



Etude de la bioremédiation par micro-organismes de sols pollués aux métaux et aux HAP

Travail de fin d'études – Mines et Géologie

Florence BRIDOUX

Année académique 2022-2023

Sous la direction de :
Prof. Dr. Ir. Pascal GODERNIAUX
Prof. Dr. Ir. Anne-Lise HANTSON

Résumé

Les sols de notre planète subissent plusieurs types d'agressions dont la pollution. Cette pollution est néfaste pour les écosystèmes et condamne ces sols à ne pas être cultivables.

Actuellement en Wallonie, les traitements des terres sont coûteux, énergivores et polluants. Dans un souci de durabilité, il faudrait effectuer une transition vers des traitements biologiques. Ceux-ci se basent sur l'utilisation du vivant, plus précisément de micro-organismes pour dépolluer des sols. Il s'agit d'un traitement durable et respectueux de l'environnement.

Deux méthodes de bioremédiation sont étudiées dans le cadre de ce travail de recherche : la bioaccumulation de métaux et la biodégradation des HAP. Pour ce faire, plusieurs types de micro-organismes sont utilisés : la bactérie *Pseudomonas putida*, le mélange de micro-organismes efficaces EM de la société EMRO et quatre champignons : *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Macrolepiota rhacodes*.

Pour étudier l'efficacité de bioremédiation de ces différents micro-organismes, des échantillons de sols pollués en hydrocarbures aromatiques polycycliques et/ou métaux lourds provenant d'un centre de traitement des terres ont été placés dans des erlenmeyers et des micro-organismes y ont été inoculés. L'évolution de la concentration en polluants dans la terre a été étudiée au cours du temps par ICP-AES ou GC-MS en fonction de leur nature.

Pour compléter l'étude, les sols ont été caractérisés d'un point de vue lithologique, granulométrique et organique.

Les micro-organismes présentant les meilleurs résultats de bioaccumulation de métaux sont *Pleurotus ostreatus* et *Macrolepiota rhacodes*. Ceux-ci ont aussi prouvé leur capacité à la biodégradation des HAP tout comme *Pseudomonas putida*.

Ce travail de fin d'études a prouvé l'efficacité en laboratoire des traitements biologiques sur des échantillons de sols pollués. La suite de ce travail de recherche serait de tenter de les mettre en œuvre à l'avenir sur des sites pollués Wallons. Ce passage du laboratoire au terrain nécessiterait certaines adaptations mais semble tout à fait réalisable.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Jérémy Dumont car c'est grâce à lui que l'idée de proposer un sujet de dépollution à l'aide de micro-organismes a germé dans mon esprit.

Ensuite, mille mercis à mes promoteurs Pascal Goderniaux et Anne-Lise Hantson d'avoir accepté de m'accompagner sur ce sujet et de m'avoir encadrée tout au long de ce travail. J'ai beaucoup appris à vos côtés et je suis fière du travail que j'ai pu réaliser grâce à vous. Je vous remercie du fond du cœur.

Madame Hantson, merci de m'avoir fait découvrir tant de chose. Il y a cinq ans je n'aimais pas du tout la chimie et je n'aurais jamais pensé que mon travail de fin d'études aurait un lien avec cette matière. Aujourd'hui, j'ai découvert le monde fascinant de la biochimie et des micro-organismes et j'ai adoré travailler dans ce domaine. Merci d'avoir élargi mes horizons.

Monsieur Goderniaux, merci pour tous vos conseils bienveillants et vos remarques pertinentes à chaque réunion. Merci aussi pour les relectures méticuleuses de mon rapport.

Evidemment, un grand merci à Henry Vincent qui m'a été d'une aide indispensable au laboratoire. Merci pour ta gentillesse et désolée pour la verrerie cassée.

Merci beaucoup à Philippe Ancia de m'avoir permis d'utiliser son laboratoire pour tamiser et stocker mes terres. Merci aussi pour la sympathie et les anecdotes.

Merci à Louise Chenoy qui m'a beaucoup aidée à utiliser l'ICP même si cette machine n'était pas très coopérative. Merci de m'avoir accompagné au service de Chimie thérapeutique et Pharmacognosie pour utiliser leur ICP. Merci aussi pour les explications et l'interprétation des résultats.

Merci à Bérénice Deletter pour son aide pour les granulométries ainsi que la préparation des échantillons pour les analyses DRX.

Merci à Joris Coron pour de m'avoir aidée à utiliser le microscope et faire de belles photos.

Merci à Nicolas Dupont pour son aide et ses explications concernant les analyses des spectrogrammes de la DRX.

Merci à mes parents et ma sœur de m'avoir toujours soutenue et encouragée. Merci aussi pour la relecture de ce rapport même si c'est « que la forme et pas le fond ».

Et enfin, merci à Arnaud. Merci pour l'amour, le soutien et surtout, les pizzas faites maison.

Je remercie sincèrement chaque personne qui, de près ou de loin, m'a apporté son aide sur ce travail qui fut (académiquement parlant) mon expérience la plus épanouissante à la Faculté.

Table des matières

Introduction	1
1. La pollution des sols dans le monde.....	1
2. La pollution des sols en Wallonie	2
2.1 Les Métaux Lourds.....	5
2.2 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)	5
3. La gestion des terres en Wallonie	6
Chapitre 1 : les traitements biologiques	8
1. Choix d'un traitement	8
2. La bioremédiation	8
2.1 La biodégradation.....	9
2.2 La mycoremédiation.....	10
2.3 La bioaccumulation	11
3. Les limites de la bioremédiation	12
Chapitre 2 : matériel et méthodes	13
1. Objectifs des expériences.....	13
2. Micro-organismes utilisés	13
2.1 La bactérie « <i>Pseudomonas putida</i> ».....	14
2.2 Les micro-organismes efficaces « EM ».....	14
2.3 Les <i>fungi</i>	14
3. Description des expériences.....	15
4. Inoculation des micro-organismes	16
4.1 Développement des champignons sur boîte de pétri	16
4.2 Développement de la bactérie <i>Pseudomonas</i> et du mélange d'EM	16
4.3 Préparation des erlenmeyers	16
4.4 Inoculation.....	17
4.5 Incubation.....	18
5. Méthodes d'analyse des polluants.....	18
5.1 Analyse des métaux.....	18
5.2 Quantification des métaux	20
5.3 Analyse des HAP	21
5.4 Quantification des HAP	22
Chapitre 3 : choix et caractérisation des lots de sols étudiés	23
1. Choix et obtention des terres polluées	23

1.1	Echantillonnage des sols.....	24
1.2	Tamisage des sols	24
1.3	Analyses des sols	25
2.	Etude de la granulométrie.....	26
3.	Etude au microscope	28
4.	Analyses aux rayons X	29
4.1	Analyses totales.....	30
4.2	Analyses des fractions fines.....	31
5.	Taux d'humidité.....	32
6.	TOC	33
Chapitre 4 : résultats et discussion des essais de bioremédiation		34
1.	Développement des micro-organismes	34
2.	Résultats de l'étude de bioaccumulation de métaux.....	37
2.1	Bioaccumulation sur le lot 1.....	37
2.2	Bioaccumulation sur le lot 2.....	38
2.3	Bilans de masse	40
3.	Biodégradation des HAP.....	43
3.3.	Biodégradation sur le lot 2	43
3.4.	Biodégradation sur le lot 3	45
Conclusions		47
	Constats.....	47
	Leçons.....	47
	Suite et perspectives	48
	La 3 ^e voie du vivant.....	49
Liste bibliographique		51
Annexes.....		54
	Protocole de mesure des éléments traces métalliques dans le sol par attaque acide oxydante (adapté de la méthode 3050B de l' U.S. Environmental Protection Agency)	57
	Protocole d'extraction Soxhlet.....	58

Introduction

Etant une étudiante soucieuse des problématiques environnementales, j'ai réalisé mon stage de deuxième année de Master dans un centre de traitement de terres. J'y ai beaucoup appris sur la législation et la gestion des terres polluées en Wallonie. J'ai pu constater que les traitements de dépollution étaient très coûteux et que la législation sur la gestion des terres en Région wallonne restait perfectible. A la suite de ce stage, j'ai pris conscience de l'importance de développer des solutions de dépollution plus abordables et, bien sûr, davantage respectueuses de l'environnement. Pour ce faire, j'ai décidé d'axer mon travail de fin d'études sur la dépollution des sols par des techniques de bioremédiation.

Avant d'approfondir le sujet de la bioremédiation, il est important de comprendre en quoi la pollution des sols est une problématique d'ordre mondial.

1. La pollution des sols dans le monde

Des scientifiques ont établi qu'il existait 9 limites planétaires (Rockström et al., 2009). Il s'agit de points de basculement qui, une fois dépassés, menacent la viabilité de notre planète. Selon certains spécialistes, chaque dépassement de ces limites environnementales nous précipite de plus en plus vers la 6^e extinction de masse. Comme on peut le voir à la Figure 1, 6 de ces 9 limites ont déjà été dépassées.

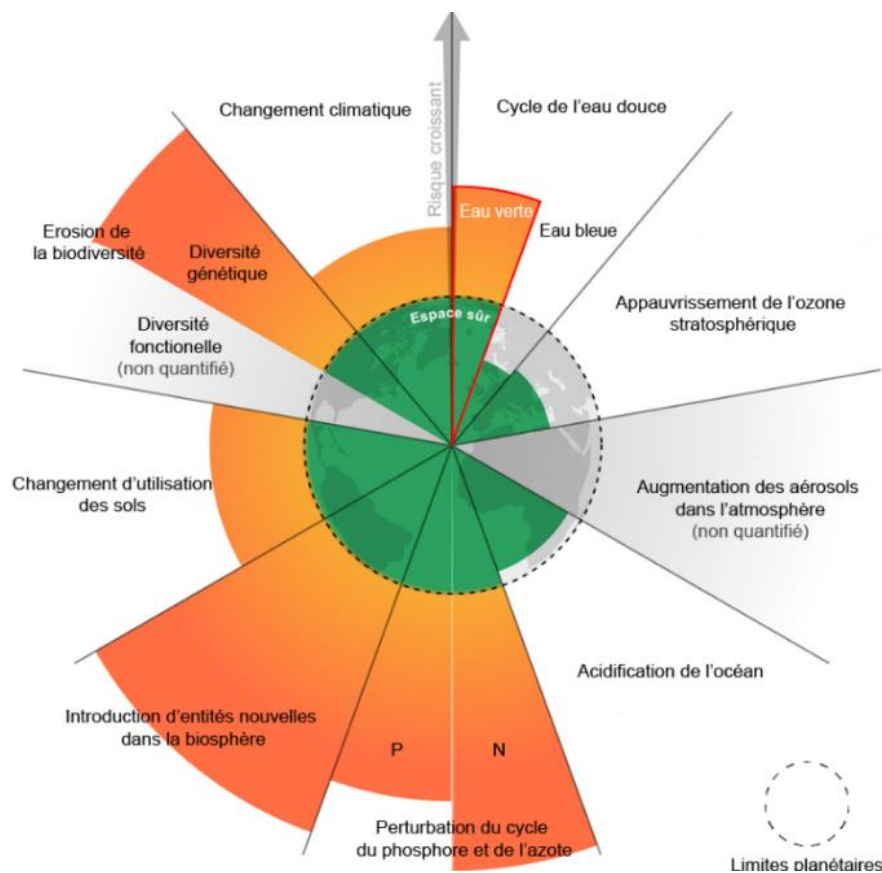


Figure 1 : schéma actuel des 9 limites planétaires, en rouge : limites dépassées (Wang-Erlandsson et al., 2022, modifié par Wagner, 2022)

Une des limites ayant été dépassée concerne l'affectation des sols. Il s'agit de la pédosphère¹. Celle-ci subit différents types d'agression de part et d'autre du globe. Par exemple, en Amazonie, c'est la déforestation pour la culture de soja destiné aux animaux d'élevage qui est la principale responsable. Dans des pays Européens comme la Belgique et la France, c'est l'inverse, la superficie des terres agricoles décroît constamment face à l'artificialisation des sols. Cette diminution n'est pas en accord avec l'augmentation démographique et nous rend donc dépendant à l'importation alimentaire.

Cette dégradation de la pédosphère est dangereuse pour l'humanité car elle pourrait diminuer les rendements agricoles et causer des risques d'insécurité alimentaire. En plus du changement nécessaire de notre mode de production alimentaire, il est donc tout aussi crucial de préserver et restaurer la qualité des sols.

En parallèle à la diminution des surfaces agricoles, on constate une augmentation des sites pollués. Actuellement, 75% des sols de notre planète se trouvent dans un état dégradé dû aux activités humaines et, si la manière dont nous nous préoccupons de ces sols n'évolue pas, ce chiffre pourrait atteindre les 95% d'ici 2050 (Cherlet et al., 2018). En Wallonie, le nombre de terrains artificialisés a augmenté de 44% entre 1985 et 2020, et cela aux dépens des terrains agricoles (Service Public de Wallonie, 2021).

On sait qu'à l'avenir il faudra à nouveau cultiver nos terres locales. Or, pour mener une activité agricole, il faut des terres exemptes de toute pollution. Cette problématique, que nous allons tout de suite aborder, nous concerne donc tout particulièrement.

2. La pollution des sols en Wallonie

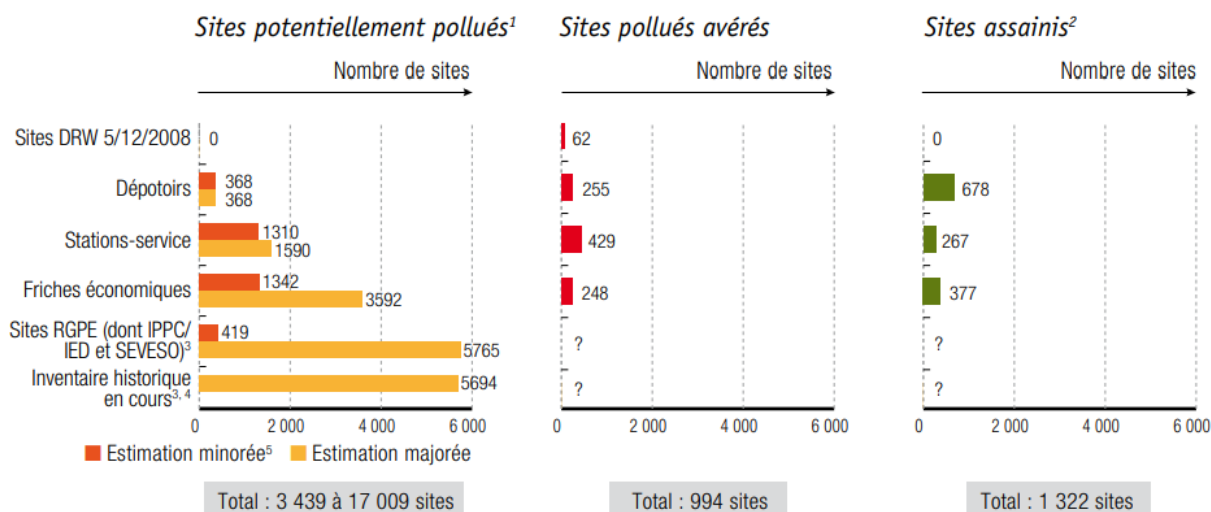
Les sols wallons sont victimes de nombreux problèmes : l'imperméabilisation, la perte de biodiversité, l'acidification, la compaction, l'érosion, la pauvreté en matière organique et enfin, la pollution locale et diffuse (Service Public de Wallonie - environnement, 2021).

Dû au passé industriel de la région, ces sols ont été soumis à d'importants risques de pollution. Dans le Rapport sur l'état de l'environnement wallon de 2012, il est estimé que la Wallonie compterait une densité de sites potentiellement pollués comprise entre 1 et 10 sites par 10 km² (Service Public de Wallonie, 2012). Ceux-ci ont été recensés sur une carte reprenant les zones comprenant des sites potentiellement pollués (voir Figure 29 en annexes). On y observe que la pollution est principalement localisée le long du sillon Sambre et Meuse.

Selon ce rapport propre à la Wallonie, il ressort que le nombre de sites potentiellement pollués pourrait s'élever à plus de 17 000 tandis que les sites assainis sont au nombre de 1 322 (Figure 2).

Mais qu'advient-il de ces sites ?

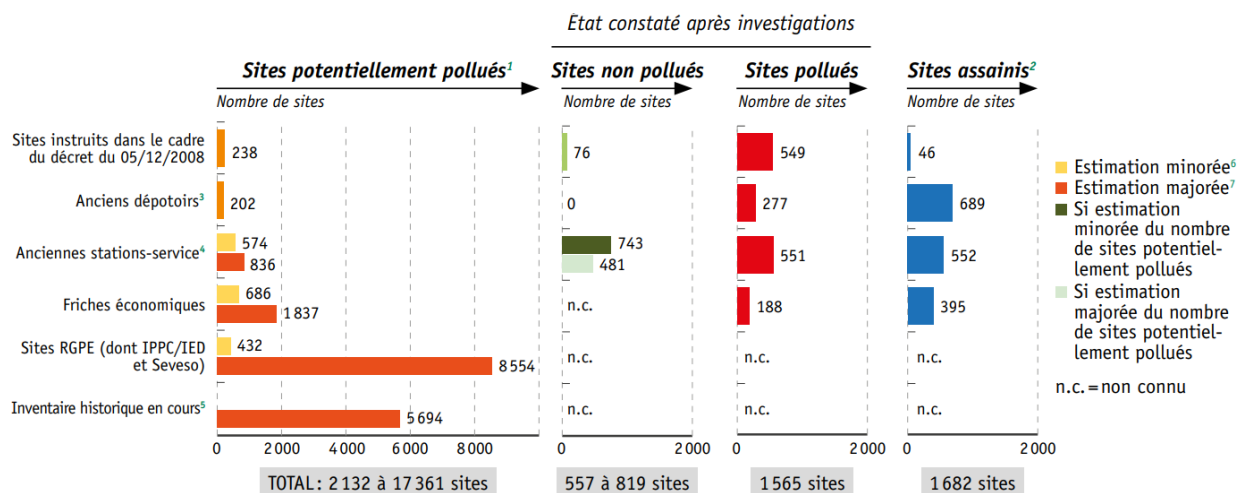
¹ **Pédosphère** : ensemble des sols formant la couche externe de notre planète



¹ Site accueillant ou ayant accueilli une activité ou une installation susceptible de polluer le sol ou les eaux souterraines ² Ou ayant fait l'objet de mesures de gestion de la pollution ³ Risque de doublons pour cette catégorie ⁴ Cartes Vandermaelen (éditées vers 1850) ⁵ Sources fiables, minimum de doublons

Figure 2 : inventaire des sites potentiellement pollués, pollués avérés et assainis en Wallonie en 2012 (Service Public de Wallonie, 2012)

Dans le Rapport de l'état de l'environnement wallon de 2017, on trouve un inventaire mis à jour des sites potentiellement pollués (Figure 3). Le nombre de sites wallons assainis s'élève à 1 682 sites. Cela représente 360 sites supplémentaires par rapport à l'année 2012. Cela veut dire qu'en moyenne, sur cette période de 5 ans, 72 sites sont assainis par an. A ce rythme-là, il faudrait au moins deux siècles pour traiter l'ensemble des sols wallons (potentiellement) pollués.



¹ Sites accueillant ou ayant accueilli une activité ou une installation susceptible de polluer le sol ou les eaux souterraines | ² Ou ayant fait l'objet de mesures de gestion de la pollution | ³ Sites instruits dans le cadre de la législation relative aux déchets | ⁴ Sites instruits dans le cadre du RGPT | ⁵ Cartes Vandermaelen (éditées vers 1850) ; inventaire en cours d'enrichissement à partir d'autres sources | ⁶ Sources fiables, minimum de doublons | ⁷ Données incertaines, risque de doublons

Figure 3 : inventaire des sites potentiellement pollués, non-pollués, pollués et assainis en Wallonie en 2017 (Service Public de Wallonie, 2017)

Lors de mon stage dans un centre de traitement des terres (Bridoux, 2022), j'ai pu observer les types de pollution des lots de terre gérés par l'entreprise. Le Tableau 1 reprend les récurrences des différents polluants dont les concentrations sont contrôlées pour définir le type d'usage ultérieur des lots.

Il en ressort qu'en Wallonie, les familles de polluants les plus récurrentes dans les sols sont les métaux lourds et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

	Usage type IV	Usage type V	Usage > V	Total	%
Métaux/métalloïdes					
Arsenic	0	2	2	4	0,37
Cadmium	14	3	0	17	1,59
Chrome	29	17	6	52	4,87
Chrome VI	3	0	1	4	0,37
Cuivre	26	4	7	37	3,47
Mercure	8	0	5	13	1,22
Nickel	4	0	2	6	0,56
Plomb	49	30	4	83	7,78
Zinc	69	0	9	78	7,31
Hydrocarbures aromatiques non halogénés					
Benzène	24	0	26	50	4,69
Ethylbenzène	7	0	2	9	0,84
Toluène	0	0	0	0	0,00
Xylènes	0	0	0	0	0,00
Styrène	0	0	1	1	0,09
Phénol	0	6	1	7	0,66
Hydrocarbures aromatiques polycycliques non halogénés					
Naphtalène	0	1	2	3	0,28
Acénaphylène	0	0	0	0	0,00
Acénaphène	0	1	2	3	0,28
Fluorène	0	2	0	2	0,19
Phénanthrène	0	13	5	18	1,69
Anthracène	0	19	5	24	2,25
Fluoranthène	22	13	4	39	3,66
Pyrène	6	11	8	25	2,34
Benzo(a)anthracène	0	15	9	24	2,25
Chrysène	70	12	6	88	8,25
Benzo(b)fluoranthène	54	9	4	67	6,28
Benzo(k)fluoranthène	39	9	5	53	4,97
Benzo(a)pyrène	43	6	10	59	5,53
Dibenzo(a,h)anthracène	0	12	6	18	1,69
Benzo(g,h,i)pérylène	72	12	6	90	8,43
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	0	11	6	17	1,59
Composés organiques volatils chlorés					
Dichlorométhane	0	0	0	0	0,00
Trichlorométhane	0	2	3	5	0,47
Tétrachlorométhane	0	2	2	4	0,37
Tétrachloroéthène (PCE)	6	2	5	13	1,22
Trichloroéthène	17	2	5	24	2,25
1,2-Dichloroéthène (somme) (DCE)	3	0	1	4	0,37
Chloroéthène (VC)	0	0	0	0	0,00
1,1,1-Trichloroéthane (1,1,1 - TCA)	0	0	0	0	0,00
1,1,2-Trichloroéthane (1,1,2 - TCA)	0	2	0	2	0,19
1,2-Dichloroéthane (1,2 - DCA)	1	0	0	1	0,09
Cyanures					
cyanures libres	0	0	0	0	0,00
Autres composés organiques					
Methyl-Tert-Butyl-Ether (MTBE)	0	0	0	0	0,00
Hydrocarbures pétroliers					
Fraction EC5-8	0	1	7	8	0,75
Fraction EC>8-10	11	2	1	14	1,31
Fraction EC>10-12	14	0	4	18	1,69
Fraction EC>12-16	21	1	10	32	3,00
Fraction EC>16-21	3	9	3	15	1,41
Fraction EC>21-35	26	8	2	36	3,37
				1067	

Tableau 1 : récurrences des polluants de 2020 à 2022 sur un site de traitement des terres pour les types d'usage IV (récréatif ou commercial), V (industriel) et supérieur à V (Bridoux, 2022)

Le choix des polluants sur lesquels un traitement biologique va être étudié a été défini sur base des plus récurrents en Wallonie : les métaux lourds et les HAP. Ce choix est conforté par le fait qu'il s'agit de composés non-volatils, ce qui facilite leur analyse ainsi que les risques pour la santé lors des manipulations. Travailler avec des composés volatils aurait présenté une difficulté supplémentaire car il est compliqué de prouver que le polluant étudié a été éliminé grâce à la biologie ou simplement par volatilisation.

