

## Liste des abréviations

A.c : *Absidia cylindrospora*

ADEME Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

AFES : Association Française pour l'Etude des Sols

BASIAS : Base des Anciens Sites Industriels et Activités de Service

CEC : Capacité d'Echange Cationique

CEE-NU : Commission Economique pour l'Europe des Nations Unies

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC en anglais : International Agency for Research on Cancer)

COT : Carbone Organique Total

DAD : Diode Array Detector (en français détecteur à barrettes de diodes)

DTPA : acide diéthylène triamine penta acétique

EAA : Agence Européenne pour l'Environnement

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

ETM : Eléments Traces Métalliques

EUP : Eau ultra pure

FPGN : fond pédogéochimique naturel

GS : Galzy et Slonimski (milieu)

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

HCl: Acide chlorhydrique

ICP AES: Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy

ICP-MS : Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

ISRIC : Centre International de Référence et d'Information sur les Sols

ITS: Internal Transcription Space

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

MEA: Malt Extract Agar

PCR : Polymerase Chain Reaction ou réaction en chaîne par polymérase

P.f : *Perenniporia fraxinea*

PDA : Potato Dextrose Agar

PNUE : Programme des Nations Unies pour l'Environnement

POP : polluants organiques persistants

ppm : partie par million

UFC : unité formant colonie

US EPA: United States Environmental Protection Agency

## Table des matières

Liste des communications.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Liste des figures .....	x
Liste des tableaux.....	xiv
Introduction générale .....	1
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique</b> .....	<b>5</b>
I. Le sol .....	6
I.1) Définition du sol .....	6
I.2) Phases du sol.....	7
I.2.1) La phase solide.....	7
I.2.1.1) La fraction minérale .....	7
I.2.1.2) La fraction organique .....	9
I.2.2) La phase liquide .....	9
I.2.3) La phase gazeuse.....	10
I.3) Composition de la croûte terrestre.....	10
II. Pollution environnementale et sols contaminés .....	13
II.1) Pollution environnementale métallique.....	13
II.2) Contamination des sols .....	14
II.2.1) Sites contaminés .....	14
II.2.2) Transfert de pollution et risques liés.....	16
III. Evaluation de la mobilité des métaux .....	16
III.1) Mobilité et biodisponibilité des ETM .....	17
III.2) Spéciation minéralogique des ETM.....	17
III.3) Facteurs conditionnant la mobilité des métaux.....	17
III.3.1) Le pH.....	18
III.3.2) Le potentiel d'oxydoréduction .....	18
III.3.3) La matière organique.....	19
III.3.4) Les oxydes métalliques .....	19
III.4) Méthodes d'étude de la spéciation minéralogique.....	20
III.4.1) Fractions du sol .....	20
III.4.2) Extractions simples .....	21
III.4.2.1) Agents complexants.....	22
III.4.2.2) Sels.....	23

III.4.2.3) Acides .....	24
III.4.3) Extractions séquentielles .....	25
IV. Description des métaux étudiés .....	28
IV.1) Le chrome .....	29
IV.2) Le plomb .....	29
IV.3) Le cadmium .....	30
IV.4) Le zinc .....	31
IV.5) Le nickel .....	32
IV.6) Le cuivre .....	33
IV.7) Le cobalt .....	33
V. Analyse des métaux dans les sols .....	34
V.1) Techniques d'analyses des métaux .....	34
V.2) Minéralisation totale des sols .....	35
V.3) Digestion assistée avec micro-ondes .....	36
VI. La remédiation des sols pollués .....	36
VI.1) Traitements in situ, ex situ et sur site .....	36
VI.2) Traitements chimiques et physiques .....	37
VI.2.1) Traitements chimiques .....	37
VI.2.2) Traitements physiques .....	38
VI.3) La bioremédiation .....	38
VI.3.1) Bioaugmentation et biostimulation .....	40
VI.3.2) Biosorption et bioaccumulation .....	41
VI.4) Etude des processus de bioremédiation des métaux .....	43
VI.4.1) Etude de bioremédiation en milieu liquide .....	43
VI.4.2) Etude de bioremédiation en milieu solide .....	43
VII. Les champignons en bioremédiation .....	45
VII.1) Particularités des champignons .....	45
VII.2) Mécanismes de séquestration des métaux par les champignons .....	49
VII.2.1) Séquestration extracellulaire des métaux par les champignons .....	50
VII.2.2) Séquestration intracellulaire des métaux par les champignons .....	52
VII.3) La mycoremédiation .....	52
VIII. Acides organiques et champignons .....	56
VIII.1) Sécrétions des acides par les champignons .....	56
VIII.2) Identification et dosage des acides organiques produits pas les champignons .....	58

VIII. Conclusion .....	62
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</b> .....	<b>63</b>
I. Techniques de caractérisation des sols .....	64
I.1) pH .....	64
I.2) Dosage des carbonates.....	64
I.3) Dosage du carbone organique total .....	64
I.4) Analyse des teneurs totales en éléments métalliques .....	65
I.5) Analyse de la fraction potentiellement disponible en éléments métalliques .....	66
I.5.1) Extractions simples .....	66
I.5.2) Extractions séquentielles.....	66
I.6) Analyse élémentaire par ICP-AES .....	68
I.6.1) Appareillage .....	68
I.6.2) Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) .....	68
I.6.3) Qualité analytique .....	70
II. Isolation et identification des souches fongiques.....	71
II.1) Méthode par incorporation directe .....	71
II.2) Méthode des suspensions-dilutions.....	71
II.3) Identification des isolats.....	72
II.3.1) Identification des isolats par approche culturale et microscopique .....	72
II.3.2) Identification des isolats par approche moléculaire .....	72
III. Mise en évidence de la production d'acides organiques par les champignons.....	72
III.1) Essai préliminaire en milieu solide .....	72
III.2) Essai en milieu liquide.....	73
III.3) Mise au point d'une méthode d'analyse des acides par HPLC.....	74
IV. Analyses statistiques.....	74
<b>Chapitre 3 : Présentation et caractérisation des sols de l'étude</b> .....	<b>75</b>
I. Présentation et caractérisation physico-chimique des sols de l'étude .....	76
I.1) Présentation des sols .....	76
I.2) Teneurs élémentaires totales dans les sols de l'étude.....	78
I.2.1) Cas des sols réels .....	80
I.2.2) Cas des sols artificiels.....	81
I.3) Teneurs potentiellement disponibles des métaux par extraction simple dans les sols de l'étude.....	81
I.4) Distribution des éléments dans les fractions géochimiques dans les sols réels R, L et C ..	83
I.5) Comparaison des résultats de l'extraction simple (HCl) et de l'extraction séquentielle....	88

I.6) Comparaison des résultats de l'extraction simple avec HCl et EDTA.....	91
II. Etude des souches fongiques identifiées dans les sols.....	92
II.1) Présentation des souches fongiques utilisées pour les essais de bioaugmentation .....	92
II.2) Caractérisation fongique des sols étudiés.....	93
II.2.1) Identification des souches fongiques dans les sols synthétiques.....	93
II.2.2) Identification des souches fongiques dans le sol réel R .....	94
II.3) Conclusion.....	98
<b>Chapitre 4 : Mise au point du microcosme.....</b>	<b>99</b>
I. Microcosme en cristallisoir .....	101
I.1) Réalisation du microcosme en cristallisoir.....	101
I.2) Séparation des composants du microcosme en cristallisoir.....	102
I.3) Analyse des métaux dans les composants des microcosmes en cristallisoir .....	104
I.4) Limites du microcosme .....	108
II. Microcosme en boîte de Petri avec filtre .....	108
II.1) Réalisation du microcosme en boîte de Petri avec filtre .....	108
II.2) Séparation des composants du microcosme en boîte de Petri avec filtre.....	109
II.3) Analyse des métaux dans les composants des microcosmes en boîte de Petri avec filtre .....	110
II.4) Limites du microcosme .....	112
III. Microcosme en boîte de Petri sans filtre.....	113
III.1) Réalisation du microcosme .....	113
III.2) Séparation des composants du microcosme en boîte de Petri avec le sol synthétique ..	114
III.3) Analyse des métaux dans les composants du microcosme en boîte de Petri sans filtre .....	115
III.3.1) Teneurs totales des métaux dans les sols des microcosmes avec le sol synthétique	116
III.3.2) Teneurs en métaux dans le mycélium des microcosmes avec le sol synthétique ...	116
III.3.3) Bilan de matière (quantité de métal) .....	117
III.3.4) Pourcentages des métaux dans les sols synthétiques bioaugmentés et biostimulés .....	119
III.4) Identification des souches fongiques .....	121
III.4.1) Souches fongiques dans le sol biostimulé (S <sup>+</sup> S) .....	122
III.4.2) Souches fongiques dans les sols bioaugmentés (S <sup>+</sup> A <sub>ac</sub> et S <sup>-</sup> A <sub>ac</sub> ).....	122
III.5) Conclusion .....	123
<b>Chapitre 5 : Application du microcosme à des sols réels .....</b>	<b>125</b>
I. Microcosmes avec un sol réel non pollué (C) .....	126

I.1) Réalisation des microcosmes.....	126
I.2) Analyse des métaux dans les composants du microcosme avec le sol non pollué C .....	127
II. Microcosmes avec un sol réel pollué (R) bioaugmenté avec la souche fongique <i>Absidia cylindrospora</i> .....	129
II.1) Réalisation des microcosmes .....	129
II.2) Evolution de la biomasse fongique .....	130
II.2.1) Description visuelle .....	130
II.2.2) Masses des mycéliums.....	131
II.3) Suivi de la microfonge du sol.....	133
II.4) Suivi des métaux .....	137
II.4.1) Teneurs totales dans les composants des microcosmes.....	137
II.4.1.1) Teneurs des métaux dans les sols.....	137
II.4.1.2) Teneurs des métaux dans les mycéliums issus des essais de bioaugmentation .	139
II.4.2) Mobilité des métaux dans les sols des microcosmes.....	144
II.4.2.1) Mobilité des métaux par extraction simple.....	144
II.4.2.2) Mobilité des métaux par extraction séquentielle .....	145
II.4.2.3) Comparaison de la fraction mobile totale F6 (extraction séquentielle) et l'extraction simple HCl.....	150
II.5) Conclusion.....	152
III. Microcosmes avec un sol réel pollué (R) bioaugmenté avec la souche fongique <i>Perenniporia fraxinea</i> .....	153
III.1) Analyse des métaux dans les composants des microcosmes bioaugmentés avec la souche fongique <i>Perenniporia fraxinea</i> .....	153
III.1.1) Teneurs totales dans les sols des microcosmes .....	153
III.1.2) Teneurs potentiellement disponibles dans les sols des microcosmes .....	155
III.2) Suivi de la microfonge du sol .....	156
III.3) Conclusion .....	160
<b>Chapitre 6 : Mise en évidence qualitative et quantitative de la production d'acides organiques.....</b>	<b>162</b>
I. Mise en évidence de la production d'acides.....	163
I.1) En milieu solide .....	163
I.1.1) Protocole en milieu solide.....	163
I.1.2) Résultats de l'expérimentation en milieu solide .....	164
I.1.2.1) Croissance des souches fongiques.....	164
I.1.2.2) Acidification du milieu de culture.....	165
I.2) En milieu liquide .....	166

I.2.1) Aspect visuel.....	166
I.2.2) Biomasse.....	167
II. Mise au point de la méthode d'analyse par HPLC .....	168
II.1) Eluant .....	170
II.2) Température .....	172
II.3) Débit.....	175
II.5) Conditions retenues.....	176
II.6) Application de la méthode d'analyse à chaque acide séparément .....	176
III. Validation de la méthode HPLC.....	178
III.1) Gamme d'étalonnage des acides.....	178
III.2) Calcul des limites de détection et de quantification.....	181
IV. Analyse des milieux de culture en HPLC.....	182
IV.1) Analyse des milieux de culture de <i>Absidia cylindrospora</i> .....	182
IV.2.1) Production de l'acide oxalique par <i>Absidia cylindrospora</i> .....	182
IV.2.1.1) Influence du métal sur la production d'acide oxalique .....	183
IV.2.1.2) Influence de la durée d'incubation sur la production d'acide oxalique .....	185
IV.2.2) Production de l'acide citrique par <i>Absidia cylindrospora</i> .....	186
IV.2.2.1) Influence du métal sur la production d'acide citrique.....	187
IV.2.2.2) Influence de la durée d'incubation sur la production d'acide citrique.....	187
IV.2.3) Comparaison de la production d'acide oxalique et d'acide citrique.....	188
IV.2) Analyse des milieux de culture de <i>Perenniporia fraxinea</i> .....	191
IV.3) Influence de la composition du milieu de culture sur la production d'acides par les champignons.....	191
IV.3.1) Source de glucose.....	191
IV.3.2) Source d'azote.....	193
IV.4) Conclusion.....	194
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>195</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>200</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>241</b>

## Liste des figures

Figure 1. Schéma général du projet de thèse présentant les principales étapes de travail. ....	4
Figure 2. Minéraux silicatés et non silicatés de la croûte terrestre (adapté de Albert 2019). ....	8
Figure 3. Formes des ETM dans la solution du sol (Schneider 2016). ....	17
Figure 4. Schéma représentant les fractions d'un sol (d'après Albert 2019). ....	21
Figure 5. Mobilité des ETM dans les fractions minéralogiques et les divers réactifs d'extraction employés dans les protocoles d'extractions séquentielles (d'après Schneider 2016). ....	25
Figure 6. Techniques d'analyses des métaux. ....	34
Figure 7. Méthodes de minéralisation totale normées. ....	35
Figure 8. Protocole de l'extraction séquentielle selon Leleyter et Probst (1999). ....	67
Figure 9. Préparation des essais d'exposition d' <i>Absidia cylindrospora</i> aux métaux en milieu de culture liquide .....	74
Figure 10. Mobilité des métaux (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn) par extraction HCl sur les sols étudiés : pourcentage extrait. ....	81
Figure 11. Répartition de Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb et Zn au sein des différentes fractions potentiellement labiles du sol R, C et L et C. ....	84
Figure 12. Pourcentages de métaux lessivés par HCl et F6 (extraction séquentielle selon Leleyter et Probst 1999). ....	89
Figure 13. Photographies des mycéliums sur milieu MEA des souches fongiques étudiées. (a) : <i>Perenniporia fraxinea</i> ; (b) : <i>Absidia cylindrospora</i> . ....	93
Figure 14. Photographie des colonies fongiques isolées du sol R. ....	94
Figure 15. Taxonomie des souches fongiques isolées du sol R. ....	95
Figure 16. Photographie des amplicons obtenus par PCR à partir de l'ADN de la souche <i>Cochliobolus geniculatus</i> avec les amorces ITS 1-4 (A) et les amorces $\beta$ 2ab et CaM (B). ....	97
Figure 17. Protocole de réalisation du microcosme en cristallisoir. ....	102
Figure 18. Photographies des microcosmes en cristallisoir prises au moment de la séparation des couches. ....	103
Figure 19. Photographies des mycéliums à la fin de l'essai issus des microcosmes en cristallisoir. ....	104
Figure 20. Photographies des filtres avec : <i>Absidia cylindrospora</i> (A) et <i>Perenniporia fraxinea</i> (B). ....	110

Figure 21. Conception du microcosme en boîte de Petri sans filtres.....	114
Figure 22. Photographies de la méthode de séparation des couches du microcosme bioaugmenté avec <i>Absidia cylindrospora</i> .....	115
Figure 23. Facteurs de bioaccumulation des microcosmes bioaugmentés. ....	117
Figure 24. Pourcentages des métaux dans les sols artificiels des microcosmes en boîtes de Petri. ....	120
Figure 25. Photographies des cultures obtenues à partir du microcosme biostimulé (S <sup>+</sup> S) et du microcosme bioaugmenté (S <sup>+</sup> Aac). ....	123
Figure 26. Protocole de réalisation du microcosme avec <i>Absidia cylindrospora</i> en boîte de Petri. ....	126
Figure 27. Conditions d'expérimentations en microcosmes pour une durée de trois mois. ....	130
Figure 28. Photographies du microcosme bioaugmenté à T 3 mois. ....	131
Figure 29. Poids frais et poids secs des mycéliums (à 15 jours, 1 mois, 2 mois et 3 mois). ....	132
Figure 30. Photographies des cultures obtenues par la méthode d'incorporation directe à partir du sol des microcosmes bioaugmentés aux différents temps d'incubation. ....	137
Figure 31. Teneurs en Cd, Co, Cr, Ni et Cu, Pb, Zn dans les mycéliums des essais de bioaugmentation aux temps d'incubation (15j ,1 mois, 2 mois, 3 mois).....	139
Figure 32. Corrélations entre les teneurs en ETM dans le sol R et dans les mycéliums des microcosmes bioaugmentés. ....	141
Figure 33. Facteurs de bioaccumulation des microcosmes bioaugmentés à 15 jours, 1 mois, 2 mois et 3 mois.....	142
Figure 34. Pourcentages de Cd, Cu, Pb et Zn extraits par HCl 1M dans les sols des essais de bioaugmentation (A.c) et biostimulation aux temps d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois). ....	144
Figure 35. Pourcentages de Co, Cr et Ni extraits par HCl 1M dans les sols des essais de bioaugmentation (A.c) et biostimulation aux temps d'incubation (15 jours ,1 mois, 2 mois, 3 mois). ....	144
Figure 36. Répartition de Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb et Zn au sein des différentes fractions potentiellement labiles du sol R (t <sub>0</sub> ) et du sol A 3 mois.....	146
Figure 37. Pourcentages de Cd, Cr, Co, Cu, Ni et Zn lessivés par HCl et F6 dans le sol bioaugmenté à la fin de l'expérimentation (3 mois).....	150

Figure 38. Pourcentages de Cd, Cu, Pb et Zn extraits par HCl 1M dans les sols des essais de bioaugmentation (P.f) et biostimulation aux temps d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois). .....	155
Figure 39. Pourcentages de Cr, Co et Ni extraits par HCl 1M dans les sols des essais de bioaugmentation (P.f) et biostimulation aux temps d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois). .....	155
Figure 40. Photographies de quelques souches identifiées à partir des microcosmes de 3 mois. .....	160
Figure 41. Mode opératoire pour la préparation des boîtes de Petri supplémentées en Cd et en vert de bromocrésol. .....	163
Figure 42. Photographies des mycéliums au 2 <sup>ème</sup> et au 6 <sup>ème</sup> jour d'exposition au métal en milieu solide. .....	164
Figure 43. Photographies des mycéliums ayant poussé en milieu liquide sans métal (gauche) et supplémenté en Cd (droite). .....	167
Figure 44. Chromatogramme du mélange des acides étudiés dans les conditions : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 0,004N à 0,5 mL.min <sup>-1</sup> avec colonne chauffée à 42°C. .....	171
Figure 45. Chromatogramme du mélange d'acides injecté dans les conditions : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 0,008N à 0,5 mL.min <sup>-1</sup> avec colonne chauffée à 42°C. .....	171
Figure 46. Chromatogramme du mélange d'acides injectés dans les conditions : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 0,008 N à 0,5 mL.min <sup>-1</sup> avec colonne chauffée à 25°C. .....	172
Figure 47. Chromatogramme du mélange d'acides injectés dans les conditions : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 0,008 N à 0,5 mL.min <sup>-1</sup> avec colonne chauffée à 35°C. .....	173
Figure 48. Chromatogramme du mélange d'acides injectés dans les conditions : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 0,008 N à 0,5 mL.min <sup>-1</sup> avec colonne chauffée à 65°C. .....	173
Figure 49. Résumé des temps de rétentions des 6 pics en fonction de la température de la colonne. .....	174
Figure 50. Chromatogramme du mélange d'acides injectés dans les conditions : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 0,008N à 0,6 mL.min <sup>-1</sup> avec colonne chauffée à 35°C. .....	175
Figure 51. Schéma résumant la mise au point de la méthode d'analyse. .....	176
Figure 52. Chromatogrammes des 5 acides étudiés injectés dans les conditions : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 0,008N à 0,5 mL.min <sup>-1</sup> avec colonne chauffée à 35°C. .....	177

