



Composante T3 - Élaboration de stratégies de gestion et de traitement des sédiments de dragage contaminés

**Produit T3.3.1 –
Rapport action pilote**

La coopération au cœur de la Méditerranée

ce programme est cofinancé par le Fonds européen de développement régional

Acronyme du Projet	GRRinPORT
Titre du projet	Gestion durable des déchets et effluents dans les ports
Convention n°	UniCa – Prot. N. 0082843 du 09/05/2018 – [Classif. III/19]
CUP	
Programme	INTERREG ITALIA-FRANCIA MARITTIMO 2014-2020
Axe prioritaire	2
Objectif spécifique	6C2
Date de début du projet	01.04.2018
Durée	36 mois+ 3 mois prolongation
N° de produit	T3.3.1
Nom du document	Rapports actions pilotes
Révision/ Approbation du (date)	26/06/2021
Composante	T3 - SVILUPPO DI STRATEGIE DI GESTIONE E TRATTAMENTO DEI SEDIMENTI DI DRAGAGGIO CONTAMINATI
Date de soumission du produit du projet approuvé	30/06/2021
Date de soumission effective	30/06/2021
Auteur principal	Isabella Pecorini
Institution	Università di Pisa
E-mail	isabella.pecorini@unipi.it
Abstract	Dans ce documents on résume les résultats des tests à l'échelle pilote sur le sédiments traités parmi le procedure de soil washing, electrokinesie et landfarming.
Mots Clés	soil washing, elettrocinesi, landfarming

Auteurs

Nom	Institution	Contact
Isabella Pecorini	UNIPi	isabella.pecorini@unipi.it
Renato Iannelli	UNIPi	renato.iannelli@unipi.it
Alessio Ceccarini	UNIPi	alessio.ceccarini@unipi.it
Simona Di Gregorio	UNIPi	simona.digregorio@unipi.it
Fabiano Pilato	ISPRA	fabiano.pilato@isprambiente.it
Simona Macchia	ISPRA	simona.macchia@isprambiente.it

Reviseur

Nom	Institution	Contact
Andrea La Camera	ISPRA	andrea.lacamera@isprambiente.it

1	Premisse.....	5
2	Aire Aménagée pour le traitement de sédiments de dragage contaminés.....	6
3	Description des essais de lavaège des sols et principaux résultats.....	6
4	Description des test pilotes d'électrocinétique et principaux résultats	6
4.1	Méthodes analytiques	6
4.2	Caractérisation SIN de Piombino	8
4.3	Spéciation des métaux dans le sédiment	10
4.3.1	Application de la procédure BCR.....	10
4.4	Set up expérimentation	15
4.4.1	Mode d'acquisition des données.....	19
4.5	Installation pilote EKR 20.....	20
4.6	Résultats et discussions.....	22
4.6.1	Caracterisation chimique de l'échantillon P 84.....	23
4.6.2	Essai pilote EKR	25
4.6.3	Elimination des contaminants à 95 jours.....	30
4.6.4	Contaminants inorganiques (95 jours).....	32
4.7	Conclusions.....	36
5	Description des tests d'épandage et principaux résultats	38
5.1	Introduction	38
5.2	Résultats	39
5.2.1	Cinétique de dégradation des hydrocarbures lourds (C > 12)	39
5.2.2	Surveillance du processus d'humification.....	42
5.2.3	Épuisement des contaminants organiques minoritaires	43
5.3	Analyse de la communauté bactérienne.....	44
5.3.1	Extraction d'ADN du sol pour analyser métagénomique.....	44
5.3.2	Metabarcoding et préparation de la librairie.....	45

5.3.3 Analyse métagénomique	61
5.4 Conclusions	62
6 Bibliographie.....	63
6.1 Réglementation	66

1 Premisse

Ce rapport contient la description des montages expérimentaux, les conditions opérationnelles adoptées et la discussion critique des résultats des essais à l'échelle pilote, grâce auxquels les implications pour le traitement à grande échelle seront évaluées.

Le groupe de travail a étudié trois types de traitement : *le lavage des sols, l'électrocinétique et l'épandage*.

2 Aire aménagée pour le traitement de sédiments de dragage contaminés

La zone équipée a été aménagée pour appliquer un schéma de traitement basé sur un procédé de lavage préalable et de séparation granulométrique suivi de l'application de l'électrocinétique et de l'épandage sur des fractions granulométriques spécifiques issues de la première phase de traitement. La zone constituera un outil/ressource très utile pour l'étude des schémas de traitement à appliquer, même selon des combinaisons différentes, aux sédiments produits par les futures activités de dragage.

Les aires de équipées sont physiquement situées sur deux sites distincts :

- l'installation pilote de **lavage des sols** de Livourne, gérée par ISPRA
- les installations pilotes d'électrocinétique et **épandage** à Pise, gérées par l'UNIFI.

3 Description des essais de Lavage des sols et principaux résultats

Les preuves expérimentales sur le *lavage des sols* ont été rapportées dans les produits des activités précédentes ainsi qu'à l'Annexe A de ce document.

4 Description des tests pilotes d'électrocinétique et principaux résultats

La partie expérimentale à l'échelle pilote a été réalisée au Département d'Ingénierie de l'énergie, des Systèmes, du Territoire et des Construction, dans le cadre des activités déjà prévues d'essais en laboratoire sur les sédiments. Les analyses chimiques visant à déterminer l'efficacité du traitement ont été effectuées au laboratoire externe "Geochim di Rosi e C. s.a.s. - Gualdo Tadino (PG)". Les analyses chimiques détaillées avec des préparations particulières ont été réalisées au laboratoire DESTEC et biologie de l'UNIFI.

4.1 Méthodes analytiques

Une fois collectés, les échantillons doivent être analysés et caractérisés, conformément aux directives du Manuel. Au sein de ces derniers, il y a des paramètres à analyser, répartis selon leur nature physique, chimique et microbiologique, à condition également que des analyses écotoxicologiques soient menées en parallèle.

Tableau 1 Paramètres analytiques des sédiments des zones portuaires physiques, chimiques et microbiologiques

	Paramètre	Spécifiques
Analyses Physiques	Description macroscopique	Couleur, odeur, présence de concrétions, résidus d'origine naturelle ou anthropique
	Granulométrie	Fractions granulométriques à $1/2\Phi$ où $\Phi = \log 2$ (diamètre en mm / diamètre unitaire en mm)
	Minéralogie ⁽²⁾	Principales caractéristiques minéralogiques
	Composés organostanniques ⁽¹⁾	Résumé : Monobutil, Dibutil et Tributylétain
	Métaux	Al, As, Cd, Cr totale, Pb, Hg, Ni, Cu, V, Zn
	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (IPA)	IPA totaux : [Fluoranthène, naphthalène, anthracène, benzo (a) pyrène, benzo (b) fluoranthène, benzo (k) fluoranthène, benzo (g, h, i) pérylène, indopyrène, acénaphthène, fluorène, phénanthrène, pyrène, benzo (a) anthracène, Crisene, Dibenzo (a, h) anthracène, Indeno (1,2,3, cd) pyrène]
	Hydrocarbures Totaux	Peut-être distinct en C <12 et C > 12
	Pesticides organochlorés	Aldrine, Dieldrine, -hexachlorocyclohexane, β -hexachlorocyclohexane, γ -hexachlorocyclohexane (Lindane, DDD, DDT, DDE (pour chaque substance : somme des isomères 2,4 et 4,4), HCB, heptachlore, heptachlore époxyde, oxychlordane, cis -clodane, trans-chlordane, trans-nonachlore, cis-nonachlore, eldrine, mirex, méthoxychlore
	Biphényles polychlorés	Congénères : PCB 28, PCB 52, PCB 77, PCB 81, PCB 101, PCB 118, PCB 126, PCB 128, PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 169, PCB 180 et leur sommation)
	Chlorobenzènes	Hexachlorobenzène
Analyses chimiques	Carbone organique total ou matière organique totale	
	Azote total	
	Phosphore total	
Analyses Microbiologiques	Coliformes	<i>Escherichia coli</i>
	Enterocoques	Fécales
	Salmonelle	
	Clostridia	Spores de clostridies sulfito-réductrices

Staphylocoques

Mycètes⁽²⁾

- 1) Paramètre à rechercher sur 1/3 des échantillons, choisi de manière à avoir une répartition homogène par rapport au volume de matière à caractériser.
- 2) Paramètre à rechercher sur au moins 3 échantillons, choisis de manière à avoir une répartition homogène par rapport au volume de matière à caractériser, dans le cas de sédiments dont on demande l'utilisation pour le remblayage. Le nombre d'échantillons à considérer doit être plus élevé en cas de forte hétérogénéité géochimique des matériaux.

4.2 Caractérisation SIN de Piombino

Dans le cadre du projet GRRinPORT, la caractérisation des zones « Darsena Lucchini » et « Darsena dei Pescherecci » a été réalisée par l'ISPRA, à travers la collecte ciblée de petites quantités de sédiments de la couche superficielle marine (niveau 0-50 cm) en de l'ordre de 2 ou 3 kg en 10 points différents. Les opérations ont été effectuées par l'intermédiaire d'un véhicule nautique et d'un opérateur plongeur, le 22 mars 2019, suivant le schéma carré illustré à la fig. 25.

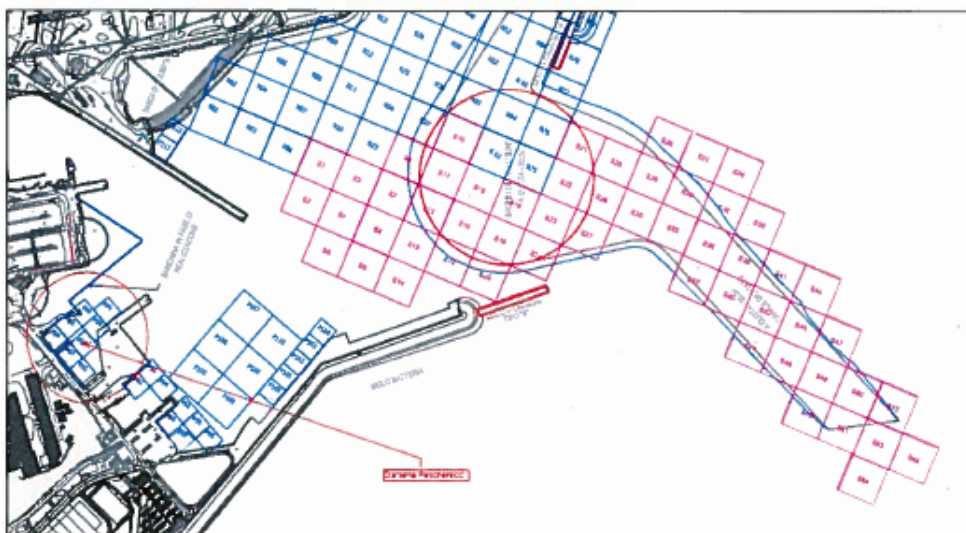


Figure 1 Schéma adopté pour l'échantillonnage dans le port de Piombino

La caractérisation du Darsena Pescherecci a été réalisée, comme prévu, selon les lignes directrices du Manuel.

Ci-dessous se trouvent la caractérisation granulométrique de la Darsena et la caractérisation des métaux lourds, cible de l'expérience réalisée et décrite dans cette thèse.

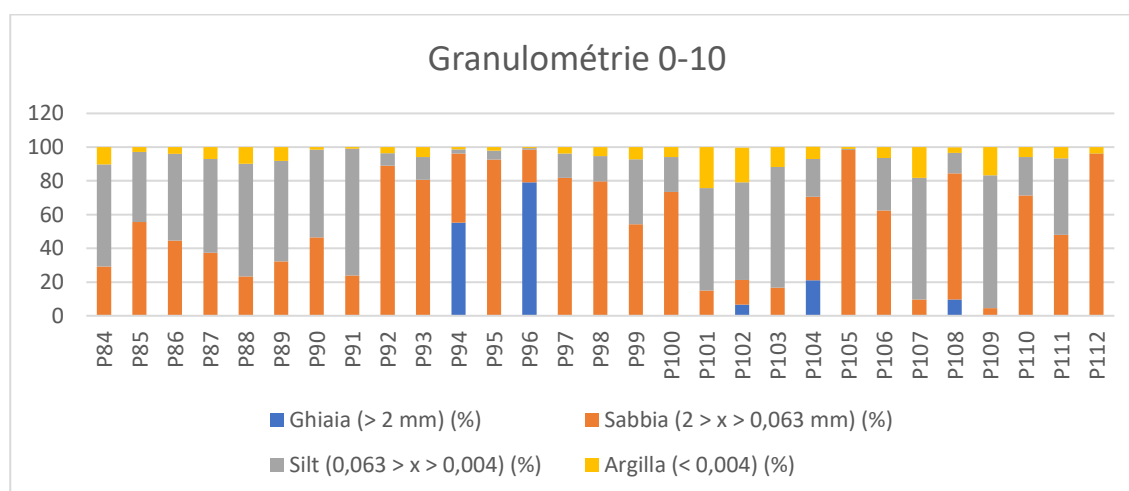


Figure 2 Granulométrie de surface (gravier, sable, silt, argile)

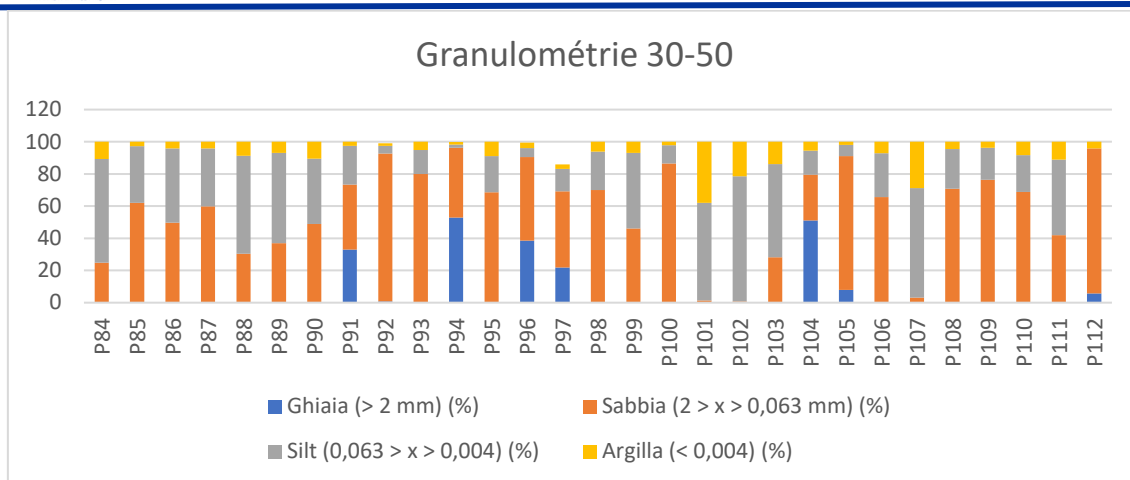


Figure 3 Granulométrie profonde

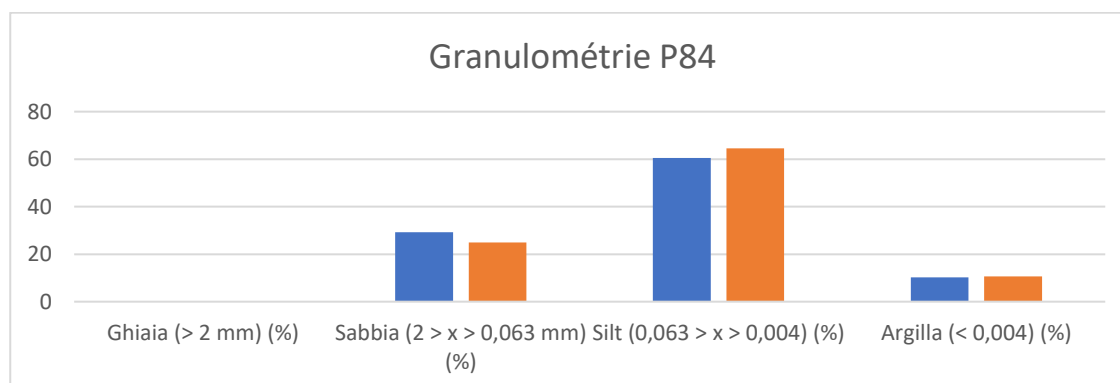


Figure 4 Granulométrie d'échantillon P84

4.3 Spéciation des métaux dans le sédiment

Les analyses généralement effectuées sur les sédiments se limitent à déterminer la concentration totale du métal ; cependant, les résultats issus de ces analyses ne fournissent pas d'informations utiles concernant la biodisponibilité des éléments potentiellement toxiques ; par conséquent, de nombreuses procédures d'extraction séquentielles ont été développées qui, basées sur l'application ultérieure d'extractants de force différente (solutions chimiques acides et basiques), permettent d'évaluer la quantité de métal présente dans diverses "fractions" de l'échantillon. L'utilisation d'extractants appliqués en séquence permet de dissoudre indépendamment et sélectivement les fractions de métaux liés aux différentes phases du solide (Gupta et al., 1996, [48]).

4.3.1 Application de la procédure BCR

Pour les sédiments étudiés, la procédure de spéciation émise par le Community Bureau of Reference (BCR) proposée par le Standard, Measurements and Testing Program (1987) a été appliquée. Cette procédure a été élaborée pour harmoniser les schémas d'extraction simples et séquentiels des sols et des sédiments.

A ce jour, la procédure BCR est la seule procédure standardisée pour laquelle il existe un matériau de référence certifié, qui permet de valider les performances analytiques. Cette procédure implique l'identification de trois phases, comme le montre le tableau 2 (Iannelli et al., 2015).

Tableau 2 Procédure d'extraction séquentielle BCR : extractants et phases extraites

Étape	Procédure d'extraction	Fraction
I	40 cm ³ de 0,11 mol dm ⁻³ CH ₃ COOH pour 1 g d'échantillon de sol sec a été agité une nuit sur agitateur mécanique à température de 25°C	Échangeable, soluble dans l'eau et l'acide
II	40 cm ³ de 0,1 mol dm ⁻³ NH ₂ OH.HCl (ajusté à pH=2 avec HNO ₃) a été ajouté au résidu et extrait pendant une nuit à 25°C	Espèces réductibles (Par exemple les complexes formés avec les hydroxydes de Fe-Mn)
III	10 cm ³ de 8,8 mol dm ⁻³ H ₂ O ₂ ont été ajoutés au résidu et digérés d'abord pendant 1 h à 25°C, puis pendant 1 h à 85°C au bain-marie avec un deuxième volume de peroxyde d'hydrogène. Ensuite la solution a été évaporé à quelques cm ³ . Après refroidissement, le résidu a été extrait une nuit avec 50 cm ³ de 1,0 mol dm ⁻³ CH ₃ COONH ₄ (ajusté à pH=2 avec HNO ₃), à une température de 25°C.	Espèces oxydables (par exemple matière organique et sulfures)

La procédure d'extraction utilisée a été appliquée pour évaluer la concentration des métaux Pb, Ni, Zn, Cu, Cd et Cr, extraits à chaque étape et indirectement aussi leur mobilité et leur biodisponibilité dans les échantillons de sédiments du SIN du port de Piombino.

L'extraction a été réalisée dans les laboratoires de Biologie de l'Université de Pise, au siège du Jardin Botanique. Cinq échantillons ont été produits à des fins statistiques, pour chaque fraction extraite.

Des échantillons de solutions chimiques utilisées lors de la procédure d'extraction ont également été conditionnés, afin d'être analysés et comparés aux échantillons dans le spectromètre de masse à plasma présent dans le département d'Ingénierie industriel et co-détenu par DESTEC de l'Université de Pise (iCAP 7400 Duo ; Thermo Fisher Scientific). En particulier, nous avons analysé un échantillon d'acide acétique 0,11 M utilisé pour l'extraction de la fraction échangeable, un échantillon d'hydroxylamine 0,1 M hydroxylamine ajusté à pH 2 avec de l'acide nitrique HNO₃ pour la fraction

réductible et un échantillon d'acétate d'ammonium 1 M également ajusté à pH 2 avec de l'acide nitrique pour la fraction oxydable.

riducibile e un campione di Acetato d'Ammonio 1 M aggiustato anch'esso a pH 2 con acido nitrico per la frazione Ossidabile.



Figure 5 Spectromètre d'émission atomique présent à DESTEC UniPI

La détermination de la concentration en métaux lourds présents a été réalisée en spectrométrie d'émission atomique couplée par induction à plasma d'argon avec détecteur optique (ICP-OES) (Fig. 29). Une aliquote d'échantillon est envoyée, via une pompe péristaltique, au nébuliseur pneumatique concentrique ou de Meinhard, d'où l'aérosol formé va à la torche ICP. Ici l'échantillon est introduit dans le plasma où, à une température comprise entre 7000 et 10000°K, chaque élément atteint un niveau d'énergie supérieur à son état fondamental. Les électrons excités de l'atome retournent à l'état fondamental directement ou via des niveaux d'énergie intermédiaires ; dans ces étapes se produit l'émission d'énergie lumineuse qui génère un spectre d'émission à différentes longueurs d'onde (lignes ou raies). Chaque raie du spectre provient d'une transition électronique particulière entre deux niveaux d'énergie différents, et puisque chaque espèce atomique est caractérisée par une série d'états ou de niveaux d'énergie possibles, les atomes produisent leur propre spectre d'émission caractéristique. L'intensité d'une raie spectrale dépend à la fois de la probabilité de la transition et du nombre d'atomes capables de l'effectuer. Puisque le nombre d'atomes excités est comparable au nombre total d'atomes présents, il est possible d'établir une relation linéaire entre l'intensité du rayonnement électromagnétique émis et la quantité d'atomes présents dans l'analyte. Le détecteur optique, placé après la torche, permet l'identification des éléments à partir des longueurs d'onde émises et la quantification en mesurant l'intensité du signal ; la détermination quantitative des analytes s'effectue en comparant l'intensité des signaux obtenus sur l'échantillon, par rapport à des solutions d'étalonnage multiéléments à concentration connue.

Les résultats de l'extraction séquentielle des 3 échantillons de sol (P84) sont présentés dans les figures suivantes (fig. 31,32, 33). On peut observer que la fraction échangeable est faible pour tous

les métaux observés, elle ne dépasse 10% que dans les cas du Zn (40%), dans tous les échantillons à l'étude, et du Cd (25%) uniquement dans l'échantillon P87. La Fraction liée aux oxydes de Fe-Mn (hydr), les espèces chimiques dites réductibles, est significative pour le Pb (environ 10 %), le Zn (environ 30 %) et le Cd (35 %). La fraction liée à la matière organique et aux sulfites est particulièrement élevée pour le Pb (86 %), le Cu (58 %) et le Cr (64 %) ; il est constitué de complexes chimiques pouvant être oxydés en milieu acide. La fraction résiduelle est particulièrement élevée pour Ni (80 %), Cu (40 %) et Cr (33 %). Le fractionnement des métaux montre qu'à l'exception du nickel, la plupart des métaux sont présents dans la fraction mobile. Contrairement aux échantillons prélevés dans le port de Livourne, dans le précédent projet Life + Sekret LIFE12 ENV/IT/00044 (Iannelli et al., 2015), les sédiments sont en grande partie amovibles : par exemple le Zn dans le port de Livourne (fig. 30) semble être présent dans la fraction résiduelle non soumise à décontamination, contrairement au Zn présent dans le port de Piombino, qui est uniformément réparti dans les différentes fractions.

