Compte rendu :
Projet “Dépol Decaz”

Travail réalisé par : les élèves de seconde, 1ère STL/STI et Terminale S participant à l’Atelier Scientifique et Technique (AST) “Dépol Decaz” dans le cadre du concours “C.Génial” 2018

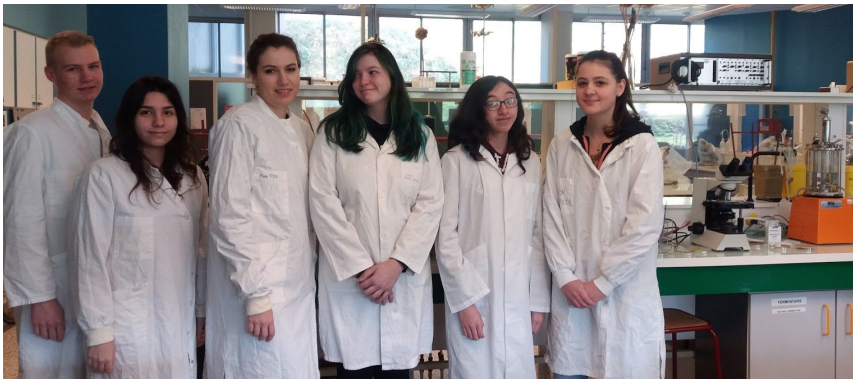
Avec la participation financière et l’aide de :

Vidéo C.Génial 2018 : http://dai.ly/x6fn42z

Résumé

En 150 ans d'activité minière et industrielle le bassin decazevillois a subi une importante pollution. Les scories et les rejets atmosphériques chargés en plomb, cadmium, zinc et arsenic se sont déposés sur les sols des jardins et les cours d'eau. A long terme la consommation des légumes pollués peut entraîner, pour le plomb un retard du développement nerveux et un saturnisme chez l'enfant, pour le cadmium des atteintes rénales et pour l'arsenic des cancers.
Notre objectif est de trouver des techniques pour dépolluer le sol des jardins des habitants du bassin et l'eau d'arrosage pour leur permettre de cultiver et consommer leur production sans danger pour leur santé.
Après détection de la pollution, des expériences de phytoextraction et de dépollution par les microorganismes ont été mises en oeuvre et l'eau d'arrosage a été dépolluée par filtration. Les déchets d'extraction sont ensuite valorisables comme catalyseur dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique.

Travail réalisé par les élèves de l'Atelier Scientifique et Technique (AST) :



- Anna ANGLADE 2nd
- Audrey VALERY 2nd
- Anna DOS SANTOS-TAVARES 1STL
- Estelle SANCHEZ 1STI
- Malaury PADILLA TS SVT
- Hugo CALMELS TS SVT

Projet piloté par : Stéphanie Mas professeur de biotechnologie en microbiologie et génie fermentaire accompagnée de Marie France Salvan professeur de biotechnologie en biochimie, Brigitte Maurel professeur de biotechnologie en biologie cellulaire et Bros Christel professeur de biotechnologie en biologie analytique

En collaboration avec :

- Annie Vivies initiatrice du projet en 2011 alors chargée de médiations scientifiques à l'INP Institut National Polytechnique de Toulouse et présidente de l'association Pratics-Cnam,
- les chercheurs de l'INP dont Philippe Behra professeur des universités pour les ateliers scientifiques, Jean Kallerhoff pour la découverte du projet de recherche "Déplass Métaux" et un doctorant de l'Université Paul Sabatier.
- les entreprises : Aveyron labo, Valgo, Umicore, le Musée de la mine Aubin, la communauté des communes de Decazeville-Aubin.

Liens vers le projet dans l'ENT du lycée la découverte :

Présentation du projet :
http://decouverte.entmip.fr/projets-et-culture/projet-impact-activite-humaine-sur-la-nature/

Blog :
http://decouverte.entmip.fr/projets-et-cultures/projet-impact-activite-humaine-sur-la-nature/blog-atelier-scientifique-et-technique-depol-decaz-/

SOMMAIRE

Résumé

Introduction

1. Bassin de Decazeville Aubin : 150 ans de passé industriel “du charbon à la pollution”

2. Conséquences de la pollution sur la santé “ du jardin à l’assiette”
    2.1. Jardin pollué : Comment ? Par quoi ?
    2.2. A l’assiette : Pourquoi ? Quels risques pour la santé ?

3. A chaque problème sa solution
    3.1. De la détection et à la dépollution de l’eau d’arrosage
        3.1.1. Comment détecter la pollution dans l’eau?
        3.1.2. Comment dépolluer l’eau pour l’arrosage?
        3.1.3. Comment faire un dosage précis du plomb dans l’eau?
            3.1.3.1. Principe de la méthode de dosage du plomb par complexométrie
            3.1.3.2. Mode opératoire de la méthode de dosage
            3.1.3.3. Exploitation des résultats expérimentaux : détermination de Cpb2+
            3.1.3.4. Résultats et interprétation des analyses menées sur l’eau
            3.1.3.5. Détermination de la limite de sensibilité de la méthode de dosage
            3.1.3.6. Visite du laboratoire “Aveyron Labo” et dosage par ICP/AES et ICP/MS
    3.2. De la détection à la dépollution des sols des jardins privés
        3.2.1. Évaluation du niveau de contamination des sols
        3.2.2. Quelles techniques de dépollution peuvent être utilisées pour dépolluer la terre ? Laquelle semble la plus efficace pour dépolluer les jardins privés ?
        3.2.3. La phytoextraction « arme végétale et microbiologique contre la pollution »
            3.2.3.1. Expérience de phytoextraction par culture in vitro des graines de tabouret
            3.2.3.2. Etude de l’implication des microorganismes dans la dépollution
        3.2.4. Blob et métaux lourds : Physarum polycephalum, peut-il être acteur de la dépollution?
            3.2.4.1. Blob party 1 : Expérience “avoine contaminé”
            3.2.4.2. Blob party 2 : Expérience “bar gélose à l’avoine plombé”
            3.2.4.3. Blob party 3 : Expérience “ponts vers avoine plombé”

4. La valorisation des déchets « un vrai trésor industriel »

Conclusion et perspectives

Introduction

A travers notre projet nous nous sommes intéressés à la pollution de notre bassin. Né en 1826, il a connu un essor minier important avec l'exploitation du charbon entraînant une épopée industrielle. Après 150 ans d'activité industrielle et minière le bassin garde l'empreinte d'un passé peu soucieux de l'impact de l'activité de l'homme sur la nature. Aujourd'hui encore les sols des jardins, sont pollués par des éléments traces métalliques aussi appelés "métaux lourds" empêchant les habitants de cultiver leurs fruits et légumes sans danger pour leur santé, d'autant que l'eau des puits et cours d'eau utilisée pour arroser les jardins est également contaminée.

Depuis le début du projet en 2011, nous essayons, de mettre en évidence la pollution avec une technique suffisamment sensible, de trouver des techniques pour dépolluer les sols cultivés et l'eau utilisée pour arroser les jardins privés tout en valorisant les déchets.

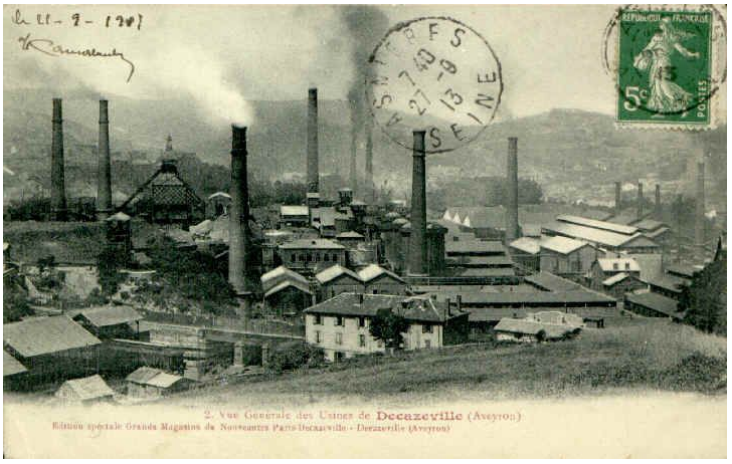
Nous avons bien avancé sur l'aspect dépollution de l'eau (milieu peu complexe) grâce au travail mené avec les chercheurs de l'INP en Atelier Scientifique et technique (AST), la technique de filtration sur charbon actif s'est avérée la plus efficace des techniques testées.

Cette année nous avons confirmé les résultats des expériences menées précédemment avec la détermination de la limite de sensibilité de la technique de dosage quantitatif par complexométrie. Nous avons également continué à étudier les processus de dépollution de la terre par phytoextraction et à l'aide de microorganismes. Enfin, nous avons exploré une nouvelle piste de dépollution avec *Physarum polycephalum*, plus communément prénommé "Blob".

Notre projet, innovant, met en oeuvre une dépollution "verte" à l'aide des plantes et des microorganismes ; A terme, il vise à la valorisation des déchets de phytoextraction et de filtration par écocatalyse. A l'heure où les stocks de "métaux lourds" naturels s'épuisent et sont difficiles à extraire, l'utilisation des métaux accumulés dans les plantes comme catalyseurs "écologiques" dans l'industrie du médicament pour la synthèse de molécules anticancéreuses, d'agents antiviraux… et dans la cosmétique permettrait à la fois de se débarrasser d'un déchet toxique et de recycler une ressource rare.

1. Bassin de Decazeville Aubin : 150 ans de passé industriel "du charbon à la pollution"

Le bassin de Decazeville-Aubin a été fortement pollué en 150 ans d'activité industrielle et minière par la combustion du charbon et l'extraction des minerais de fer et de zinc. Durant cette période deux types de pollutions ont été émises : les scories et les rejets atmosphériques contenant des éléments traces métalliques (ETM) aussi appelés "métaux lourds". Ces émissions ont contaminé l'ensemble du bassin (eau et sol) en zinc, plomb, cadmium présents dans les minerais et en arsenic issu du charbon.



2. Conséquences de la pollution sur la santé “ du jardin à l’assiette”

Hypothèses 1 : Du jardin pollué à l’assiette
Jardin pollué : Comment ? Par quoi ? A l’assiette : Pourquoi ? Quels risques pour la santé ?

2.1. Jardin pollué : Comment ? Par quoi ?

Après la fermeture des mines, les rejets de polluants dans l'atmosphère ont cessé. Mais aujourd'hui, des analyses montrent que les fruits et légumes des jardins privés contiennent encore d'importantes quantités de “métaux lourds” et l’eau utilisée pour arroser les jardins est également contaminée ce qui empêche les habitants de cultiver leurs fruits et légumes sans danger pour leur santé.

2.2. A l’assiette : Pourquoi ? Quels risques pour la santé ?

Suite à des analyses du sol du bassin. L'Institut National de Recherche Agronomique (INRA), chargée de l’expertise a conclu que les jardins de la commune montraient des contaminations importantes des sols de surface en arsenic, cadmium, plomb et zinc. Pour ces métaux, ils ont mesuré leur concentration dans les légumes et les fruits des jardins.

Nous avons donc cherché à analyser quelques documents fournis dans l’étude “Cassiopée (cadmium et arsenic dans les sols : impact observé sur une population exposée)” publiée en Octobre 2008 pour se faire une idée de l’importance de la pollution (tableau 1 : extrait de la page 12) .

Tableau 1 : synthèse des résultats des analyses de végétaux pour le Cadmium (Cd) Viviez-Aveyron

	Salade mg/kg	Tomate mg/kg	Radis mg/kg	Haricots mg/kg	Carotte mg/kg	Courgette mg/kg	Poireaux mg/kg
Nombre	9	8	5	10	6	4	5
Minimum	0.12	0.028	0.07	0.007	0.01	0.005	0.11
Maximum	1.65	0.102	0.24	0.27	0.43	0.065	1.14
Médiane	0.67	0.055	0.20	0.02	0.14	0.008	0.22
Norme	0.20	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1

Source : INRA Institut National de Recherche Agronomique

Nous avons étudié à l'aide du tableau 1 les résultats obtenus pour le dosage du cadmium (seuls résultats disponibles), pour plusieurs légumes : salade, tomate, radis, haricots, carotte, courgette et poireaux.