2.1 Les Métaux Lourds

Dans le langage courant, on utilise le terme « métaux lourds » pour parler d'éléments métalliques, les ETM (Pb, Zn, Cr, Cd, Ni, Hg, As, Co) et des métalloïdes en trace (B, Ge, As, Se, Sb, T).

Il existe des pollutions métalliques naturelles dues à la nature des fonds chimiques comme c'est le cas par exemple au Bangladesh où la teneur en arsenic dans les eaux souterraines est tellement élevée que le fait de consommer cette eau peut provoquer de graves troubles de la santé (Nickson et al, 2000). Cependant, de manière générale, la pollution métallique est principalement d'origine anthropique, liée à l'extraction minière, la gestion des eaux usées, l'utilisation de pesticides, les déchets industriels, les décharges sauvages, la production de carburant, la combustion du charbon, les opérations militaires, etc... (Zhen-Guo et al., 2002)

Ces métaux sont des polluants inorganiques non-volatils (mis à part le mercure). Leur solubilité dépend du pH et du potentiel-redox du milieu. Ce lien, qui varie pour chaque métal lourd, est illustré via des diagrammes de Pourbaix (diagramme potentiel-pH). Dans les conditions de ce TFE, les métaux étudiés sont majoritairement très peu solubles.

2.2 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des composés organiques constitués de carbone et d'hydrogène.

Bien qu'il existe des HAP d'origine naturelle (exemples : produits lors d'incendies, d'activités volcaniques), ceux-ci sont principalement d'origine anthropique due à la combustion incomplète de matière organique, autrement dit, de combustibles fossiles (Norini, 2007) mais aussi de l'industrie de la cokéfaction.

Un composé est qualifié d'insoluble en dessous de la valeur de 150 mg par litre de solution à 20°C. Les valeurs de solubilité des HAP étant bien inférieures à cet ordre de grandeur, ils peuvent eux aussi être considérés comme insolubles.

Le log K_{oc} est le coefficient de partitionnement avec le carbone organique. Plus le K_{oc} d'un composé est élevé, plus ce composé a tendance à s'adsorber sur la matière organique.

Le log K_{ow} est le coefficient de partage octanol/eau. Il qualifie le caractère hydrophile/hydrophobe des polluants. Plus la valeur de ce logarithme est importante, plus le composé est hydrophobe.

Ces caractéristiques physico-chimiques des HAP sont présentées au Tableau 2.

polluants	formule brute	nombre de cycles	log K _{oc}	log K _{ow}	S* [mg/L]	Pvap [Pa]
naphtalène	C ₁₀ H ₈	2	2,74	3,4	31	36,8
acénaphtylène	C ₁₂ H ₈	3	1,12	4	16,1	4,14
acénaphène	C ₁₂ H ₁₀	3	3,66	3,9	3,8	1,52
fluorène	C ₁₃ H ₁₀	3	3,88	4,2	1,9	7,5 × 10 ⁻¹
phénantrène	C ₁₄ H ₁₀	3	1,82	4,6	1,1	7,78 × 10 ⁻²
anthracène	C ₁₄ H ₁₀	3	4,46	4,5	0,05	1,13 × 10 ⁻²
fluoranthène	C ₁₆ H ₁₀	4	5,16	5,2	0,26	8,72 × 10 ⁻³
pyrène	C ₁₆ H ₁₀	4	4,83	5,2	0,13	1,19 × 10 ⁻²
benzo[a]anthracène	C ₁₈ H ₁₂	4	5,24	5,7	0,01	6,06 × 10 ⁻⁴
chrysène	C ₁₈ H ₁₂	4	5,72	5,8	0,002	8,40 × 10 ⁻⁵
benzo[b]fluoranthène	C ₂₀ H ₁₂	5	5,74	5,8	0,002	6,70 × 10 ⁻⁶
benzo[k]fluoranthène	C ₂₀ H ₁₂	5	5,74	6	0,001	4,12 × 10 ⁻⁷
benzo[a]pyrène	C ₂₀ H ₁₂	5	6,74	6	0,004	2,13 × 10 ⁻⁸
dibenzo[a,h]anthracène	C ₂₂ H ₁₄	5	6,52	6,8	0,0006	9,16 × 10 ⁻⁹
indénol[1,2,3-c,d]pyrène	C ₂₂ H ₁₂	6	6,2	6,6	0,062	1,3 × 10 ⁻⁸
benzo[g,h,i]pérylène	C ₂₁ H ₁₆	6	6,2	6,5	0,0003	2,25 × 10 ⁻⁵

Tableau 2 : caractéristiques physico-chimiques des HAP (Norini, 2007, Rabodonirina, 2015)

La pression de vapeur saturante (P_{vap}) reflète la tendance à la volatilisation. Les composés dont la valeur est inférieure à 1,30 × 10⁻¹³ atm soit 1,32 × 10⁻⁸ Pa, sont considérés comme non-volatils, ceux dont la valeur est comprise entre 1,30 × 10⁻¹³ et 1,30 × 10⁻³ atm soit entre 1,32 × 10⁻⁸ et 1,32 × 10² Pa sont semi-volatils.

Sur base du Tableau 2, il ressort que seul le naphtalène (le plus léger des HAP) peut être considéré comme volatil. Les autres sont semi-volatils voire non-volatils.

3. La gestion des terres en Wallonie

Les terres considérées comme polluées sont soumises à une législation spécifique selon la législation wallonne. Ces terres sont assimilées à des déchets mais cela ne veut pas dire qu'elles ne peuvent pas être revalorisées.

Leur éventuelle revalorisation dépend de leurs concentrations en plusieurs polluants. En fonction de ces seuils de concentrations, les lots de terres peuvent donc être valorisés en différents types d'usages selon l'arrêté du gouvernement Wallon du 5/07/2018 relatif à la gestion et à la traçabilité des terres. Ce décret, appelé « Décret Sols », définit cinq types d'usage :

I	II	III	IV	V
naturel	agricole	résidentiel	récréatif ou commercial	industriel

Tableau 3 : les 5 types d'usage de sols en Wallonie (Gouvernement Wallon, 2018)

Au-delà des limites de seuils de concentration du type V, les terres sont considérées comme non-valorisables. Deux options sont alors possibles : un traitement ou l'élimination (mise en décharge).

Lors de mon stage en entreprise, j'ai eu accès aux registres de traitement des terres et j'ai pu prendre connaissance des flux d'entrée et de sortie des terres. J'y ai constaté qu'environ un tiers des terres ont été envoyées en CET (centre d'enfouissement technique), c'est-à-dire qu'elles sont éliminées (Bridoux, 2022).

Ce chiffre est certes interpellant mais il s'explique par le fait que les traitements des terres sont des processus lents et très coûteux et que l'envoi en CET est beaucoup plus avantageux d'un point de vue économique. Dans un souci de confidentialité, les prix pratiqués ne peuvent être divulgués mais il faut savoir qu'un traitement biologique visant à dégrader les hydrocarbures coûte environ 1,5 fois le prix d'un envoi en CET de classe 3. Pour ce qui est du lavage physico-chimique visant à éliminer les métaux lourds, le prix est aux alentours du double d'un dépôt en CET classe 3 (Bridoux, 2022).

Ce constat est limité aux observations faites durant le stage mais il semblerait que cela soit la norme dans le monde du traitement des terres, que ce soit en Belgique mais aussi à l'étranger. En effet, M. Dufresne conclut de sa thèse de doctorat sur la durabilité des traitements des sols que les centres d'enfouissement sont l'option de traitement privilégiée car il s'agit d'une solution simple et relativement bon marché (Dufresne, 2013). A vrai dire, il ne s'agit pas vraiment d'un traitement mais d'une élimination.

Ayant eu l'occasion lors de mon stage de discuter avec des personnes travaillant dans le milieu, il est fort probable que la législation sur l'envoi en CET se durcisse dans les années à venir et que cette solution devienne très chère pour que celle-ci n'ait lieu qu'en dernier recours, dans le cas de sols non traitables. Actuellement, la législation permet que des terres polluées mais traitables soient envoyées en CET. Il est peu probable que le Gouvernement Wallon ne se penche pas sur cette faille législative dans les années à venir. Les entreprises vont donc sérieusement rechercher les options de traitements des terres. Or, la majorité de ces traitements sont très onéreux. Il est nécessaire de développer des solutions de dépollution qui soient simples et abordables financièrement.

Le sujet de ce travail de fin d'études porte donc sur une étude expérimentale de dépollution de sols pollués via des traitements biologiques. En effet, ceux-ci s'inscrivent dans l'avenir de la dépollution.

Chapitre 1 : les traitements biologiques

1. Choix d'un traitement

Le choix de la méthode de traitement d'un sol pollué se fait sur base de plusieurs critères : les natures de sols et de polluants, la superficie et la profondeur de la pollution, la profondeur de la nappe d'eau souterraine, la durée de réhabilitation et bien sûr, le coût. Au vu de tous ces critères, le choix de la méthode de traitement se fait en pratique au cas par cas. Cependant, il s'agit là uniquement de critères « techniques ». Pour prendre en compte le critère « durable », il faut y ajouter les enjeux environnementaux, économiques et sociétaux (Dufresne, 2013).

Les méthodes de traitements des terres peuvent être divisées en deux catégories : *in situ* ou *ex situ*. Actuellement, la plupart des traitements sont réalisés *ex situ*. Il existe une méthode intermédiaire appelée *on site*, dans ce cas, les terres sont excavées et traitées sur place. D'un point de vue environnemental, il est évident que le *in situ* l'emporte sur le *ex situ*. En effet, devoir excaver des centaines, voire des milliers, de tonnes de terres et ensuite les déplacer jusqu'à un centre où elles seront prises en charge et redéplacées sur leur lieu de valorisation par la suite est extrêmement chronophage et énergivore en comparaison avec les méthodes *in situ* où l'objectif est de dépolluer le sol à même le site.

Il ressort d'une étude sur la durabilité des sols que le traitement biologique est la méthode de traitement s'inscrivant le mieux dans les critères de durabilité (Dufresne, 2013). En effet, celle-ci est respectueuse de l'environnement mais aussi des travailleurs la mettant en œuvre, même si une attention particulière doit être portée aux risques de pathogénicité de certains microorganismes. Elle présente de faibles voire pas de répercussions sur la population et son coût d'application est raisonnable.

2. La bioremédiation

Un traitement biologique vise à décontaminer (extraction ou dégradation du contaminant) ou assainir (réduire les risques) grâce à des organismes vivants. On utilise des micro-organismes (bioremédiation), des végétaux (on parle alors de phytoremédiation) ou on tire profit de l'action symbiotique entre les deux. (ADIT, 2006)

L'objectif est de rendre le polluant moins toxique, de l'extraire, l'immobiliser ou le diluer grâce à des procédés tels que l'adsorption ou l'absorption (concentration du polluant), la dégradation, la digestion, l'évapotranspiration ou la transformation (ADIT, 2006).

Les métaux et les HAP étant des polluants de nature différente, leurs méthodes de traitement le sont elles aussi. Le traitement des HAP consiste à les dégrader tandis que pour les métaux, l'objectif est de les concentrer et les extraire. Il s'agit là respectivement de biodégradation et de bioaccumulation.

2.1 La biodégradation

On distingue deux types de bioremédiation *in situ* (Roger et Jacq, 2000) : l'approche écologique microbienne (« *microbial ecology approach* ») et le traitement microbien (« *microbiological approach* »). Dans la littérature scientifique francophone, on parle respectivement de biostimulation et de bioaugmentation (Belley-Vézina, 2014).

La biostimulation consiste, comme son nom l'indique, à stimuler les organismes natifs du sol afin de favoriser l'action microbienne de dégradation des polluants (Roger & Jacq, 2000). La bioaugmentation va, quant à elle plus loin : la population microbienne, en plus d'être stimulée, est augmentée par l'introduction de micro-organismes supplémentaires. La Figure 2 montre que l'inoculation de micro-organismes supplémentaires permet d'accélérer la dégradation des polluants présents dans le sol.

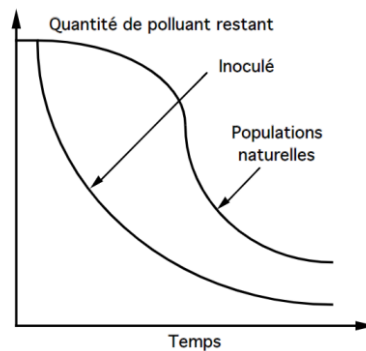


Figure 2 : Représentation schématique de l'effet attendu de l'inoculation sur la dégradation des polluants (Roger & Jacq, 2000)

Au-delà de l'intérêt de dépollution, l'ajout de micro-organismes dans les sols est fortement bénéfique d'un point de vue environnemental : cela engendre un accroissement de la biomasse et de la biodiversité microbienne (Bigot, 2019).

De manière extrêmement simplifiée, lorsqu'on leur fournit de l'oxygène et des nutriments, les micro-organismes sont capables de dégrader des substances organiques telles que les HAP en dioxyde de carbone et en eau (Alexander, 1999). En pratique, il s'agit d'une dégradation progressive lors de laquelle de nombreux composés intermédiaires sont formés. Certaines bactéries sont capables d'utiliser les hydrocarbures comme donneurs d'électrons pour croître en condition d'aérobie. La décomposition se fait via des réactions d'oxydation biochimique (Norini, 2007). L'objectif est d'oxyder les cycles afin de les dissocier et d'obtenir des composés intermédiaires de type alcool ou acide carboxylique et finalement des composés contenant un seul cycle (Norini, 2007). A terme, le produit résultant peut être du dioxyde de carbone.

Un exemple est présenté à la Figure 3. Il s'agit de l'oxydation du naphthalène, le plus simple des HAP. De manière générale, différentes voies de dégradation des HAP sont détaillées à la Figure 4.

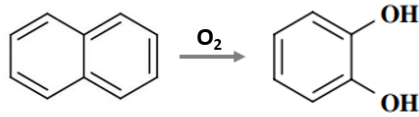


Figure 3 : oxydation simplifiée du naphthalène en catéchol (1,2-dihydroxybenzene)

Plusieurs micro-organismes ont déjà prouvé leur capacité à dégrader des HAP en aérobiose. Parmi eux figure la bactérie *Pseudomonas putida* mais c'est aussi le cas de plusieurs champignons. La dégradation via des champignons est appelée mycoremédiation.

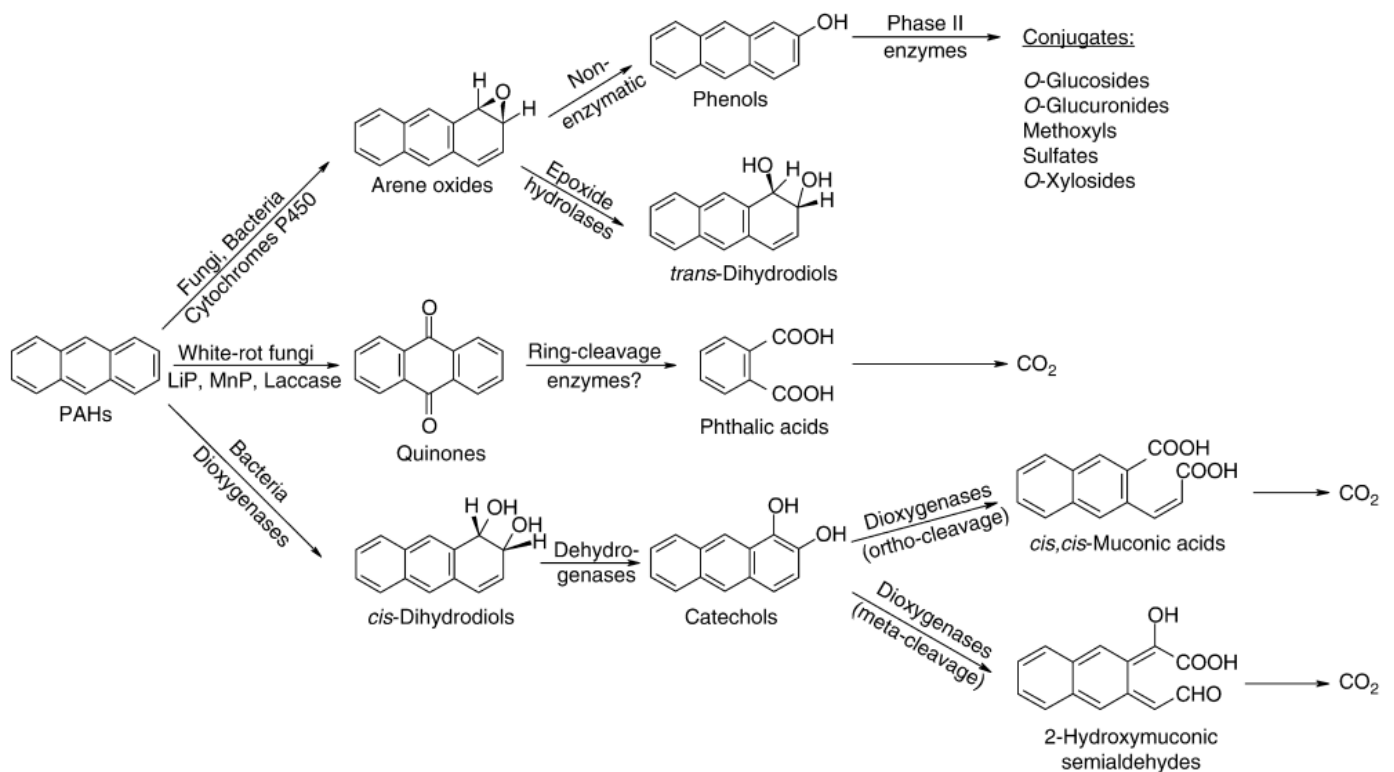


Figure 4 : exemples de voies de dégradation des HAP par des champignons et des bactéries (Cerniglia et Sutherland, 2010 modifié d'après Cerniglia, 1993)

2.2 La mycoremédiation

La mycoremédiation est un type de bioremédiation. Elle se base sur l'utilisation de champignons - plus précisément de leur mycélium - pour décomposer ou éliminer les polluants d'un environnement (Stamets, 2005). Le mycélium est la partie souterraine d'un champignon supérieur à carpophore. Il s'agit d'un ensemble complexe de filaments pouvant être assimilé à son système racinaire. Il est la principale étape du cycle de vie des champignons. Ce que l'on appelle communément « champignon » est en fait le résultat de la fructification du mycélium (Figure 5). Ce fruit va libérer des spores qui, après germination, donneront lieu à du mycélium.

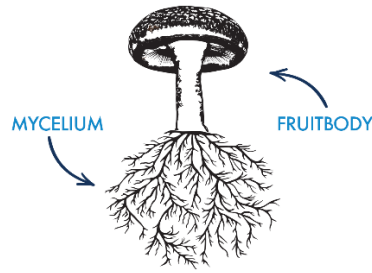


Figure 5 : schéma d'un champignon à carpophore

Les champignons ont une action de décomposition très puissante grâce à la sécrétion d'enzymes extracellulaires via leur mycélium. Parmi ces enzymes se trouvent la lignine peroxydases (LiP) et la manganèse peroxydase (MnP). De ce fait, l'ajout de sources de carbone, par exemple de la sciure ou de la paille permet d'améliorer les capacités de dégradation induisant une surproduction de ces enzymes (Adenipekun et Lawal, 2012).

Les champignons peuvent être divisés en 4 catégories : les saprophytes, les parasites, les mycorhiziens et les endophytes. C'est la première de ces catégories qui est intéressante pour la mycoremédiation. Les champignons saprophytes sont les champignons décomposeurs. Ils sont considérés comme les principaux recycleurs de la planète (Stamets, 2005).

Parmi les champignons décomposeurs, il y a deux sortes de mycéliums : le *white-rot fungi* (pourriture blanche) et le *brown-rot fungi* (pourriture brune). Ceux-ci sécrètent des enzymes capables de digérer les principales composantes structurales du bois : la lignine, l'hémicellulose et la cellulose. Le premier digère la lignine grâce à la sécrétion d'enzymes. La lignine ayant été dégradée, le bois résultant est alors principalement composé de cellulose, celle-ci étant de couleur blanche, la dégradation donne alors un aspect blanchi au bois. Le second quant à lui dégrade la cellulose laissant la lignine sous forme de dépôts brunâtres. Les champignons à pourriture blanche sont les plus nombreux (Stamets, 2005) et sont ceux qui présentent le potentiel de bioremédiation le plus intéressant. Ils ont prouvé leur capacité à dégrader plusieurs substances toxiques comme les HAP, certains pesticides, les phénols et les colorants (Singh, 2006). Le Tableau 6 en annexes présente quelques champignons à pourriture blanche capable de dégrader des polluants (Stamets, 2005), les plus réputés dans le milieu de la bioremédiation sont : *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* et *Trametes versicolor* (Singh, 2006, Adenipekun et Lawal, 2012).

