

## Cahier des charges :

# Caractérisation et essais en vue de l'application d'un traitement par bio-immobilisation

## 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.

<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>	<i>Mise en œuvre in situ : Mise en œuvre non prévue ;</i> <i>Mise en œuvre sur site ou hors site : selon la quantité de sol à traiter ;</i> <i>Accessibilité pendant plusieurs mois ;</i> <i>existence d'installations de traitement centralisées</i>
<b>Limites liées à la nature de la pollution</b>	<i>Technique adaptée au traitement de métaux facilement mobilisables</i> <i>Des précautions sont nécessaires pour le traitement de polluants susceptibles de générer la formation d'espèces gazeuses et/ou toxiques par bio-immobilisation</i> <i>Technique surtout prometteuse pour les pollutions au chrome hexavalent</i>
<b>Limites liées aux caractéristiques générales de la pollution</b>	-
<b>Limites liées aux caractéristiques du sol</b>	<i>Perméabilité à l'eau : supérieure à <math>10^{-7}</math> m/s</i>
<b>Limites liées à la concentration en polluant</b>	<i>Concentrations en métaux inhibitrices des métabolismes biologiques</i>
<b>Limites liées à d'autres paramètres spécifiques</b>	-

Tableau 1 : Rappel des caractéristiques à la base de la présélection des techniques de bioimmobilisation

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

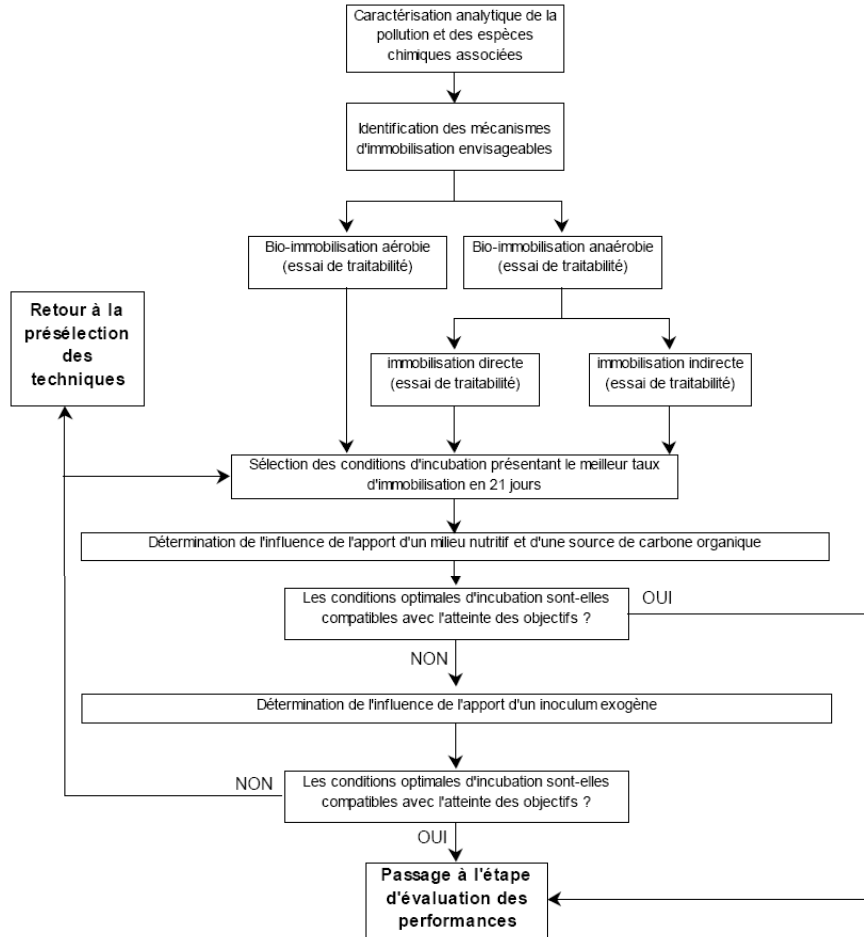


Figure 1 : Procédure d'essais d'orientation d'un traitement par bioimmobilisation

Les essais d'orientation effectués à l'échelle du laboratoire interviennent après les étapes de caractérisation préliminaire des sols et de présélection des techniques au cours desquelles ont été déterminées notamment la nature et la concentration des espèces polluantes ainsi que la perméabilité du sol à l'eau (paramètre limitant).