Tout d’abord, nous avons comparé les valeurs “médiane” et la norme pour chaque type de légume, ce qui nous a permis de voir que la salade (0.67/0.2 = 3 fois > N), le radis (0.2/0.1 = 2 fois > N) et le poireaux (0.2/0.1 = 2 fois > N) contiennent des concentrations 2 à 3 fois supérieures à la norme (N).

Puis, nous nous sommes intéressés aux valeurs “maximum”. Ainsi, nous avons pu constater que les deux légumes les plus “chargés” étaient la salade (1.65/0.2 = 8) 8 fois au dessus de sa norme (0.20 mg/kg) et le poireaux (1.14/0.1=11.4) 11 fois au dessus de sa norme (0.1mg/kg).

Heureusement, pour les valeurs “minimum” tous les résultats obtenus sont inférieurs ou égaux à la norme.

La pollution est plus importante aux abords de l’usine et le relief du bassin a eu une influence sur la dispersion des rejets atmosphériques, tout comme la “pluie” (les précipitations) qui a fait retomber les polluants.

Les polluants qui sont présents dans la terre et l’eau polluent les cultures et les productions qui se retrouvent ensuite dans notre assiette. Nous pouvons donc développer des pathologies en mangeant de la nourriture polluée et en buvant de l'eau polluée. A long terme, l'arsenic peut provoquer des cancers, le plomb peut entraîner le saturnisme, le cadmium peut provoquer des atteintes rénales : Il est donc important de trouver des solutions pour dépolluer le bassin.

3. A chaque problème sa solution

Après avoir fait le constat des dégâts causés par la pollution sur l'organisme vivant nous avons cherché à détecter les polluants puis à dépolluer les eaux et les sols pour que les personnes du bassin puissent de nouveau consommer les fruits et les légumes de leur jardin sans danger pour leur santé.

Hypothèses 2 : A chaque problème sa solution. Quelles techniques de détection et de dépollution utiliser ? Laquelle vous semble la plus efficace pour dépolluer les jardins privés et l'eau d'arrosage et permettre aux habitants de consommer leur production sans dangers pour leur santé ?

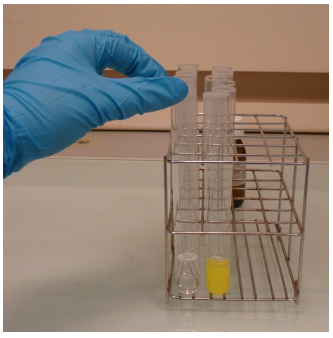
3.1. De la détection et à la dépollution de l'eau d'arrosage

3.1.1. Comment détecter la pollution dans l'eau?

Pour cela, nous avons prélevé plusieurs échantillons d'eau (cours d'eau du Riou Mort, Ligue du Mas (eau stagnante) et de terre aux alentours de l'usine. Nous avons choisi de détecter le plomb qui est plus facile à mettre en évidence avec le matériel disponible au laboratoire.

- **Mise en évidence du plomb dans l'eau avec l'iodure de potassium :**

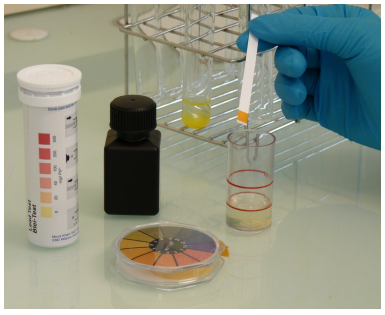
Nous avons utilisé un réactif, l'iodure de potassium, pour mettre en évidence (dosage qualitatif) la pollution par le plomb des échantillons prélevés. L'iodure de potassium (KI) réagit avec le plomb (Pb^{2+}) et forme un précipité d'iodure de plomb (PbI_2) de couleur jaune (voir image ci-après) selon la réaction :



$$Pb^{2+} + 2KI \rightarrow PbI_2 \text{ (précipité jaune)} + 2K^+$$

Suite à ces analyses, la seule eau qui présente un résultat positif pour le plomb est l'eau du site industriel. Pour les autres eaux prélevées à ligue du Mas, le cours d'eau du Riou Mort et l'eau du robinet, il faudrait refaire des tests plus sensibles pour être certain que l'eau ne contient pas de plomb.

- **Bandelette de mise en évidence semi-quantitative du plomb l'eau :**

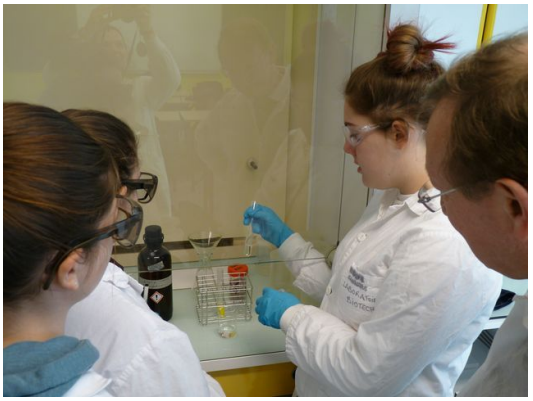


Nous avons commandé des bandelettes de mise en évidence du plomb qui sont plus sensibles (20 à 500 mg/L) et nous avons testé les eaux prélevées. La bandelette contient un réactif l'acide rhodisonique qui, en milieu acide et en présence de plomb, va créer un complexe rouge. Dans ce test, Il faut donc tout d'abord vérifier que le pH de l'eau testée est suffisamment acide (entre 2 et 5) pour une bonne mobilisation des ions pb^{2+}. Puis une fois le pH ajusté avec une solution acide nitrique, on plonge la bandelette 1 seconde dans 5 mL d'échantillon et on attend 2 minutes avant de lire le résultat.

Comme pour le test précédent, la seule eau qui présente un résultat positif pour le plomb est l'eau prélevée près du site industriel : elle contient de l'ordre de 500 $mg.L^{-1}$ de plomb. Pour les eaux prélevées à ligue du Mas, cours d'eau du Riou Mort et pour l'eau du robinet, il faudrait faire un dosage quantitatif pour être certain que l'eau ne contient pas de plomb.

3.1.2. Comment dépolluer l'eau pour l'arrosage?

Après avoir mis en évidence le plomb dans l'échantillon d'eau du site pollué, nous avons essayé de trouver une solution pour le dépolluer avec Philippe Behra, Professeur des universités à Toulouse, et Mme Mas notre professeur de biotechnologie. Nous avons testé plusieurs techniques de filtration : sur charbon actif, sur sable de Fontainebleau et sable de quartz; et nous avons utilisé les bandelettes pour le suivi de filtration.



atelier animé par Philippe Behra Professeur des universités de Toulouse à l'INP

- **sur sable de fontainebleau** : Même après trois filtrations, la concentration en plomb est toujours supérieure à 500 $mg.L^{-1}$ d'eau. Cette technique n'est pas efficace à cause de la silice à la surface des grains de sable qui a peu d'affinité pour le plomb, il s'y fixe mal.

- **sur sable de quartz**, la concentration en plomb est toujours supérieure à 500 $mg.L^{-1}$ d'eau après trois filtrations. Pourtant, le sable de quartz contient à sa surface de l'argile et des impuretés qui devraient permettre de fixer le plomb. Nous avons refait l'expérience et les résultats sont toujours les mêmes. Nous allons donc devoir essayer de comprendre pourquoi l'expérience n'a pas fonctionné.

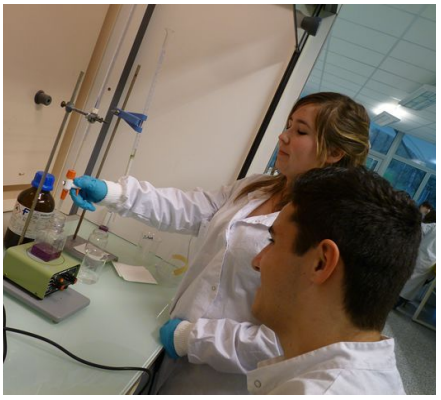
- **sur charbon actif** : On voit une nette différence entre l'eau non filtrée qui contient environ 500 $mg.L^{-1}$ de plomb et l'eau après une première filtration qui contient entre 40 et 100 $mg.L^{-1}$ de plomb. Nous avons donc réalisé une deuxième filtration qui nous a permis d'obtenir une concentration inférieure au seuil de détection des bandelettes qui est de 20 $mg.L^{-1}$ de plomb. Le plomb n'est plus détectable avec les bandelettes, on en conclut que cette technique est efficace pour dépolluer l'eau.

Des trois matériaux, le charbon actif est celui qui absorbe le mieux le plomb car il possède de nombreux site de fixation (site de surface). Dans sa partie organique, il a des groupements carboxyliques qui aident à mieux fixer le plomb ce qui explique son efficacité.

Suite à cette expérience, nous avons voulu connaître la concentration exacte en plomb dans nos échantillons avant et après filtration pour pouvoir comparer les résultats obtenus à la norme. Pour cela nous avons mis au point un dosage volumétrique avec Mme Salvan, professeur de biotechnologie et les doctorants Marina Atgié et Paul Beirnaert.

3.1.3. Comment faire un dosage précis du plomb dans l'eau?

Nous avons mis au point et réalisé un dosage volumétrique du plomb par complexométrie à l'aide de l'EDTA car il est plus sensible que les tests semi-quantitatifs avec bandelettes réalisés précédemment. Nous souhaitions ainsi déterminer la concentration précise en plomb dans les échantillons.



atelier dosage du plomb et zinc animé par Mme Salvan et les doctorants Marina Atgié et Paul Beirnaert

3.1.3.1. Principe de la méthode de dosage du plomb par complexométrie

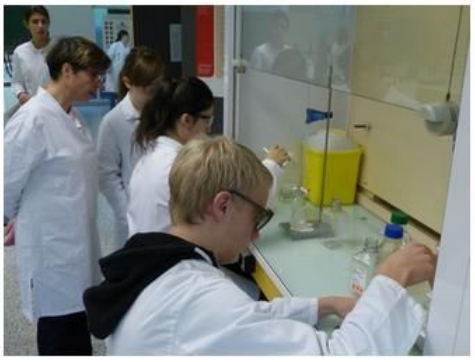
On dose le plomb par complexométrie avec l'EDTA en milieu acide (pH = 5,2). Au début du dosage une infime partie de plomb est complexé à l'indicateur coloré (l'orange de xylénol noté H_2In^{2-}) en donnant une coloration rose selon l'équation de la réaction : $\underset{\text{orange}}{H_2In^-} + Pb^{2+} = \underset{\text{rose}}{Pb\,In^{2-}} + 2\,H^+$

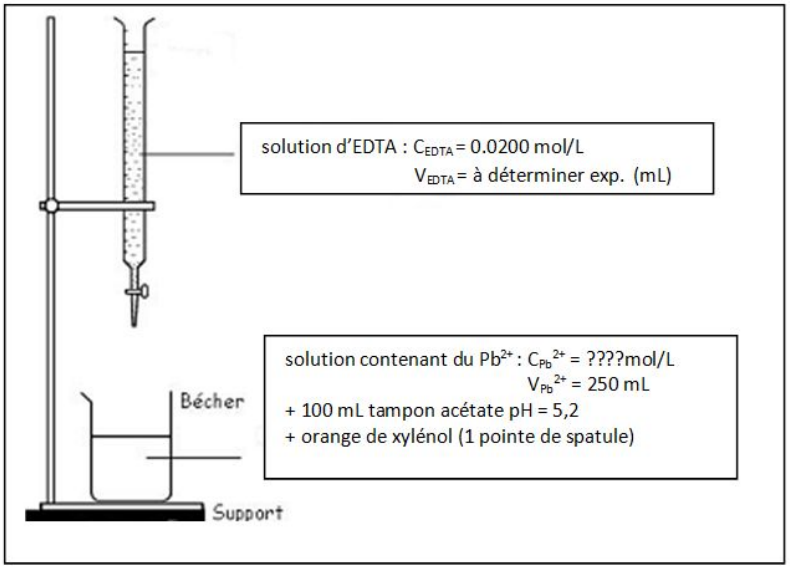
On commence par doser le plomb libre contenu dans l'échantillon et non complexé, grâce à l'EDTA (noté H_2Y^{2-}) versé dans l'échantillon , selon la réaction suivante : $Pb^{2+} + H_2Y^{2-} = PbY^{2-} + 2\,H^+$

La visualisation de la fin du dosage du plomb dans l'échantillon se fait par dissociation du complexe $Pb\,In^{2-}$ qui est peu stable et qui se dissocie grâce à l'EDTA versé qui ne peut plus réagir avec le plomb en solution car celui-ci a déjà été totalement complexé : $\underset{\text{rose}}{Pb\,In^{2-}} + H_2Y^{2-} = \underset{\text{jaune}}{PbY2-} + H_2In^{2-}$

La fin de la réaction est alors obtenue dès l'apparition d'une coloration jaune qui montre l'équivalence.