Les mycéliums de champignon à pourriture blanche brisent les liaisons hydrogène-carbone et oxydent la matière organique sous forme d'eau et de dioxyde de carbone grâce à la production de peroxydase. Ce phénomène de dégradation se produit car les structures moléculaires de la lignine et des HAP sont analogues (Norini, 2007, Garon et al., 2000). Les enzymes du mycéliums capables de dégrader la lignine sont donc aussi capable de dégrader des HAP.

2.3 La bioaccumulation

En plus de leur capacité à dégrader des polluants, les champignons sont aussi des bioaccumulateurs. Certains d'entre eux sont mêmes des hypercumulateurs, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'absorber et d'accumuler des éléments tels que les métaux lourds à des taux allant jusqu'à plusieurs milliers de fois supérieurs à ceux des zones environnantes (Stamets, 2005).

Cette capacité est évaluée par un coefficient d'accumulation aussi appelé facteur de bioaccumulation : il s'agit du rapport de la concentration en un métal dans le champignon et celle dans son environnement. Le Tableau 6 en annexe reprend les principaux champignons acteurs de la bioaccumulation ainsi que leur facteur de bioaccumulation pour différents métaux lourds.

L'objectif est donc de développer du mycélium de diverses souches sur sol pollué et d'ensuite le récolter une fois qu'il aura accumulé les métaux lourds. Plusieurs récoltes peuvent s'avérer nécessaire afin de diminuer suffisamment la pollution. Le produit récolté peut être considéré comme une source de métaux à recycler : une fois incinéré, les cendres sont concentrées en métaux lourds (Giasson, 2005).

3. Les limites de la bioremédiation

La capacité de certains micro-organismes à dégrader des polluants a bien été démontrée mais celle-ci n'est possible que pour une certaine gamme de pollution. Si la concentration du polluant est trop importante, cela peut avoir un effet toxique sur la bactérie dégradante. A l'inverse, si la concentration est trop faible, aucune enzyme de dégradation ne sera induite pour dégrader le polluant (Adams et al., 2015).

La technologie de la bioremédiation se basant sur des organismes vivants, l'action de la biodégradabilité est fortement dépendante de l'activité microbienne ainsi que des caractéristiques du site (Belley-Vézina, 2014). Le Tableau 4 présente les paramètres dont dépend la dégradation des HAP.

Propriétés du sol	Propriétés de l'hydrocarbure	Microflore
<p>pH</p> <p>présence de sources de carbone</p> <p>disponibilité des nutriments</p> <p>température</p> <p>salinité</p> <p>porosité</p> <p>humidité</p> <p>oxygénation</p> <p>présence d'un accepteur d'électrons</p>	<p>poids moléculaire et structure</p> <p>concentration</p> <p>biodisponibilité</p> <p>solubilité dans l'eau</p>	<p>diversité et abondance</p> <p>production de surfactant</p> <p>type de substrats et nutriments</p> <p>paramètres du milieu de croissance</p> <p>affinité pour le substrat</p> <p>voie métabolique</p>

Tableau 4 : facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures (modifié, d'après Belley-Vézina, 2014)

L'efficacité d'une biodégradation de polluant est complexe car elle dépend de plusieurs paramètres relatifs à l'activité de la population microbienne parfois difficiles à contrôler : la toxicité des polluants, l'environnement et la disponibilité des sources de nutriments (Norini, 2007).

Chapitre 2 : matériel et méthodes

1. Objectifs des expériences

L'objectif est de suivre l'évolution de la bioremédiation au cours du temps pour chaque condition expérimentale. Pour les métaux, il est intéressant de suivre à la fois la teneur en pollution dans le sol et dans le mycélium, ce dernier étant normalement le site d'accumulation du polluant tandis que pour les HAP, ceux-ci n'étant pas bioaccumulables dans le mycélium, seule la concentration dans le sol sera étudiée. De plus, pour l'étude de biodégradation, d'autres micro-organismes seront utilisés. En fonction des polluants, on étudie donc soit la capacité de bioaccumulation, soit de biodégradation des micro-organismes.

2. Micro-organismes utilisés

Après recherches bibliographiques (Madigan et Martinko, 2007, Stamets, 2005, Singh, 2006, Adenipekun and Lawal, 2012) une bactérie, un mélange commercial de micro-organismes et quatre moisissures (aussi appelés *fungi*) ont été sélectionnés pour les expériences. Ceux-ci sont présentés dans le Tableau 5.

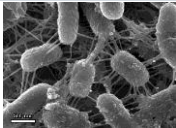





nom scientifique	nom courant	type de micro-organisme	code du micro-organisme	photos
<i>Pseudomonas putida</i>	/	bactérie	ATCC 47054	
/	EM	mélange de micro-organismes	/	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	pleurote	champignon	isolé d'un carpophore au laboratoire	
<i>Trametes versicolor</i>	tramète	champignon	MUCL 44889	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	/	champignon	MUCL 8325	
<i>Macrolepiota rhacodes</i>	lepiote	champignon	MUCL 31668	

Tableau 5 : micro-organismes utilisés dans le cadre de ce travail de fin d'études pour l'étude de la bioremédiation

2.1 La bactérie « *Pseudomonas putida* »

La bactérie *P.putida* est une cellule procaryote². Elle est de forme allongée, d'une dimension de 0,5 à 1 µm par 1,5 à 4 µm et possède un flagelle polaire (Madigan et Martinko, 2007).

Cette bactérie est capable d'utiliser de nombreux types de substrats organiques comme source de carbone (Madigan et Martinko, 2007). C'est pour cela que son métabolisme³ est capable de dégrader des HAP.

2.2 Les micro-organismes efficaces « EM »

La société Japonaise EMRO a développé un cocktail de quatre-vingts souches de micro-organismes spécifiques appelé « micro-organismes efficaces » (*Effective Microorganisms* - EM). Il s'agit d'un produit respectueux de l'environnement ayant déjà fait ses preuves dans plusieurs domaines grâce à la synergie des différents micro-organismes le constituant. Il contient des bactéries lactiques, des levures et des bactéries phototropes (EM Research Organization, 2022). L'EM est une technologie principalement utilisée dans le domaine de l'agriculture grâce à ses propriétés bénéfiques sur les composts et *bokashis*⁴, les cultures en pot, les semis, les boutures ainsi que le maraîchage. De plus, ce produit peut aussi être utilisé dans le domaine de la santé, du ménage, du traitement des déchets, du bien-être des animaux, de la conservation d'aliments ainsi que l'assainissement de l'eau (Bigot, 2019). Les EM ont également été utilisés avec succès sur des terres de Fukushima et, d'après la société EMRO, ils seraient capables de diminuer la radioactivité du césium s'y trouvant (EM Research Organization, 2022). Au vu de l'apparente efficacité de ce produit, il a donc été décidé d'étudier sa capacité à dégrader des HAP.

2.3 Les *fungi*

Contrairement aux bactéries, les champignons sont constitués de cellules eucaryotes⁵. En général, les cellules de type eucaryote sont plus grandes et plus complexes que celles de type procaryote (Madigan et Martinko, 2007).

Les champignons mis en œuvre lors de cette étude sont des souches isolables en Belgique. De ce fait, leur utilisation *in situ* ne causerait pas de tort aux écosystèmes locaux. Il s'agit de : *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Macrolepiota rhacodes*.

² **Procaryote** : cellule dépourvue de structures internes délimitées par une membrane comme le noyau. Elles représentent la majeure portion de la biomasse terrestre (Madigan et Martinko, 2007).

³ **Métabolisme** : ensemble des réactions bio chimiques se déroulant dans une cellule (Madigan et Martinko, 2007)

⁴ **Bokashis** : méthode de compostage d'appartement

⁵ **Eucaryote** : cellule dont le noyau est séparé du cytoplasme par une membrane (Madigan et Martinko, 2007).

3. Description des expériences

Les expériences effectuées se distinguent par les lots étudiés ainsi que par les micro-organismes utilisés. Les lots étudiés sont issus d'un centre de traitement de terres et sont au nombre de trois. Le premier est pollué aux métaux, le second aux métaux et aux HAP et le dernier aux HAP.

Les lots pollués par des métaux servent à investiguer les capacités de bioaccumulation des champignons tandis que pour ceux pollués aux HAP, c'est la biodégradation par les micro-organismes qui est étudiée.

Un test correspond à un type de micro-organismes sur un lot de terre. Toutes les expériences ont été réalisées dans des erlenmeyers. Afin de pouvoir suivre l'évolution de la bioremédiation au cours du temps, des réplicas ont été réalisés. Pour chaque test, quatre erlenmeyers ont été utilisés. Chacun correspond à une durée de l'expérience : t₁, t₂, t₃ et t₄ qui correspondent respectivement à des durées de 21, 42, 63 et 84 jours soient 3, 6, 12 et 18 semaines (Figure 6). Le t₀ correspond aux analyses initiales réalisées sur la terre de chacun de ces lots.



Figure 6 : ligne du temps des analyses effectuées pour chaque expérience

L'emploi de quatre erlenmeyers pour une condition expérimentale s'explique par le fait que, pour essayer d'avoir des résultats les plus représentatifs, la méthode du sacrifice est la plus adaptée : toutes les 3 semaines, un erlenmeyer par test sera analysé, l'expérience s'arrêtera donc là pour lui. Le fait de préparer les erlenmeyers de chaque condition en quadruple permet d'en sacrifier un à chaque temps d'analyse.

Un erlenmeyer supplémentaire appelé « blanc » a été réalisé pour chaque condition expérimentale. Celui-ci permet d'avoir un exemple d'évolution sans biostimulation ou d'atténuation naturelle. Il s'agit d'un test sans micro-organisme inoculé et sans ajout d'éléments nutritifs. Il a pour intérêt de pouvoir comparer l'efficacité des tests avec une référence, représentant l'évolution « naturelle » du sol.

Il a donc fallu préparer au total 96 erlenmeyers. Ce chiffre est obtenu en considérant quatre erlenmeyers par condition. Il y a cinq conditions à étudier pour les lots pollués aux métaux et sept pour ceux pollués aux HAP. Trois lots de terre polluée sont étudiés. Le lot 1 est pollué aux métaux exclusivement. Le lot 3 est pollué aux HAP exclusivement. Le lot 2 est pollué aux métaux et HAP simultanément. L'ensemble de ces conditions sont reprises dans le Tableau 6.

Lots	pollution	blanc	<i>Pseudomonas putida</i>	EM	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Macrolepiota rhacodes</i>	nombre d' erlenmeyers :
Lot 1	métaux	X			X	X	X	X	20
Lot 2	métaux	X			X	X	X	X	20
Lot 2	HAP	X	X	X	X	X	X	X	28
Lot 3	HAP	X	X	X	X	X	X	X	28
nombre d' erlenmeyers :		16	8	8	16	16	16	16	96

Tableau 6 : résumé des conditions expérimentales. Chaque croix correspond à un micro-organisme testé sur un lot de sol pollué. Chaque condition est répétée 4 fois.

4. Inoculation des micro-organismes

4.1 Développement des champignons sur boîte de pétri

Pour les champignons, des souches ont été cultivées initialement dans des boîtes de pétri contenant de l'agar, du malt et de l'extrait de levure jusqu'à obtenir une boîte couverte de mycélium comme on peut le voir à la Figure 7 avec *Pleurotus ostreatus*. Cette méthode est présentée à la Figure 8. L'objectif est d'obtenir des cultures axéniques c'est-à-dire contenant une seule espèce de micro-organisme.



Figure 7 : culture de souches de *Pleurotus ostreatus* sur boîte de pétri

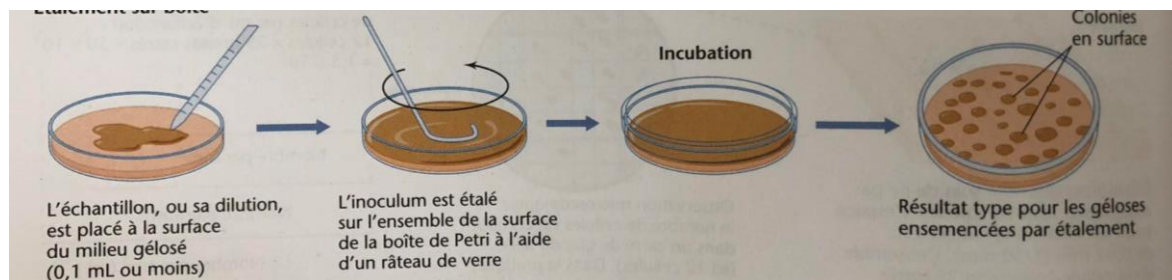


Figure 8 : schéma explicatif d'une culture bactérienne sur gélose (Madigan et Martinko, 2007)

4.2 Développement de la bactérie *Pseudomonas* et du mélange d'EM

La bactérie *P. putida*, stockée au laboratoire sur boîte de pétri en milieu LB-agar est quant à elle issue d'une préculture en milieu liquide contenant du milieu de culture « LB » (*lysogeny broth* : bouillon de lysogénie) qui est un milieu classique pour le développement de bactérie.

Pour ce qui est du mélange d'EM, celui-ci est livré et stocké dans un bidon hermétique.

4.3 Préparation des erlenmeyers

Chaque erlenmeyer a été rempli avec environ 30g de sol (avec une masse connue au dixième de gramme pour les analyses futures) et s'est vu attribuer un bouchon composé d'ouate enroulée dans des bandes de gaze.

Une fois tous les erlenmeyers remplis et bouchonnés, il est indispensable de les stériliser avant d'inoculer les micro-organismes. Pour ce faire, ils ont dû être autoclavés. Cela permet d'éviter la présence de contaminants qui risqueraient de donner des résultats non spécifiques aux micro-organismes étudiés par contamination et donc « gâcher » l'expérience, que ce soit en inhibant ou en catalysant les micro-organismes inoculés.

Cependant, Il faut garder à l'esprit que le contenu des erlenmeyers est forcément contaminé étant donné que la terre qu'ils contiennent n'est pas stérile. Ces contaminants vont inéluctablement influencer l'affinité entre les souches inoculées et les lots étudiés et ainsi directement impacter leur développement et donc leur capacité de bioremédiation.

4.4 Inoculation

Le processus d'inoculation consiste à introduire une souche de micro-organisme dans un erlenmeyer. Pour favoriser le développement des souches, un milieu de culture et également introduit, celui-ci varie en fonction de la souche : un milieu « Sabouraud » pour *Pleurotus ostreatus*, un milieu à base d'extrait de malt pour *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Macrolepiota rachodes* (aussi appelée *Chlorophyllum rachodes*) et un milieu « LB » pour la bactérie *Pseudomonas putida*.

Un milieu de culture consiste en une solution d'éléments nutritifs favorisant la croissance des micro-organismes. C'est cet ajout d'une source de nutriments qui fait que l'expérience n'est pas qu'une bio-augmentation mais une biostimulation. L'élément principal est le carbone car il est indispensable à la biosynthèse de nouveaux composants cellulaires. Cette légère stimulation permet de placer les souches dans des conditions de démarrage optimales. De plus, le fait que la terre soit en « slurry » (saturée en eau) est bénéfique aux champignons, généralement friands d'un certain taux d'humidité.

La quantité de micro-organismes fongiques inoculés n'est pas définie par sa masse (bien inférieure à un gramme de masse sèche) mais par la surface de gélose couverte de mycélium. Celle-ci est définie sur base du diamètre de l'emporte-pièce utilisé pour prélever un fin cylindre de la boîte de pétri. Dans le cadre de ces expériences, la surface de gélose des micro-organismes inoculés est de 2.23 cm² pour tous les erlenmeyers.

Pour éviter toute contamination ultérieure, l'ajout du milieu de culture ainsi que l'inoculation se déroulent sous une hotte à flux laminaire, avec des gants nettoyés à l'alcool entre chaque étape.

Après inoculation, 30mL de milieu de culture correspondant au micro-organisme inoculé ont été ajouté dans l'erlenmeyer (Figure 9).



Figure 9 : erlenmeyer après inoculation d'une souche de mycélium et l'ajout du milieu de culture

Pour ce qui est de la bactérie *Pseudomonas putida*, celle-ci ayant été développée en milieu liquide, 30mL ont été introduit par erlenmeyer. Idem pour le mélange d'EM qui est une solution à l'état liquide.

4.5 Incubation

Une fois tous les erlenmeyers préparés, ceux-ci ont été placés en incubateur, maintenus à une température de 20°C et exposés à la lumière du jour. Toutes les trois semaines, un erlenmeyer de chaque condition va être analysé. Cela représente un total de 14 analyses d'HAP et 38 analyses de métaux.

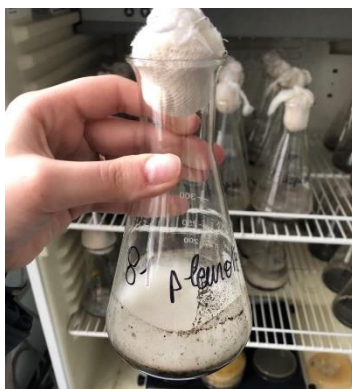


Figure 10 : évolution de *Pleurotus ostreatus* sur le lot 3 après 4 semaines d'incubation

5. Méthodes d'analyse des polluants

Les métaux et les HAP étant des polluants de natures différentes, les méthodes mises en œuvre pour les analyser et les quantifier sont elles aussi de natures différentes.

5.1 Analyse des métaux

Pour étudier les métaux présents dans le sol, il faut que ceux-ci soient mis en solution car leur analyse se fait en phase liquide à l'aide d'un spectromètre d'émission atomique à plasma à couplage inductif,

plus communément appelé « ICP-AES » (*Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectrometry*). Il faut donc préalablement réaliser une attaque acide-oxydante sur les échantillons de terre.

Les méthodes d'analyses réalisées préalablement dans les seaux diffèrent légèrement de celles réalisées sur les erlenmeyers lors de l'expérience. En effet, le sol présent dans les seaux n'est pas dans les mêmes conditions que celui présent dans les erlenmeyers. Dans ces derniers, il s'agit de « *slurry* » c'est-à-dire un taux d'humidité de 100% comparé à maximum de 30% pour les seaux.

Dans le cas des métaux, le mycélium est analysé indépendamment de la terre. Le mycélium est extrait et placé sur un verre de montre (cf. Figure 11).



Figure 11 : mycélium de *Pleurotus ostreatus* sur un verre de montre

Ensuite, les verres de montre supportant les mycéliums et les béciers contenant la terre ont été placés à l'étuve pendant 24h afin d'être complètement déshydratés. Les métaux étudiés étant inorganiques et non-volatils, ce chauffage n'impactera pas les analyses. Une fois sortis de l'étuve, des tripliquas ont été effectués pour analyser le sol : trois béciers ont été remplis avec 3-4g de sol et pesés précisément. La réalisation de plusieurs analyses au sein du même bécier permet une meilleure représentativité pour quantifier la pollution. Une fois ces béciers remplis, pesés et le mycélium lui aussi transféré dans un bécier et pesé, une attaque acide-oxydante (voir protocoles en annexes) a été réalisée sur chacun d'entre eux afin d'extraire les métaux de leur matrice minérale.

Une fois les métaux solubilisés, la solution filtrée, et celle-ci mise au trait avec de l'eau milliQ⁶ dans une fiole jaugée de 100mL, une quinzaine de millilitres en sont extraits et analysés grâce à un ICP-AES. Les modèles utilisés sont : ICP-AES Thermo Intrepid et ICP Perkin Elmer Optima 8300.

Toutes ces étapes sont résumées à la Figure 12.

⁶ **Eau milliQ** : eau ultrapure dont la résistivité est inférieure à 18,2 M Ω •cm (à 25 °C) et la valeur de C.O.T. inférieure à 5 ppb

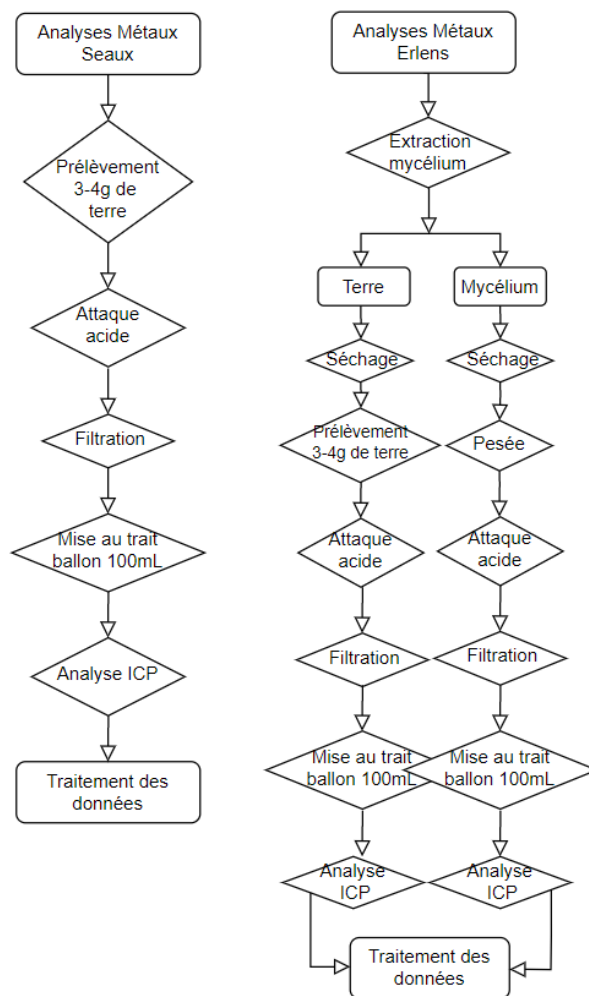


Figure 12 : schémas protocolaires d'analyses des métaux et métalloïdes présents dans les sols des seaux et des erlenmeyers, et les mycéliums

5.2 Quantification des métaux

L'ICP-AES est un instrument analytique qui nécessite d'être calibré avant chaque utilisation. Pour ce faire, des solutions de concentration précisément connues en chaque élément traces sont préparées. Plusieurs dilutions de cette solution permettent d'obtenir des standards de calibration. Ceux-ci, une fois analysés, permettent d'obtenir les valeurs nécessaires à la création d'une droite de calibration reliant le nombre de coups par seconde à une concentration en mg/L. De cette droite, on obtient une équation permettant de relier les résultats obtenus par la machine en valeurs en mg/L. Or, l'unité qui nous intéresse pour interpréter les résultats est le mg/kg. Pour passer de l'un à l'autre, il suffit de multiplier la valeur en mg/L par le volume de la solution mise au trait (dans le cas présent, il s'agit de la contenance de la fiole jaugée, c'est-à-dire 100mL) et de la diviser par la quantité de terre prélevée. Cette relation mathématique est décrite à l'Équation 1.

$$\frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{\text{L}}{\text{kg}} = \frac{\text{mg}}{\text{kg}} = \text{ppm}$$

Équation 1 : conversion de mg/l à mg/kg

5.3 Analyse des HAP

Les HAP sont analysés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse GC-MS. Etant donné que les HAP étudiés dans le cadre de ce travail sont quasiment insolubles, une extraction Soxhlet permet de les isoler du sol à l'aide d'un solvant adéquat : un mélange de dichlorométhane et d'éthanol. Une fois les HAP solubilisés et extraits dans ce solvant, ils sont ensuite concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide (aussi appelé rotavapor) et mis au trait avec du dichlorométhane dans une fiole jaugée de 50mL. Ensuite, quelques millilitres sont prélevés de ce ballon et sont analysés.

