the bioavailability to different species of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol. *Environmental Science and Technology*. **33** : 2465-2468.
- de Amarante, O. P., Brito, N. M., dos Santos, T. C. R. et G. S Nunes. 2003. Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis. *Talanta* **60**: (115-121).
- Debus, R. and K. Hund. 1997. Development of analytical methods for assessment of ecotoxicological relevant soil contamination. *Chemosphere*. **35**(1/2) : 239-261
- Degens, B. P., Schipper, L. A., Sparling, G. P. et L. C. Duncan. 2001. Is the microbial community in a soil with reduces catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry* **33**: (1143-1153).
- Dell'anno, A., Fabioano, M., Duineveld, C. A., Kok, A. et R. Danovaro. 1998. Nucleic acids (DNA, RNA) quantification and RNA/DNA ratio determination in marine sediments: comparison, spectrophotometric, fluorometric, and high-performance liquid chromatography methods and estimation of detrital DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(9): (3238-3245).
- Edwards, C.A. and P.J. Bohlen. 1996. *The Biology and Ecology of Earthworms*. 3<sup>rd</sup> edition. Chapman and Hall. London.
- Environnement Canada (EC 1997a). Méthode d'essai biologique : Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*. SPE 1/RM/25. Section de l'élaboration des méthodes et des applications. Centre de technologie environnementale. Édition révisée. 1997. 30 pages.

- Environnement Canada (EC 1997b). Méthode d'essai biologique : Essai de reproduction et de survie sur le cladocère *Ceriodaphnia dubia*. SPE 1/RM/21. Section de l'élaboration des méthodes et des applications. Centre de technologie environnementale. Édition révisée. 1997. 48 pages.
- Environnement Canada (EC 2000). Méthode d'essai biologique : Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë chez *Daphnia magna*. SPE 1/RM/14. Section de l'élaboration des méthodes et des applications. Centre de technologie environnementale. 2000. 23 pages.
- Environment Canada (EC 2002a). Tests for measuring emergence and growth of terrestrial plants exposed to contaminants in soil. Environmental protection series. Biological test methods. Draft, may 2002. 144 pages.
- Environment Canada (EC 2002b). Tests for toxicity of soil to earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*). Environmental protection series. Biological test methods. Draft, december 2002. 144 pages.
- Environmental Protection Agency (EPA 1986) EPA SW-846. Methods 3050
- Environmental Protection Agency (EPA 1988). Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. EPA/600/3-88/029. Environmental Research laboratory. Corvallis. OR, USA. 102 pages. 1988.
- Environmental Protection Agency (EPA 1994a). 10-day chronic toxicity test using *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. Environmental Protection Agency. 2028. 5 p. 1994.
- Environmental Protection Agency (EPA 1994b). 48-hour acute toxicity test using *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. Environmental Protection Agency. 2024. 4 pages. 1994.
- Environmental Protection Agency (EPA 1994c). 7-day static renewal toxicity test using *Ceriodaphnia dubia*. Environmental Protection Agency. 2025. 6 pages. 1994.
- Environmental Protection Agency (EPA 1994d). 96-hour static toxicity test using *Selenastrum capricornutum*. Environmental Protection Agency. 2027. 5 pages. 1994.
- Fairbrother, A. Glazebrook, P.W., Van Staaln, N. and J.V. Tarazona. 1999. Summary of the SETAC workshop on Tests methods for hazard determination of metals and sparingly soluble metal compounds in soils. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. SETAC press. Pensacola. FL, USA. 23 pages.
- Giroux, M. 2003. Communication personnelle. IRDA. Sainte-Foy, Québec.
- Giroux, M., M. Rompré, D. Carrier, P. Audesse et M. Lemieux. 1992. Caractérisation de la teneur en métaux lourds totaux et disponibles des sols du Québec. *Agrosol*. 9 (2) : 46-55.

- Gladys, L. S., Kuperman, R.G., Linder, G.L. et Visser I. (2002) Toxicity tests for assessing contaminated soils and ground water. In: *Environmental Analysis of Contaminated Sites*. G.I. Sunahara, A.Y. Renoux, C. Thellen, C.I. Gaudet et A. Pilon. John Wiley & Sons. p.p. 25-45
- Greene, J.C., Bartels, C.L., Warren-Hicks, W.J., Parkhurst, B.R., Linder, G.L., Peterson, S.A. and W.E. Miller. 1989. Protocol for short term toxicity screening of hazardous waste sites. EPA/600/3-88/029. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Laboratory. Corvallis, OR, USA.
- Griffiths, B. S., Bonkowski, M., Roy, J. et K. Ritz. 2001. Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil Ecology* **16**: (49-61).
- Gupta, S.K., M.K. Vollmer et R. Krebs. (1996). The importance of mobile, labile and pseudo total heavy metal fractions in soil for three-level risk assessment and risk management. *The science of the total environment*. **178**:11-20.
- Herrick, J. E. et M. M. Wander. 1998. Relationships between soil organic carbon and soil quality in cropped and rangeland soils: the importance of distribution, composition and soil biological activity. *Soil processes and the carbon cycle*. Lal, R., Kimble, J. M., Follett, R. F. et Stewart, B. A. Boca Raton, Florida, US, CRC Press: 405-425.
- Hrudey, S.E., Chen, W. and C.G. Rousseaux. 1996. Bioavailability in environmental risk assessment. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. pp. 7-8.
- ISO, 1993. Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) – Partie 1 : Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel. Organisation internationale de normalisation, Norme internationale ISO 11268-1.
- ISO. 1998a. Qualité de l'eau – Détermination l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Essai de toxicité aiguë. Organisation internationale de normalisation. Norme internationale ISO 6341.
- ISO. 1998b. Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) – Partie 2 : Détermination des effets sur la reproduction. Organisation internationale de normalisation. Norme internationale ISO 11268-2.
- ISO. 1999. Qualité du sol – Inhibition de la reproduction de *Collembola (Folsomia candida)* par des polluants du sol. Organisation internationale de normalisation. Norme internationale ISO 11267.
- ISO. 2000. Qualité de l'eau – Détermination de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*). Organisation internationale de normalisation. Norme internationale ISO 10706.
- Kandeler, E. 1996. Protease activity. *Methods in soil biology*. Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E. et Margesin, R. Berlin, Springer: 165-168.

- Kandeler, E. 1996. Urease activity by colorimetric technique. methods in soil biology. Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E. et Margesin, R. Berlin, Springer: 171-174.
- Kandeler, E., Tscherko, D., Bruce, K.D., Stemmer, M., Hobbs, P.J., Bardgett, R.D. and Amelung, W., 2000. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biology and Fertility of Soils* **32**: 390-400. Kandeler, E., Kampicher, C. et O. Horak. 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biol. Fertil. Soils* **23**: (299-306).
- Keddy, C.J., Greene, J.C. and M.A. Bonnell. 1995. Review of whole-organism bioassays : Soil, freshwater sediment and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **30** : 221-251.
- Keeney, D.R. et R.E. Wildung. Chimical properties of soils. Dans Soil for management of organic wastes and waste waters. Cp.4. Pub. Soil Soc. of Am. Madison Wisc.
- Kelsey, JW, et Alexander, M. (1997) Declining bioavaibility and innopropriate estimation of risk of persistent coumpounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 582-585.
- Khangarot, B.S., Ray, P.K., and H. Chandra. 1987. Daphnia magna as a model to assess heavy metal toxicity: Comparative assessment with mouse system. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **15**(4):427-432 .
- Kingery, W. L., C.W. Wood, D.P. Delanay, J.C. Williams et G.L. Mullins. 1994. Impact of long-term land application of broiler litter on environmentally related soil properties. *J. Environ. Qual.* **23**:139-147.
- Kula, H. and O. Larink. 1997. Development and standardization of test methods for prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. *Soil Biology and Biochemisty.* **29**(3/4) : 635-639.
- Laliberté, P. 2002. Test d'évitement avec le ver *Eisenia feotida* : Essais préliminaires. Rapport de stage. CEAEQ. Ministère de l'Environnement. Québec. 12 pages.
- Laskowski, R., Kramarz, P. and P. Jepson. 1988. Selection of species for soil ecotoxicology testing. In : Lokke, H., Van Gestel, G.M.A. (eds). Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and sons. Chichester. pp. 21-40.
- Leca, B., Noguier, T. et J.-L. Marty. 2000. Enzymes inhibitors. Biosensors for ENvironmental Monitoring. Australia; Canada, Harwood Academic Publishers: 76-87.
- Leiros, M. C., Trasar-Cepeda, C., Garcia-Fernandez, F. et F. Gil-Sotres. 1999. Defining the validity of a biochemical index of soil quality. *Biology and Fertility of Soils* **30**: (140-146).

- Lensi, R., Lescure, C., Steinberg, C., Savoie, J.-M. et G. Faurie, 1991. Dynamics of residual enzyme activities denitrification potential, and physico-chemical properties in a gamma-sterilized soil. *SOil Biology and Biochemistry* **23**(4): (367-373).
- Liang, J. et R.E. Karamanos. 1993. DTPA\_Extractable Fe, Mn, Cu and Zn. Dans Soil sampling and methods of analysis. Carter, M. R. ed. Can. Soc. of Soil Sci. Lewis Pub. pp. 87-90.
- Lock, K. and C.R. Janssen. 2001. Effect of clay and organic matter type on the ecotoxicity of zinc and cadmium to the potworm *Enchytraeus albidus*. *Chemosphere*. **44**: 1669-1672.
- Lock, K. and C.R. Janssen. 2003. Influence of aging on copper bioavailability in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **22**(5) : 1162-1166.
- Manz, M., Weissflog, L., Kühne R. and G. Shüürmann. 1999. Ecotoxicological hazard and risk assessment of heavy metal contents in agricultural soils of central Germany. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **42**(2): 191-201.
- Marzadori, C., Ciavatta, C., Montecchio, C. and Gessa, C., 1996. Effects of lead pollution on different soil enzyme activities. *Biology and Fertility of Soils* **22**: 53-58.
- Matheson VG, Mumakata-Marr J, Hopkins GD, McCarty PL, Tiedje JM et Forney LJ (1997) A novel means to develop strain-specific DNA probes for detecting bacteria in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2863-2869.
- Margesin, R. 1996. Acid and alkaline phosphomonoesterase activity with the substrate p-nitrophenyl phosphate. *Methods in soil biology*. Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E. et Margesin, R. Berlin, Springer: 213-217.
- Margesin, R., Walder, G. et F. Schinner. 2000. The impact of hydrocarbon remediation (Diesel Oil and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnol* **20**: (313-333).
- Martens, D. A. et J. M. Bremner, 1993. Influence of herbicides on transformations of Urea nitrogen in soil. *Journal of Environmental Science and Health* **B28**(4): (377-395).
- Mathiot, A. 1996. Mise au point d'un test de toxicité utilisant la réaction du ver de terre *Eisenia fetida* face aux hydrocarbures : le test d'évitement. Rapport de stage. Laboratoire de biologie et toxicité. Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec. 33 pages.
- McKeague, J. A. 1977. Manuel de méthodes d'échantillonnage et d'analyse des sols. Soil Research Institute, Ottawa. 223 pages.
- McKim, J.M.. 1994. Physiological and biochemical mechanisms that regulate the accumulation and toxicity of environmental chemicals in fish. In : Hamelink, J.L., P.F. Landrum, H.L Bergman and W.H. Benson, 1994. Bioavaibility : physical, chemical,

- and biological interactions. A special publication of the Setac. Lewis Publishers. pp. 179-201.
- Mclean J.E. et B.E. Bledsoe. 1992. Behavior of metals in soils. EPA Groundwater issue. EPA/540/S-92/018. Washington DC.
- Mehlich, A. 1984. Mehlich-3 soil test extractant; A modification of Mehlich-2 extractant. *Comm. J. Soil Sc. and Plant Analysis*. 15(12)1409-1416. MENV (1999). Politique de protection des sols et de réhabilitation des sols contaminés. Ministère de l'Environnement du Québec.
- Menzie, C. *et al.* 2000. An approach for incorporating information on chemical availability in soils into risk assessment and risk-based decision making. *Human and Ecological Risk Assessment* 6(3): 479-510.
- Moreno, J.L., Garcia, C., Hernandez, T. and J.A. Pascual. 1996. Transference of heavy metals from a calcareous soil amended with sewage-sludge compost to barley plants. *Bioresource Technology*. 55 : 251-258.
- Morgan, A.J., Evans, M., Winters, C. Gane, M. and M.S. Davies. 2002. Assaying the effects of chemical ameliorants with earthworms and plants exposed to a heavily polluted metalliferous soil. *European Journal of Soil Biology* 38(3-4): 323-327.
- Mowat and Bundy. 2001. Correlation of field-measured toxicity with chemical concentration and pollutant availability. *Environment International*. 27(6): 479-489.
- Neuhauser, E.G., Loehr, R.C., Milligan, D.L. and M.R. Malecki. 1985. Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia foetida*. *Biol. Fertil. Soils*. 1 : 149-152.
- O'Halloran, I. P. 1993. Total and organic phosphorus. Soil Sampling and Methods of Analysis. Careter, M. R., Lewis Publishers: 213-227.
- Ouzounidou, G., Ciamporova, M., Moustakas, M. and S. Karataglis. 1995. Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots. *Environ. Exp. Bot.* 35 : 167-176.
- Pankhurst, C. E. 1997. Biodiversity of soil organisms as an indicator of soil health. Biological indicators of soil health. Pankhurst, C. E., Doube, B. M. et Gupta, V. V. S. R., CAB International: 297-324.
- Pascual, J. A., Moreno, J. L., Hernandez, T. et C. Garcia. 2002. Persistence of immobilised and total urease and phosphatase activities in a soil amended with organic wastes. *Bioresource Technology* 82: (73-78).
- Peijnenburg, W.J.G.M., Baerselman, R., de Groot, A.C., Jager, T., Posthuma, L. and R.P.M. Van Veen. 1999. Relating environmental availability to bioavailability: soil-type-dependent metal accumulation in the oligochaete *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44(3): 294-310.



- Posthuma, L and J. Notenboom. 1996. Toxic effects of heavy metals in three worm species exposed in artificially contaminated soil substrates and contaminated field soils. National Institute of Public Health and the Environment. Bilthoven, The Netherlands. 79 pages.
- Posthuma, L., Boonman, H. Mogo, F.C. and R. Baerselman. 1994. Heavy metal toxicity in *Eisenia andrei* exposed in soils from a gradient around a zinc smelter (Budel), and comparison with toxic effects in OECD-artificial soil. National Institute of Public Health and Environmental Protection. Bilthoven, The Netherlands. 16 pages.
- Quian, P., J.J. Schoenau, T. Wu et S.P. Mooleki. 2003. Cooper and zinc distribution in soil as influenced by application of animal manure in east-central Saskatchewan. *Can. J. Soil Sci.* **83**(2):197-202
- Rai, J.P.N., 1992. Effects of long-term 2,4-D application on microbial populations and biochemical process in cultivated soil. *Biology and Fertility of Soils* **13**: 187-191.
- Ruby, M.V., Schoof, R., Brattin, W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., Mosby, D.E., Casteel, S.W., Berti, W., Carpenter, M., Edwards, D., Cragin, D. and W. Chappell. 1999. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science and Technology*. **33** : 3697-3705.
- Samiullah, Y. 1990. Biological Monitoring : Animals. MARC report no. 37. GEMS-Monitoring and Assessment Centre. King's College. London.
- Sannino, F., Filazzola, M. T., Violante, A. et L. Gianfreda. 1999. Fate of herbicides influenced by biotic and abiotic interactions. *Chemosphere* **39**(2): (333-341).
- Saxe, J.K., Impellitteri, C.A., W.J.G.M. Peijnenburg and H.E. Allen. 2001. Novel model describing trace metal concentrations in the earthworm *Eisenia andrei*. *Environmental Science and Technology*. **35**: 4522-4529.
- Schinner, F. 1983. Litter decomposition, CO<sub>2</sub>-release and enzyme activities in a snowbed and on a windswept ridge in an alpine environment. *Oecologia* **59**: (288-291).
- Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. et R. Margesin, Eds. 1996. Methods in soil biology. Berlin, Allemagne, Springer-Verlag.
- Seybold, C. A., Herrick, J. E. et J. J. Brejda, 1999. Soil resilience: a fundamental component of soil quality. *Soil Science* **164**(4): (224-234).
- Sheehan, P., Dewhurst, R.E., James, S., Callaghan, A., Connon, R. and M. Crane. 2003. Is there a relationship between soil and groundwater toxicity? *Environmental Geochemistry and Health* **25**(1): 9-16.
- Simard, R. R. 1993. Ammonium acetate-extractable elements. Dans Soil sampling and methods of analysis. Carter, M. R. ed. Can. Soc. of Soil Sci. Lewis pub. pp. 39-42.

- Simek, M. et E. A. Webster. 2000. Persistence of denitrifying enzyme activity in refrigerated and air-dried cambisols. *Soil use and Management* **16**: (232-233).
- Simonsen, E. et U. Isacsson. 2001. Soil behavior during freezing and thawing using variable and constant confining pressure triaxial tests. *Canadian Geotechnical Journal* **38**: (863-875).
- Speir, T.W., Kettles, H.A., Parshotam, A., Searle, P.L. and Vlaar, L.N.C., 1995. A simple kinetic approach to derive the ecological dose value, ED50, for the assessment of Cr(IV) toxicity to soil biological properties. *Soil Biology and Biochemistry* **27**: 801-810
- Richnow HH, Seifert R, Hefter J, Link M, Francke W, Schaefer G et Michaelis W (1997) Organic pollutants associated with macromolecular soil organic matter : mode of binding. *Organic geochemistry* **26**, 745-758.
- SPAC. 1992. Handbook on reference for soil analysis. Soil and plant analysis council. Georgia University Station. 201 pages.
- Spurgeon D.J., Hopkin S.P. and D.T. Jones. 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*. **84**: 123-130.
- Spurgeon, D.J. and S.P. Hopkin. 1995. Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm test to metal-contaminated field sites. *Ecotoxicology*. **4** : 190-205.
- Spurgeon, D.J. and S.P. Hopkin. 1999. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Applied Soil Ecology* **11**(2): 227-243.
- Stephenson, G.L., Feisthauer, N.C., Elshayeb, M. and R.P. Scroggins. 2002. The predictive relationship between avoidance behaviour and reproductive effects in earthworms. Poster presented at the 23<sup>rd</sup> Annual Meeting of SETAC North America. Salt Lake City, UT, USA.
- Strobl, W. et M. Traunmüller. 1996. Arylsulfatase activity. Methods in soil biology. Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E. et Margesin, R. Berlin, Springer: 230-232.
- Strobl, W. et M. Traunmüller. 1996. B-glucosidase activity. Methods in soil biology. Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E. et Margesin, R. Berlin, Springer: 198-200.
- Tabatabai, M. A. 1994. Soil Enzymes. Methods of Soil Analysis: Part 2 - Microbiological and Biochemical Properties. Weaver, R. W., Angle, J. S. et Bottomley, P. S. Winsconsin, SSSA. **5**: 775-833.
- Tabi, M., L. Tardif, D. Carrier, G. Laflamme et M. Rompré. 1990. Inventaire des problèmes de dégradation des sols agricoles du Québec. MAPAQ. Entente auxiliaire Canada-Québec sur le développement agro-alimentaire. Rapport synthèse. 71 p.

- Tisdale, S.L., W. L. Nelson et J. D. Beaton. 1985. Micronutrients and other beneficial elements in soils and fertilizers. Dans *Soil fertility and fertilizer*, 4<sup>th</sup> ed. Macmillan pub. N.Y. pp. 350-413.
- Tran, T.S., D. Côté, et A. Ndayegamiye. 1996. Effet des apports prolongés de fumier et de lisier sur l'évolution des teneurs du sol en éléments nutritifs majeurs et mineurs. *Agrosol* **9**(1): 21-30.
- Tran, T. S. et R. R. Simard. 1993. Mehlich III-3-extractable elements. Dans *Soil sampling and methods of analysis*. Carter, M. R. ed. Can Soc. of Soil Sci. Lewis pub. pp. 43-49.
- Trépanier, J.P. et A. Renoux. 2002. Cuivre : Rapport d'évaluation/validation des critères écotoxicologiques. Sanexen Services Environnementaux Inc. Montréal. 110 pages.
- Von Mersi, W. et F. Schinner. 1996. CM-Cellulase activity. Methods in soil biology. Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E. et Margesin, R. Berlin, Springer: 190-193.
- Wolf, D. et H. D. Skipper. 1994. Soil Sterilization. Methods of Soil Analysis: Part 2 - Microbiological and Biochemical properties. Weaver, R. W., Angle, J. S. et Bottomley, P. S. Winsconsin, SSSA. 5.
- Zagury, G.J., Dudal, Y., Bureau, J., Bastien C., et Chassé R. (2002). Sample handling and preparation for estimation of mobility, bioavailability and toxicity of contaminants in soils. In: *Environmental Analysis of Contaminated Sites*. G.I. Sunahara, A.Y. Renoux, C. Thellen, C.I. Gaudet et A. Pilon. John Wiley & Sons. p.p. 9-24.
- Ziadi, N., RR. Simard, T.S. Tran et G. Allard. (2001). Soil-available phosphorus as evaluated by desorption techniques and chemical extractions. *Can. J. Soil Sci.* **81**:167-174.



**ANNEXE A : ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DE 64 SOLS**

---



**Tableau A.1 : Description et caractérisation physico-chimique des 64 sols à l'étude**

No.	Séries de sols	Classes texturales	pH	M.O. (%)	C.E.C
1	Le Bras	LOAM LIMONEUX ARGILEUX	5,80	4,44	15,17
2	Dufferin	LOAM LIMONEUX	6,26	3,09	13,62
3	Greensboro	LOAM LIMONEUX	6,24	4,03	14,92
4	Suffield	LOAM	6,56	2,08	13,00
5	Neubois	LOAM LIMONEUX ARGILEUX	5,70	4,57	17,41
6	Fourchette	LOAM	6,42	2,45	11,36
7	Leeds	LOAM SABLEUX	6,81	2,69	10,93
8	St-Samuel	LOAM SABLEUX	7,22	1,95	10,23
9	Aston	LOAM SABLEUX	7,12	2,08	10,01
10	St-Damase	LOAM SABLEUX	7,25	2,08	8,76
11	St-Jude	LOAM SABLEUX	7,42	2,49	9,96
12	Beaurivage	LOAM SABLEUX	6,66	5,21	16,80
13	Rainbault	LOAM SABLEUX	5,71	5,89	17,55
14	St-Urbain	ARGILE LOURDE	6,23	1,48	13,19
15	Alma	ARGILE LIMONEUSE	6,01	7,17	25,11
16	Ascot	LOAM	6,16	5,04	16,39
17	Baby	LOAM LIMONEUX	5,66	4,57	18,99
18	Bearn	ARGILE LOURDE	5,33	3,36	25,52
19	Bedford	LOAM SABLO-ARGILEUX	7,57	4,87	22,87
20	Bourget	LOAM	5,57	6,50	17,14
21	Bullard	LOAM LIMONEUX	5,61	2,40	11,24
22	Champlain	LOAM LIMONEUX	5,90	4,03	13,46
23	Coaticook	LOAM LIMONEUX	5,74	4,03	16,51
24	Coteau	SABLE FIN	5,70	3,90	15,67
25	De L`Anse	ARGILE LIMONEUSE	5,97	8,65	31,54
26	Du Creux	LOAM	5,80	3,94	15,83
27	Duhamel	LOAM	5,78	5,72	26,43
28	Fabre	ARGILE LIMONEUSE	5,69	2,22	25,08
29	Guérin hu.	ARGILE LOURDE	6,44	9,20	33,32
30	Howick	LOAM LIMONEUX	5,90	4,30	24,89
31	Ivry	SABLE	6,33	2,62	10,50
32	Kamouraska	ARGILE	6,42	7,84	30,71
33	Kénogami	SABLE	5,42	2,61	10,64

No.	Séries de sols	Classes texturales	pH	M.O. (%)	C.E.C
34	Lanoraie	SABLE	5,08	1,37	9,25
35	Loutre	SABLE LOAMEUX	5,61	2,42	10,79
36	Macamic	ARGILE LOURDE	5,53	4,08	33,37
37	Magog	LOAM SABLEUX	5,18	3,25	14,03
38	Melbourne	LOAM SABLEUX	6,92	3,06	14,10
39	Napierville	LOAM	6,44	2,69	16,49
40	Normandin	LOAM	5,56	3,27	17,81
41	Orléans	LOAM	5,13	2,50	19,29
42	Pabos	LOAM ARGILEUX	6,00	4,03	18,45
43	Palmarolle	ARGILE LOURDE	6,45	7,06	41,43
44	Péribonka	LOAM LIMONEUX	5,13	6,57	17,03
45	Remigny	ARGILE LOURDE	5,62	6,28	37,42
46	Sabrevois	LOAM	6,49	3,81	17,00
47	Sheldon	LOAM ARGILEUX	5,88	3,92	14,89
48	Sherbrooke	LOAM	6,42	3,81	14,59
49	St-André	LOAM	5,42	3,39	18,06
50	St-Blaise	LOAM	6,08	4,71	19,40
51	Ste-Marie	LOAM	5,37	4,44	15,74
52	St-Joseph	LOAM SABLEUX FIN	6,08	2,98	12,88
53	St-Laurent	LOAM LIMONEUX ARGILEUX	6,17	3,36	21,89
54	St-Nicolas	LOAM	5,56	5,88	21,63
55	St-Pacome	SABLE	5,49	3,70	8,95
56	St-Pascal	LOAM ARGILEUX	5,47	5,55	21,93
57	St-Rosalie	ARGILE LIMONEUSE	5,98	4,57	29,39
58	St-Thomas	SABLE LOAMEUX	5,74	2,91	11,09
59	St-Urbain	ARGILE LOURDE	6,60	4,84	26,05
60	Woodbridge	LOAM	6,19	3,59	14,05
61	Yamaska	LOAM LIMONEUX	6,33	1,68	21,74
62	Hébertville	ARGILE LIMONEUSE	6,31	10,76	32,01
63	St-Amable	SABLE	6,83	6,70	11,54
64	Joly	LOAM ARGILEUX	7,47	4,10	18,58



**ANNEXE B : BILAN DES ÉTM**

---



## B.1 Concentration en ÉTM des engrais minéraux et des engrais organiques utilisés

Le Tableau B.1 présente les concentrations en ÉTM de divers engrais minéraux commerciaux. Les engrais azotés de synthèse urée et nitrate d'ammonium contiennent très peu d'ÉTM. Le mode de fabrication de ces engrais à partir du gaz naturel, de l'azote de l'air et du gaz carbonique (pour l'urée) explique ces faibles teneurs. Pour les engrais potassiques (chlorure de potassium et sul-po-mag), les teneurs en ÉTM sont également très faibles. Ces deux engrais proviennent de dépôts miniers d'une grande pureté. Les engrais phosphatés, superphosphate triple (0-46-0) et le phosphate bi-ammoniacal (18-46-0), sont par contre nettement plus enrichis en la plupart des ÉTM. Le phosphore provient de dépôts miniers d'apatite traitée avec des acides pour en faire des engrais minéraux. Certains de ces dépôts sont reconnus pour être riches en certains ÉTM dont le cadmium. Il existe des critères définis par l'Agence canadienne d'inspection des aliments relativement à la concentration maximale admissible de certains ÉTM dans les engrais. Dans le cas présent, tous les engrais minéraux respectent les concentrations maximales admissibles. Le cadmium fait notamment l'objet d'un suivi particulier dans les engrais phosphatés. Les engrais phosphatés utilisés dosent 3,72 et 6 mg Cd/kg et la concentration maximale admissible est de 20 mg Cd/kg. Quelques ÉTM ne font pas partie de la liste de l'Agence canadienne d'inspection des aliments. Pour apprécier les teneurs en ces éléments, nous avons référé aux critères provisoires du ministère de l'Environnement du Québec pour les matières résiduelles fertilisantes. Pour tous les ÉTM mesurés, les engrais minéraux respectent le critère de qualité C1, c'est-à-dire qu'ils ne représentent pas de risque d'accumulation à long terme dans les sols pour des usages normaux et qu'ils ne nécessitent pas de suivi des charges à long terme.