3.1.3.2. Mode opératoire de la méthode de dosage





Nous avons versé 250 mL de solution pouvant contenir du plomb dans un erlenmeyer et nous avons ajouté 100 mL de tampon acétate pour acidifier le milieu et une pointe d'indicateur (In^{2-}) coloré l'orange de xylénol qui réagit avec une infime partie du plomb et donne un complexe coloré rose. Ensuite avec une burette remplie d'EDTA à 0.0200 $mol.L^{-1}$ nous avons versé l'EDTA jusqu'à l'équivalence où nous avons un virage de l'indicateur coloré du rose au jaune. A partir du volume d'EDTA versé, on a pu calculer la concentration en plomb (Pb^{2+}) dans l'eau testée.

3.1.3.3. Exploitation des résultats expérimentaux : détermination de C_{pb}^{2+}

En simplifiant l'équation de réaction du dosage du plomb, on peut écrire que :

EDTA + Pb^{2+} → [complexe EDTA-plomb]

1 mole d'EDTA complexe 1 mole de Pb^{2+}

donc à l'équivalence, on peut écrire que n EDTA versé = n Pb^{2+} dans l'erlen

or : n EDTA versé = $C_{EDTA} \times V_{EDTA}$ et n Pb^{2+} dans l'erlen = $C_{Pb2+} \times V_{Pb2+}$

donc à l'équivalence : $C_{EDTA} \times V_{EDTA} = C_{(Pb2+,solution)} \times V_{(Pb2+,solution)}$

➨ Détermination de la concentration molaire en Pb^{2+} : $C_{(Pb2+,solution)} = C_{EDTA} \times V_{EDTA} / V_{(Pb2+,solution)}$

mol/L = mol/L x mL / mL

➨ Détermination de la concentration massique ($Cm_{(Pb2+,solution)}$) : $Cm_{(Pb2+,solution)} = C_{(Pb2+,solution)} \times M_{(Pb2+)}$

donc $\mathbf{Cm_{(Pb2+,solution)} = C_{EDTA} \times V_{EDTA} / V_{(Pb2+,solution)} \times M_{(Pb2+)} \times 10^6}$

µg/L = mol/L / L x g/mol

3.1.3.4. Résultats et interprétation des analyses menées sur l'eau

Grâce au dosage par complexométrie nous avons obtenu des résultats de dosage plus précis.

- Pour valider notre technique nous avons commencé par un dosage avec une solution étalon de plomb à 0,001 mol/L qui est aussi un témoin positif. Avec le complexe plomb-In^{2-} (indicateur coloré) nous avons obtenu une coloration rose, il y a donc présence de plomb. La concentration molaire obtenue est de :
$C_{(Pb2+,solution)} = C_{EDTA} \times V_{EDTA} / V_{(Pb2+,solution)} \times 10^6$ = (0.02x12.55/250) = 0,001 mol/L, l'étalon est validé.

- Pour l'eau du site polluée avant filtration sur charbon actif :
Avec le complexe plomb-In^{2-} (indicateur coloré) nous avons obtenu une coloration rose, il y a donc présence de plomb. La concentration massique obtenue est de :
$Cm_{(Pb2+,solution)} = C_{EDTA} \times V_{EDTA} / V_{(Pb2+,solution)} \times M_{(Pb2+)\ g/mol} \times 10^6$ = (0.02x15.8/250) x 207.2 x 10^6 = 261 900 µg/L

- Pour l'eau du site pollué, après deux filtrations sur charbon actif :
Avec le complexe plomb-In^{2-} (indicateur coloré) nous avons obtenu une coloration rose : il y a donc présence de plomb. La concentration massique obtenue est de :
$Cm_{(Pb2+,solution)}$ = (0.02x0.1/250) x 207.2 x 10^6 = 16 576 µg/L

Ce résultat est inférieur à la concentration obtenue avant filtration. La pollution est réduite d'un facteur 16 après deux filtrations, mais le résultat reste bien plus élevé que la norme. Il faudra encore filtrer l'eau sur charbon actif pour pouvoir passer en dessous de la norme qui est de 50 µg/L dans les eaux brutes et pouvoir arroser les jardins sans risque pour la santé.

Nous avons également testé d'autres échantillons (ligue du Mas, cours d'eau du Riou Mort) qui donnent des résultats inférieurs au seuil de détection des bandelettes avec la technique de complexométrie et nous n'avons pas obtenu de complexe coloré rose avec l'indicateur coloré : ces échantillons ne sont pas pollués ou ne contiennent pas une quantité de plomb détectable avec cette méthode de dosage.

Nous avons donc essayé d'ajuster la précision de la méthode et déterminer sa limite de détection.

3.1.3.5. Détermination de la limite de sensibilité de la méthode de dosage

Suite à notre démarche expérimentale et à la mise au point de la technique de dosage du plomb, nous nous sommes questionnés sur les limites de sensibilités de la technique : est-ce que celle-ci nous permettrait de doser des solutions dont les concentrations en plomb sont, d'après la limite réglementaires fixées à 10µg/L.

Nous avons donc choisi de doser d'autres solutions étalons de plomb de concentrations plus faibles que celles testées auparavant (solution d'EDTA (C_{EDTA} = 0.020 mol.L)), en utilisant des solutions d'EDTA de concentrations plus faibles : C_{EDTA} = 0.010 mol.L ou 0,0001 mol/L, pour gagner en sensibilité.

Nous avons testé 3 solutions de plus faible concentration EDTA et 2 solutions étalons de plomb de concentrations plus faibles :

- **sol 1** d'EDTA de C_{EDTA} = 0.001 mol/L pour dosage sol de plomb 1 (de concentration attendue à 9,9 mg/L) pour déterminer la concentration de plomb de la sol 1.
  ➨ $V_{EDTA\ ATTENDU}$ = 12 mL, $V_{EDTA\ OBTENU}$ = 11.2 mL $Cm_{(Pb2+,solution)}$ = 9.28mg/L

- **sol 2** d'EDTA de C_{EDTA} = 0.0001 mol/L pour dosage sol de plomb 2 (de concentration attendue à 50 µg/L) = pour déterminer la concentration de plomb de la sol 2. $V_{EDTA\ ATTENDU}$ = 0,6 mL
  ➨ aucun résultat (même pas de détection du plomb lors de l'ajout de de l'indicateur de fin de réaction)

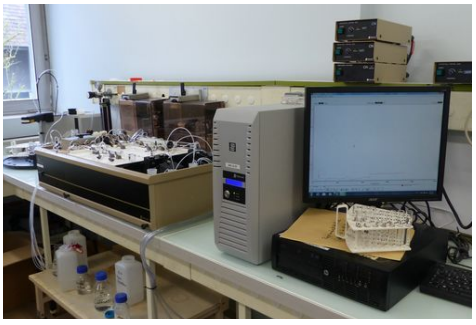
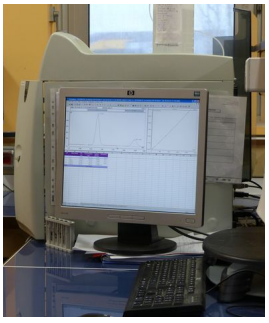
- **sol 3** d'EDTA de C_{EDTA} = 0.00005 mol/L ou 0,05 mmol/L pour dosage sol de plomb 2 (de concentration attendue à environ 50 µg/L) pour déterminer la concentration de plomb de la sol 2. $V_{EDTA\ ATTENDU}$ = 1,2 mL
  ➨ aucun résultat (même pas de détection du plomb lors de l'ajout de de l'indicateur de fin de réaction)

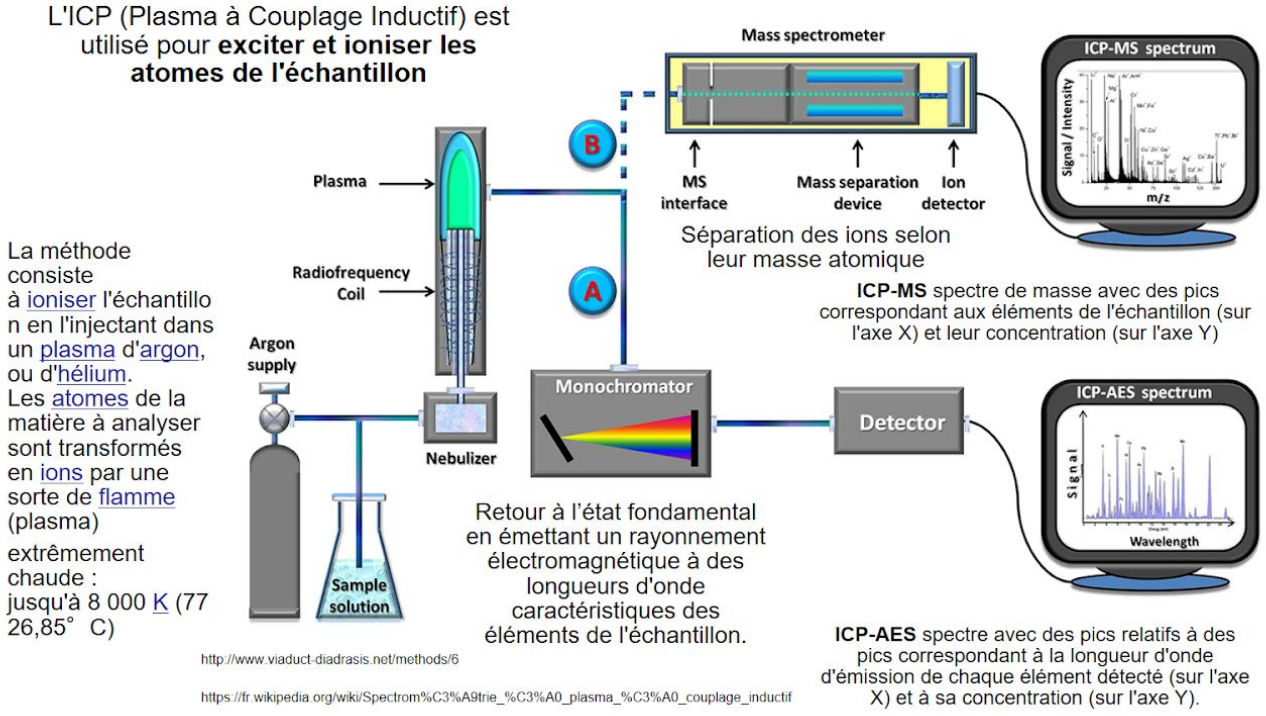
Interprétation des résultats :

On constate qu'il nous est impossible de détecter avec cette méthode une C_{Pb2+} = 50 µg/L : Nous n'arriverons donc pas à détecter des concentrations fixées par la réglementation soit 10µg/L. Il est alors nécessaire de nous intéresser à d'autres techniques de dosage. Pour cela, nous avons visité "Aveyron Labo" le laboratoire départemental d'analyses qui gère les analyses chimiques dont les dosages des métaux lourds dans l'eau.

