

# Cahier des charges :

## Caractérisation et essais en vue de l'application d'un traitement par phytoextraction et phytostabilisation

### 1. Introduction

Cette mission de caractérisation et essais intervient après la présélection des techniques et la caractérisation préliminaire du sol, qui permet notamment de définir la nature des contaminants (métalliques, organiques) et leur teneur globale, ainsi que la composition granulométrique du sol.

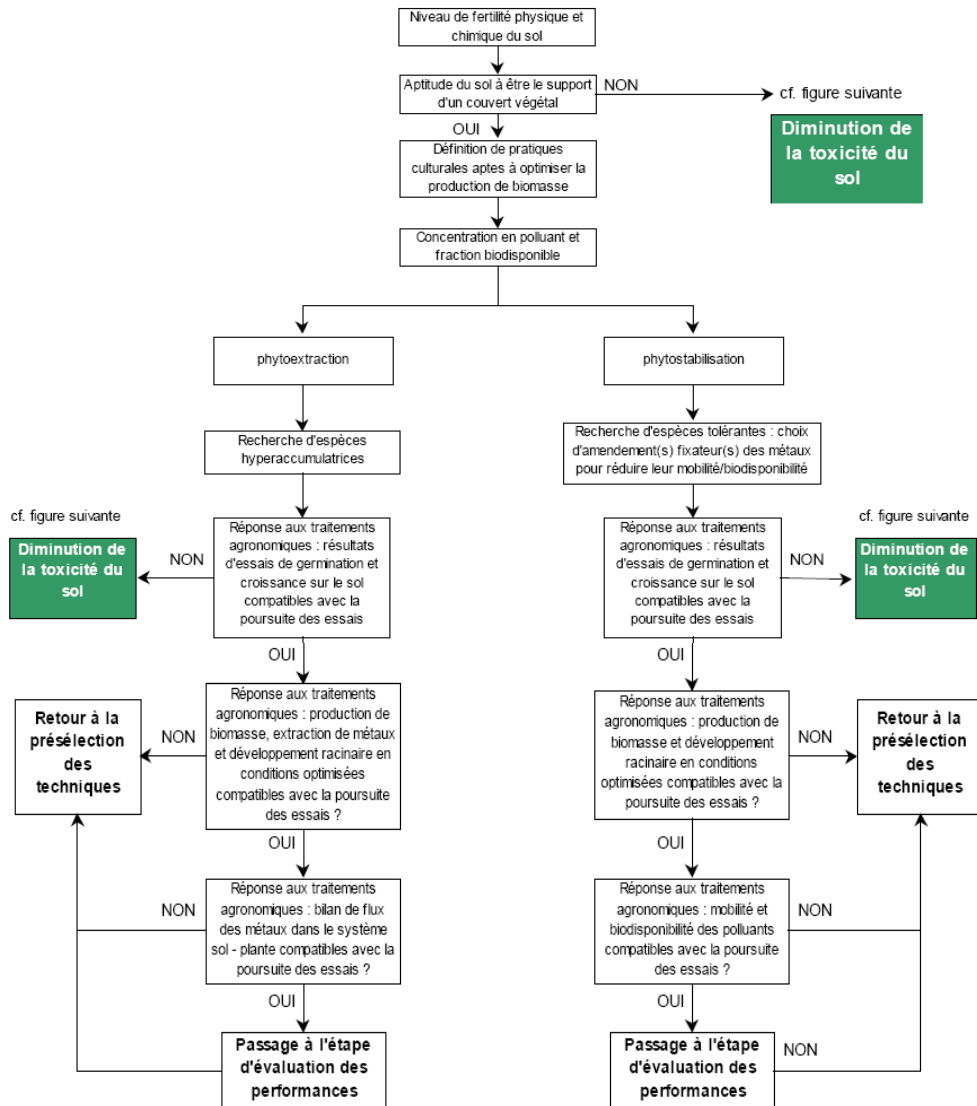
Les principales caractéristiques du site, du sol et des polluants qui ont conduit à la présélection de cette technique sont rappelées ci-dessous ainsi que les limites associées à l'application des techniques de lavage chimique :

<b>Rappel de la problématique</b>	<u>Caractéristiques de la zone polluée :</u>  <u>Nature de la pollution :</u>  <u>Situation de la pollution vis-à-vis de la zone saturée :</u>  <u>Etat physique de la pollution :</u>
<b>Limites liées à la mise en œuvre</b>	<u>Mise en œuvre in situ :</u> Profondeur de la pollution ; Accessibilité pendant plusieurs années ;  <u>Mise en œuvre sur site :</u> Quantité minimale de sol à traiter ; Accessibilité pendant plusieurs années ; La phytostabilisation sur site n'est pas envisagée
<b>Limites liées à la nature de la pollution</b>	<u>Phytoextraction :</u> Technique adaptée au traitement des métaux et radionucléides seulement ; Technique pouvant présenter des difficultés pour les pollutions par certains métaux (cuivre par exemple)  <u>Phytostabilisation :</u> Technique adaptée au traitement de pollutions mixtes ; Technique surtout prometteuse pour les métaux et en particulier le chrome et le plomb
<b>Limites liées aux caractéristiques générales de la pollution</b>	Profondeur de la pollution : inférieure à 80 cm pour un traitement in situ
<b>Limites liées aux caractéristiques du sol</b>	Fertilité physique et chimique
<b>Limites liées à la concentration en polluant</b>	<u>Phytoextraction :</u> Concentrations inhibitrices notamment Cu pour <i>Thlaspi caerulescens</i>
<b>Limites liées à d'autres paramètres spécifiques</b>	-

**Tableau 1 : Rappel des caractéristiques à la base de la présélection des techniques de phytoextraction et phytostabilisation**

Les délais et coûts maximaux attendus pour la réalisation des essais sont précisés ci-dessous. Le candidat à la réalisation des caractérisations et essais en vue de l'application d'un lavage par agents chimiques ou tensio-actifs précisera les délais et coûts qu'il prévoit pour la réalisation de sa prestation au regard de ces objectifs.