Figure 53. Droites d'étalonnage des acides étudiés.....	180
Figure 54. Concentrations en acide oxalique en mg.L <sup>-1</sup> analysées à chaque période de prélèvement (24h, 48h, 72h et 96h) dans les milieux de culture d' <i>Absidia cylindrospora</i> . .....	183
Figure 55. Concentrations en acide citrique analysées à toutes les périodes de prélèvement (24h, 48h, 72h et 96h) dans les milieux de culture d' <i>Absidia cylindrospora</i> . .....	186
Figure 56. Concentrations en mg.L <sup>-1</sup> en acides (oxalique et citrique) dans les milieux de culture à toutes les durées d'incubation.....	189
Figure 57. Allure des pics du Cr en fonction des longueurs d'onde issus du logiciel ICP-AES.	245
Figure 58. Méthode de calcul des LD et LQ par la méthode d'étalonnage par régression linéaire. ....	246
Figure 59. Pourcentages évalués par extraction simple (HCl et EDTA) sur le sol C. ....	249
Figure 60. Pourcentages évalués par extraction simple (HCl et EDTA) sur le sol L. ....	249
Figure 61. Légende de chaque microcosme.....	252
Figure 62. Photographies en microscopie d'isolats fongiques purifiés à partir des méthodes par incorporation directe et méthode suspensions- dilutions.....	266

## Liste des tableaux

Tableau 1. Concentrations moyennes de certains éléments dans la croûte terrestre par ordre d'abondance (cité par Leleyter-Reinert 2017, Allègre et Michard 1973). .....	12
Tableau 2. Valeurs d'analyse de la situation pour interpréter les concentrations en métaux dans les sols en France métropolitaine (Baize et al. 2000). .....	15
Tableau 3. Liste non exhaustive des études de mycoremédiation de métaux. ....	55
Tableau 4. Liste non exhaustive des types et quantités d'acides produites par certaines souches fongiques. ....	57
Tableau 5. Liste non exhaustive des conditions chromatographiques pour le dosage des acides organiques par HPLC. ....	60
Tableau 6. Programme pour la minéralisation acide assistée par micro-ondes. ....	65
Tableau 7. Valeurs de limites de détection et de quantification pour les métaux dosés en ICP-AES en mg.L <sup>-1</sup> calculées par la méthode des blancs. ....	69
Tableau 8. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) des métaux étudiés en mg.kg <sup>-1</sup> . ....	70
Tableau 9. Bilan sur la minéralisation du sol de référence « clean loam soil » et du sédiment de référence « TH2 ». ....	70
Tableau 10. Présentation des conditions testées en milieu de culture liquide. ....	73
Tableau 11. Composition du sol synthétique (selon la norme NF EN ISO 11268-2). ....	76
Tableau 12. Caractéristiques physicochimiques des principaux sols étudiés. ....	77
Tableau 13. Teneurs totales en éléments métalliques dans les sols de l'étude et teneurs et valeurs d'analyse de la situation pour interpréter les concentrations en métaux dans les sols en France métropolitaine (Baize et al. 2000). ....	79
Tableau 14. Taxonomie et origine des souches étudiées. ....	92
Tableau 15. Tableau descriptif des microcosmes en cristallisoir. ....	102
Tableau 16. Teneurs totales (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn) dans les sols C et la sciure employée pour les microcosmes en cristallisoir. ....	104
Tableau 17. Teneurs totales de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn dans le sol et la sciure des microcosmes en cristallisoir. ....	105
Tableau 18. Masses (en poids sec) de mycéliums obtenus à partir des microcosmes en cristallisoirs à la fin de l'essai. ....	106

Tableau 19. Teneurs totales en ETM dans les mycéliums issus des microcosmes en cristallisoir. .....	107
Tableau 20. Conditions de préparation des microcosmes avec filtres. ....	109
Tableau 21. Teneurs totales de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn dans le sol C, le filtre et la gélose sans traitement. ....	110
Tableau 22. Concentrations totales de Cd, Co, Cr, Cu, Ni et Pb dans les sols et les filtres des microcosmes avec filtres en mg.kg <sup>-1</sup> .....	111
Tableau 23. Teneurs en métal dans les composants du microcosme avec le sol synthétique en mg.kg <sup>-1</sup> des microcosmes (sol synthétique). ....	115
Tableau 24. Quantité de métal (Cd, Cu et Pb) dans les composants du microcosme (sol synthétique) en mg.....	118
Tableau 25. Souches isolées et identifiées à partir des microcosmes réalisés avec le sol synthétique. .....	121
Tableau 26. Avantages et inconvénients des trois types de microcosmes développés au cours de la thèse. ....	123
Tableau 27. Teneurs totales en mg.kg <sup>-1</sup> dans les composants des microcosmes avec le sol (C).128	
Tableau 28. Dénombrement et identification des espèces fongiques viables isolées du sol R (T0) et des sols des essais de biostimulation et bioaugmentation dans les microcosmes après chaque durée d'incubation. ....	134
Tableau 29. Teneurs en métaux dans les sols biostimulés et bioaugmentés aux temps d'incubation (15 jours ,1 mois, 2 mois, 3 mois).....	138
Tableau 30.Teneurs en métaux dans les sols biostimulés et bioaugmentés (P.f) aux temps d'incubation (15j ,1 mois, 2 mois, 3 mois). ....	154
Tableau 31. Dénombrement et identification des espèces fongiques viables isolées du sol R (T0) et des sols des essais de biostimulation et bioaugmentation dans les microcosmes (avec <i>Perenniporia fraxinea</i> ) après chaque durée d'incubation.....	157
Tableau 32. Données de préparation des milieux de culture supplémentés en vert de bromocrésol. .....	163
Tableau 33. Masses des mycéliums de <i>Absidia cylindrospora</i> et <i>Perenniporia fraxinea</i> issus des milieux liquides en poids frais et en poids secs. ....	167
Tableau 34. Intensités et aires des pics des acides étudiés. ....	170

Tableau 35. Temps de rétention, intensités et aires des pics des acides étudiés injectés dans les conditions : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 0,008N à 0,5 mL.min <sup>-1</sup> avec colonne chauffée à 35°C.....	177
Tableau 36. Données de préparation de la gamme d'étalonnage des acides étudiés.....	179
Tableau 37. Les limites de détection et de quantification des acides étudiés.....	181
Tableau 38. Composition du milieu de Galzy et Slonimski (GS).....	243
Tableau 39. Composition de la solution de sels minéraux.....	243
Tableau 40. Composition de la solution d'oligo-éléments.....	243
Tableau 41. Composition de la solution de vitamines.....	244
Tableau 42. Composition du milieu MEA.....	244
Tableau 43. Limites de détection et de quantification déterminées par régression linéaire (mg.L <sup>-1</sup> ). .....	246
Tableau 44. Limites de détection et de quantification déterminées par régression linéaire (mg.kg <sup>-1</sup> ). .....	246
Tableau 45. Teneurs totales de 24 éléments dans les sols étudiés.....	247
Tableau 46. Répartition de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn au sein des fractions labiles des sols L, C et R.....	248
Tableau 47. Poids frais et poids secs des mycéliums d' <i>Absidia cylindrospora</i> issus des essais de bioaugmentation aux temps d'incubation.....	264
Tableau 48. Teneurs en Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn dans les mycéliums des essais de bioaugmentation aux temps d'incubation (15j ,1 mois, 2 mois, 3 mois).....	265
Tableau 49. Facteurs de bioaccumulation des sols des microcosmes bioaugmentés à 15 jours, 1 mois, 2 mois et 3 mois.....	265
Tableau 50. Masses des mycéliums d' <i>Absidia cylindrospora</i> et <i>Perenniporia fraxinea</i> issus des milieux liquides en poids frais et en poids secs.....	269
Tableau 51. Teneurs en g.L <sup>-1</sup> en acides oxalique et citrique dans les milieux de culture d' <i>Absidia cylindrospora</i> (24h, 48h, 72h, 96h).....	270

## Introduction générale

Les éléments métalliques sont retrouvés naturellement dans les sols, ceci correspond au fond pédogéochimique naturel qui représente le résultat des évolutions naturelles, géologiques et pédologiques, indépendamment de tout apport d'origine anthropique (Baize, 1997). Cependant, ces éléments sont également apportés dans l'environnement par les activités humaines comme les activités minières, industrielles et agricoles en particulier (Bakircioglu et al. 2011). De fait, ces 200 dernières années d'industrialisation intensive ont causé une contamination métallique historique (Lacalle et al. 2020), car les métaux sont depuis longtemps considérés comme des ressources importantes dans le domaine industriel du fait de leur implication dans le développement technologique. Ces polluants sont persistants dans l'environnement et sont aisément transportés dans les compartiments de l'environnement (sol, eau, air). Ils ont en plus la particularité d'être non dégradables (Akan et al. 2013 ; Hlihor et al. 2017).

Pour pallier aux problèmes liés à la contamination des sols et réduire les risques environnementaux et sanitaires liés aux contaminants, des techniques de remédiation ont été élaborées. La remédiation consiste à utiliser des traitements physiques, chimiques ou biologiques pour dépolluer les sols (Ali et al. 2017). La bioremédiation (traitement biologique) en particulier emploie des organismes vivants (bactéries, plantes, champignons) pour la dégradation, l'extraction, ou la stabilisation des contaminants (Dzionic et al. 2016). La stabilisation vise à réduire la solubilité, la mobilité et/ou la toxicité du polluant (Hakeem et al. 2014).

La bioremédiation des sols contaminés en éléments métalliques implique le développement ou la recherche d'organismes résistants capables d'accumuler ces éléments pour diminuer leur disponibilité environnementale ou les stabiliser dans la matrice sol (Ahmad et al. 2011). Le traitement biologique employant des champignons que l'on nomme mycoremédiation constitue une approche originale. En effet, les champignons, principaux décomposeurs des polymères végétaux, possèdent un potentiel intéressant, en raison de leur structure et de leur métabolisme. Certains peuvent subsister dans des conditions environnementales extrêmes. Ils ont également la capacité de développer un vaste réseau mycélien capable de coloniser le sol, de transférer des nutriments et des polluants et de produire des composés extracellulaires tels que des acides et des enzymes.

Du fait de leur grand potentiel, plusieurs études (Fourest et al. 1994 ; Martins et al. 2006 ; Hlihor et al. 2015) se sont intéressées à la capacité des champignons à accumuler des métaux à partir d'un milieu liquide (effluents industriels par exemple) ou solides (sols pollués et déchets urbains). D'autres études (Cunningham et Kuiack 1992; Scervino et al. 2010; Liaud et al. 2014) se sont penchées sur la capacité des champignons à produire des acides, potentiels chélateurs de métaux. Dans ce cadre, les objectifs de cette thèse s'inscrivent dans la suite des travaux initiés par Quentin Albert (2015-2019) au sein du laboratoire qui avaient permis de mettre en évidence des souches fongiques efficaces dans la biosorption de 3 éléments métalliques (Cd, Cu, Pb) et d'évaluer leur potentiel en microcosmes de sols.

Les objectifs poursuivis pour ce travail de thèse sont de :

- mettre au point un microcosme de sol permettant d'isoler le mycélium afin de réaliser des analyses plus fines au sein du mycélium.
- étudier la biosorption ou la biostabilisation d'éléments traces métalliques par les souches fongiques *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* au cours d'une expérimentation de 3 mois en employant le microcosme de sol optimisé.
- affiner l'étude de l'impact des champignons sur la spéciation minéralogique des métaux dans les sols, par l'utilisation de techniques d'extractions chimiques simples et séquentielles.
- dresser des profils de composés sécrétés (acides organiques) par *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* sous condition de stress métallique.

Ce manuscrit est organisé de la manière suivante :

**Le premier chapitre** consiste à définir les notions de sol, d'éléments traces métalliques et de spéciation minéralogique, avant de discuter de la gestion des sols pollués et des techniques de remédiation des sols. Enfin les particularités des champignons en mycoremédiation seront mises en avant.

**Le deuxième chapitre** présentera les techniques de caractérisation des sols (paramètres physicochimiques et méthodes d'analyse des métaux) ainsi que techniques de caractérisation et d'identification des isolats fongiques. Ensuite, la mise en évidence qualitative de la production d'acides par les champignons sera décrite. Enfin, une technique de dosage de certains acides produits par les champignons par chromatographie liquide haute performance sera brièvement présentée.

**Le troisième chapitre** présentera les sols de l'étude et les résultats de caractérisation de ces derniers. Les souches fongiques étudiées au cours de ce travail et celles identifiées à partir des sols seront présentées.

**Le quatrième chapitre** sera consacré à la mise au point du microcosme adapté à notre étude. Pour cela, la conception et la séparation des couches des différents prototypes de microcosmes élaborés pour l'étude seront détaillées. Les résultats obtenus (bilan de matière, capacité de biosorption de la souche fongique *Absidia cylindrospora*) pour la validation du microcosme retenu pour l'étude y seront présentés.

**Le cinquième chapitre** présentera les résultats de deux études en microcosme de sol menées sur une période de 3 mois en employant séparément la souche fongique *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* en bioaugmentation. Les résultats concernent pour chaque temps d'incubation le suivi de la biomasse fongique et de la microfonge du sol, ainsi que l'étude de la biosorption de métaux au sein du mycélium.

**Le sixième chapitre** sera dédié à l'analyse qualitative et quantitative des acides organiques potentiellement sécrétés par *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* suite à une exposition à un stress métallique. Dans ce chapitre sera détaillé le protocole de développement de la méthode d'analyse par chromatographie liquide haute performance pour le dosage de certains acides organiques sécrétés par *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea*.

A la fin de chaque chapitre, une conclusion résumant les travaux est présentée. La totalité des travaux réalisés sont récapitulés sur la figure 1.

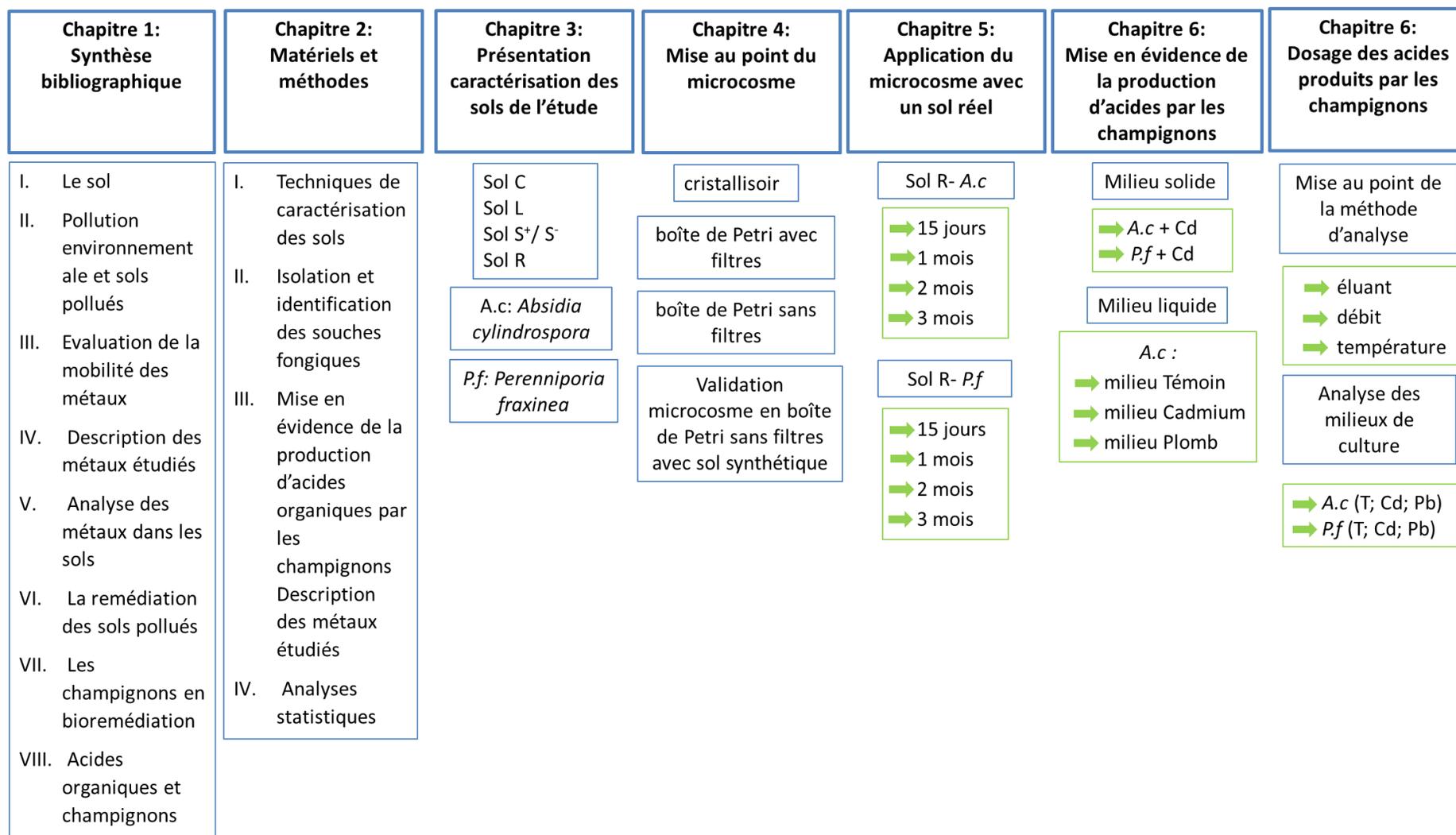


Figure 1. Schéma général du projet de thèse présentant les principales étapes de travail.

# **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

# I. Le sol

## I.1) Définition du sol

Dans la littérature, différentes définitions du système « sol » sont proposées par les pédologues ou les géologues.

- Le sol est défini par les géologues comme la partie superficielle des roches qui a subi une altération par des facteurs d'origine naturelle comme les paramètres climatiques et biologiques mais aussi par des facteurs d'origine anthropique.
- Pour les pédologues, le sol est constitué de parties minérales et organiques sous l'état solide, liquide, ou gazeux et suivent un certain agencement formant des structures spécifiques (Baize et al. 1992).
- Selon la Société Américaine des Sciences du Sol, le sol correspond à : (i) La matière minérale ou organique non consolidée à la surface immédiate de la Terre servant de milieu naturel à la croissance des plantes terrestres. (ii) La matière minérale ou organique non consolidée à la surface de la Terre qui a été soumise aux effets de facteurs génétiques et environnementaux.
- L'AFES<sup>1</sup> a défini le sol comme étant : « un volume qui s'étend depuis la surface de la Terre jusqu'à une profondeur marquée par l'apparition d'une roche dure ou meuble, peu altérée, ou peu marquée par la pédogenèse. L'épaisseur du sol peut varier de quelques centimètres à quelques dizaines de mètres, ou plus. Il constitue, localement, une partie de la couverture pédologique qui s'étend à l'ensemble de la surface de la Terre. Il comporte le plus souvent plusieurs horizons correspondant à une organisation des constituants organiques et/ou minéraux (la terre). Cette organisation est le résultat de la pédogenèse et de l'altération du matériau parental. Il est le lieu d'une intense activité biologique (racines, faune et micro-organismes) ». Cette définition officielle des sols a été formulée par l'AFES en 2014 et a été ensuite retenue en 2018.

Toutes ces définitions s'accordent à dire que le sol est un milieu caractérisé par une composition très complexe. Toutefois, la définition retenue pour ce travail de thèse est la définition proposée par l'AFES qui est plus complète et qui regroupe plusieurs aspects.

---

<sup>1</sup> **AFES** : Association Française pour l'Etude des Sols

## 1.2) Phases du sol

Le sol est composé de trois phases : une phase solide (constituée d'argiles, limons, sables, matière organique), une phase liquide (solution du sol constituée de composés dissous) et une phase gazeuse (constituée de gaz, comme l'oxygène, l'azote) (Durand et Vachier 1988 ; Baize et al. 1992).

### 1.2.1) La phase solide

La phase solide est composée d'une fraction minérale, ainsi qu'une fraction organique (Proffit 2011).

#### *1.2.1.1) La fraction minérale*

La fraction minérale est formée à partir de minéraux primaires : issus de l'altération de la roche mère par érosion, comme des minéraux silicatés (quartz, feldspaths), des calcites (formées essentiellement de carbonates de calcium), ou encore des dolomites (se caractérisant par la présence de carbonate de magnésium en plus des carbonates de calcium). Les minéraux secondaires proviennent de l'altération des minéraux primaires par différents processus chimiques et sont désignés par le complexe d'altération du sol (formé d'argiles et d'oxydes métalliques) (Proffit 2011).

Les minéraux du sol sont répartis en minéraux silicatés qui représentent environ 92% des minéraux constituant la croûte terrestre, tels que les quartz, les pyroxènes et les feldspaths. Tandis que les minéraux non silicatés ne représentent que 8% des minéraux de la croûte terrestre. Ils comprennent les phosphates, les carbonates, les halogénures, les sulfures, les sulfates, les oxydes (sauf  $\text{SiO}_2$ ) et les éléments natifs (Leleyter-Reinert 2017). La figure 2 présente les différents minéraux de la croûte terrestre.