3.1.3.6. Visite du laboratoire "Aveyron Labo" et dosage par ICP/AES et ICP/MS

Nous avons pu voir qu'il existait des méthodes de dosage du plomb dont la limite de quantification est de 0,1µg/L. Ces méthodes sont l'ICP/AES (Plasma à couplage inductif couplé à la spectrométrie d'émission) et ICP/MS (Plasma à couplage inductif couplé à la spectrométrie de masse).



<u>Perspectives</u> : Malheureusement, ce type de dosage est bien trop coûteux pour nous. Nous allons donc essayer de faire des dosages par photométrie de flamme avec Philippe Behra, professeur des universités au LCA lors de notre séjour scientifique à l'INP de Toulouse le 12 avril 2018 prochain.

3.2. De la détection à la dépollution des sols des jardins privés

3.2.1. Évaluation du niveau de contamination des sols

Nous avons réalisé des tests de mise en évidence de la pollution par le plomb dans la terre mais aucun n'a donné de résultat car le plomb n'est pas disponible ; Il est complexé à la matière organique de la terre et ne peut pas être mis en évidence avec les techniques utilisées pour le dosage dans l'eau : on parle de masquage. Nous avons donc travaillé avec les résultats communiqués dans l'étude Cassiopée.

Après ces premières analyses, la Cire (Cellule interrégionale d'épidémiologie) a conduit une campagne d'analyses des sols plus approfondie (sur 14 paramètres : plomb, cadmium, arsenic, zinc, manganèse, thallium, antimoine, vanadium, cobalt, baryum, mercure, sélénium, nickel, chrome) dans tout le village et le hameau du Crouzet, en novembre 2007, afin d'évaluer la dispersion de la pollution dans les sols des habitations voisines. Les analyses ont aussi été menées sur la commune de Montbazens non exposée. Quatre polluants se sont dégagés comme étant très présents dans les jardins privés : le plomb, le cadmium, l'arsenic et le zinc et les trois premiers ont retenu l'attention de la Cire en raison de leur toxicité (résultats ci-dessous).

extrait page 13-15 de l'étude "Cassiopée (cadmium et arsenic dans les sols : impact observé sur une population exposée)" publiée en Octobre 2008.

http://www.invs.sante.fr/fr../layout/set/print/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Environnement-et-sante/2011/Evaluation-de-l-exposition-a-des-sols-pollues-au-plomb-au-cadmium-et-a-l-arsenic-en-Aveyron

	Plomb (mg/kg)
	labo
nombre de valeurs	51
minimum	43
maximum	24000
médiane	450
valeur de référence Zone non exposée	80

	Cadmium (mg/kg)
	labo
nombre de valeurs	101
minimum	2,4
maximum	180
médiane	27
valeur de référence Zone non exposée	1.25

	Arsenic (mg/kg)
	labo
nombre de valeurs	51
minimum	19
maximum	800
médiane	140
valeur de référence Zone non exposée	48

Tableau 2 : Gamme des concentrations des polluants métalliques les plus répandus dans l'environnement

Tableau de comparaison des valeurs mesurées aux valeurs limites réglementaires (normes) :

Éléments	**Limites réglementaires** en $mg.kg^{-1}$	**Valeurs maximales labo mesurées par la Cire** en $mg.kg^{-1}$	**Conclusion** < : inférieur, > supérieur, N : Norme
Plomb	600	24000	40 fois > N
Cadmium	100	180	2 fois > N
Arsenic	20	800	40 fois > N

sources : Institut supérieure de l'éducation et de la formation continue département des sciences naturelles Bioremédiation / Phytoremédiation SN 232 Professeur : Chedly ABDELLY Année Universitaire 2006/2007

Les analyses de la Cire (tableau 2) nous ont permis de confirmer qu'il y avait une pollution dans les zones d'habitation en comparant les valeurs limites réglementaires avec les valeurs maximales obtenues au laboratoire pour connaître le taux de pollution dans les zones les plus polluées. Nous avons constaté que les taux de cadmium peuvent être 2 fois supérieurs à la norme, le plomb et l'arsenic peuvent être présents en concentration jusqu'à 40 fois supérieure à la norme.

3.2.2. Quelles techniques de dépollution peuvent être utilisées pour dépolluer la terre ? Laquelle semble la plus efficace pour dépolluer les jardins privés ?

Il existe plusieurs techniques de dépollution :

- la phytoremédiation qui utilise la capacité naturelle des plantes à extraire, dégrader ou éliminer les produits chimiques toxiques de l'eau ou des sols.
- la stabilisation à la chaux qui consiste à mélanger la terre polluée avec de la chaux pour que les polluants soient fixés sur une matière minérale ce qui évite leur relargage dans le milieu naturel
- la bio-lixiviation qui permet l'extraction biologique du plomb insoluble grâce à des microorganismes.

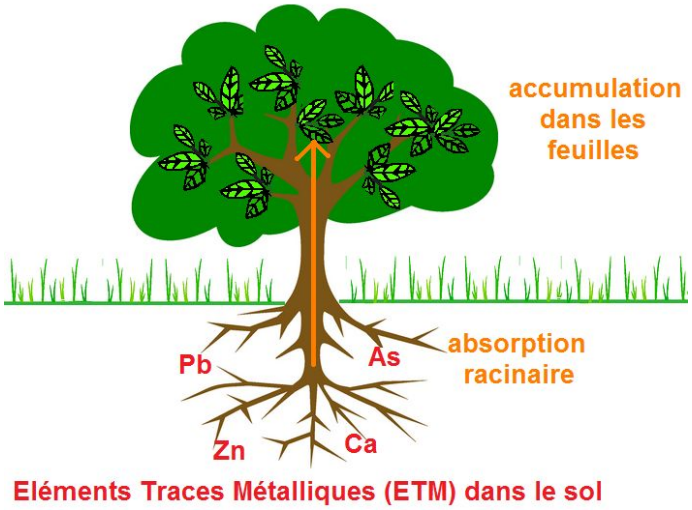
Pour dépolluer les jardins, la technique la plus efficace est la phytoremédiation. Nous avons éliminé la stabilisation à la chaux utilisée sur le chantier Umicore que nous avons visité car elle fixe les polluants mais ne les extrait pas du sol ; nous avons aussi éliminé la bio-lixiviaton car il faudrait enlever la terre des jardins et la traiter dans des usines, ce qui serait beaucoup trop long et coûteux. Nous avons donc choisi la phytoextraction car elle permet de retirer les polluants du sol et c'est la plus facile à mettre en oeuvre.

visite du chantier de remédiation du site industriel Umicore à Viviez : remédiation par confinement et stockage dans une alvéole

3.2.3. La phytoextraction « arme végétale et microbiologique contre la pollution »

En quoi consiste la phytoextraction ? Pourquoi les plantes ont-elles développé cette capacité d'hyperaccumulation ?

La phytoextraction utilise des plantes hyperaccumulatrices de métaux car ce sont des plantes qui se sont adaptées aux sols pollués. Pour pouvoir s'implanter et se développer sur des sols contaminés, elles ont dû évoluer pour devenir résistantes aux "métaux lourds" et pouvoir les capter et les stocker dans leurs feuilles.



le tabouret bleuâtre
(*Thlaspi caerulescens)*

Quelles plantes peut-on utiliser pour dépolluer ?

Pour la phytoextraction des “métaux lourds”, on peut utiliser certaines plantes comme Thlaspi, alyssum ou brassica. Nous avons utilisé la moutarde, le cresson et la roquette et nous avons découvert le tabouret que nous avons récolté aux abords du site Umicore.

sources : Émission FuturMag du 8 novembre 2014 “Dépolluer nos sols grâce aux plantes”

PRINCIPALES PHYTOTECHNOLOGIES

Polluants à traiter	Plantes utilisées	Action
PHYTOSTABILISATION		
Métaux (Pb, Cd, Zn, Cu, As, Cr, Se).	Plantes à racines fibreuses et profondes.	Confinement des polluants par le couvert végétal pour limiter le risque de lessivage et d'envol des polluants.
PHYTOEXTRACTION		
Métaux (Pb, Cd, Zn, Cu), nitrate.	Thlaspi, alyssum, brassica (moutarde).	Extraction des polluants du sol par des plantes accumulatrices dans leurs parties récoltables (feuilles, tiges, racines).
PHYTODÉGRADATION / PHYTOTRANSFORMATION		
Composés organiques, nitrate, phosphate.	Arbres (famille du saule, peuplier), herbes, légumes.	Transformation par la plante de molécules organiques complexes en composés plus simples, intégrés dans les tissus de la plante.
RHIZODÉGRADATION		
Composés organiques, solvants, produits phytosanitaires.	Herbes à racines fibreuses: bermuda, blé, seigle, fétuque.	Dégradation des polluants par les racines et l'activité microbienne qui y est associée.
PHYTOVOLATILISATION/PHYTOSTIMULATION		
Métaux (As, Hg, Se), composés organiques volatils.	Brassica juncea (moutarde), plantes marécageuses.	Volatilisation du polluant absorbé par la plante et éliminé par évapotranspiration.

Est-ce que les plantes dépolluent “toute seule” ?

Selon l’article “l’arme végétale contre la pollution” de Science et vie junior (mai 2013 n°284 pages 58 à 61) , “les plantes ont besoin d’une armée de bactéries et de champignons pour se développer”, elles travaillent en symbiose avec les microorganismes qui vont décrocher les polluants de la terre pour qu’elles puissent les absorber par leurs racines et les stocker dans leurs feuilles.

Combien de temps faut-il pour dépolluer ?

Sachant que la valeur maximale en plomb mesurée au laboratoire par la Cire est de 24 000 mg/kg, et qu’il faut 10 ans pour dépolluer un sol renfermant plus de 2500 mg/kg, il faudra (24000/2500 x 10 = 95 ans) au moins 95 ans pour dépolluer les sols les plus pollués par phytoextraction.

sources : Institut supérieure de l’éducation et de la formation continue département des sciences naturelles Bioremédiation / Phytoremédiation SN 232 Professeur : Chedly ABDELLY Année Universitaire 2006/2007

3.2.3.1. Expérience de phytoextraction par culture in vitro des graines de tabouret

Depuis l’an dernier nous expérimentons la culture in vitro de graines de tabouret l’occasion pour nous de mettre un pied en BTS biotechnologie, avec Mme Maurel, professeur de Biologie et Technologie Cellulaire.

Objectifs : Cette expérience doit nous permettre de répondre à plusieurs questions :

- les graines de tabouret sont elles capables de germer après désinfection et en milieu stérile ?
- les graines de tabouret sont elles capables de germer en absence de plomb, en présence de plomb à la limite réglementaire et à des concentrations 3, 5 et 10 fois supérieures à la limite réglementaire ?

Calculs préalables aux manipulations :

Calcul de la masse de plomb à ajouter dans un pot de gélose pour un équivalent concentration de la limite réglementaire dans la terre 600mg/kg (voir partie 3.2.1.) **:** 600 mg pour 1kg soit 0.6mg/g pour 21.5g de gélose, il faut ajouter 21.5 x 0.6/1 = 12.9mg soit 0.0129 g de plomb à ajouter à la gélose.