## 2. Essais d'orientation



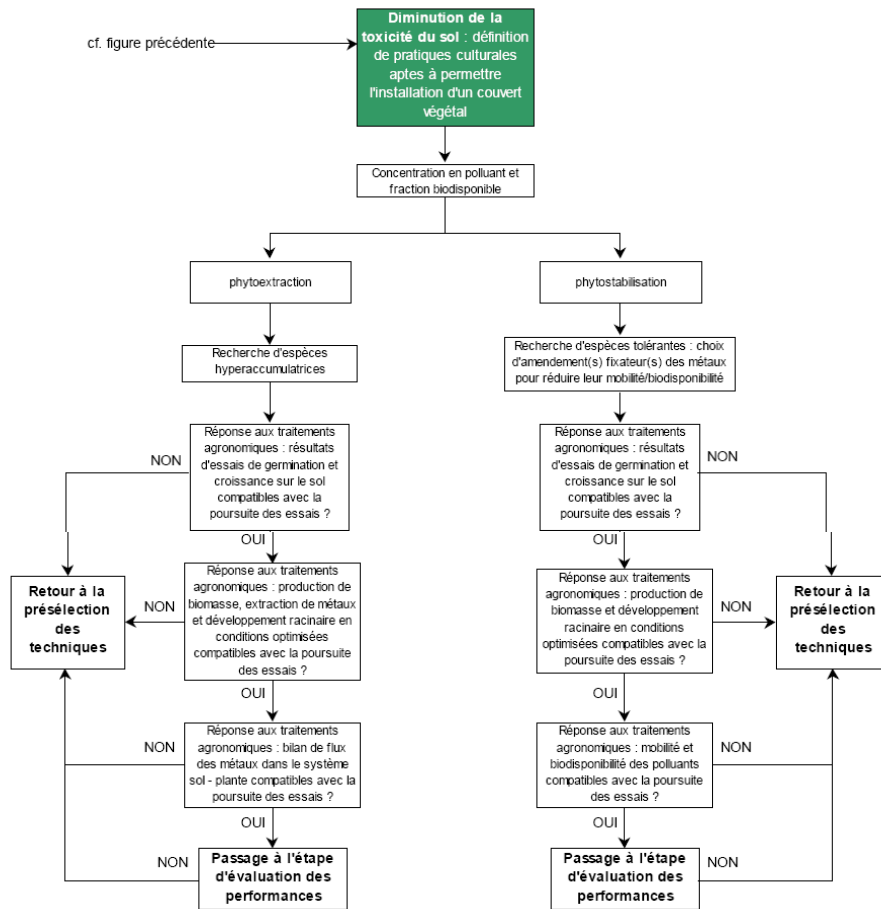


Figure 1 : Procédure d'essais d'orientation d'un traitement par désorption thermique

Les essais d'orientation en vue de l'évaluation de la traitabilité d'un sol par phytoextraction ou par phytostabilisation consistent à évaluer l'aptitude du sol étudié à être le support d'une culture d'espèces hyperaccumulatrices de métaux ou tolérantes à la pollution dans des conditions qui permettent d'atteindre, selon le cas, un flux de métaux du sol vers la plante (phytoextraction) ou une limitation de la mobilité et de la biodisponibilité des polluants (phytostabilisation) compatibles avec les objectifs fixés.

Les principaux paramètres déterminants qui doivent permettre d'évaluer la faisabilité de la phytoremédiation et d'orienter les essais vers un des procédés de phytoextraction ou de phytostabilisation adaptés aux sols à traiter sont les suivants :

- L'aptitude du sol à être le support d'un couvert végétal ;
- L'effet de la fertilisation azotée, phosphorée et soufrée sur la production de biomasse et (cas de la phyto-extraction) de l'extraction des métaux par les végétaux ;

Ainsi, après avoir effectué un bilan initial du niveau de fertilité des sols (paramètre limitant déjà étudié lors de la présélection des techniques), les tests décrits dans le tableau ci-dessous permettront de choisir des espèces végétales adaptées, soit tolérantes dans le cas de la phytostabilisation, soit hypertolérantes et hyperaccumulatrices pour la phytoextraction. La production de biomasse nécessaire à une forte couverture végétale et à une phytoextraction efficace pourra être améliorée par une fertilisation adéquate. Des amendements et des fertilisations seront à adapter pour immobiliser (phytostabilisation) ou mobiliser (phytoextraction) les métaux. Enfin, des tests finaux permettront de connaître les flux de métaux dans le système sol-eau-plante.

① <b>Analyses de fertilité du sol</b> • physique • chimique	<b>C*</b>	<b>C</b>
② <b>Recherche d'espèces adaptées</b> • tolérantes / excluantes ou hypertolérantes et hyperaccumulatrices • tests de germination • tests de croissance • développement du système racinaire	<b>S</b>	<b>E</b>
③ <b>Réponse aux traitements agronomiques</b> • fertilisation : dynamique des éléments nutritifs • réponse des plantes	<b>S</b>	<b>E</b>
④ <b>Réduction/augmentation de la phytodisponibilité</b> • mobilité / biodisponibilité des métaux - amendements - fertilisation	<b>S</b>	<b>E</b>
⑤ <b>Flux de métaux</b> (test final) • lixiviation • transport particulaire (stabilité structurale) • exportations par le couvert végétal		<b>S ou E</b>

\*C : commun      S : phytostabilisation      E : phytoextraction

Tableau 2 : Démarche générale d'essais de traitabilité par phytoremédiation

**Paramètres d'orientation de la phytostabilisation**

**Etape 1**

Problématique à tester : **Installation d'un couvert végétal sur sol pollué**

caractérisations spécifiques sur chaque sol testé :

- caractérisation de la fertilité du sol : pH, granulométrie, matière organique, carbone organique, N total, N minéralisable, C/N, P total et biodisponible suivant une méthode d'extraction sélective, cations échangeables, capacité totale d'échange, oligo-éléments
- phytotoxicité : tests de germination et de croissance discriminant des espèces tolérantes aux polluants présents dans le sol
- propriétés physiques : capacité au champ, point de flétrissement, eau utilisable, stabilité structurale, porosité

**Etape 2**

Problématique à tester : **Réponse aux traitements agronomiques**

caractérisations spécifiques sur chaque sol testé

- détermination du comportement des éléments fertilisants dans le sol : tests de mobilité, biodisponibilité des éléments nutritifs
- effets de la fertilisation (N, P, S) sur la croissance et le développement des végétaux : tests de croissance