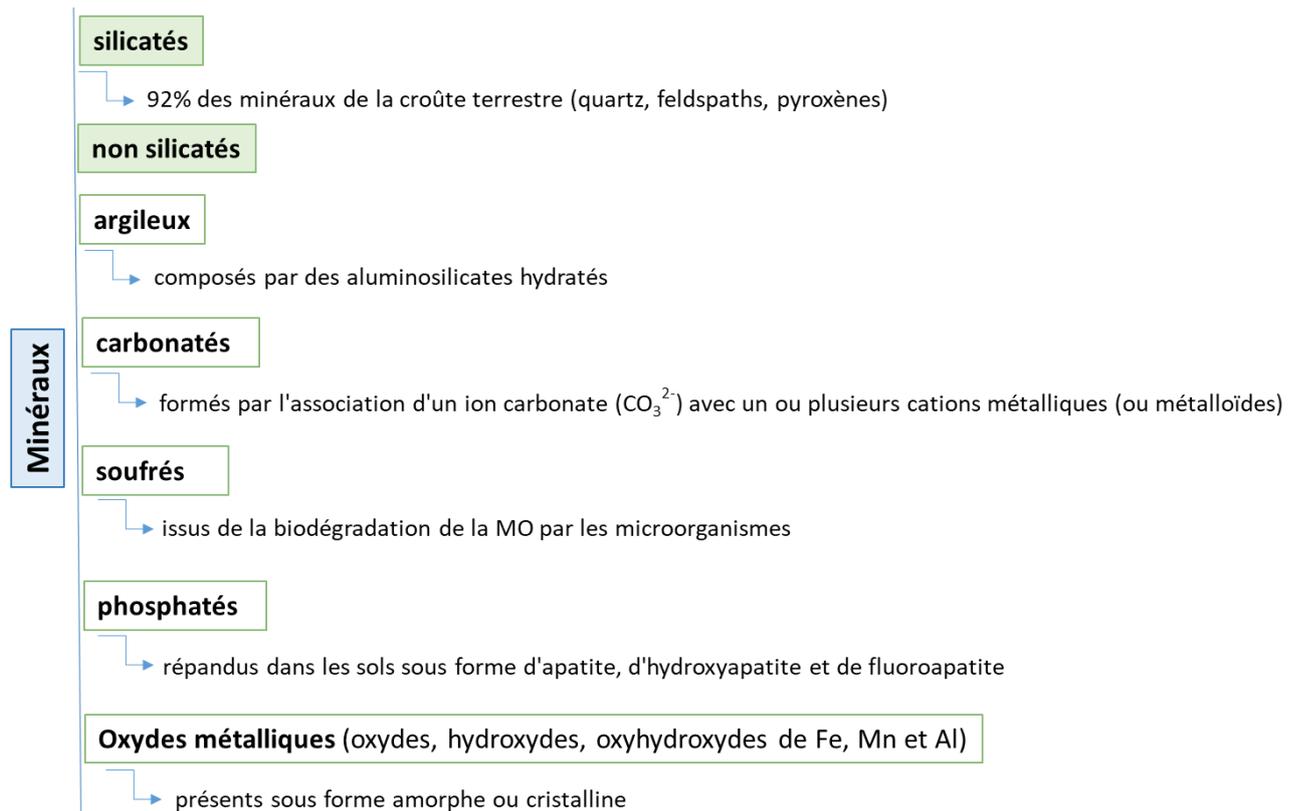


Figure 2 .Minéraux silicatés et non silicatés de la croûte terrestre (adapté de Albert 2019).

#### 1.2.1.1.1) Les argiles

Les argiles sont formées d'éléments à l'état ionique, principalement d'aluminosilicates hydratés. Elles font partie de la famille des phyllosilicates et leur structure est composée d'une succession de feuillets d'oxydes d'aluminium, de silicium et d'oxygène. L'espace entre chaque feuillet appelé « espace inter-foliaire » peut abriter des cations dits échangeables, liés avec des liaisons électrostatiques qui représentent des liaisons chimiques faibles (Cadene 2005 ; Leleyter-Reinert 2017 ; Albert 2019). Elles possédant une grande surface spécifique et sont connues pour être les principaux adsorbants des sols. L'adsorption constitue un phénomène de surface qui permet aux atomes ou aux molécules de se fixer sur une surface solide (Deschamps et al. 2006).

#### 1.2.1.1.2) Les oxydes métalliques

Les oxydes, hydroxydes et oxyhydroxydes, sont souvent appelés oxydes métalliques du sol. Les oxydes métalliques retrouvés dans les sols sont les oxydes de silicium, de fer, d'aluminium et de manganèse. Ils sont naturellement présents dans les sols sous deux formes : amorphe ou cristalline (Leleyter et Probst, 1999). Les oxydes de fer les plus répandus sont la ferrihydrite ( $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), l'hématite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) ou encore la goéthite ( $\text{FeOOH}$ ).

Les oxydes de fer sont très complexes et ont la particularité d'être très finement divisés (Liu et al. 2009 ; Cismasu et al. 2012).

D'un point de vue cristallographique, les oxydes de fer présentent des structures beaucoup plus complexes par rapport aux oxydes d'aluminium. En effet, les oxydes d'Al subissent peu de réactions de substitution de l'ion  $Al^{3+}$ , contrairement aux oxydes de Fe, qui subissent plusieurs réactions de substitution avec d'autres cations. Ceci permet aux oxydes de Fe en particulier d'avoir une grande affinité avec plusieurs cations. D'autre part, le degré de cristallinité conditionne la stabilité chimique des oxydes : plus la cristallinité est élevée plus la stabilité chimique augmente (Girard et al. 2010).

### *1.2.1.2) La fraction organique*

La fraction organique du sol est composée de matières organiques (MO) représentées par :

- les matières organiques vivantes (MOV) tels que les racines des plantes, les micro-organismes fongiques et microbiens ainsi que la microflore du sol.
- les matières organiques fraîches (MOF), composées de débris de végétaux (exsudats), d'animaux (cadavres), mais aussi de microbes et de champignons (cadavres, exsudats).
- la matière organique stable formée de substances humiques ou humus, qui représente plus de 70% de la fraction organique (Duparque et Rigalle 2011).

L'humus est le principal composant de la matière organique naturelle, il est retrouvé dans les sols, les sédiments et les plans d'eau (Tian et al. 2021).

### *1.2.2) La phase liquide*

La phase liquide du sol ou encore « solution du sol » est composée principalement d'eau et d'éléments dissous qui proviennent de l'altération de la phase solide. Elle constitue en effet le vecteur des réactifs et des produits de son altération, mais aussi la zone de toutes interactions entre les composants du sol (Durand et Vachier 1988; Proffit 2011). La composition de la phase liquide dépend non seulement de la nature du sol avec lequel elle est en contact, mais également de l'activité microbiologique et fongique (exsudats) qui ont principalement lieu au niveau des racines des végétaux. La solution du sol est considérée comme le siège des échanges sol-plantes, car les végétaux vont puiser les nutriments au sein de cette dernière.

Outre des éléments dissous, la solution du sol véhicule des colloïdes, qui sont définis comme des particules de petite taille (variant de quelques nanomètres à une dizaine de micromètres) se caractérisant par une grande surface de contact et portant le plus souvent des charges négatives.

Ainsi la liaison des composés (dont les polluants) auxquels les colloïdes ont une affinité (McCarthy et Zachara 1989) a lieu par adsorption, échange d'ions et/ou co-précipitation (Pédrot 2009).

### 1.2.3) La phase gazeuse

La phase gazeuse a à peu près la même composition que l'air atmosphérique, majoritairement composée de dioxyde d'azote (78%) et d'oxygène (21%). Elle se distingue cependant par l'activité des micro-organismes qui enrichissent sa composition en certains composés comme NO, NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub> et H<sub>2</sub>S.

La composition de la phase gazeuse est liée également à la profondeur, c'est-à-dire qu'avec la profondeur, les échanges avec l'atmosphère sont réduits, l'oxygène et le CO<sub>2</sub> sont plus présents à la surface du sol (Navel 2011; Proffit 2011). La teneur liée aux gaz des activités biologiques anoxiques augmente.

## 1.3) Composition de la croûte terrestre

D'un point de vue chimique, la croûte terrestre est principalement constituée d'éléments dits majeurs qui représentent 99,4% en masse de la croûte terrestre. Ils sont au nombre de 12 et sont : l'oxygène, le silicium, l'aluminium, le fer, le calcium, le sodium, le potassium, le magnésium, le titane, l'hydrogène, le phosphore et le manganèse. Leurs concentrations moyennes dans la croûte terrestre sont supérieures à 1g.kg<sup>-1</sup> (Leleyter-Reinert 2017). Ils sont classés par ordre d'abondance dans la croûte terrestre dans le tableau 1.

La concentration des éléments dit mineurs, quant à elle, varie entre 100 et 1000 mg.kg<sup>-1</sup>. Les éléments restants, de concentration inférieure à 100 mg.kg<sup>-1</sup>, sont dit éléments traces.

Un élément trace métallique est défini dans le compendium de terminologie chimique de l'IUPAC<sup>2</sup> par « Tout élément ayant une concentration moyenne dans les sols inférieure à environ 100 ppm d'atomes ou inférieure à 100 µg.g<sup>-1</sup> » (Brown et Milton 2005). Les métaux sont répartis en oligo-éléments (un élément trouvé en petite proportion, mais d'une manière constante, à l'analyse chimique des organismes vivants (Bertrand 1937) tels que le cuivre et le zinc et d'autres éléments (comme le plomb et le cadmium) qui représentent des éléments potentiellement toxiques et ne remplissent aucune fonction biologique actuellement connue et peuvent donc être très toxiques, même à de faibles concentrations (Fomina et Gadd 2018).

---

<sup>2</sup> IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

En effet, certains oligoéléments sont essentiels à la croissance et au développement des micro-organismes, des plantes et des animaux. Ils représentent des constituants de molécules organiques nécessaires à des réactions fondamentales du métabolisme cellulaire (Lavollay 1956). Cependant ces oligo-éléments à des teneurs élevées peuvent être toxiques (Fomina et Gadd 2018).

Plusieurs termes sont retrouvés dans la littérature pour désigner les métaux comme : métaux lourds, éléments traces métalliques ou encore éléments potentiellement toxiques.

Le terme « métaux lourds » ne sera pas employé au cours de ce travail, car il a suscité plusieurs débats et a été également critiqué par l'IUPAC, le considérant comme étant « imprécis et trompeur ». Bien que l'ASEF<sup>3</sup> ait établi une définition des métaux lourds : des éléments métalliques, naturels présentant un masse volumique supérieure à 5000 kg.m<sup>3</sup> (Akan et al. 2013), cette définition peut induire en erreur, car certains métaux avec de faibles densités ou certains métalloïdes sont également appelés par les scientifiques « métaux lourds », tel que l'Arsenic, métalloïde souvent nommé métal lourd. Le terme utilisé au cours de ce travail sera « éléments traces métalliques » ou ETM ou encore métaux. Par ailleurs, pour plus de facilité de lecture, Cr sera englobé dans le terme ETM (même si selon le tableau 1, Cr n'est pas un élément trace mais un élément mineur).

---

<sup>3</sup> **ASEF** : Association Santé Environnement France

Tableau 1. Concentrations moyennes de certains éléments dans la croûte terrestre par ordre d'abondance (cité par Leleyter-Reinert 2017, Allègre et Michard 1973).

	élément	symbole	(g.kg <sup>-1</sup> )
<b>Eléments majeurs abondance &gt; 1 g.kg<sup>-1</sup></b>	Oxygène	O	466,0
	Silicium	Si	277,2
	Aluminium	Al	81,3
	Fer	Fe	50,0
	Calcium	Ca	36,3
	Sodium	Na	28,3
	Potassium	K	25,9
	Magnésium	Mg	20,9
	Titane	Ti	4,4
	Hydrogène	H	1,4
	Phosphore	P	1,1
	Manganèse	Mn	1,0
	Total		993,7
<b>Eléments mineurs 0,1 &lt; abondance &lt; 1 g.kg<sup>-1</sup></b>	Fluor	F	0,63
	Baryum	Ba	0,43
	Strontium	Sr	0,38
	Soufre	S	0,26
	Carbone	C	0,20
	Zirconium	Zr	0,17
	Vanadium	V	0,14
	Chlore	Cl	0,13
	Chrome	Cr	0,10
	Rubidium	Rb	0,09
<b>Eléments traces abondance &lt; 0,1 g.kg<sup>-1</sup></b>	Nickel	Ni	0,08
	Zinc	Zn	0,07
	Cérium	Cs	0,06
	Cuivre	Cu	0,06
	Yttium	Y	0,03
	Lanthane	La	0,03
	Néodyme	Nd	0,03
	Cobalt	Co	0,03
	Scandium	Sc	0,02
	Azote	N	0,02
	Lithium	Li	0,02
	Niobium	Nb	0,02
	Gallium	Ga	0,02
	Plomb	Pb	0,01
	Thorium	Th	0,010
	Uranium	U	0,003
	Arsenic	As	0,002
Bore	B	0,001	
Cadmium	Cd	< 0,010	
Sélénium	Se	< 0,001	

## II. Pollution environnementale et sols contaminés

### II.1) Pollution environnementale métallique

Les éléments métalliques sont libérés dans l'environnement par des sources anthropiques comme les activités minières, l'industrie de la peinture, ou encore l'usage des pesticides, mais aussi par des sources naturelles, comme l'altération mécanique et chimique des roches (Bakircioglu et al. 2011).

Au niveau international de nombreuses réglementations ont pour but de réduire les émissions de métaux/métalloïdes tel que : antimoine (Sb), arsenic (As), cadmium (Cd), chrome (Cr), cobalt (Co), cuivre (Cu), étain (Sn), manganèse (Mg), mercure (Hg), nickel (Ni), plomb (Pb), sélénium (Se), tellure (Te), thallium (Tl), vanadium (V) et zinc (Zn) (Aarhus 2012).

Le cadmium, le plomb et le mercure sont particulièrement surveillés, identifiés par le CIRC<sup>4</sup> comme substances cancérogènes. Ainsi, le CIRC a confirmé un effet cancérigène du Cd et ses composés sur l'organisme et l'a classé dans le groupe 1 (cancérigène) en 1993, tandis que Pb et ses dérivés inorganiques sont classés dans le groupe 2B (possiblement cancérigène) en 1987 et 2A (probablement cancérigène) en 2006. Pour ce qui est de Hg et ses composés organiques, ils font partie du groupe 2B. Les ETM sont également considérés comme des polluants prioritaires par l'Agence du registre des substances et maladies toxiques des Etats Unis (département des services sociaux de la santé). Plusieurs métaux figurent dans la liste des 126 polluants prioritaires établie par l'US EPA<sup>5</sup>, dont le cadmium, le plomb, le nickel, le mercure et le cuivre (Costa et Tavares 2017).

La Convention sur la pollution atmosphérique transfrontière à longue distance représente la première convention qui a pour but de surveiller les métaux dans l'environnement (air, eau, sols) et d'établir un protocole international. En effet, le Protocole d'Aarhus (ou le Protocole sur les métaux lourds) établi en 1998 sous l'égide de la CEE-NU<sup>6</sup> exige aux parties de diminuer leurs émissions de Cd, Pb et Hg par des industries, des combustibles et l'incinération des déchets.

---

<sup>4</sup> CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

<sup>5</sup> US EPA: United States Environmental Protection Agency

<sup>6</sup> CEE-NU : Commission Economique pour l'Europe des Nations Unies

## II.2) Contamination des sols

### II.2.1) Sites contaminés

La pollution du sol en particulier correspond à la présence d'un produit chimique ou d'une substance déplacée et ou/présente dans le sol qui a des effets néfastes sur tout organisme non ciblé (FAO<sup>7</sup> et ITPS<sup>8</sup> 2015).

La pollution des sols est un problème majeur dans le monde avec un nombre de sites pollués très élevé (Lacalle et al. 2020 ; Agrawal et al. 2021). Une estimation mondiale de la pollution des sols effectuée dans les années 1990 par le ISRIC<sup>9</sup> et le PNUE<sup>10</sup> relève une superficie de 22 millions d'hectares de sols pollués (Rodríguez-Eugenio et al. 2018). En Europe, le nombre de sites pollués est évalué à plus de 2 millions, pour une superficie totale de 3,5 millions d'hectares (Colombano et al. 2014). Une étude récente (Guo et al. 2014) recense le nombre de publications sur la pollution des sols sur une durée de 13 ans et montre qu'en 1999, le nombre d'articles publiés traitant de la pollution des sols était de 514, contre 1671 articles publiés en 2012.

Plus exactement, un site contaminé est défini par l'EEA<sup>11</sup> comme étant une zone bien déterminée présentant une contamination du sol et qui pourrait présenter des dangers pour les humains, les ressources en eau et les écosystèmes (Panagos et al. 2013 ; Liu et al. 2015).

Les sites contaminés peuvent être classés en 3 catégories (Mench et al. 2012) : des sites présentant une contamination inorganique (essentiellement contaminés par des métaux et des non-métaux), des sites présentant une contamination aux xénobiotiques organiques et des sites avec une co-contamination, qu'on retrouve le plus fréquemment.

La France fait partie des premiers pays européens à avoir recensé le nombre de sites pollués de façon systématique : le premier inventaire a été réalisé en 1978 (BASIAS<sup>12</sup>). Le ministère de la transition écologique et solidaire a mis en place deux bases de données (nommées BASIAS et BASOL<sup>13</sup>) qui permettent d'identifier d'anciens sites industriels et activités de service et de recenser le nombre de sites pollués appelant une action des pouvoirs publics. Cette démarche s'inscrit dans le cadre de la nécessité de l'état d'informer le grand public et les acteurs locaux et ainsi de garantir un suivi des pollutions et des risques.

---

<sup>7</sup> **FAO**: Food and Agriculture Organization of the United Nations

<sup>8</sup> **ITPS**: The Intergovernmental Technical Panel on Soils

<sup>9</sup> **ISRIC** : Centre International de Référence et d'Information sur les Sols

<sup>10</sup> **PNUE** : Programme des Nations Unies pour l'environnement

<sup>11</sup> **EAA** : Agence Européenne pour l'Environnement

<sup>12</sup> **BASIAS** : Base des Anciens Sites Industriels et Activités de Service

<sup>13</sup> **BASOL** : Base de données sur les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués) appelant une action des pouvoirs publics

Toutefois, la loi française n'a pas établi de valeurs de concentrations de référence en polluants dans le sol qui au-dessus desquelles un sol serait considéré comme pollué, contrairement à la qualité de l'eau qui est encadrée par des normes françaises qui établissent des limites de références de qualité.

Cependant, Baize et al. (2000) ont établi des valeurs de références qui permettent d'interpréter les concentrations en métaux dans les sols en France métropolitaine (tableau 2). Ces valeurs permettent de situer un sol au sein de trois catégories selon leurs teneurs totales en ETM : une gamme courante, en cas d'anomalie et en cas de forte anomalie.

*Tableau 2. Valeurs d'analyse de la situation pour interpréter les concentrations en métaux dans les sols en France métropolitaine (Baize et al. 2000).*

Élément (mg.kg <sup>-1</sup> )	Gamme courante	Gamme en cas d'anomalie	Gamme en cas de forte anomalie
<b>Cd</b>	0,05 - 0,45	0,7 - 2,0	2,0 - 46,3
<b>Co</b>	2,0 - 23,0	23 - 90	105 - 148
<b>Cr</b>	10 - 90	90 - 150	150 - 3180
<b>Cu</b>	2,0 - 20,0	20,0 - 62,0	65,0 - 160,0
<b>Ni</b>	2 - 60	60 - 130	130 - 2076
<b>Pb</b>	9,0 - 50,0	60,0 - 90,0	100 - 10180
<b>Zn</b>	10 - 100	100 - 250	250 - 3800

Par ailleurs, en France, une recommandation (19/07/00) concernant la surveillance des risques sur la santé humaine par des sols pollués par une activité industrielle proposée par le Comité de Protection des Personnes a été signée en juillet 2000. Cette recommandation n'a cependant pas fait l'objet d'une publication au Journal Officiel. Elle a pour but d'améliorer la surveillance sanitaire et environnementale des sols pollués par des sources industrielles et se base sur :

- le plan réglementaire : qui vise à améliorer le dispositif réglementaire en améliorant le recensement et le diagnostic des sols pollués, en soulignant les formalités d'évaluation de la dangerosité des sites sur la santé humaine et en mettant en œuvre des procédures plus rapides pour entamer des études sur site.
- les moyens techniques d'assistance aux politiques publiques : en créant un dispositif visant à mesurer les concentrations résiduelles sur les sites contaminés ayant bénéficié d'un traitement de dépollution pour obtenir un procès- verbal.
- la recherche : afin de pouvoir mettre en œuvre des études sanitaires poussées comme des études toxicologiques, des études d'exposition basées sur le mode de vie et des enquêtes épidémiologiques. L'objectif est également de lancer des programmes de recherche au niveau Européen pour avoir plus de partenaires internationaux.