On ne dispose pas de plomb en poudre mais de nitrate de plomb $Pb(NO_3)_2$
M $Pb(NO_3)_2$ = 331.2 g/mol et M Pb = 207.2 g/mol

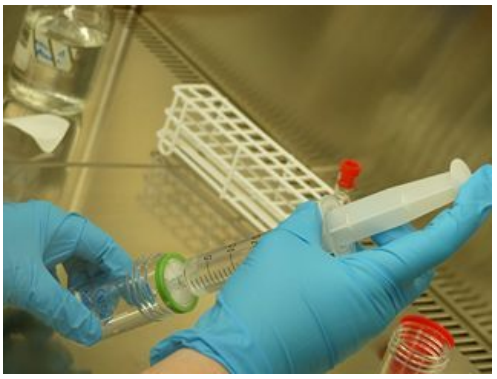
Il faut donc déterminer le nombre de moles de plomb et la quantité de nitrate de plomb correspondante à ajouter au tube :

$Pb(NO_3)_2$	=>	Pb^{2+}	+	$2NO_3^-$
1 mole		1 mole		2 moles

$n\ Pb^{2+} = m\ Pb^{2+}/M\ Pb^{2+} = 0.0129/207.2 =$ **$6.23.10^{-5}$ moles**,
$n\ Pb(NO_3)_2 = nPb^{2+} \times M\ Pb(NO_3)_2 = 6.23.10^{-5}/331.2 =$ **0.02g de nitrate de plomb**

Manipulations : Nous avons donc préparé :

- une solution de $Pb(NO_3)_2$ à 0.1mol/L : pour recréer la limite réglementaire 600mg/kg
- une solution de $Pb(NO_3)_2$ à 1mol/L **:** pour être 10 fois au delà de la limite réglementaire

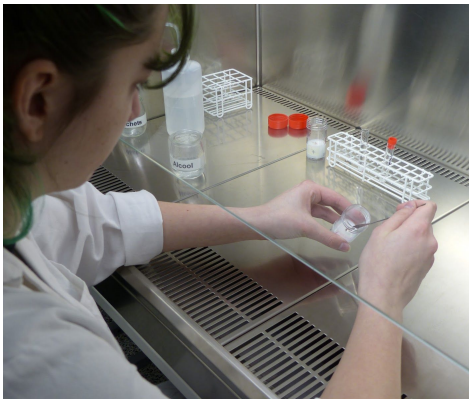


Nous ne pouvons pas recréer une concentration 40 fois supérieure à la norme car les cristaux ne se dissoudront pas dans l'eau (limite de solubilité). Une fois filtrées sur filtre millipore sous la hottes à flux laminaire les solutions de plomb sont prêtes à être utilisées.

Tableau d'expérimentation : manipulation réalisée le 4.01.2017

flacon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
opérateur	Léa	Léa	Malaury	Malaury	Audrey	Audrey	Jonathan	Jonathan	Hugo	Hugo
concentration visée(mg de pb/kg)	0		limite réglementaire 600 mg/kg		3 x limite réglementaire 2000 mg/kg		5 x limite réglementaire 3000 mg/kg		10 x limite réglementaire 6000 mg/kg	
volume et concentration déposés	-		600 µL à 0.1 mol/L		200µL à 0.961 mol/L		300µL à 0.961 mol/L		600µL à 0.961 mol/L	
masse du milieu			26.67 g	22.14 g	21.83 g	26.89 g	22.86	24.65	22.78g	23.92g
concentration finale réelle (mg de pb/kg)	0	0	466	562	1824	1481	2613	2423	5245	4995
germination 17/01/2017	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
contamination 17/01/2017	0	0	0	0	0	0	0	moisissure repiquage pour identification	0	0a
comportement 22/02/2017	flétrissement, mort par manque d'eau ou impossibilité d'établir la symbiose car graines stérilisées et milieu stérile									

Après avoir établit le tableau expérimental, nous avons décontaminé les graines dans du désinfectant puis nous les avons rincé avec de l'eau stérile avant ajout dans la gélose, avec difficulté car elles ont une sorte de couche gélatineuse autour d'elles et sont difficile à saisir avec la spatule.



En 2017, nous avons rencontré une difficulté pendant le TP, le plomb a formé un précipité localisé à la surface des géloses précoulées et nous n'avons pas réussi à avoir une imprégnation homogène du plomb. En 2018, nous avons donc introduit la solution de plomb avant l'ajout de la gélose en surfusion, pour avoir une répartition homogène.

Tableau d'expérimentation : manipulation réalisée le 31.01.2018

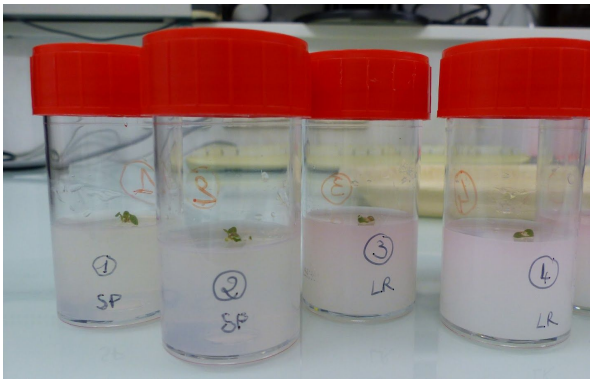
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
nom opérateur :	Anna.T	Anna.T	Anna.T	Malaury	Malaury	Malaury	Estelle	Estelle	Audrey	Audrey
concentration visée(mg de pb/kg)	0		limite réglementaire 600 mg/kg		3 x limite réglementaire 2000 mg/kg		5 x limite réglementaire 3000 mg/kg		10 x limite réglementaire 6000 mg/kg	
volume et concentration déposés	-		400µL à 0.1 mol/L		150µL à 1 mol/L		250µL à 1 mol/L		500µL à 1 mol/L	
masse du milieu standardisée pour 20mL de milieu			17.94g	17.94g	17.94g	17.94g	17.94g	17.94g	17.94g	17.94g
concentration finale réelle (mg de pb/kg)			462	462	1732	1732	2887	2887	5775	5775
germination (+/-) 7.02.2018	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
contamination (+/-) 7.02.2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

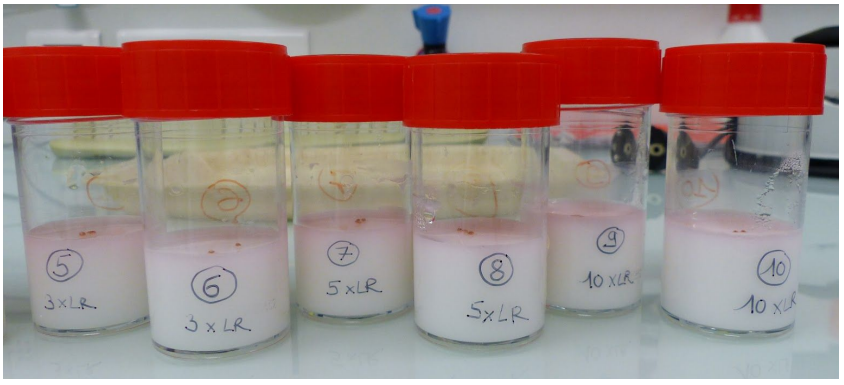
<u>Calcul de la concentration réelle dans les flacons</u> :

concentration finale réelle $_{(mg\ de\ pb/kg)}$ = (V $Pb(NO_3)_{2\ (L)}$ x C $Pb(NO_3)_{2\ (mol/L)}$ x M $Pb^{2+}{}_{(mg/mol)}$) / masse du milieu $_{(kg)}$

concentration finale réelle $_{(mg\ de\ pb/kg)}$ <u>flacon 5</u> 2017 = $(200.10^{-6} \times 0.961 \times 207.2.10^{3}) / 21.83.10^{-3}$ = 1824 mg/kg

<u>Résultats et Interprétations</u> : L'expérience menée en 2018 confirme les résultats obtenus en 2017. Les graines semées en absence de plomb (témoin) et à la limite réglementaire ont germé. Par contre, celles en contact avec une concentration en plomb supérieure à la norme n'ont pas germé.





<u>Perspectives</u> : Il faudrait tester des concentrations plus proche de 600mg/kg pour déterminer la limite de germination des graines. Cependant, utiliser ces graines pour dépolluer le sol qui est pollué par le plomb jusqu'à 40 fois la limite réglementaire dans le bassin semble très compliqué. Nous espérons que Jean Kallerhoff, chercheuse au laboratoire ECOLAB à l'INP à Toulouse responsable du projet "Déplass Métaux" pourra nous donner des conseils.

3.2.3.2. Etude de l'implication des microorganismes dans la dépollution

- Quels microorganismes sont impliqués dans la dépollution des sols pollués aux métaux lourds?

Exemples de correspondances entre polluants et bactéries dépolluantes *(Source : Biodépol'99)* :

- Nitrates : *Comamonas*, *Hyphomicrobium*
- Phosphates : *Acinetobacter*, *Moraxella*
- Pesticides : *Enterobacter*
- Dioxines : *Brevibacterium*
- Cyanures : *Thiobacillus*, *Rhizoctonia*
- Composés soufrés : *Thiobacillus*
- caoutchoucs : *Sulfolobus*, *Rhodococcus*, *Thiobacillus*
- Huiles, graisses : *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*
- Hydrocarbures : *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*
- **Métaux lourds : *Saccharomyces*, *Rhizopus*, *Chlorella*, *Thiobacillus*, *Zoogloea***

source : https://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9pollution_des_sols

Grâce à nos recherches nous avons trouvé que *Saccharomyces* (levure), *Rhizopus* (moisissure), *Thiobacillus* (bactérie), *Chlorella* et *Zoogloea* (algue), sont impliqués dans la dépollution aux métaux lourds. Pour essayer de comprendre comment agissent les microorganismes. Nous avons mené des expériences au laboratoire de Microbiologie et génie fermentaire des BTS Biotechnologie.

Objectifs :

- les microorganismes *Saccharomyces cerevisiae* (levure), *Bacillus subtilis* (bactérie) et *Rhizopus* (moisissure) arrivent-ils vraiment à décrocher le plomb de la terre?
- étudier le comportement des microorganismes en présence de plomb, *Saccharomyces cerevisiae* (levure) arrivent-elles à se développer en présence de plomb?

Expérience 1 - 2016 : En présence de terre polluée les bactéries décrochent-elles le plomb?

Nous avons cultivé des bactéries dans un bioréacteur rempli de milieu stérilisé par autoclavage auquel nous avons ajouté de la terre polluée artificiellement avec une concentration en plomb connue équivalente à celle retrouvée dans les jardins les plus pollués, après avoir fixé la T°C à 30°C et relevé le pH 7.86.

Pour 100 mL de milieu, il faut une quantité de terre de 1 à 20 g et notre bioréacteur contient 500 mL de milieu : nous avons donc multiplié par 5 la quantité nécessaire pour notre expérience, il nous faut entre 5 et 100 g de terre. Les jardins les plus pollués présentent 24000 mg de plomb/kg de terre, le plomb utilisé est sous forme de poudre de nitrate de plomb mis en en solution dans de l'eau distillée, pour 5g de terre, on a ajouté :

Poids de plomb ajouté $= C_{(\text{mg de plomb/kg de terre})} \times \text{Poids de sol}_{(\text{kg})} \times M\ Pb(NO_3)_2 / M\ Pb^{2+}$
$= 24000 \times 5.10^{-3} \times 331.2 / 207.2 = 192.1\ \text{mg} = 0.19\text{g}$

Masse réelle pesée : 0.120g soit une pollution de 15014.5 mg de plomb/kg de terre : 25 fois supérieure à la limite réglementaire (600 mg/kg limite réglementaire).

Nous avons fait des prélèvements et des tests de mise en évidence du plomb pour voir si il y avait ou non décrochage du plomb. A t_o la solution de plomb ajoutée à la terre donne un précipité jaune avec l'iodure de

potassium. Dès l'ajout à la terre, la réaction devient négative, le plomb est masqué, il se complexe à la terre. Au cours des prélèvements, nous avons ajouté de l'iodure de potassium à nos échantillons pour voir si le plomb était décroché de la terre et nous n'avons pas obtenu de réaction positive. A ce stade l'expérience n'est pas très concluante, nous envisageons de travailler dans un milieu plus acide pour favoriser le décrochage du plomb et de travailler sans terre pour voir le comportement des microorganismes en présence de plomb "libre".

<u>Expérience 2 - 2017 et 2018</u> : Comment se comporte les levures en présence de plomb?

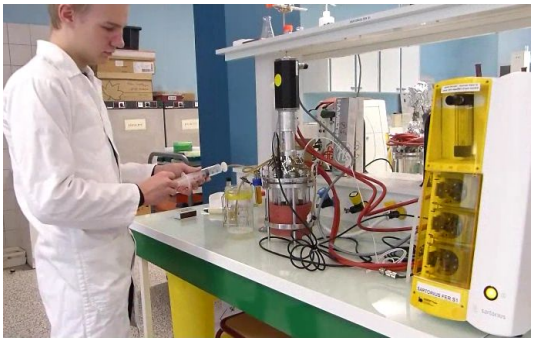
Parmi les microorganismes disponibles au laboratoire, les moisissures sont compliquées à cultiver en bioréacteur car l'arbre d'agitation casse leurs filaments et leur temps de développement est long. Du coup, on a essayé de voir le comportement des levures (*Saccharomyces cerevisiae)* en présence de différentes quantités de plomb en solution pour s'affranchir du problème de biodisponibilité du plomb dans la terre.