### Etape 3

Problématique à tester : **Réponse aux traitements visant à diminuer la phytotoxicité**

caractérisations spécifiques

- apports d'amendements : chaulage, matières organiques, alumino-silicates, ...
- équilibres nutritionnels liés aux interactions entre les éléments nutritifs et les éléments non indispensables toxiques : tests de germination et croissance

#### Conditions nécessaires à la phytoextraction

La phytoextraction consiste à extraire les métaux des sols à l'aide de cultures de plantes hyperaccumulatrices. Les résultats des travaux de recherche du Laboratoire Sols et Environnement de l'ENSAIA/INRA permettent de dégager quatre conditions indispensables à la réalisation de cet objectif qui justifient les paramètres d'orientation choisis :

1. l'installation des plantes hyperaccumulatrices sur les sols à traiter,
2. l'exploration des sols à traiter par les racines des plantes hyperaccumulatrices,
3. la mobilité et la biodisponibilité des métaux à extraire,
4. l'extraction des métaux des sols par les plantes hyperaccumulatrices.

#### Paramètres d'orientation de la phytoextraction

La même approche que celle décrite pour la phytostabilisation sera suivie avec en complément :

### Etape 1 :

Problématique à tester : **Détermination de la nature des polluants**

caractérisations spécifiques en complément des analyses totales

- tests de mesure de la mobilité et de la phytodisponibilité des métaux : tests culturaux, extractions chimiques, cinétiques de dilution isotopique (éventuellement), tests microbiologiques de toxicité

### Etape 2

Problématique à tester : **Détermination des facteurs de biodisponibilité des métaux**

caractérisations spécifiques en complément des analyses totales

- espèce végétale, caractéristiques physico-chimiques des sols.

### Etape 3

Problématique à tester : **Phytotoxicité, installation du système racinaire**

caractérisations spécifiques

- effet de la nature, de l'intensité et de la localisation de la pollution sur le développement du système racinaire des plantes, aptitude des plantes à installer leur système racinaire dans les zones polluées : tests culturaux en rhizotrons (architecture et biomasse racinaire, localisation – test en développement)
- tests de pH rhizosphérique (réponse de la plante à la présence de métaux).

## 2.1. Aptitude du sol à être le support d'un couvert végétal

### 2.1.1 Installation et croissance d'espèces végétales

*T. caerulescens*, plante hyperaccumulatrice modèle, s'implante sur des milieux très divers et autres que les sols de sites métallifères où elle se développe naturellement. Les premiers essais de phytoextraction ont été conduits sur des sols agricoles amendés par des boues. La plante germe, croit et se développe sur des supports aussi variés que des sols agricoles, des sols agricoles ayant subi des apports de boue urbaine, des sols agricoles de périphérie de site industriel (fonderie de plomb, fonderie de zinc, usine métallurgique), des sols de friches industrielles présentant des pollutions métalliques ou organométalliques (fonderie de plomb, fonderie de zinc, cokerie) ou des boues de curage de rivière fortement contaminées. La plante est néanmoins sensible au cuivre présent en concentration élevée (exemple : sol d'usine de traitement du bois). La plante répond à la fertilisation et plus particulièrement à la fertilisation azotée. La production de biomasse aérienne peut être multipliée par trois grâce à un apport d'azote et les courbes de réponse à l'azote présentent une allure classique avec un maximum de biomasse obtenu avec la dose d'azote la plus forte. *T. caerulescens* valoriserait mieux le nitrate que l'ammonium, comme les autres espèces. Il est possible que la plus faible biomasse constatée en présence de la forme ammoniacale soit liée à des phénomènes de toxicité, soit directement ammoniacale, intervenant surtout dans les premiers temps de la culture, soit aluminique en raison de la réduction du pH à une valeur inférieure à 5. Dans les conditions d'expérimentation choisies, la fertilisation phosphatée n'a pas eu d'effet sur la production de biomasse, certainement en relation avec des besoins faibles de la plante. Comme pour les plantes de grande culture, la réponse à la fertilisation est variable en fonction du type de sol. Un matériau humifère contenant plus de 15 % de matières organiques ne perturbe pas le développement de *T. caerulescens*. Cependant il a été observé que la croissance de la plante hyperaccumulatrice est ralentie en cas d'excès hydrique. La présence d'autres espèces végétales induit généralement une diminution de biomasse eu égard aux compétitions pour les éléments nutritifs.

Les essais de germination et croissance d'espèces végétales sont basés sur la norme NF X 31-201 (1982) sur 3 espèces préconisées par la norme NF X 31-202 (1982) représentant les familles des Graminées, des Brassicaceae et des Légumineuses : *Lolium multiflorum* (raygrass), *Brassica napus* (colza) et *Trifolium pratense* (trèfle violet). Afin de compléter le test, on utilise également un représentant de la famille des Composées : *Achillea millefolium* (achillée millefeuille) ainsi que, dans le cas d'un traitement par phytoextraction, une espèce hyperaccumulatrice des métaux à extraire, ou dans le cas d'un traitement par phytostabilisation, une espèce hypertolérante à la pollution rencontrée.

Les tests sont effectués en boîte de Pétri ensemencées à raison de vingt graines par boîte, incubées dans une chambre climatisée à 22 °C et à l'obscurité. L'arrosage se fait quotidiennement par pesée à l'eau osmosée, de façon à maintenir le sol à 80 % de la capacité au champ. Le nombre de graines germées est compté quotidiennement sur une période de 14 jours.

Des essais de germination et croissance sont conduits avant et après amélioration de la fertilité physique et/ou chimique du sol, lorsque les caractérisations préalables en auront montré la nécessité, pour une plante modèle (*Lolium perenne*). Différentes doses d'amendement sont ainsi testées en vases de végétation et en chambre climatique. La photopériode est de 16 h/jour et 8 h/nuit, la température est de 24 °C/jour et 16 °C/nuit et l'humidité est de 70 %.

Un essai témoin est systématiquement réalisé sur un sol agricole.

### 2.1.2 Valeurs "guides"

La suite de la procédure d'essai d'orientation est conditionnée par les résultats obtenus à l'issue des essais de germination et de croissance végétale. En effet, le niveau de fertilité des sols, après correction éventuelle, doit permettre la croissance des végétaux dans des conditions non significativement différentes des conditions de croissance des mêmes espèces modèles sur un sol agricole.