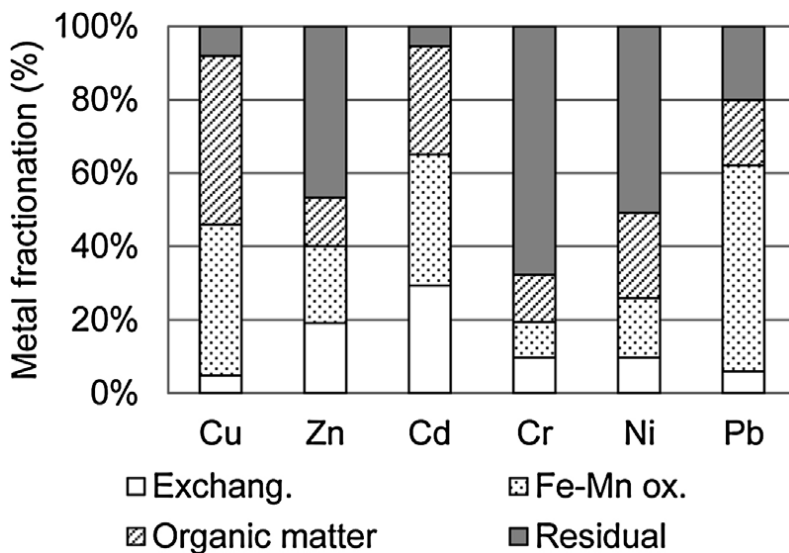


Figure 6 Frazionamento metalli pesanti Masi et al. [59]

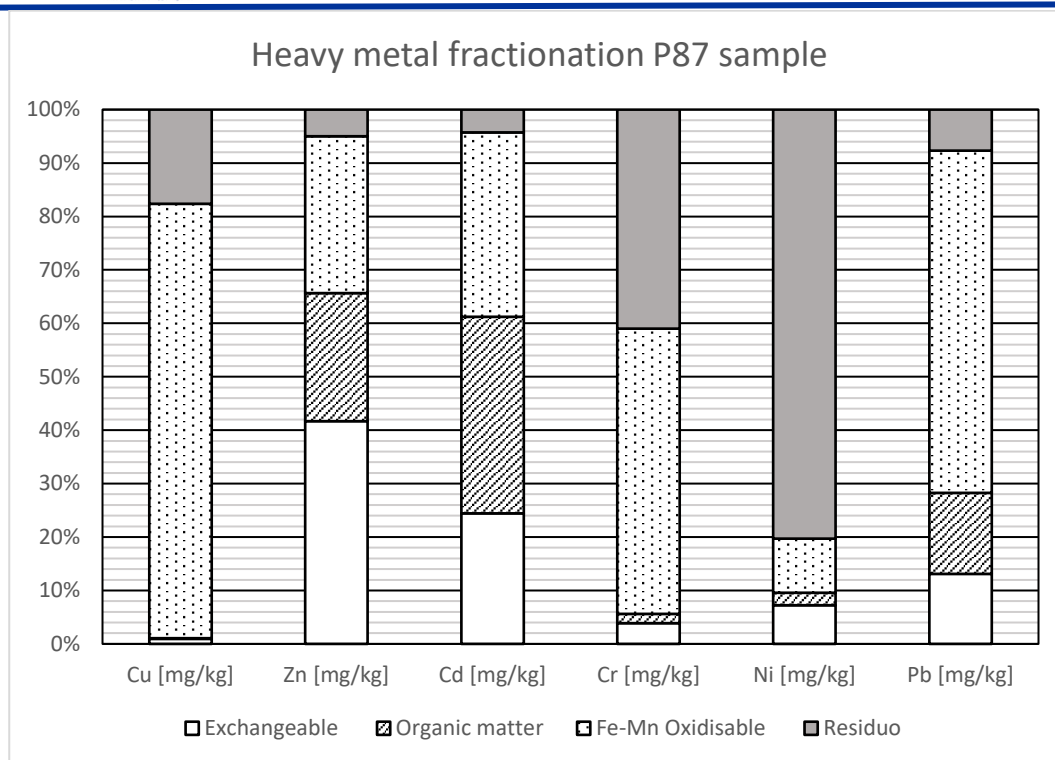


Figure 31 Fractionnement des métaux Échantillon P87

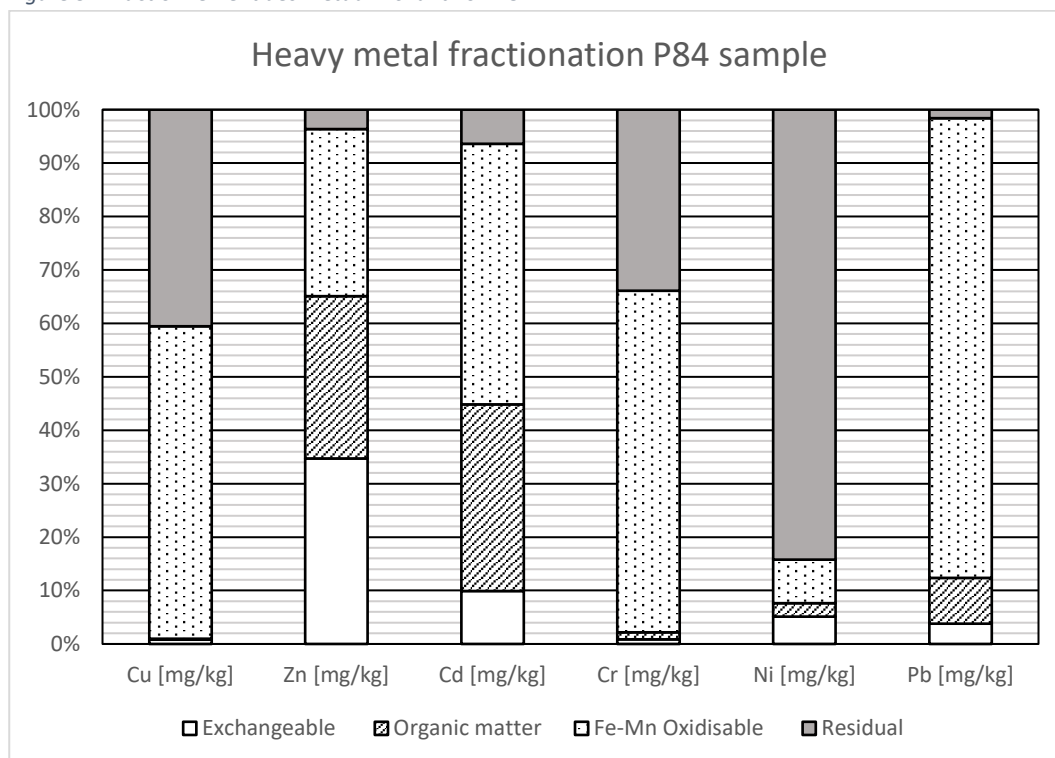


Figure 32 Fractionnement des métaux Échantillon P84

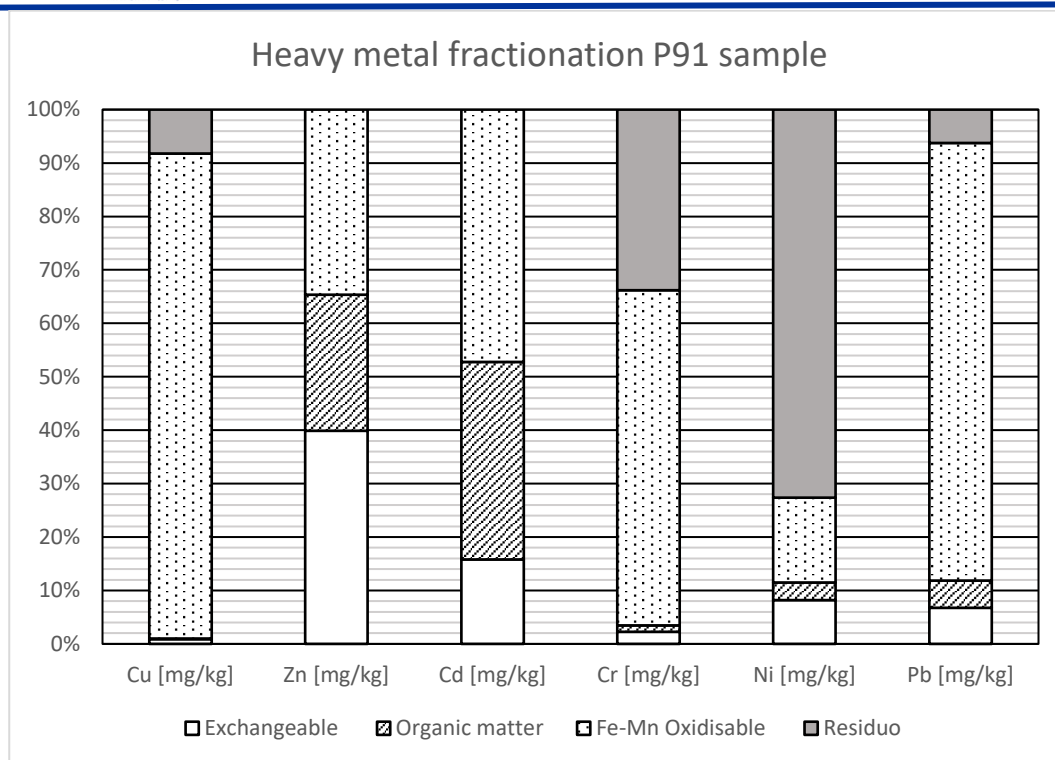


Figure 33 Fractionnement des métaux Échantillon P91

4.4. Set up experimentation

L'installation testée a été conçue et projetée pour accueillir le traitement d'une matrice solide telle que des sédiments marins d'un poids total d'environ 60 kg, soit l'équivalent d'un cylindre creux de 100 mm d'épaisseur et de 460 mm de hauteur. Les niveaux de la solution d'électrolyte ont été fixés à 430 mm du fond, environ 30 mm en dessous du niveau du sédiment, pour éviter qu'un écoulement hydraulique de l'électrolyte ne se produise à la surface de la matrice solide. Pour éviter le passage de matière et un écoulement brutal des solutions électrolytiques, la matrice solide a été isolée des cellules électrolytiques au moyen d'un grillage métallique couplé à un papier filtre ; le treillis métallique a pour but de soutenir structurellement le papier filtre. Le matériau filtrant a été placé à l'intérieur d'une chemise insérée entre le matériau contaminé et le compartiment externe d'anolyte, et entre la cellule électrolytique interne et les sédiments. La chemise est munie d'une boutonnière pour permettre son insertion correcte et facile autour du boîtier cylindrique. Il existe également des perforations en maille carrée à la fois sur la gaine et sur les deux composants à l'intérieur du cylindre creux : au total le pourcentage de perforation est égal à 50%. De plus, il y a quatre renforts, également perforés pour ne pas gêner l'écoulement de l'électrolyte dans la cellule externe. Ci-dessous, nous pouvons voir un modèle 3D du prototype (Fig. 34).

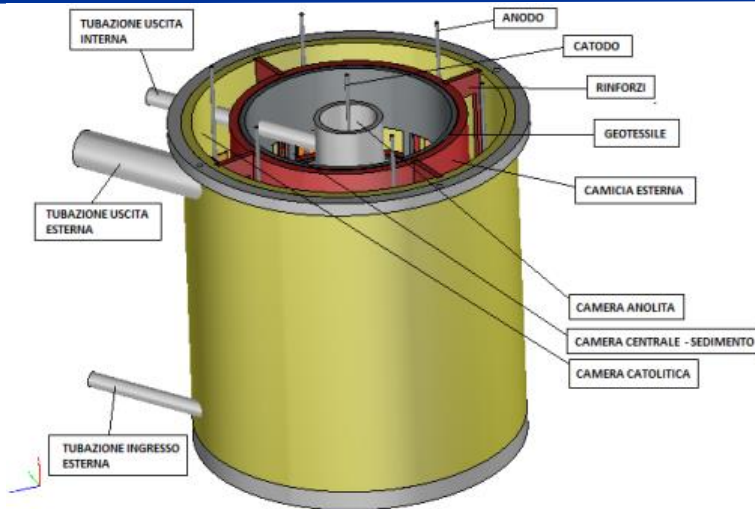


Figure 34 Modèle 3D de l'installation pilote et des composants individuels

Les niveaux de l'anolyte et du catholyte à l'intérieur des chambres respectives ont une surface libre et ils sont maintenus constants grâce à n. 2 tuyaux de trop-plein. Les tuyaux de trop-plein sont reliés à deux réservoirs externes. Pendant les 22 premiers jours de l'expérimentation, des cuves d'une capacité de 100 litres ont été utilisées mais se sont avérées limitatives pour l'application du traitement et ont donc été remplacées par la suite par des cuves d'une capacité de 200 litres.

La pompe utilisée pour recirculer le fluide de la chambre anolithique externe est une pompe à entraînement magnétique centrifuge horizontale monobloc à un étage avec aspiration axiale des fluides ; nous avons opté pour ce type de pompe car l'électrolyte avait un pH très acide, compris entre 1 et 2.

Le tuyau de refoulement a une entrée tangentielle au prototype et a un diamètre d'environ 19 mm (3/4"). La direction du flux tangentiel au prototype a pour but de déclencher un flux hydraulique hélicoïdal ascendant qui garantit une recirculation parfaite de l'électrolyte.

Le tuyau de sortie d'anolyte est placé à la limite supérieure du prototype et a un diamètre de 50 mm. Le débit de sortie et la vitesse d'écoulement sont les suivants : 11,6 l/min et 0,68 m/s.

La pompe choisie est fabriquée par "Savino Barbera s.r.l." qui produit des pompes chimiques en matières plastiques résistantes aux acides et sans pièces métalliques en contact avec des liquides, idéales pour la manipulation de liquides agressifs et de produits chimiques corrosifs en général. Le modèle BM04-PVDF a été utilisé, dont la fiche technique est présentée en Annexe (Annexe 1 BM04-PVDF). La pompe était très efficace et excellente pour pomper des liquides avec un pH fortement acide. L'entretien était nul pendant la période de traitement des sédiments de 95 jours.

La chambre centrale (catholyte) était initialement remplie d'eau du robinet grâce à une pompe péristaltique avec un débit fixe de 60 litres/heure (1 litre/minute), afin de permettre un bon échange d'eau à l'intérieur du service catholytique. La pompe est fabriquée par la société « SEKO » qui conçoit et fabrique des pompes doseuses et des systèmes de dosage pour les marchés du traitement de l'eau et des procédés industriels. Le modèle utilisé est le PSH avec fonctionnement On/Off et contre-pression maximale de travail égale à 0,1 bar. La fiche technique de la pompe est jointe (Annexe 2 PSH).

Le tuyau de trop-plein interne de la chambre centrale a un diamètre interne de 20 mm et une épaisseur de 3 mm. Les caractéristiques du flux électrolytique sont indiquées ci-dessous : 1 l/min et 0,026 m/s.

La pompe péristaltique a posé des problèmes, nécessitant beaucoup d'entretien. Pour remédier à ce problème, une pompe à entraînement magnétique supplémentaire du même type utilisée pour la chambre anolithique (BM04-PVDF) a été commandée, qui a été placée côte à côte avec le péristaltique.

Les électrodes utilisées sont constituées d'un treillis en titane recouvert d'un oxyde métallique mixte (MMO - Mixed Metal Oxide) (Fig. 35) plié à L dans le sens longitudinal, à la fois à l'anode et à la cathode, fourni par "Industrie De Nora Spa" ; le matériau choisi n'est pas attaqué en milieu acide et nous n'avons donc pas souffert de problèmes de corrosion d'électrode. Une tige d'acier est soudée à l'extrémité supérieure de l'électrode afin de permettre la connexion de l'électrode aux câbles d'alimentation.

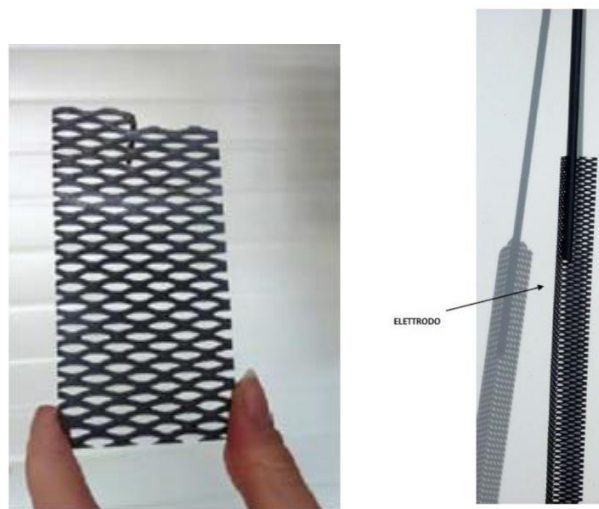


Figure 7 Électrode en titane

Les électrodes sont reliées à la plaque de plexiglas recouvrant le réacteur et disposées selon une configuration hexagonale (Fig. 36). La distance entre les électrodes de charge opposée et de même charge est de 200 mm. Le couvercle du réacteur est également pourvu de deux entrées pour loger les pH-mètres et les thermomètres des chambres électrolytiques respectives, l'entrée pour la tubulure provenant de la pompe péristaltique pour la recirculation de la chambre centrale, un trou pour l'entrée de la tubulure venant du doseur pompe de la solution de HNO₃, une entrée filetée de gaz 1/4", utilisée pour capter et acheminer le chlore gazeux formé lors du traitement de décontamination vers le laveur NaOH.

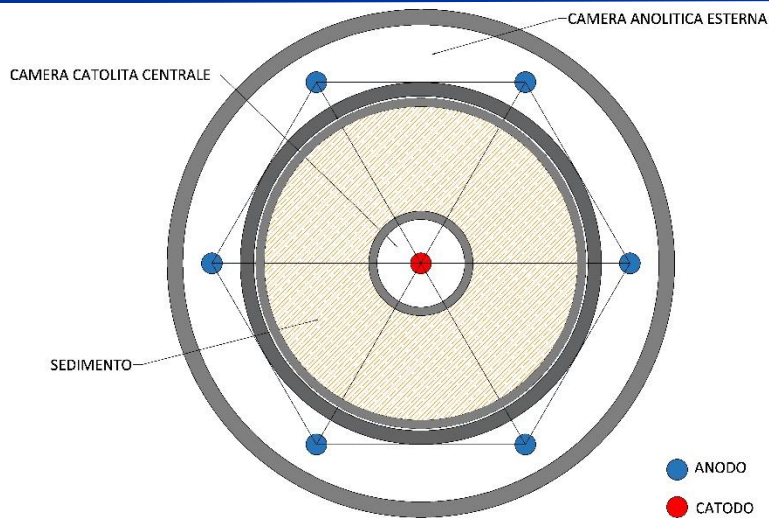


Figure 8 Configurations d'électrodes de l'usine pilote

Le dosage de l'acide nitrique à l'intérieur de la chambre centrale s'effectue grâce à une pompe péristaltique, qui dose 1,2 ml/s de solution acide, le temps d'activation de la pompe est de 30 s les 70 premiers jours puis de 45 s les 25 jours suivants avec un intervalle entre les mesures du pH à l'intérieur de la chambre catholytique égal à 120 sec. Le contrôle du pH est essentiel à la réussite de l'expérience, faute de quoi des formations précipitées se produisent qui peuvent obstruer le système de recirculation des électrolytes et diminuer la capacité potentielle de décontamination du système électrocinétique.

Ci-dessous, une image de l'implant électrocinétique dans son intégralité (Fig. 37).



Figure 9 Présentation de l'installation du projet pilote

Les électrodes sont connectées à une alimentation électrique, qui est à son tour connectée via un câble Ethernet à l'automate interne de la National Instruments. L'alimentation peut fonctionner en courant continu, donc en faisant varier la tension mais en gardant l'intensité du courant constante (cela ne peut arriver que si la conductivité des sédiments le permet), ou elle peut fonctionner dans des conditions variables dans lesquelles la tension et l'intensité du courant ne sont pas constants et varient pour atteindre la limite définie dans l'automate.

Un problème que nous avons rencontré avec le système de décontamination électrocinétique des sédiments marins est le rejet de chlore gazeux dans l'environnement, dû à l'électrolyse de l'eau salée présente dans les sédiments. Le chlore gazeux dans l'air crée un environnement acide/corrosif qui endommage l'instrumentation électronique et rend les opérations de maintenance normales dangereuses pour les opérateurs. Pour surmonter ces problèmes, l'installation pilote ainsi que les réservoirs et les pompes ont été placés dans une salle équipée d'un aspirateur. L'instrumentation électronique, quant à elle, était placée à l'extérieur de cette dernière salle pour protéger les parties électroniques et permettre les opérations normales de maintenance.

4.4.1 Mode d'acquisition des données

Les sondes pH/température sont produites par la société "Mettler-Toledo S.p.a." qui produit des capteurs qui sont utilisés dans les unités d'électrolyse d'installations importantes, le modèle utilisé est « NRPO4261 / SG / 225 ». Le transmetteur multi-paramètres utilisé pour acquérir les données a également été produit par la même société, le modèle est « M300 PROCESS2-CH, 1/4 DIN ». Les

capteurs pour mesurer le niveau de remplissage des réservoirs externes ont été produits par "SICK Italia", qui est l'un des principaux fabricants de capteurs et de systèmes d'automatisation, le modèle utilisé est "LFP0500-A4NMB". Les fiches techniques correspondantes sont présentées dans les pièces jointes.

Le logiciel de contrôle des paramètres du système et d'acquisition de données est au format Labview, et a été fourni et développé par "Florence Engineering S.r.l.", une société spécialisée dans l'ingénierie électronique.

Le logiciel suit les niveaux dans les deux réservoirs, le pH, la température, la tension et l'intensité du courant. Afin d'assurer la sécurité du système et la protection des équipements, des niveaux maximum et minimum que les réservoirs ne doivent pas dépasser ont été réglés. Lorsque ces niveaux sont dépassés, le logiciel arrête les pompes au préalable. De plus, la solution d'acide nitrique 4,5 M est dosée dans la chambre centrale en contrôlant le pH pour conditionner l'électrolyte et éviter la propagation du front basique au sein du sédiment. L'intensité de courant à atteindre est fixée en paramètre par le logiciel, la tension, quant à elle, varie en fonction de la variation de la résistivité de la terre.

4.5 Installation pilote EKR

Comme décrit au paragraphe précédent, la matrice à décontaminer est insérée dans la chambre centrale de l'installation pilote ; les sédiments doivent être homogénéisés pour une exécution correcte du test électrocinétique. Disposée la matrice dans la chambre centrale, elle est soumise à un compactage pendant les 70 premières heures. La pression de compactage idéale à atteindre doit être de 40 g/cm² telle qu'obtenue dans les expériences précédentes de Iannelli et al. (2015).

Au début de l'expérimentation, lors de la phase de test, les pompes ont été mises en marche et les chambres électrolytiques remplies d'eau du robinet et les vannes de débit présentes ont été réglées pour empêcher le passage du liquide au-dessus des sédiments. Une fois l'équilibre hydraulique du système atteint, un contrôle du pH a été effectué afin de calibrer les pH-mètres présents à l'intérieur des cellules d'électrolyse. Une fois calibrée, l'expérience pouvait commencer.

L'alimentation électrique (EA-PSI 9080-60 DT) a été allumée pour créer un champ électrique, une intensité de courant initiale de 5 A a été appliquée aux électrodes pendant les 49 premiers jours tandis que dans la période suivante, jusqu'au 70^e jour, l'intensité du courant a été augmentée à 10 A, mais en raison du manque de performance de la pompe péristaltique, qui a provoqué une mauvaise recirculation, le paramètre réglé n'a jamais été atteint. Dans la deuxième phase de l'expérience, suite à l'encadrement de la pompe péristaltique avec la pompe centrifuge à entraînement magnétique, il a été possible d'atteindre une intensité de courant de 10 A ; cette approche a cependant conduit à la fin de l'expérimentation à une surchauffe des sédiments et il a donc été préféré de baisser à nouveau l'intensité du courant à 5 A, car le réchauffement des sédiments aurait conduit à une baisse de l'humidité de la même et par conséquent à l'aggravation du processus de traitement. Les réservoirs d'électrolyte étaient initialement remplis d'eau du robinet afin de compenser les pertes dues à l'électrolyse et à l'évaporation. Pendant la période d'expérimentation, il a été nécessaire de vider le réservoir cathodique et d'ajouter de l'eau du robinet au réservoir anodique en raison du flux électro-osmotique et d'un flux hydraulique probable. La raison de la présence de ce dernier n'a pas encore été élucidée, elle pourrait être due à des défauts de construction de l'installation pilote ou à la période d'arrêt provoquée par la pandémie (environ 3 mois d'arrêt), ce qui aurait pu compromettre les caractéristiques de la matrice.