Ces essais consistent à déterminer les conditions optimales d'incubation en vue limiter la disponibilité du polluant (principalement du chrome hexavalent). La faisabilité du traitement par bio-immobilisation est alors évaluée en terme de disponibilité du polluant dans les conditions optimales d'incubation.

Les paramètres d'orientation étudiés ci-après ont été retenus d'après la bibliographie concernant la bioréduction du chrome (VI) en cultures pures. Les principaux paramètres identifiés sont les suivants :

- Conditions d'incubation anaérobies ou aérobies,
- Apport ou non d'un milieu nutritif avec ou sans source de carbone organique,

- Apport ou non d'un inoculum (exogène ou endogène) capable de réduire le chrome (VI).

La température n'a pas été retenue comme paramètre d'orientation. L'effet de la température sur les processus biologiques est un effet bien connu. Les vitesses des réactions biologiques sont approximativement doublées lorsque la température est augmentée de 10 °C dans certaines limites. Le choix de la température de mise en oeuvre du procédé relève donc d'un compromis entre l'accélération induite des processus biologiques et le bilan énergétique de l'installation industrielle considérée. Les essais de laboratoire ont été réalisés à la température optimale de croissance des bactéries aérobies hétérotrophes soit 30 °C.

#### 1.1. Choix des conditions d'incubation : aérobies ou anaérobies

La réduction biologique du chrome (VI) peut s'effectuer aussi bien en conditions aérobies qu'en conditions anaérobies suivant les micro-organismes concernés.

- Conditions anaérobies : On apporte aux micro-organismes sulfato-réducteurs (BSR) une source de carbone facilement assimilable (acétate, éthanol ou glucose) qu'ils oxydent en réduisant les ions sulfates. Ceux-ci peuvent provenir du sol testé ou être apportés sous forme de sulfate de sodium. Les ions sulfures produits doivent conduire à la précipitation du chrome sous la forme de sulfures de chrome ou à la réduction du chrome suivie de sa précipitation.
- Conditions aérobies : La mise en oeuvre de la bio-immobilisation est plus facile en pratique. On teste sa faisabilité en apportant une source de carbone facilement assimilable telle que le glucose que les micro-organismes oxydent en réduisant les ions chromates.

Ces deux conditions d'incubation sont testées comme paramètre d'orientation afin d'évaluer la faisabilité de la technique de traitement en conditions aérobies ou anaérobies.

##### 1.1.1. Conditions anaérobies

Les essais suivants sont réalisés en triplicatas sans inoculum exogène :

- Essai témoin avec agent biocide biostatique ( $\text{NaN}_3$ , 20 mg pour 10 g de sol sec),
- Essai sans source de carbone organique,
- Essai + éthanol (20 mL.L<sup>-1</sup> soit 8,2 g.L<sup>-1</sup> de carbone organique),
- Essai + glucose (10 g.L<sup>-1</sup> soit 4 g.L<sup>-1</sup> de carbone organique).

Les analyses des sulfates dans la phase liquide de la suspension de sol par dosage néphélométrique (méthode NF T 90-040 au chlorure de Baryum) ou toute autre méthode équivalente doivent permettre de vérifier la nécessité d'apporter une source complémentaire de sulfates.

##### 1.1.1.1. Mise en culture

Un volume de 200 mL de milieu de culture M63 (sans Chrome (VI)) est placé dans des flacons à Sérum de 500 mL, col large, en présence de 10 % de sol soit 20 g de sol sec. Après ajout de l'échantillon de sol et du milieu liquide, les flacons sont purgés par barbotage à l'azote, pendant au minimum 10 minutes avant leur fermeture, pour chasser l'oxygène dissous dans la phase liquide et l'oxygène présent dans le compartiment gazeux.