Dans le cas où le sol, après correction éventuelle, peut être considéré comme apte à être le support d'un couvert végétal, la suite de la procédure consistera à décider de la stratégie de traitement à adopter entre la phytoextraction et la phytostabilisation.

Dans le cas contraire, une étape de diminution de la toxicité du sol par apport d'amendements ou restauration des équilibres nutritionnels, sera nécessaire pour permettre l'installation d'un couvert végétal et poursuivre la procédure d'orientation.

## 2.2. Orientation de la technique de traitement : extraction ou stabilisation

Les critères de choix entre la voie de la phytoextraction et celle de la phytostabilisation sont :

- la nature du ou des métaux présents : il existe ou non une ou des espèces végétales hyperaccumulatrices des métaux présents dans les sols
- le statut du métal dans le sol (disponibilité, mobilité) : des concentrations très élevées en métaux biodisponibles peuvent nécessiter une stabilisation
- l'urgence du traitement
- le devenir du site après traitement puisque les effets des deux techniques ne sont pas les mêmes sur les métaux du sol

La phytostabilisation et la phytoextraction disposent chacune d'un domaine d'application correspondant à des classes de sol elles-mêmes définies par la teneur du sol en métaux d'une part et la fraction biodisponible de ces métaux du sol.

La concentration en métal biodisponible peut être approchée par différentes méthodes :

- Extractions chimiques sélectives (nécessitant une adaptation de l'extractant au métal étudié) ;
- Méthode isotopique (essentiellement pour le cadmium, méthode non appliquée en routine) ;
- Batterie de biotests (cf. le programme ADEME "Ecotoxicité des sols et des déchets").

Des exemples de valeurs guides sont proposés pour le zinc et pour le cadmium dans les tableaux suivants.

MOBILITE Zn Zn extractible H <sub>2</sub> O	TENEUR TOTALE Zn		
	Faible < 600 mg kg <sup>-1</sup>	Moyenne 600 - 1400 mg kg <sup>-1</sup>	Élevée > 1400 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Faible</b> < 1 mg kg <sup>-1</sup>	Phytostabilisation pas de traitement	Phytoextraction élément mobile	Autre traitement Phytostabilisation Phytoextraction élément mobile
<b>Moyenne</b> > 1 mg kg <sup>-1</sup> < 6 mg kg <sup>-1</sup>	Phytostabilisation Phytoextraction Élément mobile Phytoextraction Élément total	Phytostabilisation Phytoextraction Élément mobile	Autre traitement Phytostabilisation Phytoextraction Élément mobile
<b>Élevée</b> > 6 mg kg <sup>-1</sup>	Phytoextraction élément mobile Phytoextraction élément total Phytostabilisation	Phytostabilisation Phytoextraction Élément mobile Phytoextraction Élément total	Phytoremédiation d'attente ou de finition d'un traitement physico-chimique Phytostabilisation Phytoextraction élément mobile

Tableau 2 : Domaines d'application de la phytoremédiation en fonction des teneurs en zinc

MOBILITE Cd Cd extractible H <sub>2</sub> O	TENEUR TOTALE Cd		
	faible < 2 mg kg <sup>-1</sup>	moyenne 2 - 8 mg kg <sup>-1</sup>	élevée > 8 mg kg <sup>-1</sup>
<b>faible</b> < 0,01 mg kg <sup>-1</sup>	Phytostabilisation pas de traitement	Phytoextraction élément mobile	Autre traitement Phytostabilisation Phytoextraction élément mobile
<b>moyenne</b> > 0,01 mg kg <sup>-1</sup> < 0,05 mg kg <sup>-1</sup>	Phytostabilisation Phytoextraction Élément mobile Phytoextraction Élément total	Phytostabilisation Phytoextraction Élément mobile	Autre traitement Phytostabilisation Phytoextraction Élément mobile
<b>élevée</b> > 0,05 mg kg <sup>-1</sup>	Phytoextraction élément mobile Phytoextraction élément total Phytostabilisation	Phytostabilisation Phytoextraction Élément mobile Phytoextraction Élément total	Phytoremédiation d'attente ou de finition d'un traitement physico-chimique Phytostabilisation Phytoextraction élément mobile

**Tableau 3 : Domaines d'application de la phytoremédiation en fonction des teneurs en cadmium**

La mobilité est une condition majeure du transfert des métaux du sol aux parties aériennes des plantes hyperaccumulatrices. Les plantes hyperaccumulatrices ont un besoin interne élevé de métaux et plus particulièrement de zinc pour *T. caerulea*. Dans les sols fortement contaminés, la mobilité des métaux serait assez élevée pour permettre leur absorption, leur translocation et leur accumulation dans les feuilles des hyperaccumulateurs

Les sols à teneurs moyennes à faibles de métaux constituent, cependant, la majorité des surfaces de sols contaminés. Ce sont par exemple des sols agricoles ayant reçu des apports de déchets et produits dérivés ou des sols agricoles situés en périphérie de sites industriels ayant reçu des retombées atmosphériques diffuses.

Le compartiment biodisponible ou assimilable des métaux présents dans ces sols est souvent faiblement pourvu. Une augmentation de la biodisponibilité des métaux est alors nécessaire si l'objectif de la phytoextraction est de réduire la teneur du métal total dans le sol. Cette mobilisation des métaux pourrait être acquise par l'apport de substances complexantes au sol.

Il faut alors envisager le risque de départ massif de métaux depuis le sol vers l'écosystème et l'homme via les eaux. Néanmoins, une augmentation de la mobilité des métaux peut être obtenue naturellement et être localisée au niveau de la rhizosphère des hyperaccumulateurs.

L'absence de fertilisation phosphatée favoriserait l'extraction du zinc et du cadmium en augmentant leur mobilité dans le sol. Les racines qui ont une forte vitesse d'élongation acidifient de façon intense la rhizosphère. En absence de zinc, les racines en croissance de l'hyperaccumulateur ont induit une diminution du pH rhizosphérique qui a pu se répercuter sur la mobilité des métaux et des éléments nutritifs. Dans des terres polluées par le zinc, le même mécanisme pourrait se produire mais un plus grand nombre de racines croissent et se divisent induisant une augmentation de l'acidification. Ainsi, plus le zinc est présent dans le sol, plus les racines seraient actives et acidifieraient la rhizosphère et plus le zinc serait mobilisé.