Pour assurer un pH stable de la solution cathodique, il a été nécessaire d'ajouter une solution d'acide nitrique 4,5 M en continu afin de contrôler le pH à une valeur de 3 ($\pm 0,1$). Le choix du HNO₃ comme

agent de conditionnement est dû au fait que c'est l'agent permettant une meilleure réduction du pH (3,5 près de l'anode, 6 - 6,5 dans les sections centrales) et une mobilisation complète des métaux lourds comme trouvé par Iannelli et al. dans les expériences précédentes. Kim et al. (2011) ont également obtenu l'effet d'abaissement du pH le plus élevé avec le HNO₃, mais, contrairement aux résultats obtenus par Masi et al. (2017), ils ont obtenu une meilleure élimination avec HCl. Les résultats de cette étude montrent que, malgré le pH initial élevé et une forte capacité de neutralisation des acides (ANC), la meilleure stratégie d'élimination était l'utilisation d'acides forts, et en particulier de HNO₃, éventuellement en relation avec la faible teneur en matière organique. Le dosage du pH est automatisé, car en l'absence d'interventions externes sur le catholyte, des conditions d'alcalinité claire se présenteraient.

Le matériel décrit dans les paragraphes précédents a été utilisé pour la première fois avec cette expérimentation, le sédiment traité dans cette expérimentation est du P84 prélevé sur le quai Pescherecci du port de Piombino, ce sédiment a été choisi car il a une courbe granulométrique très fine et donc adapté au traitement électrocinétique. L'instrumentation utilisée est résumée ci-dessous et un schéma du système est présenté.

Tableau 3 Instrumentation utilisée pendant l'expérience

Outil	Marque	Modèle
Pompe à entraînement magnétique	Savino Barbera s.r.l.	BM04 - PVDF
Pompe péristaltique	Seko	Pompe péristaltique "SE-PSH000HM1000"
Pompe à acide péristaltique	General Valve Corporation	Part. n° 18-75-901 VAC-20PSIO
pH-mètre	Mettler-Toledo S.p.A.	Sonde pH/température "NPRO4260I/SG/225"
Commutateurs de niveau	SICK Italia	Capteur de mesure de niveau "LFP1000-A4NMB"
Transmetteur de données	Mettler-Toledo S.p.A	Émetteur "M300 PROCESS 2-CH"

source de courant

Elektro-Automatik

EA-PSI 9080-60 DT 1500W

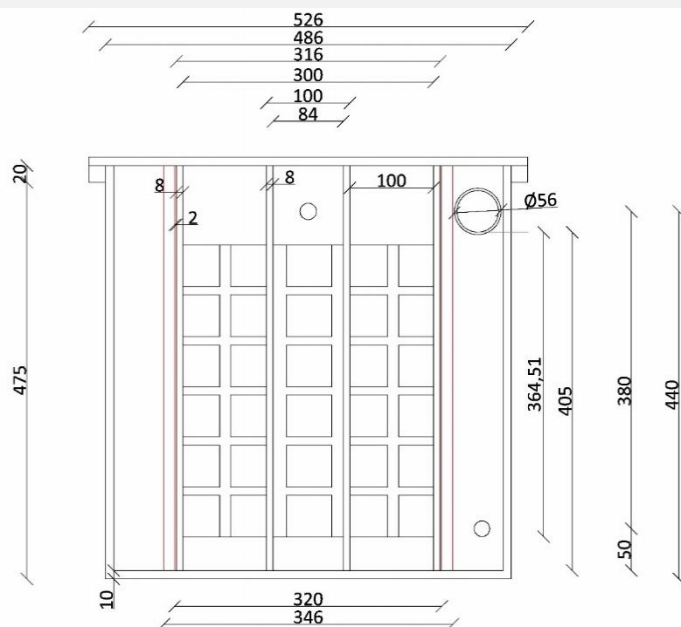


Figure 38 Section du schéma du système

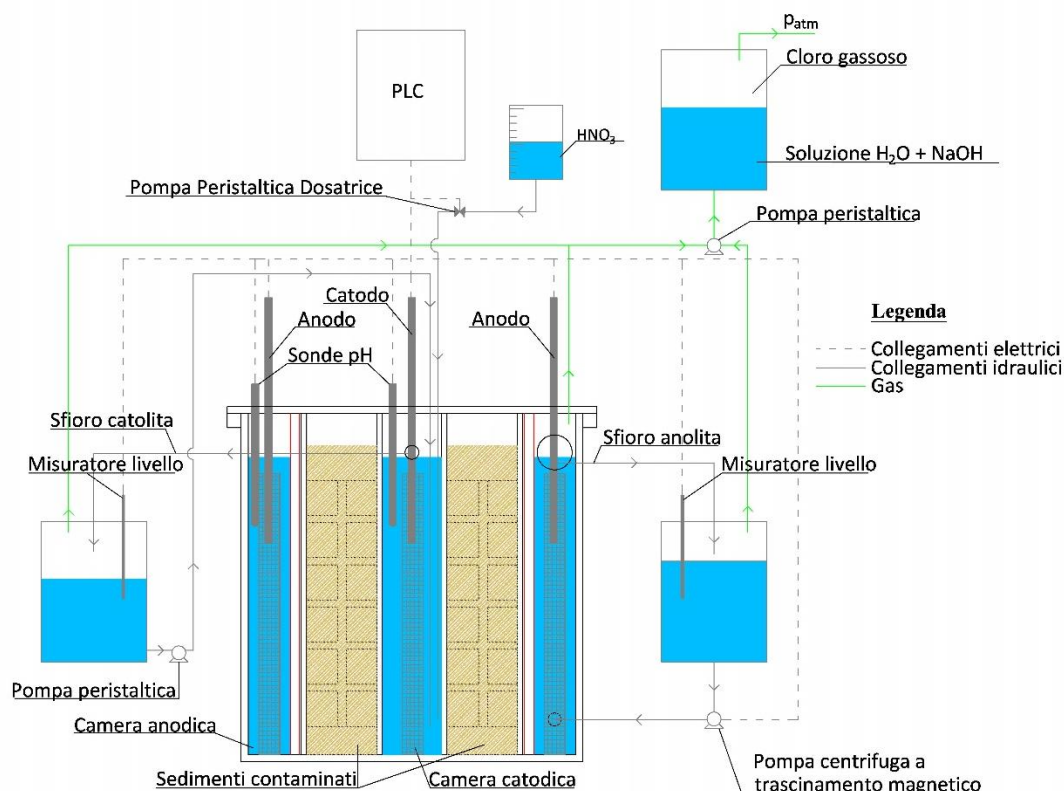


Figure 39 Schéma du système avec équipement correspondant

4.6 Résultats et discussions

4.6.1 Caractérisation chimique de l'échantillon P84

Des aliquotes ont été prélevées sur l'échantillon homogénéisé et envoyées à la société "Geochim s.a.s." afin de réaliser la caractérisation chimique (Tab. 4) de l'échantillon utilisé pour le test. Les résultats obtenus à partir de la caractérisation chimique des sédiments ont tout d'abord été comparés aux limites de la « Concentration seuil de Contamination » présentes dans les tableaux A et B, Annexe 5 partie V du décret législatif 152/2006.

Tableau 4 Concentration de contaminants dans la matrice de prétraitement, par rapport aux CSC

Paramètre	Unité de	Mesur	Incertitude	LDQ	CSC	CSC
		e	1		(Tab. A) ²	(Tab. B) ²
Antimoine	mg/kg s.s.	7,5	0,7	1	10	30
Arsenic	mg/kg s.s.	68,6	6,9	1	20	50

Béryllium	mg/kg s.s.	0,74	0,09	0,5	2	10
Cadmium	mg/kg s.s.	4,4	0,7	0,5	2	15
Cobalt	mg/kg s.s.	N.R.	-	1	20	250
Chrome total	mg/kg s.s.	169	36	0,2	150	800
Mercuré	mg/kg s.s.	N.R.	-	0,1	1	5
Nickel	mg/kg s.s.	91,7	10,8	1	120	500
Plomb	mg/kg s.s.	478	60	2	100	1000
Cuivre	mg/kg s.s.	180	23	2	120	600
sélénium	mg/kg s.s.	N.R.	-	1	3	15
Etain	mg/kg s.s.	230	23	1	1	350
thallium	mg/kg s.s.	N.R.	-	2	1	10
Vanadium	mg/kg s.s.	50,7	56,2	2	90	250
Zinc	mg/kg s.s.	2006	244	1	150	1500
Benzo (a) anthracène	mg/kg s.s.	7,1	1,1	0,01	0,5	10
Benzo (a) pyrène	mg/kg s.s.	6	1,0	0,01	0,1	10
Benzo (b) fluoranthène -s	mg/kg s.s.	9,1	1,5	0,01	0,5	10
Benzo (b) fluoranthène -s	mg/kg s.s.	2,7	0,4	0,01	0,5	10
Benzo (g,h,i) périlène -s	mg/kg s.s.	3,4	0,5	0,01	0,1	10
Crisène	mg/kg s.s.	0,05	0,01	0,01	5	50
Dibenzo (a,e) pirène	mg/kg s.s.	0,02	0,00	0,01	0,1	10
Dibenzo (a,l) pirène	mg/kg s.s.	< 0,01	-	0,01	0,1	10
Dibenzo (a,i) pirène	mg/kg s.s.	0,04	0,1	0,01	0,1	10
Dibenzo (a,h) pirène	mg/kg s.s.	< 0,01	-	0,01	0,1	10
Dibenzo (a,h) antracène	mg/kg s.s.	0,9	0,1	0,01	0,1	10
Indeno(1,2,3)pirène	mg/kg s.s.	1,4	0,2	0,01	0,1	5
Pirène	mg/kg s.s.	11,8	1,9	0,01	5	50
PCB totaux	mg/kg s.s.	0,84	0,15	0,001	0,06	5
Hydrocarbures C < 12	mg/kg s.s.	< 0,5	-	0,5	10	250
Hydrocarbures C ≥ 12	mg/kg s.s.	3882	621	3	50	750
Matière organique total	% m/m s.s.	8,6	1,4	0,15	-	-

(C x 1,724)

1) Si elle est exprimée, l'incertitude élargie est calculée en multipliant l'incertitude composée par le facteur de couverture $k = 2$ qui pour une distribution normale correspond à un niveau de confiance de 95%, le même est utilisé pour identifier les limites de confiance inférieure et supérieure.

2) Décret législatif 152/2006: concentration seuil de contamination dans le sol et le sous-sol se référant à l'usage spécifique prévu des sites à réhabiliter. Surlignée en jaune si la concentration de contaminants mesurée est supérieure au seuil fixé par l'arrêté.

Un nombre élevé de contaminants empêche, en raison de la concentration au-delà des limites, l'utilisation de la matrice pour les "Sites à usage vert public, privé et résidentiel", tandis que pour les "Sites à usage commercial et industriel" uniquement l'arsenic, le zinc et les hydrocarbures $C > 12$ empêchent son utilisation.

4.6.2 Essai pilote EKR

Les résultats de l'essai pilote de décontamination électrocinétique sont présentés ci-dessous.

Les résultats sont divisés selon les temps d'échantillonnage qui ont eu lieu à 70 et 95 jours de durée de test.

La tension et l'intensité du courant sont des valeurs quotidiennes moyennes des données acquises par l'automate, les données avec une intensité supérieure à 2,5 ampères ont été sélectionnées, de cette manière la valeur moyenne sur toute la période de fonctionnement de l'expérience est égale à 5 ampères. Les valeurs d'intensité inférieures à 2,5 ampères ont été jugées non pertinentes aux fins de l'expérience, car des données inférieures à cette valeur avaient été enregistrées pendant la période d'essai ou la courte maintenance de l'installation pilote.

La résistivité locale ne peut pas être estimée directement sans l'application d'électrodes de contrôle placées à l'intérieur de la matrice. Il a été possible d'estimer la résistivité moyenne de la masse, en négligeant l'erreur causée par la chute de tension des électrodes, grâce à la résolution de l'intégrale de résistance en coordonnées cylindriques :

$$R = \int_{r_1}^{r_2} \frac{\rho}{2\pi r h} dr = \frac{\rho}{2\pi h} \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right) [\Omega]$$

$$\rho = \frac{2\pi h}{\ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)} * \frac{\Delta V}{I} [\Omega m]$$

Où r_2 est le rayon de la chambre anodique, r_1 est le rayon de la chambre cathodique, h la hauteur des sédiments, ΔV [V] la différence de potentiel entre les deux électrodes et I [A] l'intensité du courant.

Au cours de l'essai, le volume de solution électrolytique stocké à l'intérieur des deux réservoirs a été mesuré (Fig. 42), ce qui a permis d'établir l'évolution du débit net entre les deux réservoirs avec construction de la courbe relative (Fig. 43). La formule avec laquelle le flux net a été obtenu est la suivante :

$$EOF = \frac{\Delta CAT - \Delta AN + V_{base} - V_{acid}}{2}$$

Où **ΔCAT** et **ΔAN** sont les différences quotidiennes entre les niveaux détectés dans le réservoir catholytique et anolithique respectivement, **V_{base}** est le volume de base des réservoirs au début de l'expérience, **V_{acid}** est le volume de la solution acide de conditionnement dosée quotidiennement pour empêcher le pH niveau d'être dépassé pH = 3 dans la chambre cathodique.

À la fin du 70e jour de test, une pompe centrifuge à entraînement magnétique a été ajoutée à la pompe péristaltique dans la chambre centrale. La nouvelle pompe a été calibrée avec une vanne papillon en sortie pour s'assurer que le débit de la chambre centrale ne déborde pas sur les sédiments. La puissance fournie par le bloc d'alimentation a été fixée à 50 W ; ce réglage ne permettait pas d'atteindre 10 ampères tant que cette limitation n'était pas surmontée. Par la suite, l'intensité du courant a été réduite à 5 Ampères, car comme mentionné précédemment, les sédiments avaient tendance à surchauffer et cet effet a dû être évité pour assurer le fonctionnement du procédé. Les graphiques finaux de traitement des données pour la période de 95 jours sont présentés.

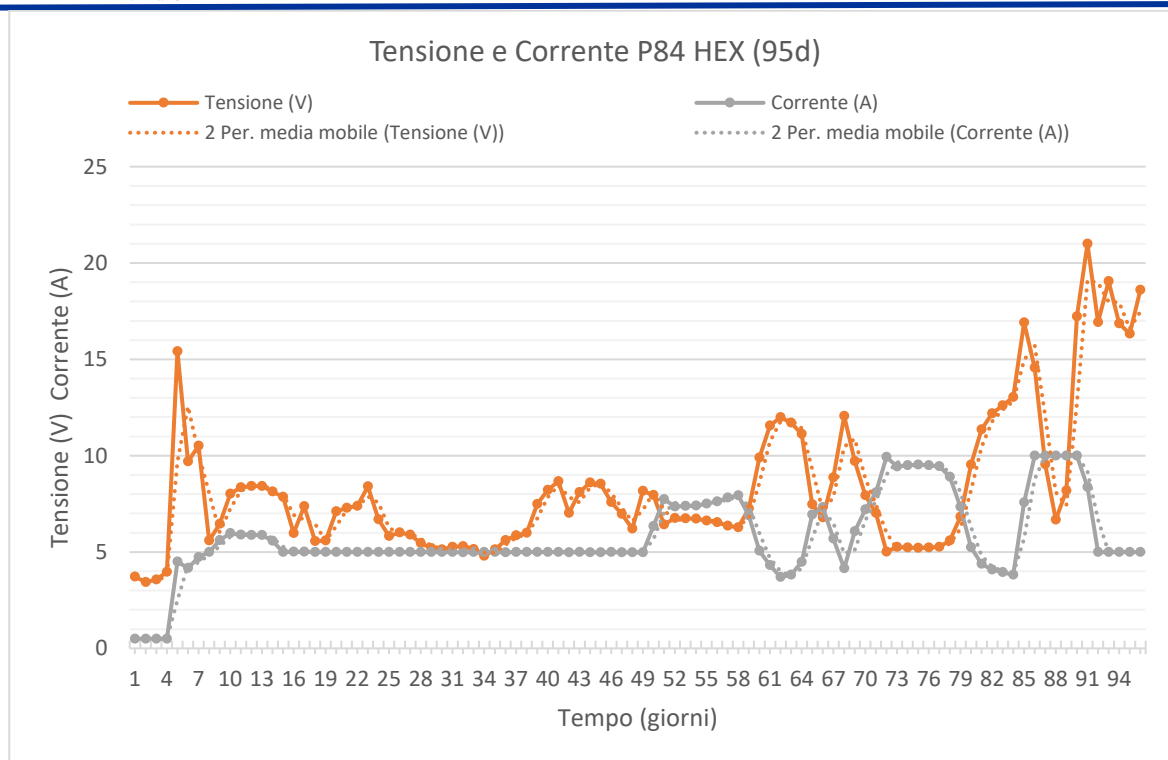


Figure 40 Tendance temporelle de la tension et du courant appliqués à la matrice P84 HEX (95d)

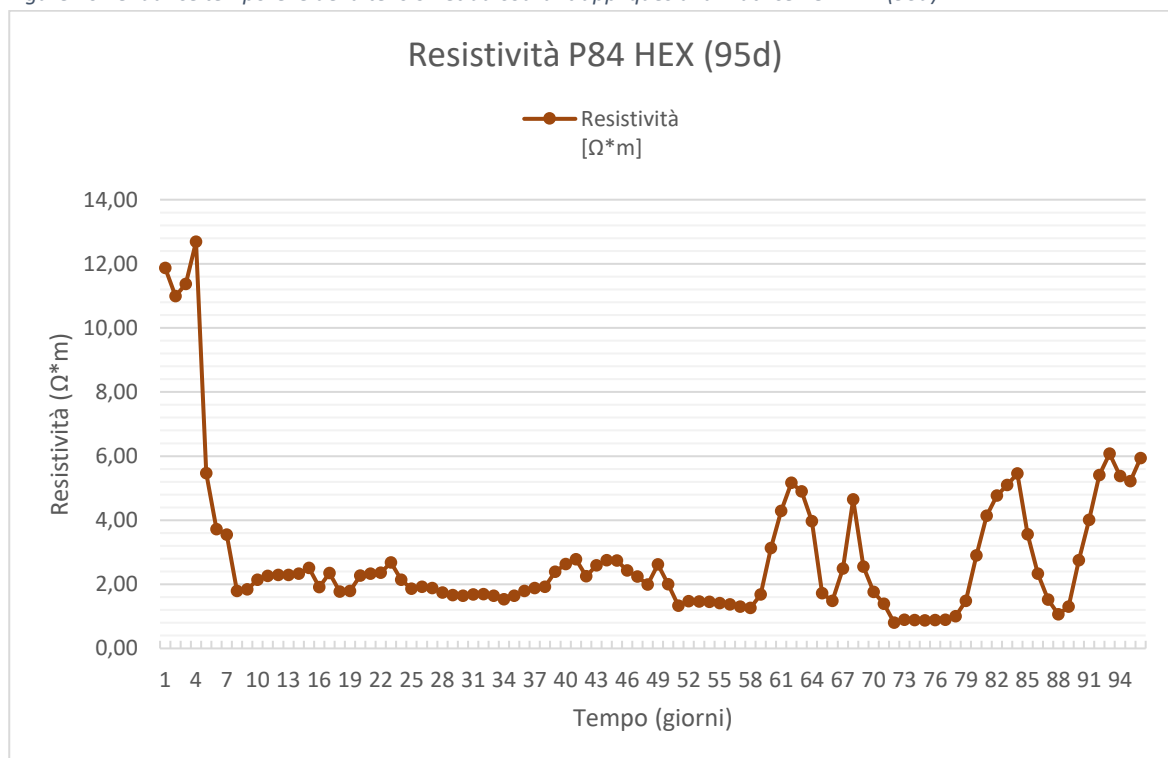


Figure 41 Tendance temporelle de la résistivité de la matrice P84 HEX (95d)

L'intensité de courant de 10 A a été atteinte dans un court intervalle de temps, entre le jour 85 et le jour 90, lorsque la limite de puissance délivrée par l'alimentation a été augmentée. Ce fait a conduit à une tendance à la baisse de la tension jusqu'au jour 88, puis à une augmentation soudaine de la tension, lorsque l'intensité du courant a été réduite à 5 ampères pour éviter une surchauffe de la matrice.

Le débit net entre les deux réservoirs est très variable entre le jour 70 et le jour 95. En cela, il n'est pas possible de distinguer le flux hydraulique du flux électro-osmotique. Les graphiques des niveaux d'électrolyte mesurés et le flux électrosmotique sont affichés.

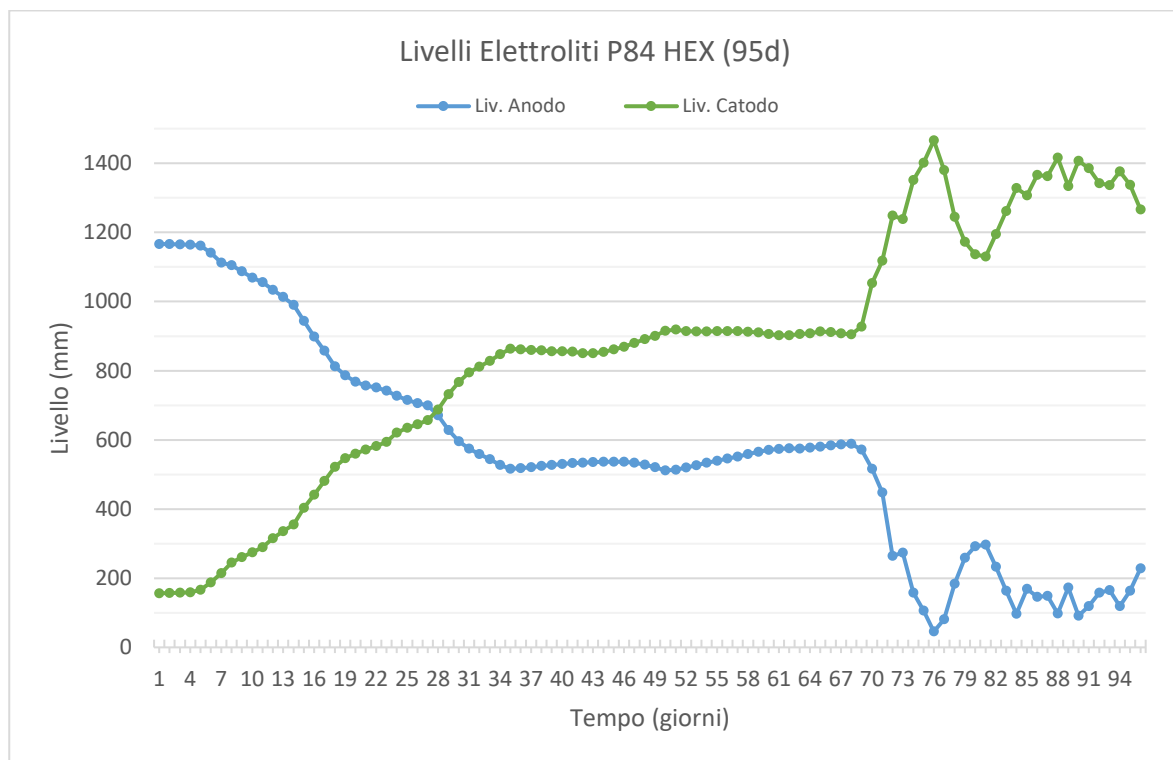


Figure 42 Variation temporelle des taux de catholyte et d'anolyte accumulés P84 HEX (95d)

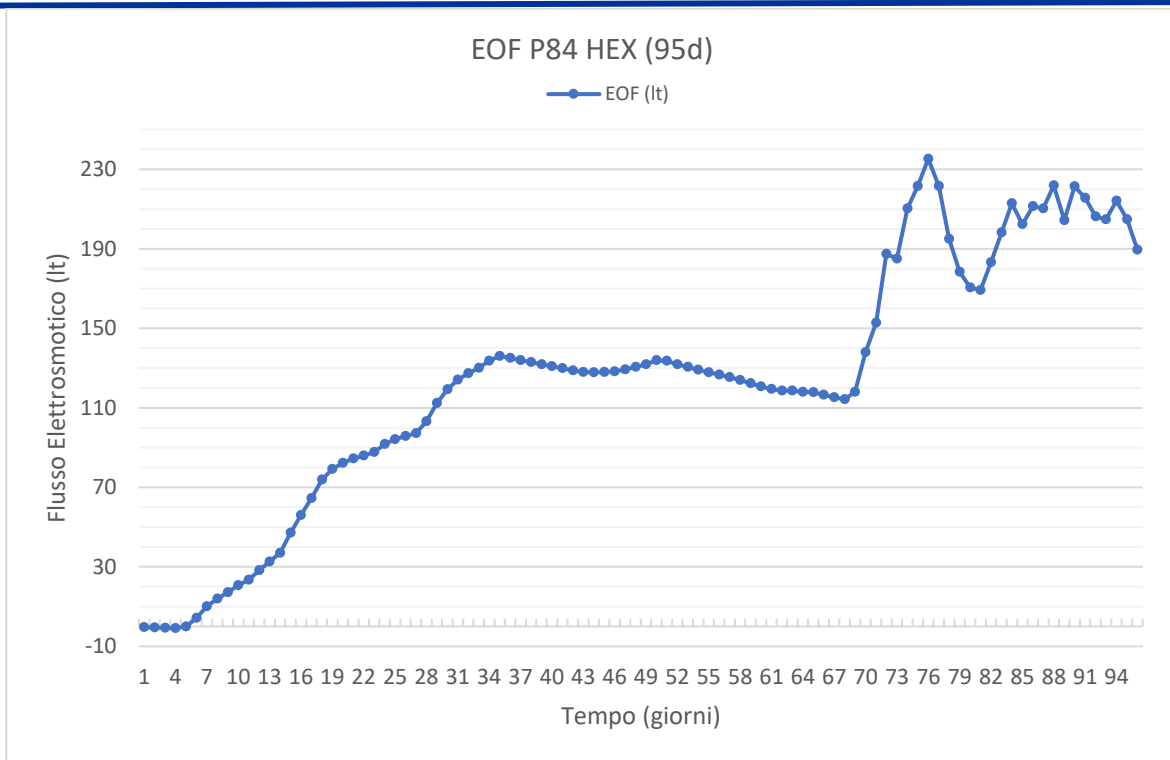


Figure 43 Évolution temporelle du flux électroosmotique P84 HEX (95d)

La consommation d'acide au cours des 25 derniers jours a considérablement diminué et cela peut être observé dans la figure 44 suivante, où à partir du 70e jour, la tendance est à la baisse. Cette réduction est due au fait que l'acidification de la matrice a réussi, en effet, dans le paragraphe suivant le pH sera montré à 95 jours et une réduction significative du pH sera observée, autour de 2. La consommation totale de solution acide est égale à 76,24 litres de 4,5M HNO₃, inférieure à la prévision faite au paragraphe précédent de 86,59 litres.