- la formation : en garantissant la formation d'inspecteurs et d'évaluateurs de risques et acteurs du terrain.

## II.2.2) Transfert de pollution et risques liés

Les sols contaminés peuvent présenter des risques environnementaux (Luo et al. 2012) et sanitaires (da Silva et al. 2014). Ils peuvent affecter la sécurité alimentaire (fertilité et productivité des sols) et la qualité de l'eau potable (Akhtar et Mannan 2020).

Le transfert des polluants métalliques du sol vers d'autres compartiments de l'environnement (air et/ou eau) est possible. D'un point de vue écosystémique, les organismes atteints par la contamination peuvent en influencer d'autres en raison de leurs interactions (chaînes trophiques, associations symbiotiques) (Sunahara et al. 2002).

Les polluants métalliques présentent aussi un risque pour la santé humaine en s'accumulant dans l'organisme et en causant des lésions rénales et des cancers, ils agissent également sur le système nerveux et le système endocrinien (Saha et al. 2017). Les principales voies d'exposition humaine aux métaux du sol sont l'ingestion de particules de sol, l'inhalation (poussières issues des sols) ou encore la voie cutanée (Panagos et al. 2013).

## III. Evaluation de la mobilité des métaux

L'évaluation des risques liés à la contamination métallique, cités dans le paragraphe précédent, ne peut être réalisée en se basant sur les concentrations totales en éléments, car elles n'apportent pas les informations suffisantes pour estimer la toxicité des éléments métalliques qui est fortement liée à leur mobilité et leur spéciation chimique (Meyer 2002; Kim et al. 2015 ; Yıldıırım et Tokaloğlu 2016 ; Leleyter 2017). Cette évaluation peut être donc fondée sur l'évaluation de l'exposition et les interactions des organismes du sol avec les fractions disponibles environnementalement des métaux dans le sol (Gupta et al. 1996).

Il paraît important de définir dans le cadre de ce travail les termes suivants : mobilité, biodisponibilité et spéciation minéralogique.

### III.1) Mobilité et biodisponibilité des ETM

La mobilité d'un élément représente son aptitude à migrer du compartiment du sol à un autre compartiment, tandis que la biodisponibilité est définie comme l'aptitude d'un élément à passer du compartiment (eau, air) du sol dans un organisme vivant comme par exemple une espèce végétale, bactérienne ou l'être humain (Baize 1997). La biodisponibilité est encadrée par la norme « NF ISO 17 402,201 » et propose la définition suivante : le degré auquel des substances chimiques présentes dans le sol peuvent être absorbées par un récepteur vivant donné.

### III.2) Spéciation minéralogique des ETM

La spéciation minéralogique permet de déterminer la répartition entre les différentes phases porteuses du sol (argiles, matière organique, oxyhydroxydes de Fe et de Mn...) (Berthelin et Bourrelier 1998 ; Faure et al. 2012). Cette répartition fait souvent l'objet de fractions définies de façon opérationnelle à l'aide d'extractions séquentielles (fraction hydrosoluble, échangeable, acido-soluble, réductible et oxydable). La spéciation minéralogique est le facteur principal conditionnant la mobilité des ETM, ainsi que leur disponibilité et biodisponibilité.

La spéciation chimique quant à elle permet de préciser l'espèce ou la forme de l'élément et la nature des liaisons chimiques : les éléments métalliques peuvent être sous différentes formes (Schneider 2016), illustrées sur la figure 3. Elle ne fera pas cependant l'objet de notre étude, les résultats de la thèse seront axés sur la spéciation minéralogique des ETM.

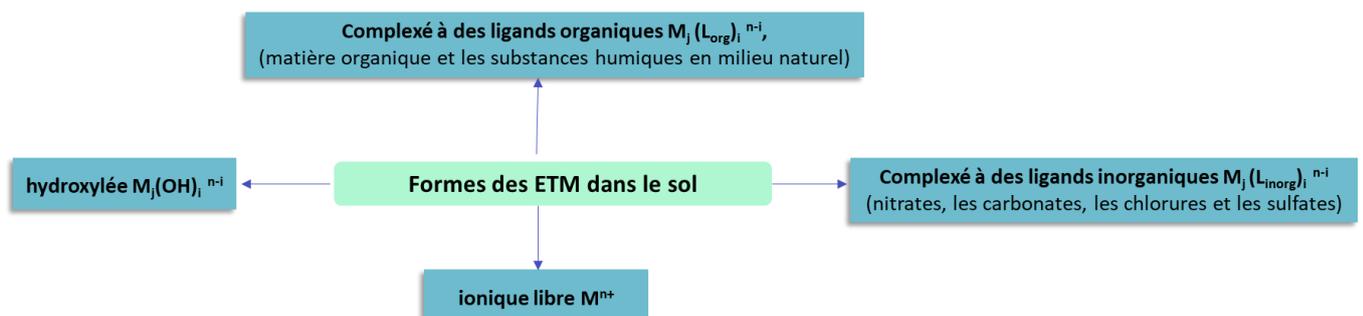


Figure 3. Formes des ETM dans la solution du sol (Schneider 2016).

### III.3) Facteurs conditionnant la mobilité des métaux

La mobilité d'un élément métallique est fonction de plusieurs propriétés du sol, notamment :

- des facteurs abiotiques : la concentration en ligands, la salinité, le taux d'humidité et la variation du pH et les équilibres d'oxydo/réduction.
- des facteurs biotiques tels que la présence de micro-organismes du sol (Bellion et al. 2006).

Plus précisément, la mobilité d'un élément métallique dépend des :

- paramètres physicochimiques du sol, tels que le pH et le potentiel d'oxydoréduction.
- constituants du sol tels que la matière organique, les oxyhydroxydes (de fer et de manganèse qui possèdent des surfaces de sorption conditionnant considérablement la mobilité des métaux), mais également les minéraux argileux (Leleyter et Probst 1999; Doherty et al. 2017).

Les principaux mécanismes de rétention des éléments métalliques dans le sol sont la sorption, la précipitation et les réactions de complexation. Le lessivage et volatilisation sont des mécanismes d'élimination des métaux dans le sol (Bolan et al. 2014).

### III.3.1) Le pH

Le pH, paramètre déterminant dans la mobilité des métaux, (Hattab et Motelica-Heino 2014) influence la spéciation chimique et minéralogique des ETM et la formation potentielle d'oxyhydroxydes, donc de phases stables (Jean 2007). Lorsque le pH diminue, la solubilité des cations métalliques dans la solution du sol tend à augmenter : ils deviennent alors plus disponibles et mobiles (Akan et al. 2013). Les métaux sont donc essentiellement sous forme d'ions libres, ou forment des espèces organométalliques plus biodisponibles (Olaniran et al. 2013). A pH élevé, la majorité des ETM forment potentiellement des formes insolubles, comme des minéraux de phosphates et de carbonates et des oxyhydroxydes. En effet, lorsque le pH augmente, la déprotonation des complexes aqueux et des groupements fonctionnels est favorisée, le nombre de protons tend donc à diminuer, diminuant ainsi la compétition entre les protons  $H^+$  et les cations métalliques, ce qui accentue la formation de nouvelles phases (Jean 2007 ; Hattab et Motelica-Heino 2014). D'une manière générale, plus le pH et la capacité d'échange cationique <sup>14</sup> augmentent, plus la capacité du sol à adsorber les cations métalliques augmente (Saidi et al. 2008).

### III.3.2) Le potentiel d'oxydoréduction

Les équilibres d'oxydoréduction conditionnent également la mobilité des éléments métalliques en solution. Le potentiel d'oxydo-réduction dépend de l'aération du sol. En effet l'air issu de l'atmosphère agit sur l'oxydation du sol ce qui conduit à la solubilisation de certains éléments métalliques(Bonet2016).

---

<sup>14</sup> CEC : capacité d'échange cationique : paramètre mesurant la charge de surface des composants du sol qui permet de prédire et d'évaluer des caractéristiques du sol

Pour des potentiels élevés, les espèces oxydées sont dominantes, tandis que les potentiels bas favorisent l'apparition des espèces réduites. La mobilité des éléments métalliques est affectée alors par la modification de l'état d'oxydation de l'élément métallique, ou des éléments qui lui sont liés, ou par la formation ou la dissolution des phases porteuses (Bourrelhier et al. 1998).

### III.3.3) La matière organique

La matière organique correspond aux molécules du sol contenant du carbone issu des plantes, des micro-organismes et des animaux. Ces organismes peuvent être vivants ou en décomposition (Parent et Gagné 2010). La matière organique est capable de fixer les éléments métalliques pour lesquels elle présente une grande affinité (Bonet 2016). La matière organique du sol possède une capacité d'échange cationique élevée et peut former des composés simples et chélatés avec les éléments métalliques dans le sol (Kwiatkowska-Malina 2018).

Les substances humiques (humus), principaux composants de la matière organique, ont plusieurs groupements fonctionnels tels que les fonctions carboxyliques, phénoliques, amines et sulfhydryles qui peuvent fixer les ions métalliques (Jean 2007).

Les petites molécules organiques conduisent à la formation de complexes organo-métalliques facilement lixiviables, tandis que les grosses molécules limiteront plus fortement la mobilité des éléments métalliques (Faure et al. 2012).

Le « complexe argilo humique », formé essentiellement d'argiles et d'humus, qui peut être chargé négativement, favorise l'adsorption de composés chargés positivement (ions positifs) ou de molécules polaires. Les éléments chargés positivement, comme les cations métalliques présentent donc une grande affinité au complexe argilo humique et peuvent se lier aux particules d'argile et d'humus (Francoys - De Brabandere 2014).

### III.3.4) Les oxydes métalliques

Les oxydes métalliques du sol, tels que les oxydes de fer, d'aluminium et de manganèse constituent également de bons adsorbants, ils augmentent en effet la rétention des métaux par le sol. Ils sont dotés d'une grande surface spécifique (Jean 2007; Komárek et al. 2013) et d'une capacité d'adsorption élevée permettant la sorption des éléments métalliques (Jean 2007).

La ferrihydrite en particulier présente une grande capacité à immobiliser les contaminants organiques et inorganiques par des réactions de sorption (Liu et al. 2009 ; Cismasu et al. 2012). D'ailleurs, la grande affinité de la ferrihydrite aux ETM a conduit plusieurs auteurs (Álvarez-Ayuso et al. 2013 ; Abad-Valle et al. 2015 ; Doherty et al. 2017) à se pencher sur l'efficacité de son emploi comme amendement de sol pour l'immobilisation des ETM.

### III.4) Méthodes d'étude de la spéciation minéralogique

#### III.4.1) Fractions du sol

La détermination des teneurs totales des ETM dans les sols permet d'étudier la situation du sol dans sa globalité. Elle apporte donc les informations permettant de détecter, en particulier des anomalies (tableau 2). Cependant, la spéciation minéralogique permet d'informer sur la mobilité environnementale des ETM (Heltai et Zoltán 2017).

La fraction totale du métal est différente de la fraction disponible environnementalement (qui représente la somme de la fraction disponible réelle et la fraction potentiellement disponible), cette dernière peut être responsable d'un potentiel risque toxique (Albert 2019). Ainsi, les fractions du sol peuvent être représentées selon le schéma présenté en figure 4.

La fraction totale du sol correspond à la fraction obtenue à partir d'une minéralisation totale du sol (chapitre I- partie V.3). Les analyses réalisées sur les sols ciblent principalement la fraction solide. La fraction totale du sol comprend elle-même une fraction potentiellement disponible dite labile, qui peut être obtenue par l'usage d'extractions simples et séquentielles, ainsi qu'une fraction résiduelle (mesurée ou calculée).

La fraction disponible réelle est la fraction liquide du sol au moment du prélèvement. Tandis, que la fraction disponible environnementalement recouvre la fraction disponible réelle et la fraction potentiellement disponible qui représente la quantité maximale qui peut être libérée et ce dans les conditions les plus extrêmes.

La fraction biodisponible quant à elle peut être évaluée à partir de la minéralisation totale de l'organisme qui a biosorbé les métaux (Vasseur et al. 2008 ; Leleyter 2017).

Pour ce travail de thèse, on s'intéressera à la fraction potentiellement disponible du sol, qui est obtenue à partir d'extractions simples et séquentielles. Ceci permettra d'obtenir des informations sur la répartition minéralogique des métaux (spéciation minéralogique).

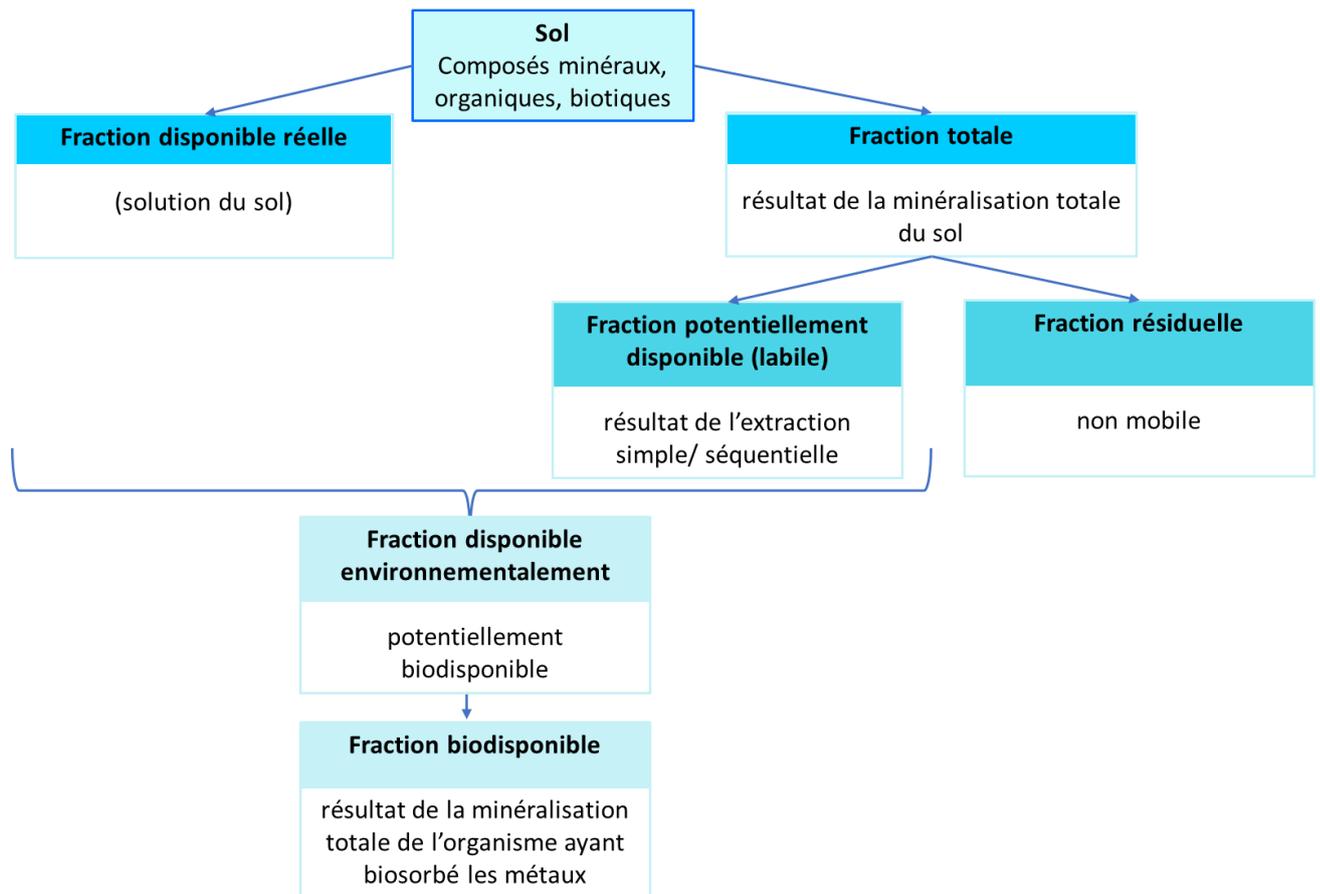


Figure 4. Schéma représentant les fractions d'un sol (d'après Albert 2019).

### III.4.2) Extractions simples

Les extractions chimiques sont l'outil le plus commun employé pour estimer les éléments métalliques potentiellement disponibles dans le sol (Lebourg et al. 1996). Elles peuvent être employées dans le domaine de l'agriculture pour évaluer la fertilité des sols en estimant l'absorption des oligo-éléments par les plantes, ce qui permet d'établir un diagnostic du sol et d'optimiser par conséquent l'apport en fertilisants pour augmenter les rendements (Rauret 1998). Le principe de ces extractions est de mettre au contact une prise d'essai (solide) de sol sec un réactif d'extraction (liquide).

Il existe deux types d'extraction selon le moyen de mise au contact du sol avec le réactif d'extraction : statique ou dynamique (Hamdoun 2015).

- l'extraction dynamique correspond à la mise au contact d'un sol avec une alimentation continue en réactif. Ce type d'extraction est généralement réalisé dans une colonne remplie de sol et alimentée par un flux régulier de réactif d'extraction.

- l'extraction statique correspond à la mise au contact de l'échantillon de sol avec un seul réactif sans réalimenter le système en réactif. L'extraction se fait « en batch », dans un réacteur fermé. Ce type d'extraction représente le mode sélectionné pour notre étude, car c'est une méthode applicable à tous les types de sols, contrairement au mode dynamique où le sol doit être suffisamment perméable pour permettre la percolation du réactif d'extraction. Ce type d'extraction en mode statique est le plus privilégié pour prédire la fraction potentiellement disponible des métaux (Hamdoun 2015).

Le rapport liquide/solide choisi pour notre étude est de 10 mL d'extractant pour 1g de sol, rapport souvent préconisé (US EPA 1992, BCR<sup>15</sup>). Le principe de l'extraction est l'adsorption/désorption des métaux et la dispersion des particules de sol dans la solution par agitation. Ce type d'extraction présente l'avantage d'être rapide (une seule étape) (Ibragimow et al. 2010).

Les scientifiques emploient différents réactifs chimiques pour extraire la fraction potentiellement disponible car un réactif particulier qui pourrait convenir pour extraire un polluant spécifique dans une zone donnée pourrait ne pas convenir à tous les métaux (Alibrahim et Williams 2016; Leleyter 2017). Les réactifs utilisés pour l'extraction peuvent être de nature différente comme des agents complexants, des sels ou des acides (Bakircioglu et al. 2011 ; Leleyter et al. 2012 ; Cuvier et al. 2021).

#### *III.4.2.1) Agents complexants*

L'EDTA<sup>16</sup> est un agent complexant reconnu pour extraire les métaux présents dans les phases non liées à la silice. Il permet d'extraire les métaux échangeables, solubles et certains métaux liés aux carbonates et à la matière organique (Alibrahim et Williams 2016). L'utilisation de l'EDTA à pH 7 avec un ratio L/S de 10 et un temps de contact d'une heure pour la détermination de la fraction mobilisable est recommandé par le BCR (Quevauviller et al. 1996 ; Dutheil 2003; Leleyter et al. 2012 ; Cuvier et al. 2021). Les agents complexants les plus utilisés sont l'EDTA et le DTPA<sup>17</sup> pour étudier la fraction de métal complexé à la matière organique et aux argiles (Schneider 2016).

---

<sup>15</sup> **BCR** : Bureau Communautaire de Référence

<sup>16</sup> **EDTA** : acide éthylènediaminetétraacétique

<sup>17</sup> **DTPA** : acide diéthylène triamine penta acétique

### III.4.2.2) Sels

Les solutions salines les plus communément utilisées sont les chlorures de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) et de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ), les nitrates de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ), d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) et de magnésium ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ). Elles sont employées pour étudier les fractions échangeables, c'est-à-dire les métaux faiblement adsorbés à la surface du sol par des liaisons électrostatiques. Ces interactions sont régies par le mécanisme d'échange d'ions. Le nitrate de magnésium ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ) est particulièrement employé, car il ne combine pas l'effet « échange d'ions » du cation  $\text{Mg}^{2+}$  et l'effet « complexant » des nitrates (qui est moins fort que celui des chlorures) (Leleyter 1998).