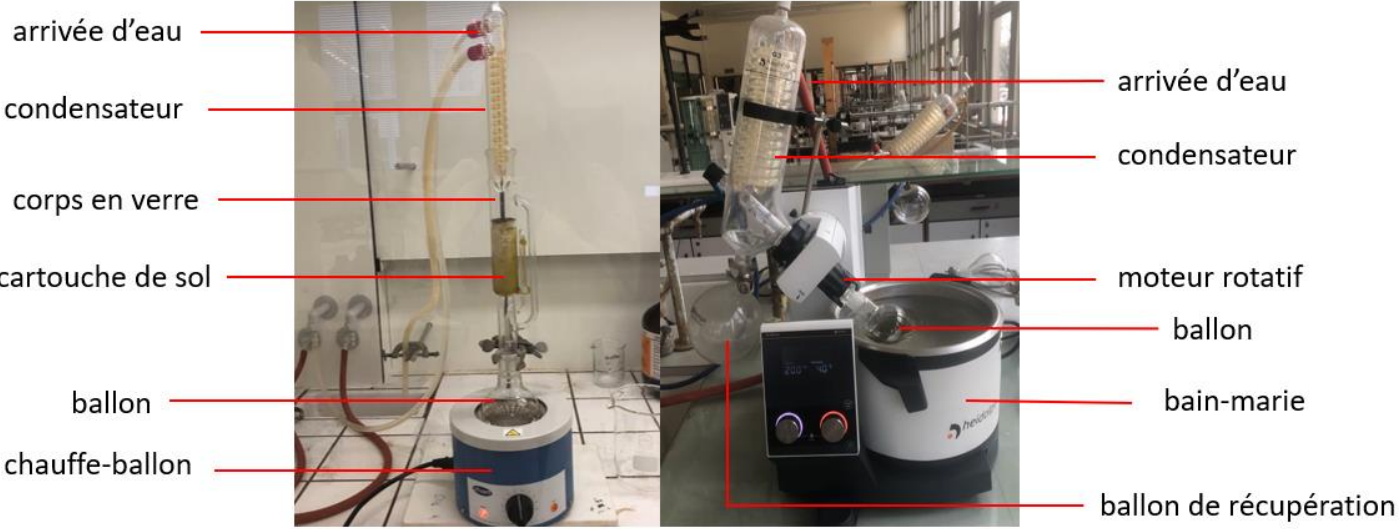


Figure 13 : extracteur soxhelt (à gauche) et rotavapor (à droite)

Un résumé de cette méthode d'analyse est présenté à la Figure 14 tandis que les protocoles complets sont disponibles en annexe.

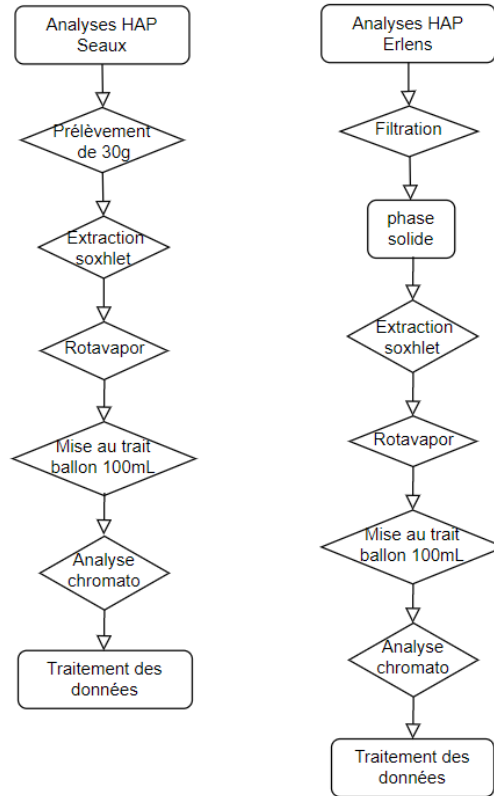


Figure 14 : schémas protocolaires d'analyses des HAP présents dans de la terre du seau et des erlenmeyers

5.4 Quantification des HAP

A l'instar de l'analyse des métaux, il faut utiliser des standards de calibration afin de calibrer et pouvoir interpréter quantitativement les résultats. Le chromatographe gazeux sépare en fonction de l'affinité des HAP pour la phase stationnaire les différents composés, le spectromètre de masse fournit un spectre à tout instant, qui permet d'identifier le composé analysé. L'aire sous chaque pic du chromatogramme est reliée à une concentration via l'équation de la droite de calibration. Là encore, les résultats de concentration sont obtenus en mg/L. Pour obtenir des mg/kg, il suffit de multiplier par le volume de la fiole jaugée (qui est de 50mL) et de diviser par la masse de terre dont l'erlenmeyer a été rempli. Cependant, il ne faut considérer que la masse sèche et donc ne pas omettre d'en exclure la portion correspondant au taux d'humidité du lot.

Chapitre 3 : choix et caractérisation des lots de sols étudiés

1. Choix et obtention des terres polluées

Pour réaliser des expériences de bioremédiation en laboratoire, deux options étaient envisageables : soit utiliser un sol « propre » et le polluer artificiellement, soit travailler sur des terres venant d'un site pollué. Ces options présentaient à la fois des avantages et des inconvénients. Le fait de polluer nous-mêmes du sol (au-delà du fait que cela soit discutable de créer un déchet pour le traiter ensuite) ne nous aurait pas permis d'avoir une pollution réaliste. Pour ce qui est de travailler sur des sols déjà pollués, il faut que ceux-ci contiennent les polluants que nous souhaitons étudier et ce, dans une gamme de concentrations adéquate.

Pour ne pas s'éloigner encore plus des conditions *in situ*, il a été choisi de travailler avec des sols provenant de sites pollués. Ceux-ci ont été récupérés dans le centre de traitement des terres dans lequel j'ai effectué mon stage, sur base des résultats d'analyses de lots présents sur site. Les lots ayant été sélectionnés sont présentés au Tableau . Le lot 1 est pollué aux métaux lourds et métalloïdes, le lot 2 contient des métaux lourds et des HAP et le lot 3, uniquement des HAP.

	Usage type I	Usage type II	Usage type III	Usage type IV	Usage type V	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Métaux/métalloïdes								
Arsenic	24	24	32	32	52	14	7,4	7,7
Cadmium	1,44	1,44	2,4	8	16	2,6	1	0,45
Chrome	45,6	45,6	62,4	112	230,4	31	85	38
Cuivre	42,4	42,4	124,8	392	480	200	100	33
Mercure	0,88	0,88	1,4	4	4	0,12	0,26	0,33
Nickel	69,6	69,6	116,8	280	280	22	29	20
Plomb	96	160	160	312	1472	390	95	81
Zinc	156,8	156,8	332	2400	2400	1300	390	120
Hydrocarbures aromatiques polycycliques non halogénés								
Naphtalène	2,00	2,00	2,00	2,00	5,04	0,24	0,15	0,14
Acénaphthylène	3,84	3,84	5,04	6,40	34,40	0,07	0,39	0,17
Acénaphthène	1,60	1,60	3,20	3,20	4,80	0,34	0,3	0,09
Fluorène	4,72	4,72	7,20	7,20	12,80	0,47	0,36	0,11
Phénanthrène	6,08	6,08	10,40	10,40	20,00	1,3	1,9	0,9
Anthracène	2,24	2,24	2,24	2,24	5,52	0,41	1,2	0,36
Fluoranthène	4,80	4,80	9,28	18,40	37,60	1,8	11	2,9
Pyrène	5,36	5,36	10,40	12,32	22,88	1,2	7,8	2,4
Benzo(a)anthracène	7,60	7,60	7,60	7,60	13,84	0,84	6,3	2,1
Chrysène	0,88	0,88	1,84	7,76	14,08	0,82	5,5	2
Benzo(b)fluoranthène	1,36	1,36	2,64	8,80	16,80	0,7	4,4	2,6
Benzo(k)fluoranthène	0,80	0,80	1,60	4,24	7,44	0,35	2,2	1,3
Benzo(a)pyrène	0,70	0,70	2,88	7,60	11,52	0,66	5	2,5
Dibenzo(a,h)anthracène	0,65	0,65	1,44	1,44	2,56	0,11	0,89	0,56
Benzo(g,h,i)pérylène	0,64	0,64	1,20	5,44	8,88	0,43	2,6	1,9
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	3,60	3,60	5,60	5,60	9,60	0,45	2,7	1,9

Tableau 7 : résultats d'analyse de la pollution aux métaux/métalloïdes et aux HAP fournis par l'entreprise des 3 lots étudiés ainsi que le type d'usage associé à chaque norme de pollution. Toutes les valeurs sont en ppm (mg/kg)

Sur base de ces résultats, la dégradation de certains polluants ne sera pas étudiée car ceux-ci ne sont pas suffisamment présents dans les échantillons pour que cela ait du sens.

1.1 Echantillonnage des sols

Le risque en choisissant de travailler avec des terres de pollution anthropique est la répartition potentiellement hétérogène des polluants au sein des lots. Il faut donc réaliser un échantillonnage méthodique afin d'obtenir des échantillons les plus représentatifs possibles. Ce risque n'aurait cependant pas été évitable avec une pollution créée au laboratoire mais il est probable que celui-ci aurait été moindre.

Une fois les lots choisis, il a fallu y prélever suffisamment de terres pour les étudier. Plusieurs seaux hermétiques de 20L ont donc été remplis pour chaque lot. Ce prélèvement a été effectué à l'aide de tarières à différents endroits de chaque lot en variant la hauteur et la profondeur de l'enfouissement de la tarière (Figure 15).



Figure 15 : prélèvement de sols pollués dans un centre de traitement des terres

1.2 Tamisage des sols

La matière brute présente dans les seaux n'étant pas tout à fait de la terre comme celle que l'on imagine dans son jardin, il a fallu la tamiser afin d'extraire les cailloux, déchets de constructions, morceaux de plastiques, et autres déchets indésirables (comme par exemple, quelques coquilles de moules dans le lot 2).

Il a été choisi de tamiser les trois lots à 4mm. Ce choix de coupure de tamisage est un compromis entre deux éléments essentiels : ne pas trop s'éloigner des conditions réelles des terrains tout en supprimant ce qui ne fait pas vraiment partie de la « terre » (Figure 16).

Etant donné que la pollution se trouve principalement dans les fractions granulométriques dites fines, le fait de tamiser ne nous en fait pas perdre mais au contraire, la concentre.

Les lots étudiés étant d'origines différentes, leurs caractéristiques varient de l'un à l'autre. Certes leur localisation d'origine et leur source de pollution n'est pas connue, mais il y a d'autres caractéristiques à déterminer.



Figure 16 : fraction de terre inférieure (à gauche) et supérieure (à droite) à 4mm

1.3 Analyses des sols

Une fois les lots tamisés, des analyses ont été réalisées afin de vérifier si la pollution annoncée par l'entreprise coïncidait avec ce qui avait été ramené dans les seaux. Pour les lots 1 et 2, c'est la pollution métallique qui a été analysée tandis que pour les lots 2 et 3, il s'agit de la pollution aux HAP.

Les résultats sont présentés au Tableau. Ceux-ci ont été obtenus en faisant une moyenne sur base de trois échantillons de sol tamisé pour chaque lot. Les résultats complets sont disponibles en annexes aux Tableau 8 et Tableau 9. On y constate que les écart-types pour les analyses de métaux sont plus importants sur le lot 1 que sur le lot 2. Pour les écart-types des analyses des HAP, ceux-ci sont plus importants pour le lot 3 que le lot 2.

Il semble donc que, la répartition de la pollution au sein du sol soit plus homogène pour le lot 2. Cela peut être expliqué par son origine. Celui-ci est issu de boues de dragage et a probablement subi un brassage important, induisant une certaine homogénéisation des polluants s'y trouvant.

Pour ce qui est des concentrations en métaux, elles sont globalement assez semblables bien que légèrement inférieures à celles fournies par l'entreprise mis à part pour le cuivre dont les teneurs sont beaucoup plus faibles par rapport à ce qui était attendu.

Pour ce qui est des concentrations en HAP, celles-ci sont relativement proches de celles fournies par l'entreprise bien que légèrement inférieures pour le lot 2 et légèrement supérieures pour le lot 3.

Le fait que les résultats d'analyses au laboratoire coïncident avec ceux fournis par l'entreprise semble indiquer que l'échantillonnage a été correctement réalisé.

	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Métaux/métalloïdes			
Cadmium	3,15	1,82	/
Chrome	23,21	89,46	/
Cuivre	0,27	8,14	/
Nickel	17,03	29,98	/
Plomb	317,74	58,06	/
Zinc	1151,40	343,11	/
HAP			
Naphtalène	/	ND	ND
Acénaphthylène	/	0,07	0,08
Acénaphène	/	0,14	0,09
Fluorène	/	0,21	0,10
Phénanthrène	/	0,96	1,11
Anthracène	/	0,35	0,37
Fluoranthène	/	2,43	3,20
Pyrène	/	1,68	2,42
Benzo(a)anthracène	/	2,08	3,67
Chrysène	/	1,54	2,57
Benzo(b)fluoranthène	/	3,64	6,64
Benzo(k)fluoranthène	/	1,36	2,17
Benzo(a)pyrène	/	1,96	4,22
Dibenzo(a,h)anthracène	/	0,45	0,68
Benzo(g,h,i)pérylène	/	1,58	2,81
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	/	1,90	3,26

Tableau 8 : résultats d'analyses réalisées au laboratoire de la pollution aux métaux/métalloïdes et aux HAP des 3 lots étudiés. Toutes les valeurs sont en ppm (mg/kg) (ND : non-détecté, c'est-à-dire sous la limite de détection de la machine analytique)

Les études de bioremédiation porteront donc sur les métaux suivants : cadmium, chrome, plomb, zinc et sur les HAP suivants : chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène et indéno(1,2,3-c,d)pyrène.

2. Etude de la granulométrie

La connaissance de la répartition des fractions granulométriques des lots est un élément de caractérisation important. Pour ce faire, des tests granulométriques ont été réalisés. Il est possible de réaliser ce genre de tests en voie humide ou en voie sèche. Etant donné que les expériences de bioremédiation se déroulent en *slurry*, il est plus pertinent de réaliser le test en voie humide. Les résultats sont présentés au Tableau 9 et à la Figure 17.

tamis [μm]	passants cumulés %		
	Lot 1	Lot 2	Lot 3
4000	100	100	100
3150	98,86	98,91	98,86
2500	95,49	96,93	95,94
2000	92,19	93,95	92,42
1600	88,95	91,65	89,57
1250	86,68	87,99	85,34
1000	83,30	85,24	82,25
800	80,94	82,60	79,83
630	79,05	80,00	77,35
500	77,18	77,17	74,84
400	75,42	74,76	72,42
315	73,20	71,43	68,14
250	71,54	68,31	64,83
200	69,01	61,41	58,16
160	67,44	58,44	50,12
125	64,96	54,09	41,70
100	63,55	51,27	38,19
80	63,09	50,09	36,98
63	59,57	44,63	34,20
50	56,02	41,33	32,04
40	49,90	38,28	29,23
32	46,39	36,89	27,93
25	35,24	33,39	22,46
20	28,55	30,99	19,41

Tableau 9 : résultats des passants cumulés en pourcentage pour chaque lot de sol

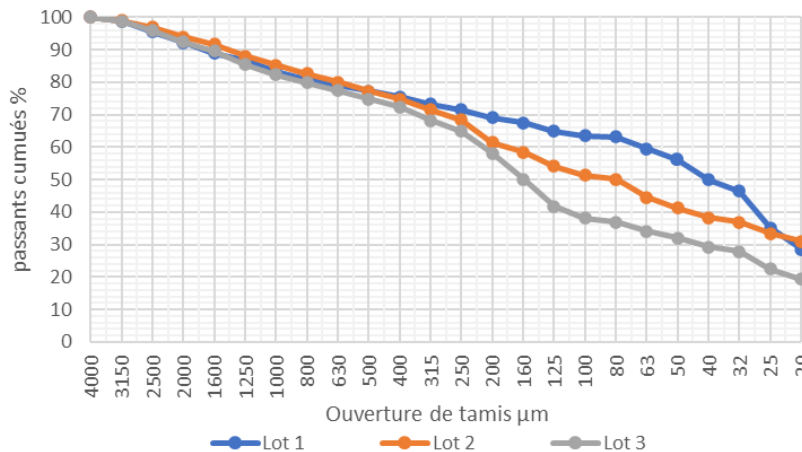


Figure 17 : courbes granulométriques des 3 lots de sol

Premièrement, on constate que le passant cumulé à 4000 μm (soit 4mm) est de 100%. Cela est logique étant donné que les lots ont précédemment subi un tamisage à 4mm.

Ensuite, entre les fractions 3,15mm et 0,5mm, les courbes granulométriques sont relativement semblables. C'est en deçà de cette fraction que leur comportement diffère légèrement. En définitive, on obtient les quantités fines, c'est-à-dire les particules inférieures à 20 μm . Celles-ci sont respectivement pour les lots 1, 2 et 3 de 28,5%, 30,9% et 19,4%. Les lots 1 et 2 présentent une teneur en particules fines relativement semblable et de valeur assez élevée. Il n'est donc pas étonnant que ceux-ci aient été soumis à une pollution métallique. Pour ce qui est du lot 3, il présente une quantité de fines moyenne à faible.

Il est intéressant de noter que la notion de particules fines varie d'un secteur et d'une application à l'autre. Ici, il est considéré que les fines représentent la fraction granulométrique inférieure à 20 μ m or, dans certaines entreprises, il est courant de considérer qu'il s'agit de la fraction inférieure à 63 μ m. C'est le cas par exemple pour le lavage physico-chimique. Il s'agit d'un traitement des terres polluées aux métaux lourds effectué en partant du principe que la pollution métallique se trouve dans les particules fines. Ce traitement consiste à extraire ces fines afin d'enlever la pollution de la terre. Cependant, il n'est valable que sur une certaine gamme de teneur en fines : s'il y en a trop peu, ce n'est pas nécessaire mais à l'inverse s'il y en a trop, cela devient techniquement irréalisable. La limite en industrie est fixée à 40% de teneurs en fines (Bridoux, 2022). Selon cette condition, cela signifierait que les lots 1 et 2 présentant 59,6 et 44,6% de teneurs en fines n'auraient pas été éligibles au traitement par lavage physico-chimique. En revanche, ils sont tout à fait aptes à subir un traitement biologique, ce qui va être démontré.

3. Etude au microscope

L'étude de la granulométrie a permis la séparation des différentes fractions granulométriques pour chaque lot. Il est donc possible de les analyser séparément au microscope.

Tout d'abord, en regardant chaque fraction de chaque lot, on constate que les lithologies sont différentes. La proportion de grains de quartz ou d'autres minéraux varie d'un lot à l'autre. Cette observation n'est cependant que qualitative et, afin de quantifier ces disparités lithologiques, une analyse aux rayons X est nécessaire.

Au-delà de la lithologie, l'analyse de ces fractions granulométriques a montré d'autres choses intéressantes : des morceaux de fibres de bois étaient présents dans la plupart des lots. Dans le lot 2, plusieurs coquillages ont été aperçus, ce qui n'est pas étonnant étant donné que celui-ci provient de boues de dragage. D'autres éléments ont également été aperçus : des morceaux de plastiques, des billes de verres (Figure 18) et des scories. Il s'agit là d'éléments d'origine anthropique illustrant bien les effets des activités humaines sur notre environnement.

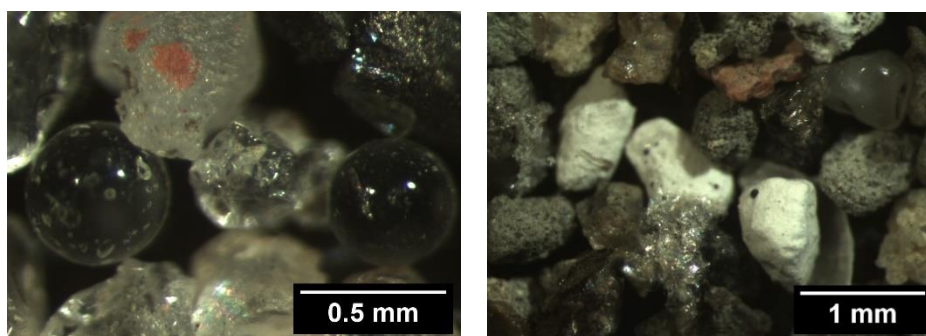


Figure 18 : Billes de verre (à gauche) et fragment de matière plastiques (à droite) dans la fraction 500 μ du lot 2

Il n'est malheureusement pas étonnant de retrouver du plastique dans ces terres. Il y en avait quelques morceaux visibles à l'œil nu lors du tamisage à 4mm mais aussi des fragments microscopiques dans la fraction 500 μ m du lot 2 comme on peut l'observer à la Figure 18. A première vue, nous avons pensé à une éventuelle présence métallique - ce qui aurait été logique pour des lots pollués aux métaux - mais après une observation plus poussée et une manipulation, nous avons pu observer que cette particule

se déformait au contact d'une pointe en métal. Pas de doute, il s'agit de microplastique. Plusieurs particules ont été aperçues.