**Tableau B.1 : Concentration en ÉTM de divers engrais minéraux commerciaux**

Engrais	Cu (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Co (mg/kg)	Pb (mg/kg)
Nitrate d'ammonium	0,0	6,2	1,4	0,35	0,00	0,17	0,00	0,14
Urée	12,3	1,1	2,8	0,35	0,00	0,34	0,00	0,65
Phosphate bi-ammoniacal	5,9	356	67,1	12,06	3,72	86,6	3,18	0,40
Superphosphate triple	7,3	253	66,5	15,26	6,00	76,9	4,25	5,61
Chlorure de potassium	1,7	1,4	1,0	0,22	0,00	0,20	0,00	0,21
Sul-po-mag	0,2	9,3	1,6	0,29	0,02	0,30	0,00	0,04

Les Tableau B.2 et Tableau B.3 présentent les concentrations en ÉTM des engrais minéraux et organiques appliqués dans la prairie et le champ de maïs-grain. Pour les engrais de ferme, il n'y a actuellement pas de critères à respecter pour les ÉTM. Selon les critères provisoires pour les matières résiduelles fertilisantes de la PPSRTC du MDDEP, les fumiers de bovins laitiers utilisés dans la prairie et dans le champ de maïs-grain sont de catégorie C1 pour tous les ÉTM mesurés. Le fumier de poulets est de catégorie C1 pour tous les éléments, sauf pour le cuivre qui est de catégorie C2. Le lisier de porcs à l'engraissement est de catégorie C1 pour tous les éléments, sauf le cuivre et le zinc qui sont de catégorie C2. Ces derniers éléments présentent donc une problématique particulière avec certains engrais de ferme, spécialement le fumier de poulets et le lisier de porcs.

**Tableau B.2 : Concentrations en ÉTM des engrais minéraux et organiques appliqués dans la prairie**

Formule des engrais	Cu (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Co (mg/kg)	Pb (mg/kg)
Urée	12,3	1,1	2,8	0,35	0,00	0,34	0,00	0,65
Phosphate bi-ammoniacal	5,9	356	67,1	12,1	3,72	86,6	3,18	0,40
Chlorure de potassium	1,7	1,4	1,0	0,22	0,00	0,20	0,00	0,21
<b>Analyses des éléments totaux (base humide)</b>								
<b>(mg/kg)</b>								
Fumier de bovins laitiers	13	43	50	1,79	0,06	2,23	0,28	0,05
Fumier de poulets	74,1	275	216	7,63	0,32	7,22	1,77	0,37
Lisier de porcs	49	40	77	1,36	0,05	0,75	0,20	0,01

**Tableau B.3 : Concentrations en ÉTM des engrais minéraux et organiques appliqués dans le champ de maïs-grain**

Fumure minérale	Cu (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Co (mg/kg)	Pb (mg/kg)
Nitrate d'ammonium	0,0	6,2	1,4	0,35	0,00	0,17	0,00	0,14
Phosphate bi-ammoniacal	5,9	356	67,1	12,1	3,72	86,6	3,18	0,40
<b>Analyses des éléments totaux (base humide)</b>								
<b>(mg/kg)</b>								
Fumier de bovins laitiers	12	34	33	1,47	0,04	1,61	0,51	0,00
Lisier de porcs	46	36	71	1,10	0,05	0,60	0,16	0,00

#### 7.1.1.1 Charges en ÉTM provenant des engrais minéraux et des engrais de ferme

Les Tableau B.4 et Tableau B.5 présentent les charges en ÉTM qui ont résulté de l'application des engrais minéraux et organiques dans la prairie et dans le champ de maïs-grain. Pour la prairie, une dose annuelle de 265 kg/ha d'un engrais de formulation 10-17-31, fabriqué avec de l'urée, du phosphate bi-ammoniacal et du chlorure de potassium a été appliquée. Pour le champ de maïs, une dose de 239 kg/ha d'un engrais 21-36-0 a été appliquée comme fumure de démarrage au semis, formulée avec du nitrate d'ammonium et du phosphate bi-ammoniacal. Une dose supplémentaire de 239 kg/ha d'urée a été appliquée au stade 4 à 6 feuilles. Ces engrais composés ont été mélangés à l'IRDA à partir des engrais simples décrits antérieurement. En tenant compte de la proportion relative de chacun des engrais simples dans les mélanges, il a été possible d'établir les charges en ÉTM qui ont résulté de ces applications.

Pour établir les charges en ÉTM provenant des engrais de ferme, nous avons multiplié la teneur des éléments dans les engrais par la dose d'application. Cette dose a été mesurée en trois répétitions au champ par la technique des quadras (1 m<sup>2</sup>) pour les fumiers solides. Pour les lisiers, une calibration vitesse-dose basée sur le débit connu de la rampe d'épandage a été établie. Pour la prairie, les doses d'épandage ont été de 30t/ha de lisier de porcs, de 16,5 t/ha de fumiers de bovins laitiers et de 3,4 t/ha de fumier de poulets. Dans le maïs-grain, les doses appliquées ont été de 47 t/ha pour le fumier de bovins laitiers et de 50 t/ha pour le lisier de porcs.

- **Prairie**

Dans la prairie, les charges en ÉTM appliquées au sol ont varié selon les modes de fertilisation. Elles sont nettement plus faibles dans le traitement avec la fumure minérale et généralement plus élevées dans le traitement avec le lisier de porcs (Tableau B.4). Pour le cadmium, les charges sont minimales, variant de 0,39 g/ha, avec la fumure minérale, à 1,54 g/ha avec le lisier de porcs. Pour le plomb les charges varient entre 0 et 1,26 g/ha et de 0,33 à 6,03 g/ha pour le cobalt. Ces trois éléments ne posent pas de problème d'apport significatif provenant de la fertilisation avec les engrais minéraux ou les engrais de ferme. On est très en dessous des maxima admissibles en terme de charge maximale cumulative appliquée au sol. Le nickel et le chrome montrent des charges pouvant atteindre 40 g/ha avec les engrais de ferme. Les charges mesurées sont également bien en dessous des maxima permis. En multipliant la charge annuelle par 45 ans, on obtient une charge cumulative de 1,8 kg/ha de nickel pour un maximum admissible de 36 kg/ha. Les lisiers pourraient apporter sur 45 ans, 5 % de la charge maximale admissible de Ni.

Pour le zinc, les charges ont varié de 7,18 g/ha avec la fumure minérale à 2285 g/ha avec le lisier de porcs. En multipliant par 45 ans la charge en zinc du lisier de porcs, on obtient une charge cumulative de 102,8 kg/ha pour un maximum admissible de 370 kg/ha. Les apports de lisier pourraient apporter 27,8 % de la charge maximale admissible de zinc. Pour le manganèse, les charges ont varié de 37 g/ha, avec la fumure minérale, à 1180 g/ha avec le lisier de porcs. Il n'y a pas de critères pour cet élément mais les lisiers en apportent des quantités appréciables. Pour le cuivre, les charges ont varié de 0,85 g/ha, avec la fumure minérale, à 1451 g/ha avec le lisier de porcs.

**Tableau B.4: Charges en ÉTM des engrais minéraux et organiques appliqués dans la prairie**

Engrais	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Ni (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)
<b>Fumure minérale (265 kg 10-17-31)</b>	0,85	37	7,18	1,30	0,39	9,07	0,33	0,08
<b>Fumier de bovins laitiers (16,5 t/ha)</b>	212	706	818	30	0,98	37	4,55	0,81
<b>Fumier de poulets (3,4 t/ha)</b>	252	934	733	26	1,08	25	6,03	1,26
<b>Lisier de porcs (30 t/ha)</b>	1451	1180	2285	40	1,54	22	5,38	0,00

- **Maïs-grain**

Il existe une différence importante entre les charges par les engrais minéraux et les engrais organiques dans le champ de maïs-grain (Tableau B.5). Les charges de cadmium appliquées au sol sont faibles, variant de 0,70 g/ha avec la fumure minérale à 2,08 g/ha avec le fumier de bovins laitiers. Elles sont également très faibles, inférieures à 1 g/ha pour le plomb. Elles varient entre 0,6 et 24,05 g/ha pour le cobalt, entre 2,3 et 70 g/ha pour le nickel et entre 16 et 82 g/ha pour le chrome. Elles sont les moins élevées avec la fumure minérale et les plus élevées avec le fumier de bovins laitiers. Pour le cuivre, les charges appliquées varient entre 3,69 g/ha avec la fumure minérale et 2295 g/ha avec le lisier de porcs. Pour le zinc, les charges varient entre 13,20 g/ha avec l'engrais minéral et 3548 g/ha avec le lisier de porcs. En multipliant par 45 ans la charge annuelle de 3548 g/ha, on obtient une charge cumulative de 159,7 kg/ha pour un maximum admissible de 370 kg/ha. Les lisiers pourraient apporter en 45 ans, 43,1% de la charge cumulative de zinc admissible. Pour le manganèse, les charges ont varié de 67 g/ha avec la fumure minérale à 1848 g/ha avec le lisier de porcs. Il n'y a pas de critères pour la charge admissible de cet élément.

Les pratiques de fertilisation avec les engrais minéraux n'ont pas provoqué d'apport important d'aucun des ÉTM mesurés. Avec les engrais de ferme, les applications de cuivre, de zinc et de manganèse peuvent représenter des charges appréciables, particulièrement avec les lisiers de porcs. Pour les autres éléments mesurés, il ne semble pas y avoir de problématiques de charges importantes appliquées. Le lisier utilisé provenait du fond d'une fosse à lisier de porcs à l'engraissement et avait des teneurs en cuivre et en zinc supérieures à la moyenne à cause de sa teneur élevée en matière sèche. Dans le cas du fumier de poulets, la concentration en Zn et Cu est élevée mais les doses appliquées ont été faibles (3,4 t/ha), compte tenu de leur teneur élevée en éléments nutritifs. Des doses plus élevées fourniraient des apports de zinc et cuivre nettement plus importants.

**Tableau B.5 : Charges en ÉTM des engrais minéraux et organiques appliqués dans le champ de maïs-grain**

Engrais	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Ni (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)
<b>Fumier de bovins (47 t/ha)</b>	556	1581	1569	69	1,82	76	23,82	0,00
+ 191 kg 27-18-0/ha	0,42	26,30	4,99	0,91	0,27	6,24	0,23	0,05
<b>Total fumier</b>	<b>557</b>	<b>1607</b>	<b>1574</b>	<b>70</b>	<b>2,08</b>	<b>82</b>	<b>24,05</b>	<b>0,05</b>
<b>Lisier de porcs (50 t/ha)</b>	2294	1822	3543	55	2,48	30	8,16	0,00
+ 191 kg 27-18-0/ha	0,42	26,30	4,99	0,91	0,27	6,24	0,23	0,05
<b>Total lisier</b>	<b>2295</b>	<b>1848</b>	<b>3548</b>	<b>56</b>	<b>2,75</b>	<b>36</b>	<b>8,39</b>	<b>0,05</b>
<b>Fumure minérale</b>	<b>3,69</b>	<b>67</b>	<b>13,2</b>	<b>2,35</b>	<b>0,70</b>	<b>16,3</b>	<b>0,60</b>	<b>0,22</b>

#### 7.1.1.2 Concentrations et exportations des ÉTM par les récoltes

- **Prairie**

Afin de mesurer les teneurs en ÉTM dans le foin et calculer les exportations par les récoltes selon les modes de fertilisation, nous avons mesuré les rendements de deux coupes de foin et procédé aux analyses d'ÉTM de chacune des coupes. Les exportations sont établies en multipliant le rendement de chacune des coupes par la teneur en ÉTM respective et en cumulant les deux coupes. Le Tableau B.6 présente les exportations des ÉTM par les récoltes obtenues pour le total des deux coupes. Elles ont varié selon les modes de fertilisation entre 0,40 et 1,24 g/ha pour le plomb, entre 3,06 et 9,25 g/ha pour le cobalt, de 1,34 à 1,80 g/ha pour le chrome, de 0,34 à 1,03 g/ha pour le cadmium, de 6,00 à 10,24 g/ha pour le nickel, de 125 à 224 g/ha pour le zinc, de 231 à 271 g/ha pour le manganèse et de 74 à 121 g/ha pour le cuivre. Pour plusieurs ÉTM (Co, Cr, Zn et Cu), les exportations par les prairies sont plus élevées dans les traitements recevant du fumier de poulets et du lisier de porcs comparativement à ceux recevant des engrais minéraux uniquement. La parcelle fertilisée avec du fumier de bovins laitiers prélève généralement moins de ÉTM que celle fertilisée au lisier de porcs ou au fumier de poulets. Les exportations pour le fumier de bovins se comparent souvent à celles mesurées avec les engrais minéraux.

Pour le cobalt, le chrome et le nickel, les exportations par les récoltes de foin sont inférieures à 10 g/ha; elles sont même inférieures à 1 g/ha pour le plomb et le cadmium. Le faible niveau des exportations fait en sorte que ces éléments présentent peu de risque d'accumulation dans la chaîne alimentaire, particulièrement pour le bétail qui va consommer ces fourrages. Pour le cadmium, les exportations sont faibles mais plus élevées dans le traitement avec la fumure minérale. Ce traitement a reçu du phosphore provenant des engrais minéraux. Les engrais minéraux phosphatés montrent des teneurs plus élevées en cadmium sans dépasser le critère admissible. Les traitements avec les engrais de ferme, particulièrement le lisier de porcs, ont exporté plus de cuivre et de zinc que le traitement avec la fumure minérale seule. Rappelons que le lisier de porcs était particulièrement riche en ces éléments.

**Tableau B.6 : Exportation des ÉTM par les récoltes de la prairie**

Traitements	Masse sèche (t/ha)	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Ni (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)
Fumure minérale	5,82	74	263	125	10,24	1,03	1,34	3,06	0,40
Fumier de bovins	7,78	115	231	174	6,39	0,34	1,79	5,88	1,24
Fumier de poulets	8,19	119	259	219	6,00	0,56	1,80	9,25	0,86
Lisier de porcs	8,71	121	271	224	8,82	0,59	1,63	6,23	0,41

- **Maïs-grain**

Pour le maïs-grain, les concentrations en ÉTM présents dans les grains ont été mesurées. À partir de ces concentrations, nous avons établi les exportations par hectare en multipliant la concentration en ÉTM des grains par le rendement à l'hectare pour chacun des traitements de fertilisation (Tableau B.7). Ces exportations sont très faibles pour la majorité des éléments, à l'exception du zinc, du manganèse et du cuivre. Les charges sont peu affectées par les traitements de fertilisation. Elles varient de 0,3 à 0,6 g/ha pour le plomb, de 0,4 à 0,6 g/ha pour le cobalt, de 0,6 à 0,8 g/ha pour le chrome, de 1,6 à 1,9 pour le nickel, de 71 à 113 g/ha pour le zinc, de 21 à 27 g/ha pour le manganèse et de 20 à 24 g/ha pour le cuivre. Elles sont inférieures à la limite de détection pour le cadmium. Ces charges d'ÉTM exportés par la récolte demeurent faibles par rapport à celles mesurées pour la prairie.

Les tiges de maïs sont retournées aux sols dans la culture du maïs-grain. Nous avons mesuré les charges en ÉTM présents dans les tiges et qui retournent aux sols à la récolte (Tableau B.7). Elles sont généralement plus importantes que celles des grains, ce qui confirme la faible mobilité des ÉTM à l'intérieur des plants de maïs. Les charges en ÉTM contenus dans les tiges et retournés au sol varient de 1,1 à 2 g/ha pour le plomb, de 0,8 à 1,3 g/ha pour le cobalt, de 7,9 à 12,4 g/ha pour le chrome, de 0,2 à 0,3 g/ha pour le cadmium, de 5,2 à 8,2 g/ha pour le nickel, de 31 à 64 g/ha pour le zinc, de 90 à 176 g/ha pour le manganèse et de 23 à 35 g/ha pour le cuivre. Il n'y a pas de différence appréciable entre les modes de fertilisation.



**Tableau B.7 : Exportation des ÉTM par la récolte du maïs-grain**

Traitements	Masse sèche (t/ha)	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Ni (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)
<b>GRAINS</b>									
Fumier de bovins	5,80	20	27	100	1,7	0,0	0,8	0,5	0,6
Lisier de porcs	6,22	24	26	113	1,9	0,0	0,7	0,6	0,3
Fumure minérale	4,90	21	21	71	1,6	0,0	0,6	0,4	0,3
<b>TIGES</b>									
Fumier de bovins	3,16	23	90	40	5,2	0,2	7,9	0,8	1,1
Lisier de porcs	4,95	35	142	64	8,2	0,3	12,4	1,3	1,8
Fumure minérale	4,61	34	176	31	5,5	0,3	8,6	0,8	2,0

### 7.1.1.3 Concentrations et charges en ÉTM des eaux de drainage

Le volume des eaux des drains agricoles a été mesuré à chaque semaine tout au long de l'année 2002 pour chacun des traitements de fertilisation dans la prairie et dans le champ de maïs-grain. Un échantillon de cette eau est prélevé en continu et envoyé à chaque semaine pour analyse au laboratoire de l'IRDA. La charge hebdomadaire est calculée en multipliant le volume d'eau de la semaine par la concentration respective en ÉTM. Les charges hebdomadaires sont par la suite cumulées pour chaque saison et pour toute l'année. Les concentrations moyennes pondérées pour chaque saison et pour l'année sont calculées en divisant la charge saisonnière et annuelle par le volume d'eau correspondant. Les ÉTM se retrouvent dans les eaux sous formes dissoutes ou particulières. Nous avons procédé à l'analyse des ÉTM totaux des eaux et des formes dissoutes en séparant les formes respectives par centrifugation. La différence entre l'analyse des ÉTM totaux et solubles représente les formes particulières, c'est-à-dire les ÉTM liés ou intégrés aux particules minérales ou organiques non dissoutes.

- **Prairie**

Le volume des eaux des drains souterrains a varié selon les traitements de 17,97 à 20,26 cm. Chaque cm d'eau drainée correspond à 100,000 litres/ha. Le Tableau B.8 présente les concentrations moyennes pondérées en ÉTM totaux pour chaque saison et pour l'année dans les eaux des drains souterrains de la prairie. Pour plusieurs éléments, les concentrations estivales sont plus élevées. Par contre, les volumes drainés sont faibles à cette saison. Le printemps s'est montré la période la plus propice aux pertes d'ÉTM. Près des deux tiers de l'eau évacuée aux drains, l'ont été à cette période (Tableau B.9). En automne 2002, le volume de ruissellement a été anormalement faible pour cette saison suite à des conditions météorologiques particulièrement sèches. Les concentrations moyennes annuelles pondérées en ÉTM totaux sont plus élevées dans les eaux pour les parcelles fertilisées avec les engrais

de ferme que dans celle fertilisée avec la fumure minérale pour les éléments Cu, Mn, Zn, Cd, Cr, Co et Pb. Les engrais de ferme favorisent la structuration et l'infiltration de l'eau dans les sols et contiennent plus de ÉTM que les engrais minéraux. Il est possible qu'ils favorisent aussi une plus grande perte en ÉTM totaux aux drains. On considère par contre qu'ils vont réduire les pertes par ruissellement en favorisant une meilleure infiltration de l'eau.

**Tableau B.8 : Concentrations moyennes pondérées des éléments totaux dans l'eau des drains souterrains de la prairie**

	Année 2002	Cu (µg/L)	Mn (µg/L)	Zn (µg/L)	Cd (µg/L)	Cr (µg/L)	Co (µg/L)	Pb (µg/L)	Ni (µg/L)
Fumure minérale	Hiver	2,06	27,8	69,5	0,21	2,02	0,47	0,77	0,03
	Printemps	2,65	9,7	44,3	0,18	1,81	0,44	0,37	0,03
	Été	5,78	116,3	244,5	0,28	6,48	2,08	9,39	0,02
	Automne	1,75	3,1	10,1	0,06	0,33	0,08	0,03	0,05
	<b>Annuelle</b>	<b>2,66</b>	<b>17,5</b>	<b>54,6</b>	<b>0,17</b>	<b>1,91</b>	<b>0,50</b>	<b>0,95</b>	<b>0,03</b>
Fumier de bovins laitiers	Hiver	3,13	16,7	58,7	0,12	3,08	0,70	0,98	0,02
	Printemps	13,84	41,2	118,3	0,60	18,12	6,75	5,69	0,02
	Été	7,81	26,4	123,2	0,37	7,41	2,01	3,07	0,02
	Automne	3,27	6,9	5,8	0,07	1,37	0,08	0,20	0,03
	<b>Annuelle</b>	<b>10,09</b>	<b>30,1</b>	<b>87,2</b>	<b>0,42</b>	<b>12,24</b>	<b>4,37</b>	<b>3,84</b>	<b>0,02</b>
Fumier de poulets	Hiver	1,12	13,6	14,8	0,12	1,13	0,18	0,38	0,03
	Printemps	7,74	27,7	230,3	0,35	12,54	3,93	3,66	0,02
	Été	11,01	23,6	406,2	0,38	7,01	3,84	3,07	0,02
	Automne	2,66	3,8	5,5	0,06	0,72	0,08	0,13	0,04
	<b>Annuelle</b>	<b>6,48</b>	<b>22,8</b>	<b>186,2</b>	<b>0,29</b>	<b>9,35</b>	<b>2,99</b>	<b>2,79</b>	<b>0,02</b>
Lisier de porcs	Hiver	8,80	24,4	149,0	0,23	8,73	3,12	4,21	0,02
	Printemps	8,62	24,3	149,5	0,35	11,71	3,05	3,72	0,02
	Été	28,00	44,1	137,3	0,54	5,10	1,61	1,86	0,03
	Automne	3,65	5,7	6,0	0,10	1,23	0,09	0,19	0,04
	<b>Annuelle</b>	<b>9,04</b>	<b>23,1</b>	<b>131,6</b>	<b>0,31</b>	<b>9,51</b>	<b>2,64</b>	<b>3,30</b>	<b>0,02</b>

En ce qui concerne les charges en ÉTM totaux perdus aux drains, elles sont également plus faibles avec la fumure minérale qu'avec les engrais de ferme pour la plupart des éléments (Tableau B.9). Elles ont varié de 4,44 à 32,97 g/ha pour le nickel, de 1,71 à 7,79 g/ha pour le plomb, de 0,89 à 8,86 g/ha pour le cobalt, de 3,43 à 24,81 g/ha pour le chrome, de 0,31 à 0,86 g/ha pour le cadmium, de 98,07 à 340 g/ha pour le zinc, de 31,44 à 61,02 g/ha pour le manganèse et de 4,78 à 20,45 g/ha pour le cuivre.

**Tableau B.9 : Charge des éléments totaux perdus dans l'eau des drains souterrains de la prairie**

	Année 2002	Volume eaux (cm/ha)	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)	Ni (g/ha)
<b>Fumure minérale</b>	Hiver	1,77	0,36	4,9	12,3	0,04	0,36	0,08	0,14	0,37
	Printemps	12,11	3,21	11,7	53,6	0,22	2,20	0,54	0,44	2,84
	Été	1,20	0,69	13,9	29,2	0,03	0,77	0,25	1,12	1,02
	Automne	2,89	0,51	0,9	2,9	0,02	0,10	0,02	0,01	0,21
	<b>Total</b>	<b>17,97</b>	<b>4,78</b>	<b>31,4</b>	<b>98,1</b>	<b>0,31</b>	<b>3,43</b>	<b>0,89</b>	<b>1,71</b>	<b>4,44</b>
<b>Fumier de bovins laitiers</b>	Hiver	1,47	0,46	2,4	8,6	0,02	0,45	0,10	0,14	0,48
	Printemps	12,48	17,28	51,4	147,7	0,75	22,63	8,43	7,11	30,39
	Été	1,43	1,12	3,8	17,6	0,05	1,06	0,29	0,44	1,35
	Automne	4,88	1,59	3,4	2,8	0,03	0,67	0,04	0,10	0,75
	<b>Total</b>	<b>20,26</b>	<b>20,45</b>	<b>61,0</b>	<b>176,8</b>	<b>0,86</b>	<b>24,81</b>	<b>8,86</b>	<b>7,79</b>	<b>32,97</b>
<b>Fumier de poulets</b>	Hiver	2,28	0,25	3,1	3,4	0,03	0,26	0,04	0,09	0,23
	Printemps	12,69	9,82	35,2	292,2	0,44	15,91	4,99	4,65	18,42
	Été	1,07	1,18	2,5	43,4	0,04	0,75	0,41	0,33	1,11
	Automne	2,24	0,60	0,9	1,2	0,01	0,16	0,02	0,03	0,25
	<b>Total</b>	<b>18,27</b>	<b>11,84</b>	<b>41,6</b>	<b>340,3</b>	<b>0,53</b>	<b>17,08</b>	<b>5,46</b>	<b>5,09</b>	<b>20,00</b>
<b>Lisier de porcs</b>	Hiver	3,84	3,38	9,4	57,2	0,09	3,35	1,20	1,62	4,73
	Printemps	11,72	10,10	28,5	175,2	0,41	13,72	3,57	4,36	16,16
	Été	0,94	2,63	4,2	12,9	0,05	0,48	0,15	0,17	0,73
	Automne	2,24	0,82	1,3	1,3	0,02	0,28	0,02	0,04	0,41
	<b>Total</b>	<b>18,74</b>	<b>16,93</b>	<b>43,3</b>	<b>246,7</b>	<b>0,58</b>	<b>17,83</b>	<b>4,94</b>	<b>6,19</b>	<b>22,04</b>

Les concentrations et les charges en ÉTM solubles sont présentées aux Tableau B.10 et Tableau B.11. Les résultats comparatifs entre les charges en ÉTM totaux et solubles nous indiquent que les formes particulières représentent la principale source de pertes d'ÉTM aux drains pour tous les éléments. Il apparaît aussi que l'apport d'engrais de ferme accroît les pertes aux drains des ÉTM solubles comparativement aux engrais minéraux, pour plusieurs éléments (Tableau B.11).