Le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) est le plus utilisé pour extraire les métaux présents dans la solution du sol et les formes facilement échangeables. Plusieurs auteurs (Houba et al. 2000; Degryse et al. 2003; Pueyo et al. 2004; Meers et al. 2007 ; Amoakwah et al. 2013) préconisent donc l'emploi du  $\text{CaCl}_2$  pour estimer la disponibilité potentielle des métaux. L'emploi de  $\text{CaCl}_2$  comme solution extractante est en effet particulièrement préconisé pour l'étude de la phytodisponibilité des métaux (Wang et al. 2003 ; Meers et al. 2007).

Amoakwah et al. (2013) ont utilisé  $\text{CaCl}_2$  à 0,01M pour étudier la disponibilité potentielle de Cd et Zn. Ils expliquent que son efficacité est due à l'effet de la complexation par les chlorures, mais également à l'échange ionique avec le cation  $\text{Ca}^{2+}$  qui permet d'éliminer plus facilement Cd et Zn et les rendre disponibles dans la solution du sol. Pueyo et al. (2004) montrent que  $\text{CaCl}_2$  interfère peu avec le pH du sol étudié et ne désagrège pas la matrice. Degryse et al. (2003) affirment également que l'extraction  $\text{CaCl}_2$  (0,01M) permet de prédire d'une bonne façon opérationnelle la fraction potentiellement disponible de Cd et Zn. Meers et al. (2007) attestent que  $\text{CaCl}_2$  (0,01M) constitue un bon indicateur pour étudier la phytodisponibilité de Cd, Cu, Ni, Pb, Zn. Houba et al. (2000) expliquent que le réactif  $\text{CaCl}_2$  à 0,01M a la même force ionique que la solution du sol et que le cation divalent est le principal cation retrouvé dans la solution du sol, c'est-à-dire qu'il est dominant du complexe argilo humique dans les sols (Dutheil 2003). Néanmoins, certains auteurs ont montré que  $\text{CaCl}_2$  extrait moins de métaux que les acides. Ibragimow et al. (2010) montrent que Cd, Cu, Cr, Ni, Pb et Zn sont plus extraits par HCl 0,1 M que  $\text{CaCl}_2$  0,01M. Bakircioglu et al. (2011) montrent également que Cu, Mn, Ni, Pb, and Zn sont mieux extraits par HCl que  $\text{CaCl}_2$ .

### III.4.2.3) Acides

L'extraction avec des acides constitue également un bon moyen d'estimation de la disponibilité potentielle (Lebourg, 1996). Les acides les plus employés pour ce type d'extraction sont l'acide acétique, l'acide nitrique et l'acide chlorhydrique (Lebourg, 1996) seuls ou en mélange (Mulchi et al. 1992). L'acide chlorhydrique reste néanmoins l'acide majoritairement employé. En effet, il présente deux avantages, c'est en même temps un des acides les plus forts et le moins dangereux à manipuler, car l'ion chlorure est non réactif et non toxique (Tuin et Tels 1990; Gitipour et al. 2016). Les acides sont employés pour mobiliser les éléments associés à la matière organique et aux fractions échangeable, acido-soluble et oxydable. Les concentrations en acide chlorhydrique utilisées varient de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (Ibragimow et al. 2010 ; Chowdhury et al. 2015 ; Cuvier et al. 2021) à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  (Bakircioglu et al. 2011; Leleyter et al. 2012 ; Oh et al. 2015). Les travaux de Tuin et Tels (1990), qui utilisent HCl et HNO<sub>3</sub>, montrent que les pourcentages extraits augmentent avec la force de ces acides et qu'ils sont d'autant plus efficaces que leur concentration est importante. L'étude de Ahmad (2009) confirme également que les teneurs extraites en Cd, Ni, Pb et Zn augmentent avec l'augmentation de la concentration de HCl. Leur étude a par ailleurs montré que l'acide chlorhydrique est plus efficace que l'acide nitrique. Par ailleurs, la comparaison entre les extractants a fait l'objet de plusieurs travaux, notamment l'étude de la comparaison entre HCl et EDTA réalisée par Leleyter et al. (2012) et par Cuvier et al. (2021). L'étude de Leleyter et al. (2012) a montré que HCl 0,2 M est suffisant pour étudier la disponibilité potentielle des métaux dans les sols et sédiments fluviaux, tandis que l'étude de Cuvier et al. (2021) a montré que HCl 0,5M est plus adapté que EDTA 0,05M pour étudier la disponibilité potentielle des métaux dans les sols.

Dans le cadre de notre étude, le choix s'est porté sur l'acide chlorhydrique comme extractant. En effet, c'est l'extractant le plus employé pour évaluer la fraction potentiellement disponible des ETM dans les sols et les sédiments, en particulier les sols et sédiments pollués (Leleyter et al. 2012 ; Hamdoun, 2013 ; Asal Gzar et Gatea 2015). De plus, d'après les études (Tuin et Tels, 1990; Leleyter et al. 2012 ; Cuvier et al. 2021) qui ont porté sur la comparaison des différents extractants, HCl présente un pouvoir extractant plus élevé par rapport à EDTA et par rapport à d'autres acides comme HNO<sub>3</sub>. La concentration en HCl choisie est de 1M, en effet des études (Ahmad 2009) montrent que l'efficacité de l'extraction augmente avec la concentration de HCl.

### III.4.3) Extractions séquentielles

Plusieurs scientifiques (Tessier et al. 1979 ; Ure et al. 1993 ; Quevauviller et al. 1997 ; Leleyter et Probst 1999) ont élaboré des procédures d'extractions séquentielles. Celles-ci sont basées sur l'usage successif de réactifs d'une agressivité croissante pour attaquer les différentes fractions du sol et donc obtenir leur composition pour mieux déterminer la mobilité et la disponibilité potentielle des éléments métalliques (Alan et Kara 2018). Les réactifs sont sélectionnés afin de mobiliser les ETM selon les disponibilités croissantes comme le montre la figure 5. Les concentrations totales en métaux dans le sol sont utilisées pour réaliser le bilan de masse nécessaire au calcul des concentrations dans les extractions séquentielles, mais également dans les extractions simples (Leleyter, 1999; Chand et Prasad 2012). La formule de calcul se présente comme suit :

$$\% \text{ d'un ETM dans une fraction} = \frac{\text{concentration dans la fraction (mg.kg}^{-1}\text{)}}{\text{concentration totale dans le sol (mg.kg}^{-1}\text{)}} (1)$$

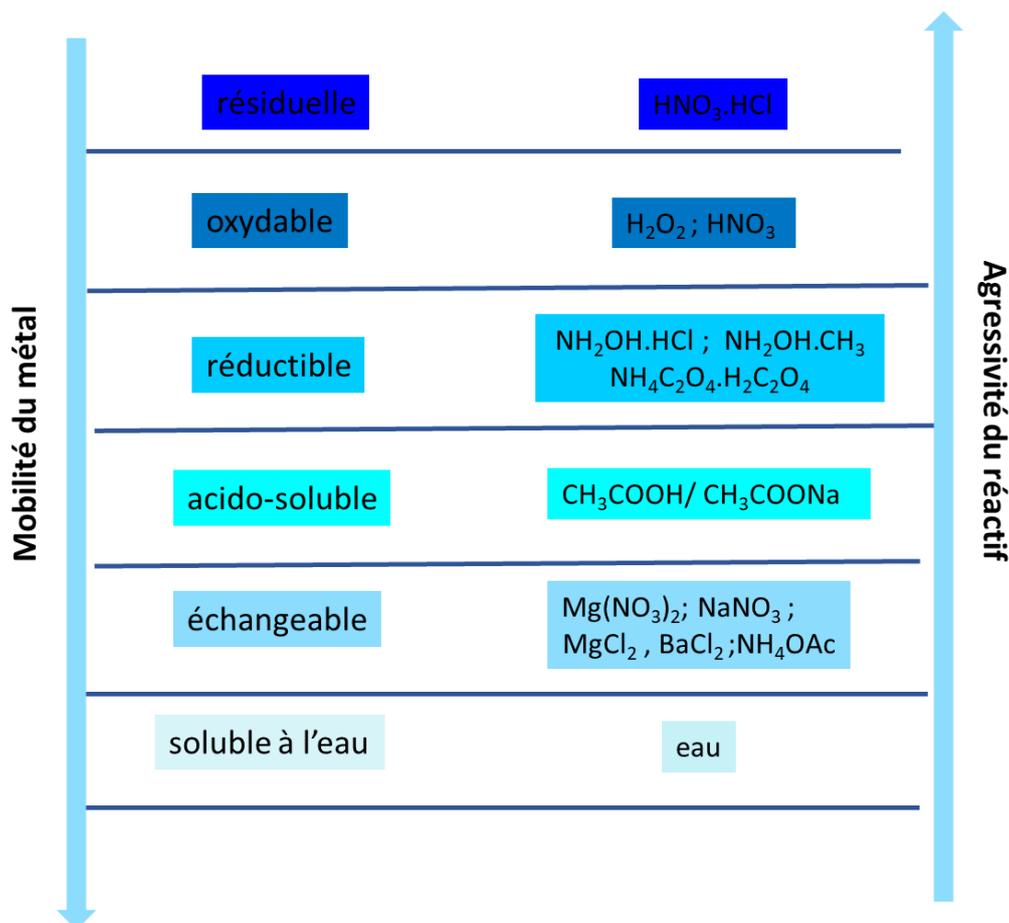


Figure 5 .Mobilité des ETM dans les fractions minéralogiques et les divers réactifs d'extraction employés dans les protocoles d'extractions séquentielles (d'après Schneider 2016).

Les extractions séquentielles renseignent sur la répartition des métaux au sein des différentes fractions minéralogiques définies par le protocole. L'interprétation des résultats de cette répartition des métaux permet d'estimer la mobilisation de ces métaux dans l'environnement conditionnés par le pH, le potentiel rédox et la matière organique.

Ces procédures d'extractions séquentielles ont été largement employées et modifiées ou adaptées pour étudier la fraction potentiellement disponible des métaux dans les sols et les sédiments et par conséquent la comparaison des résultats obtenus à partir des différents protocoles est très peu fiable. Ceci a conduit le BCR à établir en 1993 une procédure en 3 étapes avec l'objectif d'harmoniser les protocoles (Wali et al. 2014). Cette procédure représente un compromis entre les temps d'analyses et les réactifs d'extraction (Chen et al. 2008). Cependant, cette technique présente une limite : les extractants sont appliqués successivement à la prise d'essai sans laisser un temps de séchage entre l'ajout des réactifs d'extraction. Ceci conduit à un mélange des réactifs entre les étapes, ce qui peut fausser en quelque sorte les résultats obtenus pour la deuxième et la troisième étape d'extraction. Le protocole de Leleyter et Probst (1999) offre l'avantage de prévoir un temps de séchage à 40°C (entre 48 et 72h selon l'échantillon étudié) entre chaque ajout de solution extractante, ce qui permet d'obtenir des résultats plus fiables. D'une autre part, l'extraction des fractions acido-soluble et réductible est optimisée avec ce protocole.

La description des fractions définies par le protocole de Leleyter et Probst (1999) sera détaillée dans les paragraphes suivants.

Cuvier et al. (2021) ont montré que l'extraction par le protocole de Leleyter et Probst (1999) est plus adapté à l'étude de la disponibilité potentielle de Cr, Cu, Zn et Ni que le protocole BCR. Cependant pour le cas du Pb, l'extraction séquentielle (Leleyter et Probst 1999) semble sous-estimer la disponibilité du Pb (Leleyter et al. 2012 ; Albert 2019 ; Cuvier et al. 2021).

Toutefois, les protocoles les plus souvent proposés par la littérature sont les protocoles de :

- Tessier et al. (1979) cible 5 fractions : échangeable, liée aux carbonates, liée aux oxydes de fer et de manganèse, liée à la matière organique et résiduelle.
- Le BCR qui cible trois fractions : une fraction acido-soluble, réductible et oxydable sous deux étapes.
- Ure et al. (1993) est basé sur l'extraction de 4 fractions : acido-soluble, liée aux oxydes de fer amorphes, liée à la matière organique et résiduelle.
- Leleyter et Probst (1999) comporte 7 fractions, plus sélectif et précis, décrites ci-après.

L'établissement du protocole par Leleyter and Probst (1999) a fait l'objet de plusieurs essais sur des composés purs tels que les carbonates, les oxydes ou encore les minéraux argileux.

En effet, ce protocole démontre une grande sélectivité, de par la sélection des solutions extractantes et une efficacité élevée (Leleyter et Probst 1999; Leleyter et al. 2012 ; Hamdoun 2015 ; Albert 2019).

Dans le cadre de ce travail, le choix est donc porté sur l'extraction séquentielle de Leleyter et Probst (1999). Les paragraphes suivants serviront à présenter ces fractions, ainsi que les réactifs employés principalement par Leleyter et Probst (1999). Les réactifs employés par d'autres auteurs seront également rapportés.

- **la fraction hydrosoluble** : par définition la plus mobile. Elle est indispensable dans le cas de l'étude des sols afin d'éviter de surestimer la fraction suivante, mais souvent négligée dans d'autres protocoles d'extractions séquentielles (Tessier et al.1979; Ure et al. 1993). Elle représente néanmoins souvent la première étape d'une procédure d'extractions séquentielles afin de définir la fraction hautement mobile ou adsorbée de façon non spécifique (Dutheil 2000).

- **la fraction échangeable** : cible les cations échangeables. Les métaux liés à cette fraction sont liés avec des interactions électrostatiques faibles retenues en surface du sol. Les extractants employés sont généralement des électrolytes en solution, comme des sels (Gleyzes et al.2002). Le sel utilisé pour extraire les métaux est le  $Mg(NO_3)_2$ . Le magnésium sous forme de cation divalent  $Mg^{2+}$  (qui est plus stable que le cation monovalent dans l'espace inter-foliaire des minéraux argileux) va substituer les cations à l'intérieur des espaces inter-foliaires. D'autres sels sont utilisés pour cette fraction par d'autres auteurs comme le  $MgCl_2$  (Tessier et al. 1979), le  $BaCl_2$  (Clark et al. 2000), ou encore le  $CH_3COONH_4$  (Kersten et Forstner 1986). Cependant l'usage de solutions de chlorure peut conduire à la solubilisation des cations non échangeables.

- **la fraction acido-soluble** : cible les carbonates connus pour être sensibles aux variations du pH, mais aussi certains phosphates (Leleyter et Baraud 2006). Le mécanisme impliqué est la dissolution de la fraction solide à des pH aux alentours de 5. Pour cela, les réactifs utilisés dans le protocole de Leleyter et Probst (1999) pour cette étape sont un mélange d'acétate de sodium et d'acide acétique avec un pH de 4,5 qui permet de solubiliser totalement la calcite et partiellement la dolomite et les phosphates (Leleyter et Baraud, 2006) sans avoir un effet sur les oxydes et minéraux argileux. Cette fraction est donc connue pour être sensible aux variations de pH (Leleyter 1999 ; Qasim 2015 ; Albert 2019).

- **la fraction réductible** : concerne 3 sous fractions (F4a, F4b et F4c) formées de différents oxydes (de manganèse, de fer amorphes et cristallins) liés par des réactions de précipitation et de co-précipitation (Leleyter 1999). Cette fraction est basée sur une seule extraction dans le protocole de (Tessier et al. 1979) qui utilise comme réactif un mélange de  $\text{NH}_2\text{OH}, \text{HCl}$  et  $\text{HOAc}$  à un pH de 4,5. Pour extraire les oxydes de manganèse (F4a), le réactif le plus souvent utilisé est le chlorure d'hydroxylammonium qui est un réducteur puissant et spécifique des oxydes de manganèse. Concernant les oxydes de fer amorphes (F4b), ils sont extraits par l'acide oxalique et l'oxalate d'ammonium dans le protocole de Leleyter et Probst (1999). Les protons de l'acide oxalique s'adsorbent à la surface de l'oxyde selon l'équation :  $\text{Fe}-\text{OH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{Fe}-\text{OH}_2^+$  (2).

Tandis que l'oxalate d'ammonium agit comme un ligand chélatant selon l'équation :  $\text{Fe}-\text{OH} + \text{HL} \leftrightarrow \text{Fe}-\text{L} + \text{H}_2\text{O}$  (3).

Les oxydes de fer cristallins (F4c) sont solubilisés avec de l'acide oxalique, de l'oxalate d'ammonium et l'acide ascorbique qui agit comme réducteur pour solubiliser au maximum les oxydes de fer (Leleyter-Reinert 2017).

- **la fraction oxydable** ou liée aux sulfures et à la matière organique pour laquelle les métaux ont une grande affinité et par conséquent peut accumuler et stocker les métaux. Il est nécessaire de se mettre en conditions oxydantes et/ou acides pour faciliter la solubilisation de la matière organique et des sulfures. Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dilué dans l'acide nitrique est généralement utilisé en réalisant un chauffage (Gleyzes et al. 2002). Il possède un fort pouvoir oxydant et permet de solubiliser jusqu'à 75% de la matière organique, sans altérer les allumino-silicates (Leleyter 1999).

Dans le protocole de Leleyter et Probst (1999), cette dernière fraction se base sur l'utilisation du peroxyde d'hydrogène, également utilisé pour l'extraction de la fraction oxydable dans les protocoles de Tessier et al. (1979) et Ure et al. (1993).

#### IV. Description des métaux étudiés

Cette partie présente la description des ETM les plus communément retrouvés dans les sols urbains, leurs caractéristiques chimiques, leurs spéciations dans le sol, l'effet des paramètres physico-chimiques du milieu sur leur mobilité, ainsi que leur toxicité. Ces métaux (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn) feront l'objet de ce travail de thèse.

## IV.1) Le chrome

Le chrome est un métal de couleur grise argenté brillant, peu présent dans la croûte terrestre (de l'ordre de  $0,1 \text{ g.kg}^{-1}$ ) (tableau 1). Les teneurs retrouvées en Cr dans les sols français varient entre 10 et  $90 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Baize, 2000) (tableau 2).

Il est généralement extrait sous sa forme  $\text{FeCr}_2\text{O}_4$  (chromite) comme un produit primaire (Chen et al. 2016). Selon le pH et le potentiel redox, le chrome est présent principalement sous les degrés d'oxydation (VI) et (III).

Dans le sol, le chrome est retrouvé au degré d'oxydation (III) (degré d'oxydation de  $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ) lorsqu'il est d'origine naturelle (fond géochimique), tandis que Cr (VI) est généralement d'origine anthropique (Fernandez-Cornudet 2006).

La mobilité du Cr (III) dépend fortement de la solubilité de la matière organique qui est conditionnée par le pH, mais également par le potentiel d'oxydoréduction. Il est retrouvé sous les formes  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  et  $\text{Cr}(\text{OH})_4$  dans les conditions environnementales normales (Desjardin 2002).

Le Cr (VI) plus mobile que le Cr (III), est majoritairement présent sous les formes  $\text{CrO}_4^{2-}$  et  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  et a donc une faible affinité pour les colloïdes du sol (chargés le plus souvent négativement aussi). Les hydroxydes de fer et d'aluminium possèdent une affinité pour le chrome (VI) à une plage de pH entre 2 et 7. Le Cr (VI) peut être réduit en Cr (III) en présence de matière organique (acides fulviques et humiques), d'ions fer ferreux (II) et de sulfites (sous forme  $\text{H}_2\text{S}$ , liés au fer (II) ou à d'autres métaux dans les minéraux), mais également dans le cas d'une baisse de potentiel (Fendorf 1995; Desjardin 2002).

Le Cr (III) a un rôle majeur dans le métabolisme des protéines, des lipides et des glucides contrairement au Cr (VI) qui présente plusieurs risques pour la santé humaine (asthme, cancers du poumon ou des cavités nasales, inflammation du tube digestif et ulcères gastroduodénaux en cas d'ingestion) (Jean 2007).

## IV.2) Le plomb

Le plomb est un métal de couleur blanche bleuâtre, argenté ou gris doux et malléable. Il est présent dans la croûte terrestre à hauteur de  $0,01 \text{ g.kg}^{-1}$  (tableau 1). Les teneurs issues du fond géochimique sont estimées entre 9 et  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  en France (tableau 2) (Baize, 2000).