#### 1.1.1.2. Conditions d'incubation

- Température :  $30 \pm 2$  °C,
- Obscurité,
- Agitation orbitale : 120 rotations par minute (rpm),
- Durée d'incubation : 21 jours,
- Nombre de répétitions : 3,
- Rapport Liquide/solide V/m de 10 (soit 20 g de sol sec dans 200 mL de milieu liquide),

#### 1.1.2. Conditions aérobies :

Les essais suivants sont réalisés sans inoculum exogène :

- Essai témoin avec agent biocide biostatique (NaN<sub>3</sub>, 20 mg pour 10 g de sol sec),
- Essai sans source de carbone organique,
- Essai + glucose (10 g.L<sup>-1</sup> soit 333 mM).

Les analyses des sulfates dans la phase liquide de la suspension de sol par dosage néphélométrique (méthode NF T 90-040 au chlorure de Baryum) ou toute autre méthode équivalente doivent permettre de vérifier la nécessité d'apporter une source complémentaire de sulfates.

#### 1.1.2.1. Mise en culture

Un volume de 100 mL de milieu de culture M63 (sans Chrome VI) est placé dans un erlenmeyer de 250 mL, col large, en présence de 10 % de sol soit 10 g de sol sec.

#### 1.1.2.2. Conditions d'incubation

- Température :  $30 \pm 2$  °C,
- Obscurité,
- Agitation orbitale : 120 rotations par minute (rpm),
- Durée d'incubation : 21 jours,
- Nombre de répétitions : 3,
- Rapport Liquide/solide V/m de 10 (soit 10 g de sol sec dans 100 mL de milieu liquide),

L'atteinte des conditions optimales d'incubation est vérifiée par

- la mesure du pH, d'après la norme NF T 90-008. Les mesures de pH sont effectuées à l'aide de l'électrode de verre plongée directement dans la suspension de sol. L'étalonnage se fait avec deux solutions tampons à pH 7 et 4 car le pH des solutions étudiées reste dans le domaine acide. La méthode au papier pH est privilégiée dans certains essais pour éviter les contaminations bactériennes éventuelles entre témoins et essais et lorsque la solution est trop chargée en matières en suspension (notamment pour la mesure du pH d'une suspension contenant du sol). Le papier est mis en contact avec la solution. La couleur apparaissant alors est comparée avec l'échelle des couleurs fournie ;

- la mesure du potentiel d'oxydo-réduction de la solution au moyen d'une électrode combinée constituée d'une électrode de platine et d'une électrode de référence Ag/AgCl/KCl saturé. La chaîne de mesure est périodiquement vérifiée avec une solution étalon. Par convention, les résultats sont exprimés par rapport à l'électrode normale à hydrogène (mV/ENH).

### 1.1.2.3. Suivi de la concentration en chrome

Les résultats des essais sont suivis par l'analyse de la concentration en chrome en solution.

Pour déterminer le chrome total en solution, le chrome est converti en totalité en chrome hexavalent par oxydation avec de l'hypobromite de lithium en condition acide et en présence de pyrosulfate de potassium. On effectue ensuite le dosage du chrome (VI) avec du DPCZ (1,5- diphénylcarbazine). L'erreur relative est de l'ordre de 2 %. Le molybdène hexavalent et les sels de mercure peuvent interférer la mesure pour des concentrations supérieures à 0.2 mg.L<sup>-1</sup>. Le fer et le cuivre peuvent également interférer pour des concentrations supérieures à 1 mg.L<sup>-1</sup>.

### 1.2. Influence de l'apport d'un milieu nutritif et d'une source de carbone organique

Des essais préliminaires en cultures pures ont permis d'effectuer une présélection de sources de carbone organique facilement assimilables et permettant la bioréduction optimale du chrome (VI) en 21 jours d'incubation à 30 °C et à l'obscurité : le glucose et le glycérol. Dans la perspective de la mise au point du traitement, il est nécessaire de tester l'influence de la nature et de la concentration en source de carbone organique sur la bioréduction du chrome (VI) dans un échantillon de sol mis en suspension dans une solution nutritive. Bien que le sol soit naturellement riche en éléments nutritifs minéraux et en oligo-éléments, il est utile d'évaluer l'influence d'un apport supplémentaire en azote, phosphore, et oligo-éléments sur la bioréduction du chrome (VI). Pour cela, nous avons effectué des essais sans milieu nutritif (sol en suspension dans l'eau) ou avec le milieu nutritif M63 (rapport massique C/N/P 100/10,5/77,5). L'ensemble des essais réalisés sans inoculum exogène (uniquement microflore endogène) sont présentés dans la liste suivante :