L'acidification semble moins intense sur l'ensemble du système racinaire sur sol industriel qu'au voisinage des apex des racines sur sol agricole. Ceci suggère que dans un sol homogène l'acidification serait répartie le long de la racine en raison d'une forte quantité de zinc disponible.

Des pH rhizosphériques plus élevés pourraient être interprétés comme une immobilisation de zinc potentiellement toxique par les racines alors que celles-ci le prélèvent à une vitesse élevée.

Lorsque l'acidification est surtout localisée aux extrémités racinaires, ce serait pour mobiliser d'autres éléments nutritifs des sols non contaminés en exsudant des protons qui seraient normalement exsudés tout le long de la racine jusqu'à l'apex parce que certains éléments nutritifs (par exemple P) sont peu mobiles dans les sols industriels. Ainsi la racine peut mobiliser le Phosphore sans provoquer une toxicité accrue du zinc.



## 2.3. Réponse aux traitements agronomiques

### *Essais en conditions optimisées*

Dans les cas de traitement par phytoextraction et phytostabilisation, les effets de la fertilisation azotée, phosphorée et soufrée sur la production de biomasse et, dans le cas de la phytoextraction, l'extraction des métaux par les végétaux sont observés. Les objectifs sont d'une part de déterminer la stratégie de fertilisation à mettre en œuvre pour atteindre la production de biomasse et, dans le cas de la phytoextraction, le rendement optimum d'extraction et d'autre part d'initier un bilan en termes de flux des métaux dans le système sol plante. Ce bilan sera complété lors des essais pilotes.

Quatre modalités d'apport d'azote ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), de phosphore ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) et de soufre ( $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ ) sont réalisées.

Les expérimentations ont lieu dans une chambre de culture avec une photopériode de 12 h jour/12 h nuit, une température de 24 °C jour/17 °C nuit et une humidité relative de 70 %. Les cultures sont réalisées dans des pots de section ronde et de volume égal à 500 mL. Chaque pot est constitué d'une couche drainante de gravier et de 300 g de sol sec. Les solutions nutritives sont apportées au sol de façon à atteindre 80 % de la capacité au champ. L'arrosage se fait ensuite quotidiennement à l'eau osmosée pour maintenir le taux d'humidité à 80 % de la capacité au champ.

Le dispositif expérimental correspond à une randomisation totale des pots. Au cours de la culture, l'évaluation de la croissance des végétaux se fait par relevé soit de la hauteur moyenne soit du nombre moyen de feuilles par pot et par individu. Après culture, les parties aériennes et racinaires sont récoltées. Les organes végétaux sont lavés à l'eau du robinet et rincés à l'eau osmosée avant d'être mis à sécher dans une étuve à 70°C durant 48 h. Les matières fraîche et sèche sont déterminées avant et après passage à l'étuve.

Dans le cas d'un traitement par phytoextraction, les végétaux sont broyés à l'aide d'un broyeur à mortier en agate afin d'éviter toute contamination. Une prise d'essai de 0,5 g de matière sèche est placée dans un tube à minéralisation et soumise à une attaque acide avec successivement 2 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 6 ml  $\text{HNO}_3$  et 6 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les minéralisations sont effectuées dans un bloc thermostaté. Le minéralisat est filtré sur filtre sans cendres et récupéré dans une fiole de 25 mL et ajusté avec une solution d'acide nitrique 0,1 M. Les analyses sont réalisées par ICP. Les sols sont séchés à l'air et conservés à l'abri de l'humidité avant détermination de la stabilité structurale et des concentrations en métaux.

Les résultats obtenus avec le sol étudié, exprimés en termes de biomasse sèche et, dans le cas de la phyto-extraction, de minéralomasses en métaux, sont comparés aux résultats obtenus dans les mêmes conditions d'essais sur un sol agricole. Les différences sont considérées significatives au seuil 5 %.

### *Exploration du milieu par les racines des végétaux*

Lorsque la plante s'est installée, elle doit pouvoir explorer le sol pour exploiter les éléments nutritifs et les métaux. Sur un site pollué, la colonisation du milieu doit dans un premier temps se faire horizontalement. Ainsi, en appliquant une densité de semis de 100 à 400 plantes par  $\text{m}^2$ , il est possible d'obtenir un couvert continu de plantes hyperaccumulatrices. Ceci a été observé en bacs lysimétriques avec *T. caerulescens* sur sol de cokerie, mais aussi in situ avec *T. caerulescens* sur sol agricole ayant reçu des épandages de boue urbaine, ou *Arabidopsis halleri* et *Armeria maritima* sur sol de fonderie de Zn.

Dans l'objectif de phytoextraction, la colonisation verticale du profil de sol par le système racinaire des végétaux est primordiale. Contrairement aux racines des plantes de grande culture non-tolérantes qui s'installent préférentiellement dans les zones non contaminées des sols et pénètrent de façon limitée les sols pollués par les métaux, les racines de l'hyperaccumulateur de zinc *T. caerulescens* explorent préférentiellement les zones polluées. Ce résultat obtenu en conditions contrôlées a été confirmé par des observations de terrain sur sol de cokerie et sur sol agricole ayant reçu des apports de boue. L'initiation et l'organisation des racines de *T. caerulescens* semblent être une réponse spécifique à la teneur et à la localisation du zinc dans le sol. Le principal facteur déterminant l'architecture racinaire de *T. caerulescens* semble être les métaux (zinc et cadmium) biodisponibles du sol. L'avantage d'une architecture racinaire dense pourrait alors être une meilleure résistance à la sécheresse par une augmentation du prélèvement d'eau grâce à l'accroissement du nombre d'apex racinaires.

Le développement racinaire est évalué par observation dans les essais en rhizotrons.

### *Extraction des métaux*

Un rendement est habituellement défini comme étant une production évaluée par rapport à une norme ou à une unité de mesure. Ainsi, le rendement des plantes de grande culture est défini par exemple comme étant la quantité de grain ou de matière sèche consommable produite par hectare.