Le principal minéral du plomb est la galène (PbS). Il est moins retrouvé sous les formes : cérusite (PbCO<sub>3</sub>), anglésite (PbSO<sub>4</sub>) et crocoïte (PbCrO<sub>4</sub>) (Chen et al. 2016).

Le plomb est retrouvé sous deux degrés d'oxydation dans la nature (Fernandez-Cornudet 2006) :

- (II) forme sous laquelle existe la majorité des espèces inorganiques (Pb<sup>2+</sup>, PbS)
- (V) état d'oxydation des composés organiques.

Le plomb dans les gisements et roches naturelles est généralement très stable dans des conditions environnementales normales, mais des conditions acides pourraient augmenter sa solubilité. Dans des conditions oxydantes, le plomb est lié et immobilisé par des minéraux d'oxydes de fer, en effet Pb présente une forte affinité avec les oxydes de fer et de manganèse, mais aussi avec la matière organique (John et Leventhal 1995).

La toxicité du plomb impacte les organismes du sol. Par ailleurs, le plomb a un impact plus important sur les micro-organismes (plus sensibles) que sur les plantes, mais peut néanmoins inhiber leur croissance (Fernandez-Cornudet 2006).

Pour l'être humain, le Pb est très toxique, il attaque le système cardio-vasculaire, le système nerveux et les reins et cause des troubles cognitifs (Tremel-Schaub et Feix 2005). Il peut également être responsable d'anomalies au niveau de la reproduction notamment chez la femme, en causant une altération du développement fœtal au cours de la grossesse et chez l'homme en inhibant la production des spermatozoïdes. Le saturnisme est défini comme l'intoxication aiguë ou chronique par le plomb, avec une plombémie (taux de plomb dans le sang) supérieure à 100 µg.L<sup>-1</sup>, il correspond en effet à une imprégnation excessive des individus, en particulier des enfants, au plomb. Par ailleurs, le ministère de la transition écologique souhaite améliorer la démarche de gestion des sites et sols pollués au plomb en particulier par l'augmentation du nombre d'analyses de plomb réalisées sur les sols français. L'objectif est de mettre en place une base de données permettant de créer un référentiel géographique (Ministère de la transition écologique).

### IV.3) Le cadmium

Le cadmium est un métal ductile blanc bleuâtre qui n'est pas retrouvé pur dans l'environnement, mais généralement sous forme de CdS et CdCO<sub>3</sub>. Le Cd est extrait des minerais sulfurés de plomb, de zinc et de cuivre (Chen et al. 2016).

Le cadmium est retrouvé à l'état d'oxydation (II) dans le sol et prend les formes suivantes :  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{CdCO}_3$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{CdO}$  (Gérard 2000). Dans les sols français, les teneurs en Cd varient entre 0,05 et 0,45  $\text{mg.kg}^{-1}$  et dans des sols pollués, ces teneurs sont estimées à 150  $\text{mg.kg}^{-1}$  (Baize 2000) (Tableau 2).

Le Cd possède une grande affinité avec la matière organique, il est donc retrouvé dans les horizons supérieurs, connus pour être plus chargés en matière organique. Il a également une grande affinité avec les oxydes métalliques du sol (Tremel-Schaub et al. 2005). Le pH joue un rôle important dans la mobilisation du Cd. En effet, la solubilité du Cd augmente en conditions acides, mais à des pH supérieurs à 6, le cadmium subit des réactions d'adsorption sur la phase solide ou de précipitation, diminuant ainsi sa concentration dans la solution du sol. Il forme alors des liaisons avec les carbonates. Certains ions, dont Cd entrent en compétition avec des oligo-éléments pour utiliser les mêmes transporteurs membranaires et accéder aux racines des plantes en raison de leur similitude au niveau des états d'oxydation avec les oligo-éléments (Ali et al. 2013). De plus, certaines espèces végétales possèdent des transporteurs spécifiques de Cd, ce qui les rend capables d'absorber fortement le Cd en réduisant la compétition avec le Zn (Schwartz et al. 2003).

Le cadmium est toxique pour la faune, la flore et l'être humain. Il induit chez les plantes une inhibition de la croissance, une chlorose voire même une nécrose des feuilles (Fernandez-Cornudet 2006). Il est considéré comme une substance cancérigène (classé dans le groupe 1 depuis 1993 par le CIRC) pour l'être humain et un toxique cumulatif, c'est-à-dire que la dose de Cd excrétée est très faible par rapport à la dose de Cd ingérée. L'ingestion et l'inhalation représentent les principales voies d'absorption du cadmium. Le cadmium est accumulé dans le rein et provoque des insuffisances rénales (Andujar et al. 2010).

En France, l'inquiétude autour des risques sanitaires liés aux métaux a conduit Santé Publique France à mobiliser plusieurs organismes comme l'INRA<sup>18</sup> et l'ANSES<sup>19</sup> à réaliser des études concernant l'élévation des concentrations en Cd dans la population française.

#### IV.4) Le zinc

Le zinc est un métal dont la teneur moyenne dans la croûte terrestre est de 70  $\text{mg.kg}^{-1}$  (Tableau 1). Il est généralement retrouvé à l'état d'oxydation +II.

---

<sup>18</sup> INRA : Institut national de la recherche agronomique.

<sup>19</sup> ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation

Le Zn est principalement extrait des minéraux sulfurés sous forme de ZnS (sphalérite), mais aussi de minéraux carbonatés ZnCO<sub>3</sub> (smithsonite) et de silicates (Zn<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>) (Bur 2008; Qasim 2015). Dans les sols français, les teneurs en Zn dans les sols naturels varient entre 10 et 100 mg kg<sup>-1</sup> (Baize 2000).

Le Zn est connu pour être peu soluble par rapport aux autres ETM dans le sol, essentiellement sous les formes d'oxydes, de sulfures ou de carbonates. La disponibilité du Zn dépend fortement du pH du sol ; dans des sols acides, le Zn voit sa mobilité et sa disponibilité augmenter (Baize 1997).

Bien que le Zn soit un oligo-élément, il peut devenir toxique à certaines doses pour la faune et la flore, ou l'homme. Il peut conduire ainsi à l'inhibition des activités métaboliques des micro-organismes et de la nécrose des tissus des plantes (Bur 2008). Chez l'Homme, l'absorption intestinale du Zn se traduit par une accumulation dans les muscles squelettiques (environ 60 %) et dans les os (30%), mais aussi dans les organes tels que les reins, les poumons, le cœur et le foie (INRS<sup>20</sup> 2020).

#### IV.5) Le nickel

Le nickel est un métal blanc argenté, également considéré comme un oligo-élément (Bur 2008), il est présent dans la croûte terrestre à hauteur de 0,08 g.kg<sup>-1</sup> (tableau 1).

Les teneurs issues du fond géochimique sont estimées entre 2 et 60 mg.kg<sup>-1</sup> en France (Baize, 2000). Il est essentiellement retrouvé sous son état d'oxydation +II, mais est également trouvé sous les états d'oxydation : +III et +IV. Les principaux minerais de nickel sont les oxydes, les silicates et les sulfures. Les formes de nickel les plus solubles sont associées aux chlorures, aux nitrates et aux sulfates, contrairement aux carbonates et aux hydroxydes qui sont moins solubles. Les sulfures quant à eux sont insolubles (WHO 2007). Le nickel d'origine naturelle aurait une grande affinité aux oxydes de fer et de manganèse, tandis que le nickel d'origine anthropique serait préférentiellement lié aux carbonates et à la matière organique (Baize, 1997). La mobilité du nickel dans le sol est plus importante que celle des autres ETM (cadmium, zinc et plomb) (Kashelm et al. 2007; Robidas 2011).

Le nickel est toxique pour les plantes et les micro-organismes du sol, il peut induire une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique.

---

<sup>20</sup> INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

Cet élément cancérigène peut causer chez l'homme des cancers des poumons, du larynx et des fosses nasales (Eshghi Malayeri 1995).

#### IV.6) Le cuivre

Le cuivre est un métal ductile d'une couleur métallique rouge, présent dans la croûte terrestre à des teneurs de l'ordre de  $0,06 \text{ g.kg}^{-1}$  (tableau 1). Dans les sols français, les teneurs en Cu varient entre 2 et  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Baize 2000).

Il est retrouvé à l'état natif, mais peut également être extrait à partir de minéraux de sulfures (zinc, plomb et cadmium). Les formes que prend le Cu sont principalement la chalcopryrite ( $\text{CuFeS}_2$ ), la chalcocite ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) et la bornite ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ), mais il peut être retrouvé sous forme de malachite et d'azurite (Robidas 2011). Le Cu est présent dans 4 états de valence : Cu (0), Cu (I), Cu (II) et Cu (III). Cependant, Cu (II) est la forme la plus communément retrouvée ainsi que la plus stable (Chen et al. 2016).

La mobilité du cuivre est très liée à la matière organique du sol et cela en raison de sa forte affinité avec cette dernière (Pernet-Coudrier 2008). Le cuivre forme des complexes solubles avec les acides fulviques par exemple ou insolubles avec les acides humiques. Le pH influence sa solubilité, tel qu'à des pH inférieurs à 6, il est principalement sous forme  $\text{Cu}^{2+}$ , tandis qu'à des pH supérieurs à 8, il a tendance à se complexer avec la matière organique (Tremel-Schaub et Faux, 2005).

Le cuivre est un oligo-élément et un cofacteur indispensable dans la synthèse de protéines (Eshghi Malayeri 1995). D'ailleurs des carences en cuivre peuvent être observées notamment chez les animaux, les végétaux et l'être humain (Bur 2008). Du fait de sa toxicité à forte dose, le cuivre est employé en viticulture comme fongicide en bouillie bordelaise (Eshghi Malayeri 1995; Bur 2008). Par ailleurs, les quantités de cuivre imprégnées dans les sols viticoles français sont évaluées à  $36000 \text{ t}$  par an sur les  $1\,200\,000 \text{ ha}$  de sols viticoles (Tessier 2002).

#### IV.7) Le cobalt

Le cobalt est un métal gris et dur. C'est un composant principal de la vitamine B12 indispensable à plusieurs réactions enzymatiques, il est donc considéré comme oligo-élément, comme Zn ou Cu. Il est retrouvé dans la croûte terrestre à une teneur de  $0,03 \text{ g.kg}^{-1}$ . Dans les sols français, les teneurs en Co varient entre 2 et  $23 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Baize 2000).

Le cobalt peut se retrouver sous les formes  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Co}^{3+}$  au cours de l'altération des minéraux dans des conditions acides et oxydantes.

Le cobalt a une grande affinité pour les oxydes de Fe et de Mn, pour les argiles, mais également pour la matière organique sur lesquels il peut s'adsorber (Pelfrène 2008).

Le cobalt est peu toxique par rapport à d'autres ETM. Il peut être inhalé par des professionnels lors d'exposition à des teneurs élevées et peut induire des cancers de poumons (INRS 2015).

## V. Analyse des métaux dans les sols

### V.1) Techniques d'analyses des métaux

Il existe plusieurs techniques permettant d'analyser les éléments métalliques, dont certaines sont illustrées dans la figure 6.

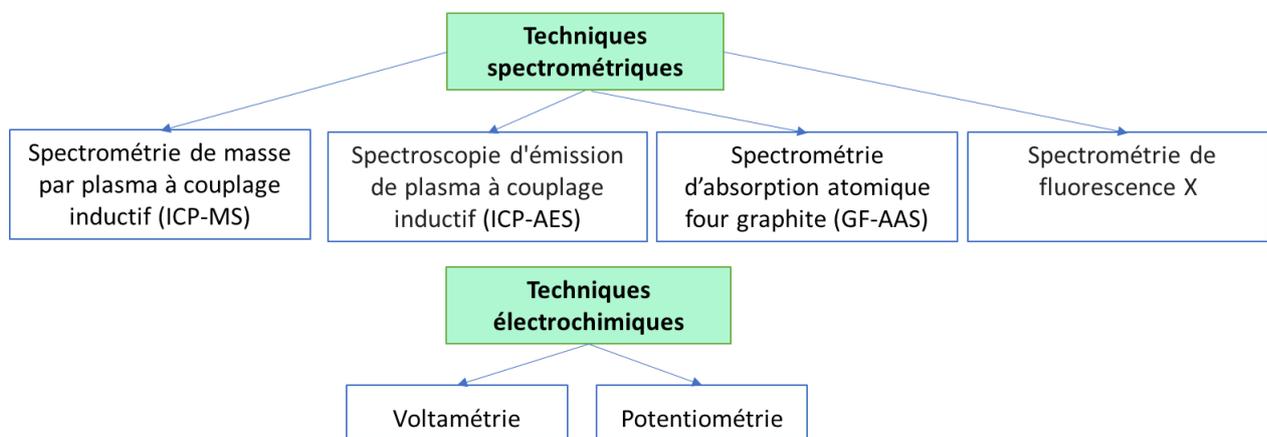


Figure 6. Techniques d'analyses des métaux.

La méthode employée pour ce travail de thèse est la spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif qui est une technique très sensible. Cette technique permet l'étude de la quasi-totalité des éléments du tableau périodique, avec des limites de détections très basses (Pansu et Gautheyrou 2003). Elle a l'avantage de réaliser des analyses multi-élémentaires ce qui représente un gain de temps, contrairement à d'autres techniques qui permettent de réaliser des analyses mono-élémentaires et nécessitent donc un temps d'analyse plus long (Brown et Milton 2005). Cependant, la température d'atomisation au niveau du plasma d'argon peut atteindre jusqu'à 8000K, ce qui rend le coût de cette technique assez élevé (plus élevé que celui de la spectrométrie d'absorption atomique par exemple). Cette technique peut présenter un problème d'interférences surtout à des concentrations basses (Brown et Milton 2005).

## V.2) Minéralisation totale des sols

Par ailleurs, l'analyse de la composition élémentaire totale d'un sol (ou dans des matrices environnementales en général) est généralement réalisée par des minéralisations à l'acide qui permettent de solubiliser l'échantillon solide. La digestion acide (ou minéralisation) est donc une méthode qui permet de convertir des échantillons solides en des matrices liquides, pour quantifier les concentrations totales ou pseudo-totales en métaux (da Silva et al. 2014 ; Leleyter-Reinert 2017).

La minéralisation totale d'un sol peut être réalisée selon les normes françaises présentées en figure 7.

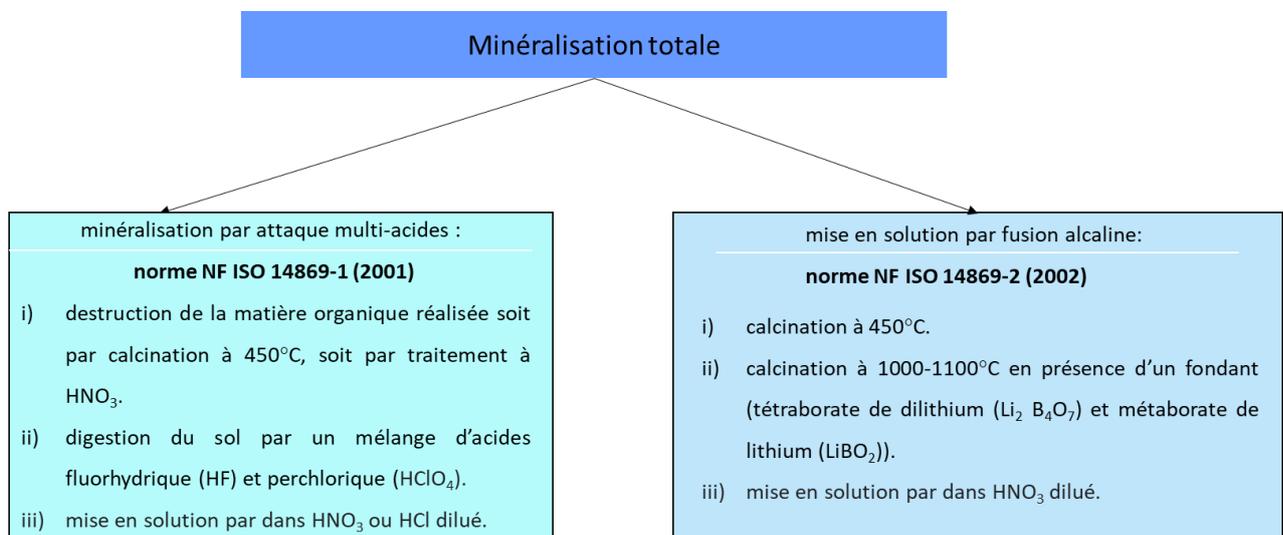


Figure 7. Méthodes de minéralisation totale normées.

Une autre méthode de minéralisation dite pseudo-totale est basée sur l'utilisation de l'eau régale qui représente un mélange de : 2/3 HCl, 1/3 HNO<sub>3</sub> (v/v). C'est une méthode très commune pour réaliser des minéralisations, rapide et simple à mettre en œuvre, qui permet d'éviter de manipuler de l'acide fluorhydrique (HF). Elle est considérée comme une digestion pseudo-totale, car seul HF est capable d'attaquer les matrices alumino-silicatées. Dans leur étude, Baize et al. (2006) expliquent que la méthode de mise en solution employant HF donne accès aux teneurs véritablement totales, alors que celle employant l'eau régale donne accès aux teneurs dites « pseudo-totales ». Néanmoins, pour tous les éléments (à l'exception de Si et Al), il a été montré (Baize et al. 2006 ; Leleyter-Reinert 2017) que les concentrations obtenues après minéralisation totale ou pseudo totale sont égales. Le terme de concentration totale sera donc employé pour toutes les concentrations des éléments (sauf Al et Si) obtenues après minéralisation acide assistée par micro-ondes.

### V.3) Digestion assistée avec micro-ondes

La digestion assistée avec des micro-ondes, réalisée en système fermé avec haute température et haute pression est une méthode rapide (da Silva et al. 2014) et plus adaptée pour l'étude de matrices complexes. Elle permet de minimiser les pertes en éléments volatiles en réduisant le risque de contamination (Chand et Prasad 2013; dos Santos et al. 2013). Les digestions en milieu fermé sont très efficaces pour le dosage des éléments volatils en trace et ultra traces comme le Pb, Cd, As, Sc, B, Hg, Sb, Se, Sn. Cette technique possède plusieurs avantages (Pansu et Gautheyrou 2003) :

- un temps d'attaque plus court, car l'augmentation de la température et la pression permettent d'augmenter les points d'ébullition des acides.
- un volume de réactifs plus réduit (10mL), car risque limité d'évaporation.
- un risque de contamination moins élevé vu le faible volume de réaction et l'absence de contact avec les particules d'air.
- la réduction des fumées d'acides (corrosives et toxiques).

## VI. La remédiation des sols pollués

Pour pallier les problèmes liés à la contamination des sols et ainsi réduire les risques environnementaux liés aux contaminants, des techniques de remédiation ont été élaborées (Ali et al. 2017).

Les types de remédiation peuvent être classés en : méthodes physiques, chimiques ou biologiques, leur application pouvant se faire in ou ex situ (Hanfi et al. 2019 ; Souza et al. 2020). Le potentiel de décontamination du sol dépend de plusieurs facteurs, en premier lieu la concentration des contaminants, mais également des propriétés chimiques du sol et de l'ancienneté de la contamination.

### VI.1) Traitements in situ, ex situ et sur site

Les traitements peuvent être mis en œuvre (Bispo et al. 2016):

- *ex situ* : entraînant une excavation des terres polluées qui sont conduites à des centres de traitements spécialisés ou traités sur site. L'excavation signifie donc l'évacuation du sol et son possible acheminement vers un site de traitement (Azubuike et al. 2016).

- *in situ* : ne nécessitant pas d'excavation, le traitement de la pollution est dans ce cas réalisé sur site sur le sol en place.
- *sur site* : qui nécessite des travaux d'excavations sur site et un traitement sur site, sans déplacer les terres excavées vers un autre site de traitement.

Les coûts des traitements *ex situ* (hors site), où le sol a besoin d'être déplacé, sont cependant élevés prenant en compte les coûts d'excavation, du transport et la consommation de l'énergie employée (Bispo et al. 2016).

## VI.2) Traitements chimiques et physiques

### VI.2.1) Traitements chimiques

Les traitements employant des substances chimiques offrent l'avantage d'être efficaces pour le traitement d'un large panel de polluants (organiques et inorganiques) et peuvent être réalisés sur de courtes durées. Cependant, ces méthodes sont coûteuses et perturbent l'écosystème. En effet, les produits chimiques peuvent interagir avec les micro-organismes du sol en affectant leurs activités, mais également avec les plantes en inhibant leur croissance (Chibuike 2013; Ali et al. 2017).