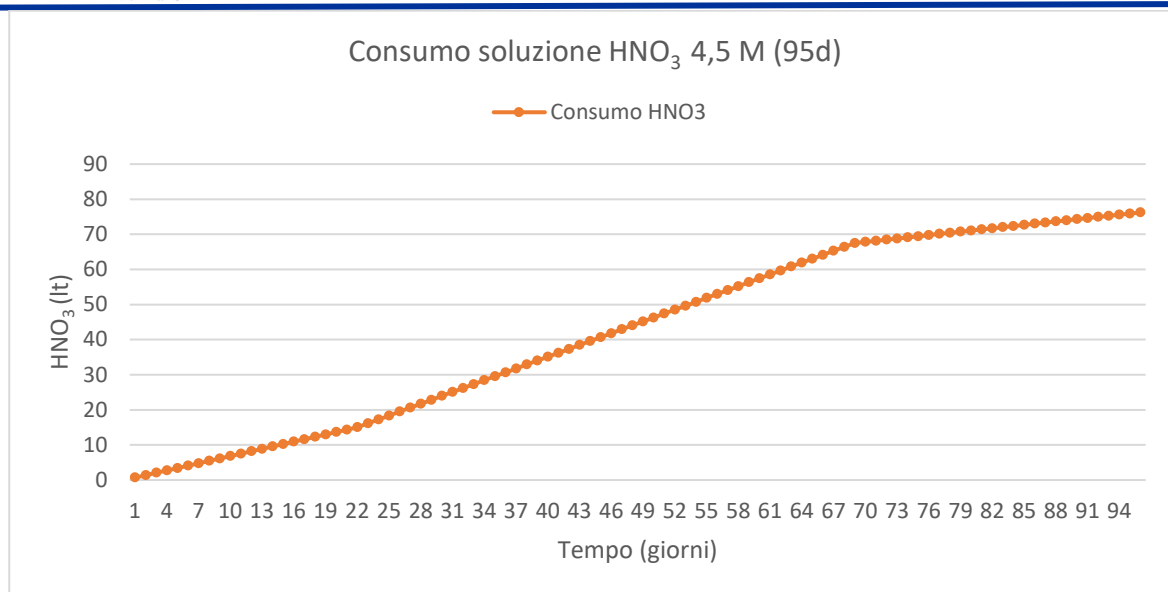


Figure 44 Consommation de solution d'acide nitrique pendant l'expérience 95d

4.6.3 Élimination des contaminants à 95 jours

La deuxième phase d'expérimentation avec l'ajout de la nouvelle pompe à entraînement magnétique s'est terminée après 25 jours, pour un total de 95 jours de traitement électrocinétique. L'échantillonnage de la matrice a été effectué de la même manière que décrit au paragraphe 5.7.6.

Les graphiques de la tendance de l'humidité et du pH de la matrice sont affichés.

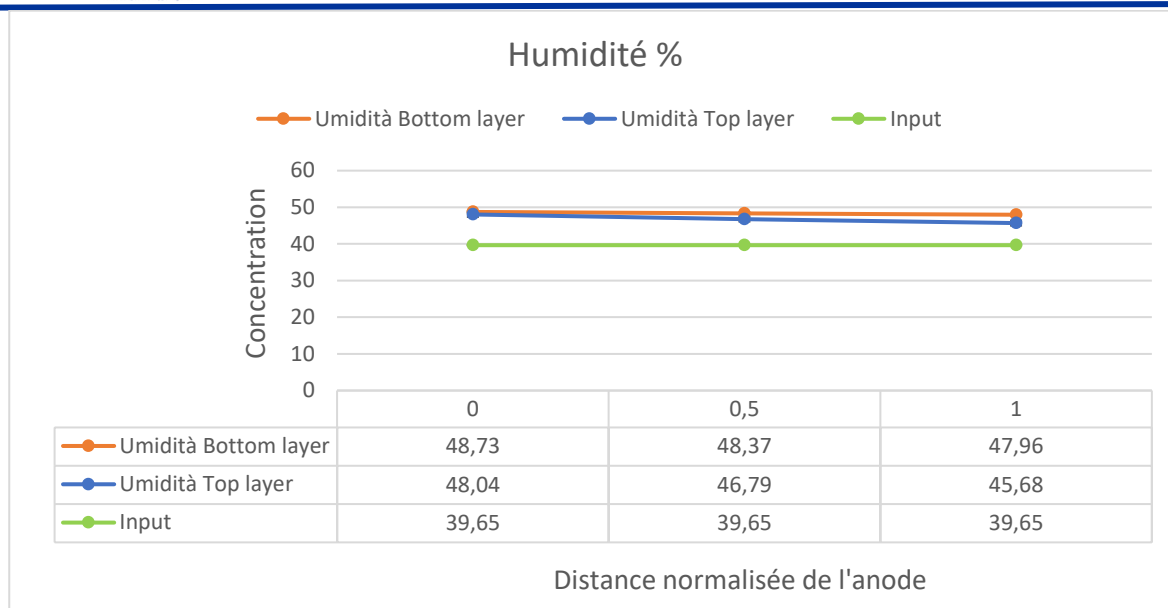


Figure 50 Teneur en eau présente dans les coupes analysées, comparée à l'humidité présente dans la matrice avant traitement (95d)

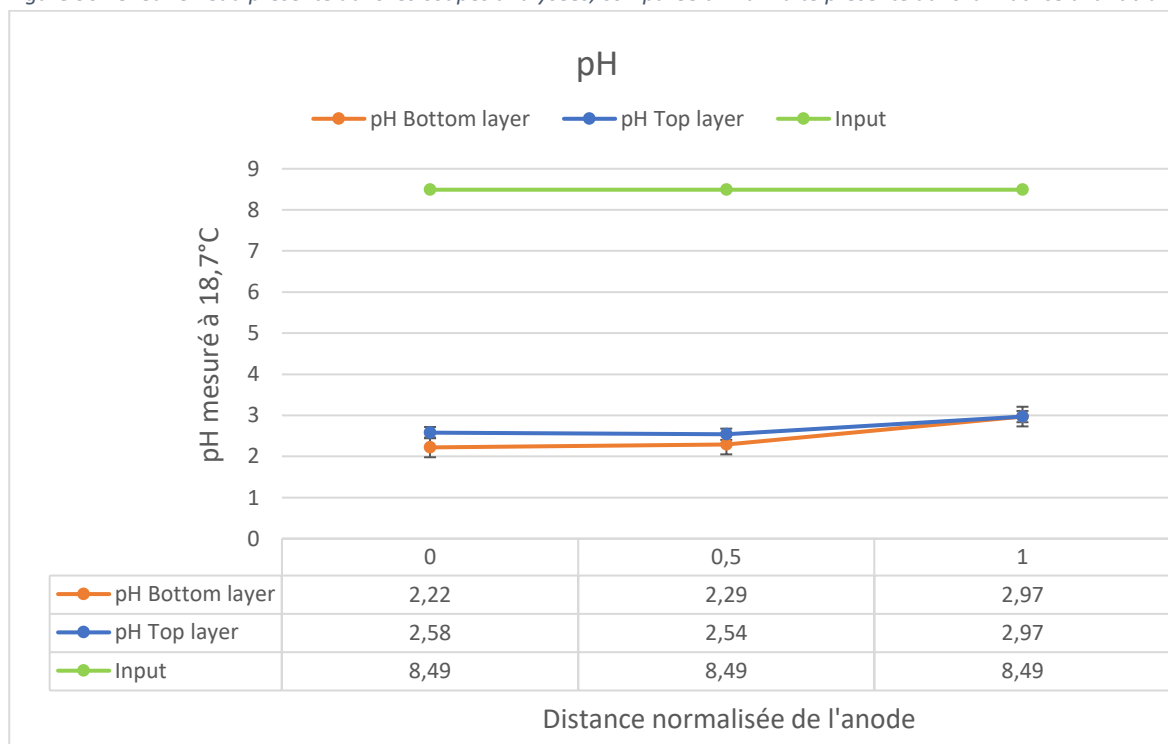


Figure 51 Tendence du pH mesuré à 18,7°C après 95j

À partir du graphique 50 sur la tendance de l'humidité à 95 jours, nous voyons une augmentation de 10 % dans les sections centrales par rapport à l'humidité à 70 jours (Fig. 46). Cette augmentation de l'humidité se traduit par l'abaissement du pH dans les sections centrales (fig. 51), cela signifie que le front acide a traversé la matrice et ne s'est pas arrêté peu avant la chambre cathodique.

L'acidification complète de la matrice peut être due à la plus faible capacité de neutralisation acide (ANC) du sédiment et à la géométrie hexagonale des électrodes.

Les résultats de l'analyse chimique des échantillons après le traitement de 95 jours montrent une nouvelle réduction des contaminants. Les concentrations d'Arsenic et d'Antimoine ne permettent pas dans de nombreux cas de rentrer dans les valeurs limites CSC de la colonne B. De plus, les valeurs des métaux précités présentent des concentrations supérieures à celles retrouvées dans la Matière d'Entrée, cet effet aura à préciser dans des recherches ultérieures. L'antimoine et l'arsenic échappent très probablement au traitement électrocinétique et sont considérablement affectés par les erreurs de détection dans les analyses chimiques

Le processus de décontamination, au cours des 25 derniers jours d'expérimentation, a conduit à une élimination très élevée des contaminants. Pour mieux comprendre ce processus, les résultats fournis par le laboratoire externe ont été analysés et traités afin d'obtenir les valeurs de pourcentage d'élimination pour les différents contaminants $\left(\frac{C_0 - C_f}{C_0} \cdot 100\right)$ et le rapport C/C_0 pour chaque section, où C représente la concentration en sortie de la section analysée et C_0 est la concentration en entrée de l'échantillon vierge.

Les graphiques relatifs aux pourcentages d'élimination des principaux polluants étudiés sont présentés ci-dessous. Les polluants organiques n'ont été que partiellement détectés, étant donné que l'objectif principal de cette expérience est les métaux lourds, qui sont la cible de la décontamination électrocinétique.

4.6.4 Contaminants inorganiques (95 jours)

Les pourcentages de suppression sont indiqués ci-dessous.

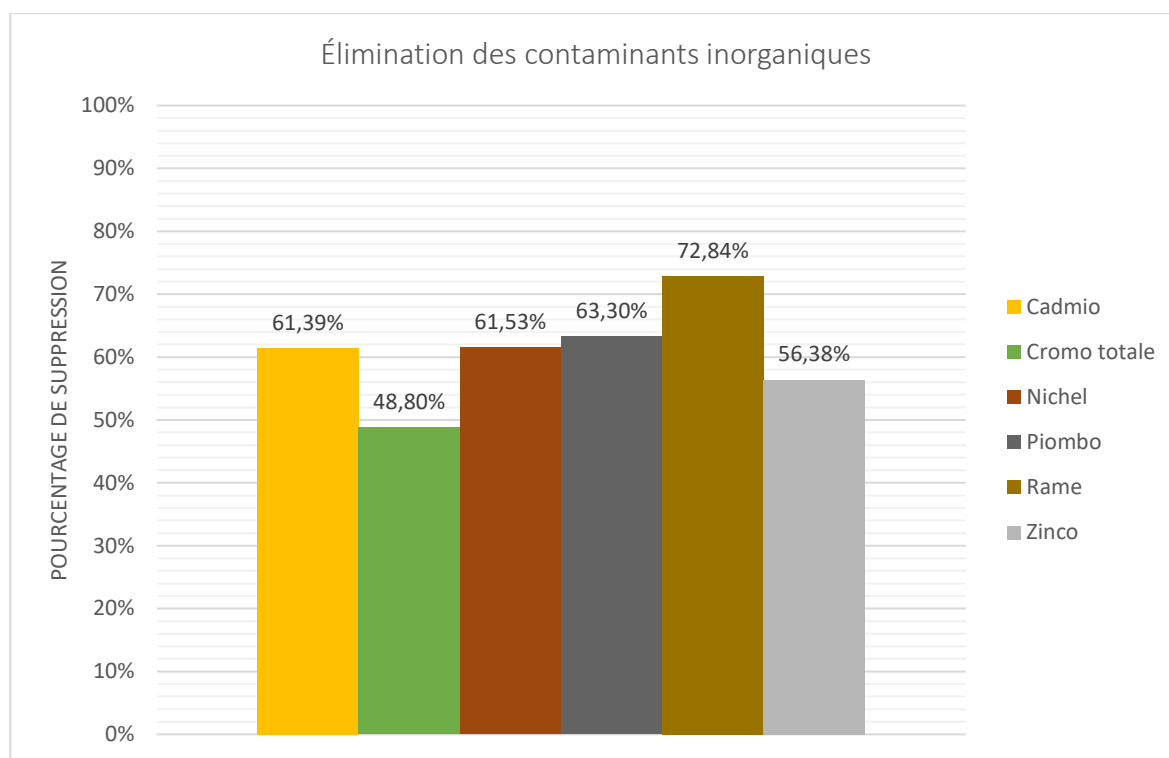


Figure 52 Pourcentage d'élimination des contaminants inorganiques (95d)

Comme on peut le voir sur le graphique de la fig. 52 les pourcentages d'élimination sont supérieurs à ceux déterminés au 70e jour d'expérimentation, avec une moyenne de 60 % d'élimination des contaminants inorganiques.

Les tendances des principaux éléments soumis au traitement sont présentées ci-dessous : l'image 53 montre l'évolution de la décontamination dans les couches inférieure et supérieure de la matrice.

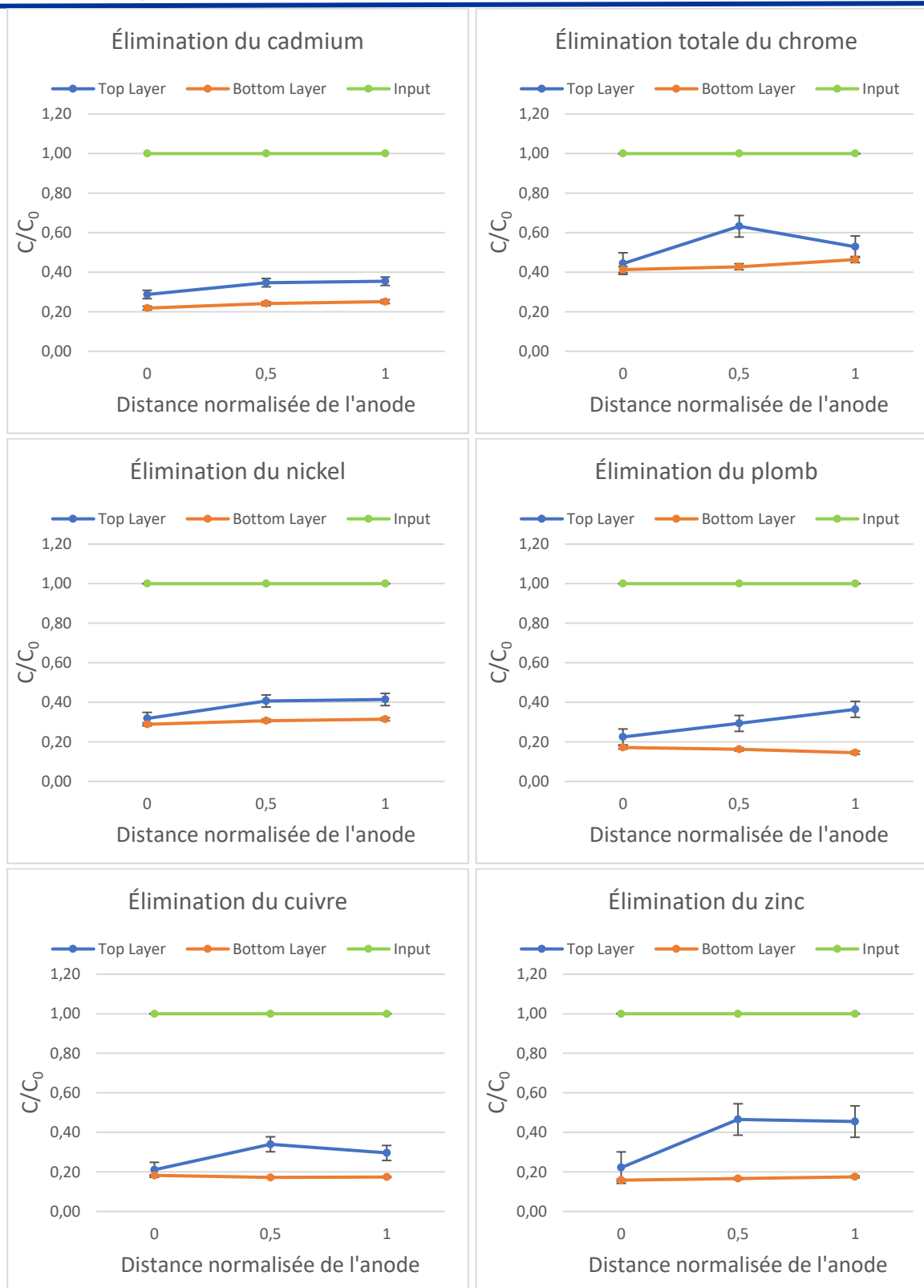


Figure 53 Tendance d'enlèvement de Cd, Cr, Ni, Pb, Cu et Zn dans les trois sections (Haut et Bas) (95d)

Les graphiques de C/C0 montrent des réductions dans les trois sections de la matrice et il est intéressant de noter que le Zinc dans la section proche de la cathode est passé de valeurs autour de 8 après 70 jours à des valeurs inférieures à 1 après 95 jours. Cette dernière découverte permet de dire que le zinc, accumulé près de la cathode, a été transporté vers la chambre catholytique par le front acide oxydant. Par ailleurs, une donnée supplémentaire qui permet de renforcer cette affirmation est fournie par l'analyse du précipité formé dans la chambre centrale.



Figure 54 Précipité à la cathode

L'analyse du précipité est rapportée ci-dessous.

Tableau 5 Analyse chimique du précipité extrait de la chambre catholytique

<u>PARAMÈTRE</u>		<u>PRÉCIPITÉ À LA CATHODE</u>	
	<u>Unité de mesure</u>	<u>Mesure</u>	<u>Incertitude</u>
Antimoine	mg/kg s.s	23,86	± 4,1
Arsenic	mg/kg s.s	78,98	± 14
Béryllium	mg/kg s.s	2,21	± 0,26
Cadmium	mg/kg s.s	14,42	± 1,7
Cobalt	mg/kg s.s	38,92	± 6,7
Chrome total	mg/kg s.s	1476	± 172
Mercure	mg/kg s.s	N.R.	-
Nickel	mg/kg s.s	649	± 75
Plombe	mg/kg s.s	6730,8	± 780
Cuivre	mg/kg s.s	671,2	± 78
sélénium	mg/kg s.s	N.R.	-
étain	mg/kg s.s	31,53	± 5
thallium	mg/kg s.s	N.R.	-
Vanadium	mg/kg s.s	103,28	± 12
Zinc	mg/kg s.s	10865,4	± 1312
Benzo (a) antracène	mg/kg s.s	N.R.	-
Benzo (a) pyrène	mg/kg s.s	N.R.	-

Benzo (b) fluorantène-s	mg/kg s.s	N.R.	-
Benzo (k) fluorantène-s	mg/kg s.s	N.R.	-
Benzo (g-h-i) périlène-s	mg/kg s.s	N.R.	-
Crisène	mg/kg s.s	N.R.	-
Dibenzo (a-e) pyrène	mg/kg s.s	N.R.	-
Dibenzo (a-l) pirène	mg/kg s.s	N.R.	-
Dibenzo (a-i) pirène	mg/kg s.s	N.R.	-
Dibenzo (a-h) pirène	mg/kg s.s	N.R.	-
Dibenzo (a-h) antracène	mg/kg s.s	N.R.	-
Indeno (1,2,3) pyrène	mg/kg s.s	N.R.	-
Pyrène	mg/kg s.s	N.R.	-
PCB Totaux	mg/kg s.s	0,07	± 0,13
Hydrocarbures C<12	mg/kg s.s	N.R.	-
Hydrocarbures C>=12	mg/kg s.s	66,30	± 11

Le précipité a des concentrations élevées de zinc, cuivre, plomb, nickel et chrome, tous des éléments avec des pourcentages de réduction très élevés.

La formation du précipité dans la chambre catholytique doit faire l'objet d'une enquête plus approfondie, étant donné que l'environnement s'est avéré être dans des conditions acides et qu'il est connu de la littérature scientifique que les conditions acides favorisent la précipitation des métaux.

4.7 Conclusions

Les résultats des tests électrocinétiques fournissent une base pour de futures expériences avec l'utilisation d'une configuration bidimensionnelle des électrodes. La nouveauté présentée dans cette thèse sur la technique de décontamination est la disposition hexagonale des électrodes et leur immersion dans une enceinte dans laquelle le flux électrolytique circule librement. Cette configuration a permis l'élimination des contaminants en 95 jours avec un succès considérable. Les pourcentages d'élimination, en effet, sont les suivants: Cd = 61,39 %, Cr_{tot} = 48,80 %, Ni = 61,53 %, Pb = 63,30 %, Cu = 72,84 %, Zn = 56,38 %.

Malgré les problèmes liés à la maintenance des appareils dans la première phase de l'expérimentation, le processus électrocinétique a conduit à l'acidification totale de la matrice et cela a entraîné une augmentation des performances dans les 25 derniers jours de traitement. Probablement s'il n'y avait pas eu de problèmes techniques de pompage dans la première phase d'expérimentation, le traitement aurait été plus rapide et avec la même efficacité d'élimination.