**Tableau B.10 : Concentrations moyennes pondérées des éléments solubles dans l'eau des drains souterrains de la prairie**

	Année 2002	Cu (µg/L)	Mn (µg/L)	Zn (µg/L)	Cd (µg/L)	Cr (µg/L)	Co (µg/L)	Pb (µg/L)	Ni (µg/L)
<b>Fumure minérale</b>	Hiver	2,35	0,08	1,74	0,01	0,09	0,01	0,00	0,28
	Printemps	1,37	0,46	1,87	0,04	0,19	0,09	0,00	0,07
	Été	2,33	0,31	3,11	0,13	0,18	0,00	0,00	0,39
	Automne	1,76	0,93	1,88	0,04	0,11	0,09	0,00	0,15
	<b>Annuelle</b>	<b>1,58</b>	<b>0,51</b>	<b>1,93</b>	<b>0,04</b>	<b>0,17</b>	<b>0,08</b>	<b>0,00</b>	<b>0,12</b>
<b>Fumier de bovins laitiers</b>	Hiver	2,37	0,05	1,89	0,02	0,77	0,01	0,00	0,01
	Printemps	2,09	0,61	2,76	0,03	0,58	0,03	0,00	0,36
	Été	4,01	0,43	5,05	0,07	0,50	0,00	0,00	0,33
	Automne	3,31	2,84	2,33	0,03	0,67	0,10	0,01	0,73
	<b>Annuelle</b>	<b>2,53</b>	<b>1,15</b>	<b>2,70</b>	<b>0,03</b>	<b>0,61</b>	<b>0,05</b>	<b>0,00</b>	<b>0,43</b>
<b>Fumier de poulets</b>	Hiver	2,27	0,07	2,49	0,03	0,03	0,04	0,00	0,00
	Printemps	2,09	0,34	2,36	0,03	0,22	0,02	0,00	0,26
	Été	3,79	0,28	3,71	0,07	0,41	0,00	0,00	0,87
	Automne	3,15	2,56	2,42	0,04	0,54	0,15	0,20	0,84
	<b>Annuelle</b>	<b>2,36</b>	<b>0,59</b>	<b>2,47</b>	<b>0,03</b>	<b>0,25</b>	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>	<b>0,34</b>
<b>Lisier de porcs</b>	Hiver	2,76	0,26	0,97	0,04	0,14	0,03	0,00	0,72
	Printemps	2,14	0,47	2,15	0,06	0,50	0,02	0,00	0,24
	Été	3,06	0,35	4,99	0,06	0,53	0,02	0,00	0,52
	Automne	3,51	3,56	3,10	0,02	0,60	0,16	0,00	0,39
	<b>Annuelle</b>	<b>2,48</b>	<b>0,81</b>	<b>2,17</b>	<b>0,05</b>	<b>0,44</b>	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>	<b>0,37</b>

**Tableau B.11 : Charge des éléments solubles perdus dans l'eau des drains souterrains de la prairie**

	Année 2002	Volume eaux (cm/ha)	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)	Ni (g/ha)
<b>Fumure minérale</b>	Hiver	1,60	0,38	0,01	0,28	0,00	0,02	0,00	0,00	0,05
	Printemps	12,09	1,66	0,56	2,26	0,05	0,23	0,11	0,00	0,08
	Été	0,99	0,23	0,03	0,31	0,01	0,02	0,00	0,00	0,04
	Automne	3,29	0,58	0,31	0,62	0,01	0,04	0,03	0,00	0,05
	<b>Total</b>	<b>17,97</b>	<b>2,84</b>	<b>0,91</b>	<b>3,46</b>	<b>0,07</b>	<b>0,30</b>	<b>0,15</b>	<b>0,00</b>	<b>0,21</b>
<b>Fumier de bovins laitiers</b>	Hiver	1,38	0,33	0,01	0,26	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00
	Printemps	12,51	2,62	0,76	3,45	0,03	0,72	0,04	0,00	0,45
	Été	0,99	0,40	0,04	0,50	0,01	0,05	0,00	0,00	0,03
	Automne	5,38	1,78	1,53	1,25	0,01	0,36	0,06	0,00	0,40
	<b>Total</b>	<b>20,26</b>	<b>5,12</b>	<b>2,33</b>	<b>5,46</b>	<b>0,06</b>	<b>1,24</b>	<b>0,10</b>	<b>0,00</b>	<b>0,88</b>
<b>Fumier de poules</b>	Hiver	2,09	0,47	0,01	0,52	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
	Printemps	12,75	2,66	0,44	3,01	0,04	0,28	0,03	0,00	0,33
	Été	1,23	0,47	0,03	0,46	0,01	0,05	0,00	0,00	0,11
	Automne	2,32	0,73	0,59	0,56	0,01	0,13	0,04	0,05	0,20
	<b>Total</b>	<b>18,39</b>	<b>4,34</b>	<b>1,08</b>	<b>4,55</b>	<b>0,06</b>	<b>0,47</b>	<b>0,07</b>	<b>0,05</b>	<b>0,63</b>
<b>Lisier de porcs</b>	Hiver	3,75	1,03	0,10	0,36	0,01	0,05	0,01	0,00	0,27
	Printemps	11,75	2,51	0,55	2,53	0,06	0,59	0,02	0,00	0,28
	Été	0,91	0,28	0,03	0,45	0,01	0,05	0,00	0,00	0,05
	Automne	2,34	0,82	0,83	0,73	0,00	0,14	0,04	0,00	0,09
	<b>Total</b>	<b>18,74</b>	<b>4,64</b>	<b>1,52</b>	<b>4,07</b>	<b>0,09</b>	<b>0,83</b>	<b>0,07</b>	<b>0,00</b>	<b>0,69</b>

- **Maïs-grain**

Les Tableaux B.12 et B.13 présentent les concentrations moyennes pondérées et les charges d'ÉTM totaux perdus aux drains pour chaque saison et pour toute l'année dans le champ de maïs-grain. Le printemps a été la principale saison pour les pertes d'ÉTM aux drains à cause des volumes d'eau plus importants évacués à cette période. Les charges annuelles des ÉTM totaux perdus aux drains agricoles en 2002 ont varié selon les modes de fertilisation de 90 à 187 g/ha pour le nickel, de 24 à 48 g/ha pour le plomb, de 27 à 58 g/ha pour le cobalt, de 62 à 130 g/ha pour le chrome, de 1,4 à 2,5 g/ha pour le cadmium, de 156 à 305 g/ha pour le zinc, de 1050 à 2938 g/ha pour le manganèse et de 51 à 106 g/ha pour le cuivre. La parcelle fertilisée au fumier de bovins perd plus de ÉTM que les autres.

**Tableau B.12 : Concentrations moyennes pondérées des éléments totaux dans l'eau des drains souterrains du champ de maïs-grain**

Année 2002		Cu	Mn	Zn	Cd	Cr	Co	Pb	Ni
		(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)
<b>Fumier de bovins</b>	<b>Hiver</b>	4,9	85	16	0,19	2,8	1,16	1,33	4,7
	<b>Printemps</b>	49,5	1282	145	1,17	62,4	27,86	23,57	88,1
	<b>Été</b>	81,5	1486	222	1,41	94,5	34,57	31,34	137,9
	<b>Automne</b>	15,0	1070	44	0,64	16,6	9,94	5,63	28,6
	<b>Annuelle</b>	<b>44,6</b>	<b>1240</b>	<b>129</b>	<b>1,07</b>	<b>55,0</b>	<b>24,45</b>	<b>20,30</b>	<b>79,1</b>
<b>Lisier de porcs</b>	<b>Hiver</b>	11,3	33	14	0,06	1,3	0,40	0,28	1,9
	<b>Printemps</b>	24,1	469	79	0,58	29,9	11,70	11,20	40,3
	<b>Été</b>	59,0	1084	217	1,54	82,9	32,09	34,02	105,7
	<b>Automne</b>	9,7	174	35	0,39	11,5	4,95	4,19	16,5
	<b>Annuelle</b>	<b>23,6</b>	<b>449</b>	<b>79</b>	<b>0,60</b>	<b>29,5</b>	<b>11,60</b>	<b>11,23</b>	<b>39,6</b>
<b>Fumure minérale</b>	<b>Hiver</b>	8,2	447	32	0,23	8,2	3,82	3,20	11,9
	<b>Printemps</b>	18,5	1265	55	0,59	22,7	10,60	8,90	33,4
	<b>Été</b>	60,5	1191	194	1,12	74,7	28,40	27,92	99,6
	<b>Automne</b>	6,4	134	21	0,30	5,4	2,77	1,86	9,3
	<b>Annuelle</b>	<b>19,0</b>	<b>1090</b>	<b>58</b>	<b>0,57</b>	<b>23,0</b>	<b>10,39</b>	<b>8,90</b>	<b>33,4</b>

**Tableau B.13 : Charge des éléments totaux perdus dans l'eau des drains souterrains du champ de maïs-grain**

	Année 2002	Volume eaux (cm/ha)	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)	Ni (g/ha)
<b>Fumier de bovins</b>	Hiver	0,32	0,16	3	0,49	0,01	0,1	0,0	0,0	0,1
	Printemps	16,73	82,8	2144	241,9	1,95	104,3	46,6	39,4	147,5
	Été	1,90	15,5	283	42,3	0,27	18,0	6,6	6,0	26,3
	Automne	4,76	7,2	509	20,7	0,31	7,9	4,7	2,7	13,6
	<b>Total</b>	<b>23,70</b>	<b>105,6</b>	<b>2938</b>	<b>305,4</b>	<b>2,53</b>	<b>130</b>	<b>58</b>	<b>48</b>	<b>187</b>
<b>Lisier de porcs</b>	Hiver	0,63	0,71	2	0,87	0,00	0,1	0,0	0,0	0,1
	Printemps	17,58	42,3	825	138,2	1,02	52,5	20,6	19,7	70,7
	Été	1,46	8,6	158	31,7	0,23	12,1	4,7	5,0	15,4
	Automne	3,68	3,6	64	12,9	0,14	4,2	1,8	1,5	6,1
	<b>Total</b>	<b>23,35</b>	<b>55,2</b>	<b>1050</b>	<b>183,7</b>	<b>1,39</b>	<b>69</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>92</b>
<b>Fumure minérale</b>	Hiver	0,90	0,74	40	2,9	0,02	0,7	0,3	0,3	1,1
	Printemps	21,09	39,1	2668	116,0	1,24	47,9	22,4	18,8	70,3
	Été	1,53	9,3	182	29,7	0,17	11,4	4,3	4,3	15,2
	Automne	3,41	2,2	46	7,2	0,10	1,8	0,9	0,6	3,2
	<b>Total</b>	<b>26,93</b>	<b>51,3</b>	<b>2937</b>	<b>155,8</b>	<b>1,54</b>	<b>62</b>	<b>28</b>	<b>24</b>	<b>90</b>

Les Tableaux B.14 et B.15 présentent les concentrations moyennes pondérées et les charges d'ÉTM solubles perdus dans les drains dans le champ de maïs-grain. Pour tous les ÉTM, la concentration des éléments solubles est très inférieure aux concentrations en éléments totaux. Ceci nous indique que les ÉTM sont perdus aux drains principalement sous formes particulaires. Ce phénomène a également été observé dans ces parcelles pour le phosphore. Les formes solubles représentent une faible partie des pertes des ÉTM aux drains. Elles sont peu affectées par les modes de fertilisation. Elles varient selon les traitements de 2,72 à 3,75 g/ha pour le nickel, de 0,00 à 0,01 g/ha pour le plomb, de 0,03 à 0,18 g/ha pour le cobalt, de 0,02 à 0,17 g/ha pour le chrome, de 0,66 à 0,74 g/ha pour le cadmium, de 6,48 à 8,88 g/ha pour le zinc, de 1,60 à 2,86 g/ha pour le manganèse et de 5,18 à 5,90 g/ha pour le cuivre.

**Tableau B.14 : Concentrations moyennes pondérées des éléments solubles dans l'eau des drains souterrains du champ de maïs-grain**

Année 2002		Cu	Mn	Zn	Cd	Cr	Co	Pb	Ni
		(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)
<b>Fumier de bovins</b>	<b>Hiver</b>	2,07	0,25	1,49	0,34	0,030	0,07	0,002	0,62
	<b>Printemps</b>	2,36	1,21	2,06	0,28	0,003	0,05	0,000	1,72
	<b>Été</b>	2,05	0,54	5,20	0,32	0,001	0,00	0,000	2,07
	<b>Automne</b>	1,64	0,76	4,18	0,42	0,026	0,18	0,004	0,96
	<b>Annuelle</b>	<b>2,18</b>	<b>1,05</b>	<b>2,73</b>	<b>0,31</b>	<b>0,007</b>	<b>0,07</b>	<b>0,001</b>	<b>1,58</b>
<b>Lisier de porc</b>	<b>Hiver</b>	5,76	0,66	5,64	0,21	0,000	0,00	0,000	0,54
	<b>Printemps</b>	2,34	0,77	2,74	0,34	0,023	0,00	0,000	1,35
	<b>Été</b>	2,58	0,43	8,43	0,19	0,000	0,02	0,000	1,01
	<b>Automne</b>	2,85	0,39	6,73	0,27	0,005	0,06	0,002	0,51
	<b>Annuelle</b>	<b>2,53</b>	<b>0,69</b>	<b>3,80</b>	<b>0,32</b>	<b>0,018</b>	<b>0,01</b>	<b>0,000</b>	<b>1,17</b>
<b>Fumure minérale</b>	<b>Hiver</b>	1,97	0,36	3,09	0,21	0,000	0,02	0,090	0,62
	<b>Printemps</b>	1,88	1,13	2,59	0,25	0,077	0,00	0,000	1,08
	<b>Été</b>	3,21	0,36	6,48	0,21	0,008	0,02	0,000	1,24
	<b>Automne</b>	2,46	1,13	4,96	0,22	0,020	0,07	0,004	0,59
	<b>Annuelle</b>	<b>2,03</b>	<b>1,06</b>	<b>3,13</b>	<b>0,25</b>	<b>0,064</b>	<b>0,01</b>	<b>0,003</b>	<b>1,01</b>



**Tableau B.15 : Charge des éléments solubles perdus dans l'eau des drains souterrains du champ de maïs-grain**

	Année 2002	Volume eaux (cm/ha)	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)	Ni (g/ha)
<b>Fumier de bovins</b>	<b>Hiver</b>	0,32	0,07	0,01	0,05	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02
	<b>Printemps</b>	16,73	3,94	2,03	3,45	0,47	0,00	0,09	0,00	2,88
	<b>Été</b>	1,90	0,39	0,10	0,99	0,06	0,00	0,00	0,00	0,39
	<b>Automne</b>	4,76	0,78	0,36	1,99	0,20	0,01	0,09	0,00	0,46
	<b>Total</b>	<b>23,70</b>	<b>5,18</b>	<b>2,50</b>	<b>6,48</b>	<b>0,74</b>	<b>0,02</b>	<b>0,18</b>	<b>0,00</b>	<b>3,75</b>
<b>Lisier de porcs</b>	<b>Hiver</b>	0,63	0,36	0,04	0,36	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03
	<b>Printemps</b>	17,58	4,11	1,35	4,82	0,60	0,04	0,00	0,00	2,36
	<b>Été</b>	1,46	0,38	0,06	1,23	0,03	0,00	0,00	0,00	0,15
	<b>Automne</b>	3,68	1,05	0,14	2,48	0,10	0,00	0,02	0,00	0,19
	<b>Total</b>	<b>23,35</b>	<b>5,90</b>	<b>1,60</b>	<b>8,88</b>	<b>0,74</b>	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>	<b>2,73</b>
<b>Fumure minérale</b>	<b>Hiver</b>	0,90	0,18	0,03	0,28	0,02	0,00	0,00	0,01	0,06
	<b>Printemps</b>	21,09	3,97	2,39	5,47	0,53	0,16	0,00	0,00	2,28
	<b>Été</b>	1,53	0,49	0,05	0,99	0,03	0,00	0,00	0,00	0,19
	<b>Automne</b>	3,41	0,84	0,39	1,69	0,08	0,01	0,02	0,00	0,20
	<b>Total</b>	<b>26,93</b>	<b>5,47</b>	<b>2,86</b>	<b>8,43</b>	<b>0,66</b>	<b>0,17</b>	<b>0,03</b>	<b>0,01</b>	<b>2,72</b>

#### 7.1.1.4 Concentrations et charges en ÉTM des eaux de ruissellement

Dans les eaux de ruissellement, nous avons établi les concentrations en ÉTM des eaux de ruissellement pour chacun des événements allant de la fonte des neiges, débutant le 15 mars, au gel du sol vers le 15 novembre. Un échantillon d'eau proportionnel aux volumes des eaux ruisselées est recueilli pour chacun des événements survenus pendant cette période. Nous avons établi la concentration moyenne en ÉTM totaux et solubles des eaux de ruissellement correspondant à chacun des événements. Ces concentrations nous ont permis d'établir la concentration moyenne pondérée des eaux de ruissellement. La charge totale perdue est calculée en multipliant la concentration moyenne pondérée par l'épaisseur de la lame de ruissellement. Comme en 2002, on était à mettre au point un système de mesure du volume des eaux de ruissellement qui a plus ou moins bien fonctionné, il n'est pas possible d'avoir une valeur précise des volumes ruisselés dans nos parcelles. Comme d'autres équipes de recherche de l'IRDA ont procédé à des mesures de ruissellement sur le même sol au même site, il est possible de fixer un ordre de grandeur acceptable pour l'épaisseur de la lame de ruissellement. Une épaisseur de 4 cm est retenue pour établir les volumes de ruissellement dans la prairie et de 6 cm pour le champ de maïs-grain pour la période allant du 15 mars au 15 novembre. Les volumes ont été produits par 4 jours de fonte rapide des neiges, deux événements estivaux de précipitation intense et un événement automnal de précipitation

continue. L'automne particulièrement sec en 2002 a produit un ruissellement sans doute inférieur à la normale. L'arrêt des mesures a eu lieu le 15 novembre à cause du gel qui rend inopérants les systèmes de mesure des débits et d'échantillonnage des eaux.

- **Prairie**

Le Tableau B.16 présente les concentrations moyennes pondérées en ÉTM totaux des eaux ruisselées selon les différents modes de fertilisation dans la prairie. Les eaux de ruissellement sont relativement peu chargées de sédiments et les concentrations en ÉTM sont beaucoup plus faibles dans la prairie que dans le champ de maïs-grain. Elles sont plus faibles dans la parcelle avec la fumure minérale. La présence d'engrais de ferme semble donc de nature à accroître les pertes d'ÉTM dans les eaux de ruissellement. Le Tableau B.17 présente les charges d'ÉTM perdus dans les eaux de ruissellement dans la prairie. Elles ont varié de 1,8 à 4,4 g/ha pour le nickel, de 1,02 à 2,07 g/ha pour le plomb, de 0,39 à 1,05 g/ha pour le cobalt, de 1,00 à 2,82 g/ha pour le chrome, de 0,02 à 0,09 g/ha pour le cadmium, de 7,2 à 32,8 g/ha pour le zinc, de 15,2 à 39,6 g/ha pour le manganèse et de 2,16 à 21,25 g/ha pour le cuivre. La parcelle fertilisée au lisier de porcs a produit des charges plus élevées en cuivre, en zinc et en manganèse dans les eaux de ruissellement que les autres traitements. Ces éléments se retrouvent en grande quantité dans le lisier, ce qui pourrait expliquer ces résultats.

**Tableau B.16 : Concentration moyenne pondérée des éléments totaux ruisselés dans la prairie**

Traitements	Cu (µg/l)	Mn (µg/l)	Zn (µg/l)	Cd (µg/l)	Cr (µg/l)	Co (µg/l)	Pb (µg/l)	Ni (µg/l)
Fumure minérale	5,40	39	18	0,05	3,27	0,98	2,54	4,51
Fumier de bovins laitiers	9,21	59	55	0,21	6,17	2,03	3,74	9,68
Fumier de poulets	5,89	38	20	0,12	2,49	1,14	5,18	4,53
Lisier de porcs	53,1	99	82	0,19	7,05	2,63	4,59	11,04

**Tableau B.17 : Charge des éléments totaux ruisselés dans la prairie**

Traitements	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)	Ni (g/ha)
Fumure minérale	2,16	15,6	7,2	0,02	1,31	0,39	1,02	1,80
Fumier de bovins laitiers	3,68	23,6	22,0	0,09	2,47	0,81	1,49	3,87
Fumier de poulets	2,36	15,2	8,1	0,05	1,00	0,46	2,07	1,81
Lisier de porcs	21,3	39,6	32,8	0,07	2,82	1,05	1,83	4,42

De la même manière, nous avons établi les concentrations moyennes pondérées et les charges en ÉTM solubles des eaux de ruissellement (Tableau B.18 et Tableau B.19). Les charges en ÉTM solubles ont varié de 0,42 à 0,92 g/ha pour le nickel, de 0,03 à 0,46 g/ha pour le plomb, de 0 à 0,07g/ha pour le cobalt, de 0,15 à 0,51 g/ha pour le chrome, de 0,04 à 0,10 g/ha pour le cadmium, de 2,41 à 23,4 g/ha pour le zinc, de 0,82 à 5,50 g/ha pour le manganèse et de 1,30 à 2,82 g/ha pour le cuivre. La couverture végétale des prairies agit comme un filtre sur les eaux de ruissellement de sorte qu'elles sont peu chargées de matière en suspension. Les ÉTM particulaires sont peu présents dans les eaux de ruissellement des prairies. Ceci peut expliquer la quantité relativement faible des ÉTM perdus et la proportion relativement élevée des ÉTM solubles par rapport aux ÉTM totaux dans les eaux de ruissellement sous prairies. Les prairies perdent peu d'ÉTM totaux mais elles les perdent sous des formes relativement solubles.

**Tableau B.18 : Concentration moyenne pondérée des éléments solubles ruisselés dans la prairie**

Traitements	Cu (µg/l)	Mn (µg/l)	Zn (µg/l)	Cd (µg/l)	Cr (µg/l)	Co (µg/l)	Pb (µg/l)	Ni (µg/l)
Fumure minérale	3,26	2,06	6,02	0,19	0,37	0,00	0,34	1,04
Fumier de bovins laitiers	4,20	6,20	58,47	0,26	1,28	0,02	1,16	2,29
Fumier de poulets	4,21	2,40	6,93	0,11	0,40	0,00	0,26	1,28
Lisier de porcs	7,05	13,75	12,58	0,25	1,14	0,17	0,07	2,14

**Tableau B.19 : Charge des éléments solubles ruisselés dans la prairie**

Traitements	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)	Ni (g/ha)
Fumure minérale	1,30	0,82	2,41	0,07	0,15	0,00	0,13	0,42
Fumier de bovins laitiers	1,68	2,48	23,39	0,10	0,51	0,01	0,46	0,92
Fumier de poulets	1,69	0,96	2,77	0,04	0,16	0,00	0,10	0,51
Lisier de porcs	2,82	5,50	5,03	0,10	0,46	0,07	0,03	0,86

- **Maïs-grain**

Dans le champ de maïs-grain, deux parcelles seulement sont instrumentées pour recueillir les eaux de ruissellement. Il s'agit de la parcelle fertilisée avec la fumure minérale et celle avec le lisier de porcs. Le Tableau B.20 présente la concentration moyenne pondérée en ÉTM totaux des eaux de ruissellement du champ de maïs-grain. Les concentrations en ÉTM sont beaucoup plus élevées que celles de la prairie. Le maïs-grain, semé en rangs espacés de 75 cm, laisse à nu une grande superficie de sol pendant une bonne partie de la saison, ce qui rend cette culture vulnérable à l'érosion des sols.

**Tableau B.20 : Concentration moyenne pondérée des éléments totaux ruisselés dans le maïs-grain**

Traitements	Cu (µg/l)	Mn (µg/l)	Zn (µg/l)	Cd (µg/l)	Cr (µg/l)	Co (µg/l)	Pb (µg/l)	Ni (µg/l)
Lisier de porcs	133	2141	494	3,2	169	63	71	104
Fumure minérale	97	2011	373	3,1	162	60	68	100

Le Tableau B.21 présente la quantité des ÉTM totaux perdus par hectare pour une lame de ruissellement à 6 cm. Les charges en ÉTM totaux ruisselés ont varié de 60 à 62 g/ha pour le nickel, de 41 à 42 g/ha pour le plomb, de 36 à 38 g/ha pour le cobalt, de 97 à 101 g/ha pour le chrome, de 1,8 à 1,9 g/ha pour le cadmium, de 224 à 297 g/ha pour le zinc, de 1207 à 1284 g/ha pour le manganèse et de 58 à 80 g/ha pour le cuivre. Ces pertes relativement importantes d'ÉTM sont associées aux pertes de sols. La parcelle fertilisée avec la fumure minérale a fourni des pertes semblables à celle fertilisée avec du lisier de porcs pour tous les éléments sauf Cu, Mn et Zn pour lesquels les pertes sont plus élevées avec le lisier de porcs. Il semble que les modes de fertilisation puissent affecter les pertes de ces éléments. Le niveau des apports prolongés de lisier pourrait accroître les pertes de cuivre, de zinc et de manganèse en augmentant la teneur de ces métaux dans les sols. Ce phénomène concorde tout à fait avec ce qui a été observé pour le phosphore. Cet élément, fixé par le sol, se perd principalement par érosion des sols et le ruissellement de surface mais les apports d'engrais accroissent significativement les pertes. Les modèles utilisés pour prédire les pertes de phosphore pourraient donc être utiles pour estimer les risques de pertes des ÉTM.

**Tableau B.21 : Charge des éléments totaux ruisselés dans le maïs-grain**

Traitements	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)	Ni (g/ha)
Lisier de porcs	80	1284	297	1,9	101	38	42	62
Fumure minérale	58	1207	224	1,8	97	36	41	60

Les concentrations et les charges en ÉTM solubles (Tableau B.22 et Tableau B.23) ont également été établies. Les charges de ÉTM solubles perdus à l'hectare par ruissellement de surface dans le champ de maïs-grain ont varié de 1,8 à 1,9 g/ha pour le nickel, de 0,36 à 0,56 g/ha pour le plomb, de 0,22 à 0,24 g/ha pour le cobalt, de 0,68 à 1,30 g/ha pour chrome, de 0,12 à 0,16 g/ha pour le cadmium, de 3,4 à 15,1 g/ha pour le zinc, de 7 à 37 g/ha pour le manganèse et de 1,8 à 3,0 g/ha pour le cuivre. Elles sont supérieures pour le cuivre, le manganèse et le zinc dans la parcelle fertilisée avec le lisier de porcs. Soulignons que la fraction soluble est hautement disponible dans le milieu aquatique.

**Tableau B.22 : Concentration moyenne pondérée des éléments solubles ruisselés dans le maïs-grain**

Traitements	Cu	Mn	Zn	Cd	Cr	Co	Pb	Ni
-------------	----	----	----	----	----	----	----	----

	( $\mu\text{g/l}$ )	( $\mu\text{g/l}$ )	( $\mu\text{g/l}$ )	( $\mu\text{g/l}$ )	( $\mu\text{g/l}$ )	( $\mu\text{g/l}$ )	( $\mu\text{g/l}$ )	( $\mu\text{g/l}$ )
<b>Lisier de porcs</b>	5,1	61	25,2	0,27	1,1	0,36	0,60	2,9
<b>Fumure minérale</b>	2,9	12	5,7	0,19	2,2	0,40	0,94	3,2

**Tableau B.23 : Charge des éléments solubles ruisselés dans le maïs-grain**

Traitements	Cu (g/ha)	Mn (g/ha)	Zn (g/ha)	Cd (g/ha)	Cr (g/ha)	Co (g/ha)	Pb (g/ha)	Ni (g/ha)
<b>Lisier de porcs</b>	3,0	37	15,1	0,16	0,68	0,22	0,36	1,8
<b>Fumure minérale</b>	1,8	7	3,4	0,12	1,30	0,24	0,56	1,9



**ANNEXE C : PROTOCOLES ASSOCIÉS AUX ESSAIS ENZYMATIQUES**

---






## LISTE DES PROTOCOLES

Protocole 1 : Mesure de l'activité de la xylanase dans un sol .....	5
Protocole 2 : Mesure de l'activité de la $\beta$ -glucosidase basée sur la détermination de la production de p-nitrophénol.....	9
Protocole 3 : Mesure de l'activité de l'uréase dans un sol. ....	14
Protocole 4 : Mesure de l'activité de la protéase dans les sols.....	18
Protocole 5 : Mesure de l'activité de l'arylsulfatase dans un sol.....	22
Protocole 6 : Mesure de l'activité de la phosphatase dans un sol.....	26
Protocole 7 : Extraction de la biomasse d'un sol avec des solutions salines.....	31
Protocole 8 : Test de perturbation d'un sol par dessiccation à 60° ou 95°C .....	33
Protocole 9 : Test de perturbation par gel-dégel.....	36
Protocole 10 : Test de perturbation d'un sol par application de 2,4-D .....	39
Protocole 11 : Expérience détermination de l'effet du gel-dégel sur un sol contaminé au 2,4-D.....	41
Protocole 12 : Expérience détermination de l'effet d'une dessiccation à 60°C sur un sol contaminé au 2,4-D.....	44
Protocole 13 : Humidification préliminaire d'un sol et contamination au 2,4-D. Préparation des sols pour le stage au CEMAGREF du 8 au 19 décembre 2003.....	47
Protocole 14 : Extraction d'ADN d'un échantillon de sol.....	49
Protocole 15 : Amplification PCR.....	57
Protocole 16 : Séparation des fragments du gène 16S bactérien par la technique de DGGE..	61



		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : C-1		Nombre de pages : 5	
Version :		Date : 2	
Auteur(s): _____ _____			
Approuvé par :		Signatures :                      Date :	
Louise Deschênes _____		<input type="checkbox"/> _____	
Manon Leduc _____		_____	
Lucie Jean _____		<input type="checkbox"/> _____	
_____		_____	
_____		<input type="checkbox"/> _____	
_____		_____	

<b>Protocole 1 : Mesure de l'activité de la xylanase dans un sol</b>	
Mots clés : Xylanase	

**1. OBJECTIF**

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol. Les enzymes testés sont des représentants des cycles du carbone, azote, soufre et phosphore. Après la cellulase, la xylanase est l'enzyme la plus importante pour la dégradation primaire de la litière. Le xylane est un polysaccharide constituant des tissus de soutien des végétaux (gommages) et dont l'hydrolyse aboutit au D-xylose. La xylanase est produite par des bactéries et des champignons.