Enfin, de nombreuses scories ont été trouvées dans les trois lots. Les scories sont des résidus de procédés métallurgiques. Elles sont facilement reconnaissables grâce à leur aspect noir brillant, leur forme hétérogène et alvéolaire (Figure 19).

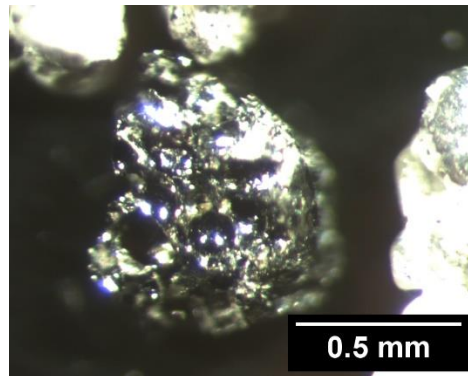


Figure 19 : Scories dans le lot 1 dans la fraction 500 μm

4. Analyses aux rayons X

La diffraction aux rayons X (DRX) permet de qualifier la lithologie des lots via l'obtention d'un spectre représentant les pics caractéristiques de chaque minéral. Cette détection se fait à l'aide d'un laser dont la longueur d'onde est connue. L'échantillon à analyser subit préalablement une préparation et est ensuite placé sur un socle, cerné d'un laser et d'un détecteur pouvant pivoter autour du même axe afin de faire varier leurs angles par rapport au plan de l'échantillon (Figure 20). Un rayon X est alors envoyé sur le cristal et l'interférence résultante de l'interaction avec le cristal (appelée diffraction) est captée par un détecteur. L'angle entre le laser et la poudre de l'échantillon étant connu, il est possible de calculer la distance d entre les atomes via la loi de Bragg (Equation 2).

$$2 d \sin \theta = n \lambda$$

Équation 2 : loi de Bragg

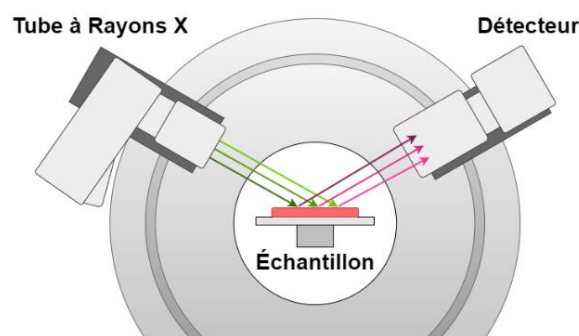


Figure 20 : schéma d'une analyse par diffraction aux rayons X

Le spectrogramme obtenu renseigne sur la présence de minéraux (via la position des pics) et leur concentration (via l'intensité des pics).

4.1 Analyses totales

Dans un premier temps, des échantillons bruts (c'est-à-dire issus des seaux) ont été préparés et analysés. La préparation consiste à sécher quelques grammes de sols, à les broyer jusqu'à obtenir une poudre et les placer sur un porte-échantillon circulaire afin d'être analysés par la machine. L'échantillon en poudre est qualifié de « désorienté » car les grains composant les minéraux sont organisés de manière non-orientée.

Les résultats sont présentés au Tableau 10 et à la Figure 21.

minéraux	formules	Valeurs semi-quantitatives [%]		
		Lot 1	Lot 2	Lot 3
albite	$\text{Na}(\text{AlSi}_3\text{O}_8)$	5,7	3,5	/
anorthite	$\text{Ca}(\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_8)$	7,4	3,6	/
biotite	$\text{KMg}_3\text{AlSi}_3\text{O}_{10}\text{OHF}$	/	5,3	2,5
calcite	CaCO_3	14,8	24,6	7,4
chlorite	$\text{Mg}_2.5\text{Fe}.65\text{Al}.5\text{Si}_2.2\text{Al}.8\text{O}_{10}(\text{OH})_8$	1,1	2,1	5,6
feldspath	$\text{K}.5\text{Na}.5\text{AlSi}_3\text{O}_8$	9,4	4,2	16
hématite	Fe_2O_3	/	/	0,9
illite	$\text{KAl}_2\text{Si}_3\text{AlO}_{10}(\text{OH})_2$	6,5	4,7	9,2
kaolinite	$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$	1,7	4,5	2,2
nacrite	$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$	/	3,8	5,3
pyrite	FeS_2	4,3	1,3	2,3
quartz	SiO_2	46,4	40,2	46,5
tourmaline	$\text{Na}_3\text{Fe}_9\text{Al}_{18}\text{B}_9\text{Si}_{18}\text{O}_{81}(\text{OH})_{12}$	2,7	2,2	1,9
zircon	$\text{FeS}_2 \text{ Zr}(\text{SiO}_4)$	/	/	0,3

Tableau 10 : valeurs semi-quantitatives des minéraux présents dans les 3 types de sols

La composition des sols est très hétérogène : en effet il s'agit d'un mélange de fragments de roche variant selon l'origine géographique. La composition minérale principale des lots est identique : ils possèdent tous au moins 40% de quartz. Ensuite, le lot 1 est majoritairement composé de calcite et de feldspaths, le lot 2 d'une majorité de calcite tandis que le lot 3 se compose principalement de feldspaths et d'illite.

Il s'agit de valeurs semi-quantitatives, c'est-à-dire dont l'erreur sur la mesure est inconnue.

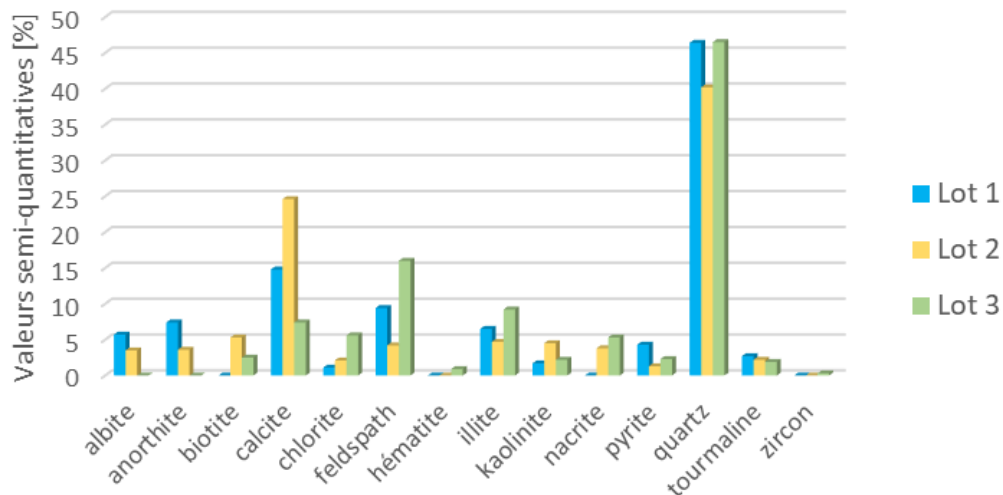


Figure 21 : graphiques des quantités semi-quantitatives des minéraux présents dans les 3 lots

4.2 Analyses des fractions fines

Dans un sol, c'est dans la fraction argileuse que la pollution est concentrée. Celle-ci est principalement composée de smectite, de kaolinite et d'illite. L'objectif est de déterminer les proportions de ces trois types d'argiles qui se distinguent par l'espace entre les feuillets.

Il est donc intéressant d'étudier les argiles des lots. Pour ce faire, deux méthodes existent et ont été réalisées. La première méthode est d'analyser la fraction fine obtenue grâce à l'étude granulométrique. Chaque fraction ayant été récupérée, il suffit juste de les sécher et de préparer les échantillons comme pour les analyses totales : les sols sont séchés et disposés sur des socles circulaires.

La deuxième méthode est un peu plus longue et complexe à mettre en œuvre. Elle consiste à extraire la fraction argileuse du sol brut. Pour ce faire, plusieurs dizaines de grammes de sol sont placés dans un bécher avec de l'eau. De l'acide y est ajouté (quelques dizaines de ml) pour décarbonater l'échantillon. Ensuite, on laisse décanter pendant 24h afin de séparer les phases ce qui va se faire suivant la loi de Stoke de la sédimentation. La fraction supérieure est alors récupérée et, après centrifugation, le culot est placé en suspension dans une solution aqueuse. Après une brève décantation, la partie supérieure de cette solution est prélevée et déposée sur une lame de verre. Une fois sec, cette lame de verre ne contient plus que le dépôt argileux qui est prêt à être analysé. Il s'agit là de la préparation dite « normale ». Pour l'étude de la fraction argileuse, deux autres préparations sont réalisées : un échantillon chauffé qui va détruire la kaolinite et déshydrater la smectite et un échantillon glycolé qui va faire gonfler la smectite qui est une argile gonflante.

Ces trois différents échantillons sont qualifiés d'« orientés » car les grains des minéraux se sont déposés selon une direction préférentielle. Le fait d'avoir un échantillon normal, un chauffé et un glycolé permet de réaliser des spectrogrammes et ainsi d'estimer les proportions en smectite, illite et kaolinite.



Figure 22 : échantillon sous forme de poudre sur un porte échantillon (en haut) et sous forme de dépôt argileux sur lame de verre (en bas)

Les résultats sont, encore une fois, semi-quantitatifs. Ils ont été obtenus en combinant les informations obtenues via les deux spectrogrammes et sont présentés au Tableau

	kaolinite	illite	smectite	illite-smectite	chlorite
Lot 1	30	25	25	20	0
Lot 2	20	50	15	10	5
Lot 3	10	35	25	25	5

Tableau 11 : valeurs semi-quantitatives exprimées en pourcentages des différents types d'argiles présentes dans les 3 lots étudiés

La répartition des différents types d'argiles est plutôt équitable pour le lot 1. Il contient environ un tiers de kaolinite, un tiers d'illite, un tiers de smectite mais dont une partie d'argiles interstratifiées illite-smectite.

Le lot 2 est composé principalement d'illite, d'un peu de kaolinite, d'un peu de minéraux accessoires et d'interstratifiés.

Pour ce qui est du lot 3, sa fraction argileuse est assez similaire au lot 2 si ce n'est qu'il contient plus de pics accessoires, beaucoup d'interstratifiées.

La connaissance de la quantité de smectite est intéressante car il s'agit d'une argile gonflante, son volume varie avec la teneur en eau du sol. Elle est donc capable de stocker plus de polluants dans ses espaces interfoliaires. Il n'est pas étonnant de constater que les trois lots pollués sont chacun composé d'au moins 20% de smectite.

5. Taux d'humidité

Le taux d'humidité représente la proportion massique d'eau présente dans les différents lots. Ceux-ci ont été obtenus en prélevant quatre échantillons de masse connue pour chaque lot, les plaçant 24h à l'étuve et en les pesant à nouveau. La perte de masse correspond à la teneur en eau. Les résultats obtenus sont présentés au Tableau 12.

Lots	t _w [%]
Lot 1	17,9
Lot 2	23,7
Lot 3	11,9

Tableau 12 : teneur en eau des trois lots étudiés

On constate que la teneur en eau n'est pas homogène au sein des trois lots. Le lot le plus humide est le lot 2 avec un taux d'humidité de 23,7%, tandis que le moins humide est le lot 3 avec presque 12%. Pour ce qui est du lot 1, celui-ci présente une teneur en eau de 17,9%.

6. TOC

Le taux de carbone organique (*total organic carbon* TOC) représente la concentration de carbone organique présent dans le sol. L'activité des micro-organismes dépend fortement de ce facteur. Les résultats sont présentés au Tableau 13.

Lots	TOC [%]
Lot 1	2,1
Lot 2	0,7
Lot 3	2,6

Tableau 13 : teneur en carbone organique (TOC) des 3 lots étudiés

Les lots des lots 1 et 3 possèdent des taux de carbone organique similaires de respectivement 2,1 et 2,6%.

Le taux du lot 2 est extrêmement bas : moins d'un pourcent. Cela indique que sans apport de nutriments et/ou de matière organique extérieure, c'est un milieu peu propice au développement de micro-organismes hétérotrophes.

Chapitre 4 : résultats et discussion des essais de bioremédiation

1. Développement des micro-organismes

Avant de parler de l'efficacité ou non des expériences de bioremédiation, un point essentiel à mentionner est le développement des souches de micro-organismes. En effet, l'état des micro-organismes est directement lié à leur capacité de bioaccumulation et/ou de biodégradation.

Il a été constaté visuellement que les différents *fungi* n'avaient pas les mêmes affinités pour chaque lot bien qu'il soit compliqué d'expliquer pourquoi une souche se développe mieux sur un lot plutôt qu'un autre. Concernant le mélange d'EM, le développement n'est pas directement visible comme c'est le cas pour les mycéliums, et il n'a donc pas été possible de commenter leur développement au cours de l'expérience.

Pour les quatre erlenmeyers correspondant aux mêmes conditions expérimentales (c'est-à-dire le même micro-organisme sur le même lot), le développement des souches de mycélium est identique. En revanche, pour un même micro-organisme, le développement varie d'un lot à l'autre. Ce phénomène est visible à la Figure 23, où l'on voit le champignon *Macrolepiota rhacodes* au même moment, sur chacun des trois lots. Ce champignon s'est mieux développé sur le lot 1 suivi du lot 3 et enfin, le lot 2.



Figure 23 : analyse visuelle du développement de *Macrolepiota rhacodes* en t_1 sur les lots 1, 2 et 3 (de gauche à droite)

En t_2 , les mycéliums présentaient tous un aspect similaire au t_1 , témoignant d'un développement stationnaire. A partir de t_2 , plusieurs champignons ont commencé à dépérir et certains semblent morts.

Au cours des expériences de bioaccumulation, les mycéliums ont été extraits et pesés pour analyser la présence de métaux présents dans ceux-ci. Si l'on s'intéresse à l'évolution des masses de mycéliums au cours du temps qui sont présentées à la Figure 24, on peut y appréhender leur développement et, pour certain, leur déclin.

Sur le lot 1, la masse de tous les champignons a augmenté jusqu'au temps t_2 correspondant à 42 jours d'incubation. Après cette période, seuls *Macrolepiota rhacodes* et *Pleurotus ostreatus* ont continué à

croître tandis que *Trametes versicolor* et *Phanerochaete chrysosporium* ont commencé à décroître et sont morts avant t_4 .

Les développements des champignons sur le lot 2 sont assez différents. Ils ont tous connu une belle croissance jusqu'en t_1 et puis, excepté *Pleurotus ostreatus*, ils ont tous vu leur état décliner en t_2 et puis, mourir avant t_3 . *Pleurotus ostreatus* a quant-à-elle continué à croître jusqu'en t_2 et puis elle a commencé à décroître.

En en se basant sur les teneurs respectives en carbone organique (voir section 6 du Chapitre 3), il est logique que les champignons aient plus de difficultés à se développer sur le lot 2 que sur le 1.

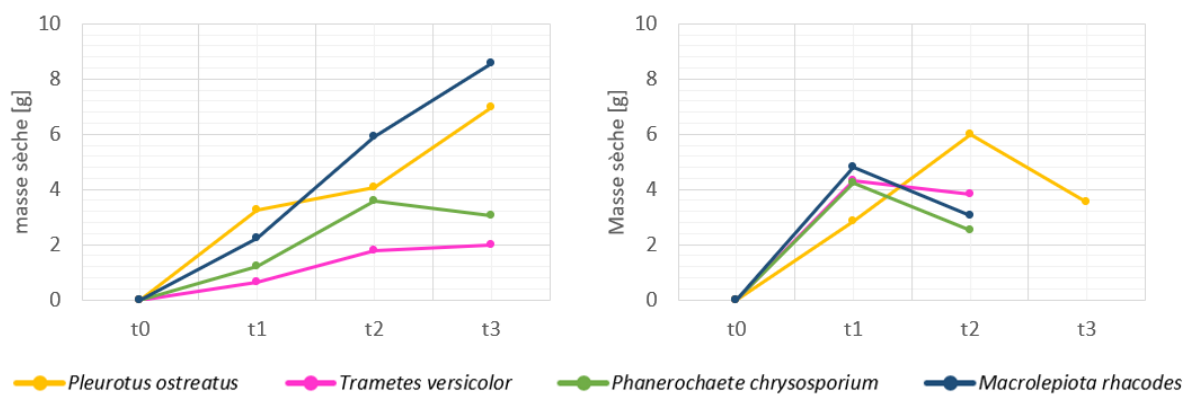


Figure 24 : évolution des masses des mycéliums au cours du temps sur le lot 1 (à gauche) et sur le lot 2 (à droite)

Pour tous ces champignons morts, il n'était plus possible de continuer l'étude de bioaccumulation. En effet, les mycéliums s'étant décomposés, il n'était plus réalisable de les extraire pour les analyser.

Des signes avant-coureurs de la dégradation de l'état des champignons ont été observé en t_2 : ils ont commencé à sporuler. Le fait qu'un champignon produise des spores colorées comme on peut le voir à la Figure 25, est un symptôme de manque de nutriments et d'un passage à l'état végétatif.



Figure 25 : spores sur mycélium de *Pleurotus ostreatus* (à gauche) et *Macrolepiota rhacodes* (à droite) après 45 jours d'incubation

La Figure 26 illustre le fait que la sporulation signe la dégradation du mycélium.

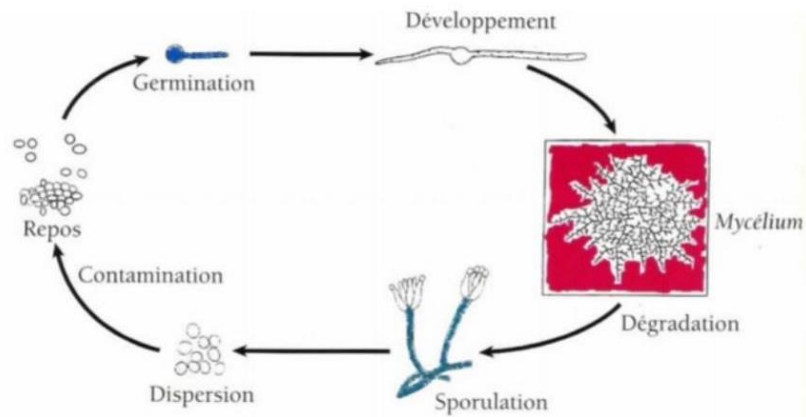


Figure 26 : schéma du cycle de vie des moisissures (Roquebert, 2022)

Les circonstances de la mort de certains champignons ne sont pas déterminées. Deux hypothèses non exclusives sont plausibles. La première est que, les mycéliums ont accumulé une quantité de métaux trop importante qui s'est avérée fatale. La deuxième, est un épuisement des nutriments disponibles dans le milieu de culture, ils n'avaient plus de ressources nutritives au bon fonctionnement de leur métabolisme. Dans ce cas, il aurait probablement fallu alimenter régulièrement les champignons en nutriments (complément de source de carbone ou d'azote).

Concernant la bactérie *Pseudomonas putida*, celle-ci s'est mieux développée sur le lot 2 que sur le lot 3 et a, elle aussi, commencé à dépérir peu après t_2 comme on peut le constater à la Figure 27.

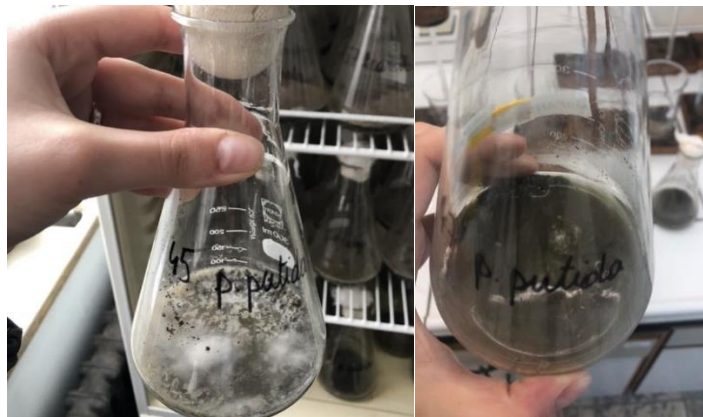


Figure 27 : photos de la bactérie *Pseudomonas putida* en t_1 (à gauche) et en t_3 (à droite) sur le lot 2

La mort de plusieurs champignons est une des raisons principales pour laquelle les analyses t_4 n'ont pas été réalisées. Il n'était plus possible d'extraire le mycélium pour étudier la bioaccumulation et il n'était plus intéressant d'étudier la biodégradation s'il n'y avait plus de micro-organismes.

2. Résultats de l'étude de bioaccumulation de métaux

Pour l'étude de la capacité de bioaccumulation des champignons, il est intéressant de suivre l'évolution simultanée de la concentration en métaux dans le sol et dans les mycéliums.

Il est à rappeler que toutes les conditions expérimentales sur un même lot, pour le même polluant étudié, possèdent le même temps initial t_0 . Il s'agit de la concentration initialement mesurée dans le seau.

Or, en t_1 , on observe une disparité non négligeable des valeurs de concentrations en métaux. Cette variation est plus importante que l'écart-type de la valeur de t_0 .

Cette disparité des valeurs en t_1 , s'explique par la grande hétérogénéité de la pollution métallique au sein du seau.

Il est constaté que lorsque les mycéliums se portent bien, ils accumulent des métaux. Quand leur été commencent à se dégrader, ils relâchent petit à petit ce qu'ils avaient accumulé.

2.1 Bioaccumulation sur le lot 1

Les résultats de l'étude des capacités de bioaccumulation des 4 champignons sur le lot 1 sont synthétisés au Tableau 14. Les évolutions de la concentration en métaux au cours du temps, dans le sol et dans le mycélium y sont présentées.

L'interprétation de ces résultats est compliquée car la répartition de la pollution au sein du sol est très hétérogène. Il est donc complexe de réaliser des expériences dont les résultats soient représentatifs.

Concernant le cadmium tout d'abord, on observe une diminution claire dans le sol.