La comparaison des résultats d'élimination avec des expériences antérieures nous a permis de constater comment une densité de courant moyenne plus faible (30 A/m²) mais avec l'application d'un champ électrique radial permet une réduction des temps de traitement nécessaires, une augmentation de l'efficacité d'élimination et une baisse de la consommation d'électricité. L'augmentation de la densité de courant pourrait probablement diminuer les temps de décontamination et améliorer l'efficacité d'élimination, mais il convient de prendre en compte

l'augmentation de la température interne de la matrice traitée et du flux électrolytique, ce qui conduirait à des problèmes d'évaporation. Le front acide-oxydant, illustré par l'évolution du pH dans la matrice échantillonnée, traverse complètement les sédiments et permet la désorption des métaux lourds. Ce résultat n'a pas été atteint dans les expériences précédentes et ce succès peut être attribué à la valeur ANC inférieure du sédiment P84, à la configuration hexagonale des électrodes, à la conformation du champ électrique et à la largeur du sédiment lui-même.

5 Description des tests d'Épandage et principaux résultats

Comme décrit précédemment, l'épandage consiste à favoriser les processus de biodégradation affectant l'écologie microbienne du sédiment lui-même, avec un intérêt particulier pour les processus oxydatifs.

5.1 Introduction

Ce rapport présente les résultats obtenus lors des tests de biostimulation et de bioaugmentation avec le champignon indigène *Fusarium sp.* qui avaient été entamées lors de la préparation du rapport précédent, et qui sont décrites au paragraphe 5.1 du Produit T3.2.2

L'isolat fongique a été isolé des sédiments traités (natif) de la manière décrite dans le même paragraphe.

Pour rappel et pour faciliter la compréhension du set up expérimental, nous rapportons brièvement les opérations de montage des tests précités :

préparation des sédiments :

- Drainage de l'excès d'eau sur Leca
- Modification de la texture par ajout de sable (10 %) et de copeaux de bois (10 %)
- Amendement de phosphore et d'azote (rapport final C : N : P 100 : 10 : 1)
- Séparation du sédiment préparé en triples de 1000 gr, entre mésocosmes bio-stimulés, et inoculé avec *Fusarium sp.* 5,5% en poids frais.

Les sédiments du port de Piombino p87 et p91 ont donc été testés. Par condition de contrôle, nous entendons la condition de biostimulation uniquement, par inoculé des sédiments dans lesquels le champignon indigène a été amendé.

Les méthodes d'analyse des contaminants organiques sont décrites dans la section 5.1 du Produit T3.2.2 : les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont quantifiés avec la même méthode que celle décrite pour le pyrène.

La quantification du carbone organique total a été réalisée selon la méthode décrite dans le D.M. 185 du 13/09/1999, au point XIV, tandis que la quantification des acides humiques et fulviques a été réalisée selon la méthode IPLA-TO A28 1984 pour la caractérisation des engrais, du compost et des boues des installations d'épuration.

La technique d'extraction, la préparation des bibliothèques et le traitement des données dérivant du séquençage de l'ADN métagénomique sont les mêmes que ceux décrits au point 5.1 du Produit T3.2.2.

5.2 Résultats

L'objectif principal de l'enquête était de suivre le processus de dégradation biologique des contaminants constitués par la fraction lourde des hydrocarbures dérivant des produits pétroliers, qui apparaît comme le contaminant majeur des sédiments en question : les sédiments en question ont de toute façon mis en évidence la présence d'autres contaminants organiques à des concentrations supérieures à celles du seuil de contamination dans le sol et le sous-sol, signalées dans le décret législatif 152/2006.

Nous commencerons donc par décrire et modéliser la cinétique du processus de dégradation des hydrocarbures lourds, et nous analyserons en second lieu l'effet sur les polluants organiques minoritaires. Nous identifierons les candidats microbiens et fongiques qui contribuent à la dégradation/transformation des polluants précités, et au déclenchement de processus préparatoires à la transformation des sédiments en « sol technique », ou au démarrage des processus d'humification qui sont à la base de la constitution d'un pabulum propice à la prolifération des microorganismes du sol impliqués dans les cycles d'éléments tels que le carbone, l'azote et le phosphore.

5.2.1 Cinétique de dégradation des hydrocarbures lourds (C > 12)

Vous trouverez ci-dessous les données de quantification des hydrocarbures lourds, accompagnées de l'écart type, dans les procédés de bio-r rééduction testés à l'échelle du laboratoire.

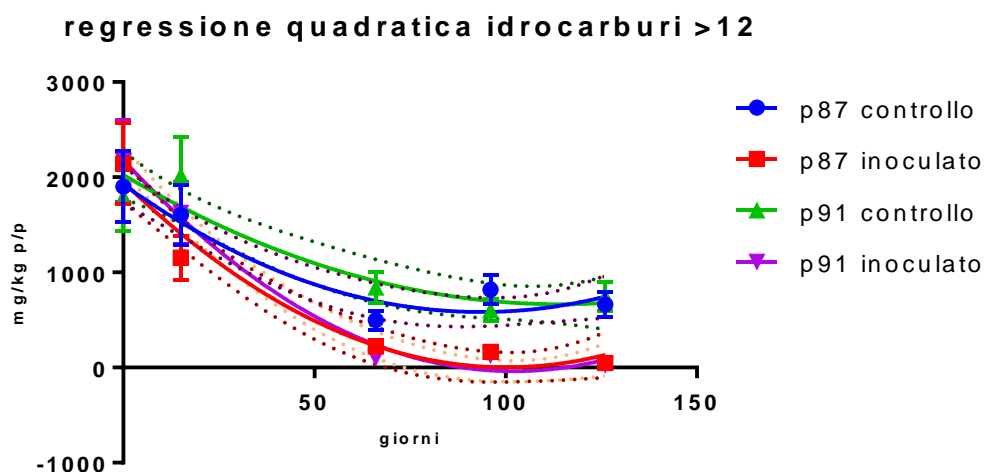


Figure 58 cinétique de réduction de la contamination par les hydrocarbures lourds. Les lignes verticales représentent les écarts types, tandis que les lignes pointillées représentent l'intervalle de confiance (95%) de l'interpolation effectuée.

La cinétique de dégradation (traits pleins de la figure 58) des hydrocarbures lourds est non linéaire: un modèle polynomial du second degré se prête bien à l'interpolation de points expérimentaux, comme le montre l'indice de corrélation de Pearson présenté dans le tableau 1

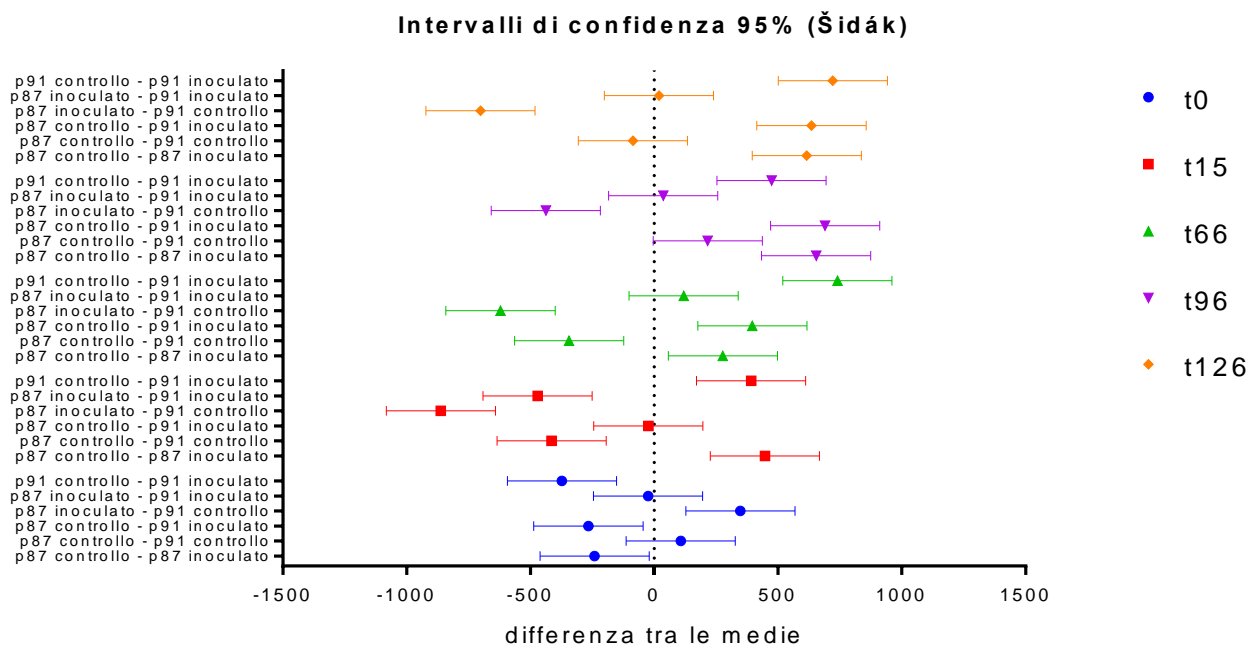
La cinetica di degradazione (linee intere nella Figura 58) degli idrocarburi pesanti è non lineare: un modello polinomiale di secondo grado si presta bene all'interpolazione dei punti sperimentali, come si può ben vedere dall'indice di correlazione di Pearson riportato in tabella 1

Tableau 1 : paramètres du polynôme du second degré qui interpole les points expérimentaux, accompagnés de l'incertitude et de la qualité de l'ajustement (R^2)

Polynôme du second degré	p87 contrôle	p87 inoculé	p91 contrôle	p91 inoculé
Paramètres d'interpolation				
B0	1925	1951	2026	2183
B1	-28,68	-38,89	-23,78	-43,51
B2	0,1533	0,1942	0,1039	0,2131
erreur standard sur les paramètres d'interpolation				
B0	90,12	96,57	112,1	68,67
B1	3,914	4,194	4,866	2,982
B2	0,03103	0,03325	0,03859	0,02365
R^2 correct	0,9701	0,9835	0,9588	0,9934

D'après la figure 1, il est évident que dans les deux types de traitement, il y a un effet de réduction de la concentration en hydrocarbures lourds, qui est significativement plus marqué pour les sédiments inoculés avec le champignon *Fusarium sp.* A partir de l'interpolation des données expérimentales, il est possible d'estimer la demi-vie pour les traitements soit bio-stimulés soit avec inoculum fongique : ces temps correspondent respectivement à 47,8 et 29,4 jours pour p87 bio-stimulé et inoculé, et respectivement 56,6 et 29,2 pour p91 bio-stimulé et inoculé avec le champignon.

Il est à noter que l'inoculum fongique, en plus d'accélérer le processus d'épuisement, a homogénéisé le même dans les deux sédiments différents, conduisant à une demi-vie comparable dans les deux matrices.



Figures 59 intervalles de confiance de la différence entre les moyennes des concentrations d'hydrocarbures $C > 12$, corrigés de l'effet des comparaisons multiples. Les groupes comparés sont indiqués en ordonnée, la valeur numérique de la différence des moyennes en abscisse. La ligne horizontale entre les points représente l'intervalle de confiance à 95 % de la différence signalée : lorsque l'intervalle est autour de 0, la différence n'est pas significative.

Sur la figure 59, il est évident qu'il existe une différence significative de réduction entre les sédiments non traités et ceux inoculés avec le champignon *Fusarium sp.* dans les deux sédiments testés : cet abattement était de 97,8 % contre 65,1 % pour le sédiment p87 et de 98,7 % contre 58,2 % pour le sédiment p91.

On peut noter qu'à partir de concentrations équivalentes chez les deux témoins et inoculés, il y a une mort plus rapide (15 jours) dans p87 inoculé, par rapport au p91 correspondant.

A 66 jours, la différence d'abattement entre les deux sédiments inoculés devient insignifiante, en restant telle jusqu'à la fin de l'expérimentation, et mettant en évidence que le traitement fongique a des résultats équivalents sur les deux types de sédiments différents testés.

Quant aux non inoculés, la communauté microbienne autochtone et bio-stimulée du sédiment p87 est plus efficace que celle du sédiment p91, même si à 126 jours la différence d'abattement des hydrocarbures lourds dans les deux sédiments devient insignifiante.

5.2.2 Surveillance du processus d'humification

L'abattement des hydrocarbures lourds s'accompagne d'une modification physico-chimique de la matrice sédimentaire, qui devient progressivement plus proche de celle d'un sol : il est possible de voir combien la formation d'acides humique et fulvique est importante après 66 jours de traitement, et nettement plus prononcée en conjonction avec l'inoculum fongique (Figure 60). L'augmentation générale de la teneur en carbone organique est également intéressante du fait de l'humification de la matière ligno-cellulosique utilisée comme agent structurant, qui se désagrège progressivement et passe dans le sous-tamis analysé.

L'utilisation d'un structurant organique complexe tel que la matière lignocellulosique, en plus d'assurer une texture adaptée aux processus aérobies impliqués dans l'épuisement des polluants organiques, agit comme activateur des processus d'humification, et comme élément constitutif pour la production d'acides humiques et fulviques. Bien que la teneur en carbone organique soit déjà importante au début de l'expérimentation, il faut considérer que ce paramètre ne fait pas de distinction entre les composés organiques polluants et ceux qui se forment lors de l'humification : il faut donc analyser spécifiquement les acides humiques et fulviques pour exprimer eux-mêmes en termes d'activation de processus biologiques visant à l'humification.

Il convient de noter que l'inoculum fongique favorise la production d'acides humiques, qui, ayant un poids moléculaire plus élevé et sensiblement moins hydrophiles, sont mieux adaptés pour agir comme une réserve de carbone disponible pour la croissance des micro-organismes, ainsi qu'avoir les capacités connues des composants de l'humus, qui rendent un sol plus fertile, à savoir :

- tampons pour le pH du sol
- échange cationique élevé
- effet complexant pour les métaux essentiels et les micronutriments

acidi umici e fulvici e carbonio organico totale

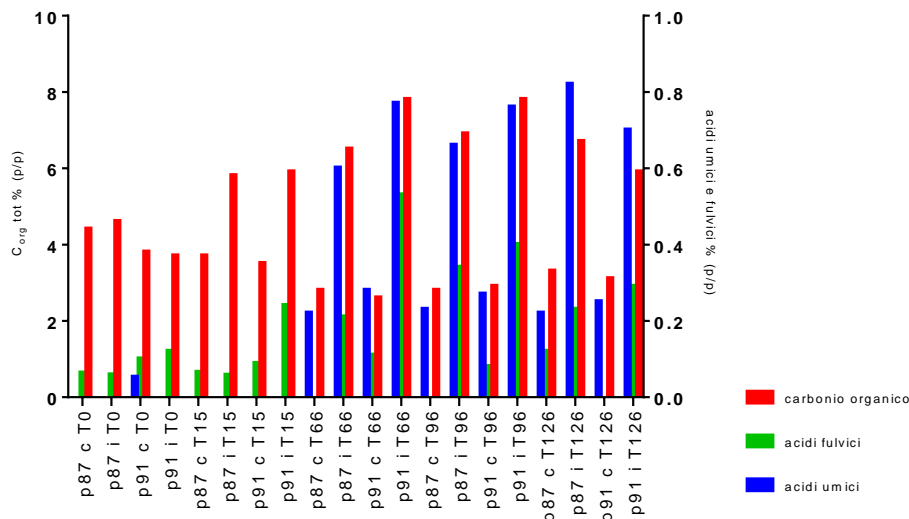


Figure 60 valeurs moyennes de concentration des acides humiques et fulviques et du carbone organique total pour chaque triplé

5.2.3 Épuisement des contaminants organiques minoritaires

D'autres effets sont trouvés sur d'autres types de polluants organiques : la figure 61 montre comment l'effet de dégradation est également marqué pour les composés aromatiques en présence de champignon inoculé : l'effet pour les mésocosmes non inoculés, en revanche, consiste à diminuer la complexité des contaminants présents.

L'effet de l'inoculum fongique après 126 jours consiste en une élimination des polluants organiques aromatiques (HAP et PCB) en deçà des limites de quantification des méthodes utilisées, dans les deux sédiments traités

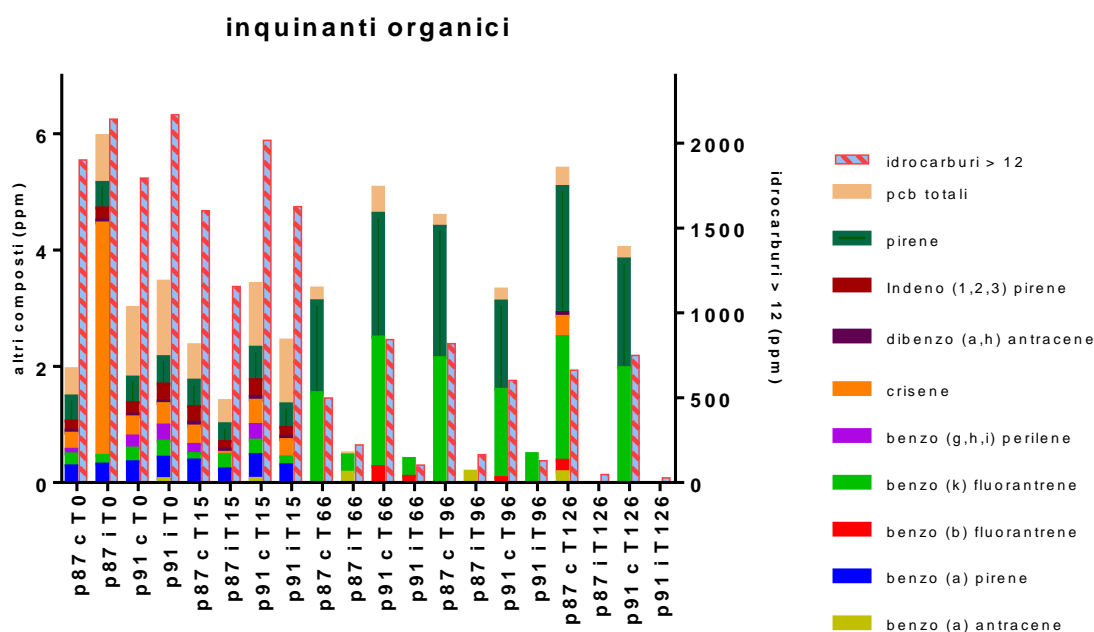


Figure 61 polluants organiques comme la moyenne de 3 répliqués biologiques. Les hydrocarbures > 12 sont indiqués sur l'axe des ordonnées à droite, tandis que l'IPA et les PCB sont indiqués comme accumulés sur l'axe des ordonnées à gauche

On constate que dans les jours qui suivent le quinzième, dans les contrôles bio-stimulés, la teneur totale en contaminants polycycliques augmente, et la complexité est réduite. Une explication possible de cet effet est, parallèlement à la rupture partielle des cycles aromatiques des composés polycycliques, la réduction du poids moléculaire de tous les composés asphalténiques, effet principalement dû à la communauté bactérienne : les produits de dégradation de ces composés seraient composés plus légers, même s'ils sont constitués d'un nombre considérable de cycles condensés.

5.3 Analyse de la communauté bactérienne

5.3.1 Extraction d'ADN du sol pour analyse métagénomique.

L'extraction de l'ADN total des échantillons de sédiments de l'expérimentation en mésocosme a été réalisée à l'aide du kit FastDNA™ SPIN pour sol (MP Biomedicals) et du Fast Prep Instrument (MP Biomedical). Ce kit utilise des billes de silice pour broyer l'échantillon de sol et l'homogénéiser avec l'action mécanique de Fast-Prep, selon le protocole proposé par le fournisseur.

La quantité d'ADN a été vérifiée par Qubit® 3.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Life Technologies) selon les spécifications du fabricant. La qualité de l'ADN a été évaluée par mesure spectrophotométrique des rapports d'absorbance 260/280 et 260/230.

5.3.2 Metabarcoding et préparation de la librairie

Les bactéries ont été identifiées par amplification et séquençage de portions hypervariables des ADNr 16S, V4 et V5, en utilisant le forward primer 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') et reverse primer 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'). Les champignons ont été identifiés par amplification et séquençage des régions d'espacement interne de l'ADNr 18S, en utilisant le forward primer ITS1-5F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') et le reverse primer ITS2-2043R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3').

Les librairies de séquençage avec technologie Illumina ont été préparées par Novogene (niveau 54, Hopewell Center, 183 Queen's Road East, Hong Kong) à l'aide du kit NEBNext Ultra DNA Library Pre® en suivant les recommandations de l'usine et en ajoutant des codes d'index pour effectuer le pool de génomique de chaque échantillon à séquencer. Les qualités des librairies ont été évaluées au fluoromètre Qubit® 2.0 (Thermo Scientific) et au Bioanalyzer 2100 Agilent. Enfin, les librairies ont été séquencées avec Illumina Miseq avec des lectures appariées de 250 pb.

5.3.3 Analyses métagénomique

Les reads pair-end ont été attribuées aux échantillons sur la base du code-barres unique qui a ensuite été supprimé des séquences selon Trimmomatic v. 0.36 et FastQC v. 0.11.9. Par la suite, les reads forward et reverse ont été assemblées, filtrées par qualité de lecture, nettoyées des séquences chimériques et attribuées aux clusters représentés par chaque ASV (Amplicon Sequence Variant) en utilisant le DADA2 v. 1.18 de Qiime2.

Pour les séquences bactériennes de la région hypervariable V4-V5, la base de données de séquences représentatives, 16S Greengenes v 13_8, regroupée avec 99 % d'homologie de séquence, a été utilisée, tandis que pour les séquences fongiques ITS, UNITE v 8.0 avec séquences a été utilisée représentative regroupée avec 99 % d'homologie de séquence.

L'abondance des ASV a été normalisée par raréfaction en utilisant un nombre d'extractions égal au nombre de séquences de l'échantillon le moins séquencé. La α -diversité a été évaluée avec différents paramètres : Chao1, indice de Shannon, indice de Simpson et les courbes de raréfaction des espèces observées. Pour estimer la β -diversité, l'Analyse des Coordonnées Principales (PCoA) basée sur les distances UniFrac pondérées et l'Analyse des Correspondances Canoniques (CCA) ont été effectuées pour estimer dans quelle mesure la variance des échantillons est expliquée par la variance des variables environnementales. Cela a été fait avec le programme statistique RStudio v. 1.1.383 avec les packages Phyloseq (version 1.30.0), Vegan (version 2.5-6) et Pheatmap (version 1.0.12).

Vous trouverez ci-dessous les données concernant la diversité alpha de la communauté bactérienne, c'est-à-dire la variation du nombre d'espèces parmi les différents échantillons (richesse) et leur équirépartition. S'il existe une sélection de micro-organismes compétents pour la dégradation des contaminants, à la fois le nombre d'espèces bactériennes et leur équidistribution diminueront.

En général, le premier effet est dû aux variations des conditions environnementales (aération, température, biostimulation, etc.) qui ne favorisent qu'une partie des espèces présentes dans le microbiome. Le second effet est dû à l'enrichissement numérique des espèces qui s'adaptent aux variations environnementales évoquées. Cependant, ce deuxième effet est également attribuable à l'établissement de populations dominantes car elles sont métaboliquement actives contre la contamination ou sont capables d'utiliser cette dernière comme seule source de carbone.

D'après les données rapportées à la figure 62, on peut voir que dans les mésocosmes bio-stimulés, il n'y a pas de réduction du nombre d'espèces présentes (panneau A), mais il y a un enrichissement clair de souches spécifiques (panneau B et C), tandis que pour les mésocosmes inoculés avec le champignon, il y a une augmentation des espèces présentes (plus marquée pour le sédiment p87) et une augmentation de l'équidistribution des espèces bactériennes : ce processus montre que la sélection dans ce cas affecte beaucoup moins la communauté microbienne.