Nous avons suivi la croissance des levures dans différentes conditions comme pour la culture in vitro :

- Suivi de croissance de *S.cerevisiae* (levure) en milieu YPD sans plomb : témoin de culture
- Suivi de croissance de *S.cerevisiae* en milieu YPD + quantité plomb égale à la limite réglementaire
- Suivi de croissance de *S.cerevisiae* en milieu YPD + quantité de plomb équivalente à 5 fois la limite réglementaire dans le sol

Conditions de travail : en milieu YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar : gélose avec de l'extrait de levure, des peptones, et des glucides), dans les conditions suivantes :

- à une température de 30°C : température optimale de la levure
- à un pH entre 5 et 5.5 sans régulation : pH optimale de la levure
- à une agitation de 250 rpm (rotation par minute)

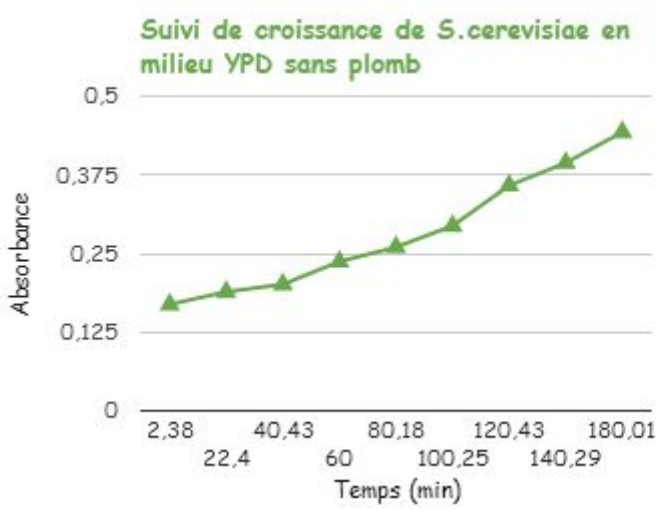


Exploitation graphique des résultats : tracé dans le tableur de Google Drive :

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1klTtEo_xcc0gbl_4CkLXUyTQkJZaT-KPInByvGquJZE/edit?ts=587f6e21#gid=0

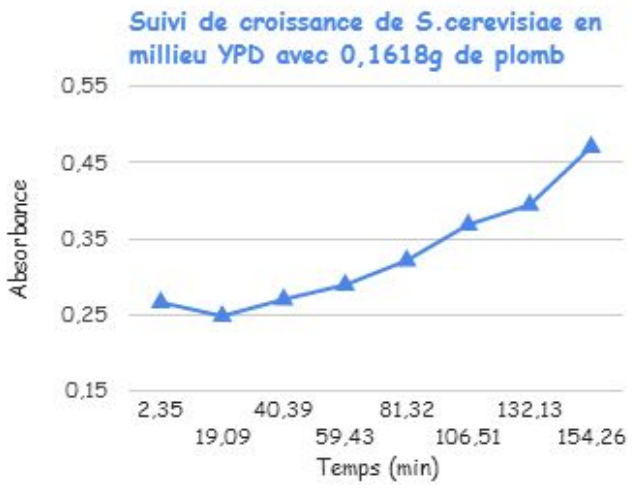
- **Suivi de croissance *S.cerevisiae* (levure) en milieu YPD sans plomb : témoin de culture**

prélèvement	t (min)	absorbance
1	2,38	0,169
2	22,4	0,189
3	40,43	0,201
4	60	0,237
5	80,18	0,26
6	100,25	0,294
7	120,43	0,358
8	140,29	0,394
9	180,01	0,443
10	199,52	0,511
11	225,05	0,596



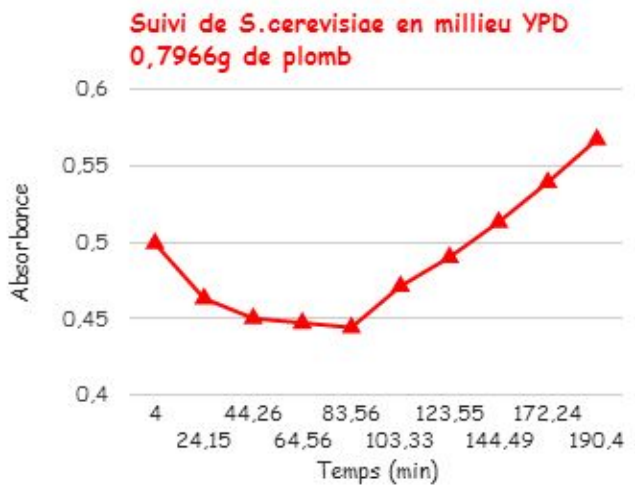
- **Suivi de croissance *S.cerevisiae* : YPD + [plomb] équivalente à la limite réglementaire**

prélèvement	t(min)	absorbance	pH
1	2,35	0,266	5,37
2	19,09	0,248	5,36
3	40,39	0,27	5,35
4	59,43	0,289	5,33
5	81,32	0,321	5,22
6	106,51	0,368	5,26
7	132,13	0,394	5,26
8	154,26	0,47	5,24



- **Suivi de croissance *S.cerevisiae* : YPD + [plomb] 5 fois supérieure à la limite réglementaire**

prélèvement	t(min)	absorbance	pH
1	4	0,499	4,84
2	24,15	0,463	4,83
3	44,26	0,45	4,82
4	64,56	0,447	4,81
5	83,56	0,444	4,8
6	103,33	0,471	4,79
7	123,55	0,49	4,78
8	144,49	0,513	4,77
9	172,24	0,539	4,77
10	190,4	0,567	4,75



Résultats et Interprétations :

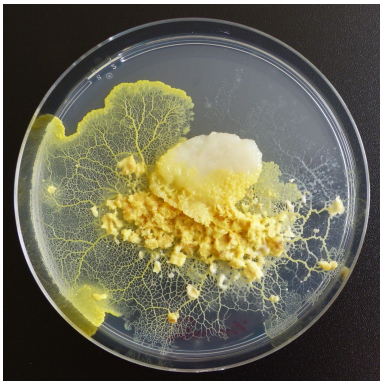
- En absence de plomb la souche de levure *S.cerevisiae* se développe normalement. L'absorbance a augmenté de 0.274 (absorbance finale - absorbance initiale = 0.443-0.169).
- En présence d'une quantité de plomb équivalente à la limite réglementaire dans la terre, on observe une baisse de l'absorbance (0.266-0.248 = 0.018) et une perte cellulaire d'environ 7% :
  % perte = 100-(absorbance minimale*100/absorbance initiale) = 100-(0.248*100/0.266) = 6.8%.
  Durant les 17 premières minutes une partie des levures meurent. Puis à partir de la 19ième minutes la souche se développe normalement.
- En présence d'une quantité de plomb 5 fois au dessus de la limite réglementaire dans le sol, on observe une forte diminution de l'absorbance (0.499-0.444 = 0.055) -0.055 soit une perte de 11%(100-(0.444*100/0.499)) durant les 80 premières minutes donc une partie des levures meurent. Puis au delà de 80 minutes la souche se développe normalement.

Hypothèses : En présence de plomb la levure se retrouve en stress et met du temps (selon la quantité de plomb) à trouver des moyens pour se défendre. Les levures qui n'arrivent pas à se défendre meurent et celles qui résistent sont sélectionnées.

En perspectives :
Nous devons poursuivre nos expérimentations en reproduisant les expériences et en augmentant la concentration en plomb pour voir si les levures survivent à la concentration retrouvée dans les sols les plus pollués. Nous pourrions aussi essayer d'étudier les mécanismes de résistance aux métaux lourds de la levure.

3.2.4. Blob et métaux lourds : *Physarum polycephalum*, peut-il être acteur de la dépollution?

Cette année nous avons découvert l'existence du "Blob" *Physarum polycephalum* grâce à Audrey Dussutour Chercheuse au CNRS, éthologue au centre de recherches sur la cognition animale, à l'UPS Toulouse.



Perle sur le blob : accès vidéos, tutoriel et recherche documentaire
http://www.pearltrees.com/zague/info-blob/id19615386

source : Audrey Dussutour, Tout ce que vous avez voulu savoir sur le blob sans jamais le demander, Éditions Équateur Sciences, avril 2017, p. 87.

Tout d'abord intrigué par cet organisme vivant dans les sous bois, mangeur de champignons, immortel…., nous nous y sommes intéressé car il aurait la capacité à accumuler les métaux lourds.

Il nous a fallu quelques semaines pour apprendre à bien le nourrir, le repiquer, réaliser des sclérotes et finalement nous lancer dans les expérimentations.

Au laboratoire nous n'avons pas les moyens de doser le plomb dans un milieu complexe, impossible pour nous de vérifier les résultats des publications. Nous avons donc décidé d'étudier le comportement du blob vis-à-vis du plomb et voir si il pourrait faire un bon candidat pour la dépollution. Pour cela, nous avons élaboré trois expériences.

3.2.4.1. Blob party 1 : Expérience "avoine contaminé"

Objectif : sur le même principe que la phytoremédiation, nous avons voulu observer la capacité du blob à se développer en présence de différentes concentrations en plomb dans sa source de nourriture (avoine).

Tableau expérimental : manipulations : 11.01 et 18.01.2018

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
nom opérateur	hugo	hugo	audrey	audrey	estelle	estelle	anna.A	anna.A	anna.T	anna.T
concentration visée(mg de pb/kg)	0		limite réglementaire 600 mg/kg		3 x limite réglementaire 2000 mg/kg		5 x limite réglementaire 3000 mg/kg		10 x limite réglementaire 6000 mg/kg	
semaine 1 : volume et concentration déposés	-		14 µL à 0.1 mol/L		42µL à 0.1 mol/L		70µL à 0.1 mol/L		140µL à 0.1 mol/L	
masse du milieu			0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
concentration finale réelle (mg de pb/kg)	0	0	579.6		1738.8		2898		5796	

Calcul de la concentration réelle dans l'avoine :

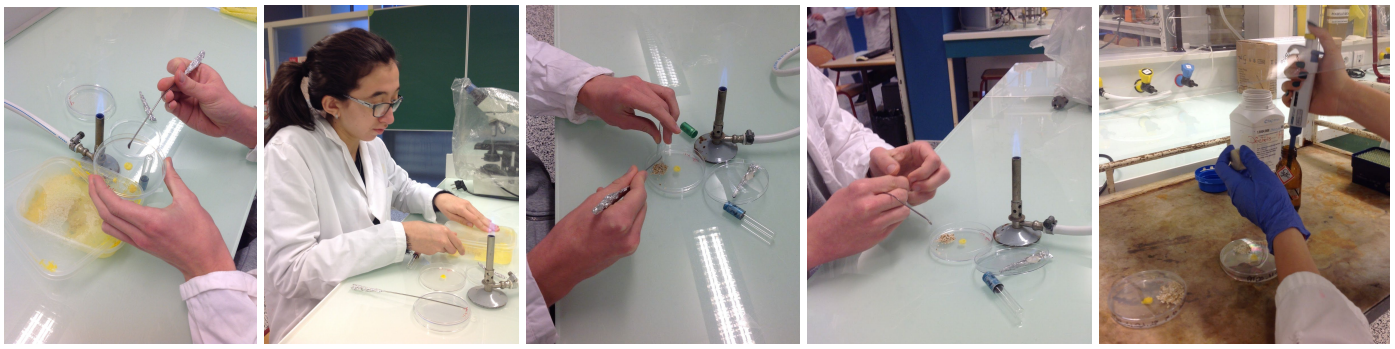
concentration finale réelle $_{(mg\ de\ pb/kg)}$ = (V $Pb(NO_3)_2$ $_{(L)}$ x C $Pb(NO_3)_2$ $_{(mol/L)}$ x M Pb^{2+} $_{(mg/mol)}$) / masse du milieu $_{(kg)}$

concentration finale réelle $_{(mg\ de\ pb/kg)}$ boîte 2 = $(14.10^{-6} \times 0.1 \times 207.2.10^{3}) / 0.5.10^{-3}$ = 579.6 mg/kg