Le lavage des sols consiste à utiliser des réactifs liquides pour traiter des contaminants via deux mécanismes : séparation physique et extraction chimique ou la combinaison des deux mécanismes dans le but de concentrer les contaminants dans un faible volume (Dermont et al. 2008; Gitipour et al. 2016). Cette technique est largement utilisée pour la décontamination des sols pollués en métaux mais aussi en HAP<sup>21</sup> en employant différents extractants comme les acides, les bases, les agents chélatants et les électrolytes. Cette technique est agressive, les réactifs injectés affectent la structure du sol et peuvent conduire à une perte des minéraux du sol qui peut atteindre jusqu'à 50% (Dermont et al. 2008). Elle génère également de grands volumes de liquides à traiter (Lo et Yang 1999).

L'EDTA est particulièrement utilisé pour l'extraction de métaux comme le Cd, Cu, Ni et Zn (Scheckel et Sparks 2001; Asal Gzar et Gatea 2015; Sun et al. 2001; Lo et Yang 1999; Khalkhaliani et al. 2006; Delil et Köleli 2018) car il forme des complexes très stables avec les métaux (partie II.4.1.1) (Tuin et Tels 1990; Lévesque Michaud 2016; Gitipour et al. 2016). L'inconvénient de son usage est sa non biodégradabilité, néanmoins, certains industriels ont trouvé des solutions de récupération après son utilisation (Lévesque Michaud 2016; Gitipour et al. 2016).

---

<sup>21</sup> **HAP** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

## VI.2.2) Traitements physiques

Parmi les méthodes de traitements physiques on retrouve : la vitrification. Une technique électrochimique : la remédiation électrocinétique sera également présentée.

La vitrification peut être réalisée in situ et ex-situ, elle consiste à immobiliser le contaminant en appliquant un courant électrique grâce à des électrodes qui va servir à chauffer à la profondeur voulue (où se trouvent les contaminants) à une température pouvant aller jusqu'à 2000°C. Le but est donc d'immobiliser le contaminant en réalisant une fusion et ensuite un refroidissement qui seraient à l'origine de la formation d'une phase stable et inerte chimiquement, il fait référence à un bloc solide de matériau vitreux. Cette technique est le plus souvent utilisée pour les sols contaminés en As et en Se (Lallemand-Barres 1993; Siveris et al. 2019). La vitrification offre l'avantage d'être réalisée in et ex situ, mais présente certaines limites comme la limite de la profondeur où se trouvent les contaminants, mais aussi son coût élevé et le dégagement de gaz toxiques (Siveris et al. 2019).

Le principe de la remédiation électrocinétique est d'exercer un courant électrique de faible intensité par le biais d'électrodes insérées dans le sol et ainsi faire migrer par électromigration et/ou électroosmose les composés solubilisés dans la phase liquide, vers les électrodes. Elle est moins onéreuse que la vitrification, et peut être utilisée en combinaison avec d'autres techniques, néanmoins elle peut conduire à la formation d'acides et de bases qui changeraient la structure minérale initiale du sol.

Par ailleurs, il a été reporté que les techniques de remédiation physicochimiques ne sont pas adaptées à des zones contaminées étendues sur de grandes surfaces, ce qui est le cas des sites miniers, des sites industriels ou des parcelles agricoles contaminées (Archana et Jaitly 2014).

Toutefois, la sélection d'une technique de remédiation est régie par plusieurs facteurs, en particulier les caractéristiques du site, le type de contamination. Le choix dépend également du projet : du budget, de la rentabilité, du temps attribué et de l'acceptabilité du grand public. Ces paramètres doivent faire l'objet d'une étude au préalable avant d'entamer des travaux à l'échelle du terrain (Liu et al. 2018).

## VI.3) La bioremédiation

La bioremédiation consiste à employer des organismes vivants ou morts pour réduire, éliminer, contenir ou transformer les contaminants présents dans les sols, les sédiments, l'eau et l'air (Shanahan, 2004). Elle permet la dégradation (parfois totale) ou la transformation des contaminants en des formes moins toxiques et/ou moins mobiles (Dzionic et al. 2016).

La bioremédiation est apparue aux cours des trois dernières décennies comme une alternative économique et plus respectueuse de l'environnement (Touceda-González et al. 2017 ; Radojčić Redovniković et al. 2017). Cette technologie verte est mieux acceptée par le public du fait de l'emploi d'organismes vivants pour dépolluer les sols par voie biologique au lieu d'introduire des substances chimiques ou « artificielles » dans l'environnement (Chibuïke 2013 ; Radojčić Redovniković et al. 2017 ; Touceda González et al. 2017). Les principaux organismes utilisés sont les plantes, les champignons et les bactéries (Vidali 2001).

Le processus de bioremédiation de sols contaminés implique la croissance d'organismes résistants pouvant accumuler les polluants (Ahmad et al. 2006). La bioremédiation se base également sur la stabilisation du métal, comme le cas de la phytoremédiation. En effet, la phytostabilisation a pour but de faire passer le métal d'une phase très mobile à une phase moins mobile (Bolan et al. 2014). D'une manière générale, la stabilisation vise à réduire la solubilité, la mobilité et la toxicité du polluant métallique (Hakeem et al. 2014).

Selon le type de polluant, d'organisme, les conditions environnementales et les mécanismes de bioremédiation envisagés, il est possible de soit mobiliser/ immobiliser le polluant, voire le transformer (c'est-à-dire changer sa spéciation chimique). Si le mécanisme de bioremédiation employé est la dégradation ou la volatilisation, il n'est pas question dans ce cas, d'accumulation. D'autre part, l'atténuation naturelle (ou bio-atténuation) est une autre approche étudiée en bioremédiation. Son principe est de surveiller et d'étudier le comportement des espèces autochtones vis-à-vis d'une contamination d'un sol, en laissant se dérouler les processus biologiques et les réactions abiotiques sans faire intervenir d'autres organismes vivants allochtones, ni d'apports de nutriments (Roudier 2004 ; Bosco et Mollea 2019).

Au niveau mondial, les traitements de bioremédiation les plus utilisés pour traiter les sols contaminés en ETM sont la phytoremédiation (utilisation de plantes) et la mycoremédiation (utilisation de champignons) (Kumar et al. 2018).

La phytoremédiation est basée sur l'emploi des plantes qui possèdent plusieurs propriétés leur permettant d'absorber les polluants du sol (Ali et al. 2013). Cette technique présente cependant plusieurs limites, car la croissance de la plante est conditionnée par sa tolérance aux contaminants ainsi qu'aux conditions climatiques (selon la zone de croissance). La plante doit pouvoir tolérer des concentrations élevées en polluants et pousser sur des sols secs, peu fertiles et acides qui sont les majeures caractéristiques des sols contaminés (ex : sols miniers) (Fahr 2014).

La mycoremédiation est quant à elle basée sur l'usage des champignons afin de décontaminer un site (Ali et al. 2017 ; Albert 2019). En particulier, grâce au phénomène de biosorption, les micro-organismes du sol, tels que les champignons ont la capacité de séquestrer les métaux toxiques présents dans la solution du sol (Kumar et al. 2018).

### VI.3.1) Bioaugmentation et biostimulation

La **biostimulation** consiste à introduire des nutriments et/ou de l'oxygène dans un sol contaminé pour stimuler l'activité des espèces autochtones. En effet, dans certains cas, malgré la présence d'espèces tolérantes, leur nombre n'est parfois pas suffisant pour réaliser un essai de bioremédiation, une stimulation est donc nécessaire (Vidali 2001).

A l'échelle du laboratoire, les nutriments sont sous forme de sels inorganiques, tandis qu'à l'échelle du terrain, les nutriments peuvent être apportés par des sous-produits provenant des activités agricoles ou des fertilisants (Bosco et Mollea 2019). La biostimulation peut également consister en l'introduction d'oxygène (Fulekar et al. 2012). Cette technique reste une solution simple et peu coûteuse, car elle engage des espèces autochtones adaptées au milieu où elles se sont développées. Le principe est de stimuler la croissance des espèces présentes et d'améliorer leur activité (Bosco et Mollea, 2019; Sales da Silva et al. 2020).

La **bioaugmentation** consiste à introduire des espèces allochtones qui ont la capacité d'interagir avec les contaminants dans le sol (Bosco et Mollea, 2019).

Elle est conseillée dans le cas où le nombre de micro-organismes autochtones capables d'interagir avec les contaminants est faible ou lorsque les micro-organismes présents sont inefficaces dans le traitement de la pollution (El Fantroussi et Agathos 2005).

Le choix des micro-organismes utilisés en bioaugmentation doit satisfaire les conditions suivantes :

- (i) une croissance rapide
- (ii) une absence de toxicité
- (iii) une tolérance élevée aux contaminants
- (iv) une grande capacité d'adaptation à différents environnements.

Néanmoins, ces contraintes liées à la réalisation de l'essai de bioaugmentation peuvent constituer un frein aux essais à l'échelle du terrain par rapport aux essais en laboratoire.

Une limite peut se présenter dans le cas d'un site incluant une co-contamination (organique et métallique) : les micro-organismes introduits pour dégrader les polluants organiques peuvent être inhibés par la présence des polluants métalliques (Tyagi et al. 2011).

L'inoculation d'organismes en bioaugmentation peut être de deux types : allochtone et génétique.

- l'inoculation allochtone propose d'isoler un micro-organisme à partir d'un autre site ou d'une autre matrice et de l'introduire dans le sol à décontaminer.
- l'inoculation génétique a pour principe d'introduire des micro-organismes génétiquement modifiés (OGM) dans un site pollué (Cycoń et al. 2017).

L'efficacité de la bioaugmentation dépend fortement de la capacité d'adaptation du micro-organisme au nouvel environnement (facteurs biotiques et abiotiques). Le déclin de la population microbienne est l'une des principales difficultés rencontrées dans les processus de bioaugmentation, en particulier dans la matrice sol qui est complexe.

### VI.3.2) Biosorption et bioaccumulation

Les principaux mécanismes de bioremédiation des métaux sont la bioaccumulation qui est un processus actif et la biosorption qui représente un phénomène passif.

La **biosorption** est l'absorption passive de contaminants par des matériaux biologiques. Elle a la particularité de pouvoir être réalisée par des organismes vivants, mais aussi morts ou inactifs, du fait de l'emploi de mécanismes non métaboliques. La biosorption réalisée par des organismes morts peut être égale à celle d'organismes vivants et présente l'avantage d'être moins coûteuse (la biomasse issue d'organismes morts peut être fournie par des industries : valorisation des déchets de fermentation par exemple ou par des déchets de l'agriculture) (Hlihor et al. 2017) et n'a nullement besoin d'être entretenue dans un milieu de culture (Abbas et al. 2017). Aussi, la biomasse « morte » n'est pas affectée par les concentrations des toxiques et les paramètres physicochimiques (comme le pH, la température), mais également par le besoin en nutriments (Kulshreshtha et al. 2014).

Plusieurs auteurs (Fourest et al. 1994; Martins et al. 2006; Brito et al. 2021) se sont intéressés à la biosorption de métaux en milieu liquide par de la biomasse morte. Martins et al. (2006) ont étudié la biosorption du Pb en milieu liquide par une algue brune *Sargassum* sp. Fourest et al. (1994) ont étudié la biosorption du Cd, Cr, Ni, Pb avec la biomasse morte de la souche fongique *Rhizopus arrhizus*.

Hlihor et al. (2015) ont étudié la biosorption de Cd par la biomasse vivante et morte de la souche fongique *Trichoderma viride*. Leurs résultats suggèrent que la capacité d'absorption du Cd de la souche vivante et morte est équivalente.

Les mécanismes liés à la biosorption sont la complexation de surface, l'échange d'ions, l'attraction électrostatique et la précipitation. Les biosorbants les plus étudiés sont les champignons, les algues et les bactéries (Hlihor et al. 2017). La biosorption permettrait d'éliminer des quantités plus élevées de métaux que la bioaccumulation (Castro et al. 2019). La **bioaccumulation** est un phénomène actif, dépendant du métabolisme. Après une première étape de biosorption, le polluant est transporté à l'intérieur des cellules pour y être stocké via des systèmes de transport actif consommant de l'énergie (Hlihor et al. 2017).

La bioaccumulation est finalement définie par l'accumulation nette du métal dans les tissus d'un organisme ou dans l'organisme en intégralité après son exposition au métal. La bioaccumulation peut donc se faire via l'adsorption en surface ou l'absorption par l'organisme (ou par un tissu de l'organisme).

La capacité de bioaccumulation d'un organisme peut être évaluée par :

- le facteur de bioconcentration (BCF) (McGeer 2004) qui représente le rapport entre la concentration de métal dans un organisme et la concentration de métal dans l'eau interstitielle, à l'état d'équilibre. Le BCF est donc exprimé selon l'équation suivante (4) :

$$BCF = \frac{\text{concentration de métal dans l'organisme vivant}}{\text{concentration de métal dans l'eau}} \quad (4)$$

- le facteur de bioaccumulation (BAF) (Damodaran et al. 2014) quant à lui représente le rapport de la concentration de métal dans l'organisme bioaccumulateur sur la concentration de métal dans son environnement. Le BAF est donc exprimé selon l'équation suivante (5) :

$$BAF = \frac{\text{concentration de métal dans l'organisme vivant en } mg.kg^{-1}}{\text{concentration de métal dans le sol en } mg.kg^{-1}} \quad (5)$$

Si le BAF est supérieur à 1, cela veut dire que l'organisme vivant est capable d'accumuler le métal à des teneurs élevées (Damodaran et al. 2014).

## VI.4) Etude des processus de bioremédiation des métaux

### VI.4.1) Etude de bioremédiation en milieu liquide

Les études de biosorption des métaux par des souches fongiques en milieu liquide sont multiples (Mohsenzadeh et Shahrokhi 2014 ; Mohammadian et al. 2017 ; Albert et al. 2019). Elles sont simples à mettre en œuvre et ne nécessitent pas de conditions particulières (elles peuvent être réalisées à température ambiante sur une courte durée) (Tastan et al. 2010). Elles sont menées en majorité sans utilisation de sol. Joshi et al. (2013) ont étudié la biosorption de métaux (Cd, Ni, Pb) par *Aspergillus awamori* et *Phanerochaete chrysosporium* dans du dextrose de pomme de terre et du bouillon nutritif. Les souches *A.awamori* et *P.chrysosporium* ont accumulé 3,00 mg.g<sup>-1</sup> et 2,73 mg.g<sup>-1</sup> de Cd, 3,02 mg.g<sup>-1</sup> et 2,87 mg.g<sup>-1</sup> de Ni et 5,12 mg.g<sup>-1</sup> et 8,30 mg.g<sup>-1</sup> de Pb respectivement dans des milieux liquides contaminés à 60 mg.L<sup>-1</sup> de chaque métal.

Zotti et al. (2014) ont comparé la capacité d'accumulation de Cu par 3 souches fongiques : *Clonostachys rosea*, *Trichoderma harzianum* et *Aspergillus alliaceus* dans une suspension de Tween 80. Elles ont montré une tolérance jusqu'à 100 mg.L<sup>-1</sup> et les souches *C. rosea* et *T. harzianum* ont respectivement accumulé 22222 et 19628 mg.kg<sup>-1</sup> de Cu.

Farhan et Khadom (2015) ont évalué la biosorption de métaux (Cd, Co, Cu, Cr, Pb et Zn) en solution (à pH 5-6) par la levure *Saccharomyces*. Leurs résultats montrent que la biosorption est un phénomène rapide et que les métaux sont accumulés selon l'ordre suivant : Pb>Zn>Cr >Co>Cd>Cu. Cependant, les études en milieu liquide ne fournissent pas suffisamment d'informations et ne montrent pas de conditions réalistes.

### VI.4.2) Etude de bioremédiation en milieu solide

Les expériences de biosorption en milieu solide sont menées dans des conditions plus réelles que les expériences en milieu liquide (Barra Caracciolo et al. 2013). Ces études sont le plus souvent menées en microcosmes, ce qui permet d'étudier le comportement et le fonctionnement des écosystèmes en intégralité (Kampichler et al. 2001) et plus particulièrement l'activité des micro-organismes autochtones. Ils représentent un dispositif efficace d'évaluation des risques (Santos et al. 2018).

Un microcosme du sol se définit comme une unité expérimentale reproductible contenant du sol mesurant la réponse d'une ou plusieurs espèces biotiques (Burrows et Edwards 2004).

Les microcosmes produits en laboratoire sont des modèles d'écosystèmes réduits, représentant une partie de l'environnement.

Les espèces constituant le microcosme sont maintenues dans des conditions contrôlées (telles que la température, l'humidité ou la luminosité), représentatives de l'environnement naturel.

Les études en microcosmes constituent une bonne approche pour étudier à petite échelle les interactions entre les organismes vivants et les polluants dans les sols et sont nécessaires avant tout essai sur le terrain. L'emploi des microcosmes permet de déterminer la procédure de bioremédiation la plus adéquate (Bosco et Mollea, 2019).

Les essais en microcosme sont d'un coût modéré, nécessitent peu de place (en général les tailles des microcosmes varient de 0,02 à 32 L) et peuvent être de courte durée (Kampichler et al. 2001).

Malgré les principaux avantages que présentent les microcosmes à l'échelle du laboratoire comme la facilité de réaliser un grand nombre de réplicats et un contrôle précis et efficace des conditions appliquées, ils ont été cependant critiqués pour la « non-représentabilité » de l'écosystème entier, surtout pour l'étude de processus microbiologiques (Eller et al. 2005).

Peu de tests en laboratoire ont été standardisés et soumis à des normes. Néanmoins à l'échelle Européenne, un test permettant l'étude de la toxicité sur des vers de terre a été standardisé et adapté à plusieurs espèces, comme les isopodes et les acariens (Bogomolov et al. 1996).

Les prototypes de microcosmes de sol qui ont été largement étudiés et qui ont témoigné de bons résultats sont de deux types (Edwards 2002) :

- (i) un petit microcosme de sol intégré (ISM : *integrated soil microcosm*) contenant du sol tamisé et des espèces invertébrées sélectionnées, ces tests ont été réalisés avec plusieurs réplicats sous des conditions hautement contrôlées. Les dimensions de ce microcosme sont 7,5 cm de diamètre et 15 cm de hauteur.
- (ii) un microcosme plus grand (TME : *terrestrial model ecosystem*) avec un sol intact non tamisé, des espèces d'invertébrés autochtones et un mélange de flore et donc une plus grande biodiversité. Ces tests ont été réalisés avec un faible nombre de réplicats, ce type de test est destiné à l'étude à l'échelle du terrain. Les dimensions de ce microcosme sont 17,5 cm de diamètre et 40 cm de hauteur.

Les microcosmes de sol ont été largement employés pour des études d'écotoxicité, notamment avec l'utilisation de nématodes, en particulier les vers de terre (Bogomolov et al. 1996).

De nombreuses expériences ont été menées dans plusieurs tailles et conceptions ces dernières années pour étudier l'effet des micro-organismes sur les polluants. Certaines études en microcosme traitent de la pollution organique (Hollender et al. 2003).

La majorité de ces composés ont pour origine la pollution agricole, comme la mésotrione (Crouzet et al. 2010), le carbendazime (Burrows et Edwards 2004), l'atrazine (McGregor et al. 2008) et le pentachlorophénol (Bosso et al. 2015). D'autres études se sont intéressées à la capacité des micro-organismes à dégrader les HAP (Sarma et al. 2019; Prasad 2019; Košnář et al. 2019).

Cependant, l'utilisation de microcosmes du sol pour l'étude de l'efficacité des bactéries (Gremion et al. 2004) et des champignons (Srivastava et Thakur 2006; Albert et al. 2019; Hassan et al. 2020) pour faire face à une contamination métallique est peu rapportée.

Des études en microcosme de sol ont été réalisées en appliquant en bioaugmentation des souches fongiques comme *Aspergillus niger* (Srivastava et Thakur, 2006), ou encore : *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor* et *Pleurotus ostreatus* (Yateem et al. 1998). Certains auteurs ont réalisé des études comparatives entre des essais en microcosmes et des essais à l'échelle du terrain. Eller et al. (2004) ont comparé la structure de bactéries méthano et méthylotrophiques connues pour la réduction du méthane dans les champs de riz. Les résultats de leur étude ont montré que malgré le nombre de bactéries plus faible retenu à l'échelle du terrain par rapport à l'étude en microcosmes, la diversité bactérienne reste comparable.