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

## 2. XYLANASE

### Matériel

- pH-mètre
- Balance
- 4 Erlenmeyers de 100 mL avec rubber stoppers
- 2 Ballons de 1 litre
- 1 Ballon de 500mL
- 1 ballon de 100 mL
- 2 ballons de 25 mL
- Papier aluminium
- Pipette de verre pour mesure de 60 mL
- anhydrous sodium acetate
- Acide acétique glacial
- xylane d'épeautre d'avoine (Serva 3800, oat spllets)
- anhydrous sodium carbonate
- potassium cyanide
- ferric ammonium sulfate
- sodium dodecyl sulfate
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré
- glucose anhydre

### 3. Préparation des solutions

#### Tampon Acétate (2M, pH 5,5) :

1. Dissoudre 164,06 g d'acétate de sodium anhydre (anhydrous sodium acetate) dans le l'eau distillée et diluer dans un volume total de 1 litre dans un ballon de 1 litre.
2. Pipeter 60 ml d'acide acétique glacial dans un ballon de 500 ml d'eau, ajuster à 500 mL.
3. Mélanger le 1 litre d'acétate de sodium avec 190 ml d'acide acétique et ajuster le pH de la solution avec l'acide à 5,5.

#### Solution de substrat (1,2% w/v) :

*Pour 1 essai avec 1 sol, il faut 60 mL de solution de substrat. Pour 1 essai :*

1. Peser 1,2g de xylane d'épeautre d'avoine (Serva 3800, oat spelts) dans un ballon de 100 mL suspendre dans la solution tampon et ajuster au volume avec le tampon.

#### Réactif A :

Pour 1 essai avec 1 sol et construction de la courbe de calibration, il faut 11 mL de réactif A :

1. Peser 400 mg de carbonate de sodium anhydre (anhydrous sodium carbonate).
2. Peser 22,5 mg de cyanide de potassium (potassium cyanide).
3. Mélanger dans un ballon de 25 mL, dissoudre avec de l'eau distillée et ajuster le volume avec l'eau distillée.

#### Réactif B :

Pour 1 essai avec 1 sol et construction de la courbe de calibration, il faut 11 mL de réactif B :

1. Peser 12,5 mg d'hexacyanoferrate (III) de potassium (potassium hexacyanoferrate (III)) dans un ballon de 25 mL et diluer avec de l'eau distillée, ajuster avec l'eau distillée.
2. Entreposer cette solution dans un contenant ambré.

#### Réactif C :

Pour 1 essai avec 1 sol et construction de la courbe de calibration, il faut 55 mL de réactif C :

1. Peser 150mg de sulfate d'ammonium ferreux (ferric ammonium sulfate) dans un ballon de 100 mL.
2. Peser 100mg de sodium dodecyl sulfate dans le même ballon de 100 mL.
3. Ajouter 90 ml d'eau distillée.
4. Ajouter 0,42 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.
5. Dissoudre à 50°C.
6. Après refroidissement ajuster à 100 mL avec de l'eau distillée.

#### Solution standard stock (250 µg glucose/mL):

1. Peser 0,25g de glucose anhydre dans un ballon de 1 litre dissoudre avec de l'eau.
2. Ajuster à 1 litre.

#### Standard de travail (25µg glucose/mL) :

1. Pipeter 10 mL de solution standard stock dans un ballon de 100 mL.
2. Ajuster le volume avec de l'eau distillée.

### 4. Méthodologie

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

#### Préparation du sol et incubation avec substrat

1. Peser 5 g de sol humide dans 4 erlenmeyers de 100 ml.
2. Ajouter 15mL de la suspension de substrat et 15 mL de tampon acétate dans 3 des erlenmeyers (échantillons).
3. Pipeter 15 mL de tampon acétate dans le dernier erlenmeyer (témoin).
4. Agiter les erlenmeyers brièvement et sceller avec des rubbers stoppers.
5. Incuber à **50°C** pour **24h**. en agitant à XX RPM.

#### Préparation du filtrat après incubation

1. Après l'incubation, pipeter 15 mL de la suspension de substrat dans le témoin seulement.
2. Filtrer (sur un filtre 0,45µm) et les échantillons le témoin immédiatement.
3. Pipeter 0,5 mL de filtrat et diluer à 20 ml d'eau distillée dans les tubes tests.

#### Analyses photométrique du filtrat

1. Pipeter 1 mL du filtrat dilué dans un tube test,
2. Ajouter 1 mL de réactif A et 1 mL de réactif B dans les tubes test, sceller.
3. Agiter et incuber pour **15 minutes** dans un bain d'eau bouillante.
4. Refroidir les tubes test pendant **5 minutes** dans un bain d'eau à la température de la pièce.
5. Ajouter 5 mL du réactif C, mélanger, et laisser pour **60 minutes** à la température de la pièce pour le développement de la couleur.

6. Dans les 30 minutes qui suivent, mesurer l'extinction à 690 nm avec un spectrophotomètre contre un blanc de réactif (pour opération du spectro, voir protocole XXX).

Courbe de calibration

Pour préparer la courbe de calibration

1. Pipeter 0 (blanc de réactif), 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 et 0.6 mL du standard de travail dans 7 tubes.
2. Diluer à 1 mL avec de l'eau distillée.
3. Traiter ces solutions comme un filtrat du sol (section 2.3.3).

Note : Les standards de calibration contiennent 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 et 15 µg de glucose.

Calculs

L'activité de la xylanase est exprimée en µg de glucose équivalent (GE) par gramme de sol sec et temps d'incubation. Le glucose équivalent est calculé avec la courbe de calibration.

$$(S-C) \cdot 30 \cdot 40 \cdot 100 = \mu\text{g GE} \cdot \frac{\text{g}^{-1} \text{ sol sec} \cdot 24\text{h}^{-1}}{5\% \text{ sol sec}}$$

S Valeur moyenne des échantillons (µg GE)

C Control (µg GE)

30 Volume du mélange d'incubation (mL)

40 Facteur de dilution du filtrat

5 Poids initial du sol (g)

100·%<sup>-1</sup> sol sec Facteur pour le sol sec.


Notes

Il faut continuellement vérifier le pH pendant la réaction de coloration. Après l'ajout des réactifs A et B, la valeur du pH devrait être supérieure à 10,5 pour atteindre une complète réduction lors de l'ébullition. Après l'addition du réactif C le pH doit se situer en dessous de 2. Des pH plus élevés pourraient provoquer une précipitation.

Pour disposer des réactifs contenant du cyanure, ces solutions peuvent être désactivées via l'oxydation avec du peroxyde d'hydrogène dans une solution alcaline.

**5. Référence(s)**

Schinner, F. et Mersi von W (1990) Xylanase-, CM cellulase- and invertase activity in soil, an improved method. *Soil Biology and Biochemistry*, 22:511-515.

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>
Protocole # : C-2	Nombre de pages : 5	
Version : 2	Date : 4	
Auteur(s): _____ _____		
Approuvé par : Louise Deschênes Manon Leduc Lucie Jean	Signatures : <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	Date :

<b>Protocole 2 : Mesure de l'activité de la <math>\beta</math>-glucosidase basée sur la détermination de la production de p-nitrophénol</b>
Mots clés : $\beta$ -glucosidase, activité enzymatique

## 1. OBJECTIF

Cette série de protocole (série 46 C) a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol. Les enzymes testés sont des représentants des cycles du carbone, azote, soufre et phosphore. Puisqu'il est très difficile d'extraire et de mesurer les enzymes contenus dans les sols, le principe sur lequel repose chacun des protocoles proposés est la mesure du potentiel d'activité enzymatique. C'est à dire, que l'on va introduire dans un échantillon de sol un substrat ciblé par l'enzyme testé et l'on mesure après une période d'incubation les produits de la transformation enzymatique.

La  $\beta$ -glucosidase est l'enzyme limitant la dégradation microbienne de la cellulose au glucose. La  $\beta$ -glucosidase a été détectée chez les microorganismes, les cellules de plantes et d'animaux. Elle est inactivée à des températures dépassant 70°C et démontre une corrélation importante avec le contenu en matière organique.

## 2. $\beta$ -GLUCOSIDASE

### 2.1 Matériels

- Incubator shaker (New Brunswick scientific, Innova 4000, U.S.A);
- pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ionmeter);
- Balance précision 0,0001 (Mettler toledo, AB204, Switzerland);
- Erlemeyers de 100 mL
- 3 ballons de 1 litre
- 2 ballons de 25 mL
- 5 béchers de 25 mL
- pipette pasteur
- Micropipette P5000, P1000
- Pipette graduée de 25mL
- Pipette graduée de 10 mL
- Cylindre gradué de 1L
- Bouteille ambrée de 1L
- Seringue graduée de 30 mL
- Filtre millipore non stériles de 0,45 $\mu$ m
- Disodium p-nitrophenyl- $\beta$ -D glucopiranoside (-20°C, dessicateur. Manipuler avec ventilation et sensible à la lumière)
- acide acétique concentré
- *tris(hydroxymethyl)aminomethane*
- NaOH
- Acide malique (brûle les muqueuses, manipuler avec ventilation)
- Acide borique
- Acide citrique monohydrate
- *p-nitrophenol*

### 2.2 Préparation des solutions

#### 2.2.1 NaOH (1M)

1. Peser 40 g de *NaOH* dans une cupule de plastique.
2. Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L et ajouter de l'eau distillée jusqu'à trait de jauge.

#### 2.2.2 Tampon Universel, solution stock

1. Dans un ballon de 1L, dissoudre dans 500 mL d'une solution de NaOH 1M, sous la hotte:
  - 12,1 g de tri (hydroxyméthylaminométhane)
  - 11,6 g d'acide malique
  - 12,8 g d'acide citrique anhydre
  - 6,3 g d'acide borique
2. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.
3. Garder cette solution à 4°C.



### 2.2.3 Solution de Chlorure de calcium $\text{CaCl}_2$ (0,5M)

1. Dans un ballon de 500 mL, peser 36,74g de  $\text{CaCl}_2$  dihydrate.
2. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Attention aux bulles quand on ajoute l'eau, il y a du chlore qui se libère, alors faire le mélange sous une hotte).

### 2.2.4 Solution d'hydroxyde de sodium (0.5M) : (même que pour sulfatase)

1. Peser 20 g de  $\text{NaOH}$  dans une cupule de plastique.
2. Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L et ajouter de l'eau distillée jusqu'à trait de jauge.

### 2.2.5 Solution standard stock ( 1 mg p-nitrophenol·mL<sup>-1</sup>): même que sulfatase

1. Peser 1g de *p-nitrophenol* dans une cupule de plastique.
2. Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L.
3. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.
4. Garder cette solution à 4°C dans un contenant ambré.

### 2.2.6 Standard de travail pour une courbe de calibration (20 µg p-nitrophenol·mL<sup>-1</sup>) :

1. Pipeter 1 mL avec une micropipette P1000 de la solution stock dans un ballon de 50 mL.
2. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.
3. Transvider dans un bécher.

### 2.2.7 Standard de calibration :

1. Pipeter avec la pipette P5000 (blanc) 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL du standard de travail dans des erlenmeyer de 50 mL.
2. Ajuster les volumes à 5 mL avec de l'eau distillée en pipetant dans le même ordre qu'au point précédent 5, 4, 3, 2, 1 et 0 mL avec une P5000.
3. Ajouter 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0,5M). Il est important d'ajouter le  $\text{CaCl}_2$  avant le  $\text{NaOH}$ .
4. Ajouter 4 ml avec une P5000 de solution d'hydroxyde de sodium (0,5M).
5. Filtrer sur des filtres 0,45 µm.
6. Les standards de calibration contiennent 0, 2, 4, 6, 8 et 10 µg de p-nitrophenol par mL.

### 2.2.8 Tampon universel acide (pH 6.0) :

1. Mélanger dans un bécher de 1L.  
200 mL de Tampon universel.  
500 mL d'eau distillée.
2. Ajuster le pH à 6,0 avec du HCl.
3. Transvider dans un ballon de 1 L et ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

### 2.2.9 Solution acide de substrat pour une analyse et une c. c. (25mM) :

1. Peser 0,47 g de *disodium p-nitrophényl* dans un ballon de 50mL.
2. Diluer dans le tampon acide et ajuster le volume au trait de jauge à 50 mL avec le tampon.
3. Préparer la solution le jour même.

ATTENTION : le substrat est sensible à la lumière et à la température.

## 3 Méthode

Les mesures sont effectuées en 4 étapes : 1) Il faut préparer le sol avec le substrat et l'incuber, 2) Préparation du filtrat qui contient le produit de l'activité de la glucosidase, 3) Traiter le filtrat avec un

réactif coloré pour mesure photométrique, 4) Préparation de la courbe de calibration pour effectuer les calculs. La méthode est la même que pour les deux types de phosphatase (acide ou alcaline) et que pour l'arylsulfatase. Il suffit d'utiliser le bon substrat et le bon tampon dans la section 2.3.1 préparation du sol et incubation avec substrat.

### 3.1 Préparation du sol et incubation avec substrat

1. Peser  $1,00\text{g} \pm 0,05$  de sol humide dans 3 erlenmeyers de 100 mL.
2. Avec une P5000, ajouter 4mL du tampon acide et 1 mL avec une P1000 de la solution de substrat correspondantes (acide ou basique) dans deux des 3 erlenmeyers (échantillons).
3. Avec une P5000, pipeter seulement 4 mL de tampon correspondant dans l'autre erlenmeyer (témoins).
4. Agiter brièvement et incuber **1h à 37°C dans l'incubateur.**

### 3.2 Préparation du filtrat après incubation

1. Avec une P1000, ajouter 1 mL de chlorure de calcium dans les 3 erlenmeyers. Attention il est très important d'ajouter le  $\text{CaCl}_2$  avant le NaOH.
2. Avec une P5000, ajouter 4 mL de NaOH (0,5M) dans les 3 erlenmeyers.
3. Avec une P1000, ajouter 1 mL de solution substrat correspondant dans les témoins.
4. À l'aide d'une dispensette de 100mL, ajouter 20 mL d'eau distillée dans les 3 erlenmeyers
5. Agiter les erlenmeyers, s'assurer que le pH est au-dessus de 10.
6. À l'aide d'une seringue graduée de 5 mL, prélever environ 3 mL du surnageant.
7. Ajouter un filtre millipore de  $0,45\ \mu\text{m}$  non stérile au bout de la seringue et filtrer et les échantillons le témoin immédiatement dans des cuvettes à lecture UV de 25 mL.

### 3.3 Analyses photométrique du filtrat

1. Mesurer l'extinction à **420 nm** avec un spectrophotomètre contre le blanc.

### 3.4 Courbe de calibration

1. Pipeter avec la pipette P5000 (blanc) 0, 1, 2, 3, 4 et 5 mL du standard de travail dans des éprouvettes jetables.
2. Ajuster les volumes à 5 mL avec de l'eau distillée en pipetant dans le même ordre qu'au point précédent 5, 4, 3, 2, 1 et 0 mL avec une P5000 dans les éprouvettes jetables.
3. Ajouter 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0,5M).
4. Ajouter 4 ml avec une P5000 de solution d'hydroxyde de sodium (0,5M).
5. Filtrer sur des filtres jetables.
6. Les standards de calibration contiennent 0, 2, 4, 6, 8 et 10  $\mu\text{g}$  de p-nitrophenol par mL de solution.

## 4 Calculs

Calculer les concentrations of p-nitrophenol (pNP) à partir des courbes de calibration.

$$\frac{(S-C) \cdot 30}{\% \text{ sol sec}} = \mu\text{g pNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec} \cdot \text{h}^{-1}$$

S valeur moyenne des échantillons ( $\mu\text{g pNP}$ )

C valeur moyenne des témoins ( $\mu\text{g pNP}$ )


30 / % ms      facteur pour matière sèche.

## 5      **Notes**

- Le substrat est sensible à la chaleur et à la lumière, les flacons doivent être recouverts d'un papier d'aluminium.
- Mesurer l'extinction dans les 6 premières heures.
- La courbe de calibration est linéaire jusqu'à 120 µg p-nitrophenol.
- L'ajustement du pH devrait se faire à 37°C puisque c'est la T° d'incubation.
- Utiliser plus ou moins de sol si l'activité sort de la courbe de calibration, ou est trop faible.
- Le CaCl<sub>2</sub> est ajouté afin d'éviter l'interférence que créent les substances humiques qui se dissolvent. Il prévient aussi la dispersion de l'argile. Un précipité blanchâtre se forme lorsque le NaOH est ajouté au CaCl<sub>2</sub>.

## 6      **Références**

- Eivazi, F.Tabatabai, M.A., 1990. Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 891-897.
- Strobl, W.Traunmüller, M., 1996b. B-glucosidase activity. In: Schinner, F.*et al.* (Eds.). *Methods in soil biology*. Berlin, Springer, pp. 198-200.

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : C-3		Nombre de pages :4	
Version :		Date : 2	
Auteur(s): _____ _____			
Approuvé par : Louise Deschênes Manon Leduc Lucie Jean		Signatures : _____ Date : _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	
<b>Protocole 3 : Mesure de l'activité de l'uréase dans un sol.</b>			
Mots clés : uréase, sol			

## 1. OBJECTIF

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol. Les enzymes testées sont des représentantes des cycles du carbone, azote, soufre et phosphore.

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

L'uréase catalyse l'hydrolyse de l'urée en  $\text{CO}_2$  et  $\text{NH}_3$  selon un mécanisme de réaction basé sur la formation de carbamate comme intermédiaire. Cette enzyme est très bien distribuée dans la nature, elle est présente dans les microorganismes, les plantes et les cellules animales. L'uréase dans le sol est étroitement liée à la matière organique et aux minéraux du sol. L'uréase est généralement dénaturée à  $70^\circ\text{C}$ .

## 2. Uréase

### 2.1 Matériels

- HCl 1M
- NaOH 3M
- Des filtres sans azote
- Test tubes
- 1 ballon de 2 litres
- 1 ballon de 50 mL

- 3 ballons de 1 litre
- 1 ballon de 25 mL
- 5 ballons de 100 mL
- 4 erlenmeyers de 100 mL
- $\text{NH}_4\text{Cl}$
- tetraborate de sodium
- urée
- KCl
- salicylate de sodium
- sodium nitro-prusside (sodium nitrofericyanide, à 4°C dans dessiccateur)
- dichloroisocyanurate de sodium (attention peu brûler, à manipuler avec ventilation, tenir loin du feu).

## 2.2 Préparation des solutions

### 2.2.1 NaOH (3M)

1. Dissoudre 120g de NaOH dans de l'eau distillée et diluer à 1L.

### 2.2.2 Tampon Borate (0,1 M, pH 10) :

1. Dans un ballon de 2 L (1L), dissoudre 57,2 g (28,6g) de *tetraborate de sodium* dans 1,5 L (0,75L) d'eau distillée.
2. Chauffer si nécessaire afin d'obtenir une dissolution complète.
3. Refroidir la solution à la température de la pièce, ajuster le pH à 10 avec du NaOH 3M.
4. Ajuster le volume à 2L avec de l'eau distillée.

### 2.2.3 Solution de substrat pour une analyse et une courbe de calibration (720 mM) :

1. Dans un ballon de 50 mL, dissoudre 2,16g d'*urée* dans de l'eau distillée.
2. Préparer ce réactif le jour même.

### 2.2.4 HCl (1M)

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

### 2.2.5 Solution de chlorure de potassium KCl (2M) :

1. Dissoudre 74,6g de KCl dans de l'eau distillée dans un ballon de 1L.
2. Avec une pipette de 10 mL, ajouter 10 mL d'HCl à 1M.
3. Ajuster le volume à 1L avec de l'eau distillée.
4. Garder cette solution quelques semaines seulement.

### 2.2.6 Solution de NaOH (0,3M) :

1. Dissoudre 12g de NaOH dans de l'eau distillée et diluer à 1L.
1. À l'aide d'une P5000, pipeter 2,5 mL de NaOH 3M dans un ballon de 25 mL.
2. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.

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

1. Dissoudre 4,25 g de *salicylate de sodium* dans un ballon de 25mL.

2. Ajouter 30 mg de sodium *nitro-prusside*.
3. Ajuster jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.
4. Préparer juste avant de l'utiliser.

#### **2.2.8 Réactif A (à préparer pendant incubation):**

1. Dans un bécher de 100 mL, mélanger 25 mL de NaOH 0,3M, 25 mL de solution de salicylate de sodium et 25 mL d'eau distillée.
2. Préparer ce réactif juste avant l'usage.

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

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

#### **2.2.10 Solution standard stock (1000µg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N ml<sup>-1</sup>):**

1. Dans un ballon de 1 L, dissoudre 3,8207g de NH<sub>4</sub>Cl dans de l'eau distillée et ajuster jusqu'au trait de jauge.
2. Garder cette solution à 4°C.

#### **2.2.11 Standards de calibration :**

1. Avec un P5000, pipeter 0 (blanc), 0,5, 0,75, 1 et 2.5 mL de solution stock dans des ballons de 50mL et ajuster le volume au trait de jauge avec la solution de chlorure de potassium.
2. Les standards contiennent 0, 10, 15, 20 et 25 µg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N mL<sup>-1</sup>.

### **2.3 Méthodologie**

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

#### **2.3.1 Préparation du sol et incubation avec substrat**

1. Peser 2,5 g de sol humide dans 3 erlenmeyer de 50 mL (2 échantillons et un témoins).
2. Avec une P5000, ajouter 1,25 mL de la solution de substrat et avec une P10mL, 10 mL de tampon borate dans deux erlenmeyers (échantillons).
3. Pipeter seulement 10 mL de tampon borate dans le troisième (témoin).
4. Agiter brièvement, sceller et incuber pour **2h à 37°C**.

#### **2.3.2 Préparation du filtrat après incubation**

1. Ajouter 15 mL de solution de chlorure de potassium dans tous les erlenmeyers et ajouter à l'aide d'une P5000 1,25 mL de substrat dans le témoin.
2. mélanger pendant 30 minutes sur un agitateur rotatif.
3. Filtrer le contenu des erlenmeyers à travers des filtres ne contenant pas d'azote.

#### **2.3.3 Analyses photométrique du filtrat**

1. Pipeter 0,5 mL de filtrat dans les éprouvettes jetables.
2. Ajouter 4,5 mL d'eau distillée dans les éprouvettes.
3. Ajouter 2,5 mL du réactif A dans les éprouvettes.
4. Ajouter 1 mL de réactif B (solution de dichloroisocyanurate) dans les éprouvettes.
5. Bien mélanger, laisser décanter pour 30 minutes à la température de la pièce.
6. Lecture à 685 nm.

### 2.3.4 Courbe de calibration

1. Traiter 0,5 mL des standards comme les filtrats de sol i.e. :
2. Ajouter 4,5 mL d'eau distillée dans les éprouvettes.
3. Ajouter 2,5 mL du réactif A dans les éprouvettes.
4. Ajouter 1 mL de réactif B (solution de dichlorosocyanurate) dans les éprouvettes.
5. Bien mélanger, laisser décanter pour 30 minutes à la température de la pièce.
6. Lecture à 685.
7. Les standards de calibration contiennent maintenant 0, 1, 1.5, 2 et 2.5  $\mu\text{g NH}_4\text{-N ml}^{-1}$ .

### 2.4 Calculs

Calculer les concentrations à partir de la courbe de calibration

$$\frac{(S-C) \cdot 10 \cdot D \cdot 100}{5 \cdot \% \text{ sol sec}} = \mu\text{g N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec} \cdot \text{h}^{-1}$$

S	valeur moyenne des échantillons ( $\mu\text{g N ml}^{-1}$ )
C	valeur moyenne des témoins ( $\mu\text{g N ml}^{-1}$ )
D	volume de l'extrait = 52.5 pour tamponnée (mL)
10	facteur de dilution du filtrat
5	poids initial du sol humide (g)
100 / % ms	facteur pour matière sèche.


### 2.5 Notes

- Si nécessaire, les filtrats peuvent être entreposés pendant une nuit à 4°C.
- La courbe de calibration est linéaire jusqu'à 3.5  $\mu\text{g N} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Si l'intensité de la couleur des filtrats n'est pas dans cette limite, ils doivent être dilués avec de l'eau distillée.
- Le complexe coloré est stable pendant 8 heures.

### 2.6 Références

Kandeler, E., 1996. Urease activity by colorimetric technique. In: Schinner, F. *et al.* (Eds.). *methods in soil biology*. Berlin, Springer, pp. 171-174.

Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* 6, 68-72.

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : C-4		Nombre de pages : 5	
Version : 2		Date : 2	
Auteur(s): _____ _____			
Approuvé par : Louise Deschênes Manon Leduc Lucie Jean		Signatures : _____ Date : _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	

### Protocole 4 : Mesure de l'activité de la protéase dans les sols

Mots clés : protéase

#### 1. OBJECTIF

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol. Les enzymes testés sont des représentants des cycles du carbone, azote, soufre et phosphore.

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

L'activité de la protéase a été détectée dans des microorganismes, des plantes des animaux. Elle est responsable de l'hydrolyse des protéines en polypeptides et des oligopeptides en acides aminés. Dans le sol, la protéase est présente dans des cellules actives, des cellules mortes, en tant qu'enzyme libre ou absorbé à la matière organique, inorganique et organominérale.

#### 2. Protéase

##### 2.1 Matériels

- Un agitateur rotatif
- HCl 1M



- NaOH 0,1 M
- 4 Ballons de 1 litre
- 2 ballons de 100 mL
- 1 ballon de 200 mL
- 1 bécher de 200 mL
- 1 ballon de 10 mL
- 5 erlenmeyers de 25 mL
- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
- Caseine
- $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (TCA)
- Carbonate de sodium
- Copper(II)sulfate pentahydrate
- Sodium potassium tartate ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
- Folin Ciocalteu's phenol reagent
- Tyrosine (frais et sec)

## 2.2 Préparation des solutions

### 2.2.1 Tampon tris (0.05M, pH 8,1) :

1. Peser 6,06g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane et transférer dans un ballon de 1L, dans 800 mL d'eau distillée.
2. Ajuster le pH à 8,1 avec 1M HCl (préparé dans le protocole PE46-C3) et diluer à 1L avec de l'eau distillée.
3. Garder la solution à 4°C.

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

1. Dans un ballon de 100 mL, peser 2g de caséine (sodium-salt, Sigma C-2649) dans un ballon suspendre dans le tampon tris, et ajuster le volume avec le tampon chaud.
2. Mélanger la suspension à 50°C jusqu'à ce que la caséine soit dissoute.
3. Préparer, ce réactif la journée même.