Pour un hyperaccumulateur, le rendement est la quantité de métal extraite par hectare qui dépend directement de la production de biomasse (condition d'installation) et de la teneur des métaux dans les tissus végétaux (condition d'extraction). La courbe dose-réponse des plantes hyperaccumulatrices à des teneurs croissantes de métaux du sol est similaire à celle décrite pour des plantes non-hyperaccumulatrices à la seule différence qu'elle est décalée vers des valeurs très élevées de métaux dans le sol et dans la plante.

En absence de zinc biodisponible, *T. caerulescens* prélève le cadmium et le plomb en plus forte quantité. Il est possible qu'un mécanisme de compensation se mette en jeu. Dans des sols à contamination hétérogène, caractéristique de la majorité des sols urbains et industriels pollués, la majeure partie du système racinaire colonise les zones polluées alors que le reste du système racinaire se développe dans des zones moins polluées, assurant une augmentation du taux d'extraction des métaux. La diversité de la morphologie du système racinaire de *T. caerulescens* est une voie par laquelle cette espèce assure ses performances d'hyperaccumulation.

Le transfert des métaux vers la plante est différent d'un individu à l'autre provenant d'un même écotype et entre les individus des deux écotypes différents, probablement en raison d'une forte variabilité génétique. Cette variabilité doit présenter des individus particulièrement efficaces à sélectionner par le génie génétique ou plutôt par la sélection classique.

La teneur des métaux dans *Thlaspi* est étroitement dépendante de la fertilisation azotée avec, là aussi, une différence considérable de réponse entre les deux écotypes. Enfin, *Thlaspi-Viviez* accumule près de dix fois plus de Cd que *Thlaspi-Prayon* et l'augmentation du prélèvement du Cd avec les apports d'azote constitue un résultat essentiel dans une perspective de mise en œuvre de la phytoextraction.

L'absence de fertilisation phosphatée tend à favoriser le transfert des métaux du sol vers les parties aériennes de *T. caerulescens*. Il peut s'agir d'un effet indirect de l'action de la plante sur son milieu en particulier par le biais de l'exsudation de composés acides et/ou complexants du type des acides organiques par les racines qui favoriserait la mise en solution du phosphore, du zinc et du cadmium. L'addition de phosphore tend à réduire l'absorption des métaux. Il ne semble pas que l'insolubilisation des métaux sous la forme de phosphates métalliques soit à mettre en cause dans la mesure où, en absence de plante, la teneur du métal soluble dans l'eau est indépendante de la dose de phosphore apportée.

Quelle signification peut-on apporter à un effet de dilution des métaux dans la biomasse relativement faible chez *T. caerulescens* ? Ceci confirme en fait les très grands besoins de la plante vis-à-vis du zinc.

Pourquoi dans le cas de *Thlaspi Viviez* Cd est beaucoup plus accumulé que dans *Prayon* ? Il est possible que *Prayon* soit beaucoup plus sélectif vis-à-vis des éléments qu'il prélève que *Viviez*. Il faut rappeler que Cd et Zn empruntent les mêmes voies de transfert par transport actif dans les cellules racinaires. *Thlaspi Viviez* présenterait une physiologie de la nutrition minérale plus rudimentaire que *Prayon* autorisant la pénétration de cadmium au même titre que le zinc.

Une autre hypothèse peut être émise. *Thlaspi Prayon* et *Viviez* pourraient prélever la même quantité de cadmium. Cela pourrait s'interpréter en termes d'immobilisation du cadmium par *Prayon* dans les racines par le biais de phytochélatines induites par le cadmium qui permettent le stockage du cadmium dans les vacuoles. Ce mécanisme serait moins efficient chez *Thlaspi Viviez*, alors le cadmium pourrait être plus facilement transporté vers les parties aériennes. Une vérification serait possible en analysant les racines.

Ces phénomènes peuvent-ils avoir une signification en termes d'évolution ? Les types de *Thlaspi* ont des milieux d'origine différents de par la qualité des sols et les conditions climatiques. Le cadmium compléterait le zinc dans *Thlaspi Viviez* si on admet par exemple que l'hyperaccumulation est liée à la résistance à la sécheresse. En tout cas, il s'agit de mécanismes propres aux plantes et indépendants, semble-t-il, du sol et de la biodisponibilité du métal car les résultats ont été obtenus en comparant les plantes sur les mêmes milieux.

La question du rôle respectif de la production de biomasse et de la teneur des métaux dans les tissus des plantes hyperaccumulatrices dans l'efficacité de la phytoextraction est rémanente.

Pour répondre à cette question, il a été montré que dans les conditions choisies, l'efficacité des plantes hyperaccumulatrices pour extraire les métaux est toujours supérieure à celle des plantes non-hyperaccumulatrices même si ces dernières ont parfois des productions de biomasse jusqu'à 10 fois plus élevées. Les exportations de zinc par *T. caerulescens* sont d'autant plus importantes que les plantes sont de grande taille. Par conséquent, l'augmentation de la biomasse par le biais de techniques agronomiques appropriées, dont la possibilité a été montrée, est un objectif à atteindre. Il apparaît indispensable de privilégier à la fois l'hyperaccumulation des métaux et la production de biomasse. L'option qui consisterait à conduire des plantes non hyperaccumulatrices mais seulement accumulatrices en vue de la phytoextraction n'est pas pertinente.

En conditions favorables, le maïs ou *Brassica juncea* (moutarde indienne, préconisée pour la phytoextraction) peuvent atteindre un rendement de biomasse sèche de 20 t ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>. Dans le cas d'une contamination du sol à hauteur de 100 mg kg<sup>-1</sup> Zn et 1 mg kg<sup>-1</sup> Cd, les plantes de grande culture montrent des pertes de rendement significatives lorsque la teneur du Zn dans les parties aériennes est de 500 mg kg<sup>-1</sup>. Si une acidification d'un sol contaminé induit une augmentation du prélèvement de Zn, la phytotoxicité peut entraîner une perte de 50 % de rendement chez une plante de grande culture à forte production de biomasse. La matière sèche des plantes de grande culture contient 500 mg kg<sup>-1</sup> i.e. 500 g Zn t<sup>-1</sup>. Ces plantes n'extraient alors que 5 kg Zn ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>.