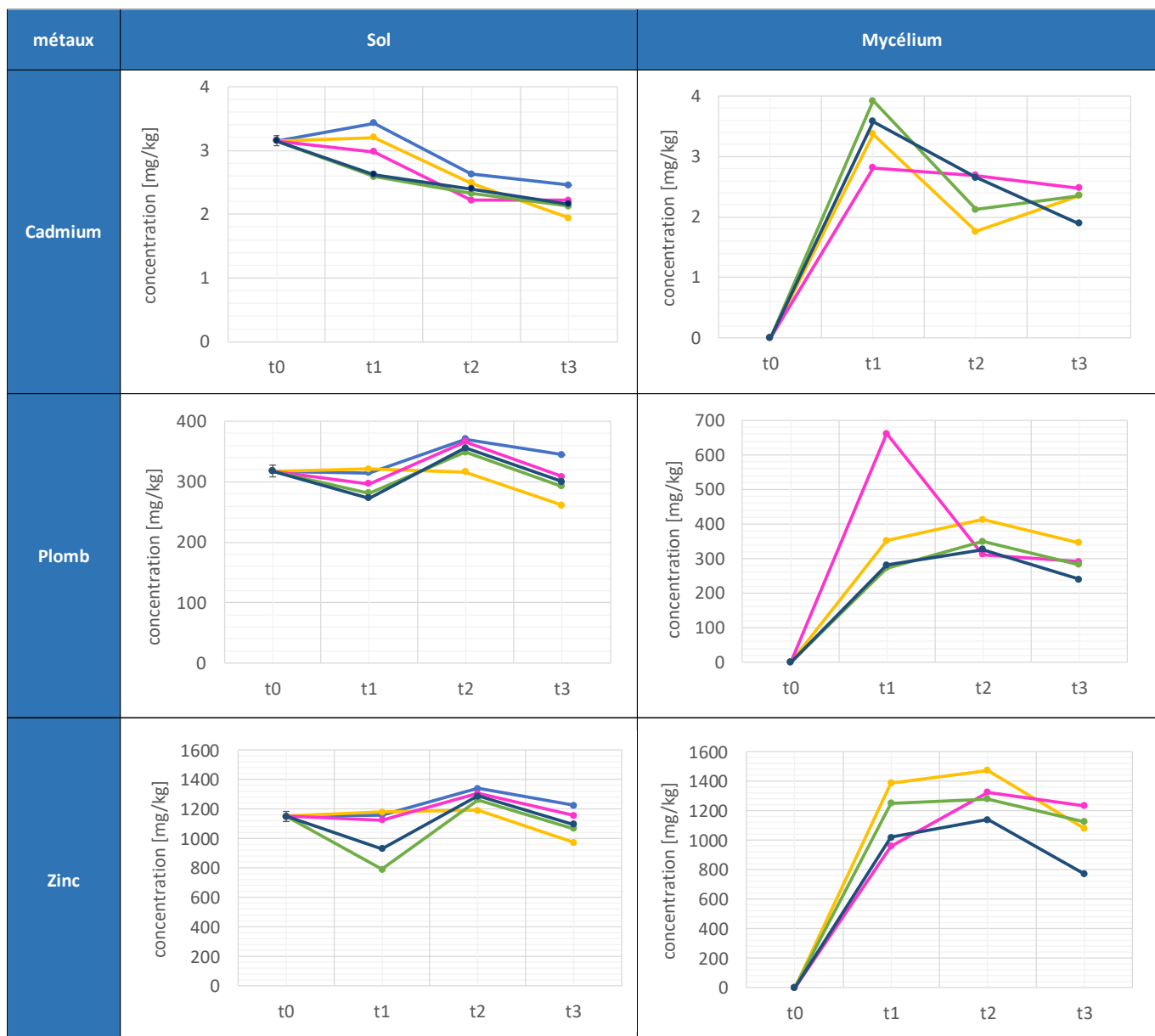
Pour chaque champignon, la concentration en cadmium en t_3 est inférieure à celle en t_0 et t_1 . C'est aussi le cas pour l'échantillon témoin (le blanc), mais la diminution est plus légère. La concentration en cadmium dans le blanc aurait dû, *a priori*, être relativement constante.

Les concentrations en cadmium accumulées dans le mycélium suivent la même tendance pour les quatre champignons. La concentration nulle en t_0 correspondant au moment de l'inoculation, augmente significativement en t_1 et stagne ou diminue ensuite.

Le fait que le mycélium ait accumulé une certaine quantité de cadmium pour ensuite la relâcher progressivement est bien corrélé avec l'évolution de la masse des mycéliums au cours du temps (Figure 24). Lorsque le mycélium est en pleine croissance, il est plus apte à bioaccumuler des métaux. Quand il commence à dépérir, il perd cette capacité, la mort cellulaire se traduit par une lyse qui relâche les métaux qu'il avait accumulés. C'est exactement ce qui est observé sur les graphiques de l'évolution de la teneur en métaux dans le mycélium.

En fait, pour chaque mycélium, sur chaque métal, cette tendance est exactement la même.

Pour le plomb et le zinc dans le sol, les éventuelles tendances à la diminution sont moins évidentes. Les pollutions métalliques sont peut-être réparties de manière beaucoup plus hétérogène dans l'échantillon prélevé sur site. Dans le mycélium, les mêmes tendances que pour le cadmium sont observées.



Légende :

● blanc
 ● *Pleurotus ostreatus*
● *Trametes versicolor*
● *Phanerochaete chrysosporium*
● *Macrolepiota rhacodes*

Tableau 14 : résultats des essais de bioremédiation par bioaccumulation de métaux sur le lot 1

2.2 Bioaccumulation sur le lot 2

Plusieurs analogies peuvent être observées visuellement entre les graphiques de l'évolution de la concentration en métal dans le lot 1 (Tableau 14) et le lot 2 (Tableau 15).

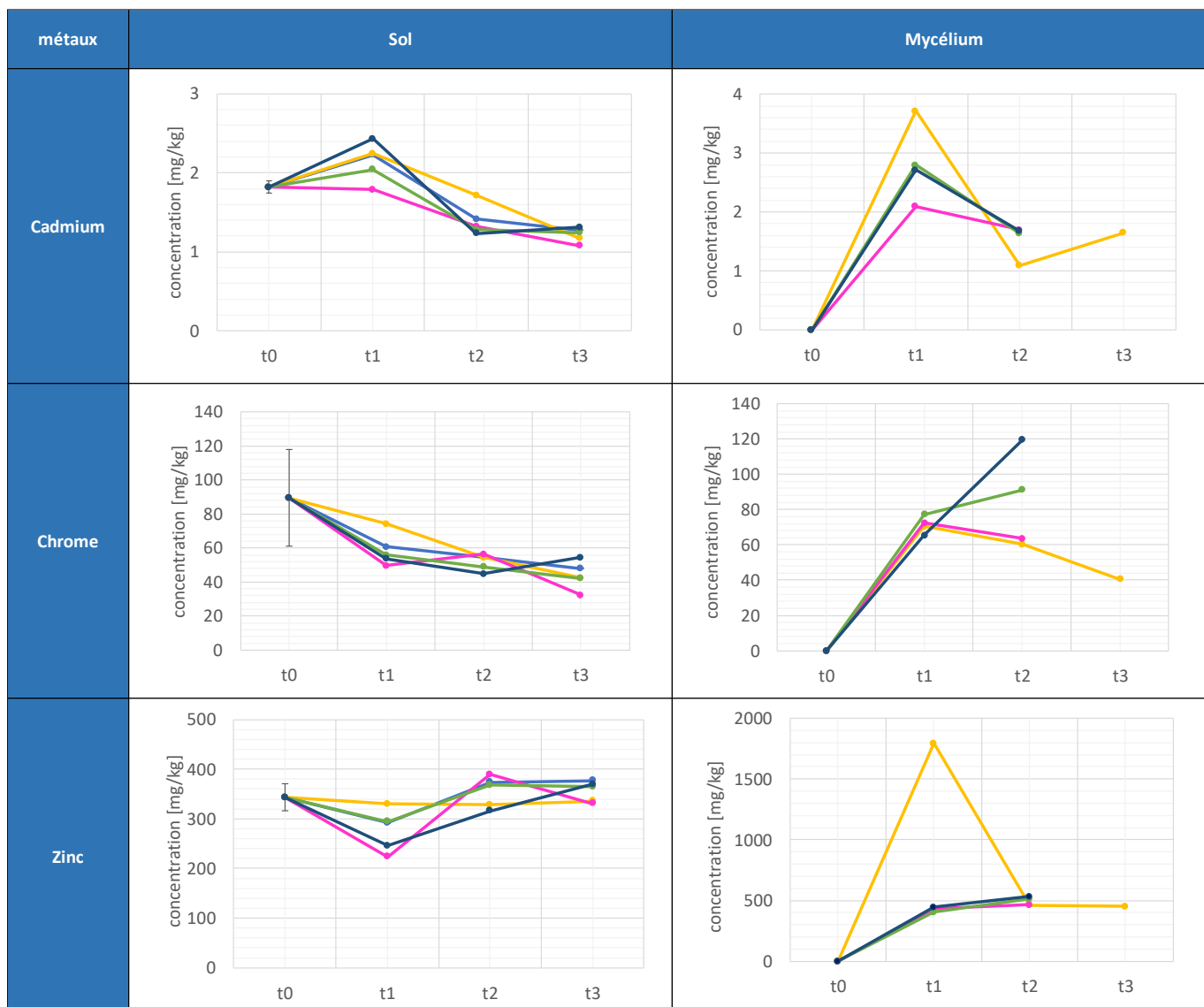
Pour l'évolution de la concentration en cadmium dans le sol, là encore, une tendance à la baisse est visible pour les champignons mais aussi pour le blanc. Pour l'évolution de la concentration dans le

mycélium, celle-ci a augmenté fortement en t_1 et puis, ils ont tous relâché du cadmium. En t_3 , seule pleurote avait survécu.

Le graphique de l'évolution de la concentration en chrome dans le sol présente une tendance à la diminution pour les champignons mais, encore une fois, aussi pour le blanc. En parallèle, la concentration dans le mycélium augmente fortement en t_1 , ensuite en t_2 , on observe une augmentation ou une stagnation de cette concentration. Seule *Pleurotus ostreatus* présente un résultat en t_3 car c'est la seule à avoir survécu jusque-là. Cependant, elle est en train de mourir et a déjà relâché une partie du chrome qu'elle avait accumulé.

Globalement, les graphiques de l'évolution de la pollution métallique dans le lot 2 présentent des tendances à la diminution de la concentration en métal plus visible que ceux du lot 1. Cette tendance plus claire semble due au fait que la pollution métallique au sein du lot 2 est plus homogène que celle au sein du lot 1.

Pour ce qui est de l'évolution de la concentration en zinc dans le sol, il est compliqué de la commenter, les concentrations obtenues au cours du temps ne varient que très légèrement. La concentration dans le mycélium a, elle encore bien augmenté en t_1 puis stagné en t_2 , ensuite ils sont décédés. De manière surprenante, la concentration en zinc en t_2 pour *Pleurotus ostreatus* est anormalement élevée, aucune explication ne peut être fournie à ce stade.



Légende :

● blanc
 ● *Pleurotus ostreatus*
● *Trametes versicolor*
● *Phanerochaete chrysosporium*
● *Macrolepiota rhacodes*

Tableau 15 : résultats des essais de bioremédiation par bioaccumulation de métaux sur le lot 2

2.3 Bilans de masse

Afin de mieux appréhender les quantités de métaux absorbées par le mycélium, des bilans de masse ont été réalisés. L'idée est de regarder si ces quantités sont significatives par rapport à la pollution totale de l'échantillon.

Il est étonnant d'observer que, lorsque le mycélium commence à dépérir et donc à relâcher le métal qu'il a bioaccumulé, la concentration en ce même métal dans le sol n'augmente pas spécialement. En vérité, la concentration dans le mycélium paraît importante en ppm, c'est-à-dire en mg/kg, mais en mg, cela ne représente pas une quantité énorme.

Pour estimer le potentiel de dépollution des champignons, ce n'est donc pas la concentration en métaux présente en eux qu'il faut prendre en compte mais bien le rapport entre la quantité accumulée dans le mycélium par rapport à la quantité présente dans l'erlenmeyer.

En réalité, « dépolluer » ne veut pas dire retirer la totalité des métaux du sol mais la diminuer à des seuils non-toxiques compatibles à une valorisation du sol. La dépollution la plus forte à réaliser est donc d'obtenir une concentration inférieure à celles des normes du type d'usage I, le type naturel.

Prenons l'exemple de la pollution au zinc dans le lot 1. La teneur moyenne en t_0 était de 1151,40 mg/kg. Posons l'hypothèse que cette valeur est valable pour chaque erlenmeyer. Ceux-ci pesant 30g, ils contiennent donc une quantité de 34,5 mg.

L'objectif de dépollution étant d'atteindre une teneur en zinc inférieure à 156,8g. Visons 150g, pour un erlenmeyer de 30g, cela correspond à 4,5mg.

Nous avons un erlenmeyer contenant 34,5mg de zinc et l'objectif à atteindre pour correspondre à un usage de type 1 est de 4,5mg, il faut donc retirer 30mg de zinc pour pouvoir considérer le sol comme dépollué.

En t_1 , *Pleurotus ostreatus* contenait 1389,48mg/kg de zinc, sa masse étant de 3,26g, elle contenait donc une quantité de 4,53mg soit 15% de la quantité à extraire.

Ce raisonnement mathématique est présenté à l'Equation 3 et a permis de réaliser les graphiques présentés dans les Tableau 16 et Tableau 17.

$$\begin{aligned} \text{taux de dépollution} &= \frac{\text{masse bioaccumulée dans le mycélium [mg]}}{\text{masse à extraire du sol [mg]}} \\ &= \frac{\text{concentration dans mycélium [mg/kg]} \times \text{masse mycélium [g]}}{(\text{concentration en } t_0 \text{ [mg/kg]} - \text{concentration type d'usage I [mg/kg]}) \times \text{masse sol [g]}} \end{aligned}$$

Équation 3 : calcul du taux de dépollution du sol

Sur base de ces graphiques, il est possible d'estimer le nombre de « récoltes » qui auraient été nécessaires pour dépolluer un erlenmeyer, autrement dit, atteindre un taux de dépollution égal à 1. Evidemment, il faut récolter les mycéliums au bon moment c'est-à-dire quand ils sont à leur optimum.

Par exemple, si on voulait dépolluer le lot 1 en cadmium à l'aide de *Pleurotus ostreatus*, sur base du taux de dépollution en t_3 qui est de 0,3 il faudrait, a priori, réaliser 4 récoltes. Pour le plomb et le zinc, les taux sont respectivement de 0,35 et 0,25. Il est donc probable que 4 récoltes suffisent à dépolluer le lot 1.

En pratique, il s'agit d'une estimation, il n'est pas garanti que le taux de dépollution soit constant pour chaque récolte. Néanmoins, cela donne une idée du mode opératoire à mettre en œuvre. On remarque que ces graphiques de taux de dépollution ont des allures corrélées à ces graphiques de l'évolution de la masse des mycéliums au cours du temps

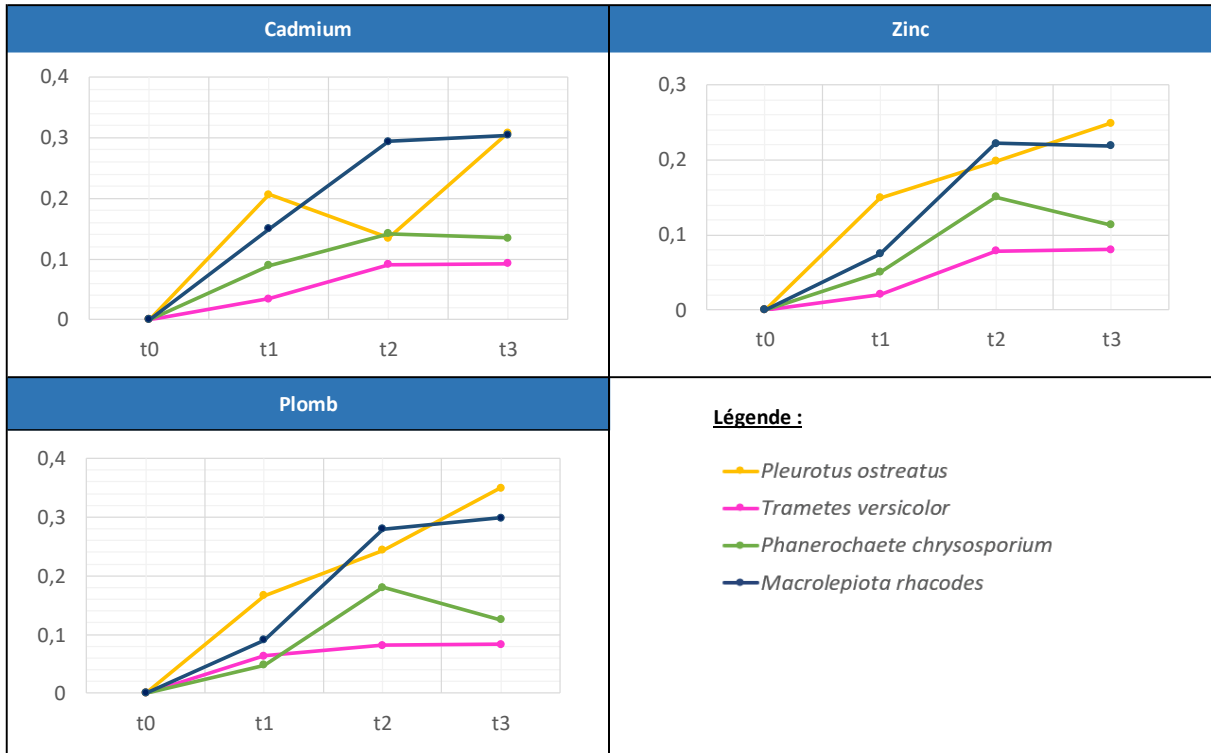


Tableau 16 : graphiques des taux de dépollution du sol du lot 1 en fonction du temps

Pour ce qui est du lot 2, la plupart des champignons voient leur taux de dépollution chuter en t₂, ce qui correspond à leur dépérissement et correspond aux graphiques de l'évolution de la teneur en métaux au cours du temps.

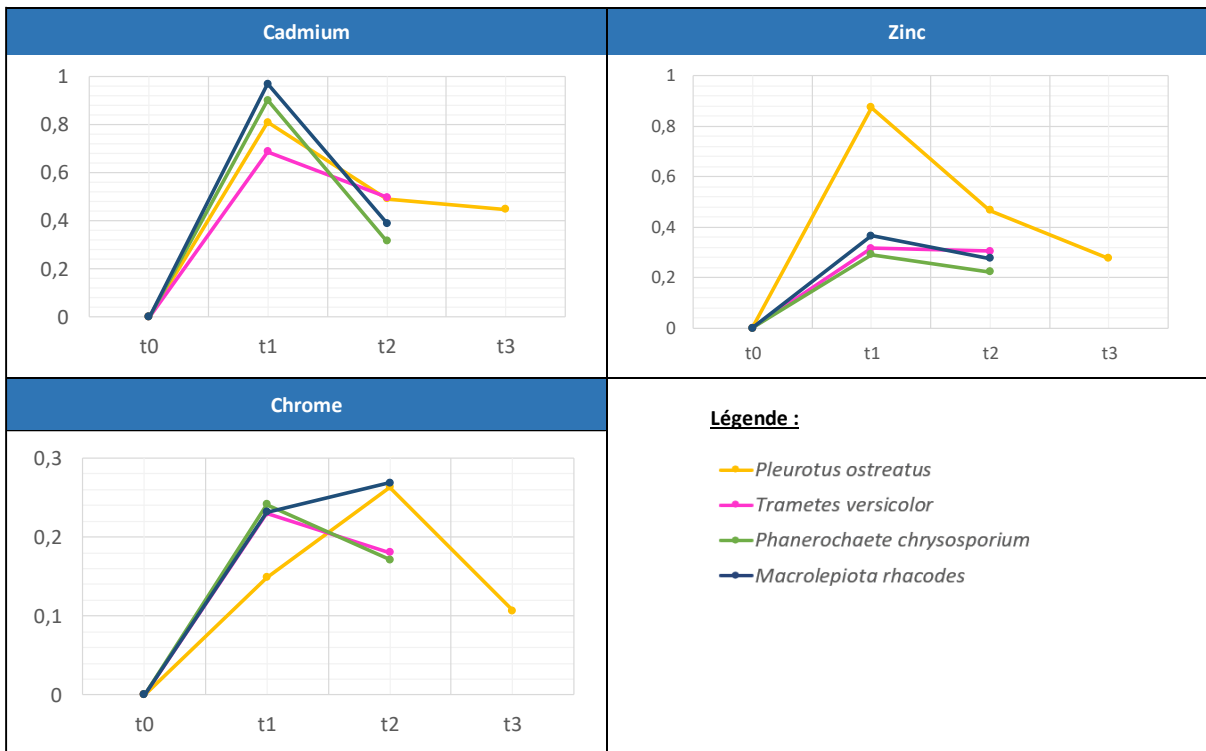


Tableau 17 : graphiques des taux de dépollution du sol du lot 2 en fonction du temps

3. Biodégradation des HAP

Contrairement à l'étude de bioaccumulation des métaux, seules les concentrations dans le sol sont ici étudiées. En effet, ce n'est pas l'accumulation au sein du mycélium qui est intéressante mais sa diminution dans le sol et sa métabolisation par le micro-organisme.

Encore une fois, toutes les conditions expérimentales possèdent une valeur commune de t_0 qui est le résultat d'analyse du sol issu directement du seau tamisé.

Les résultats d'analyse de t_1 ne sont pas exploitables et ne sont pas présentés. Cela semble dû à un délai trop long entre le moment où les solutions ont été préparées et le moment où elles ont été analysées.

Du fait de l'absence de données en t_1 , il est difficile de déterminer si la disparité des valeurs obtenues en t_2 est due à l'hétérogénéité de la pollution dans l'échantillon préalablement prélevé ou à l'efficacité de biodégradation des HAP variable d'un micro-organisme à l'autre.

3.3. Biodégradation sur le lot 2

Excepté pour le mélange d'EM et la bactérie *Pseudomonas putida*, on peut observer sur les graphiques présentés au Tableau 18 des droites de pentes négatives entre t_2 et t_3 . Cela indique que la concentration en HAP a globalement diminué, c'est-à-dire qu'ils ont été dégradés. Toutefois, cela ne signifie pas que le sol n'est plus pollué. La dégradation des HAP en substances moins voire, non toxiques est un processus long au cours duquel les composés intermédiaires formés peuvent malheureusement être toxiques.