Pour le sodium caseinate : 2g dans de l'eau distillée chaude (50°C) dans un ballon de 100mL. (Kalef et Nannipieri, 1995)

### 2.2.3 Solution d'acide trichloroacétique (TCA, 0,92M) :

1. Peser 37,5 g de  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (TCA) dans un ballon de 250 mL.
2. Dissoudre et diluer jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

### 2.2.4 Réactif A, protéase :

1. Peser 50 g de carbonate de sodium (water-free) dans un ballon de 1L.
2. Ajouter 60 mL de NaOH 0,1M ou 6mL de NaOH 1M.
3. Dissoudre dans 600 mL d'eau distillée, ajuster le volume.
4. Garder la solution à 4°C au maximum 3 semaines.

### 2.2.5 Réactif B, protéase :

1. Peser 5 g de copper(II)sulfate pentahydrate (ou 1,6 g anhydre) dans un ballon de 1L.

2. Dissoudre et diluer avec de l'eau distillée.
3. Garder à 4°C au maximum 3 semaines.

#### **2.2.6 Réactif C, protéase :**

1. Peser 10 g de sodium potassium tartate ( $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ ) dans un ballon de 1L.
2. Dissoudre et diluer avec de l'eau distillée.
3. Garder à 4°C pour quelques jours.

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

1. Mélanger 100 mL de réactif A, 2 mL de réactif B et 2 mL de réactif C dans un bécher.
2. Préparer cette solution le jour même.

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

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

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

1. Peser 12,5 mg de tyrosine dans un ballon de 25 mL et dissoudre dans le tampon tris.
2. Si nécessaire, chauffer pour dissolution complète.
3. Ajuster au trait de jauge avec du tampon tris.
4. Garder la solution à 4°C pour quelques jours seulement.

#### **2.2.10 Standard de calibration :**

1. Pipeter 0, 0.2, 0.5, 1, 2 et 3 mL de la solution stock dans six éprouvettes jetables.
2. Ajuster les volumes à 5 mL avec le tampon tris, (ajouter dans le même ordre que précédemment : 5, 4.8, 4.5, 4, 3, 2 mL).
3. Ajouter 5 mL de solution de substrat.
4. et 5mL de solution TCA.
5. Les standards de calibration contiennent 0 (blanc), 100, 250, 500, 1000 et 1500 µg de tyrosine dans un volume de 15 mL.

### **3 Méthode**

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

#### **3.1 Préparation du sol et incubation avec substrat**

1. Peser 1g de sol humide dans trois erlenmeyers de 50 mL (2 échantillons et 1 témoins).
2. Ajouter 5 mL de solution substrat et 5 mL de tampon tris dans 2 erlenmeyers (échantillons).
3. Pipeter seulement 5mL de tampon tris dans le dernier (témoin).
4. Agiter les flacons brièvement, sceller avec des « rubber stoppers » et incuber pour **2h à 50°C sur un agitateur rotatif**.

#### **3.2 Préparation du filtrat après incubation**

1. Pipeter 5 mL (avec une P5000) de substrat dans le témoin.
2. Mélanger brièvement.
3. Ajouter 5 mL (avec une P5000) de TCA dans les 3 erlenmeyers.
4. Agiter brièvement, prélever 4 mL avec une seringue puis installer un filtre 0,45 µm au bout de la seringue et filtrer immédiatement.

### 3.3 Analyses photométrique du filtrat

1. Pipeter 2,5 mL (avec une P5000) de filtrat dans une éprouvette jetable.
2. Ajouter 3,75 mL (avec une P5000) de réactif alcali dans les éprouvettes jetables.
3. Bien mélanger.
4. Ajouter 2,5 mL (avec une P5000) de Folin Ciocalteu's phenol reagent, mélanger encore.
5. Si un précipité est formé après 1h, filtrer ou centrifuger la solution.
6. Laisser reposer 90 min à la température de la pièce pour le développement de la couleur.
7. Dans les prochaine 90 min mesurer l'extinction (absorbance) des standards, des échantillons et des témoins contre le blanc à 700 nm.

### 3.4 Courbe de calibration

1. Filtrer les standards de calibration.
2. Pipeter 2,5 mL (avec une P5000) de filtrat dans une éprouvette jetable.
3. Ajouter 3,75 mL (avec une P10 mL) de réactif alcali dans les éprouvettes jetables.
4. Bien mélanger.
5. Ajouter 2,5 mL (avec une P5000) de Folin Ciocalteu's phenol reagent, mélanger encore.
6. Si un précipité est formé après 1h, filtrer ou centrifuger la solution.
7. Laisser reposer 90 min à la température de la pièce pour le développement de la couleur.
8. Dans les prochaine 90 min mesurer l'extinction des standards, des échantillons et des témoins contre le blanc à 700 nm.

## 4 Calculs

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

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

S Valeur moyenne des échantillons (µg tyr)

C Control (µg tyr)

100·%<sup>-1</sup> sol sec Facteur pour le sol sec.


## 5 Notes :

- Il est possible de garder les filtrats à 4°C pendant 5h
- Si la concentration en tyrosine dépasse la courbe de calibration, réduire le temps d'incubation à 1h.
- Dans les témoins, la caséine (le substrat doit être ajouté immédiatement avant le TCA à la fin de l'incubation parce que la précipitation n'est pas complète si le substrat est ajouté après la solution acide.

## 2.6 Références

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

Tiré de Schinner et al. 1997.

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>
Protocole # : C-5	Nombre de pages : 4	
Version :	Date : 2	
Auteur(s): _____ _____		
Approuvé par : Louise Deschênes _____ Manon Leduc _____ Lucie Jean _____	Signatures : <input type="checkbox"/> _____ _____ <input type="checkbox"/> _____ _____ <input type="checkbox"/> _____ _____	Date : _____ _____ _____

**Protocole 5 : Mesure de l'activité de l'arylsulfatase dans un sol.**

Mots clés : arylsulfatase

**1. OBJECTIF**

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol. Les enzymes testés sont des représentants des cycles du carbone, azote, soufre et phosphore.

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

**2. Aryl sulfatase**

**2.1 Matériels**

- Incubator shaker (New Brunswick scientific, Innova 4000, U.S.A);
- pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ionmeter);

- Balance précision 0,0001 (Mettler toledo, AB204, Switzerland);
- 5 erlemeyers de 50 mL
- 3 ballons de 1 litre
- 2 ballons de 25 mL
- 5 béchers de 25 mL
- pipette pasteur
- Micropipette P5000, P1000
- Pipette graduée de 25mL
- Pipette graduée de 10 mL
- Cylindre gradué de 1L
- Bouteille ambrée de 1L
- Seringue graduée de 30 mL
- Filtre millipore non stériles de 0,45µm
- Sodium trihydrate
- Acide acétique concentré
- *Potassium-p-nitrophenylsulfate*
- NaOH
- *p-nitrophenol*

## 2.2 Préparation des solutions

### 2.2.1 Tampon Acétate (0.5 M, pH 5.8) :

1. Dans un ballon de 1L, dissoudre 64g d'acétate de *sodium trihydrate* dans 700 mL d'eau distillée ajouté à l'aide d'un cylindre gradué de 1L.
2. Ajuster le pH à 5.8 avec approximativement 2 mL d'acide acétique concentré pipeté goutte à goutte avec une pipette pasteur en agitant avec un barreau magnétique et en suivant l'évolution du pH avec le pH-mètre.
3. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.

### 2.2.2 Solution de substrat pour une analyse et une courbe de calibration (0.02M) :

1. Peser 128.75 mg de *potassium-p-nitrophenylsulfate* dans un ballon de 25mL.
2. Diluer dans le tampon acétate et ajuster le volume au trait de jauge à 25 mL avec le tampon.
3. Préparer la solution le jour même.

ATTENTION : le substrat est sensible à la lumière et à la température.

### 2.2.3 Solution d'hydroxyde de sodium (0.5M) :

1. Peser 20 g de *NaOH* dans une cupule de plastique.
2. Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L et ajouter de l'eau distillée jusqu'à trait de jauge.

### 2.2.4 Solution standard stock ( 1 mg p-nitrophenol-ml-1):

1. Peser 1g de *p-nitrophenol* dans une cupule de plastique.
2. Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L.
3. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.

4. Garder cette solution à 4°C dans un contenant ambré.

#### **2.2.5 Standard de travail pour une courbe de calibration (0.1mg p-nitrophenol·ml-1) :**

1. Pipeter 2.5 mL avec une micropipette P5000 de la solution stock dans un ballon de 25 mL.
2. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.
3. Transvider dans un bécher.

#### **2.2.6 Standard de calibration :**

1. Pipeter avec la pipette P5000 (blanc) 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL du standard de travail dans des béchers de 50 mL.
2. Ajuster les volumes à 5 mL avec de l'eau distillée en pipetant dans le même ordre qu'au point précédent 5, 4, 3, 2, 1 et 0 mL avec une P5000 dans les éprouvettes jetables.
3. Ajouter 25 mL d'eau distillée avec une pipette graduée de 25mL dans les béchers.
4. Pipeter 6 mL avec une micropipette P10mL des mélanges dans 6 éprouvettes jetables et ajouter 4 ml avec une P5000 de solution d'hydroxyde de sodium.
5. Les standards de calibration contiennent 0, 20, 40, 60, 80 et 100 µg de p-nitrophenol par 10 mL de solution.

### **3 Méthode**

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

#### **3.1 Préparation du sol et incubation avec substrat**

1. Peser 1g de sol humide dans cinq erlenmeyers de 50 mL.
2. Avec une P5000, ajouter 4mL du tampon acétate et 1 mL de la solution de substrat dans trois des 5 erlenmeyers (échantillons).
3. Avec une P5000, pipeter seulement 4 mL de tampon acétate dans les deux autres erlenmeyers (témoins).
4. Agiter brièvement et incuber **1h à 37°C dans l'incubateur shaker**.

#### **3.2 Préparation du filtrat après incubation**

1. À l'aide d'une pipette graduée de 25 mL, ajouter 25 mL d'eau distillée dans tous les erlemeyers.
2. Avec une P5000, ajouter 1 mL de solution substrat dans les témoins.
3. Agiter les erlenmeyers.
4. À l'aide d'une seringue graduée de 30 mL, prélever environ 15 mL du surnageant.
5. Ajouter un filtre millipore de 0,45 µm non stérile au bout de la seringue et filtrer et les échantillons et le témoin immédiatement dans des béchers de 25 mL.

#### **3.3 Analyses photométrique du filtrat Analyses photométrique du filtrat**

1. Prélever à l'aide d'une P5000 6 mL des filtrats et le déposer dans une éprouvette jetable.
2. Ajouter 4 mL d'hydroxyde de sodium à l'aide de la P5000.
3. Mesurer l'extinction à **420 nm** avec un spectrophotomètre contre le blanc.

#### **3.4 Courbe de calibration**

1. Pipeter avec la pipette P5000 (blanc) 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL du standard de travail dans des béchers de 50 mL.
2. Ajuster les volumes à 5 mL avec de l'eau distillée en pipetant dans le même ordre qu'au point précédent 5, 4, 3, 2, 1 et 0 mL avec une P5000 dans les éprouvettes jetables.

3. Ajouter 25 mL d'eau distillée avec une pipette graduée de 25mL dans les béchers.
4. Pipeter 6 mL avec une micropipette P10mL des mélanges dans 6 éprouvettes jetables et ajouter 4 ml avec une P5000 de solution d'hydroxyde de sodium.
5. Les standards de calibration contiennent 1, 20, 40, 60, 80 et 100 µg de p-nitrophenol par 10 mL de solution.
6. Mesurer l'extinction à **420 nm** avec un spectrophotomètre contre le blanc.

#### 4 Calculs

Calculer les concentrations of p-nitrophenol (pNP) à partir des courbes de calibration.

$$\frac{(S-C) \cdot 30 \cdot 100}{6 \cdot \% \text{ sol sec}} = \mu\text{g pNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec} \cdot \text{h}^{-1}$$


S	valeur moyenne des échantillons (µg pNP)
C	valeur moyenne des témoins (µg pNP)
30	volumes de l'extrait (mL)
10	facteur de dilution du filtrat
6	Filtrat de l'aliquot (mL)
100 / % ms	facteur pour matière sèche.

#### 5 Notes

- Le substrat est sensible à la chaleur et à la lumière, les flacons doivent être recouverts d'aluminium.
- Mesurer l'extinction dans les 6 premières heures.
- La courbe de calibration est linéaire jusqu'à 120 µg p-nitrophenol

#### 6 Références

Strobl, W. Traunmüller, M. , 1996a. Arylsulfatase activity. In: Schinner, F. *et al.* (Eds.). *Methods in soil biology*. Berlin, Springer, pp. 230-232.

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>
Protocole # : C-6	Nombre de pages : 5	
Version :	Date : 2	
Auteur(s): _____ _____		
Approuvé par : Louise Deschênes Manon Leduc Lucie Jean	Signatures : <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	Date : _____ _____ _____

### **Protocole 6 : Mesure de l'activité de la phosphatase dans un sol.**

Mots clés : phosphatase, enzymes, activité enzymatique

#### **1. OBJECTIF**

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol. Les enzymes testés sont des représentants des cycles du carbone, azote, soufre et phosphore.

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

La phosphatase est importante pour la nutrition des plantes. La phosphomonoestérase (autre nom de la phosphatase) peut avoir 2 pH optimum, c'est pour cela que l'on mesurera la phosphatase acide et la phosphatase alcaline.

#### **2. Phosphatase**

##### **2.1 Matériels**

- Incubator shaker (New Brunswick scientific, Innova 4000, U.S.A);
- pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ionmeter);
- Balance précision 0,0001 (Mettler toledo, AB204, Switzerland);



- 5 erlemeyers de 100 mL
- 3 ballons de 1 litre
- 2 ballons de 25 mL
- 5 béchers de 25 mL
- pipette pasteur
- Micropipette P5000, P1000
- Pipette graduée de 25mL
- Pipette graduée de 10 mL
- Cylindre gradué de 1L
- Bouteille ambrée de 1L
- Seringue graduée de 30 mL
- Filtre millipore non stériles de 0,45µm
- Disodium p-nitrophenyl (-20°C, dessiccateur. Manipuler avec ventilation et sensible à la lumière)
- Acide acétique concentré
- *Tris(hydroxymethyl)aminomethane*
- NaOH
- Acide malique (brûle les muqueuses, manipuler avec ventilation)
- Acide borique
- Acid citrique monohydrate
- *p-nitrophenol*

## 2.2 Préparation des solutions

### 2.2.1 NaOH (1M)

1. Peser 40 g de *NaOH* dans une cupule de plastique.
2. Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L et ajouter de l'eau distillée jusqu'à trait de jauge.

### 2.2.2 Tampon Universel, solution stock

1. Dans un ballon de 1L, dissoudre dans 500 mL d'une solution de NaOH 1M, sous la hotte:
  - 12.1 g de tri(hydroxymethylaminomethane)
  - 11.6 g d'acide malique
  - 12,8 g d'acide citrique anhydre
  - 6.3 g d'acide borique
2. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.
3. Garder cette solution à 4°C.

### 2.2.3 Solution de Chlorure de calcium CaCl<sub>2</sub> (0,5M)

1. Dans un ballon de 500 mL, peser 36,74g de CaCl<sub>2</sub> dihydrate.
2. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

(Attention aux bulles quand on ajoute l'eau, il y a du chlore qui se libère, alors faire le mélange sous une hotte).

#### **2.2.4 Solution d'hydroxyde de sodium (0.5M) : (même que pour sulfatase)**

1. Peser 20 g de *NaOH* dans une cupule de plastique.
2. Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L et ajouter de l'eau distillée jusqu'à trait de jauge.

#### **2.2.5 Solution standard stock ( 1 mg p-nitrophenol·ml-1): même que pour sulfatase**

1. Peser 1g de *p-nitrophenol* dans une cupule de plastique.
2. Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L.
3. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.
4. Garder cette solution à 4°C dans un contenant ambré.

#### **2.2.6 Standard de travail pour une courbe de calibration (20 µg p-nitrophenol·ml-1) :**

1. Pipeter 1 mL avec une micropipette P1000 de la solution stock dans un ballon de 50 mL.
2. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.
3. Transvider dans un bécher.

#### **2.2.7 Standard de calibration :**

1. Pipeter avec la pipette P5000 (blanc) 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL du standard de travail dans des erlenmeyer de 50 mL.
2. Ajuster les volumes à 5 mL avec de l'eau distillée en pipetant dans le même ordre qu'au point précédent 5, 4, 3, 2, 1 et 0 mL avec une P5000.
3. Ajouter 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0,5M). Il est important d'ajouter le  $\text{CaCl}_2$  avant le  $\text{NaOH}$ .
4. Ajouter 4 ml avec une P5000 de solution d'hydroxyde de sodium (0,5M).
5. Filtrer sur des filtres 0,45 µm.
6. Les standards de calibration contiennent 0, 2, 4, 6, 8 et 10 µg de p-nitrophenol par mL.

### **ACID PHOSPHOMONOESTERASE**

#### **2.2.8 Tampon universel acide (pH 6.5) :**

1. Mélanger dans un bécher de 1L :  
200 mL de Tampon universel  
500 mL d'eau distillée
2. Ajuster le pH à 6,5 avec du HCl.
3. Transvider dans un ballon de 1 L et ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

#### **2.2.9 Solution acide de substrat pour une analyse et une c. c. (115mM) :**

1. Peser 106,7 mg de *disodium p-nitrophényl* dans un ballon de 25mL.
2. Diluer dans le tampon acide et ajuster le volume au trait de jauge à 25 mL avec le tampon.
3. Préparer la solution le jour même.

ATTENTION : le substrat est sensible à la lumière et à la température.

### **ALCALINE PHOSPHOMONOESTERASE**

#### **2.2.10 Tampon universel basique (pH 11) :**

1. Mélanger dans un bécher de 1L :  
200 mL de Tampon universel  
500 mL d'eau distillée
2. Ajuster le pH à 11 avec du NaOH.
3. Transvider dans un ballon de 1 L et ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

#### **2.2.11 Solution acide de substrat pour une analyse et une c. c. (115mM) :**

1. Peser 106,7 mg de *disodium p-nitrophényl* dans un ballon de 25mL.
2. Diluer dans le tampon basique et ajuster le volume au trait de jauge à 25 mL avec le tampon.
3. Préparer la solution le jour même.

ATTENTION : le substrat est sensible à la lumière et à la température.

### 3 Méthode

Les mesures sont effectuées en 4 étapes : 1) Il faut préparer le sol avec le substrat et l'incuber, 2) Préparation du filtrat qui contient le produit de l'activité de la phosphatase, 3) Traiter le filtrat avec un réactif coloré pour mesure photométrique, 4) Préparation de la courbe de calibration pour effectuer les calculs. La méthode est la même pour les deux types de phosphatase (acide ou alcaline). Il suffit d'utiliser le bon substrat et le bon tampon dans la section 2.3.1 préparation du sol et incubation avec substrat.

#### 3.1 Préparation du sol et incubation avec substrat

1. Peser 1,00g  $\pm$  0,05 de sol humide dans 3 erlenmeyers de 100 mL.
2. Avec une P5000, ajouter 4mL du tampon correspondant (acide ou basique) et 1 mL avec une P1000 de la solution de substrat correspondantes (acide ou basique) dans deux des 3 erlenmeyers (échantillons).
3. Avec une P5000, pipeter seulement 4 mL de tampon correspondant dans l'autre erlenmeyer (témoins).
4. Agiter brièvement et incuber **1h à 37°C dans l'incubateur.**

#### 3.2 Préparation du filtrat après incubation

1. Avec une P1000, ajouter 1 mL de chlorure de calcium dans les 3 erlenmeyers. Attention il est très important d'ajouter le  $\text{CaCl}_2$  avant le NaOH.
2. Avec une P5000, ajouter 4 mL de NaOH (0,5M) dans les 3 erlenmeyers.
3. Avec une P1000, ajouter 1 mL de solution substrat correspondant dans les témoins.
4. À l'aide d'une dispensette de 100mL, ajouter 90 mL d'eau distillée dans les 3 erlenmeyers.
5. Agiter les erlenmeyers.
6. À l'aide d'une seringue graduée de 5 mL, prélever environ 3 mL du surnageant.
7. Ajouter un filtre millipore de 0,45  $\mu\text{m}$  non stérile au bout de la seringue et filtrer et les échantillons le témoin immédiatement dans des cuvettes à lecture UV de 25 mL.

#### 3.3 Analyses photométrique du filtrat Analyses photométrique du filtrat

1. Mesurer l'extinction à **420 nm** avec un spectrophotomètre contre le blanc.

#### 3.4 Courbe de calibration

1. Pipeter avec la pipette P5000 (blanc) 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL du standard de travail dans des éprouvettes jetables.
2. Ajuster les volumes à 5 mL avec de l'eau distillée en pipetant dans le même ordre qu'au point précédent 5, 4, 3, 2, 1 et 0 mL avec une P5000 dans les éprouvettes jetables.
3. Ajouter 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0,5M).
4. Ajouter 4 ml avec une P5000 de solution d'hydroxyde de sodium (0,5M).
5. Filtrer sur des filtres.
6. Les standards de calibration contiennent 0, 2, 4, 6, 8 et 10  $\mu\text{g}$  de p-nitrophenol par mL de solution.

#### 4 Calculs

Calculer les concentrations of p-nitrophenol (pNP) à partir des courbes de calibration.

$$\frac{(S-C) \cdot 10 \cdot 100}{\% \text{ sol sec}} = \mu\text{g pNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec} \cdot \text{h}^{-1}$$


S	valeur moyenne des échantillons ( $\mu\text{g pNP}$ )
C	valeur moyenne des témoins ( $\mu\text{g pNP}$ )
10	facteur de dilution du filtrat
100 / % ms	facteur pour matière sèche.

#### 5 Notes

- Le substrat est sensible à la chaleur et à la lumière, les flacons doivent être recouverts d'aluminium.
- Mesurer l'extinction dans les 6 premières heures.
- La courbe de calibration est linéaire jusqu'à 120  $\mu\text{g p-nitrophenol}$ .
- L'ajustement du pH devrait se faire à 37°C puisque c'est la T° d'incubation.
- Utiliser plus ou moins de sol si l'activité sort de la courbe de calibration, ou est trop faible.
- Le  $\text{CaCl}_2$  est ajouté afin d'éviter l'interférence que créent les substances humiques qui se dissolvent. Il prévient aussi la dispersion de l'argile. Un précipité blanchâtre se forme lorsque le NaOH est ajouté au  $\text{CaCl}_2$ .
- Une corrélation négative entre l'activité de la phosphatase et le P disponible a été observée dans des sables et dans des sols de forêts.
- La phosphatase n'est pas excrétée par les plantes et est donc produite par la faune et la microflore des sols.

#### 6 Références

Eivazi, F. Tabatabai, M.A., 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 9, 167-172.

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>
Protocole # :	Nombre de pages :2	
Version :	Date :16/04/02	
Auteur(s):	_____	
	_____	
Approuvé par :	Signatures :	Date :
Louise Deschênes	<input type="checkbox"/> _____	_____
Manon Leduc	<input type="checkbox"/> _____	_____
	<input type="checkbox"/> _____	_____

<b>Protocole 7 :           Extraction de la biomasse d'un sol avec des solutions salines</b>
Mots clés :    NaCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , compte microbien

## 1.    **OBJECTIF**

Kingsley et Bohlool (1981) exposent l'efficacité d'extraction de plusieurs solutions salines et en arrive à la conclusion qu'une solution de 0,1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> est bien plus performante qu'une simple solution de NaCl en ce qui a trait à l'extraction de la biomasse d'un sol. L'objectif de ce protocole est de vérifier ce résultat avec nos méthodes d'extraction avec billes de verre et avec lecture par microscopie fluorescente *BacLight*<sup>TM</sup>. Le protocole présenté est très succinct puisqu'il utilise les méthodes d'extraction et de dilutions semblables à ceux de la méthode NPP et considère l'utilisateur familiarisé avec ce genre de manipulation.

## 2.    **MATÉRIEL**

- Solution NaCl (8,5 g/l)
- Solution (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1M ou 13,2g/L)
- 1 x Bouteille de lait contenant 95 mL de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M et 30 billes de verre stérilisée
- 4 x Bouteilles de lait contenant 90 mL de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M stérilisées

- 1 x Bouteilles de lait contenant 95 mL de Solution saline 8,5 g/L NaCl et 30 billes de verre stérilisées
- 4 x Bouteilles de lait contenant 90 mL de Solution saline 8,5 g/L NaCl stérilisées
- 0,7 g de Flocculant : [Ca(OH)<sub>2</sub> et MgCO<sub>3</sub> dans une proportion 2 :5 w/w]

### 3. MÉTHODOLOGIE

#### 3.1. Sous la hotte biologique :

Peser 10g de sol et l'introduire dans la bouteille contenant les billes de verre et le NaCl.

Peser 10g de sol et l'introduire dans la bouteille contenant les billes de verre et le (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

#### 3.2. Brasser 30 min sur le « wrist action ».

#### 3.3. Sous la hotte biologique, ajouter 0,7g de flocculant dans la bouteille de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mélanger et laisser se déposer pendant 1h.

#### 3.4. Sous la hotte biologique, procéder aux dilutions pour les deux extractions.

#### 3.5. Procéder aux protocoles Baclight PE 42-F pour les dilutions adéquates.

### 4. RÉFÉRENCE(S)

Kingsley, M.T.Bohlool, B.B., 1981. Release of Rhizobium spp. from tropical soils and recovery for immunofluorescence Enumeration. Applied and Environmental Microbiology 42, 241-248.

### 5. Résultats

Fait avec des NPP:


Résultats bruts :

Dilutions	nombre de positifs NaCl	nombre de positifs (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPOH
-4	5	5
-5	5	2
-6	4	1
-7	2	0
-8	0	0
-9	0	0
-10	0	0
-11	0	0

pois dans la solution NaCl : 9,7433 g

Poids dans la solution (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPOH : 9,4450g

% humidité :

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>
Protocole # :	Nombre de pages :3	
Version :1	Date :16/11/02	
Auteur(s):	_____	
	_____	
Approuvé par :	Signatures :	Date :
_____	<input type="checkbox"/> _____	_____
_____	<input type="checkbox"/> _____	_____
_____	<input type="checkbox"/> _____	_____

<b>Protocole 8 :      Test de perturbation d'un sol par dessiccation à 60° ou 95°C</b>
Mots clés :            dessiccation, perturbation, enzymes, stabilité

## 1. OBJECTIF

L'assèchement d'un sol représente une faible perturbation puisque la majorité des bactéries y sont résistante. De plus, la dessiccation d'un sol à température ambiante (air drying) est une méthode de conservation d'échantillons pour l'étude des enzymes extracellulaires (Choromanska and DeLuca, 2002). C'est en fait l'application d'une température « extrême » qui représente une perturbation autant pour la flore microbienne que pour la stabilité des enzymes non-immobilisés. Cette perturbation est moins représentative de la « vie de tous les jours » des sols, mais se rapproche de l'effet d'un incendie. Les incendies de faible intensité peuvent induire une température de 160°C aux sols de surface (Choromanska and DeLuca, 2002). Toutefois, on constate à cette température, un impact sur la composition chimique des sols.

À des températures supérieures à 50°C, les microorganismes thermo-sensibles vont être majoritairement tués. À plus de 70°C, c'est la végétation qui est directement touchée. Schinner (1983) propose d'exposer le sol à 95°C pour un séchage optimal sans que le contenu chimique du sol soit affecté. C'est pourquoi cette température est retenue pour les essais. La température de 60°C sera aussi utilisée, elle se situe entre les deux bornes de 50 et 70°C, représente une température que l'on

retrouve à quelques centimètre de la surface lors d'un incendie et aussi une température qu'atteint le sol lors de canicules.

Résumé du protocole :

Les tests sont effectués sur les trois mélanges de sol. Deux températures seront testées, 60°C et 95°C. Deux témoins seront effectués, un biotique et l'autre abiotique. Le témoin biotique ne subira pas de période de chauffage. Le témoin abiotique consistera en un sol irradié, dont la flore aura été tuée. Celui-ci subira les périodes de chauffage et représentera la persistance des enzymes initiaux extra et intracellulaires.