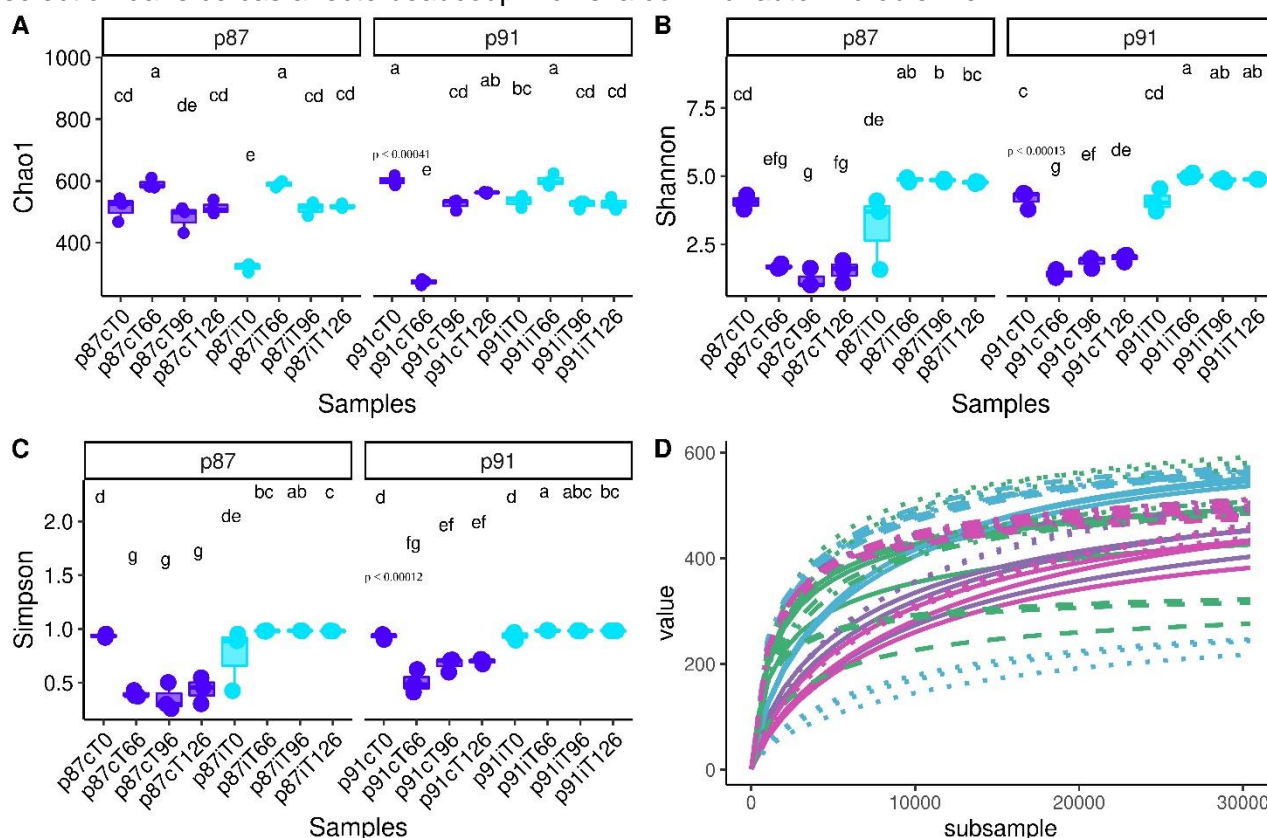


Figure 62 analyse de la diversité alpha de la communauté bactérienne. Un indice de richesse (Chao1) et deux indices de diversité (Shannon et Simpson) sont rapportés. En bleu foncé les échantillons bio-simulés sont reportés, en bleu les échantillons inoculés avec le champignon *Fusarium* sp. Le panneau D montre les courbes de raréfaction pour chaque échantillon, afin de démontrer que les échantillons ont été suffisamment séquencés pour des analyses statistiques ultérieures. La valeur p représentée est le résultat d'un test omnibus de Kruskal-Wallis (confiance à 95 %), tandis que les lettres représentent des groupes statistiquement identiques selon le test LSD post-hoc de Fisher, corrigé des comparaisons multiples par la méthode de Benjamini-Hochberg

La même évaluation a été faite pour la communauté fongique. Notez que les espèces fongiques sont extrêmement peu nombreuses que les bactériennes. Dans ce cas, il est à noter que le champignon a perturbé la communauté des sédiments p87 dans une moindre mesure, tandis que

dans le sédiment p91, la perturbation est similaire à la fois dans les bio-stimulées et les inoculées, ce qui suggère que c'est l'effet des nutriments qui a provoqué le processus de sélection de souches fongiques autochtones (réduction des richesses et équirépartition).

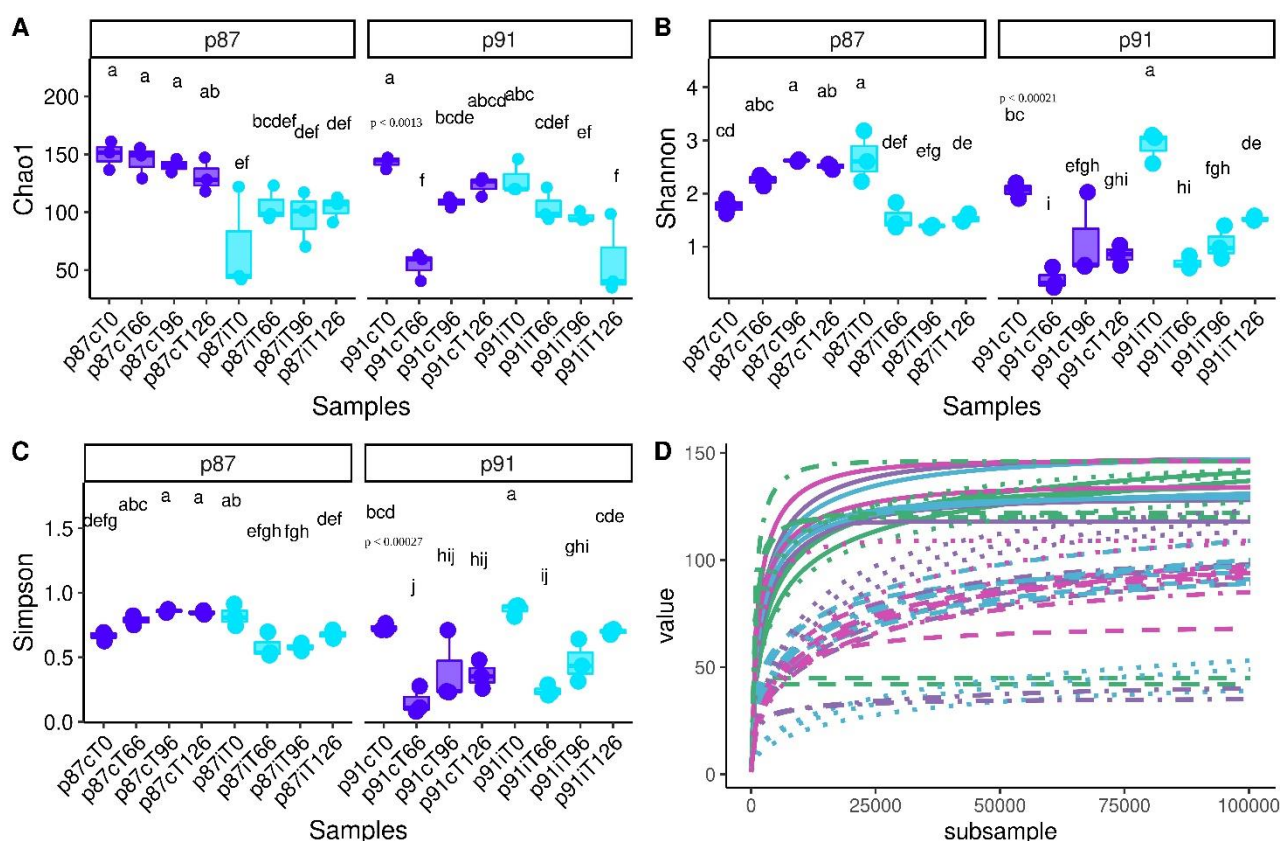


Figure 63 diversité alpha de la communauté fongique. La description de la figure est similaire à celle rapportée pour la figure 5

La diversité bêta bactérienne (Figure 64), qui montre si et comment l'écologie bactérienne varie au cours du processus, indique qu'en observant jusqu'à 87 % de la variance sur les deux axes rapportés, les populations bactériennes sont bien distinctes et différentes entre les temps d'installation de l'essai et temps d'incubation ultérieurs. De plus, les mésocosmes inoculés présentent une écologie bactérienne bien distincte de celle des mésocosmes non inoculés. Les premiers sont par ailleurs associés à un épuisement important des contaminants organiques. La tendance est évidente pour les deux sédiments et met en évidence une participation raisonnable de la communauté bactérienne dans le processus de dégradation.

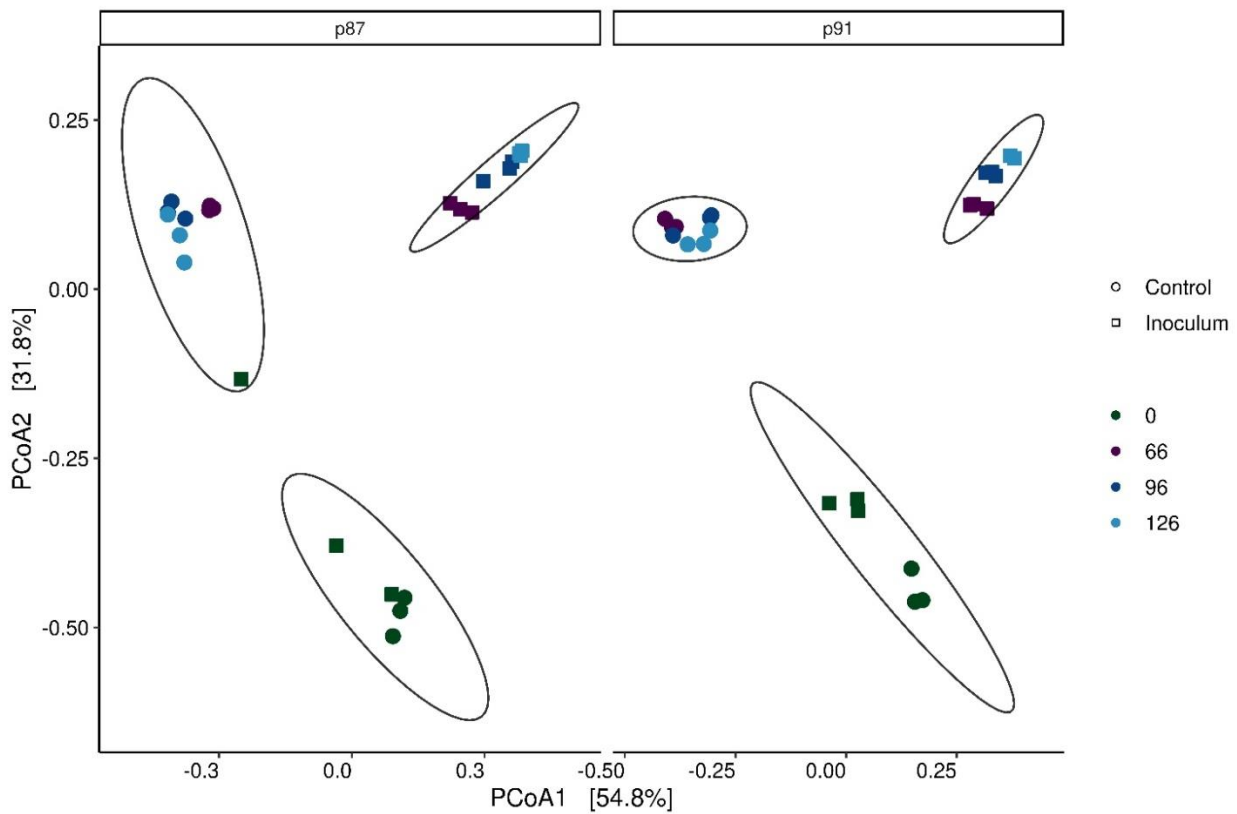


Figure 64 Analyse en composantes principales (PcoA) de la communauté bactérienne, basée sur la distance taxonomique UniFrac pondérée. Les ellipses décrivent un intervalle de confiance à 95% en termes de similarité des points expérimentaux, calculé entre les points expérimentaux les plus similaires selon l'ordre hiérarchique UPGMA.

En ce qui concerne la communauté fongique (Figure 65), où 87 % de la variance est analysée, les populations fongiques de référence montrent des différences beaucoup moins nettes que les bactéries à la fois en ce qui concerne les conditions expérimentales et les temps d'incubation et les données sont plus évidentes pour p97 que pour p81.

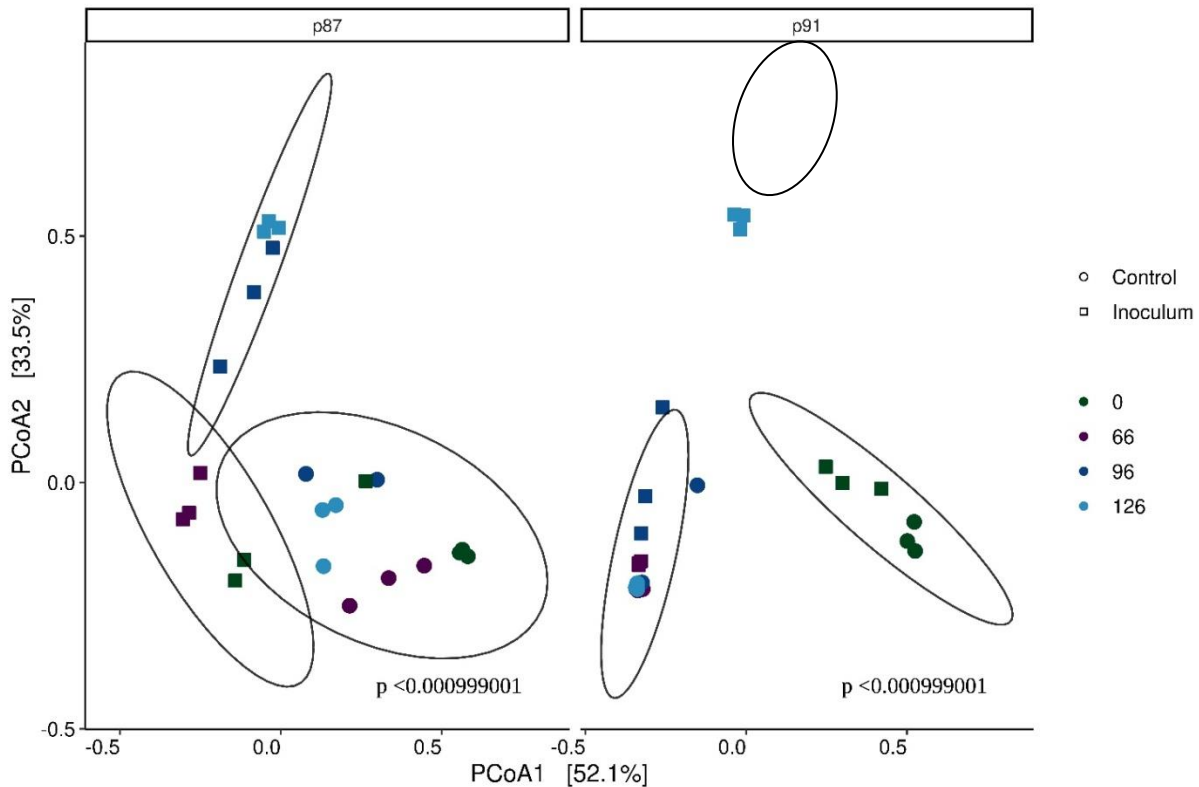


Figure 65 PCoA de la communauté fongique. La description de la figure est similaire à celle rapportée pour la figure 64

Les figures 66 et 67 montrent les abondances relatives des différents taxons bactériens dans p87 analysés respectivement au niveau de la famille et du genre. Un regroupement par profils en fonction du temps d'incubation et du type de traitement est observé. En d'autres termes, les familles bactériennes avec une valeur de score zêta positive par rapport à la valeur moyenne correspondante qui caractérisent le moment du montage de l'expérience sont différentes de celles qui caractérisent les temps d'incubation ultérieurs, mais en l'absence d'inoculum fongique. Dans ce cas, il y a une dominance des familles *Halothiobacillaceae* et *Bacillaceae* avec une nette dominance de la première. Dans le même temps, en revanche, une évolution continue est observée dans les temps d'analyse ultérieurs dans le cas du bio-inoculum fongique qui se caractérise par une dominance progressive des *Streptomyetaceae* (Figure 9).

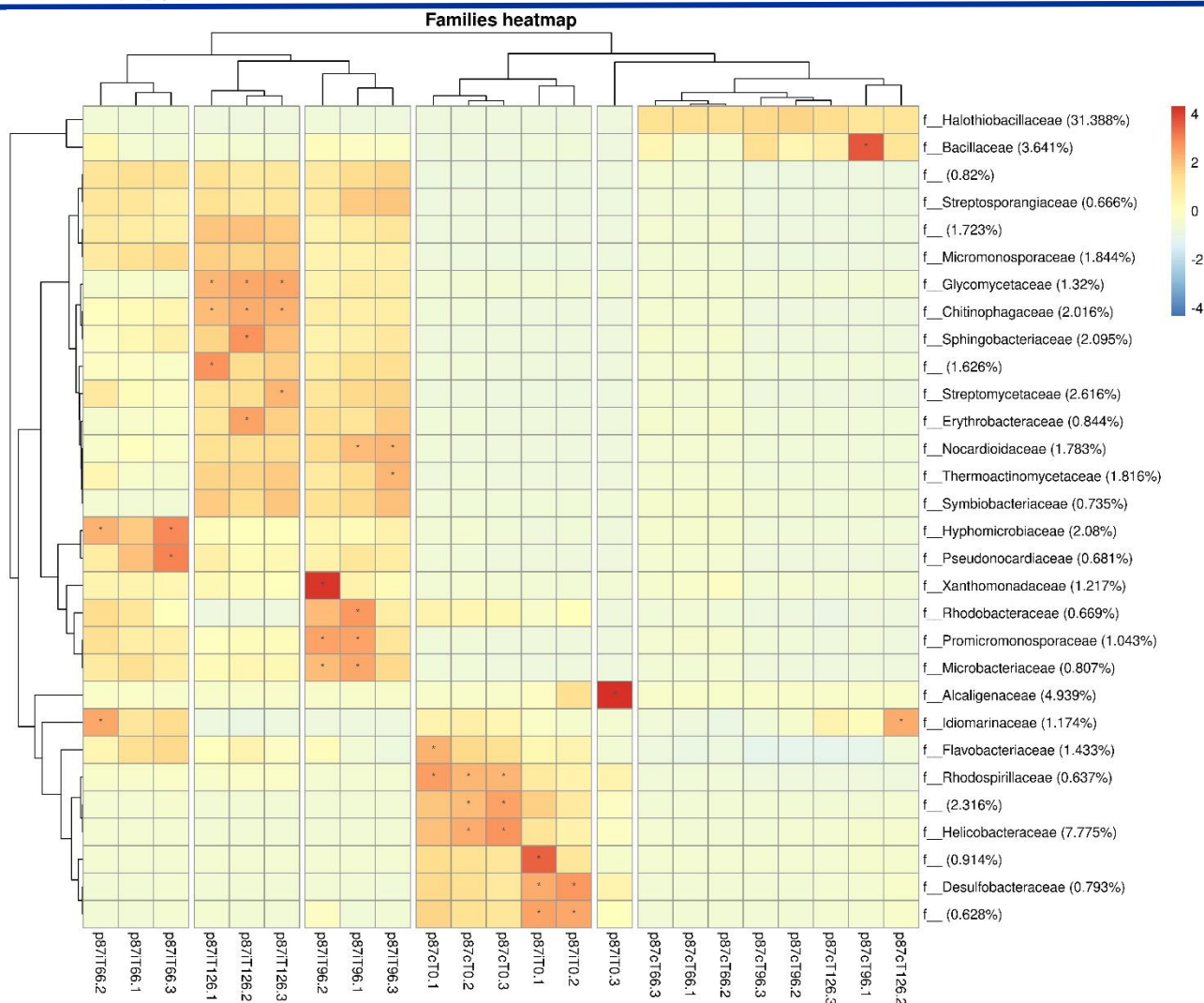


Figure 66 Carte thermique des 30 plus grandes abondances relatives, agrégées au niveau familial, pour la communauté bactérienne du sédiment p87. Les lignes et les colonnes montrent les arbres dérivant d'un regroupement hiérarchique basé sur la corrélation de Pearson des distances euclidiennes. Le schéma de couleurs froid- chaud représente le score z de chaque taxon, calculé par rapport à sa présence dans chaque échantillon. Les pourcentages affichés à côté des noms de taxon représentent les abondances relatives par échantillon sur le total (une valeur Z de zéro représente le pourcentage rapporté). Les astérisques représentent un score z supérieur à 2 ou inférieur à -2.

Au niveau du genre (Figure 67) évidemment la tendance se reproduit, soulignant qu'en présence d'inoculum fongique, une évolution progressive de la communauté bactérienne s'établit, non évidente dans l'écologie microbienne du sédiment où seule la bio-stimulation a eu lieu.

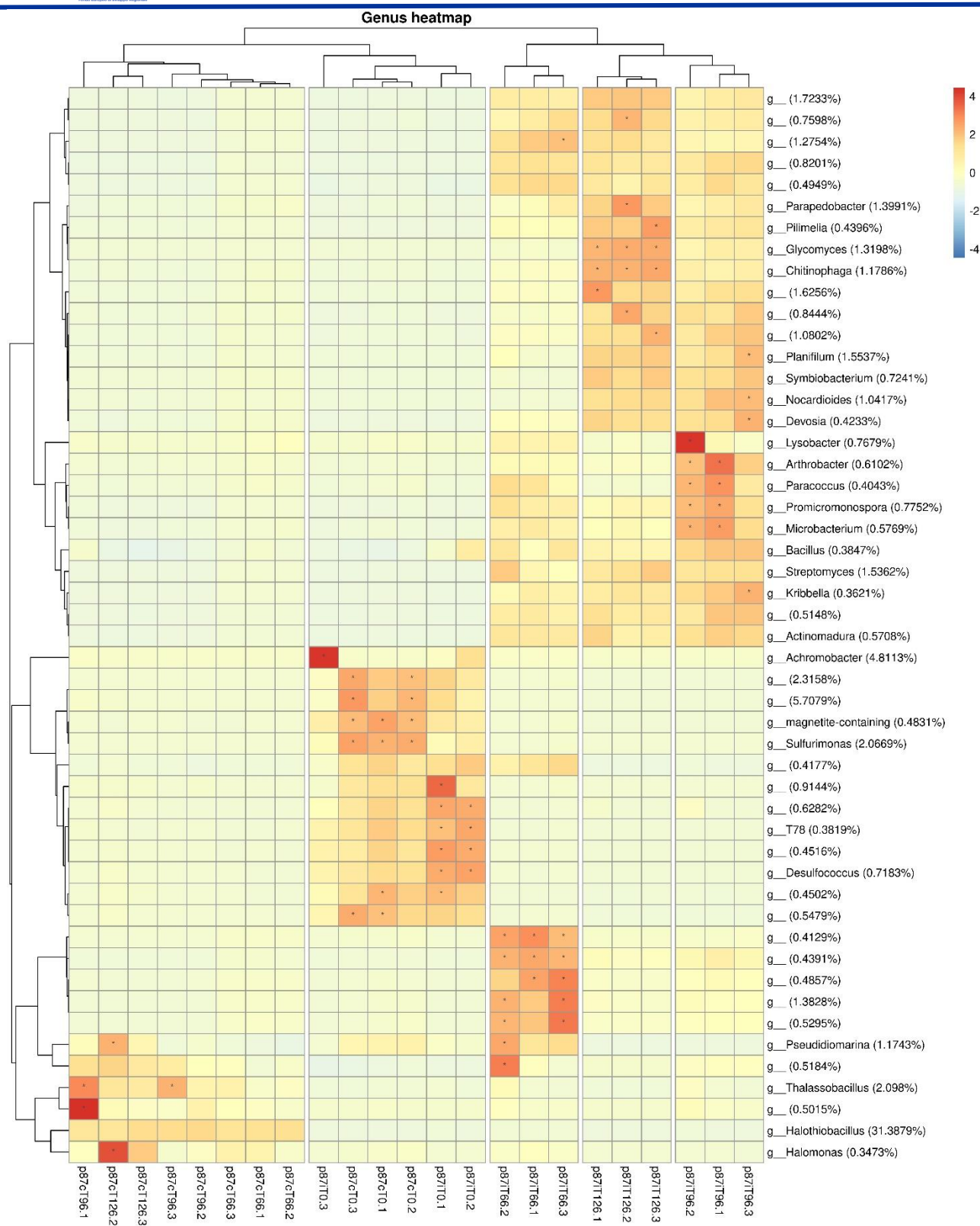


Figure 67 Carte thermique des 50 plus grandes abondances relatives, agrégées au niveau du genre, pour la communauté bactérienne des sédiments p87. La description de la figure est similaire à celle de la figure 66.