Le blanc en t_2 ne possède pas de valeur car une erreur de manipulation au laboratoire a eu lieu. Il est donc compliqué de commenter l'évolution de la concentration en HAP pour cette condition expérimentale bien que, les valeurs de t_3 soient inférieures à aux valeurs de t_0 .

Le benzo(g,h,i)perylène ne possède lui non plus pas de valeurs en t_2 car les résultats d'analyses pour cet HAP sont sous la limite de détection de la méthode analytique. Il est donc là aussi compliqué de commenter l'efficacité de l'expérience.

Les quatre champignons mis en œuvre se sont montrés efficaces à la dégradation entre t_2 et t_3 . Cette efficacité varie d'un HAP à l'autre mais globalement, *Macrolepiota rhacodes* donne les meilleurs résultats.

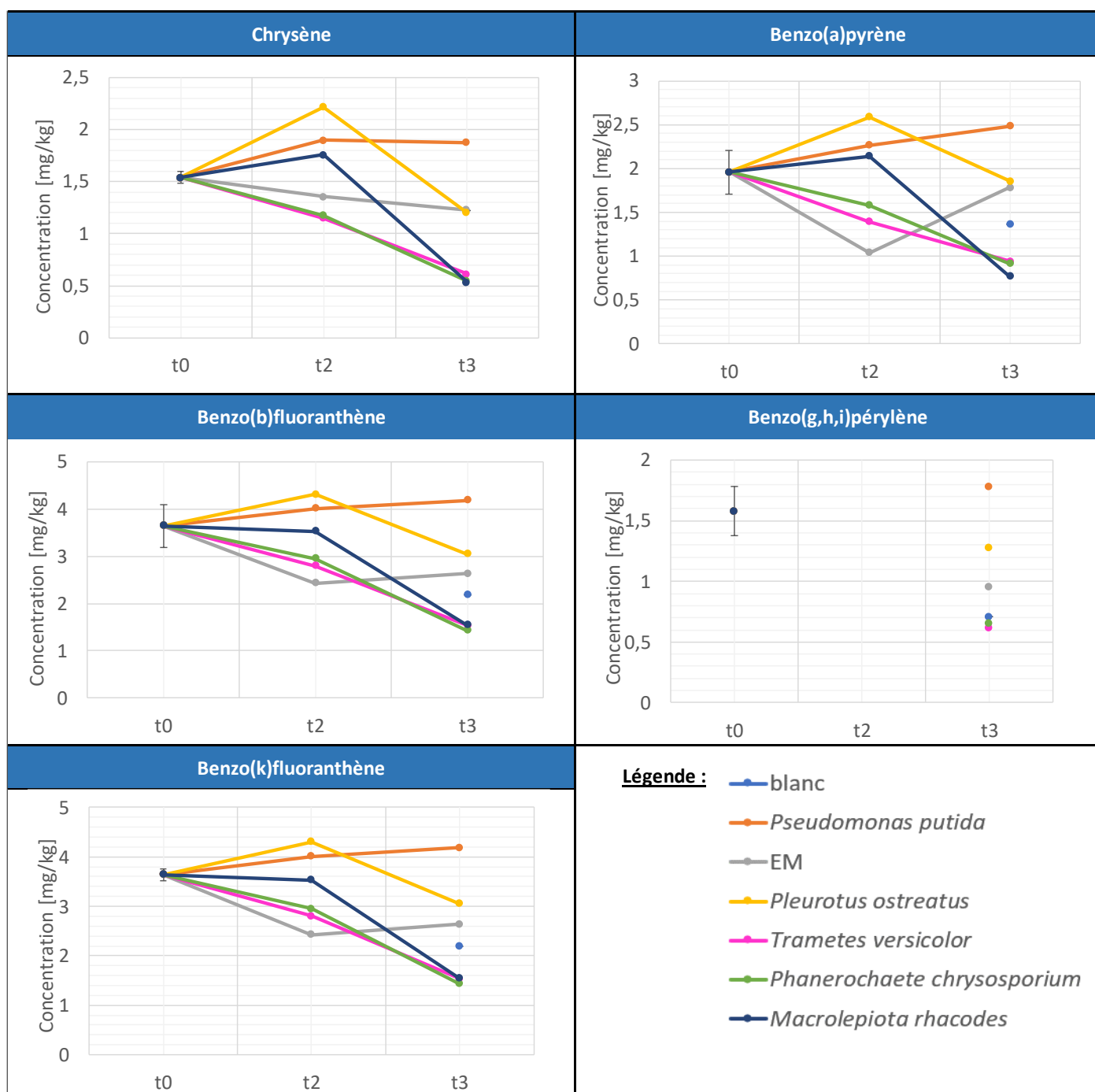


Tableau 18 : résultats des essais de bioremédiation par biodégradation des HAP sur le sol du lot 2. Dû à une erreur de manipulation au laboratoire, aucune valeur n'est présentée pour les blancs en t₂. Idem pour le benzo(g,h,i)pérylène car les résultats d'analyses pour cet HAP sont sous la limite de détection de la méthode analytique

3.4. Biodégradation sur le lot 3

Les résultats de l'étude de biodégradation sur le lot 3 (Tableau 19) semblent moins probants que sur le lot 2 (Tableau 18). Ils sont surtout plus difficiles à interpréter. En effet, en observant les valeurs de concentrations en t_2 , on constate que, à l'instar de la pollution métallique du lot 1, les polluants sont répartis de manière extrêmement hétérogène au sein du sol.

Le seul micro-organisme qui semble avoir été efficace pour la dégradation des HAP semble être la bactérie *Pseudomonas putida*. Pour chaque graphique d'évolution de la concentration en HAP en fonction du temps (à part celui du benzo(g,h,i)pérylène), la pente de la droite entre t_2 et t_3 est négative.

Pour les autres micro-organismes, l'expérience s'avère non concluante. Pour la plupart, on observe une stagnation entre t_2 et t_3 , pour d'autres, une augmentation de la teneur en HAP. Cette augmentation est probablement due à une hétérogénéité trop importante de la répartition des HAP au sein du sol.

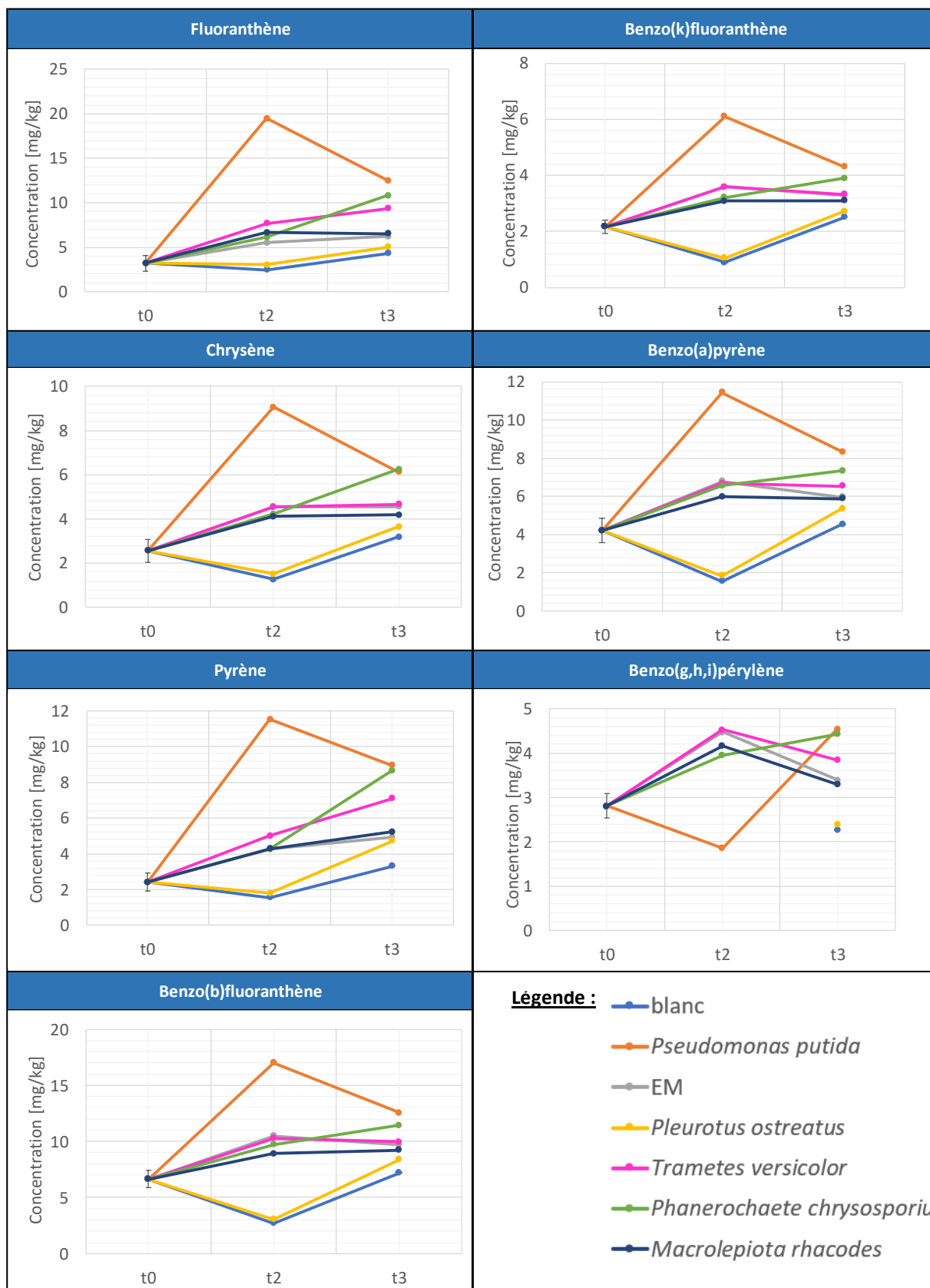


Tableau 19 : résultats des essais de bioremédiation par biodégradation des HAP sur le sol du lot 3

Conclusions

Les objectifs de ce travail de fin d'études étaient de mettre en évidence les capacités de bioremédiation de plusieurs micro-organismes et cela s'est avéré concluant. La bioaccumulation de métaux ainsi que la biodégradation des HAP en laboratoire est tout à fait réalisable si les conditions expérimentales sont adaptées. Les *fungi* les plus aptes à ces dépollutions furent *Pleurotus ostreatus* et *Macrolepiota rhacodes*. La bactérie *Pseudomonas putida* semble, elle aussi être capable de dégrader des HAP.

Toutes les expériences ne se sont, certes, pas avérées concluantes mais elles ont prouvé la possibilité de dépolluer les sols à l'aide de micro-organismes et apportent de nombreuses pistes de réflexion pour en réaliser de nouvelles sur base de cette expérience acquise.

Constats

La principale difficulté à laquelle s'est confrontée ce travail de fin d'études est l'hétérogénéité de la répartition des polluants dans le sol. Ce problème intrinsèque rend l'interprétation des résultats assez complexes. Il est peu probable que de réaliser une pollution artificielle au laboratoire ait résolu ce problème.

La seconde difficulté fut la mort de certains micro-organismes au cours des essais.

Ces difficultés ne sont pas rédhibitoires au traitement biologique et, des enseignements peuvent en être tirés.

Leçons

Malgré les difficultés rencontrées, l'efficacité de bioaccumulation et de biodégradation des micro-organismes a été démontrée.

Afin les résultats soient moins impactés par des incertitudes liées à l'hétérogénéité initiale au sein des lots, et soient davantage représentatifs de la pollution au sein du sol, il faudrait mieux la caractériser et réaliser les essais avec trois à cinq répliques au lieu d'un seul. Une solution serait de sacrifier pour chaque temps non pas un mais trois voire cinq erlenmeyers.

Pour prolonger l'efficacité et la durée de l'expérience, il faut faciliter la survie des micro-organismes et s'assurer de leur croissance et survie. Pour vérifier si leur mort est due à un manque de nutriments, il faut prélever du mycélium d'un erlenmeyer où celui-ci a commencé à dépérir et le transférer dans un milieu de culture. Si suite à cela le mycélium se redéveloppe, cela veut dire que le manque de nutriments est bien la cause de leur mort. Ce test a été réalisé sur un prélèvement de mycélium de *Pleurotus ostreatus* et s'est avéré positif : le micro-organisme n'était pas mort, il a repris son développement grâce à ce nouvel apport nutritif (Figure 28).



Figure 28 : boîte de pétri couverte du mycélium de *Pleurotus ostreatus* après récupération de spores dans un erlenmeyer

La présence de vanilline (un produit de dégradation de la lignine) semble améliorer le processus de dégradation des champignons (Bhattacharya et al., 2014), un apport régulier de sciure ou de copeaux de bois devrait aussi participer à les entretenir.

Si la cause du dépérissement des champignons est due à la toxicité des métaux bioaccumulés, l'apport de nutriments serait vain. Dans ce cas, il faudrait récolter le mycélium dès que des signes de mauvaise santé sont visibles comme la présence de spores colorées ou la perte de masse. Ensuite, il faudrait à nouveau inoculer du mycélium et réitérer ce schéma jusqu'à ce que la pollution dans le sol ait suffisamment diminué.

Dans les cas des pollutions multiples comme pour le lot 2 qui contient à la fois une pollution métallique et une pollution aux HAP, il serait peut-être préférable de traiter une pollution à la fois. Dans un premier temps, extraire les métaux par bioaccumulation et puis seulement dégrader les HAP. En effet, car la biodégradation de composés organique peut être inhibée par la toxicité des métaux (Wuana et Okieimen, 2011).

Suite et perspectives

Dans le cadre de ce travail, les capacités de bioremédiation de plusieurs micro-organismes ont été étudiées individuellement. Pour aller plus loin, il serait intéressant d'étudier les capacités de ces micro-organismes œuvrant en synergie. Par exemple, tester la combinaison du champignon *Pleurotus ostreatus* et de la bactérie *Pseudomonas putida*.

L'objectif de cette étude de traitement biologique est, à terme, de traiter les sols pollués directement sur site, *in situ* ou, éventuellement *ex situ on site* sous forme d'andains. La manière dont je vois les choses est la suivante : après des recherches plus poussées au laboratoire, les mécanismes de bioremédiation sont mieux compris et maîtrisés.

Peu importe le site à dépolluer, il faut préalablement tester le développement et la capacité de bioremédiation des micro-organismes au laboratoire. En effet, il a été remarqué que chaque champignon a plus ou moins d'affinité avec un type de sol pollué qu'un autre. Il faut donc trouver les souches qui s'adaptent au sol étudié et trouver les conditions environnementales favorisant son développement. Au laboratoire, une petite quantité de mycélium fut inoculée dans chaque erlenmeyer. Sur site, il faudrait développer au préalable le mycélium dans des conditions optimales au laboratoire et puis seulement, l'amener sur le site d'intérêt.

Il faut garder à l'esprit que, une réhabilitation durable d'un site pollué ne doit pas uniquement consister en une dépollution. Il est aussi primordial de le réenrichir en matière organique afin que les sols soient des écosystèmes sains ou des terres agricoles de qualité.

Bien sûr, le passage de l'étude au laboratoire à la mise en place sur site ne sera pas aisé et risque de se heurter à de nombreuses difficultés. Il faudra s'adapter, développer la technologie et *in fine*, pourquoi réaliser un guide de réhabilitation biologique et durable de site pollués.

La 3^e voie du vivant

Dans son livre « La 3^e voie du vivant », le biologiste français Olivier Hamant questionne la course à la performance par laquelle notre société est obnubilée. Il s'agit d'un essai que l'auteur débute avec ces mots (Hamant, 2022) :

« Aujourd'hui, notre prédation globale sur les ressources naturelles génère des conséquences si négatives qu'elle remet en cause notre viabilité sur Terre ».

Selon lui, c'est cette obsession de la performance et de l'optimisation n'est pas en adéquation avec notre planète et ses limites et nous mène vers une potentielle extinction de masse. La voie à suivre pour survivre est la voie du vivant.

Notre objectif ne devrait pas être l'amélioration des performances à tout prix mais bien d'atteindre la résilience⁷. Ne pas être des parasites sur notre planète mais vivre en symbiose avec elle. Il nous raconte comment la sous-optimalité du vivant pourrait nous inspirer pour habiter la Terre. En effet, beaucoup d'exemple dans le monde de la biologie illustrent à quel point la vie est imparfaite, sous-optimale mais résiliente.

Prenons un des exemples préférés de M. Hamant qui est : pourquoi l'herbe est-elle de couleur verte ? Pour vivre, les plantes ont recouru à la photosynthèse, elles utilisent l'énergie lumineuse. Or, la lumière du soleil est blanche, elle se compose de toutes les couleurs de l'arc en ciel et donc, de toutes les longueurs d'onde. Pourtant, les plantes n'absorbent la lumière que dans le rouge et le bleu. Elles n'absorbent pas le vert. De ce fait, le rendement de leur photosynthèse est d'à peine un pourcent alors que des panneaux solaires sont actuellement capables, dans de bonnes conditions, d'atteindre un rendement d'une vingtaine de pourcents. Mais pourquoi les plantes ont, au cours de l'évolution, choisi de gâcher une fraction disponible de l'énergie lumineuse ? La réponse est simple : la robustesse. En effet, il a été démontré que, pour que l'absorption des photons soit optimale, il faut que le flux d'énergie soit constant au niveau moléculaire. Or, cela n'est pas le cas : il y a des fluctuations à la fois au sein des cellules végétales mais aussi au niveau de la lumière du soleil qui varie énormément au cours de la journée et au fil des saisons. L'absorption de la lumière dans le rouge et le bleu, ces couleurs dont les pics d'absorption du spectre électromagnétique, permet aux végétaux de gérer ces fluctuations et donc de rendre la photosynthèse plus robuste⁸. Autrement dit, les plantes ont évolué vers la résilience et non la performance même si cela les contraigne à une certaine sous-optimalité. Elles absorbent moins de lumière mais elles sont capables d'en absorber suffisamment et ce, en toutes circonstances.

Selon lui, la sous-optimalité n'est pas réservée à la biologie, la robustesse est le chemin de la viabilité et se construit contre la performance. C'est la robustesse qui permet de résister aux fluctuations et de s'adapter au monde qui change. Les organismes vivants ont bâti leur résilience sur base de hasards,

⁷ **Résilience** : capacité d'un système à être robuste, adaptable et transformable

⁸ **Robustesse** : capacité d'un système à maintenir ses réponses dans une fourchette donnée malgré les perturbations subies

d'erreur, de lenteur, de hasard et d'imperfection. La biologie embrasse des valeurs jugées négativement dans notre société du culte de la performance et pourtant le résultat est là : la vie est présente sur Terre depuis 3,8 milliards d'années.

Le sujet de ce travail de fin d'études illustre parfaitement cette philosophie : actuellement, la mise en pratique de traitements biologiques est délaissée parce qu'ils prennent du temps. Et dans notre société de « toujours plus, toujours plus vite », consacrer plusieurs mois voire une année ou deux à la réhabilitation d'un site est inenvisageable. Ce n'est pas considéré comme performant. Et pourtant, il est possible de regarder cela sous un autre angle et y voir une solution qui a du sens. Tout d'abord, concernant la durée de la réhabilitation *in situ*, celle-ci est certes longue mais ne nécessite pas un suivi continu, il faut être patient et attendre que les micro-organismes fassent leur travail. De plus, les traitements biologiques sont durables : une fois les processus de bioremédiation bien maîtrisés, ils nécessitent de relativement peu de moyens. Ils sont donc peu énergivores. De plus, le fait que les terres soient traitées sur place et non transportées d'un endroit à l'autre en camion permet d'émettre peu de gaz à effet de serre. Cependant, dans un souci de transparence, il faut bien admettre que, la bioremédiation pourrait conduire à la production de composés organiques volatiles qui possèdent des effets bien plus importants que celui du CO₂.

A cela s'ajoute le fait qu'ils sont respectueux de l'environnement et sont bénéfiques pour les écosystèmes ce qui est important pour la préservation de la biodiversité.

Le monde du vivant nous montre de manière passionnante et philosophique la voie à emprunter, qu'attendons-nous pour la suivre ?

Liste bibliographique

- Adams, G., P.T. Fufeyin, S.E. Okoro, I. Ehinomen (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation : a review. *International Journal of Environmental of Bioremediation and Biodegradation*, vol.3, no 1, pages 28-39. DOI : 10.12691/ijebb-3-1-5
- Adenipekun, C.O. and Lawal, R. (2012) Uses of mushrooms in bioremediation: A review. *Biotechnol. Molecular Biology Review*, 7(3), 62-68. DOI : 10.5897/BMBR12.006
- ADIT (2006) Traitement biologique des sols pollués : recherche et innovation. Etude réalisée pour le compte de l'ADEME par l'ADIT (Agence pour la diffusion de l'information technologique). France
- Alexander, M. (1999) Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, New York, p. 269–298.
- Belley-Vézina, V. (2014) Vers un traitement durable des sols au Québec : possibilités et perspectives des traitements *in situ* des sols contaminés aux hydrocarbures. Essai présenté au Centre universitaire de formation en environnement et développement durable en vue de l'obtention du grade de maître en environnement, 140 pages, Université de Sherbrooke, Canada
- Bhattacharya, S. et al. (2014) Mycoremediation of Benzo[a]pyrene by *Pleurotus ostreatus* in the presence of heavy metals and mediators. *Biotech*, 4(2), 205-211. DOI: 10.1007/s13205-013-0148-y
- Bigot, E. (2019) Mes micro-organismes efficaces (EM) - L'alternative naturelle aux produits chimiques de synthèse. Editions Jouvence, 121 pages. France
- Bridoux, F. (2022) Etude des terres polluées gérées par un centre de traitement. Rapport de stage de Master 2, 53pages, Faculté Polytechnique de Mons, Université de Mons, Belgique.
- Cerniglia, C.E. (1993) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 4, Issue 3, Pages 331-338, ISSN 0958-1669. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(93\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0958-1669(93)90104-5)
- Cerniglia, C.E., Sutherland, J.B. (2010). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi . In: Timmis, K.N. (eds) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_151
- Cherlet, M., Hutchinson, C., Reynolds, J., Hill, J., Sommer, S., von Maltitz, G. (2018) *World Atlas of Desertification (WAD)*, Publication Office of the European Union, 3 e edition, 248 pages, Luxembourg
- Colombano, S., A. Saada, V. Guerin, P. Bataillard, G. Bellenfant, S. Beranger, D. Hube, C. Blanc, C. Zornig et I. Girardeau (2010). *Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfices*. Rapport final BRGM-RP-58609-FR , 402 pages, France
- Dufresne, M. (2013) Les technologies de traitements des sols contaminés : lesquelles sont durables ? Essai présenté au Centre universitaire de formation en environnement et développement durable en vue de l'obtention du grade de maître en environnement, 55 pages, Université de Sherbrooke, Québec, Canada

Effective microorganisms Research Organization (2022). Site web de la société Japonaise EMRO. <https://emrojapan.com/>. Consulté le 18/12/2022.