Après la période prescrite de chauffage, les échantillons de sols sont ré-humidifiés rapidement à 60% de leur CRC puis incubés à la noirceur à 20°C. Dès que les sols ont retrouvé leur teneur en eau initiale, les mesures de densité microbiennes ainsi que des potentiels d'activité enzymatiques sont faites à intervalles réguliers (24h, puis 48h après la période de récupération rapide).

## 2. MATÉRIEL

En plus de la verrerie et du matériel nécessaire aux analyses enzymatiques et BacLight :

- 6 pots Masson par sol à l'essai
- Un four allant à 95°C
- Du sol stérilisé par irradiation
- Eau stérile
- Balance
- Papier d'aluminium
- 

## 3. MÉTHODOLOGIE

Note: Préalablement déterminer la CRC et le contenu en eau du sol

### 3.1 Étapes d'expérimentation

Note 1: Le suivi de l'activité enzymatique ainsi que de la densité microbienne (méthode *BacLight*<sup>TM</sup>) sont effectués tout au long de l'essai.

Note 2: La même méthodologie est utilisée pour les 2 températures testées: 60 °C et 95°C

1. Introduire 300 g de sol dans 6 bocaux ( ABC sont les triplicatas qui seront perturbés et DEF sont les triplicatas qui ne subiront pas de perturbation).
2. Prendre les poids secs afin de déterminer l'eau qu'il faudra ajouter afin de les amener à une concentration en eau de 60% de CRC.
3. Après avoir vérifié que l'activité enzymatique des sols est stable (2 points de mesure) procéder à la dessiccation au four.
4. Peser les bocaux ABC avant de les mettre au four et utiliser des supports en métal pour maintenir les bocaux penchés, sans leurs couvercles, dans le four (afin d'optimiser la surface de contact entre le sol et l'air). Garder le four à 95°C ou 60°C pendant 24 heures
5. Pour le témoin abiotique :
  - 5.0 Introduire le sol dans le bocal stérilisé dans une atmosphère stérile.
  - 5.1 Stériliser des bouchons de mousse à l'autoclave
  - 5.2 Nettoyer le four (maintenant froid!) à l'aide d'éthanol pour tenter d'éliminer le plus possible les sources de contamination



- 5.3 Placer les bouchons de mousse pour remplacer le couvercle du bocal et placer le bocal dans le four à 95°C ou 60°C. Laisser sécher 24h au four.
6. Réhumidification : Sortir les bocaux du four et les laisser refroidir dans la hotte biologique stérilisée afin d'éviter toute source de contamination par l'air. Une fois les bocaux refroidis, les peser afin de déterminer le poids perdu en eau. Utiliser de l'eau distillée stérile pour rajouter au sol ce qu'il a perdu d'eau durant sa période au four.
  7. Tout de suite après la réhumidification, prendre une mesure de l'activité enzymatique puis de la densité bactérienne, ainsi qu'une mesure de poids sec et un échantillon pour analyse DGGE.
  8. Continuer à prendre les mesures d'activité enzymatique selon l'horaire décrite au point 3.2 par la suite. Puis mesure de densité bactérienne et DGGE aux moments clefs de la récupération.

### 3.2 Horaire d'échantillonnage

<b>vendredi</b> humidification des sols	<b>samedi</b>	<b>dimanche</b>	<b>lundi</b> échantil.	<b>mardi</b> échant. perturbation	<b>mercredi</b> réhumidification échantil.	<b>jeudi</b> échantil.
<b>vendredi 2</b> échant.	<b>samedi 2</b>	<b>dimanche 2</b>	<b>lundi 2</b> échantil.	<b>mardi 2</b>	<b>mercredi 2</b> échantil.	<b>jeudi 2</b>
<b>vendredi 3</b> échantil.						

### 4. RÉFÉRENCE(S)

- Utilisation des protocoles PSO A7, PSO A23, PE 48D, PE 48E, PE 43 H, PE46 C2 à PE46 C6
- Choromanska, U.DeLuca, T.H., 2002. Microbial activity and nitrogen mineralization in forest mineral soils following heating: evaluation of post-fire effects. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 263-271.
- Schinner, F., 1983. Litter decomposition, CO<sub>2</sub>-release and enzyme activities in a snowbed and on a windswept ridge in an alpine environment. *Oecologia* 59, 288-291.
- Tabatabai, M.A. , 1994. Soil Enzymes. In: Weaver, R. W.*et al.* (Eds.). *Methods of Soil Analysis: Part 2 - Microbiological and Biochemical Properties..* Winsconsin, SSSA, pp. 775-833.


### 5. RECOMMANDATION(S)

Remarque au sujet des témoins abiotiques: **L'irradiation dénature les enzymes, on a donc pas une mesure de l'activité extracellulaire** (Tabatabai, 1994).

Remarque sur la prise des poids secs:

Le fait de chauffer le sol peut désactiver les enzymes présents mais peut aussi modifier la structure chimique des contaminants (exemple : le 2,4-D commence à être instable à 50°C).

Notre méthode de mesure de poids sec se fait peut-être à trop haute température et une partie du carbone volatil pourrait quitter le sol. Je propose de faire sécher les sols à basse température longtemps, jusqu'à stabilisation de la masse et puis de rajouter une quantité connue d'eau pour ensuite effectuer la mesure telle que décrite dans le protocole PSO A7 pour la mesure du poids sec. S'il y a une différence de poids entre avant l'ajout d'eau et après le séchage à 105°C c'est qu'il y a autre chose que l'eau qui est partie.

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # :		Nombre de pages :3	
Version :1		Date :16/11/02	
Auteur(s): _____ _____			
Approuvé par :		Signatures :                      Date :	
_____		<input type="checkbox"/> _____	
_____		<input type="checkbox"/> _____	
_____		<input type="checkbox"/> _____	

**Protocole 9 : Test de perturbation par gel-dégel**

Mots clés : gel-dégel

**1. OBJECTIF**

L'absence de neige durant des périodes de gel entraîne des températures du sol sous le point de congélation. Une telle situation représente un stress naturel sur la flore microbienne de ce sol.

Des essais préliminaires devront être effectués afin de déterminer la température ainsi que la période de gel qui constituent une perturbation plausible pour le climat local. Au Canada, des essais de gel-dégel sont effectués sur les matériaux qui constituent les routes et autoroutes afin de vérifier leur solidité et durabilité. Ces tests sont effectués à des températures de -20°C (gel) et de 20°C (dégel) (Simonsen and Isacson, 2001). Il arrive toutefois que cette température baisse jusqu'à -30°C pour une courte période.

Résumé du protocole :

Deux témoins seront effectués, un biotique et l'autre abiotique. Le témoin biotique ne subira pas de période de gel. Le témoin abiotique consistera en un sol irradié, dont la flore aura été tuée. Celui-ci subira les périodes de gel et représentera la persistance des enzymes initiaux extra et intra cellulaires.

Après la période prescrite de gel, les échantillons de sols sont incubés à la noirceur à 20°C jusqu'à ce qu'ils atteignent la température de la pièce. Les mesures de densité microbiennes ainsi que des potentiels d'activité enzymatiques sont ensuite faites à intervalles réguliers (24h, puis 48h après la période de récupération rapide).

**2. MATÉRIEL**

En plus de la verrerie et du matériel nécessaire aux analyses enzymatiques et BacLight :

- 6 pots Masson par sol à l'essai
- Un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$
- Du sol stérilisé par irradiation
- Eau stérile
- Balance

### 3. MÉTHODOLOGIE

Note 1: La perturbation sera suivie par le suivi de l'activité enzymatique (PE 46 C2-6), ainsi que de la densité microbienne (méthode BacLight™).

Note 2: Déterminer préalablement la CRC et le contenu en eau du sol

#### 3.1 Perturbation gel-dégel

1. Introduire 300 g de sol dans 6 bocaux (ABC sont les triplicatas qui seront perturbés et DEF sont les triplicatas qui ne subiront pas de perturbation).
2. Prendre les poids secs afin de déterminer l'eau qu'il faudra ajouter afin de les amener à une concentration en eau à 60% de la CRC.
3. Après avoir vérifié que l'activité enzymatique des sols est stable (2 points de mesure) procéder au gel.
4. Laisser les bocaux fermés hermétiquement dans le congélateur à  $20^{\circ}\text{C}$  pendant 24h.
5. Sortir les bocaux et les laisser dégelé à la température de la pièce. Après 4 heures, le sol devrait être dégelé et à la température de la pièce. Procéder à la mesure de l'activité enzymatique, compte microbien DGGE et poids sec.
6. Continuer à prendre les mesures d'activité enzymatique de façon journalière par la suite. Puis mesure de densité bactérienne et DGGE aux moments clefs de la récupération.

#### 3.2 Horaire d'échantillonnage

<b>vendredi</b> humidification des sols	<b>samedi</b>	<b>dimanche</b>	<b>lundi</b> échantil.	<b>mardi</b> échant. perturbation	<b>mercredi</b> réhumidification échantil.	<b>jeudi</b> échantil.
<b>vendredi 2</b> échant.	<b>samedi 2</b>	<b>dimanche 2</b>	<b>lundi 2</b> échantil.	<b>mardi 2</b>	<b>mercredi 2</b> échantil.	<b>jeudi 2</b>
<b>vendredi 3</b> échantil.						

### 4. RÉFÉRENCE(S)


Utilisation des protocoles PSO A7, PSO A23, PE 48D, PE 48E, PE 43 H, PE46 C2 à PE46 C6

Simonsen, E. Isacsson, U., 2001. Soil behavior during freezing and thawing using variable and constant confining pressure triaxial tests. *Canadian Geotechnical Journal* 38, 863-875.

Tabatabai, M.A., 1994. Soil Enzymes. In: Weaver, R. W. *et al.* (Eds.). *Methods of Soil Analysis: Part 2 - Microbiological and Biochemical Properties*. Winconsin, SSSA, pp. 775-833.

## 5. RECOMMANDATION(S)

Remarque au sujet des témoins abiotiques: **L'irradiation dénature les enzymes, on a donc pas une mesure de l'activité extracellulaire** (Tabatabai, 1994).

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>
Protocole # : G	Nombre de pages :2	
Version :1	Date : 16/11/02	
Auteur(s): _____ _____		
Approuvé par : Louise Deschênes _____ Manon Leduc _____ _____	Signatures : <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	Date : _____ _____ _____
<b>Protocole 10 : Test de perturbation d'un sol par application de 2,4-D</b>		
Mots clés : stabilité enzymatique, perturbation, 2,4-D		

### 1. OBJECTIF

La méthode d'évaluation de la stabilité enzymatique d'un sol est basée sur le phénomène de perturbation de la flore. Un mode de perturbation adéquat est donc essentiel à la méthode. Ce protocole s'applique à une perturbation sous forme d'application de 2,4-D.

### 2. MATÉRIEL

En plus de la verrerie et du matériel nécessaires aux analyses :

- 6 pots Masson
- Hotte biologique
- 2,4-D, grade technique
- Eau stérile
- Balance

### 3. MÉTHODOLOGIE

Note 1: Pour ces essais de perturbation, stériliser les 6 pots maçon de 1L dans l'autoclave ainsi que 1 L d'eau distillée.

Note: Préalablement détermine la CRC et le contenu en eau du sol

### 3.1 Perturbation par contamination au 2,4-D :

1. Introduire 300 g de sol dans 6 bocaux (ABC sont les triplicatas qui seront perturbés et DEF sont les triplicatas qui ne subiront pas de perturbation).
2. Prendre les poids secs afin de déterminer l'eau qu'il faudra ajouter afin de les amener à une concentration en eau de 60% de CRC.
3. Après avoir vérifié que l'activité enzymatique des sols est stable (2 points de mesure, une mesure de la densité bactérienne au dernier point) procéder à la dessiccation de tous les bocaux à l'air ambiant dans la hotte biologique à l'aide des supports d'aluminium.
4. S'assurer de prendre le poids des bocaux avant la dessiccation, puis après.
5. La réhumidification se fait avec une solution de 2,4-D.

#### 5.1 Préparation de la solution de 2,4-D (la dissolution est lente, environ une journée)

- 1 Peser 300 mg de 2,4-D
- 2 Introduire le 2,4-D dans un bécher de 500mL, ajouter 400 mL d'eau distillée ajouter un bâton agitateur magnétique. Placer sur une plaque chauffante magnétique et chauffer légèrement en agitant la solution (sous la hotte).
- 3 Transvider dans un ballon de 500mL et ajuster au trait de jauge.
- 4 Garder cette solution dans un contenant ambré

#### 5.2 Ajouter l'eau nécessaire afin d'atteindre la concentration en 2,4-D voulue dans les sols des bocaux ABC (50 mg/kg).

6. Tout de suite après la réhumidification, prendre une mesure de l'activité enzymatique puis de la densité bactérienne, ainsi qu'une mesure de poids sec et un échantillon pour analyse DGGE et concentration de 2,4-D et pH.
7. Continuer à prendre les mesures d'activité enzymatique selon l'horaire de la section 3.2 par la suite. Puis mesure de densité bactérienne, pH et contenu en eau aux moments clefs de la récupération.

### 3.2 Horaire d'échantillonnage

<b>vendredi</b> humidification des sols	<b>samedi</b>	<b>dimanche</b>	<b>lundi</b> échantil.	<b>mardi</b> échant. perturbation	<b>mercredi</b> réhumidification échantil.	<b>jeudi</b> échantil.
<b>vendredi 2</b> échant.	<b>samedi 2</b>	<b>dimanche 2</b>	<b>lundi 2</b> échantil.	<b>mardi 2</b>	<b>mercredi 2</b> échantil.	<b>jeudi 2</b>
<b>vendredi 3</b> échantil.						


## 4. RÉFÉRENCE(S)

Abdel\_Mallek et al. (1996) ont simplement arrosé le sol avec un mélange aqueux de Fluazifop-butyl (membre de la famille des herbicides phenoxy acid)

Omar et Abdel-Sater (2001) sèche le sol à l'air libre et ajuste ensuite l'humidité avec l'herbicide dilué dans de l'eau distillée.

## 5. RECOMMANDATION(S)

Les analyses doivent être faites par la même personne lors d'un suivi afin que les résultats soient vraiment comparables, surtout en ce qui a trait à la densité bactérienne par la méthode back light.

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>
Protocole # : I	Nombre de pages :3	
Version :1	Date :17/06/03	
Auteur(s): _____		
Approuvé par :	Signatures :	Date :
Louise Deschênes _____	<input type="checkbox"/> _____	_____
Manon Leduc _____	<input type="checkbox"/> _____	_____
_____	<input type="checkbox"/> _____	_____
<b>Protocole 11 : Expérience détermination de l'effet du gel-dégel sur un sol contaminé au 2,4-D.</b>		
Mots clés : Gel-dégel, 2,4-D		

## 1. OBJECTIF

Déterminer l'effet de deux cycles de gel-dégel sur un sol contaminé au 2,4-D afin de pouvoir le comparer à un sol sain.

## 2. MATÉRIEL

En plus de la verrerie et du matériel nécessaire aux analyses de suivi :

- 6 pots Masson
- Un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$
- 2,4-D
- hotte biologique stérile
- Eau stérile
- Balance

## 3. MÉTHODOLOGIE

### 3.1 Test de perturbation

1. Stérilisation des bocal et de l'eau distillée à l'autoclave.
2. Préparation des sols

- Jour 1**
- 2.1. Mesurer le poids des bocaux vides
  - 2.2. Prendre le poids sec et la CRC du sol
  - 2.3. Introduire 300 g de sol dans 6 bocaux (ABC sont les triplicatas qui seront perturbés et DEF sont les triplicatas qui ne subiront pas de perturbation).
  - 2.4. Prendre le poids des bocaux et du sol humide. Mettre les bocaux à sécher à l'air libre dans une hotte biologique stérile.

**Jour 2**

- 2.5. Prendre les poids des sols et bocaux afin de déterminer l'eau qu'il faudra ajouter afin de les amener à une concentration en eau de 60% de CRC.
- 2.6. La réhumidification se fait avec une solution de 2,4-D pour les bocaux de sols contaminés et de l'eau distillée pour atteindre un contenu en eau de 60% de la CRC dans tous les bocaux.
3. Préparation de la solution :
  1. Peser 300 mg de 2,4-D
  2. Introduire le 2,4-D dans un bécher de 500mL, ajouter 400 mL d'eau distillée ajouter un bâton agitateur magnétique. Placer sur une plaque chauffante magnétique et chauffer légèrement en agitant la solution (sous la hotte).
  3. Transvider dans un ballon de 500mL et ajuster au trait de jauge.
  4. Garder cette solution dans un contenant ambré
4. Ajouter l'eau nécessaire afin d'atteindre la concentration en 2,4-D voulue (50 mg/kg) dans les sols des bocaux. Ajustez le contenu en eau avec de l'eau distillée stérile. Bien mélanger avec spatule et brasser les bocaux.
5. Incuber les bocaux à la noirceur et à la température de la pièce pour 3 jours.
6. Au bout de trois jours, prendre un échantillon pour activité enzymatique. En prendre un autre le jour suivant et mesurer la densité microbienne en plus de l'activité enzymatique.

Tout de suite après avoir pris les échantillons:

**Perturbation gel-dégel**

7. Laisser les bocaux fermés hermétiquement dans le congélateur à 20°C pendant 24h.
8. Sortir les bocaux et les laisser dégeler à la température de la pièce pendant 24h puis les remettre dans le congélateur pour 24h. Au bout des 24h sorti les bocaux à la température de la pièce. Après 4 heures, le sol devrait être dégelé et à la température de la pièce. Procéder à la mesure de l'activité enzymatique, compte microbien DGGE et poids sec.
9. Entreposer les bocaux fermés à la noirceur et à la température de la pièce. Continuer à prendre les mesures d'activité enzymatique selon l'horaire en 3.2 par la suite. Puis mesurer de densité bactérienne, DGGE, 2,4-D et pH aux moments clefs de la récupération.

**3.2 Horaire d'échantillonnage**

<b>vendredi</b> humidification des sols	<b>samedi</b>	<b>dimanche</b>	<b>lundi</b> échantil.	<b>mardi</b> échant. perturbation	<b>mercredi</b> réhumidification échantil.	<b>jeudi</b> échantil.
<b>vendredi 2</b> échant.	<b>samedi 2</b>	<b>dimanche 2</b>	<b>lundi 2</b> échantil.	<b>mardi 2</b>	<b>mercredi 2</b> échantil.	<b>jeudi 2</b>
<b>vendredi 3</b> échantil.						



#### **4. RÉFÉRENCE(S)**


Utilisation des protocoles PSO A7, PSO A23, PE 48D, PE 48E, PE 43 H, PE46 C2 à PE46 C6

Abdel\_Mallek et al. (1996) ont simplement arrosé le sol avec un mélange aqueux de Fluazifop-butyl (membre de la famille des herbicides phenoxy acid)

Omar et Abdel-Sater (2001) sèche le sol à l'air libre et ajuste ensuite l'humidité avec l'herbicide dilué dans de l'eau distillée.

#### **5. RECOMMANDATION(S)**

Les analyses doivent être faites par la même personne lors d'un suivi afin que les résultats soient vraiment comparables, surtout en ce qui à trait à la densité bactérienne par la méthode back light.

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole # : J		Nombre de pages :3	
Version :1		Date :17/06/03	
Auteur(s): _____ _____			
Approuvé par :		Signatures :	
Louise Deschênes _____		<input type="checkbox"/> _____	
Manon Leduc _____		<input type="checkbox"/> _____	
_____		<input type="checkbox"/> _____	
		Date :	

<b>Protocole 12 : Expérience détermination de l'effet d'une dessiccation à 60°C sur un sol contaminé au 2,4-D.</b>
Mots clés : Dessiccation, 2,4-D

### 1. OBJECTIF

Déterminer l'effet d'une dessiccation à 60°C sur un sol contaminé au 2,4-D afin de pouvoir le comparer à un sol sain.

Ce protocole est basé sur le protocole PE 46D.

### 2. MATÉRIEL

En plus de la verrerie et du matériel nécessaire aux analyses de suivi :

- 6 pots Masson, stériles
- Four allant à 60°C
- 2,4-D
- hotte biologique stérile
- Eau stérile
- Balance

### 3. MÉTHODOLOGIE

1. Stérilisation des bocaux et de l'eau distillée à l'autoclave.
2. Préparation des sols
  - Jour 1**
    - 2.1. Mesurer le poids des bocaux vides
    - 2.2. Prendre le poids sec et la CRC du sol
    - 2.3. Introduire 300 g de sol dans 6 bocaux (ABC sont les triplicatas qui seront perturbés et DEF sont les triplicatas qui ne subiront pas de perturbation).
    - 2.4. Prendre le poids des bocaux et du sol humide. Mettre les bocaux à sécher à l'air libre dans une hotte biologique stérile.
  - Jour 2**
    - 2.5. Prendre les poids des sols et bocaux afin de déterminer l'eau qu'il faudra ajouter afin de les amener à une concentration en eau de 60% de CRC.
    - 2.6. La réhumidification se fait avec une solution de 2,4-D pour les bocaux de sols contaminés et de l'eau distillée pour atteindre un contenu en eau de 60% de la CRC dans tous les bocaux.
3. Préparation de la solution :
  1. Peser 300 mg de 2,4-D
  2. Introduire le 2,4-D dans un bécher de 500mL, ajouter 400 mL d'eau distillée ajouter un bâton agitateur magnétique. Placer sur une plaque chauffante magnétique et chauffer légèrement en agitant la solution (sous la hotte).
  3. Transvider dans un ballon de 500mL et ajuster au trait de jauge.
  4. Garder cette solution dans un contenant ambré
4. Ajouter l'eau nécessaire afin d'atteindre la concentration en 2,4-D voulue (50 mg/kg) dans les sols des bocaux . Ajustez le contenu en eau avec de l'eau distillée stérile. Bien mélanger avec spatule et brasser les bocaux.
5. Incuber les bocaux à la noirceur et à la température de la pièce pour 3 jours.
6. Au bout de trois jours, prendre un échantillon pour activité enzymatique. En prendre un autre le jour suivant et mesurer la densité microbienne en plus de l'activité enzymatique.

Tout de suite après avoir pris les échantillons:

#### **Perturbation dessiccation 60°C**

7. Peser les bocaux avant de les mettre au four et utiliser des supports en métal pour maintenir les bocaux penchés, sans leurs couvercles, dans le four (afin d'optimiser la surface de contact entre le sol et l'air). Garder le four à 60°C pendant 24 heures
8. Réhumidification : Sortir les bocaux du four et les laisser refroidir dans la hotte biologique stérilise afin d'éviter toute source de contamination par l'air. Une fois les bocaux refroidit, les peser afin de déterminer le poids perdu en eau. Utiliser de l'eau distillée stérile pour rajouter au sol ce qu'il a perdu d'eau durant sa période au four.
9. Tout de suite après la réhumidification, prendre une mesure de l'activité enzymatique puis de la densité bactérienne, ainsi qu'une mesure de poids sec et un échantillon pour analyse DGGE.
10. Entreposer les bocaux fermés à la noirceur et à la température de la pièce. Continuer à prendre les mesures d'activité enzymatique selon l'horaire en 3.2 par la suite. Puis mesurer de densité bactérienne, DGGE, 2,4-D et pH aux moments clés de la récupération.

#### **3.2 Horaire d'échantillonnage**

vendredi	samedi	dimanche	lundi	mardi	mercredi	jeudi
----------	--------	----------	-------	-------	----------	-------

humidification des sols			échantil.	échant. perturbation	réhumidification échantil.	échantil.
<b>vendredi 2</b> échant.	<b>samedi 2</b>	<b>dimanche 2</b>	<b>lundi 2</b> échantil.	<b>mardi 2</b>	<b>mercredi 2</b> échantil.	<b>jeudi 2</b>
<b>vendredi 3</b> échantil.						

#### 4. RÉFÉRENCE(S)


Utilisation des protocoles PSO A7, PSO A23, PE 48D, PE 48E, PE 43 H, PE46 C2 à PE46 C6

Abdel\_Mallek et al. (1996) ont simplement arrosé le sol avec un mélange aqueux de Fluazifop-butyl (membre de la famille des herbicides phenoxy acid)

Omar et Abdel-Sater (2001) sèche le sol à l'air libre et ajuste ensuite l'humidité avec l'herbicide dilué dans de l'eau distillée.

#### 5. RECOMMANDATION(S)

Les analyses doivent être faites par la même personne lors d'un suivi afin que les résultats soient vraiment comparables, surtout en ce qui à trait à la densité bactérienne par la méthode back light.

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>
Protocole # : K	Nombre de pages :2	
Version :1	Date :17/11/03	
Auteur(s): _____ _____		
Approuvé par :	Signatures :	Date :
<u>Louise Deschênes</u> _____	<input type="checkbox"/> _____	_____
<u>Manon Leduc</u> _____	<input type="checkbox"/> _____	_____
_____	<input type="checkbox"/> _____	_____

<p><b>Protocole 13 : Humidification préliminaire d'un sol et contamination au 2,4-D. Préparation des sols pour le stage au CEMAGREF du 8 au 19 décembre 2003</b></p>
<p>Mots clés : humidification, 2,4-D</p>

## 1. OBJECTIF

Préparer les réacteurs qui serviront aux expérimentations de perturbation.

## 2. MATÉRIEL

6 pots Masson (bocaux de verre de 1L autoclavables, pots à confiture maison)

Un four allant à 60°C dans lequel on peut mettre 6 bocaux de verre de 1 L

- 300mg de 2,4-D grade de laboratoire (envoyé avec le protocole)
- 1 litre d'eau stérile
- Balance
- Un bécher de 500mL
- Un ballon de 500mL
- Un contenant de verre ambré de 500 mL

- Plaque chauffante et agitatrice.

### 3. MÉTHODOLOGIE

**3.1 Préparation du sol de départ** Le sol doit être séché dans les bocaux, pour tous les bocaux, à l'air dans la hotte biologique afin de diminuer l'humidité de la même façon pour tous les essais. Puisque la contamination se fait en ajoutant du 2,4-D dissout dans l'eau, il faut s'assurer que le contenu en eau du sol soit inférieur à ce qu'il faut rajouter d'eau contenant le 2,4-D.

#### 3.2 Préparations préliminaires Jour 0 (le jeudi)

1. Stérilisation des bocaux et de l'eau distillée à l'autoclave.
2. Préparation de la solution de 2,4-D (la dissolution est lente, environ une journée)
3. Peser 289 mg de 2,4-D
4. Introduire le 2,4-D dans un bécher de 500mL, ajouter 400 mL d'eau distillée ajouter un bâton agitateur magnétique. Placer sur une plaque chauffante magnétique et chauffer légèrement en agitant la solution (sous la hotte).
5. Transvider dans un ballon de 500mL et ajuster au trait de jauge.
6. Garder cette solution dans un contenant ambré
7. Mesurer et noter le poids des bocaux vides
8. Introduire 260 g de sol humide dans 12 bocaux

Note: Une série de 6 bocaux contiendront du sol propre et 6 du sol contaminé au 2,4-D ABC sont les triplicatas qui seront perturbés et EFG sont les triplicatas qui ne subiront pas de perturbation. Les identifier ainsi:

sol propre <b>PA</b> (perturbé)	sol propre <b>PB</b> (perturbé)	sol propre <b>PC</b> (perturbé)	sol propre <b>PD</b> (témoin)	sol propre <b>PE</b> (témoin)	sol propre <b>PF</b> (témoin)
sol contaminé <b>CA</b> (perturbé)	sol contaminé <b>CB</b> (perturbé)	sol contaminé <b>CC</b> (perturbé)	sol contaminé <b>CD</b> (témoin)	sol contaminé <b>CE</b> (témoin)	sol contaminé <b>CF</b> (témoin)

#### 3.3 Préparation des sols Jour 1 (le vendredi)

1. Ajuster l'humidité des sols propres. Aux sols PA, PB, PC, PD, PE et PF ajouter 61 mL d'eau stérile et mélanger comme il faut en secouant le bocal.
2. Contaminer les sols à 50mg de 2,4-D/kg de sol sec et ajuster l'humidité: Aux sols CA, CB, CC, CD, CE, CF ajouter 45 mL de solution de 2,4-D puis 16 mL d'eau stérile. Mélanger comme il faut en secouant les bocaux.
3. Entreposer ces bocaux à la noirceur, à la température de la pièce.