*T. caerulescens* a un faible rendement de biomasse aérienne en comparaison avec les plantes citées plus haut. Cependant, elle peut hypertolerer jusqu'à 25 000 mg kg<sup>-1</sup> Zn ce qui représente 25 kg t<sup>-1</sup> MS sans perte de rendement. Même avec un rendement faible de 5 t ha<sup>-1</sup>, la quantité de zinc extraite serait de 125 kg ha<sup>-1</sup>. On peut là aussi conclure que la capacité à hypertolerer et à hyperaccumuler les métaux qui doivent être extraits par phytoremédiation est plus importante que la forte production de biomasse. C'est pourquoi il faut insister sur l'importance de la domestication des plantes hyperaccumulatrices de métaux et de la sélection de cultivars efficaces.

Les recherches menées jusqu'à ce jour ont montré que pour une phytoextraction efficace, chaque élément métallique doit être considéré individuellement en raison de ses caractéristiques particulières dans le sol et dans la physiologie de la plante. Dans le cas de *T.caerulescens* originaire de Viviez, nous avons montré qu'une même espèce d'un écotype particulier peut être efficace pour la phytoextraction de deux métaux, cadmium et zinc. Dans le cas de multipollutions métalliques, une culture associée de métalophytes n'a pas le même rendement d'extraction des métaux qu'autant de monocultures successives qu'il y a de plantes associées. Il semble qu'il y ait une interaction entre le développement de la plante, la teneur du métal dans la plante et la teneur du métal dans le sol. Il existerait une teneur de métal biodisponible dans le sol qui favoriserait la phytoextraction. Cette teneur permettrait d'atteindre un compromis entre le prélèvement par la plante et la phytotoxicité du métal ou entre la teneur du métal dans les tissus et la quantité de biomasse produite.

En résumé, les plantes hyperaccumulatrices germent et se développent sur des supports de cultures très différents. Leurs racines privilégient les zones du sol les plus chargées en métaux. Les prélèvements se font dans le compartiment mobile des métaux du sol. Le compartiment biodisponible des métaux du sol est alors très fortement réduit après une culture d'hyperaccumulateur. Ces principaux résultats montrent que l'hyperaccumulateur *T.caerulescens* est, par exemple, une espèce végétale qui remplit les conditions de la phytoextraction définies.

## 2.4. Valeurs "guides"

Pour que la procédure d'essais de traitement soit suivie des essais d'évaluation des performances de traitement par phytoextraction ou phytostabilisation :

- l'aptitude du sol à être le support d'un couvert végétal, après correction éventuelle de sa qualité agronomique, et à explorer les zones les plus contaminées du sol devra avoir été montrée,
- le choix entre une phytostabilisation et une phytoextraction devra pouvoir être justifié sur la base notamment de la teneur du sol en métaux et de la fraction biodisponible de ces métaux du sol,
- la réponse du sol aux traitements agronomiques en termes d'extraction et de biodisponibilité des métaux devra être compatible avec les objectifs de teneur résiduelle en métaux.

En particulier, la phytoextraction ou la phytostabilisation n'est pas applicable si un élément phytotoxique est présent (tel le cuivre par exemple). La phytoextraction n'est pas applicable si les métaux à extraire ne sont pas phytodisponibles.

## 3. Caractérisation en vue de l'évaluation des performances

Les performances de l'application d'un traitement par phytoextraction ou phytostabilisation doivent être jugées, en tenant compte des objectifs fixés, par comparaison des résultats d'analyses et essais obtenus sur le sol avant et après traitement.

## 4. Evaluation des performances

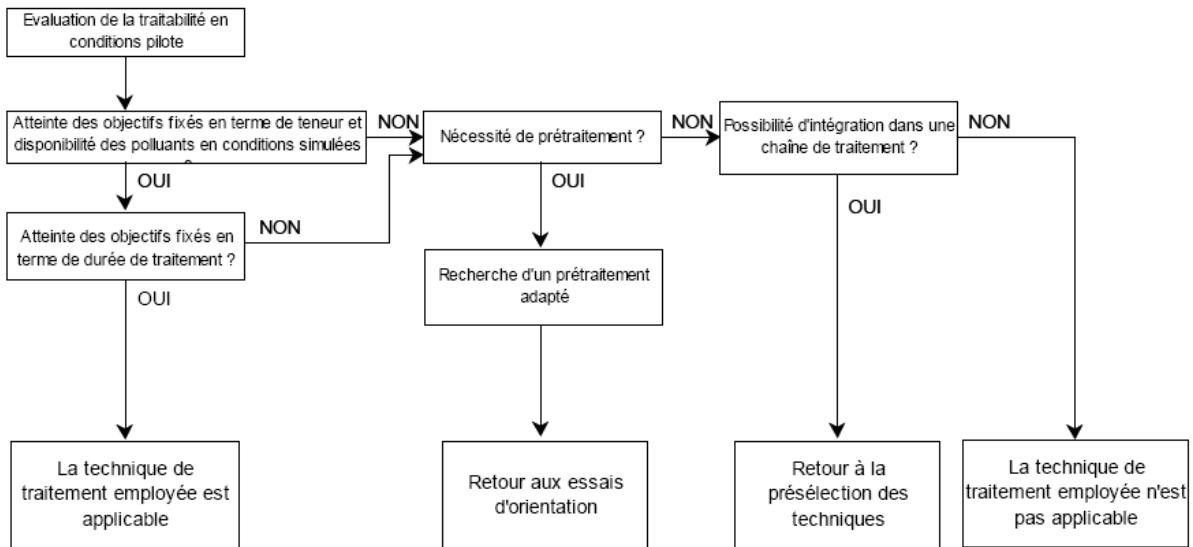


Figure 3 : Procédure d'essais d'évaluation des performances d'un traitement par phytoextraction ou phytostabilisation

La faisabilité du traitement par phytoextraction sera évaluée à ce niveau de la procédure d'essais selon l'atteinte, dans les conditions pilotes optimisées, des objectifs fixés en terme principalement de teneur en polluants et de durée de traitement. L'évaluation sera ensuite complétée en termes de disponibilité des polluants et d'écotoxicité directe et indirecte du sol traité.

Dans le cas d'un traitement par phytostabilisation, la faisabilité du traitement devra être évaluée principalement selon l'atteinte, dans les conditions pilotes optimisées, des objectifs fixés en termes de mobilité et de disponibilité des polluants.

Ces essais qui visent à évaluer les performances de la phytoextraction ou de la phytostabilisation doivent permettre de valider sa faisabilité technique à une échelle pilote, plus proche des conditions réelles de traitement.