Giasson, P. (2005). Utilisation de champignons mycorhiziens dans le processus de phytorestauration de sols contaminés aux métaux lourds. Thèse de doctorat, 165 pages, Université du Québec à Chicoutimi. DOI:10.1522/24608079

Gouvernement Wallon (2018) Arrêté du gouvernement Wallon relatif à la gestion et à la traçabilité des terres. <http://environnement.wallonie.be/legis/solsousol/sol007.htm>

Hamant, O. (2022) La troisième voie du vivant. Editions Odile Jacob, 248 pages, France.

Madigan M, Martinko J (2007) Brock biology of microorganisms, 11th editions. Editions Pearson Education France, 1004 pages. France.

Nickson RT, McArthur J-M, Ravenscroft P, Burgess W.G, Ahmed K.M (2000) Mechanism of arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal, Applied Geochemistry, Volume 15, Issue 4, Pages 403-413

Rabodonirina R (2015) Contaminants organiques (HAP, Me-HAP, PCB) en environnement: Etude de milieu naturel et de faisabilité de bioremédiation. Université de Lille, France, 205 pages <https://pepite-depot.univ-lille.fr/LIBRE/EDSMRE/2015/50376-2015-Rabodonirina.pdf>

Rhodes, J. (2014) Mycoremediation (bioremediation with fungi) – growing mushrooms to clean the earth, Chemical Speciation & Bioavailability, 26:3, 196-198 <https://doi.org/10.3184/095422914X14047407349335>

Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., & Scheffer, M. (2009) A safe operating space for humanity. Nature 461, 472–475. <https://doi.org/10.1038/461472a>

Roger, P., V. Jacq (2000) Introduction à la bioremédiation des sols, des eaux et de l'air. Polycopié de cours, Université de Provence, France

Roquebert, M-F. (2002) Les contaminants biologiques des biens culturels. Volume 2 de Collection Patrimoine, Elsevier, 419 pages, France

Service public de Wallonie (2012) Les indicateurs clés de l'environnement Wallon ICW 2012 – Rapport sur l'état de l'environnement Wallon, 164 pages. SPW Editions. Belgique. <https://ediwall.wallonie.be/rapport-sur-letat-de-l-environnement-wallon-les-indicateurs-cles-de-l-environnement-wallon-2012-2013-numerique-085932>

Service public de Wallonie (2017). Rapport sur l'état de l'environnement wallon 2017 (REEW) SPW Éditions. 368 pages. Belgique. <https://ediwall.wallonie.be/rapport-sur-letat-de-l-environnement-wallon-2017-numerique-060236?ref=>

Singh, H. Mycoremediation : Fungal Bioremediation. Editions John Wiley & Sons, 590 pages. New York, USA. DOI:10.1002/0470050594

SPW Environnement - DEMNA – DEE (2021) L'environnement wallon en 10 infographies, SPW Éditions : Jambes, Belgique. <http://etat.environnement.wallonie.be>

Stamets, P. (2005). Mycelium running how mushrooms can help save the world. Editions Ten Speed Press. Berkley, Etats-Unis.

Stamets, P. (2021) Why All Host Defense Supplements Are Powered by Mushroom Mycelium, article publié sur le site Host Defense Mushrooms, consulté le 03/06/2023
<https://hostdefense.com/blogs/host-defense-blog/mycelium-explained>

Wagner T (2022) La 6e limite planétaire est franchie : le cycle de l'eau douce, article sur le site BonPote <https://bonpote.com/la-6e-limite-planetaire-est-franchie-le-cycle-de-leau-douce/>

Wang-Erlandsson, L., Tobian, A., van der Ent, R.J. et al. (2022) A planetary boundary for green water. Nature Reviews Earth Environment 3, 380–392. <https://doi.org/10.1038/s43017-022-00287-8>

Wuana, R. Okieimen, F. (2011) Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation, International Scholarly Research Notices, vol. 2011, Article ID 402647, 20 pages. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>

Zhen-Guo S, Xian-Dong L, Chun-Chun W, Huai-Man Ch, Hong Ch. (2002). Lead Phytoextraction from contaminated soil with highbiomass plant species. J. Environ. Qual. 31: 1893-1900. DOI: 10.2134/jeq2002.1893

Annexes

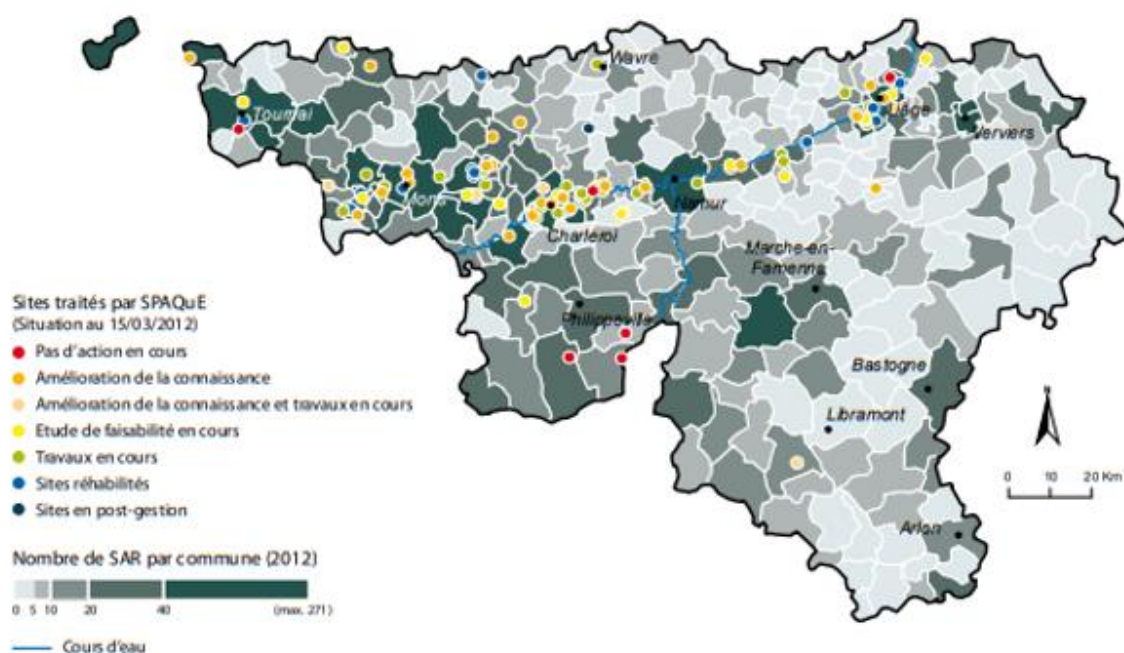


Figure 29 : carte des sites (potentiellement) pollués et des sites à réaménager (SAR) en Wallonie en 2012 (SPW, 2012)

	benzo- pyrènes	diméthyl- méthyl- phosphate	dioxine	hydrocarbures polycycliques (HAP)	polychloro- biphényles (PCB)	pentachloro- phénols (PCB)	trinitro- toluènes (TNT)
<i>armillaria ostoyae</i>		X				X	
<i>bjerkandera adusta</i>	X			X			
<i>grifola frondosa</i>						X	
<i>irpex lacteus</i>				X			
<i>lentinula edodes</i>				X	X	X	
<i>naematoloma frowardii</i>				X			X
<i>phanerochaete chrysosporium</i>	X					X	X
<i>pleurotus eryngii</i>			X				
<i>pleurotus ostreatus</i>	X	X	X	X	X		X
<i>pleurotus pulmonarius</i>			X				
<i>trametes versicolor</i>		X	X			X	X

Tableau 6 : tableau indiquant quel type de champignon est capable de dégrader quel type de polluant (modifié, d'après Stamets, 2005) (Les croix indiquent que des études ont prouvé que tel champignon était capable d'agir sur tel polluant. L'absence de croix ne signifie pas forcément que le champignon est inefficace contre le polluant mais son efficacité n'a pas encore été prouvée)

	arsenic	cadmium	césium radioactif	plomb	mercure	cuivre
<i>agricus arvensis</i>		x			150 x	
<i>agaricus bisporus</i>		x		23 x	165 x	
<i>agaricus bitorquis</i>		x			x	
<i>agaricus brasiliensis</i>		x			x	
<i>agaricus brunnescens</i>	x	x		10x	10 x	
<i>agaricus campestris</i>		x			x	
<i>boletus edulis</i>		10 x	x	x	250 x	x
<i>cantharellus cibarius</i>			2 x			
<i>chlorophyllum rachodes</i>	x			x	x	x
<i>clitocybe inversa</i>	x	x				
<i>coprinus comatus</i>	21 x	8 x			27 x	
<i>gomphidius glutinosus</i>			10000 x			
<i>laccaria amethystina</i>	x		x			
<i>lycoperdon perlatum</i>			x	2 x	100 x	x
<i>macrolepiota procera</i>					230 x	
<i>morchella sp.</i>				70-100 x		
<i>morchella atretomentosus</i>				x	x	
<i>paxillus atrotomentosus</i>			1180 x			
<i>pleurotus ostreatus</i>		x			65-140 x	
<i>pleurotus pulmonarius</i>		x			x	x
<i>suillus tomentosus</i>				67 x	6 x	
<i>trametes versicolor</i>					x	

Tableau 7 : facteurs de bioaccumulation des certains champignons en métaux lourds (modifié, d'après Stamets , 2005). Ceux marqués d'un X sans coefficient multiplicateur sont capable d'accumuler des métaux mais l'ordre de grandeur n'est pas connu

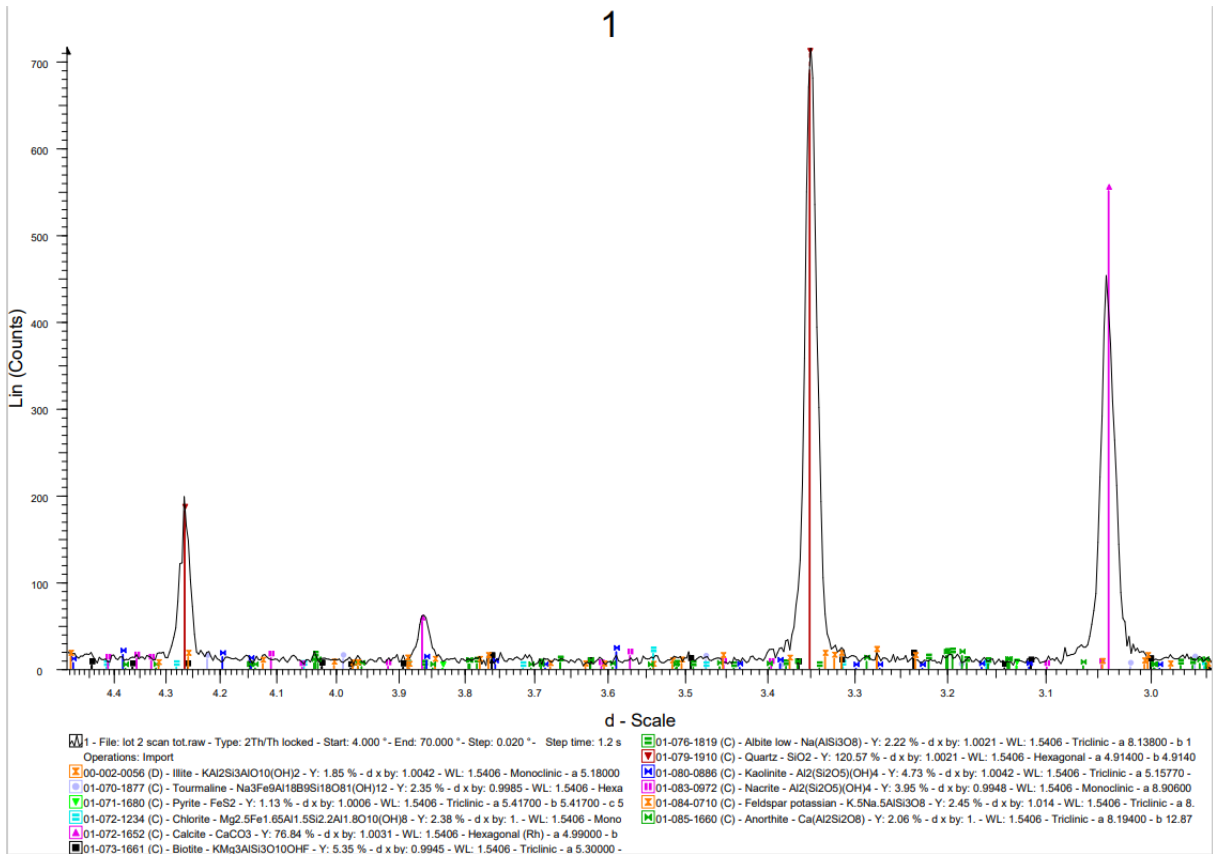


Figure 30 : spectrogramme de la fraction inférieure à 4mm du lot 3

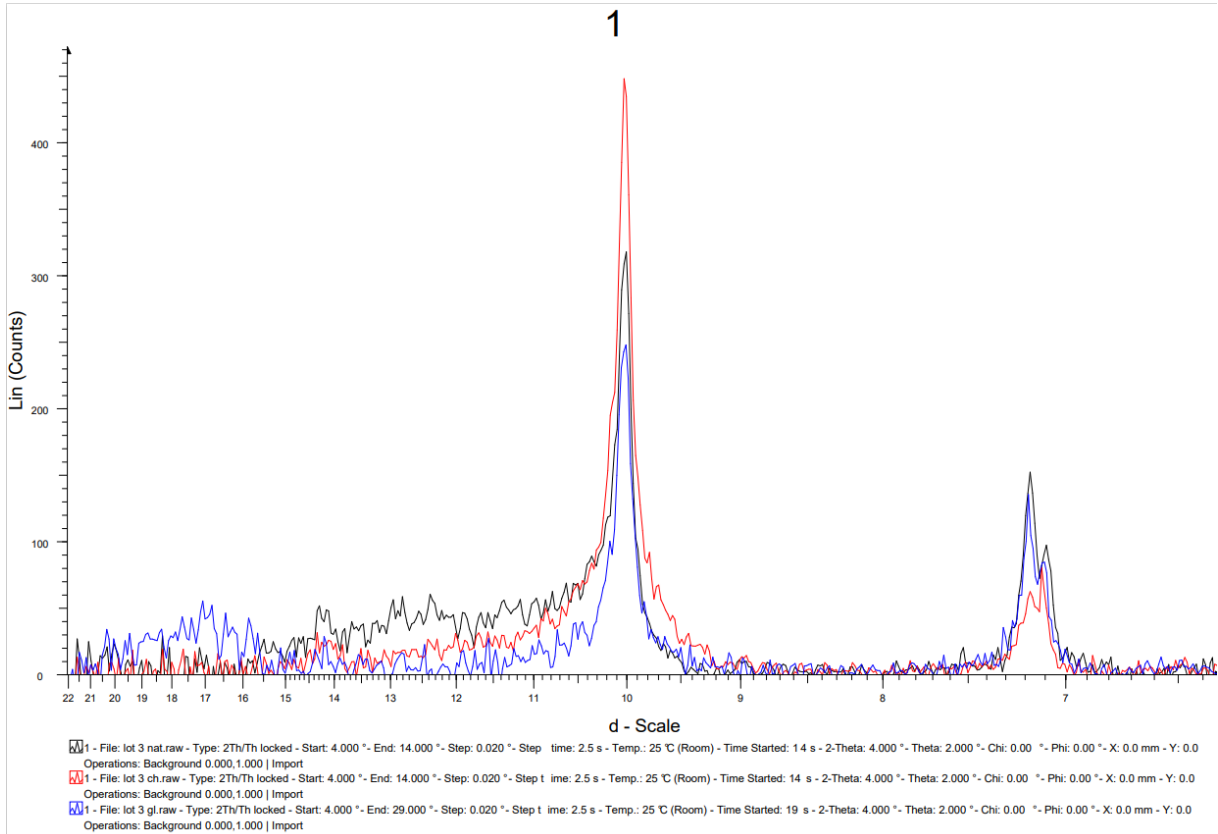


Figure 31 : spectrogramme de la fraction argileuse du lot 3

	Lot 1						Lot 2					
	L1A	L1B	L1C	moy L1	std	std %	L2A	L2B	L2C	moy L2	std	std %
cadmium	3,20	3,06	3,20	3,15	0,08	2,46	1,73	1,90	1,84	1,82	0,08	4,61
chrome	23,55	23,07	23,01	23,21	0,30	1,29	67,59	79,08	121,71	89,46	28,51	31,87
plomb	317,16	308,55	327,51	317,74	9,49	2,99	59,29	58,48	56,41	58,06	1,49	2,56
zinc	1142,51	1123,52	1188,17	1151,40	33,23	2,89	337,04	372,83	319,45	343,11	27,20	7,93

Tableau 8 : résultats d'analyses au laboratoire des concentration en métaux dans les lots 1 et 2

	Lot 2						Lot 3					
	L21	L22	L23	moy	std	std %	L31	L32	L33	moy	std	std %
Naphthalene	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Acenaphthylene	0,07	0,00	0,07	0,07	0,00	6,05	0,09	0,06	0,10	0,08	0,02	25,63
Acenaphthene	0,20	0,11	0,12	0,14	0,05	34,28	0,09	0,12	0,04	0,09	0,04	51,24
Fluorene	0,18	0,19	0,24	0,21	0,03	15,93	0,07	0,13	0,09	0,10	0,03	31,36
Phenanthrene	1,09	0,94	0,86	0,96	0,12	12,20	0,99	1,55	0,78	1,11	0,40	35,89
Anthracene	0,21	0,25	0,59	0,35	0,21	59,68	0,37	0,46	0,29	0,37	0,08	21,91
Fluoranthene	2,58	2,75	1,97	2,43	0,41	16,80	3,01	4,17	2,42	3,20	0,89	27,85
Pyrene	1,77	1,85	1,40	1,68	0,24	14,36	2,35	2,98	1,94	2,42	0,53	21,77
Benz[a]anthracene	1,93	2,34	1,97	2,08	0,23	10,93	3,71	4,36	2,95	3,67	0,70	19,21
Chrysene	1,60	1,54	1,47	1,54	0,06	4,20	2,44	3,14	2,14	2,57	0,51	19,87
Benzo[b]fluoranthene	4,08	3,68	3,15	3,64	0,46	12,76	6,94	7,24	5,75	6,64	0,79	11,89
Benzo[k]fluoranthene	1,49	1,34	1,24	1,36	0,12	9,18	2,20	2,40	1,91	2,17	0,25	11,35
Benzo[e]pyrene	1,96	2,20	1,71	1,96	0,25	12,61	4,37	4,77	3,52	4,22	0,64	15,15
Dibenz[a,h]anthracene	0,66	0,37	0,32	0,45	0,19	41,25	0,78	1,09	0,17	0,68	0,46	68,45
Benzo[ghi]perylene	1,79	1,38	1,57	1,58	0,20	12,92	2,99	2,95	2,50	2,81	0,27	9,74
Indeno[1,2,3-cd]fluoranthene	2,29	1,84	1,57	1,90	0,36	18,90	3,71	4,42	1,65	3,26	1,44	44,16

Tableau 9 : résultats d'analyses au laboratoire des concentration en HAP dans les lots 2 et 3

Protocole de mesure des éléments traces métalliques dans le sol par attaque acide oxydante (adapté de la méthode 3050B de l' U.S. Environmental Protection Agency)

- Peser 3 à 4 g de matière sèche dans chaque bécher (si la matière n'est pas sèche, il faut connaître le taux d'humidité). S'assurer que les bêcheurs utilisés soient propres c'est-à-dire ne contiennent pas de résidus métalliques qui pourraient fausser les résultats. Si nécessaire, laver les bêcheurs à l'acide nitrique.
- Ajouter 20 ml d'HNO₃ 65% pur
- Chauffer 20 à 30 minutes. Il n'est pas nécessaire de porter à ébullition.
- Ajouter 10 ml d'H₂O₂ (délicatement car il s'agit d'un puissant oxydant)
- Chauffer jusqu'à évaporer à quelques ml.
- Ajouter 30 ml d'HCl 37% et couvrir d'un verre de montre pour simuler un reflux et éviter l'évaporation.
- Continuer à chauffer 20 à 30 minutes.
- Enlever le verre de montre et évaporer à quelques ml.
- Laisser refroidir et filtrer par gravité.
- Mettre au trait dans une fiole jaugée de 100 ml avec de l'eau milliQ
- Transférer les solutions dans des vials pour analyser les éléments traces métalliques par ICP-MS.

Protocole d'extraction Soxhlet

- Remplir une cartouche en cellulose avec 30 g de terre
- Remplir un ballon à col rodé avec 100mL de méthanol et 25mL de dichlorométhane, y ajouter quelques pierres ponce pour éviter une ébullition trop violente
- Placer le ballon dans le chauffe-ballon
- Emboîter le corps en verre contenant la cartouche dans le col du ballon
- Insérer le système de condensation au corps de verre
- Relier le système de condensation à une arrivée d'eau
- Ouvrir l'arrivée d'eau et allumer les chauffe-ballons
- Laisser l'extraction se dérouler pendant 7h
- Passer les ballons à cols rodés au rotavapor afin de concentrer la solution
- Transférer la solution concentrée dans une fiole jaugée de 50mL et mettre au trait avec du dichlorométhane.
- Transférer la solution dans des vials pour l'analyse par GC-MS.

Remarque : dû à la présence de micro-organismes, il est possible que la solution concentrée dans la fiole jaugée soit biphasique. Dans ce cas, la phase supérieure est à retirer à l'aide d'une pipette. Les HAP se trouvent dans la phase dichlorométhane qui est la plus dense, c'est cette phase qui doit être mise au trait.



Figure 32 : solution résultante de l'extraction Soxhlet et du rotavapor présentant un comportement biphasique