### 4. RÉFÉRENCE(S)

Abdel Mallek et al. (1996) ont simplement arrosé le sol avec un mélange aqueux de Fluazifop-butyl (membre de la famille des herbicides phenoxy acid)

Omar et Abdel-Sater (2001) sèche le sol à l'air libre et ajuste ensuite l'humidité avec l'herbicide dilué dans de l'eau distillée. Liste des protocoles



## PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Protocole # :	Nombre de pages : 26
Version :	Date :
Auteur(s): _____ Olivier Schoefs	
Approuvé par :	Signatures : _____ Date : _____
_____	<input checked="" type="checkbox"/> _____
_____	<input checked="" type="checkbox"/> _____
_____	<input checked="" type="checkbox"/> _____
	_____

### Protocole 14 : Extraction d'ADN d'un échantillon de sol

Mots clés : H<sub>2</sub>O, ADN, sol non-saturé, extraction liquide-liquide au 2-butanol, fluorométrie.

#### 1. OBJECTIF

La méthode d'extraction d'ADN vise à purifier l'ADN d'un échantillon de sol, afin d'éliminer toutes composantes organiques pouvant nuire à la quantification de l'ADN des micro-organismes se trouvant dans le sol à l'étude.

#### 2. MATÉRIEL

##### 2.1. Réactifs

- 10 ml de 2-butanol (Laboratoire MAT, 8041AN);
- 10 ml de HCl (Aldrich);
- 3 ml de DNase (Sigma, D4527);
- 10 ml d'eau stérile;

- 300 µl de la solution Chloroforme-alcool isoamyl : 24 : 1. Chloroforme (Fisher Scientific, lot no 943500, HPLC grade). Alcool isoamyl (Aldrich, AS 00337AS, grade ACS);
- 300 µl de la solution tampon phosphate – 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O (Anachemia, lot 690727-Y6, grade ACS), pH 8;
- 300 µl de la solution SDS – 100 mM NaCl (Anachemia, lot no 990426-9A, grade ACS), 500 mM Tris pH 8 (Anachemia, lot no 891216-S9, réactif pour biotechnologie), 10% SDS (Fluka Chemika, 71726, puriss.p.a);
- 25 ml de la solution TEN 10X – 10 mM Tris (Anachemia, lot no 891216-S9, réactif pour biotechnologie), 1 mM EDTA (Anachemia, Lot no 990426-A9, grade ACS), 100 mM NaCl (Anachemia, lot no 990527-A9, grade ACS), pH 8;
- 25 µl de solution Hoechst 33258 à 2 mg/ml (Sigma, no 33258);
- 2.15 ml de solution standard d'ADN 10 µg/ml;
- 100 µl de solutions standards d'ADN (0.5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 µg/ml) solubilisés dans du tampon TEN 1X.

## 2.2. Équipements

- 2 g de billes zirconium-silice 0.1mm de diamètre autoclavables (Biospec product, no 11079101Z);
- Mini BeadBeater 8<sup>TM</sup> (Biospec Products, modèle 693, Bartlesville, Oklahoma);
- Fluoromètre (Molecular Devices, Spectra MAX GEMINI XS, Sunnyval);
- Évaporateur Speed Vac (Savant, modèle SC 110, Holbrook, NY)
- Tubes microcentrifuges autoclavables 1,5 ml (Fisher Brand, no 05-669-30) et 2 ml (Fisher Scientific, no 05-407-25A);
- Tubes en polypropylène avec bouchon vissable 2 ml pour Mini BeadBeater (autoclavable);
- Centrifugeuse IEC (21000R, Needham Heights, USA);
- Micropipettes P1000, P200, P20 et P10ml (Gilson);
- Embouts à micropipettes stériles jaunes (Fisher Brand, no 21-197-8G) et bleus (Fisher Brand, no21-197-8F);
- Dispenseur à huit canaux (Nichiryo, modèle 8800);
- Microplaque à 96 puits;
- Seringue de plastique 1 ml avec aiguille 27.5G (B-D, no 309623);
- Colonnes Sephacryl S-200 HR (Amersham Pharmacia Biotech, no 27-5120-01);
- Tubes à centrifuge stériles jetables de 15 ml (Fisher Brand, no 05-539-5) et 50 ml (Fisher Brand, no 05-539-6);
- Vortexeur (Fisher Scientific, vortex, modèle génie 2, no 12-812, N.-Y., USA);
- pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ion meter);
- Électrode (Orion Research Inc., Ross Sure-flow, Beverly, U.S.A.);
- Spatules;
- Ballons de 100 ml et 500 ml;
- Cylindre gradué de 10 ml et 100 ml;
- Pipette jaugée de 4 ml;
- Pipette graduée de 25 ml;
- Seringue de 50 µl et 1000 µl;
- Balance avec une précision de ± 0,0001 (Mettler Toledo, AB204, Switzerland);



- Papier aluminium;
- Bec brûleur;
- Pince;
- Bain-marie à 37 °C;
- Glace;
- Hotte chimique.

### 3. MÉTHODOLOGIE

#### 3.1 Préparation des solutions

##### 3.1.1 Préparation de 10 ml de la solution SDS 10%

- Peser 58,44 mg de NaCl directement dans un bécher de 25 ml;
- Peser 605,7 mg de TRIS dans une coupelle et transférer dans le bécher de 25 ml;
- Peser 1 g de SDS dans une coupelle et le transférer dans le bécher de 25 ml;
- À l'aide d'une pipette de 10 ml, prélever 10 ml d'eau distillée dans le bécher de 25 ml;
- Ajouter un barreau magnétique et agiter sur une plaque magnétique jusqu'à dissolution complète des solides;
- Ajuster le pH à 8 à l'aide du pH-mètre avec une solution de HCl 10 M. Voir le PSO E3 pour l'utilisation du pH-mètre.

##### 3.1.2 Préparer une solution de 100 ml de PB (Tampon phosphate : 100 mM

###### NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, pH 8)

- Peser 1,3799 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O et le transférer dans un ballon de 100 ml;
- Ajouter environ 80 ml H<sub>2</sub>O, ajouter une barreau magnétique et agiter sur une plaque magnétique;
- Ajuster le pH à 8 à l'aide du pH-mètre avec une solution de NaOH 10 M;
- Compléter jusqu'au trait jauge avec de l'eau distillée.

##### 3.1.3 Préparer une solution de chloroforme-alcool isoamyl (24 : 1)

*Travailler sous la hotte chimique pour la préparation de cette solution*

- À l'aide d'une pipette jaugée 4 ml, mettre 4 ml d'alcool isoamyl dans une ballon de 100 ml;
- À l'aide d'un cylindre gradué 100 ml, mesurer 96 ml de chloroforme et le transférer dans le ballon de 100 ml;
- Bouchonner le ballon de 100 ml et l'inverser à treize reprises.

##### 3.1.4 Préparation de 500 ml de la solution TEN 10X (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8)

- Peser 605,7 mg de TRIS et le transférer dans un ballon de 500 ml;
- Peser 186,12 mg d'EDTA et le transférer dans ce même ballon de 500 ml;
- Peser 29,22 mg de NaCl et le transférer dans ce même ballon de 500 ml;
- Ajouter de l'eau distillée et compléter jusqu'au trait jauge;

- Ajouter un barreau magnétique et agiter jusqu'à dissolution complète;
- Préparer une solution de 100 ml de TEN 1X :
- À l'aide de la pipette automatique P10 ml, prendre 10 ml de la solution TEN 10X et la transférer dans un ballon de 100 ml;
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'au trait jauge;
- Bouchonner le ballon de 100 ml et l'inverser à treize reprises.

### 3.1.5 Préparation de 20 ml d'une solution Hoechst (0.8 µg/ml)

*On effectue une dilution sérielle à partir de trois tubes : 2 tubes de 15 ml et 1 tube de 50 ml*

- À l'aide de la micropipette P200, prélever 25 µl de la solution Hoechst concentrée (2 mg/ml) et le transférer dans un tube à centrifugeuse jetable de 15 ml;
- À l'aide de la pipette automatique P5000, ajouter 2.5 ml de solution TEN 1X;
- Boucher le tube et vortexer 10 secondes;
- À l'aide de la pipette automatique P5000, prélever 1 ml de la solution vortexée et la transférer dans un nouveau tube à centrifugeuse jetable de 15 ml;
- À l'aide de la pipette automatique P5000, lui ajouter 4 ml de TEN 1X;
- Boucher le tube et vortexer de nouveau pendant 10 secondes;
- À l'aide de la pipette P5000, prélever 4 ml de la solution obtenue à l'étape 5 et la transférer dans un nouveau tube à centrifugeuse jetable de 50 ml;
- À l'aide d'une pipette graduée de 25 ml, lui ajouter 16 ml de TEN 1X;
- Boucher et recouvrir le tube de 50 ml contenant la solution Hoechst (0.8 µg/ml) d'un papier aluminium, car cette solution réagit à la lumière et perd sa fluorescence.

### 3.1.6 Procédure de l'extraction de l'ADN (1)

- Peser 2 g de billes Biospec de 0.1 mm de diamètre dans un tube adapté de 2 ml pour la machine Mini BeadBeater et bouchonner;
- Autoclaver ce tube pendant 15 minutes à 120 °C en position "SOLIDS";
- *Travailler en mode aseptique (le rayon d'une flamme suffit)*
- Peser directement 200 mg de sol de jardin dans le tube adapté pour la machine Mini BeadBeater contenant 2 g de billes Biospec de 0.1 mm de diamètre préalablement autoclavées. (Voir les recommandations pour les différents types de sol);
- À l'aide d'une pipette automatique P1000, ajouter 300 µl de tampon phosphate, 300 µl de solution SDS et 300 µl de solution chloroforme-alcool isoamyl (24 : 1) dans le tube contenant le sol et les billes;
- Introduire le tube dans la machine Mini BeadBeater et homogénéiser à vitesse maximale pendant 2 minutes (2). Déposer l'échantillon sur de la glace jusqu'au moment de la centrifugation;
- Récupérer le surnageant en plusieurs étapes :
- Centrifuger le tube adapté Mini BeadBeater à 10 000 g pendant 30 secondes;
- Récupérer le surnageant à l'aide d'une pipette automatique P1000 et le transférer dans un tube microcentrifuge de 2 ml préalablement autoclavé;
- Afin de récupérer le liquide résiduel dans le tube adapté Mini BeadBeater, perforer la base à l'aide d'une aiguille stérile de 27,5 gauge. Placer le tube perforé dans un tube de 15 ml contenant un tube microcentrifuge 1,5 ml dépourvu de son bouchon (Voir figure 1);

- Centrifuger à 1400 g pendant 15 minutes;
- Ajouter 500 µl d'eau stérile au tube adapté Mini BeadBeater perforé contenant l'échantillon de sol;
- Centrifuger de nouveau à 1400 g pendant 15 minutes;
- À l'aide d'une pince, retirer et jeter le tube adapté Mini BeadBeater;
- À l'aide d'une pipette automatique P1000, récolter le surnageant du tube inférieur et l'ajouter au tube microcentrifuge de 2 ml de l'étape b);
- Déposer l'échantillon sur de la glace jusqu'au moment de l'extraction liquide-liquide (section 3.3).

### 3.1.7 Extraction liquide-liquide au 2-butanol

*Cette étape est limitante lorsqu'on veut quantifier l'ADN par fluorométrie. L'extraction liquide-liquide au 2-butanol permet d'une part de diminuer le volume de l'échantillon et d'autre part d'éliminer la solution de SDS contenue dans l'échantillon. La solution de SDS représente une interférence importante lors de la quantification par fluorométrie. De plus, sa présence dans l'échantillon inhibe l'action de la DNase qui s'avère très utile comme témoin lors de cette analyse.*

- Travailler sous la hotte chimique
- Régler la température de la centrifugeuse IEC 21000R à 4°C;
- Dans le tube microcentrifuge de 2 ml de l'étape 3.2.i, ajouter avec une pipette automatique P1000 un volume 1 : 1 de 2-butanol ( un volume 1 : 1 signifie qu'on doit ajouter un volume équivalent de 2-butanol au volume de l'échantillon contenu dans le tube microcentrifuge de 2 ml);
- Vortexer pendant 10 secondes;
- Laisser reposer 5 minutes à température ambiante;
- Centrifuger le tube à 12 000 g pendant 5 minutes à 4°C (à noter que la centrifugeuse doit préalablement être réglée à 4°C avant son utilisation);
- Éliminer la phase supérieure, la phase organique, sans chercher l'interphase à l'aide d'une pipette automatique P1000;
- Répéter les étapes précédentes encore 4 fois de manière à obtenir un volume final d'environ 150 µl;
- Évaporer l'échantillon au Speed Vac pendant 1 heure à température Medium. Cet appareil se situe dans le laboratoire de Bio-Med au local A-677. Les informations concernant l'utilisation de cet appareil sont inscrites sur ce dernier.

### 3.1.8 Préparation des colonnes Sephacryl S-200 HR

*Les colonnes sont conservées au réfrigérateur à 4°C*

- Vortexer pendant 10 secondes une colonne Sephacryl S-200 de manière à resuspendre la résine;
- Dévisser d'un quart de tour le bouchon rouge de la colonne;
- Céder la partie inférieure de la colonne au niveau de la jonction (voir la figure 2);
- Placer la colonne dans un tube microcentrifuge de 1.5 ml dépourvu de son bouchon (bouchon qu'on a coupé) pour servir de support à la colonne;
- Centrifuger la colonne à 735 g (3000 rpm pour le modèle Eppendorf 5415C à vitesse variable avec rotor à angle fixe possédant 18 positions) pendant 1 minute;

- Placer la colonne dans un nouveau tube microcentrifuge 1.5 ml. Conserver la colonne pour l'étape de purification de l'ADN.

### 3.1.9 Purification de l'ADN

- À l'aide d'une micropipette P200, prélever 120 µl de solution TEN 1X et resuspendre l'échantillon évaporé au Speed Vac;
- Centrifuger le tube microcentrifuge 2 ml à 10 000 g pendant 30 secondes;
- À l'aide de la micropipette P200, récupérer le surnageant **seulement** et le déposer **lentement** au-dessus de la colonne Sephacryl S-200 HR, et ce de façon centrée à la colonne;
- Centrifuger de nouveau la colonne à 735 g mais cette fois pendant 2 minutes;
- Jeter la colonne et récolter l'échantillon purifié dans le tube microcentrifuge 1.5 ml. Le volume récolté se situe entre 100 et 130 µl;
- À l'aide d'une micropipette P200, prélever 50 µl de cet échantillon et le déposer dans un tube microcentrifuge de 1.5 ml. Cet échantillon sera analysé par fluorométrie;
- À l'aide de la micropipette P200, prélever 50 µl de cet échantillon et le déposer dans un nouveau tube microcentrifuge de 1.5 ml identifié d'un numéro plus DNase. Cet échantillon servira de témoin lors de l'analyse par fluorométrie.

### 3.1.11 Préparation d'une solution de DNase et traitement à la DNase

- Prendre un tube microcentrifuge de 1.5 ml contenant 30 µl de la DNase (l'enzyme). La DNase est conservée au congélateur à -20°C;
- À l'aide d'une pipette automatique P1000, ajouter **lentement** (on manipule très lentement pour ne pas dénaturer l'enzyme) à ce tube 970 µl de la solution à DNase. Cette solution est conservée au réfrigérateur à 4°C;
- Mélanger **lentement** en effectuant trois inversions de ce tube;
- À l'aide d'une micropipette P200, ajouter 120 µl de la solution de DNase préparée ci-dessus aux 50 µl d'ADN servant de témoin préparer au point 3.5;
- Incuber cet échantillon dans un bain-marie à 37°C pendant 30 minutes.

### 3.1.12 Préparation des standards d'ADN

*On établit la courbe standard D'ADN à partir de concentrations connues d'ADN (voir l'exemple d'une courbe standard en annexe)*

À partir d'un standard d'ADN de 10 µg/ml, effectuer les concentrations suivantes : 8 µg/ml, 6 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml et 0.5 µg/ml;

Effectuer la dilution 8 µg/ml :

- à l'aide d'une seringue de 1000 µl, prélever 800 µl de la solution d'ADN 10 µg/ml et le transférer dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml;

-à l'aide d'une seringue de 1000 µl, y ajouter 200 µl de solution TEN 1X.

Effectuer la dilution 6 µg/ml :

- à l'aide d'une seringue de 1000 µl, prélever 600 µl de la solution d'ADN 10 µg/ml et le transférer dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml;

-à l'aide d'une seringue de 1000 µl, y ajouter 400 µl de solution TEN 1X.

Effectuer la dilution 4 µg/ml :

- à l'aide d'une seringue de 1000 µl, prélever 400 µl de la solution d'ADN 10 µg/ml et le transférer dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml;

-à l'aide d'une seringue de 1000 µl, y ajouter 600 µl de solution TEN 1X.

Effectuer la dilution 2 µg/ml :

- à l'aide d'une seringue de 1000 µl, prélever 200 µl de la solution d'ADN 10 µg/ml et le transférer dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml;

-à l'aide d'une seringue de 1000 µl, y ajouter 800 µl de solution TEN 1X.

Effectuer la dilution 1 µg/ml :

- à l'aide d'une seringue de 1000 µl, prélever 100 µl de la solution d'ADN 10 µg/ml et le transférer dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml;

-à l'aide d'une seringue de 1000 µl, y ajouter 900 µl de solution TEN 1X.

Effectuer la dilution 0.5 µg/ml :

- à l'aide d'une seringue de 50 µl, prélever 50 µl de la solution d'ADN 10 µg/ml et le transférer dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml;

-à l'aide d'une seringue de 1000 µl, y ajouter 950 µl de solution TEN 1X

Vortexer les solutions standards et les déposer sur de la glace jusqu'à leur utilisation. Conserver les standards au congélateur à -20°C après leur utilisation.

### 3.1.13 Quantification de l'ADN

#### *Lecture au fluoromètre*

On procède à l'analyse de l'ADN par fluorométrie en utilisant une microplaque de 96 puits dans laquelle on introduit des quantités fixes d'ADN (50 µl) et de solution Hoechst (250 µl) #33258 à 0.8 µg/ml. On dépose ensuite la microplaque dans le lecteur à microplaque. On configure les paramètres du logiciel SPF. Les paramètres à modifier sont la longueur d'onde d'excitation (360 nm), la longueur d'onde d'émission (460 nm) et l'autocutoff (420 nm). On doit également mettre le brassage de la microplaque à ON.

- À l'aide d'une micropipette P200, prélever à deux reprises (duplicata) 50 µl de la solution TEN 1X et déposer l'échantillon dans les puits (section A1, A2) de la microplaque. Ces échantillons serviront de blanc pour définir la courbe standard;
- À l'aide d'une micropipette P200, prélever à deux reprises (duplicata) 50 µl de la solution standard d'ADN 0,5 µg/ml et déposer l'échantillon dans les puits (section B1, B2) de la microplaque;
- Répéter l'étape précédente pour toutes les solutions standards d'ADN en les déposant dans les puits C1, C2 jusqu'à G1, G2;
- À l'aide de la micropipette P200, prélever 50 µl de l'échantillon d'ADN et le déposer dans le puits A3 de la microplaque;
- À l'aide de la micropipette P200, prélever 50 µl de l'échantillon d'ADN ayant été traité à la DNase et le déposer dans le puits B3 de la microplaque;
- À l'aide du distributeur à 8 canaux (modèle 8800), on ajoute 250 µl de solution Hoechst 0.8 µg/ml dans les puits contenant 50 µl d'ADN. La microplaque est lue directement par le lecteur à microplaque;
- Convertir les valeurs de fluorescence obtenues à partir de la courbe standard d'ADN.

#### 4. RÉFÉRENCE(S)

**Herrick, J. B., D. N. Miller, E. L. Madsen, and W. C. Ghiorse.** 1996. Extraction, purification, and amplification of microbial DNA from sediments and soils, p.130-133. *In* J. F. Burke (ed.), PCR :essentiel techniques. John Wiley & Sons, New York, N.Y.11 :4715-4724


**D.N. Miller, J. E. Bryant, E. L. Madsen, and W.C. Ghiorse.** Nov. 1996. Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Applied and Environmental Microbiology*.

#### 5. RECOMMANDATION(S)

L'utilisation du 2-butanol doit se faire sous la hotte chimique. Ce réactif engendre des irritations respiratoires.

Le port de gants est recommandé pour la manipulation de la solution Hoechst. Ce réactif possède des pouvoirs mutagènes.

Le type de sol est un paramètre important lors de l'extraction de l'ADN. La quantité de sol à analyser doit être évaluée expérimentalement pour chaque type de sol utilisé. On peut faire varier la quantité de sol de 100 à 500 mg seulement.

		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>
Protocole # :	Nombre de pages :	
Version :	Date :	
Auteur(s): _____ _____		
Approuvé par :	Signatures :	Date :
_____	<input checked="" type="checkbox"/> _____	_____
_____	<input type="checkbox"/> _____	_____
_____	<input type="checkbox"/> _____	_____
	_____	

<b>Protocole 15 : Amplification PCR</b>
Mots clés :

## 1. OBJECTIF

L'objectif de la méthode PCR vise à amplifier des gènes spécifiques codés par l'ADN extrait de cellules. Le gène 16 S des micro-organismes présents dans le sol est à l'étude. Une amplification de ce gène permettra d'obtenir une quantité suffisante d'ADN, afin d'analyser le produit PCR sur un gel électrophorèse.

## 2. MATÉRIEL

- Tubes microcentrifuges eppendorf 0.5 et 1,5 ml (Fisher Scientific);
- Embouts pour pipette stériles;
- Seringue de 1 ml;
- Filtre millipore 0.22 µm;
- Support à tubes microcentrifuges;

- Pipettes P2, P20, P200 et P1000;
- H<sub>2</sub>O stérile;
- Solution BSA, bovine serum albumin (Sigma, cat A-2153);
- Solution dNTP 10mM (Amersham Pharmacia Biotech inc, cat 27-2035-01);
- Solution d'amorces 341fgc et 534r 10pmoles/μl;
- Solution tampon Taq 10X (Amersham Pharmacia Biotech inc, cat 27-0798-03);
- Taq DNA polymérase (Amersham Pharmacia Biotech inc, cat 27-0798-03);
- Agarose (GIBCO BRL, cat 15510-027);
- Solution tampon TAE 50X (Tris, acide acétique, EDTA);
- Appareil électrophorèse (model FB105, Fisher Biotech);
- Support électrophorèse (MINI SUB<sup>TM</sup>DNA CELL, BIO-RAD)

Appareil PCR (model DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer).

### 3. MÉTHODOLOGIE

#### 3.1 Préparation de la solution BSA

- À la balance, peser directement dans un tube eppendorf 1.5 ml 20 mg de BSA;
- À l'aide d'une pipette P1000, ajouter 1 ml d'eau déionisée et agiter en effectuant un mouvement de va et vient avec la pipette;
- À l'aide d'une seringue de 1 ml et d'un filtre millipore 0.22 μm, filtrer la solution de façon stérile dans un tube eppendorf 1.5 ml stérile;
- Faire des aliquots de 10 μl dans des tubes eppendorf stérile de 0.5 ml;
- Congeler à -20°C jusqu'à utilisation.

#### 3.2 Préparation de la solution de dNTP 10 mM

*Travailler de façon stérile sous une hotte biologique*

- À l'aide d'une pipette P20, prélever 10 μl de solution ATP 100 mM et transférer dans un tube eppendorf stérile de 1.5 ml;
- Répéter l'étape 1 pour les solutions de GTP, CTP et TTP et mettre dans le même tube;
- À l'aide d'une pipette P200, prélever 60 μl d'eau stérile et transférer dans le tube eppendorf de 1.5 ml;
- Mélanger en effectuant des mouvements de va et vient avec la pipette;
- Faire des aliquots de 10 μl dans des tubes eppendorf stérile de 0.5 ml;
- Congeler à -20°C jusqu'à utilisation.

#### 3.3 Préparation de la solution d'amorce (10 pmoles/réaction)

- À l'aide d'une pipette P20, prélever 9 μl d'eau déionisée stérile et transférer dans un tube eppendorf stérile de 0.5 ml;
- À l'aide d'une pipette P20, prélever 1 μl de la solution d'amorce 341 fgc ~ 100 pmoles/μl et la transférer dans le tube eppendorf stérile de 0.5 ml;
- Répéter les étapes 1 et 2 avec un nouveau tube eppendorf stérile de 0.5 ml et l'amorce 534 r ~ 100 pmoles/μl.

#### 3.4 Préparation de la solution TAE 1X

- À la balance, peser 121 g de TRIS dans une coupelle et transférer dans une fiole de 500 ml;



- À l'aide d'une pipette graduée de 50 ml, ajouter 28.55 ml d'acide acétique glacial à la fiole de 500 ml;
- À l'aide d'une pipette graduée de 50 ml, prélever 50 ml de la solution d'EDTA.2Na 0.5 M pH 8.0 préparée au point 3.1.2 du protocole extraction d'ADN et transférer dans la fiole de 500 ml;
- Compléter à 500 ml avec H<sub>2</sub>O déionisée et transférer dans une bouteille de 500 ml (**on obtient une solution TAE 50X**);
- À l'aide d'une micropipette P10 ml, prélever 10 ml de cette solution et transférer dans une autre bouteille de 500 ml;
- À l'aide d'un cylindre gradué de 500 ml, prélever 490 ml d'eau déionisée et la transférer dans la bouteille de 500 ml. On obtient donc une solution de TAE 1X.

### 3.5 Amplification PCR

*Recette pour une amplification PCR*

Master Mix	Volume final 50 µl
H <sub>2</sub> O	39,5 µl
Tampon Taq 10X*	5 µl
BSA	1 µl
DNTP 10 mM	1 µl
Amorce 341 fgc 10 pmoles/µl	1 µl
Amorce 534 r 10 pmoles/µl	1 µl
Taq DNA polymérase	0.5 µl
Huile minérale	40 µl
ADN	1 µl

\*Concentration finale du Tampon : Tris HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM

Dans un tube eppendorf stérile de 0.5 ml, ajouter les ingrédients à **l'exception de la Taq DNA polymérase** dans le même ordre que décrit ci-haut;

Mettre le tube dans l'appareil DNA Thermal Cycler 480 (figure 6.2) lorsque le cycle de température indique 80 °C. À l'aide d'une pipette P2, ajouter 0,5 µl de la Taq DNA polymérase au tube contenant les réactifs.