### 4.1. Essais de mise en culture

#### Dispositif d'essai

Ces essais pilotes sont réalisés au moyen de dispositifs lysimétriques équipés qui permettent de quantifier les flux de métaux par transport particulaire, par lixiviation et par exportation par les végétaux. Ce type de dispositif est schématisé par la Figure 2.

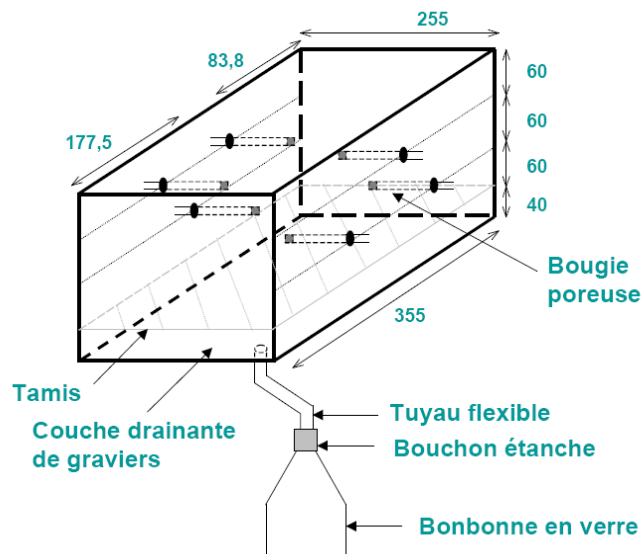


Figure 2 : Schéma d'un dispositif lysimétrique pour les essais pilotes de phytoremédiation

### **Suivi des essais**

Dans le système sol-plante, les éléments suivent un cycle avec une redistribution le long du profil de sol, une absorption par les racines et les parties aériennes, une redistribution dans la plante et une redéposition dans les différents horizons du profil de sol (résidus racinaires, litières, exsudats racinaires). Les travaux du Laboratoire Sols et Environnement (ENSAIA / INRA) ont montré qu'au cours de ce processus, une partie des métaux peut être solubilisée. Au cours de cultures successives, la plante prélèvera les métaux dans la fraction labile et, dans certaines conditions, dans la fraction non labile des métaux des sols, pouvant ainsi conduire à l'épuisement de la fraction biodisponible des métaux.

Les essais pilotes ont pour objectif de suivre l'évolution des différents compartiments en métaux dans le système sol-eau-plante au cours d'une culture de plantes hyperaccumulatrices ou hypertolérante.

Le dispositif lysimétrique utilisable pour différentes terres nous a permis de faire un bilan des flux de métaux dans le système sol-eau-plante et de définir l'efficacité de la phytoextraction des métaux ou l'effet de phytostabilisation. Chaque lysimètre reconstruit l'horizon de surface d'un sol. Il est équipé d'un système de récupération des eaux gravitaires, et de 6 bougies poreuses pour l'échantillonnage de solution du sol. Les lysimètres sont disposés en chambres de culture régulées (température, photopériode, humidité de l'air).

Pour répondre aux objectifs de bilan des flux de métaux, plusieurs paramètres sont suivis :

- l'évolution de la taille des compartiments isotopiquement échangeables du Cd est suivie grâce à des cinétiques d'échange isotopiques réalisées sur des échantillons de sol prélevés après trois mois de culture de plantes hyperaccumulatrices,
- l'évolution de la fraction biodisponible des métaux au cours du temps est suivie grâce à des prélèvements réguliers de solution du sol par des bougies poreuses. Les paramètres suivis sont : pH, Eh, concentrations en métaux dans la solution (Cd, Zn et Pb),
- parallèlement, des extractions sélectives sont réalisées sur des échantillons de terre : extractions CaCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (fraction biodisponible) ; approche cinétique de la spéciation des métaux selon deux classes (métaux labiles et métaux non labiles) par extraction EDTA
- les flux de métaux sont mesurés dans différents compartiments du système sol-eau-plante :
  - les parties aériennes des végétaux (transfert),
  - la solution du sol,
  - les eaux gravitaires (lessivage),
  - la phase solide du sol (métaux totaux et échangeables)

### **4.2. Valeurs "guides"**

À l'issue des essais pilotes, la traitabilité par phytoremédiation est évaluée par observation in situ de la densité du couvert végétal et de la production de biomasse ainsi que du développement racinaire.

L'applicabilité d'une phyto-extraction est évaluée sur la base de l'atteinte ou non de conditions d'extraction compatibles avec les objectifs fixés en termes de teneur résiduelle en polluants et de durée de traitement. L'évaluation sera ensuite complétée en termes de disponibilité des polluants et d'écotoxicité directe et indirecte du sol traité.

L'applicabilité d'une phytostabilisation est évaluée sur la base de l'atteinte ou non des objectifs de disponibilité des polluants dans les conditions d'essais pilote, compte tenu des objectifs fixés en termes de durée de traitement.

L'évaluation sera ensuite complétée en termes d'écotoxicité directe et indirecte du sol traité.

## 5. Synthèse des résultats

Les résultats de faisabilité de ces techniques sur la base des essais d'orientation et de l'évaluation des performances du traitement par phytoextraction ou phytostabilisation sont présentés selon le modèle de fiche ci-dessous.

<b>DESCRIPTION DE LA PROBLEMATIQUE RENCONTREE ET DE L'USAGE PREVU</b>	Typologie de pollution, caractéristiques du sol, du site, cibles à protéger, voies de transfert
<b>OBJECTIFS DE REHABILITATION RECHERCHES</b>	Réduction des risques sanitaires Réduction des risques environnementaux Réduction des nuisances et autres risques
<b>RESULTATS DES ESSAIS D'ORIENTATION</b>	<i>Passage à l'évaluation des performances</i> <i>Abandon de cette technique</i>
<b>RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES</b>	<i>Technique applicable</i> <i>Technique non applicable</i>
<b>COMPARAISON DES PERFORMANCES</b>  Teneur résiduelle / objectifs  Concentration disponible / objectifs  Ecotoxicité  Aptitude à un support végétal /objectifs  Durée de traitement / objectifs	
<b>EQUIPEMENT COMPLEMENTAIRE NECESSAIRE</b>  (gestion des effluents)	
<b>COMMENTAIRE</b>	