Ce qui a été observé dans le sédiment p87 a également été observé dans le sédiment p91 à la fois au niveau de la famille (Figure 68) et au niveau du genre (Figure 69).

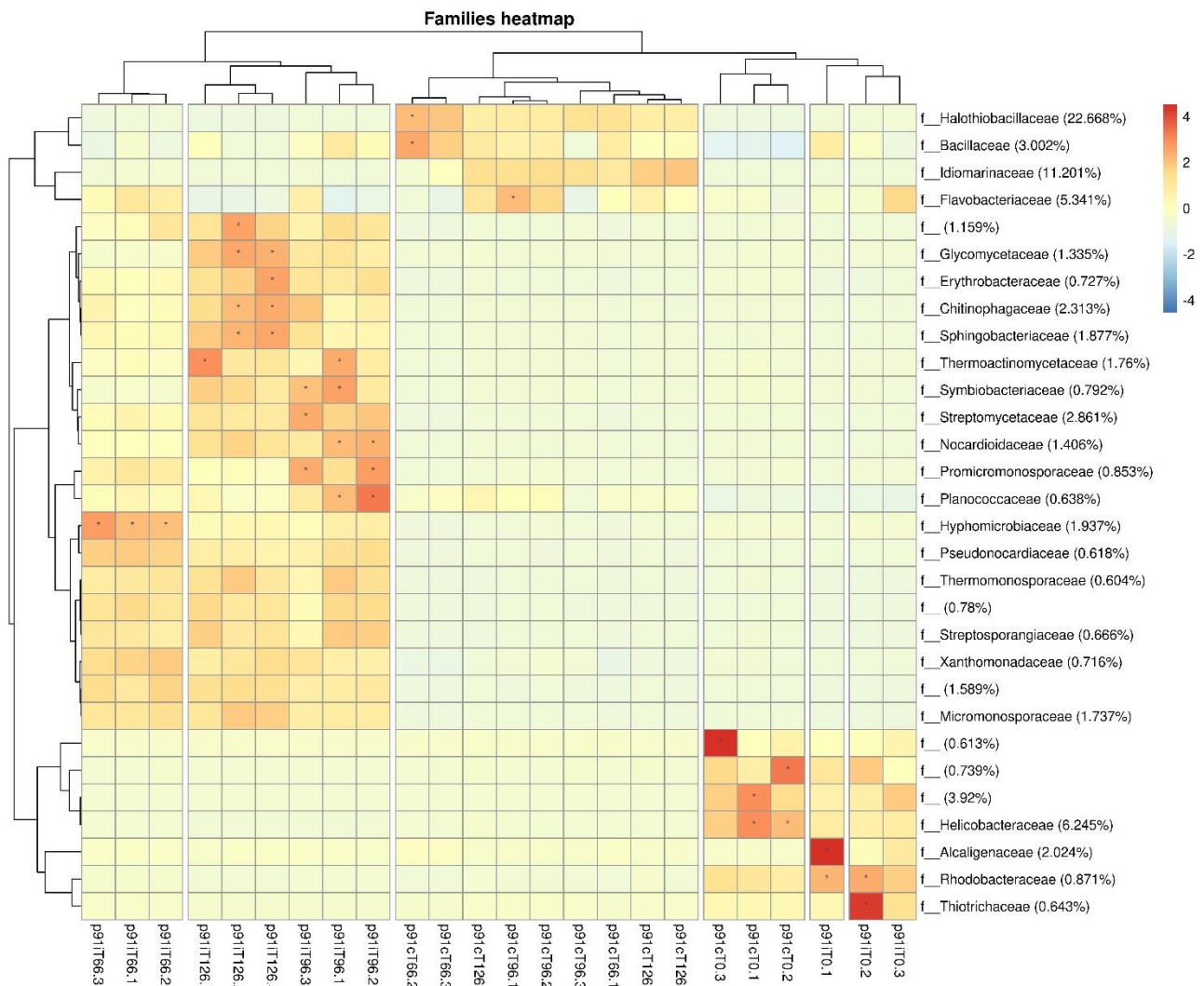


Figure 68 Carte thermique des 30 plus grandes abondances relatives, agrégées au niveau familial, pour la communauté bactérienne du sédiment p91. La description de la figure est similaire à celle de la figure 67.

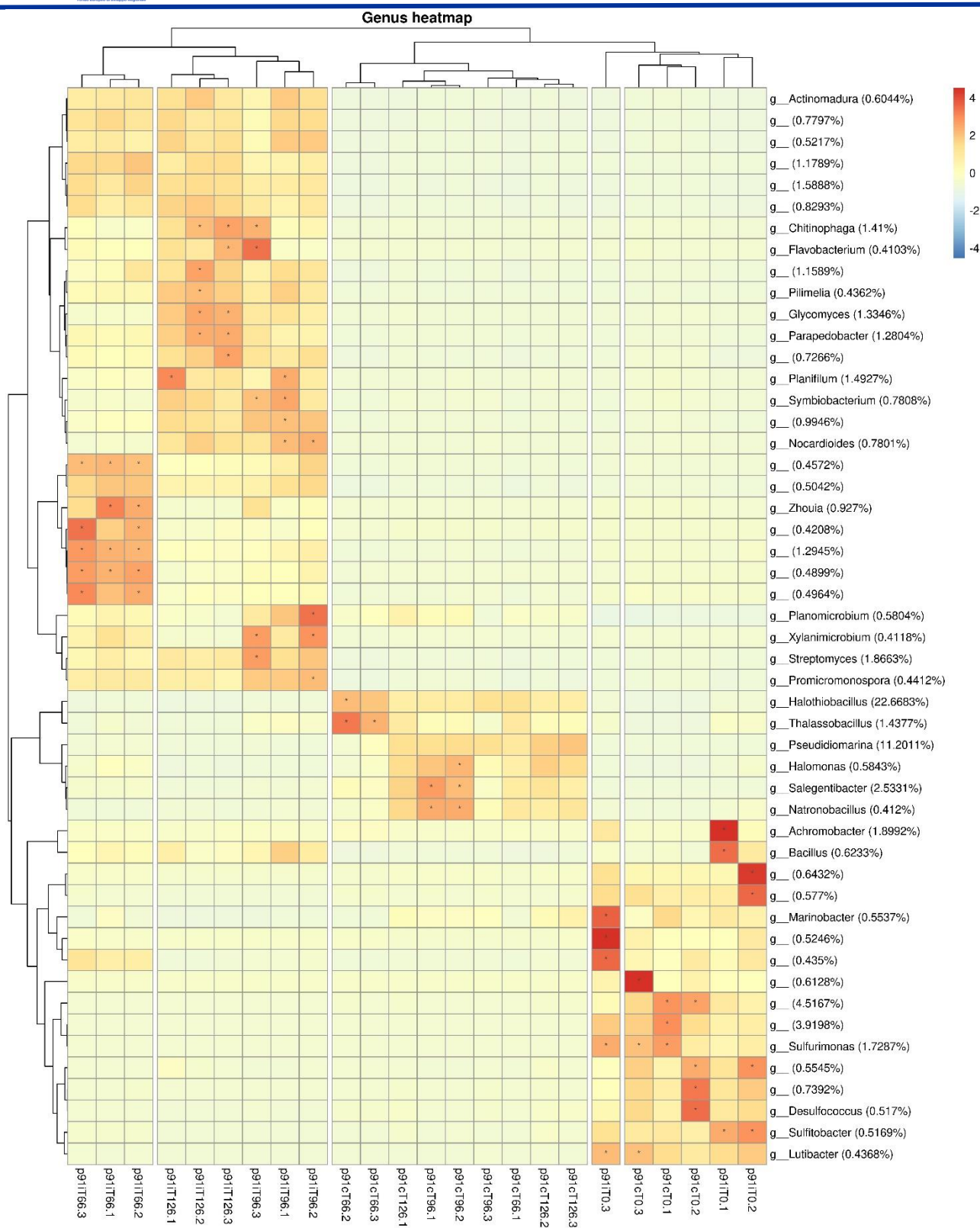


Figure 69 Carte thermique des 50 plus grandes abondances relatives, agrégées au niveau du genre, pour la communauté bactérienne du sédiment p91. La description de la figure est similaire à celle de la figure 67.

Par rapport aux résultats de méta-génomique prédictive obtenus (Figure 70) on observe que la contribution des genres bactériens potentiellement impliqués dans la dégradation des xénobiotiques est significativement plus importante dans les mésocosmes inoculés que dans les mésocosmes non inoculés, avec une contribution plus importante de la communauté bactérienne de le sédiment p87 par rapport au sédiment p91, confirmant ce qui est observé au niveau de l'analyse chimique, à savoir que les cinétiques d'appauvrissement de la contamination sont plus rapides, au moins dans les 66 premiers jours d'incubation, dans le sédiment p87 que dans le p91.

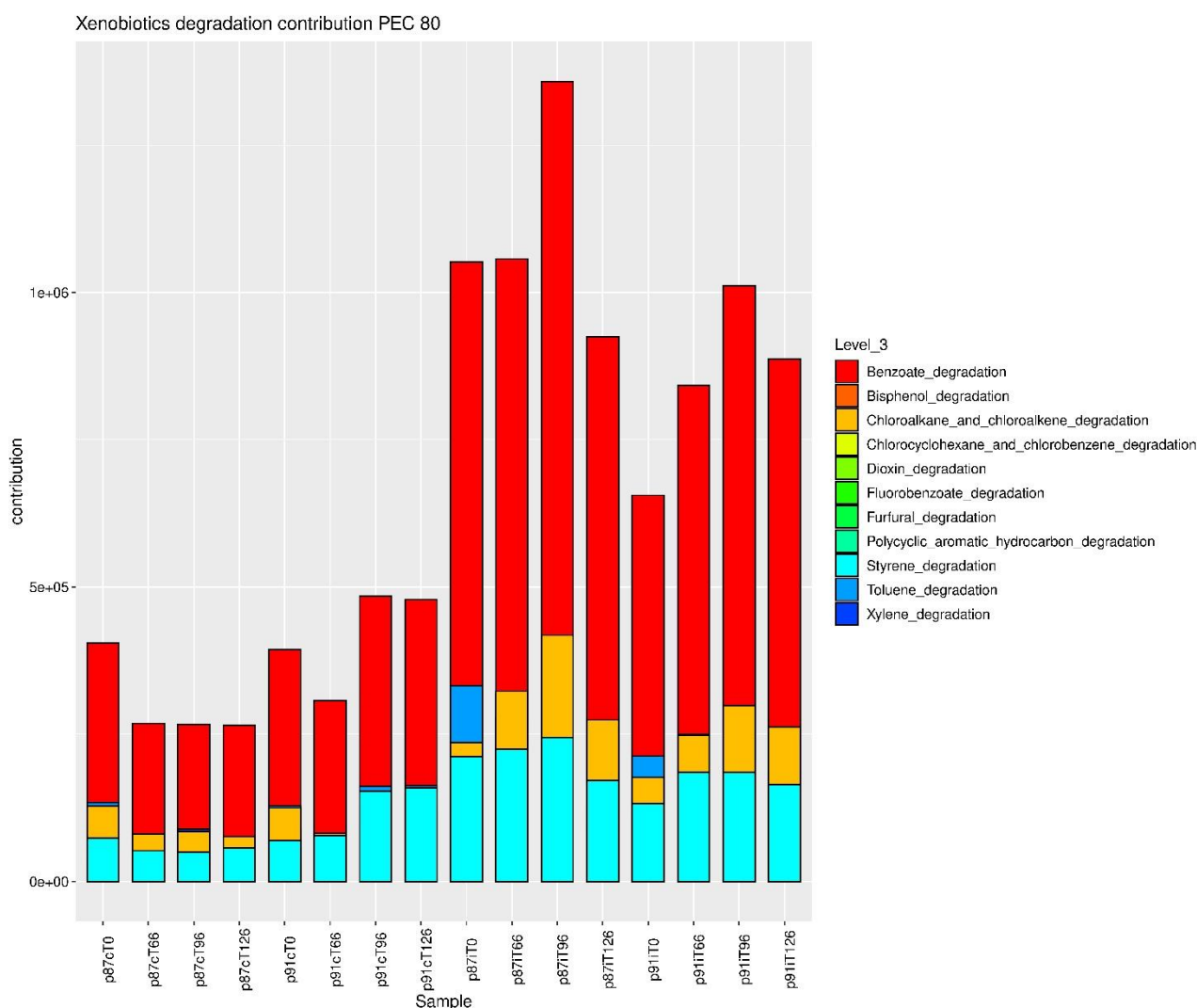


Figure 70 décompte des contributions fonctionnelles dans chaque métagénome, calculé par PICRSt2 et distribué par catégorie de dégradation selon la base de données BRITE

Dans le cadre de la dégradation des polycycliques aromatiques, pourtant présents dans les deux sédiments étudiés, la plus grande contribution des genres bactériens tels que *Glycomyces*, *Streptomyces*, *Nocardioïdes*, *Promicromonospora*, *Pseudonocardia* et *Arthrobacter sps* peut être observée pour le sédiment p81 (Figure 71) des Actinobactéries, dont la contribution n'est pas dominante dans les mésocosmes non inoculés

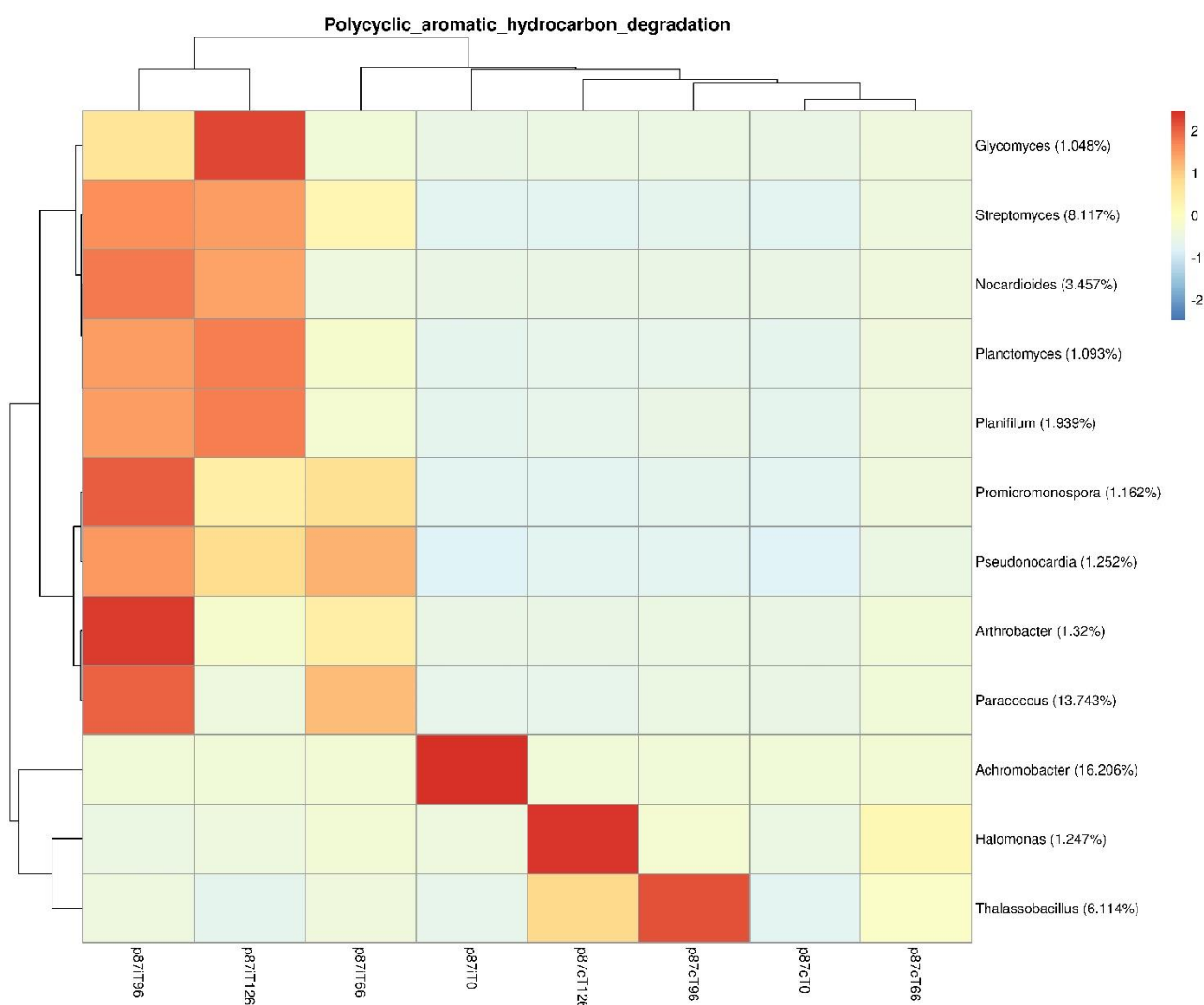


Figure 71 Carte thermique montrant les contributions à la voie de dégradation des composés aromatiques polycycliques par la communauté bactérienne dans le sédiment p81. Ces contributions ont été calculées en excluant les micro-organismes qui contiennent moins de 80% des gènes qui contribuent à la voie susmentionnée. La résolution taxonomique est rapportée au niveau du genre. Les lignes et les colonnes montrent les arbres dérivant d'un regroupement hiérarchique basé sur la corrélation de Pearson des distances euclidiennes. Le schéma de couleurs froid- chaud représente le score z de chaque taxon, calculé par rapport à sa présence dans chaque échantillon. Les pourcentages affichés à côté des noms de taxon représentent les abondances relatives par échantillon sur le total (une valeur Z de zéro représente le pourcentage rapporté).

Une tendance similaire est observée dans le sédiment p91 même si elle est caractérisée par une dominance relative plus faible des Actinobactéries associée à une cinétique de déplétion de contamination, limitée aux *Glycomyces*, *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Pseudonocardia* et *Arthrobacter* sps. Dans les deux sédiments, une contribution importante est attribuable à *Paracoccus* sp.

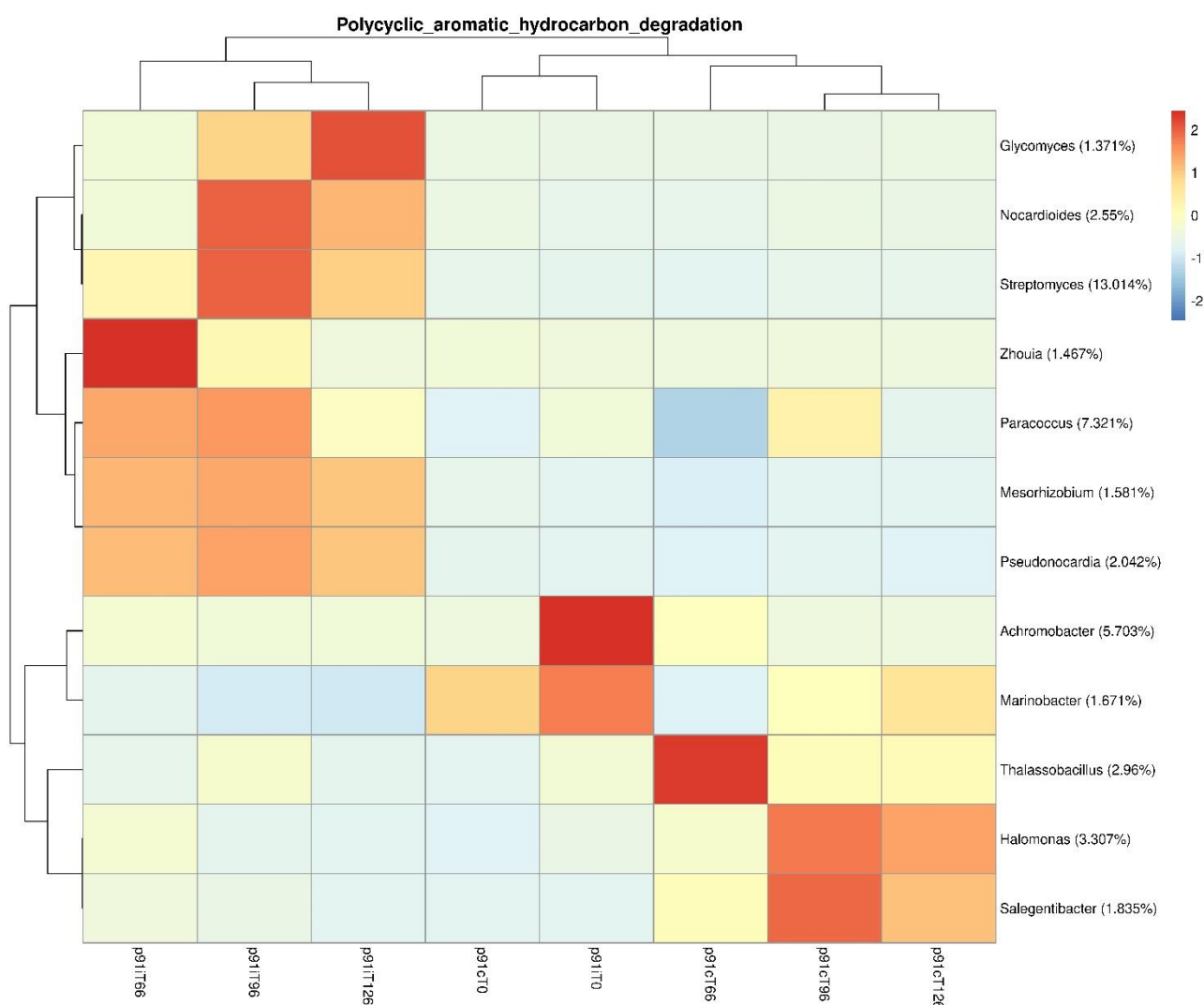
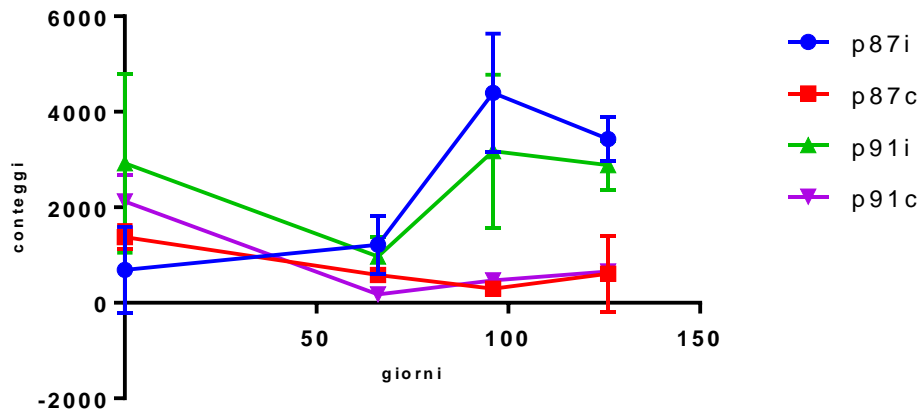


Figure 72 Carte thermique montrant les contributions à la voie de dégradation des composés aromatiques polycycliques par la communauté bactérienne dans le sédiment p91. La description de la figure est similaire à celle de la figure 9.

La figure 73 montre la contribution de la communauté bactérienne au métagénome pour une enzyme clé dans la dégradation aérobie des hydrocarbures lourds : l'alcane 1-monooxygénase (EC : 1.14.15.3). L'alcane 1-monooxygénase semble être responsable de l'attaque initiale de la chaîne aliphatique des hydrocarbures lourds, c'est-à-dire la première des étapes oxydatives qui conduisent à la fragmentation des contaminants aliphatiques en molécules plus légères et plus faciles à métaboliser (Figure 74).

alcano monoossigenasi



Figures 73 contributions métagénomiques à l'alcane 1-monoxygénase (EC : 1.14.15.3) de la communauté bactérienne. Ces données ont été déduites à l'aide de PICRSt2, à partir de la composition taxonomique de la communauté susmentionnée. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95 % de 3 réplicats biologiques.