- Essais témoins avec milieu nutritif M63 sans source de carbone organique (C.O.),
- Essais avec milieu nutritif M63 + glucose (10 g.L<sup>-1</sup> soit 4 g.L<sup>-1</sup> de C.O.),
- Essais avec milieu nutritif M63 + glycérol (3 g.L<sup>-1</sup> soit 1,17 g.L<sup>-1</sup> de C.O.),
- Essais avec H<sub>2</sub>O + glucose (10 g.L<sup>-1</sup>),
- Essais avec H<sub>2</sub>O + glycérol (3 g.L<sup>-1</sup>),
- Essais avec milieu nutritif M63 + glucose (0 ; 1 ; 10 et 100 g.L<sup>-1</sup> soit 0 ; 0,4 ; 4 et 40 g.L<sup>-1</sup> de CO), pour tester les paramètres suivants :
  - Influence de la nature de la source de carbone organique,
  - Influence de la concentration initiale en glucose,
  - Influence du milieu nutritif.

Les essais sont effectués en triplicatas sur des échantillons de sol mis en suspension dans le milieu nutritif (ratio Solide/Liquide S/L de 10 g de sol sec pour 100 mL milieu nutritif).

Les résultats des essais sont suivis par l'analyse de la concentration en chrome en solution.

### 1.3. Influence de l'apport d'un inoculum exogène

Aucun ensemencement de micro-organisme exogène n'est prévu pour les essais de bioimmobilisation par bioréduction du chrome (VI) en conditions anaérobies.

En revanche, l'application d'un traitement de bio-immobilisation du chrome (VI) par voie aérobie nécessite d'effectuer des essais permettant d'évaluer l'activité bio-réductrice endogène du sol étudié et l'influence de l'apport d'un inoculum bactérien exogène sur le taux et la vitesse de bioréduction du chrome (VI). Pour cela, deux souches bactériennes exogènes sont testées :

- *Pseudomonas fluorescens* LB 300, référence ATCC 27663, sélectionnée pour sa capacité à réduire le chrome (VI) en culture pure,
- *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 isolée au LAEPSI d'un sol pollué par du chrome (VI).

Une série d'essais peut également être effectuée avec une inoculation des suspensions de sol par un surnageant enrichi d'une microflore endogène provenant du même sol et ayant déjà réduit le chrome (VI) (microflore endogène enrichie).

Les essais réalisés peuvent être les suivants :

- Essais témoins sans apport d'inoculum,
- Essais avec la souche *Pseudomonas fluorescens* LB300,
- Essais avec la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 :
  - Enrichissement sous la forme de spores,
  - Enrichissement sous la forme mycélienne,
- Essais avec microflore endogène enrichie.

Les protocoles sont décrits ci-après pour :

- Les essais avec la souche *Pseudomonas fluorescens* LB300,
- Les essais avec la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 avec enrichissement sous la forme de spores:

Les essais sont effectués en triplicatas à la température d'incubation de 30°C, à l'obscurité, dans le milieu de culture M63 + glucose à 10 g.L<sup>-1</sup>. dans un ratio Solide/Liquide S/L de 10 g de sol sec pour 100 mL de milieu nutritif.

### 1.3.1. Conditions de culture des micro-organismes exogènes

La préparation des cultures des souches exogènes doit impérativement être effectuée dans des conditions parfaitement stériles. Les milieux de culture, la verrerie, le matériel sont stérilisés par autoclavage (120 °C pendant 20 minutes).

#### ***Pseudomonas fluorescens* LB300**

Revitalisation de la souche :

Il est nécessaire tout d'abord de revitaliser la souche fournie sous la forme lyophilisée par l'ATCC. La moitié du stock de cette souche est mise en milieu riche de type LB.

Milieu LB (LURIA BROTH) :  
 Bactotryptone 10 g,  
 Extrait de levure 5 g,  
 NaCl 5 g.