À noter : lorsqu'on prévoit faire plus d'une réaction PCR, on doit multiplier la recette par le nombre de réaction à faire. **Pour ce faire, on doit préparer la recette PCR dans un tube eppendorf stérile de 1.5 ml (solution mère). Puis, on doit prélever 48,5 µl de cette solution mère pour la distribuer dans un tube eppendorf stérile de 0.5 ml. On ajoute ensuite 1µl d'ADN dans chacun des tubes.**

### 3.6 Vérification du produit PCR sur un gel d'agarose 1.5 %

- Prendre un nombre X ( nombre d'échantillons à analyser plus un) de tubes eppendorf 1,5 ml et à l'aide d'une pipette P20 y déposer 2 µl de tampon de migration (colorant bleu);
- À ces tubes, ajouter 10 µl de solution d'ADN (produit PCR) à analyser et au tube restant ajouter 5 µl du marqueur d'ADN 100 pb;
- À la balance, peser dans une coupelle 0,75 g d'agarose et transférer dans un erlenmeyer de 250 ml;

- À l'aide d'un cylindre gradué de 50 ml, mesurer un volume de 50 ml de la solution TAE 1X et l'ajouter à l'erenmeyer de 250 ml;
- Remuer pour mélanger;
- Faire chauffer la solution au micro-ondes pendant 1 min (remuer au t ½);
- Couler la solution chaude dans le support à migration électrophorèse (on doit mettre du ruban adhésif aux extrémités du support pour maintenir la solution dans le support **voir figure 6.1**);
- Fixer le peigne approprié sur le support;
- Laisser gélifier pendant 20 min à la température ambiante;
- Retirer le peigne et le ruban adhésif du support et déposer le support dans la cuve électrophorèse;
- Charger les puits de 12 µl de solution d'ADN préparée au point 1;
- Mettre le couvercle en place en prenant soin de bien brancher les pôles au bon endroit et mettre l'alimentation en marche pour un voltage de 80 mVolts;
- Laisser migrer pendant 1 heure;
- Débrancher l'appareil électrophorèse, retirer le couvercle et le support;
- Laisser glisser le gel du support dans le bain à bromure d'éthidium **\*\*\*le port des gants est obligatoire, car le bromure d'éthidium est cancérigène**;
- Mettre sur un agitateur rotatif et laisser colorer pendant 10 min;
- À l'aide d'une spatule, retirer le gel du bain à bromure d'éthidium et le déposer dans un autre bain contenant de l'eau;
- Mettre sur l'agitateur rotatif et laisser décolorer le gel pendant 15 min;
- Analyser le gel sous une lampe UV et prendre une photo.
- 

#### 4. RÉFÉRENCE(S)


Villemur Richard. Protocoles de l'institut Armand Frappier.

#### 5. RECOMMANDATION(S)

Les réactifs et la préparation de la réaction se doivent être effectués dans des endroits différents, afin d'éviter la contamination croisée.

Il faut travailler sous une hotte biologique lorsqu'on prépare une réaction PCR. Tout objet que l'on introduit à l'intérieur de la hotte biologique doit être nettoyé avec une solution d'éthanol 70%. Ceci aura pour effet d'éliminer une contamination due aux manipulations.

Le port des gants est recommandé lorsqu'on manipule la solution de bromure d'éthidium.

 <p>Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites</p>		<p><b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b></p>
Protocole # :	Nombres de pages :	
Version :	Date :	
Auteur(s): _____ _____		
Approuvé par :	Signatures :	Date :
_____	<input checked="" type="checkbox"/> _____	_____
_____	<input checked="" type="checkbox"/> _____	_____
_____	<input checked="" type="checkbox"/> _____	_____

<p><b>Protocole 16 : Séparation des fragments du gène 16S bactérien par la technique de DGGE</b></p>	
Mots clés :	DGGE, <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i> , ADN, PCR, gène 16S

## 1. OBJECTIF

L'objectif de la méthode vise à effectuer un gel électrophorèse DGGE, afin d'obtenir un patron de migration pour l'amplification du gène 16S des procaryotes. Ce gène se retrouve chez tous les procaryotes, cependant la séquence varie selon le type de bactéries. Cette variation de la séquence nous permet d'obtenir des migrations différentes dans le gel DGGE d'où l'intérêt d'amplifier ce gène afin de faire le suivi d'une flore microbienne dans un sol à l'étude.

## 2. MATÉRIEL

- Tubes microcentrifuges eppendorf 1,5 ml (Fisher Scientific);
- Fioles de 25 ml;
- Pipette graduée de 10 ml
- Barreau magnétique et plaque agitatrice;

- Urée (Bio-Rad, cat 161-0731);
- Solution APS 10 % (Bio-Rad, cat 161-0700);
- Solution TEMED (Bio-Rad, cat 161-0800);
- Solution TAE 50X (Tris, acide acétique, EDTA);
- Solution acrylamide : bis (37,5 : 1);
- Solution formamide déionisée;
- Solution colorante au glycérol 100% (colorant: xylène cyanol et bleu bromophénol);
- H<sub>2</sub>O stérile;
- Agarose (GIBCO BRL, cat 15510-027);
- Appareil électrophorèse (model FB105, Fisher Biotech);
- Support électrophorèse (MINI SUB<sup>TM</sup> DNA CELL, BIO-RAD, USA)
- Appareil DGGE (model 475 Dcode System, BIO-RAD, USA).

### 3. MÉTHODOLOGIE

- Préparation de la solution TAE 50X
- À la balance, peser 121 g de TRIS dans une coupelle et transférer dans une fiole de 500 ml;
- À l'aide d'une pipette graduée de 50 ml, ajouter 28.55 ml d'acide acétique glacial à la fiole de 500 ml;
- À l'aide d'une pipette graduée de 50 ml, prélever 50 ml de la solution d'EDTA.2Na 0.5 M pH 8.0 préparée au point 3.1.2 et transférer dans la fiole de 500 ml;
- Compléter à 500 ml avec H<sub>2</sub>O déionisée.

#### 3.1 Préparation de la solution d'acrylamide 40%

*Travailler sous une hotte chimique pour la préparation de cette solution (TOXIQUE)*

*Le port des gants est obligatoire.*

- Peser 38g de poudre d'acrylamide;
- Déposer dans une erlenmeyer de 250 ml et en nettoyant la nacelle avec un peu d'eau (pas trop d'eau parce que l'acrylamide prend beaucoup d'expansion);
- Peser 2g de poudre de bis-acrylamide;
- Placer dans le même erlenmeyer que l'acrylamide en nettoyant la nacelle avec un peu d'eau;
- Ajouter un barreau magnétique et agiter sur un agitateur magnétique;
- Ajouter de l'eau un peu plus bas que la ligne de 75 ml de l'erlenmeyer;
- Laisser agiter pendant au moins 30 minutes;
- Nettoyer les rebords de l'erlenmeyer avec un peu d'eau de temps en temps;
- Lorsque complètement dissous, placer dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter jusqu'à la ligne sans dépasser;
- Filtrer la solution avec un filtre millipore 0.45 µm;
- Mettre dans une bouteille hermétiquement fermée et conserver à 4°C.

#### 3.2 Préparation des solutions d'acrylamide 8% pour le gel avec un gradient d'urée

##### 3.3.1 Solutions d'acrylamide 8% avec 0% d'urée dénaturant (25 ml)

- À l'aide d'une pipette graduée, prélever 5 ml d'acrylamide:bis (37.5:1) 40% et transférer dans un bécher de 50 ml;
- À l'aide d'une pipette P1000, prélever 500 µl de solution TAE 50X;
- À l'aide d'une pipette de 25 ml, prélever 19,5 ml d'H<sub>2</sub>O milli-Q;
- Bien mélanger;
- À l'aide d'un filtre millipore 0.45 µm, filtrer la solution;
- Dégazer dans une chambre anaérobie sans le support à Pétri: placer l'erlenmeyer dans la chambre (agitateur magnétique dans la solution); placer la chambre sur une plaque agitatrice; fermer la chambre hermétiquement et mettre sous vide;
- Laisser dégazer ainsi pendant 10 à 15 minutes;
- Transférer la solution dans un contenant ne laissant pas passer la lumière (*Sarstedt*, 50 ml, avec papier d'aluminium autour) et garder à 4°C.

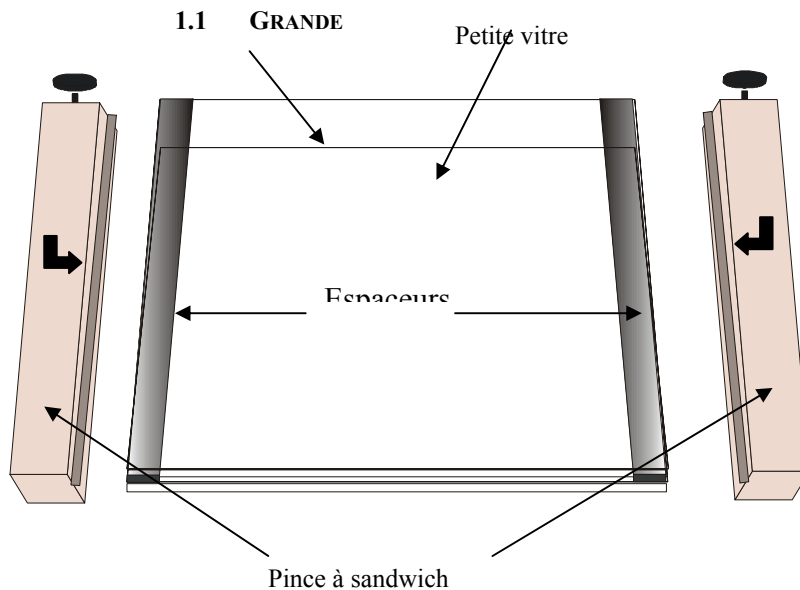
### 3.3.2 Solutions d'acrylamide 8% avec 80% d'urée dénaturant (25 ml)

- À l'aide d'une pipette graduée, prélever 5 ml d'acrylamide:bis (37.5:1) 40% et transférer dans un bécher de 100 ml;
- À l'aide d'une pipette P1000, prélever 500 µl de solution TAE 50X et transférer dans le bécher;
- À l'aide d'une pipette graduée de 10 ml, prélever 8 ml de formamide déionisé (décongelé, s'il en reste, ne pas recongeler, bon pour une semaine à 4°C) et transférer dans le bécher;
- À la balance, peser 8.4 g d'urée et transférer dans le bécher;
- Ajouter un barreau magnétique, environ 2 ml d'eau et laisser dissoudre sous agitation à l'aide d'une plaque rotative;
- Transférer dans fiole jaugée de 25 ml et compléter à la jauge avec de H<sub>2</sub>O milli-Q;
- Filtrer la solution avec un filtre millipore 0.45 µm;
- Dégazer (voir solution 0% dénaturant au point 3.3.1);
- Placer dans un tube de 50 ml (*Sarstedt*) entouré d'aluminium et ranger à 4°C.

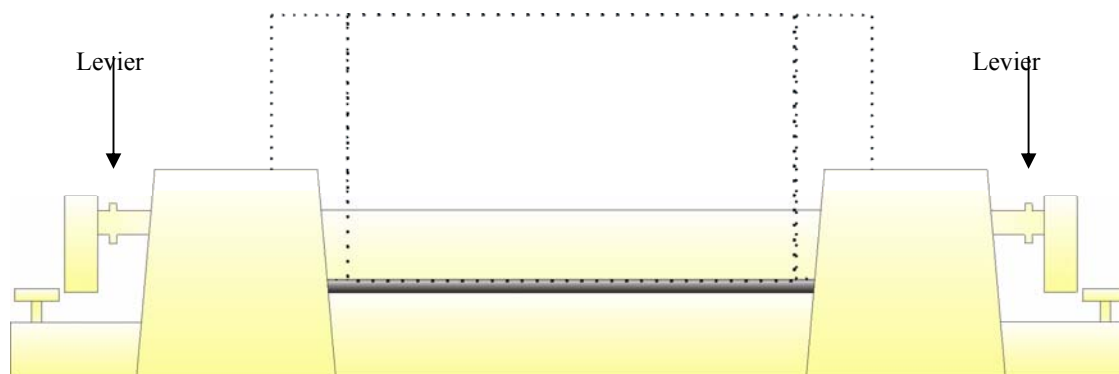
### 3.3 Préparation du support à gel DGGE

#### Montage du sandwich

- S'assurer que les vitres et les espaceurs sont propres (laver avec éthanol 95%);
- Placer la grande vitre (20x20) à plat sur une espace propre et y déposer deux espaceurs de 1.5 mm d'épaisseur, un à chaque extrémité de la vitre;
- Déposer la petite vitre (16x20) sur les espaceurs;

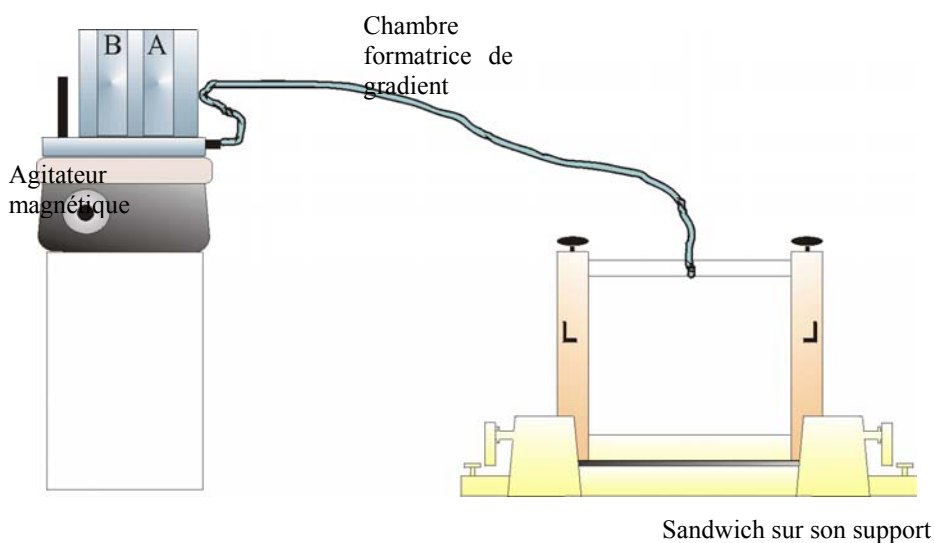


- Ouvrir les pinces à sandwich à l'aide de la vise pour permettre au sandwich de s'y glisser;
- Insérer un des côtés du sandwich dans la pince et visser légèrement. Faire la même chose pour l'autre côté;
- Serrer à nouveau les vis légèrement pour que le montage tienne;
- Placer le montage dans la fente d'alignement qui se trouve sur le portoir;
- Desserrer les vis et insérer entre les vitres la carte d'alignement;
- Pousser la carte sur les espaceurs pour que ces derniers soient bien au fond des pinces;
- Ensuite, à l'aide des pouces, s'assurer que les vitres et les espaceurs sont bien à plat à la base et ce en poussant à l'extrémité supérieure. De cette manière, on évite que le gel coule;
- Le tout est vérifié en serrant les vis, en enlevant le montage de dans la fente à alignement et en passant un doigt sur la base du montage;
- Si tout semble égal, enlever la carte d'alignement et s'assurer que les pinces à sandwich sont bien serrées. **IMPORTANT**, ne pas aller plus fort que la force des doigts pour ne pas risquer de briser les vitres;
- Poser le montage sur la bande éponge en caoutchouc situé sur le support à sandwich de manière à ce que la petite vitre soit vers soi;
- Presser sur les deux leviers blancs de chaque côté du support vers le centre du gel et les abaisser (tourner à 180°). Le montage devrait s'enfoncer dans la bande éponge;



## 1.2 SUPPORT À SANDWICH

Le tube allant de la chambre formatrice de gradient par gravité est d'abord fixé vers le haut (éviter que le liquide descende immédiatement après avoir rempli la chambre) et son extrémité est ensuite fixée à l'ouverture entre les deux vitres;



## 1.3 Chambre à gradient et support

### 3.4 Préparation du gel DGGE

Le gel (**ATTENTION: gants**)

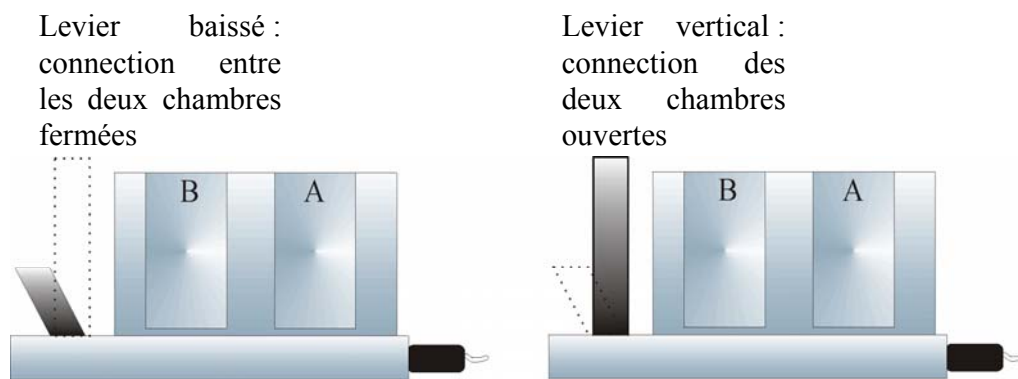
À partir des solutions stock de 0% et de 80% (voir Solution d'Acrylamide 8% pour gel à gradient dénaturant) effectuer les dilutions nécessaire pour avoir un gel couvrant l'échelle de dénaturant appropriée pour l'échantillon (voir **tableau** à la fin des manipulations (en annexe 1))

**Note:** lors de l'évaluation d'un nouvel échantillon, faire un gel dont l'échelle de gradient s'étant de 0 à 80%, ensuite, diminuer l'échelle du gradient en fonction des bandes qui définissent l'échantillon

Lorsque les solutions sont terminées, faire dégazer une première solution sous agitation dans une jarre anaérobie dont le support à été retiré. Faire le vide dans la jarre et laisser dégazer pendant 15 min;

- Recouvrir la solution dégazée et la placer sur la glace;

- Faire la même chose pour la deuxième solution;
- Préparer une solution de persulfate d'ammonium (APS) à 10%: 0.1g de persulfate d'ammonium dans 1 ml d'H<sub>2</sub>O milli-Q; et placer sur glace;
- Mettre le TEMED sur la glace;
- **Note:** les solutions étant froides, la polymérisation s'effectuera plus lentement et les risques d'obturation des chambres formatrices de gradient sont moins élevés
- S'assurer que la chambre formatrice de gradient et son tuyau sont totalement asséchés;
- Verser la solution dont la concentration en dénaturant est la plus faible dans la chambre B ou celle qui n'est pas directement relié au tuyau;
- Placer le levier à la verticale pour permettre à une petite quantité de cette solution de traverser vers la chambre A (celle qui est relié au tuyau) et le rebaisser immédiatement. Cela permet d'éliminer l'air dans la tunelle connecteur pour le mélange des deux solutions;
- Enlever le surplus qui est dans la chambre A et le remettre dans la chambre B;
- Verser la solution ayant la plus grande concentration de dénaturant dans la chambre A;
- Faire agiter le barreau magnétique qui se trouve dans la chambre A en mettant l'appareil en marche (entre 3 et 4, pas plus rapide);

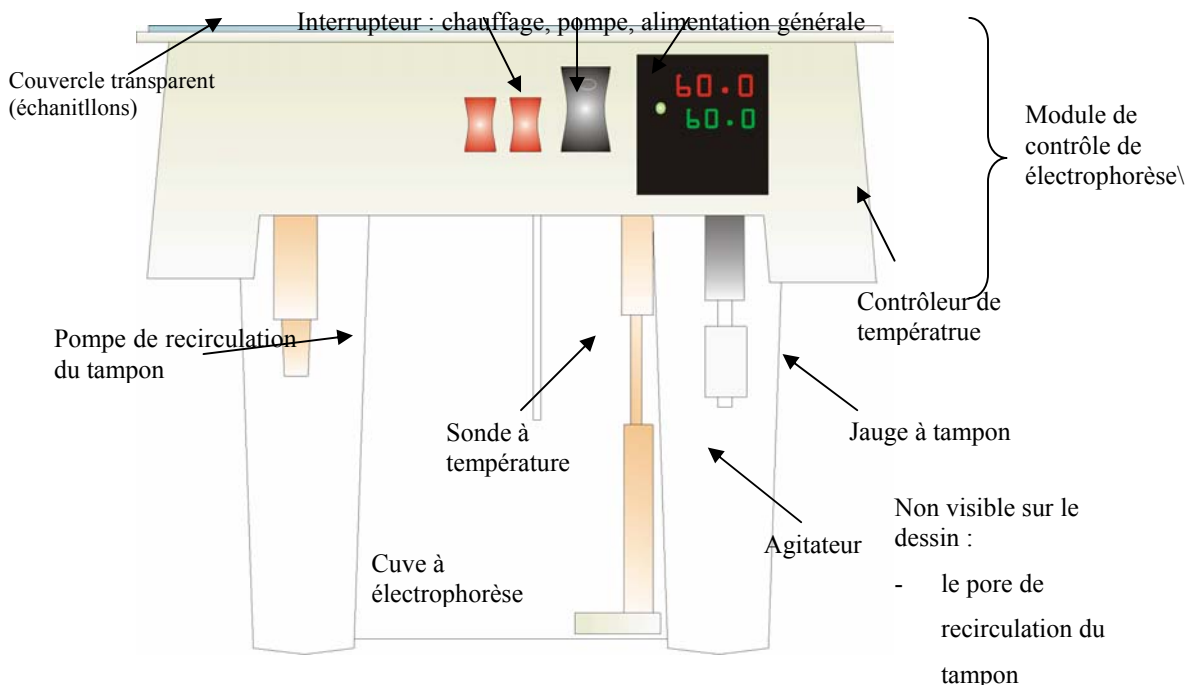


**ATTENTION:** les étapes suivantes doivent être effectuées rapidement (s'applique pour volume de 20 ml/chambre)

- Ajouter 100 µl de persulfate d'ammonium à la chambre A et 100 µl à la chambre B et utiliser l'embout pour agiter dans cette dernière;
- Faire la même chose pour 10 µl de TEMED pour chacune des chambres;
- Retirer le papier collant qui retient le tuyau vers le haut et en même temps que ce dernier est emmené vers le bas, placer le levier à la verticale;
- Vérifier si la solution de faible dénaturant traverse dans l'autre chambre;
- Si tel n'est pas le cas, soulever délicatement le côté où se trouve la chambre B et replacer; il devrait y avoir circulation de la solution de B vers A;
- S'assurer qu'il n'y a pas de bulles dans le tube; le débit ne doit pas être trop rapide ni trop lent (jouer avec la hauteur de la chambre);
- Laisser couler ainsi jusqu'à ce que le gel soit complété et que les deux chambres soient vides (c'est ainsi que s'effectue le gradient);



- Vérifier s'il n'y a pas obturation des orifices de la chambre ou du tuyau; vérifier si le gel ne coule pas: si une de ces deux avenues se produisent, recommencer le gel;
- Lorsque les deux chambres sont vides, immédiatement enlever le bout du petit tuyau d'entre les deux vitres et le placer dans un récipient;
- Verser de l'H<sub>2</sub>O milli-Q dans les deux chambres et s'assurer qu'elle coule dans le tuyau jusqu'au récipient : nettoie la chambre formatrice de gradient et le tuyau;
- Placer rapidement, après que le gel est terminé de couler, le peigne en l'insérant délicatement entre les deux vitres et le glisser dans le gel une "dent" à la fois pour éviter la formation de bulle à la base des puits
- Laisser polymériser pendant 2 heures;
- Assécher la chambre formatrice de gradient et son tuyau;
- Préparer 7 l de tampon TAE 1X: à l'aide d'une cylindre gradué de 1 l, prélever 140 ml de solution TAE 50X et compléter à 1 l avec de l'eau déionisée. Verser dans un récipient pouvant contenir au moins 7 l de solution. Remplir le cylindre de 1 l à 6 reprises de manière à obtenir 7 l de solution TAE 1X;
- Verser la solution TAE 1X dans la cuve à électrophorèse;
- Placer le module contrôleur d'électrophorèse\température par dessus la cuve et s'assurer que la tige rotative est placée dans son enceinte;
- Mettre l'appareil en fonction et les boutons de la pompe et de la température doivent être ouvert;
- Ajuster la température à 60°C;
- Laisser le tampon atteindre cette température (environ 1h30);



Après 2 heures

**Si gel d'empilement (stacking):** évite une certaine perturbation du gradient par le peigne

- Enlever l'eau sur le gel polymérisé à l'aide d'un papier très absorbant tel que du papier filtre *Wathmann*;
- Utiliser 5 ml de la solution à 0%, y ajouter les volumes calculés d'ammonium persulfate 10% et de TEMED;
- À l'aide d'une propipette, déposer les 5 ml de la solution entre les deux vitres, tout en mettant le peigne en place;
- S'assurer qu'il n'y a pas de bulles d'air présentes et que toute l'espace est occupée par la solution d'acrylamide;
- Laisser polymériser 1 heure;

**Si pas de gel d'empilement**

- Retirer le gel de sur son support et de l'éponge de caoutchouc en faisant pivoter les chevilles de 180° vers le haut et en tirant par la suite vers l'extérieur;
- Retirer le peigne délicatement;
- Nettoyer les puits en injectant du TAE 1X à l'intérieur des puits;
- Mettre du tampon sur le caoutchouc scellant se retrouvant sur le support à migration;
- Faire glisser les fentes sur chacune des pinces à sandwich sur le support à migration et pousser jusqu'à ce que l'on entende un clic assez fort;
- Si il y a un deuxième gel, faire les trois dernières étapes;
- Si il n'y a pas d'autre gel, placer deux vitres ensemble (une petite et une grande) sans espaceurs, les faire retenir à l'aide de pince à sandwich et faire les deux dernières étapes;
- Placer le support à migration avec le gel dans la cuve à migration: il y a un côté à la position du support, le point rouge est toujours à droite de la cuve.
- S'il est mal placé, il ne pourra pas entrer;
- Replacer le couvercle contrôleur de température et laisser équilibrer le gel dans le tampon pendant 1 heure;
- Grâce à la pompe, le bassin de dessus se remplira seul;

### 3.5 Préparation des échantillons

Mettre un minimum de 400 ng de matériel génétique (produit de PCR) par échantillon à observer (suivi de l'évolution d'une population microbienne);

- Ajouter un volume égale ou un peu moindre (0.4 volume, minimum) de tampon de chargement 100% glycérol (colorant, xylène cyanol et bleu bromophénol);
- Après 1 heure
- Soulever le petit couvercle transparent se situant sur le dessus du couvercle contrôleur de température;
- Charger les puits des échantillons à l'aide d'embout pour mini gel de protéines à partir du côté gauche du gel s'il est devant le support et à partir du côté droit s'il est derrière le support à migration;
- Ne pas utiliser les 2 premiers puits de chacune des extrémités du gel;
- Replacer le couvercle transparent, s'il n'est pas replacer, le courant ne passera pas;
- Brancher les fils sur le bloc d'alimentation (rouge/rouge, noir/noir);
- Mettre l'appareil sous tension et ajuster à 100V; s'assurer que l'ampérage est de 5 mV;
- Laisser migrer pendant 16 heures;

### 3.6 Coloration du gel

- Éteindre l'appareil DGGE et débrancher les fils du bloc d'alimentation;
- Enlever le gel de sur le support à électrophorèse;
- Soulever la petite vitre à l'aide d'un espaceur;
- En laissant le gel sur la grande vitre, couper les puits et faire une marque oblique sur le coin droit;
- Renverser le gel sur une pellicule de plastique rigide; le coin oblique se retrouve à gauche et devra rester ainsi jusqu'à la fin de la prise de photo;
- Glisser la pellicule de plastique et le gel dans une solution de bromure d'éthidium (**ATTENTION!!!, gants**);
- Colorer en agitant sur une plaque rotative pendant 10 min;
- Retirer la pellicule et le gel du bassin de bromure d'éthidium et décolorer dans un bassin d'H<sub>2</sub>O milli-Q pendant 15 min;
- Retirer la pellicule et le gel du bassin d'eau et prendre la photo sous UV.
- **Nettoyage du matériel**
- Vitres, espaceurs, éponge caoutchouc et peigne: eau savonneuse, rincer eau robinet, rincer H<sub>2</sub>O milli-Q, éthanol et essuyer
- Pince à sandwich, support à migration, cuve et contrôleur de température: rincer H<sub>2</sub>O milli-Q sauf cuve qui est rincé à l'eau normal avant.

#### 4. RÉFÉRENCE(S)

Villemur Richard. Protocoles de l'institut Armand Frappier.

#### 5. RECOMMANDATION(S)

Le port des gants est recommandé lorsqu'on manipule les solvants et la solution de bromure d'éthidium.