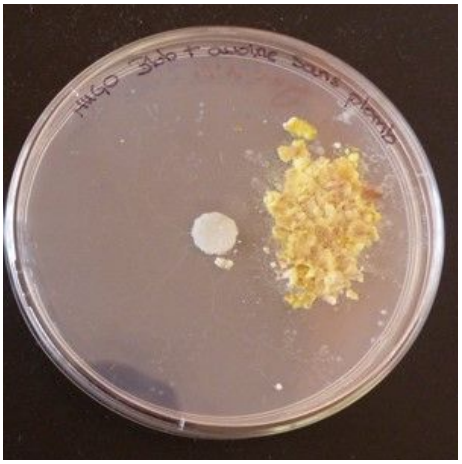
Manipulation :

Nous avons donc préparé une solution de $Pb(NO_3)_2$ à 0.1mol/L : pour recréer la limite réglementaire 600mg/kg. Après avoir établit le tableau expérimental (ci-dessus), nous avons :

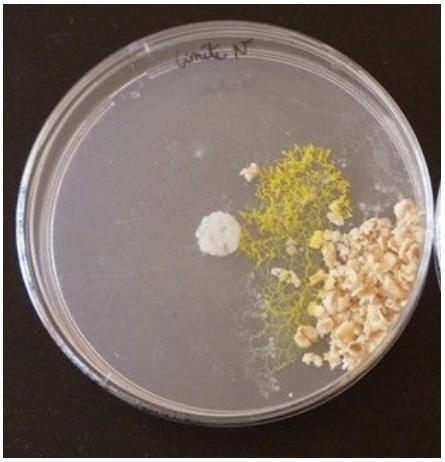
- carotté et déposé le blob en partie centrale sur une boîte de Pétri à 1% d'agar,
- ajouté les 0.5g d'avoine à côté du blob,
- ajouté le volume de solution de plomb $Pb(NO_3)_2$ à 0.1mol/L selon la concentration voulue.



Observations : photographie au bout d'une semaine :



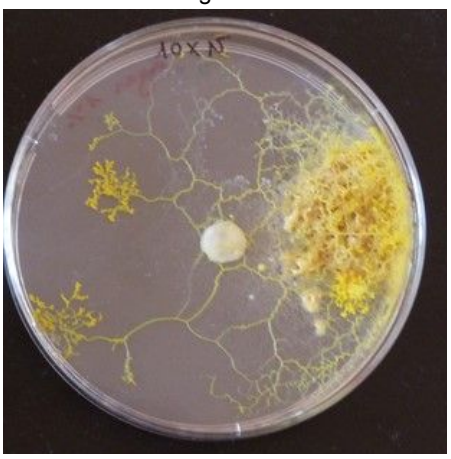
sans plomb



à la limite réglementaire

3 fois la limite réglementaire

5 fois la limite réglementaire



10 fois la limite réglementaire

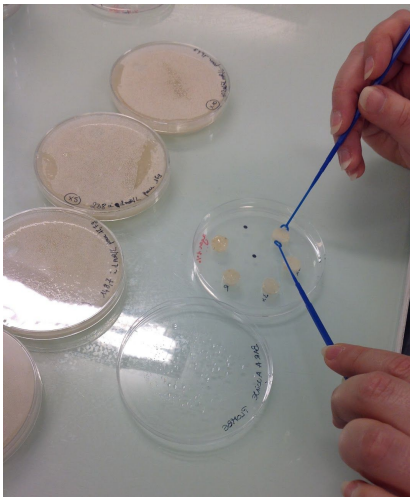
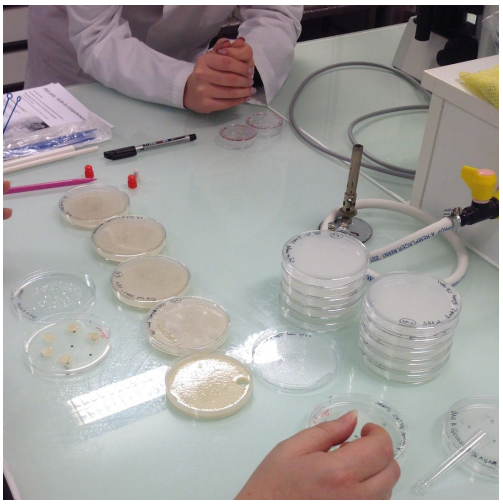
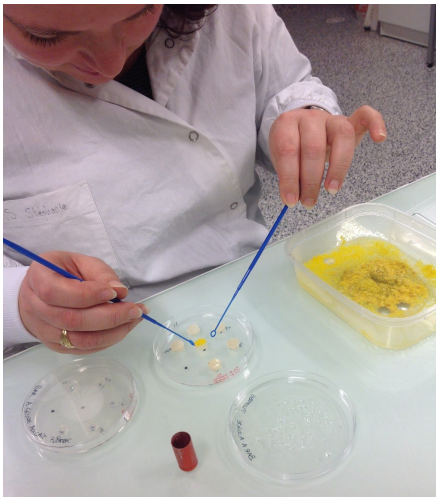
Interprétations : Contre toute attente Blobby a l'air de ne pas bouder l'avoine chargé en plomb, alors qu'on s'attendait à ce qu'il tente de trouver une autre source de nourriture en évitant l'avoine contaminé au plomb. "Mieux que ça" le Blob a mis moins de temps à aller vers l'avoine contaminé par le plomb à des concentrations 5 et 10 fois supérieures à la limite réglementaire. Aurait-il une attirance pour le plomb? En tout cas, quelque soit la concentration en plomb dans l'avoine le Blob se développe.

Perspectives : Nous avons réfléchi comment intégrer le plomb dans le milieu gélosé pour être plus proche des conditions de l'environnement avec un sol pollué et nous avons mis en oeuvre les expériences suivantes en s'inspirant des travaux de recherche de Audrey Dussutour.

3.2.4.2. Blob party 2 : Expérience “bar gélose à l’avoine plombé”

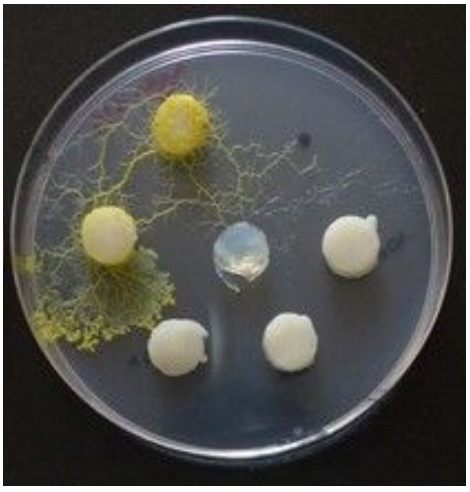
Objectif : Voir comment se comporte le blob quand on lui donne le choix. En lui proposant sur une même boîte des pastilles de milieu avec des concentrations en plomb différentes et le laisser faire son choix.

Manipulation : On a préparé un bar à plomb à partir de 5 boîtes de gélose “avoine 10% et agar 1%” avec des concentrations allant de 0 à 10 fois la limite réglementaire en plomb dans le sol. Les pastilles de milieu “avoine plombé” sont carottées et déposées sur une gélose à 1% d’agar en allant de la concentration la plus faible en plomb vers la plus forte. Puis, une pastille de blob est déposée en partie centrale de la boîte. Il ne reste plus qu’à observer le comportement du Blob au fil des jours.

Observations : plan de dépôt : dans le sens inverse des aiguilles d’une montre : point noir absence de pastille (en haut à droite), pastille 0 (sans plomb), pastille LR (Limite Réglementaire), pastille x3 LR (x = fois), pastille x5 LR et pastille x10 LR

Jour +1 : 26.01.2018 12:55



Jour +1 : 26.01.2018 16:39

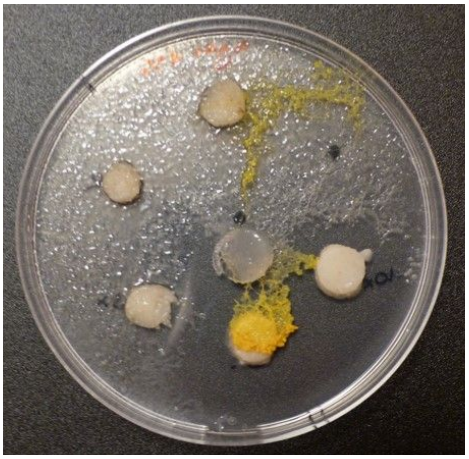
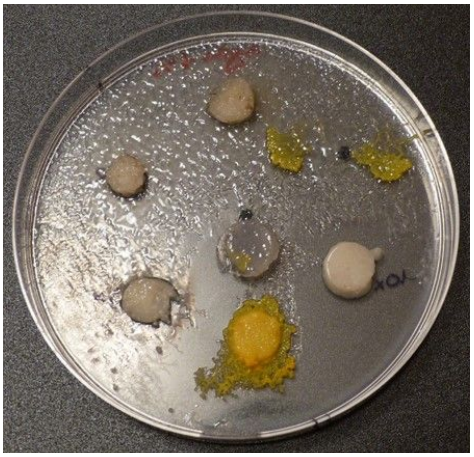
Jour +2 : 27.01.2018 10:47

Jour +4 : 29.01.2018 19:21

Jour +5 : 30.01.2018 20:19

Jour +6 : 31.01.2018 11:30

Jour +7 : 1.02.2018 10:18 | Jour +7 : 1.02.2018 20:54 | Jour +8 : 2.02.2018 7:19

Interprétations :

Jour +1 : Blobby s'est dirigé en premier vers la pastille sans plomb, puis celle à la limite réglementaire et il est ensuite parti à la découverte de la pastille à 3 fois la limite réglementaire.

Jour +2 à +6 : il a fait des allers et retours entre la pastille à 3 fois la limite réglementaire, les pastilles sans plomb et à la limite réglementaire. Par contre, il ne s'aventure pas vers les pastilles à 5 et 10 fois la limite réglementaire, on pourrait même dire qu'il les évite en regardant les traces laissées lors des explorations.

Jour +7 : le jour du changement ! Blobby finit par revenir sur sa pastille de départ, il doit avoir une grosse faim! ce qui va le mener à se déplacer vers la pastille à 5 fois la limite réglementaire et a lancer un pseudopode vers la pastille 10 fois la limite réglementaire (qui ne tente rien n'a rien). Finalement, Il finit par revenir sur la pastille 5 fois la limite réglementaire et y reste jusqu'à la fin de l'expérience.

Conclusion : Quand on lui laisse le choix le Blob ne se rend pas sur la pastille à 10 fois la limite réglementaire, il préfère les pastilles sans plomb, à la limite réglementaire et à 3 fois la limite réglementaire. Et il tolère celle à 5x la limite réglementaire.

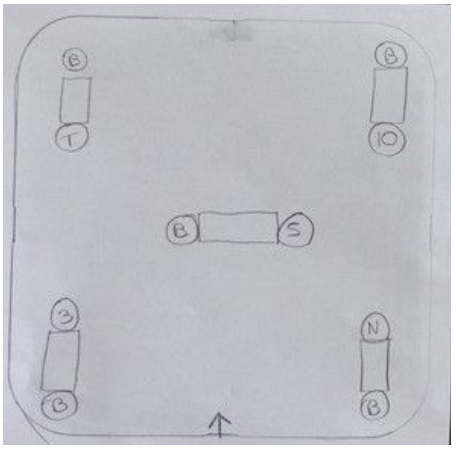
3.2.4.3. Blob party 3 : Expérience "ponts vers avoine plombé"

Objectif : Voir le comportement du blob quand on lui donne pas le choix, en le forçant à se nourrir d'avoine pollué aux différentes concentrations.