Ces ingrédients sont dissous dans 1 litre et le pH est à ajuster à 7 avec de la soude 0,1N.

Mise en culture :

Ensemencement d'un premier Erlenmeyer et incubation pendant 96 h minimum. Les milieux sont mis sous agitation orbitale (160 rpm) dans la chambre thermostatée à 30 °C et à l'obscurité complète.

Ensemencement de la souche dans un milieu de culture M63+Glc, contenant du chrome (VI) (voir paragraphe entretien de la souche).

Milieu M63 : pour 1 litre

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,6 g ;
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (solution à 20 %)	10,0 mL ;
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O (solution à 20 %)	1,0 mL ;
FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O (solution à 0,1 %)	1,0 mL ;
KOH (solution à 130 g/L)	8,3 mL ;
Thiamine (solution à 0.05 %)	1,0 mL ;
Source de carbone organique	10 g.L <sup>-1</sup> de glucose (4 g.L <sup>-1</sup> de CO) ; 3 g.L <sup>-1</sup> de glycérol (1,17 g.L <sup>-1</sup> de CO) ; 10 mL.L <sup>-1</sup> d'éthanol (4,1 g.L <sup>-1</sup> de CO).

Les solutions sont autoclavées séparément (20 minutes, 120 °C) puis mélangées stérilement.

Source de carbone :

La solution de source de carbone est également ajoutée après autoclavage car le glucose en présence des constituants du milieu donne une coloration brune. Lorsque le carbone organique est apporté sous forme de glycérol, celui-ci peut être ajouté au milieu avant autoclavage. Lorsque le carbone organique est apporté sous la forme d'éthanol liquide absolu, celui-ci est ajouté au milieu seulement après autoclavage.

Entretien de la souche

La souche est repiquée dans le même milieu M63 + Glc en présence de Chrome (VI) (50 mg/L soit environ 1 mM) avec 7 % volumique d'inoculum par rapport au volume de milieu nutritif. A répéter deux fois minimum (mêmes conditions de culture : 30 °C, à l'obscurité, 72-96 h, agitation orbitale 160 rpm). Les suspensions bactériennes sont alors soit stockées au réfrigérateur à 4 °C jusqu'au prochain repiquage, soit utilisées dans les différents essais.

Préparation de la culture avant ensemencement des essais en batch

Avant la mise en route des essais de bio-immobilisation aérobie, la souche est repiquée une nouvelle fois dans le milieu M63+Glc mais sans apport de chrome (VI). Cette suspension microbienne correspond à la solution-mère (SM) qui servira à inoculer les milieux

réactionnels des différents essais réalisés pour l'étude de la bio-immobilisation aérobie en présence d'un inoculum exogène de *Pseudomonas fluorescens* LB300.

### ***Streptomyces thermocarboxydus* NH50**

Milieu de sporulation R5 :

Ce milieu R5 solide est utilisé pour la sporulation de la souche. Les spores sont récupérées, filtrées sur coton, lavées puis suspendues à nouveau dans du glycérol 20% et pourront être facilement congelées. Ces échantillons congelés serviront à ensemercer les milieux de culture liquide.

#### Pour 1 litre de milieu R5 :

Sucrose	103,0 g ;
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (50 mM)	10,0 mL ;
Casaminoacides	0,1 g ;
Solution traces éléments	2,0 mL ;
Extrait de levure	5,0 g ;
TES Buffer	5,73 g ;
Agar	22,0 g ;
H <sub>2</sub> O qsp	1000 mL.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (solution à 0.5 %) *	5,0 mL ;
CaCl <sub>2</sub> (solution à 5 M) *	2 mL ;
Glucose (solution à 40 %) *	25 mL ;
L-Proline (solution à 20 %) *	7,5 mL ;
NaOH (solution à 1 M) *	3,5 mL.

\* Ces éléments sont à rajouter après autoclavage au milieu fondu.

Il est nécessaire de chauffer le milieu au bain-marie afin de solubiliser le sucre. Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes. On peut également ajouter au milieu R5 du chrome (VI) à une concentration allant jusqu'à 1 mM en chrome (VI).