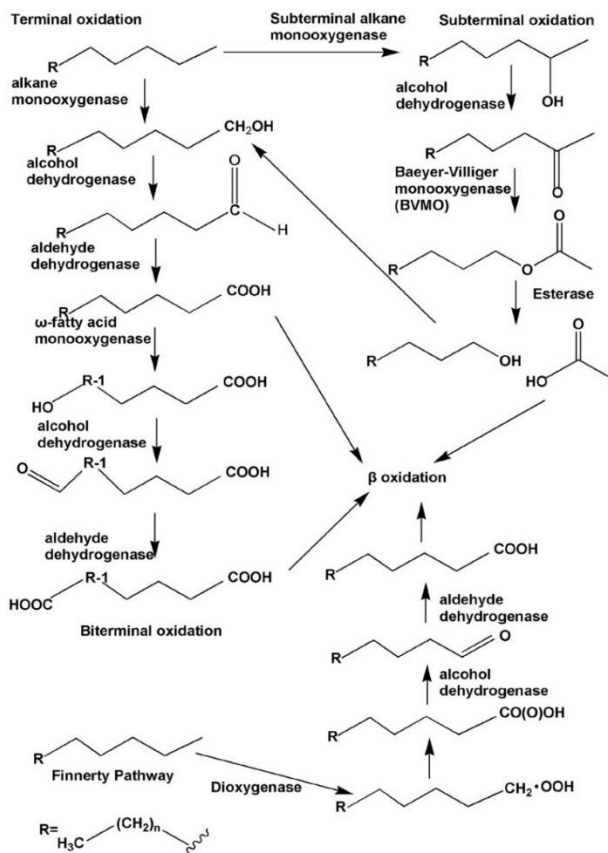


Figure 74 Voies métaboliques bactériennes pour la dégradation des composés aliphatiques tels que les hydrocarbures lourds. L'alcane 1-monooxygénase (EC : 1.14.15.3) catalyse l'attaque initiale de la chaîne aliphatique.

Sur la figure 74, on peut voir comment le nombre d'enzymes EC : 1.14.15.3 est significativement plus élevé dans les échantillons inoculés avec le champignon, suggérant que le métabolisme fongique aide la communauté bactérienne dégradante.

D'autre part, il est évident que la communauté bactérienne autochtone est potentiellement caractérisée par une constitution génétique responsable de la dégradation des hydrocarbures lourds et des HAP qui répondent par une augmentation de la contribution relative dans les mésocosmes inoculés avec le candidat fongique, suggérant une synergie du métabolisme de dégradation qu'il implique à la fois le composant bactérien et fongique. La synergie précitée est raisonnablement responsable de l'accélération des processus de dégradation de la contamination dans les mésocosmes inoculés par rapport aux non inoculés.

Également intéressante est la capacité de la communauté bactérienne à synthétiser des rhamnolipides associée à la présence de dTDP-4 déshydryramnose 3,5-épimérase (EC : 5.1.3.13) (Figure 75), qui participe à la production de rhamnolipides éventuellement produits pour la solubilisation de composés hydrophobes qui, dans le cas de cet essai, sont raisonnablement associés à une contamination.

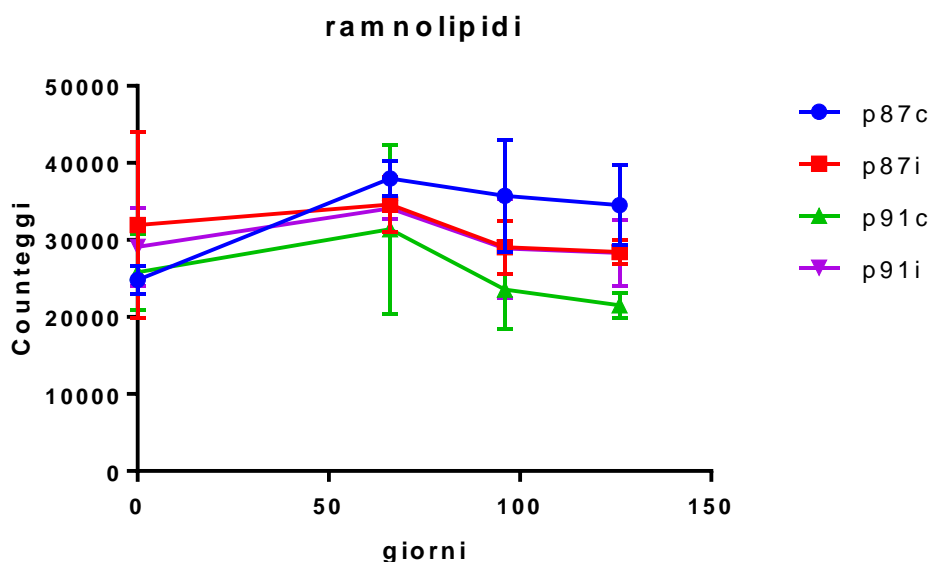


Figure 75 dTDP-4 déshydryramnose 3,5-épimérase (EC : 5.1.3.13) également incluse dans la production de tensioactifs rhamnolipides

En ce qui concerne l'écologie fongique (Figure 76) du sédiment p87, on observe que le genre fongique inoculé est le plus représenté dans le sédiment bio-inoculé et persiste comme tel tout au long du traitement. De plus, l'écologie fongique des sédiments inoculés est distincte de celle des sédiments non inoculés au moins en termes d'espèces dominantes.

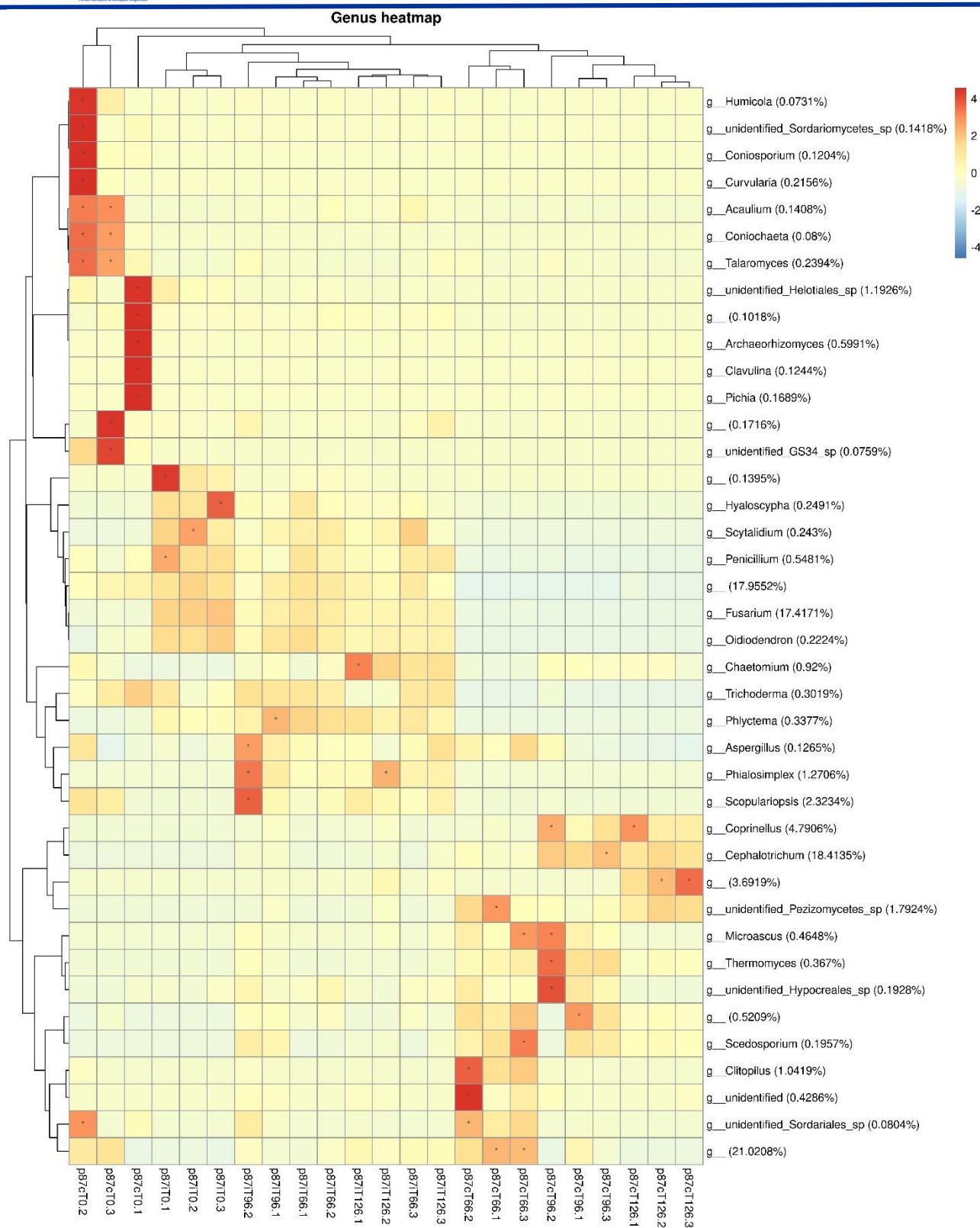


Figure 76 Carte thermique des 40 plus grandes abondances relatives, agrégées au niveau du genre, pour la communauté fongique des sédiments p87. La description de la figure est similaire à celle de la figure 67.

En ce qui concerne le sédiment p91 (Figure 77), on observe que le genre fongique inoculé est cependant dominant dans les sédiments inoculés mais seulement dans la première phase de l'expérimentation, soit jusqu'à 66 jours de traitement. Dans ce cas également, l'écologie fongique des sédiments inoculés est significativement différente de l'écologie microbienne des sédiments non inoculés.

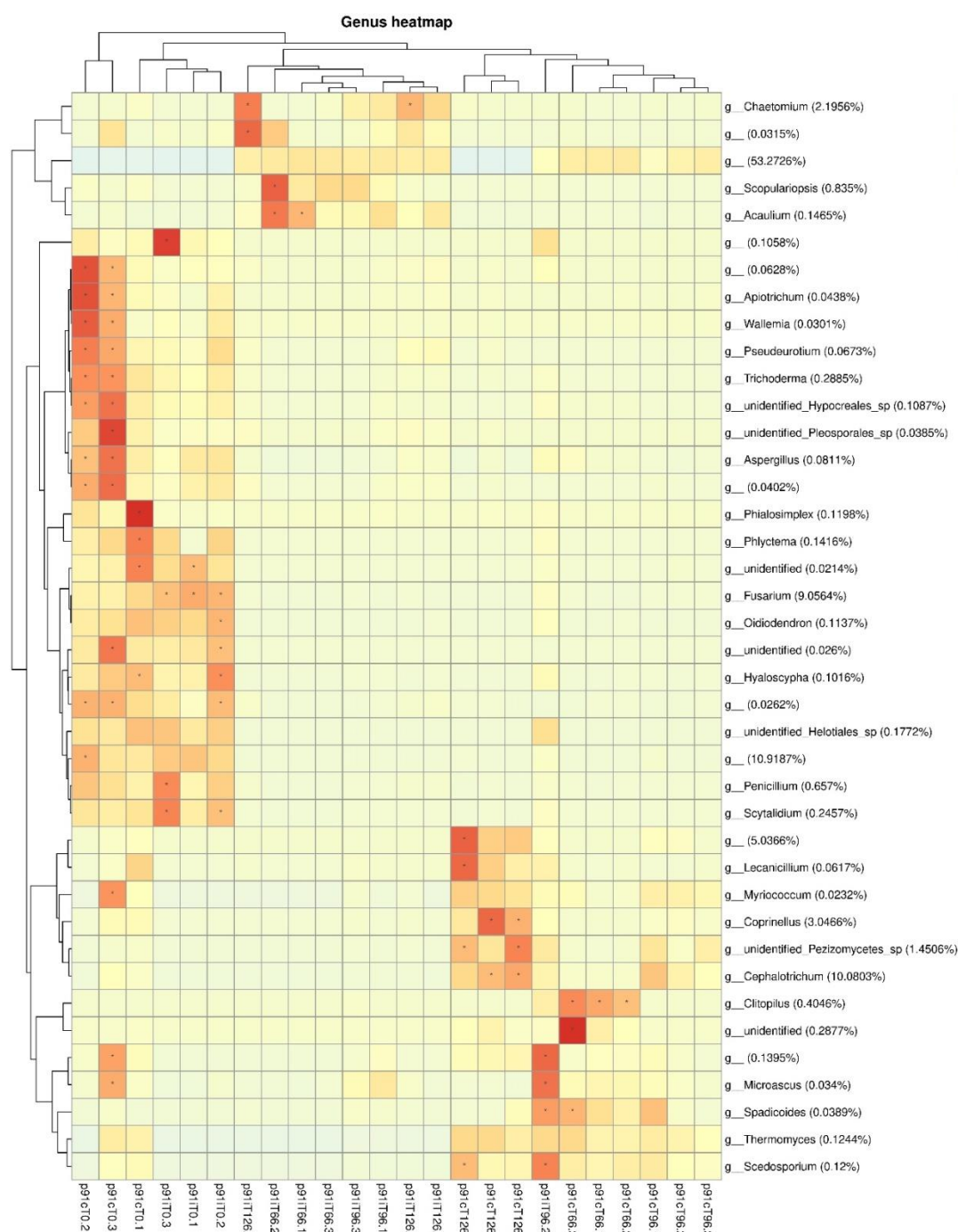


Figure 77 Carte thermique des 40 plus grandes abondances relatives, agrégées au niveau du genre, pour la communauté fongique des sédiments p87. La description de la figure est similaire à celle de la figure 67.

L'écologie fongique observée qui voit une dominance du genre fongique inoculé dans les sédiments correspondants est en corrélation avec la cinétique d'appauvrissement de la contamination observée. La meilleure cinétique correspondant au sédiment p87 est en corrélation avec une dominance prolongée du genre fongique jusqu'à 126 jours, non observée dans le sédiment p91.

En ce qui concerne les genres bactériens, les Actinobactéries sont décrits dans la dégradation des récalcitrants de l'environnement non seulement comme dégradants par des mécanismes intracellulaires, mais aussi éventuellement responsables des processus d'humification de la substance organique qui sont raisonnablement impliqués dans la promotion de l'activité métabolique de tout micro-organisme capable d'utiliser la contamination comme seule source de carbone (Becarelli et al. 2021).

Concernant les bactéries, le genre *Glycomyces* a été isolé des sédiments marins avec l'isolement et l'identification de nouvelles espèces (Mohammadipanah et al. 2018). L'implication dans les processus de dégradation des contaminants organiques est décrite pour la première fois dans ce contexte. Le genre *Glycomyces* est décrit avant tout comme un genre terricole éventuellement aussi présent dans les milieux extrêmes (Guan et al. 2017). De même, le genre *Streptomyces* a été isolé des environnements hypersalins (Fathepure et al. 2014) et a trouvé une utilisation dans les processus d'épuisement de la contamination par les hydrocarbures lourds (Baoune et al. 2019). Le genre *Nocardioide* est déjà décrit comme impliqué dans la dégradation des hydrocarbures lourds (Schippers et al. 2005). Le genre *Promicromonospora* est décrit comme dominant dans les matrices contaminées par des hydrocarbures lourds (Liu et al. 2020), comme observé pour *Pseudonocardia* (Wang et al. 2016) et *Arthrobacter* (Xu et al. 2018).

5.4 Conclusions

En effet, l'approche de mycorémédiation apparaît importante pour accélérer la cinétique de dégradation de la contamination dans les deux sédiments analysés. Le processus de décontamination s'accompagne également de processus d'humification de la substance organique qui justifient une récupération de résilience de la matrice, positivement corrélée à l'augmentation de la biodiversité bactérienne observée lors du processus de mycoaugmentation, distinguant de manière significative les matrices finales. En effet, une augmentation des indices de biodiversité dans les sédiments inoculés est observée. La même tendance n'est pas évidente dans les sédiments non inoculés même si un début du processus de biodégradation de la contamination actuelle est mesurable.

6 Bibliographie

APAT 2007, *Manuale per la movimentazione di sedimenti marini* – Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare, APAT e Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, 2007

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool". In: *Journal of molecular biology*, 215(3), pp. 403-410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Baoune H, Aparicio JD, Acuña A, El Hadj-Khelil AO, Sanchez L, Polti MA, Alvarez A. Effectiveness of the *Zea mays*-*Streptomyces* association for the phytoremediation of petroleum hydrocarbons impacted soils. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019 Nov 30;184:109591. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109591. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31514081.

Becarelli, S., I. Chicca, G. Siracusa, S. La China, A. Gentini, R. Lorenzi, Gi. Munz, G. Petroni, D.B. Levin and S. Di Gregorio (2019). "Hydrocarbonoclastic Ascomycetes to enhance co-composting of total petroleum hydrocarbon (TPH) contaminated dredged sediments and lignocellulosic matrices". In: *New biotechnology* 50, pp. 27-36. DOI: 10.1016/j.nbt.2019.01.006

Chaudhary, D. K., and J. Kim (2018). "*Flavobacterium naphthae* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil". In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(1), pp. 305-309. DOI: 10.1099/ijsem.0.002504

Chaudhary, D. K., D. U. Kim, D. Kim, and J. Kim (2019). "*Flavobacterium petrolei* sp. nov., a novel psychrophilic, diesel-degrading bacterium isolated from oil-contaminated Arctic soil". In: *Scientific reports*, 9(1), pp. 1-9. DOI: 10.1038/s41598-019-40667-7

Dashti, N., N. Ali, S. Salamah, M. Khanafer, G. Al-Shamy, H. Al-Awadhi, and S. S. Radwan, (2019). "Culture-independent analysis of hydrocarbonoclastic bacterial communities in environmental samples during oil-bioremediation". In: *MicrobiologyOpen*, 8(2):e00630, DOI: 10.1002/mbo3.630

Fathpure BZ. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Front Microbiol.* 2014 Apr 23;5:173. doi: 10.3389/fmicb.2014.00173. PMID: 24795705; PMCID: PMC4005966.

Gauthier, M. J., B. Lafay, R. Christen, L. Fernandez, M. Acquaviva, P. Bonin, and J. C. Bertrand (1992). "*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium". In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42(4), pp. 568-576. DOI: 10.1099/00207713-42-4-568

Guan TW, Xiang HP, Wang PH, Tian L, Tang SK, Zhao SX, Zhang XC. *Glycomyces xinjiangensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a hypersaline habitat. *Arch Microbiol.* 2017 Nov;199(9):1231-1235. doi: 10.1007/s00203-017-1392-z. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28573482

- Hwang, C. Y., M. H. Kim, G. D. Bae, , G. I. Zhang, Y. H. Kim, and B. C. Cho (2009). “*Muricauda olearia* sp. nov., isolated from crude-oil-contaminated seawater, and emended description of the genus *Muricauda*”. In: International journal of systematic and evolutionary microbiology, 59(8), pp. 1856-1861. DOI: 10.1099/ij.s.0.007708-0
- Iannelli, R., M. Masi, A. Ceccarini, M. Ostuni, R. Lageman, A. Muntoni, D. Spiga, A. Poletti, A. Marini, and R. Pomi (2015). “Electrokinetic remediation of metal-polluted marine sediments: experimental investigation for plant design”. In: Electrochimica Acta 181, pp. 146–159. DOI: 10.1016/j.electacta.2015.04.093.
- Iannelli, R., M. Masi, and A. Ceccarini (2016). “Gestione e trattamento degli elettroliti nella bonifica elettrocinetica di matrici contaminate da metalli pesanti”. In: Ingegneria dell’Ambiente 3.2, pp. 140–152. DOI: 10.14672 /ida.v3i2.466.
- ICRAM (2006). Progetto preliminare di bonifica dell’area marina inclusa nella perimetrazione del sito di bonifica di interesse nazionale di Livorno. Tech. rep., p. 134.
- Jurelevicius, D., V. M. Alvarez, J. M. Marques, L. R. F. de Sousa Lima, F. de Almeida Dias, and L. Seldin. (2013). “Bacterial community response to petroleum hydrocarbon amendments in freshwater, marine, and hypersaline water-containing microcosms”. In: Applied Environmental Microbiology, 79(19), pp. 5927-5935. DOI:
- Kostka, J. E., O. Prakash, W. A. Overholt, S. J. Green, G. Freyer, A. Canon, J. Delgadino, N. Norton, T.C. Hazen, and M. Huettel (2011). “Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill”. In: Applied Environmental Microbiology 77(22), pp. 7962-7974 DOI: 10.1128/AEM.05402-11
- Lageman, R and WPool (2009). “Experiences with field applications of electrokinetic remediation”. In: Electrochemical Remediation Technologies for Polluted Soils, Sediments and Groundwater, C. Cameselle and K. R. Reddy. John Wiley & Sons, Inc., pp. 697–717. DOI: 10.1002/9780470523650.ch7.
- Lageman, R, W Pool, and G. A. Seffinga (1989). “In-Situ Bodensanierung durch elektrokinetischen Schadstofftransport”. In: Sanierung kontaminierter Standorte. Ed. by E. S. Verlag. Vol. 33. Abfallwirtschaft in Forschung und Praxis. Berlin, Germany, pp. 255–282.
- Liu H, Gao H, Wu M, Ma C, Wu J, Ye X. Distribution Characteristics of Bacterial Communities and Hydrocarbon Degradation Dynamics During the Remediation of Petroleum-Contaminated Soil by Enhancing Moisture Content. Microb Ecol. 2020 Jul;80(1):202-211. doi: 10.1007/s00248-019-01476-7. Epub 2020 Jan 18. PMID: 31955225.
- Linee Guida SNPA 18/2018. Analisi granulometriche dei sedimenti marini. Romano E., Ausili A., Bergamin L., Celia Magno M., Pierfranceschi G., Venti F., 2018.
- Lozupone, C., M. E. Lladser, D. Knights, J. Stombaugh, and R. Knight (2011). “UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison”. In: The ISME journal, 5(2), pp. 169-172. DOI: 10.1038/ismej.2010.133

Kyung-Jo Kim, D-H Kim, J-C Yoo, K. Baek (2011). *Electrokinetic extraction of heavy metals from dredged marine sediment* – In: Separation and Purification Technology 79, pp. 164-169. DOI: 10.1016/j.seppur.2011.02.010

Masi, M. and R. Iannelli (2015). "Trattamento elettrocinetico di sedimenti di dragaggio portuale contaminati da metalli pesanti: il progetto life+ "SEKRET"". In: Ingegneria dell'Ambiente 2.2, pp. 45–58. DOI: 10.14672 /ida.v2i2.334.

Mohammadipanah F, Atasayar E, Heidarian S, Wink J. *Glycomyces sediminimaris* sp. nov., a new species of actinobacteria isolated from marine sediment. Int J Syst Evol Microbiol. 2018 Jul;68(7):2357-2363. doi: 10.1099/ijsem.0.002847. Epub 2018 Jun 5. PMID: 29869980.

Quaderno ICRAM "Aspetti tecnico-scientifici per la salvaguardia ambientale nelle attività di movimentazione dei fondali marini: dragaggi portuali". Gennaio 2002

Romauld, S. I., R. Venkataraghavan, D. Yuvaraj, V. I. Devi, and S. Hashika (2019). "Mycoremediation of Hydrocarbon and its products using *Fusarium oxysporum*". In: Research Journal of Pharmacy and Technology, 12(9) pp. 4216-4224. DOI: 10.5958/0974-360X.2019.00725.X

Siracusa, G., S. Becarelli, R. Lorenzi, A. Gentini, and S. Di Gregorio (2017). "PCB in the environment: bio-based processes for soil decontamination and management of waste from the industrial production of *Pleurotus ostreatus*". In: New biotechnology 39, pp. 232-239. DOI: 10.1016/j.nbt.2017.08.011

Schippers A, Schumann P, Spröer C. *Nocardioides oleivorans* sp. nov., a novel crude-oil-degrading bacterium. Int J Syst Evol Microbiol. 2005 Jul;55(Pt 4):1501-1504. doi: 10.1099/ijs.0.63500-0. PMID: 16014472.

Wang H, Wang B, Dong W, Hu X. Co-acclimation of bacterial communities under stresses of hydrocarbons with different structures. Sci Rep. 2016 Oct 4;6:34588. doi: 10.1038/srep34588. PMID: 27698451; PMCID: PMC5048299.

Xu X, Liu W, Tian S, Wang W, Qi Q, Jiang P, Gao X, Li F, Li H, Yu H. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. Front Microbiol. 2018 Dec 3;9:2885. doi: 10.3389/fmicb.2018.02885. PMID: 30559725; PMCID: PMC6287552.

6.1 Réglementation