Manipulation :

L'idée était de recréer un "pont" en gélose neutre séparant le blob de sa nourriture et de voir s'il pouvait le franchir. En gros, mange ou crève !

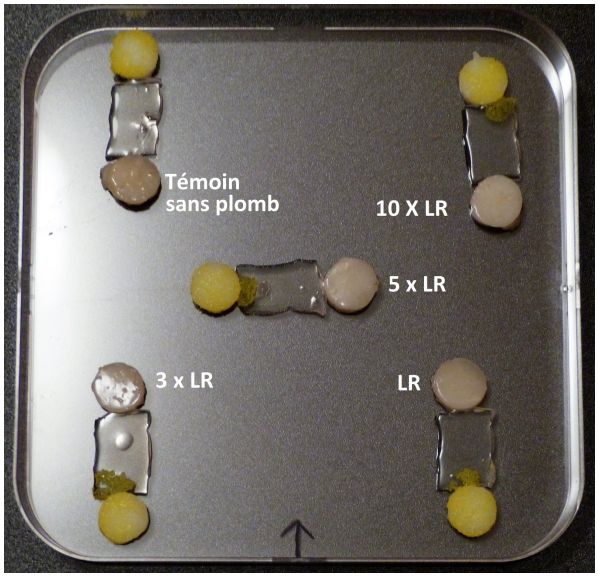
On a carotté le blob qu'on a déposé d'un côté de chaque pont et en face on a disposé des pastilles d'avoine : témoin, limite réglementaire, 3x, 5x et 10x la limite réglementaire selon le plan de dépôt (ci-contre) en utilisant nos géloses à l'avoine artificiellement polluée. Nous avons essayé d'éloigner le plus possible les blobs les uns des autres pour être sûrs qu'ils ne puissent pas aller chercher la nourriture de leur camarade.



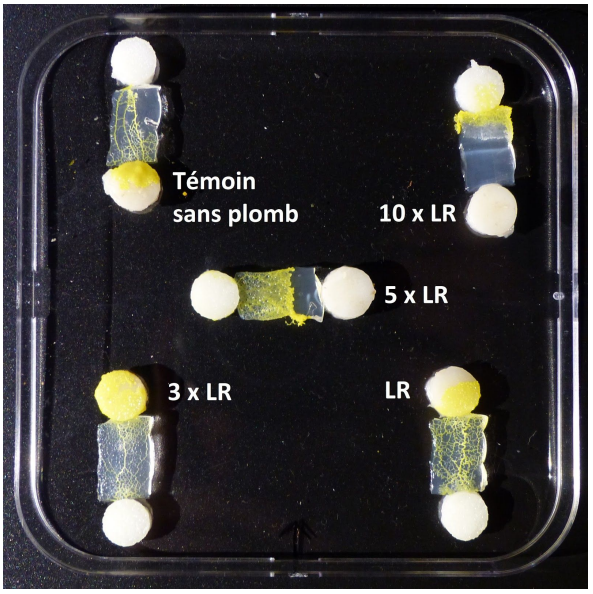
MATRICE DE DÉPÔT :

B : Blob
T : témoin sans plomb
N : Limite réglementaire
3 : 3 fois le limite réglementaire
5 : 5 fois le limite réglementaire
10 : 10 fois le limite réglementaire

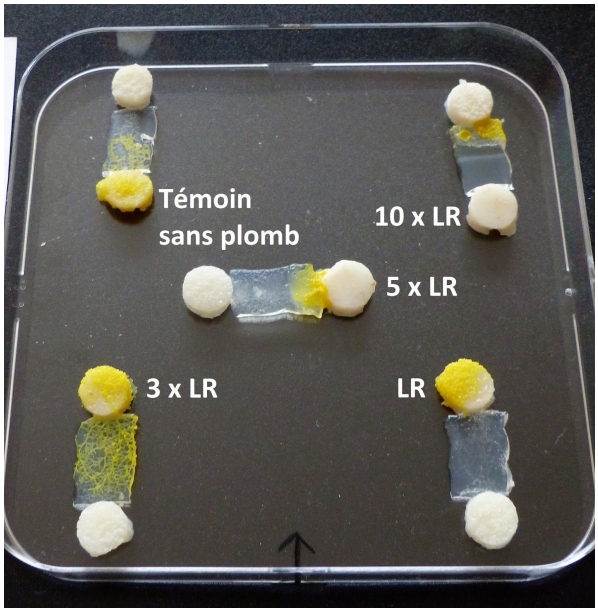
Observations :



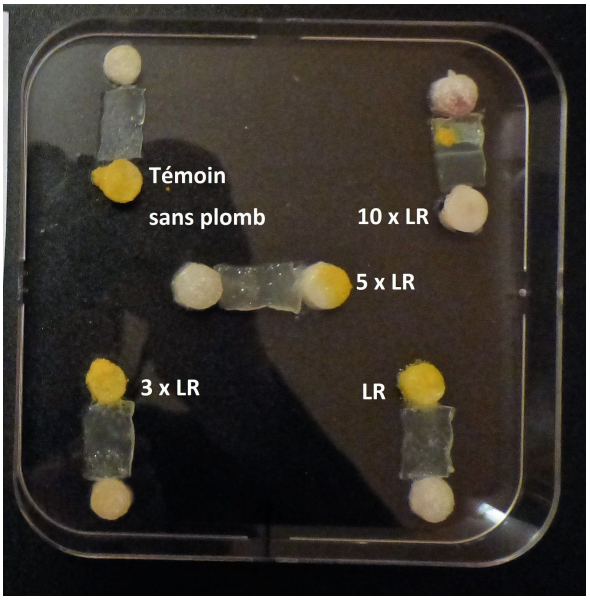
← Jour +1 :
2.02.2018



Jour +2 :
3.02.2018 →



← Jour +3 :
4.02.2018



Jour +4 :
6.02.2018 →

Interprétations : Le premier jour, le blob a commencé à franchir tous les ponts.
Dès le second jour, il a complètement franchi tous les ponts sauf ceux avec 10x et 5x fois la limite réglementaire.
Au troisième jour, il a atteint l'avoine contaminé à 5x la limite réglementaire. Il a été plus lent, le plomb ne l'attire pas du tout.
Au final, il n'a pas franchi le pont avec l'avoine contaminé à 10x la limite réglementaire, il se laisse mourir, c'est bien qu'il sent que le plomb n'est pas bon pour lui à une telle concentration.
Cette expérience nous permet de dire que le blob n'a pas d'affinité pour le plomb mais qu'il y résiste très bien jusqu'à 3 fois la limite réglementaire.

4. La valorisation des déchets « un vrai trésor industriel »

Hypothèses 3 : «Un vrai trésor industriel». Les “métaux lourds”, des déchets qui pourraient valoir leur pesant d’or. Comment valoriser les déchets “métaux lourds” accumulés ?

On pourra broyer ou incinérer les plantes et le Blob gorgés de métaux et traiter le résidu pour s’en servir comme catalyseur qui rend possible des réactions chimiques et permet d’augmenter leur vitesse. Les catalyseurs sont utilisés principalement dans les domaines de la cosmétique, de la chimie, de biopesticide mais surtout en pharmaceutique où ils permettent la synthèse d’anticancéreux, d’agents antiviraux et de molécules actives contre la malaria.

Le Professeur Philippe Behra nous a précisé que l’utilisation des métaux lourds comme catalyseur exige des étapes de purification longues et coûteuses pour éliminer les métaux lourds des produits avant leur commercialisation.

Lors du prochain atelier scientifique avec Philippe behra et Christel Bros professeur de biotechnologie, nous allons essayer de réaliser une catalyse hétérogène au lycée avec une enzyme immobilisée dans des billes d’alginate et son substrat dans le milieu.

sources : Article “l’arme végétale contre la pollution” Science et vie junior mai 2013 n°284 pages 58 à 61
GRISON, Claude; ESCANDE, Vincent; BITON, Jacques. *l’écocatalyse nouvelle approche intégrée de l’écologie scientifique*. ISTE édition, 2015. 195 p. collection écologie ISBN 978-1-78405-082-5 page 23

Conclusion et perspectives

Après le constat des dégâts causés par la pollution sur l’organisme, nous avons cherché à dépolluer les eaux et les sols pour que les habitants du bassin puissent de nouveau consommer les fruits et les légumes de leur jardin sans danger pour leur santé.

Pour dépolluer l’eau d’arrosage, nous avons cherché des éléments capables de filtrer l’eau en absorbant les “métaux lourds” comme le charbon actif qui retient le plomb à la différence des autres matériaux testés (sable quartz et sable de Fontainebleau) et nous avons fait le suivi de l’efficacité de la filtration avec différentes méthodes de dosage du plomb. Notre protocole de dosage quantitatif par complexométrie a montré ses limites avec une limite de détection supérieure à 50µg/L alors que la norme pour l’eau potable est à 10µg/L. Nous sommes donc allé visiter le laboratoire d’analyses départemental qui réalise les analyses chimiques dont le dosage des métaux lourds grâce aux techniques de pointe : ICP / AES Plasma à couplage inductif couplé à la spectrométrie d'émission et ICP / MS Plasma à couplage inductif couplé à la spectrométrie de masse. Malheureusement, ses dosages sont bien trop chers pour nous, nous allons donc tenté de faire les dosages par photométrie de flamme au LCA avec le chercheur Philippe Behra le 12 avril prochain.

Pour dépolluer les sols des jardins, nous avons visité le chantier de remédiation d’Umicore à Viviez pour voir si nous pouvions utiliser leur technique de stabilisation des polluants. Cette méthode est intéressante pour réhabiliter les sites industriels en confinant le polluant mais ne répond pas à nos objectifs car on veut extraire les polluants du sols.

Aujourd’hui, la phytoextraction est la seule technique qui permet d’extraire les métaux lourds du sol sans danger et pouvoir, à terme, recultiver ces terrains. Cependant, d’après nos estimations, il faudra environ 100 ans pour dépolluer les zones les plus contaminées grâce aux plantes. Les plantes sont ensuite séchées pour que l’on puisse s’en servir comme catalyseur dans la cosmétique, pharmaceutique et la chimie.

Nous avons donc cherché des plantes capables d’extraire les polluants (par phytoextraction) présents dans les sols comme le tabouret qui est une plante hyperaccumulatrice du plomb, du cadmium et l’arsenic. Nous avons récolté les graines près de l’usine Umicore. Nous avons fait des expériences de culture in vitro des

graines décontaminées en milieu stérile. Elles ont réussi à germer jusqu'à la limite réglementaire en plomb mais pas au delà.

Comme les plantes travaillent en symbiose avec les microorganismes de la terre, nous avons essayé de comprendre comment ils participent à la dépollution et comment il résistent en présence des métaux lourds. Pour l'instant, nos expériences ont montré que la levure semble développer des mécanismes de résistance en présence du plomb. Nous avons également démontré la difficulté de travailler sur un milieu comme la terre où le plomb est complexé à la matière organique et n'est pas biodisponible.

Nous devons donc refaire nos expériences pour avancer dans le projet. Nous avons aussi écrit à la chercheuse Claude Grison (professeur en chimie et chercheur en écologie scientifique spécialiste de chimie "éco-inspirée") qui a reçu le Prix scientifique François Sommer Homme Nature 2016 pour obtenir son aide.

Le travail mené sur le comportement du Blob en présence de plomb nous a également ouvert de nouvelles perspectives.

Depuis 3 ans, nous présentons notre projet à la Fête de la Science au CM1 et CM2 pour, les sensibiliser au problème de pollution dans le bassin, partager quelque chose qui nous plaît et peut-être leur donner envie par la suite de faire de la science.

Nous avons bien aimé partager nos connaissances avec les petits et apprécié l'attention portée à notre projet : Ils se sont vite intéressés à notre atelier et se sont montrés volontaires, aimables et motivés. Leur compagnie a été très agréable.

lien vidéo fête de la science :https://youtu.be/GmdYRgO0qf0

Cette expérience à l'AST (Atelier Scientifique et Technique) est très intéressante, elle donne envie de continuer, nous avons beaucoup aimé participer à ce projet, tout en nous perfectionnant dans les manipulations.