Préparation du stock de spores :

A partir d'une boîte de Pétriensemencée et mise en culture pendant plusieurs jours jusqu'à sporulation des bactéries, déposer 10 mL d'eau stérile sur la boîte de Pétri. Gratter la surface avec la pipette. Verser la suspension dans un tube à essai stérile et vortexer 1 min. environ.

Filtrer la suspension sur du coton stérile dans une seringue stérile. Centrifuger le filtrat 10 min à 5000 rpm et suspendre à nouveau les spores dans 1 mL de glycérol 20 % ou dans 0,5 mL d'eau stérile pour une utilisation immédiate, ou bien compléter vol/vol de glycérol 40 % pour conserver la suspension au congélateur à -20 °C.

Dilution des spores :

Les spores de *Streptomyces* sont assez résistantes à la pression osmotique. Elles peuvent ainsi être diluées dans de l'eau stérile. Il a tout de même été choisi d'effectuer les dilutions dans une solution saline de NaCl (9/1000, sérum physiologique). Pour travailler avec précision, 0,5 ou 1,0 mL de suspension sont ajoutés respectivement à 4,5 ou 9,0 mL d'eau physiologique stérile respectivement pour effectuer des dilutions au 10ème.

#### 1.3.2. Conditions d'ensemencement



Selon les inocula testés, l'ensemencement sera réalisé selon les deux possibilités :

- 7 % en volume de souche mère de P fluorescens (soit 14 mL),
- 100 mL de solution concentrée en spores de S. thermocarboxydus (au final, 109 spores.L-1).

Les % sont rapportés au volume de milieu de culture.

### 1.3.3. Suivi de la concentration en chrome

Les résultats des essais sont suivis par l'analyse de la concentration en chrome en solution.

### 1.4. Valeurs "guide"

L'efficacité du traitement est évaluée sur la base de l'analyse du chrome (VI) en solution en fonction du temps sur 21 jours d'incubation. La décision de poursuivre la procédure par des essais d'évaluation des performances devra être justifiée par l'examen du profil cinétique de l'évolution de la concentration en solution et des niveaux de concentration atteints en solution dans les conditions optimales d'incubation, au regard des objectifs fixés en terme de disponibilité du chrome (VI) et de durée de traitement.

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

Les performances de l'application d'un traitement par stabilisation physico-chimique 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

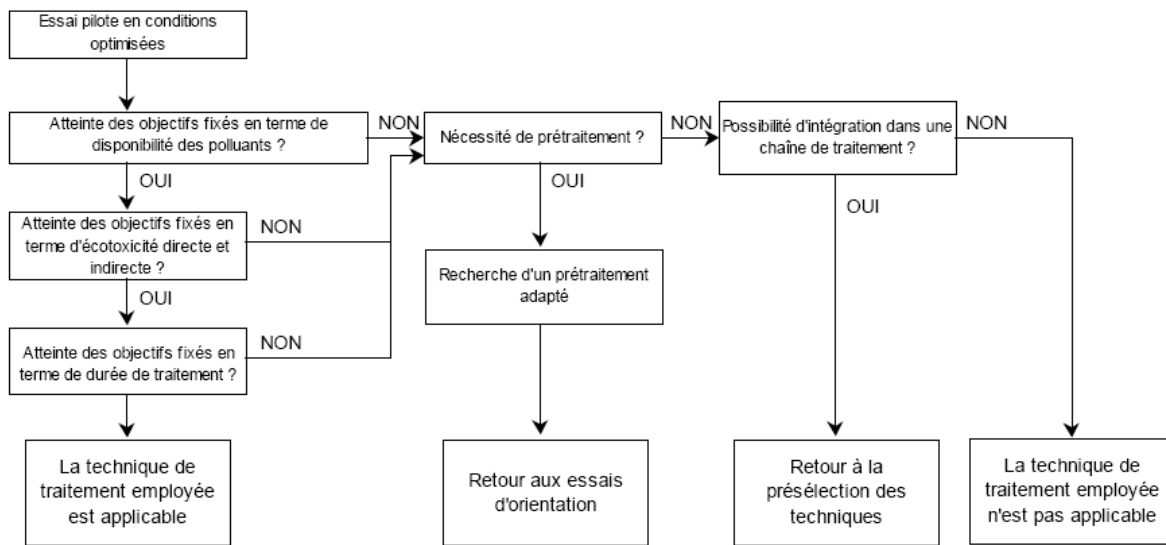


Figure 2 : Procédure d'essais d'évaluation des performances d'un traitement par bio-immobilisation

Les essais pilotes ont pour but de reproduire à l'échelle du laboratoire un procédé de traitement d'un sol pollué que l'on pourrait appliquer sur le site même ou hors site dans une configuration de type biotertre. Les pilotes de laboratoire utilisés permettent de travailler avec des quantités de sol de l'ordre de quelques kilogrammes.

Les essais pilotes présentés correspondent à une configuration « lysimètre » de bio-immobilisation du chrome (VI) en conditions aérobies.

### 3.1. Essais de bio-immobilisation

Les conditions optimales d'incubation définies dans le cadre de la phase d'orientation sont reproduites pour les essais d'évaluation des performances. En particulier, les apports de milieu nutritif avec ou sans source de carbone organique ainsi que d'inoculum exogène sont mis en oeuvre, lorsqu'ils ont été jugés nécessaires, dans les dispositifs pilote décrits ci-après.

#### 3.1.1. Présentation du pilote

Les lysimètres sont des casiers en PVC de 50 cm sur 30 cm, dans lesquels sont placés environ 3 kg de sol à traiter, de manière à obtenir une couche d'environ 5 cm. L'échantillon de sol est déposé sur un géotextile, évitant ainsi l'entraînement de petites particules de terre qui pourraient boucher les conduits ainsi que les pompes. Le casier est recouvert d'un dôme en PVC dans lequel s'effectue l'arrosage. Une circulation de trois litres d'eau ou de milieu nutritif se fait en boucle, aspergeant de façon homogène et par alternance le sol pollué par l'intermédiaire de réacteurs contenant les solutions (voir Figure suivante). Une agitation est maintenue dans les réacteurs lorsque les pompes sont arrêtées, de façon à ne pas réinjecter les dépôts de terre qui auraient pu passer le géotextile et qui pourraient endommager l'installation. L'aération du milieu se fait par cette agitation intense. Le débit des pompes est de 6 litres/heure. Les pompes fonctionnent  $\frac{1}{4}$  h toutes les deux heures sauf la nuit et les fins de semaines pour des raisons de sécurité. Les essais sont réalisés parallèlement dans trois lysimètres.

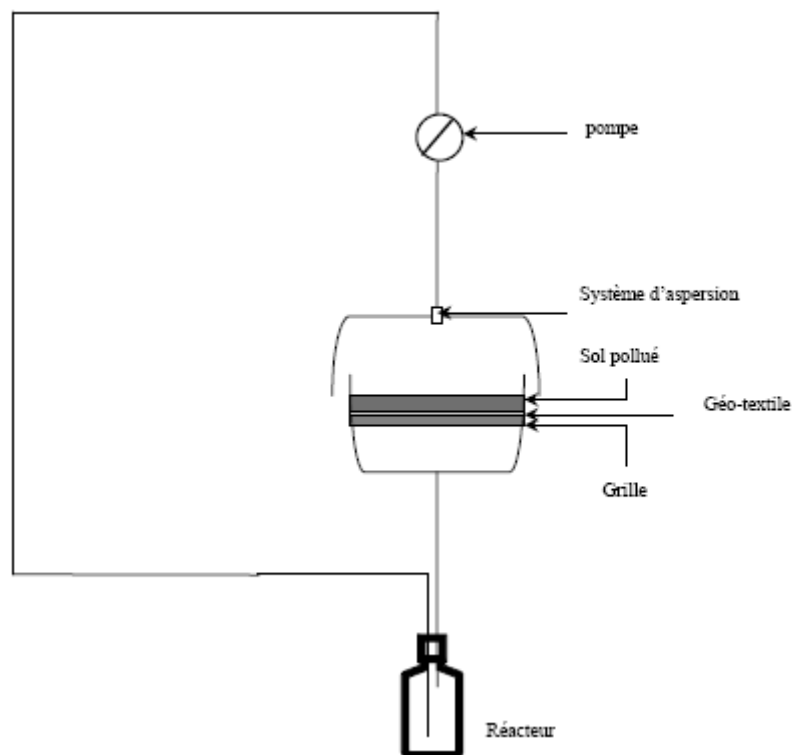


Figure 3 : Schéma d'un lysimètre pilote avec circulation fermée.

### 3.1.2. Déroulement des essais

Des lysimètres non ensemencés et pour lesquels le milieu nutritif est remplacé par de l'eau servent de témoins. Ils permettent d'évaluer le devenir du chrome (VI) sans apport d'une microflore exogène adaptée et en absence de milieu nutritif minéral et d'une source de carbone organique.

Pour les trois lysimètres d'essai avec optimisation de la réduction biologique, le milieu nutritif utilisé est le suivant :

Pour 3 litres :

- Sulfate d'ammonium 28,2 g,
- Phosphate de potassium 5,4 g,
- Sulfate de magnésium 6,0 g.

Ces ingrédients sont dissous dans 3 litres et le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage pendant 20 min à 120 °C.

La source de carbone organique, lorsqu'elle a été jugée nécessaire, est ajoutée seulement après la phase de stabilisation de la concentration en chrome (VI) dans la phase liquide (voir ci-après)

La procédure de mise en place des lysimètres est la suivante :

1- Remplissage des lysimètres avec les échantillons de sol (3 kg),

2- Stabilisation de la concentration en chrome (VI) en solution : en moyenne, trois jours suffisent pour obtenir la stabilisation de la concentration en chrome (VI) dans la solution circulant au travers de la couche de sol,

3- Ajout de la source de carbone et ensemencement (si ces opérations sont justifiées par les essais d'orientations) : après stabilisation de la concentration en chrome (VI) en solution, 300 g de glucose (ou 90 g de glycérol) sont ajoutés dans les réservoirs contenant la solution circulante. L'ensemencement de la couche de sol s'effectue par dépôt direct de 150 mL de milieu BL contenant la suspension microbienne de *Pseudomonas fluorescens* ou de *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 sous la forme de mycélium ou de spores sélectionnée par les essais d'orientation,

4- Circulation de la phase liquide (eau permutée (lysimètres témoins) ou milieu nutritif) par aspersion du liquide à la surface de la couche de sol. Le débit est de 12 L/h maintenu pendant ¼h toutes les deux heures pendant trois mois.

5- Suivi de la concentration en chrome (VI) : la réduction du chrome (VI) est évaluée par analyse du chrome (VI) en solution.

6- En fin de période d'incubation (3 mois), on effectue l'analyse du chrome total et du chrome (VI) en solution dans la phase circulante ainsi que dans le sol. La concentration en chrome (III) est déduite de la différence de concentration entre le chrome total et le chrome (VI).

### 3.1.3. Analyse du chrome en solution

L'analyse du chrome hexavalent en solution est réalisée par spectrométrie d'absorption moléculaire selon la norme NF T 90-043 en présence de DPCZ (1,5-diphénylcarbazine).

Pour déterminer le chrome total en solution, le chrome est converti en totalité en chrome hexavalent par oxydation avec de l'hypobromite de lithium en condition acide et en présence de pyrosulfate de potassium. On effectue ensuite le dosage du chrome (VI) avec du DPCZ (1,5-diphénylcarbazine) conformément à la norme NF T 90-043. L'erreur relative est de l'ordre de 2 %. Le molybdène hexavalent et les sels de mercure peuvent interférer la mesure pour des concentrations supérieures à 0.2 mg.L<sup>-1</sup>. Le fer et le cuivre peuvent également interférer pour des concentrations supérieures à 1 mg.L<sup>-1</sup>.

### 3.2. Valeurs "guide"

L'évaluation des performances du traitement par bio-lixiviation selon les conditions définies lors des essais d'orientation est faite par la comparaison des résultats d'analyse du chrome en solution à l'issue des 3 mois d'essais avec les objectifs de disponibilité du chrome.

## 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 stabilisation physico-chimiques 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>	