Ranjard et al. (2006) ont réalisé une étude sur 2 mois en microcosme de sol pour la comparer à une étude en terrain d'une durée d'un an. Le but de l'étude a été de comparer l'effet du traitement en Cu (sous forme de bouillie bordelaise souvent utilisée en amendement) sur la communauté microbienne du sol. Les auteurs revendiquent une étude plus poussée et plus précise en microcosmes, qui a permis de détecter des modifications au niveau de la communauté microbienne par rapport à l'étude en terrain, qui du fait des variations pédoclimatiques, n'ont pas pu être détectées.

## VII. Les champignons en bioremédiation

### VII.1) Particularités des champignons

Les champignons représentent le second groupe d'organismes le plus grand (diversifié) au monde. Le nombre des espèces connues est estimé à 70 000, mais leur nombre réel pourrait s'élever à près de 5 millions d'espèces (Ghormade et al. 2017). Ce sont des Eucaryotes non mobiles, hétérotrophes qui représentent une grande diversité. Selon leur taille, ils peuvent être soit macroscopiques (« macromycètes »), soit microscopiques (« micromycètes ») et leur mode de reproduction peut être sexué et asexué (Zaragoza 2017).

Les champignons se répartissent en plusieurs divisions taxonomiques, en particulier : les Mucoromycètes (*Mucoromycota*, anciennement inclus dans un groupe nommé Zygomycètes ou *Zygomycota*), les Ascomycètes (*Ascomycota*) et les Basidiomycètes (*Basidiomycota*).

Les 2 phylums étudiés au cours de nos travaux sont : les Basidiomycètes et les Mucoromycètes.

- **les Basidiomycètes** sont des champignons qui produisent des spores à l'extrémité d'un diverticule (stérigmate) produit par la cellule mère (baside).

Les Basidiomycètes ont été largement étudiés dans le domaine médical et dans le domaine de la nutrition (Takao 1965) et plus récemment dans les études de bioremédiation en particulier pour leur capacité à produire des acides (Sasaki et Takao 1967; Jarosz-Wilkolazka et Graz 2006; Ribeiro et al. 2007 ; Liaud et al. 2014; Bosco et Mollea 2019; Krull et al. 2020; Hassan et al. 2020).

- **les Mucoromycètes** sont des champignons filamenteux caractérisés par deux types de reproduction. Elle peut être asexuée en formant des sporocystes (vésicules contenant des spores) et sexuée par la formation de zygospores. Les Zygomycètes sont connus pour être employés dans le domaine de la fermentation (Hesseltine 1991).

Les souches étudiées au cours des travaux sont : *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* :

- La souche fongique *Absidia cylindrospora* (Hagem, 1908) appartient à la division des *Mucoromycota*, de l'ordre des Mucorales et de la famille des *Cunninghamellaceae*. Cette souche modèle au laboratoire a été étudiée pour la biodégradation du fluorène (molécule faisant partie des 16 HAP classés prioritaires par l'US EPA) (Garon et al. 2004). Elle a ensuite été étudiée dans le cadre de la thèse d'Albert (2019) pour sa capacité à biosorber les métaux à partir de milieux de culture artificiellement contaminés en Cd, Cu et Pb. Cette souche est considérée comme la plus tolérante au Cd (jusqu'à 1000 mg.L<sup>-1</sup>) parmi les 28 souches testées dans cette étude. Cette espèce filamenteuse se caractérise de plus par une croissance rapide en laboratoire.
- La souche fongique *Perenniporia fraxinea* (Bull.Ryvarden, 1976) appartient à la division des *Basidiomycota*, de l'ordre des *Polyporales* et de la famille des *Polyporaceae*. Cette souche a été isolée à partir d'un sol industriel contaminé en Cu (100 mg.kg<sup>-1</sup>) et en Pb (140 mg.kg<sup>-1</sup>). Cet isolat est capable de tolérer 10 mg.L<sup>-1</sup> de Cd, 100 mg.L<sup>-1</sup> de Cu et 1000 mg.L<sup>-1</sup> de Pb (Albert et al. 2019).

L'étude de Sturini et al. (2017) a montré l'efficacité de cette souche à bioaccumuler des quantités importantes en métaux (Cd, Hg, Pb, Ni, Cr, Cu, Fe, Mn, Zn). En effet, elle a accumulé des teneurs allant jusqu'à 35 mg.kg<sup>-1</sup> de Cu et 57 mg.kg<sup>-1</sup> de Zn.

Dans le sol, les champignons forment le groupe de micro-organismes le plus diversifié suivis par les bactéries et sont considérés comme les principaux décomposeurs des polymères végétaux tels que la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

Les champignons possèdent une grande capacité d'adaptation, du point de vue de leur structure et de leur métabolisme. Ils peuvent subsister dans des conditions environnementales extrêmes, comme de faibles valeurs de pH, des températures extrêmes et des conditions de stress osmotique. Ils peuvent être retrouvés dans des sols arctiques et antarctiques, dans des déserts chauds et froids et même dans des sols et lacs hypersalés (Clipson et Gleeson 2012 ; Hamba et Melkamu 2016; Kapahi et Sachdeva 2017).

Les champignons ont la capacité de se développer sur une grande variété de roches et jouent un rôle majeur dans l'altération des roches et des minéraux. Ils possèdent la propriété de minéraliser, de libérer et de stocker des éléments et des ions ainsi que d'accumuler des matières toxiques.

L'altération peut être de deux types (Clipson et Gleeson 2012) :

- une altération physique : grâce à la croissance des hyphes, ils peuvent pénétrer dans les roches et créer des fissures, ou encore grâce à leurs sécrétions extracellulaires qui conduisent à une contraction et appliquent une pression physique qui perturbe la structure minérale.
- une altération chimique : grâce au métabolisme fongique, les champignons peuvent être la cause de la dissolution des minéraux.

Les champignons possèdent un mycélium (ensemble de filaments) qui représente un système très étendu, sa surface pouvant atteindre parfois 100 m<sup>2</sup>. Le mycélium est majoritairement formé de polymères naturels tels que la chitine et de protéines dont leur matière sèche représente environ 30% de protéines brutes (Rathore et al. 2019).

Il est formé d'une multitude d'hyphes (composées de cellules allongées) et de nombreuses ramifications capables de sécréter des exo-enzymes. Celles-ci permettent de subvenir aux besoins énergétiques de leur croissance (de Lima et al. 2018) et sont capables d'absorber les nutriments (principalement les oligo-éléments) (Gómez Ariza et al. 2000). Le mycélium issu des champignons peut être considéré comme un filtre biologique, il possède également des « propriétés sorbantes », grâce à ses structures qui ont une grande affinité avec les métaux (Damodaran et al. 2014).

Le mycélium fongique a un comportement similaire aux racines de la plante (Ali et al. 2017 ; Uddin et al. 2020), il se répand en effet de la même façon, absorbe et accumule des métaux dans son cytosol. Cependant, plusieurs études (Demirbaş 2002; Ali et al. 2017) ont montré que les champignons peuvent accumuler des concentrations supérieures en métaux (comme Pb, Cd et Hg) par rapport aux plantes. En effet, les champignons possèdent des mécanismes d'absorption plus efficaces que les plantes (Damodaran et al. 2014). Il est à noter que l'âge du mycélium est un paramètre important conditionnant l'accumulation des métaux, en effet plus le mycélium est âgé, plus sa capacité à accumuler les métaux est importante ( Kalač et Svoboda 2000 ; Ali et al. 2017).

Concernant la relation champignon-métal, les métaux sont directement et/ou indirectement impliqués dans la croissance des champignons, dans leur métabolisme et dans leur reproduction (Gadd 1994). Les métaux (comme : Cu, Mn, Mo, Zn et Ni) font partie des métaux essentiels à la croissance des champignons, ainsi qu'à des réactions enzymatiques, mais à certaines doses, ces métaux peuvent aussi être toxiques (Baldrian 2002; Vaishaly et al. 2015 ; Kertesz et Frossard 2015). Comme expliqué dans le chapitre 1- partie I.3, les oligo-éléments sont indispensables à la survie des espèces (Fomina et Gadd 2018).

En effet, tous les métaux peuvent interagir avec les champignons, mais présentent des seuils de toxicité différents selon l'espèce, le métal et les paramètres environnementaux. Les champignons ont donc la capacité d'absorber et d'accumuler les polluants (dont les ETM) tout comme les nutriments (Fomina et Gadd 2018).

Plusieurs études (Kalač et Svoboda 2000; Isildak et al. 2004) reportent que des doses importantes de métaux ont été retrouvées dans des champignons comestibles.

Chez les macromycètes, les métaux peuvent être transportés et stockés au niveau des organes de fructification (sporophores) des champignons (Ali et al. 2015).

Les organes de fructification des champignons peuvent contenir 57% de glucides, 25% de protéines, 5,7% de matières grasses et 12,5% de cendres en poids sec (Demirbaş 2002). Boamponsem et al. (2013) ont montré que des teneurs élevées en métaux ont été retrouvées dans les organes de fructification de champignons ayant poussé à proximité de sites pollués (fonderies, boues d'épuration). Les métaux les plus communément accumulés dans ces organes sont le Cd, Cu, Pb et Hg (Kalač et Svoboda 2000; Boamponsem et al. 2013).

Dans les sites contaminés, on retrouve plusieurs espèces fongiques métallo-résistantes, qui peuvent non seulement subsister dans des milieux fortement contaminés (Oladipo et al. 2018), mais aussi bioaccumuler les métaux vis-à-vis desquels elles ont développé une résistance (Castro et al. 2019).

Par ailleurs, les genres fongiques le plus souvent retrouvées dans les sols pollués sont : *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizopus* et *Fusarium* (Zafar et al. 2007; Zotti et al. 2014; Oladipo et al. 2018; Liaquat et al. 2020).

Cependant, la pollution métallique a plusieurs effets négatifs sur la biomasse fongique dans les sols dont la diminution de la biodiversité fongique, ce qui engendre l'augmentation du nombre d'espèces les plus tolérantes qui deviennent dominantes dans le milieu. Cette propriété est appelée « évolution adaptative » : elle se traduit par l'augmentation de la tolérance des espèces fongiques se trouvant dans le sol et subissant un stress métallique (Bellion 2006).

Le phénomène de « tolérance » correspond à la capacité d'un micro-organisme à survivre à une toxicité métallique grâce à des mécanismes intrinsèques, tandis que la « résistance » correspond à la capacité à survivre aux effets toxiques en étant exposé à une contamination métallique et cela en employant des mécanismes de détoxification en réponse directe à la pollution métallique (Sinha et al. 2011; Archana et Jaitly 2014). La toxicité des métaux peut également se manifester par l'inhibition de la croissance chez les Basidiomycètes par exemple, mais aussi par des altérations morphologiques (changement de couleur, élongation cellulaire) et physiologiques et peut affecter la reproduction (Vaishaly et al. 2015 ; Kumar et Dwivedi 2021).

## VII.2) Mécanismes de séquestration des métaux par les champignons

Le mycélium au contact des métaux peut subir des dommages physiologiques et peut même être détruit. Les champignons ont alors adopté un mécanisme de survie qui est l'évolution de leur paroi cellulaire avec une capacité de liaison aux métaux (Siegel et al. 1990). Les moyens de défense déployés par les champignons leur permettent ainsi de réduire la toxicité des métaux, en sécrétant des composés pouvant se lier aux métaux et les immobiliser (Baldrian 2002), mais également par des réactions de précipitation et de transport actif (Ahmad et al. 2011). La solubilisation des métaux par les champignons se manifeste par deux phénomènes qui sont la séquestration des métaux et l'acidification du micro-environnement selon Gadd (2003).

On retrouve dans le sol, différents acides organiques d'un faible poids moléculaire comme l'acide oxalique, formique, citrique, malique et acétique issus de la décomposition de la matière organique, des exsudats racinaires, mais également de la production de métabolites par les champignons et les bactéries (Gadd 1999).

La concentration en acides organiques dans les sols en général varie de 0 à 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  pour les acides di/tricarboxyliques (acide oxalique, malonique, malique, succinique, tartrique et citrique) et de 0 à 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  pour les acides monocarboxyliques (acide formique, acide acétique, propionique, butyrique, valérique et lactique) (Adeleke et al. 2017).

Dans les sols forestiers, les concentrations en acide oxalique peuvent varier de 25 à 1000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  dans la solution du sol (Gadd 1999).

Ces acides ont la capacité de modifier la spéciation minéralogique et la mobilité des métaux en influençant leur solubilité et à plus grande échelle, peuvent avoir des conséquences sur les cycles biogéochimiques (Gadd 2003). Ils jouent également plusieurs rôles dans les mécanismes qui se produisent dans le sol, comme la mobilisation et l'absorption des nutriments par les plantes ou micro-organismes, ou la dissolution des minéraux du sol (Jones 1998) via trois mécanismes (Adeleke et al. 2017) :

- (i) l'acidification : où la majorité des métaux liés à la fraction acido-soluble, sensible aux variations de pH, se transforment en espèces solubles et sont libérés dans la solution du sol.
- (ii) la chélation : où les acides organiques forment des complexes avec les métaux. Les acides organiques, comme l'acide citrique, oxalique et malique sont des chélateurs potentiels de métaux. Les éléments suivants peuvent former des oxalates métalliques : Ca, Cd, Co, Cu, Mn, Sr et Zn (Baldrian 2002).  
Les acides organiques possèdent en effet, un ou plusieurs groupes carboxyliques, ce qui leur confère des charges négatives, leur permettant de se lier aux cations métalliques et de former ainsi des complexes avec ces derniers. Néanmoins, le degré de complexation dépend de plusieurs facteurs, tout d'abord quel acide organique entre en jeu (nombre et proximité des groupes carboxyles), le type de métal et sa concentration ainsi que le pH de la solution du sol (Jones 1998).
- (iii) l'échange : les métaux ont une grande affinité aux groupements fonctionnels retrouvés à la surface des cellules.

Les mécanismes de séquestration des contaminants métalliques déployés par les champignons sont de deux types (Kapahi et Sachdeva 2017) :

- extracellulaire (via l'adsorption sur la paroi cellulaire, cette séquestration est la plus décrite dans la littérature).
- intracellulaire (au sein des vacuoles des champignons).

### VII.2.1) Séquestration extracellulaire des métaux par les champignons

La séquestration peut être extracellulaire dans le cas où les métaux sont préférentiellement chélatés par les composés sécrétés par les champignons et liés à la paroi cellulaire (Farhan et Khadom 2015; Castro et al. 2019).

La paroi cellulaire des champignons est majoritairement composée de chitine, de chitosane, de  $\beta$ -glucane et de mannane. Les parois des Zygomycètes sont essentiellement formées de chitine et de chitosane, quant aux Basidiomycètes, elles sont formées de chitine et  $\beta$ -glucane. La chitine peut représenter de 22 à 44% de la paroi cellulaire selon l'espèce de champignons. Ces différents mucopolysaccharides peuvent lier et chélater les métaux (Ghormade et al. 2017).

La chitine en particulier est le polymère le plus abondant dans la nature après la cellulose. Les composés contenant de la chitine ont été largement étudiés dans le domaine de la bioremédiation des métaux (Chen et al. 2016).

La chélation peut être réalisée également par le glutathion (GSH), les phytochélatines (Farhan et Khadom 2015; Gube 2016; Vaseem et al. 2017), les métallothionéines (Castro et al. 2019) et les sidérophores (Machuca et al. 2007).

- Les phytochélatines sont des protéines majoritairement associées aux processus de tolérance et d'accumulation des métaux chez les plantes et les champignons. Elles sont formées d'unités de ( $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl) n-glycine ( $n = 2-11$ ), dont les précurseurs sont les glutathions. Elles sont synthétisées par une enzyme appelée la phytochélatine synthase, qui est activée par les métaux. Les phytochélatines sont riches en groupes cystéine sulfhydryle qui ont la capacité à se lier aux métaux et de les séquestrer au sein de complexes très stables (Ali et al. 2013).
- Les métallothionéines sont de petits peptides cytoplasmiques riches en cystéine et présents chez les eucaryotes ainsi que chez les procaryotes (Simes et al. 2003). Ils sont retrouvés chez les plantes, les micro-organismes, les vertébrés et aussi chez les invertébrés comme *Eisenia andrei*, une espèce de ver de terre capable de synthétiser une protéine de liaison au Cd, la métallothionéine (Cd-MT) (Rorat et al. 2017).  
Les métallothionéines, le glutathion et les polyphosphates sont considérés comme des complexants pour le Pb, le Cd et le Hg et sont les protéines primordiales impliquées dans les processus de tolérance des métaux (Castro et al. 2019). La surface cellulaire des champignons étant chargée négativement (par la présence de différents composés anioniques : le glucane et la chitine) permet aux champignons de lier les cations métalliques (Anahid et al. 2011).
- Les sidérophores sont des composés organiques produits par les champignons, mais également par les plantes (phytosidérophores) en situation de stress métallique. Ce sont des composés de faible masse moléculaire, qui ont généralement une grande affinité pour le fer.

Ils peuvent également solubiliser plusieurs métaux comme le Cd, Cu, Ni, Pb, Zn d'où leur intérêt dans les processus de bioremédiation (Ahmed et Holmström 2014).

Du fait de leur non-spécificité, les enzymes (lignine peroxidase, laccases, ...) sécrétés par les champignons offrent l'avantage d'interagir avec une multitude de contaminants dans le sol pour leur alimentation et leur source d'énergie (Ali et al. 2017).

### VII.2.2) Séquestration intracellulaire des métaux par les champignons

Le phénomène de chélation intracellulaire se caractérise par la séquestration des métaux au sein des vacuoles (Castro et al. 2019). Les vacuoles sont des organites retrouvés dans le cytoplasme des champignons, elles sont composées d'eau, d'ions, de glucides et de pigments.

Le rôle principal des vacuoles des champignons est un rôle protecteur, mais elles agissent également sur le mécanisme de défense en détectant et isolant des molécules toxiques.

Elles permettent de réguler les concentrations en ions métalliques au niveau du cytosol et la détoxification d'ions métalliques potentiellement toxiques comme le  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  et  $Ni^{2+}$ , séquestrés préférentiellement au sein des vacuoles (Ahmad et al. 2011).

### VII.3) La mycoremédiation

La mycoremédiation, employant des souches fongiques, peut être mise en œuvre *in situ* ou *ex situ* (Ali et al. 2017). L'utilisation des champignons en bioremédiation est très avantageuse, du fait de leur biomasse supérieure par rapport aux bactéries, leur tolérance à de faibles valeurs de pH, leurs besoins nutritionnels peu complexes, leur rapport surface/volume élevé mais également leur particularité à dégrader plusieurs substrats (tels que : la cellulose, l'hémicellulose) (Dave et al. 1994; Akhtar et Mannan 2020).

La mycoremédiation implique la mise au contact de champignons avec des ETM, ce qui a semblé au départ mettre en péril leur bien-être, mais les champignons ont su développer une stratégie de survie qui est l'évolution de la paroi cellulaire avec une capacité de liaison aux métaux comme expliqué précédemment (Siegel et al. 1990).

Le traitement biologique avec des champignons est peu coûteux du fait d'une utilisation minimale de substances chimiques. Il est également assez efficace et sélectif, il permet en effet de cibler les ETM qu'on souhaite traiter, en sélectionnant une souche appropriée à un polluant spécifique (Hamba et Tamiru 2016). Les champignons de pourriture blanche en particulier sont très étudiés dans des essais de bioremédiation pour leur efficacité à interagir avec les ETM (Yateem et al. 1998).

L'intérêt pour les champignons filamenteux comme bioadsorbants a commencé dans les années 80. Jusqu'alors leur utilisation était exclusivement orientée vers la production d'acides, d'enzymes et d'antibiotiques. L'étude des champignons filamenteux pour l'adsorption des ETM (à partir de sols ou d'eaux contaminés) constitue donc un nouveau volet de biotechnologie, considéré comme la première application non comestible de biomasse fongique.

L'utilisation de champignons filamenteux est plus appréciée pour des essais de bioremédiation par rapport aux bactéries et aux levures, car ils sont caractérisés par une grande capacité à former un vaste réseau mycélien ainsi qu'à produire des composés extracellulaires (Bosco et Mollea 2019). De plus, ils possèdent des capacités de liaison des métaux aux parois cellulaires supérieures à celles des autres micro-organismes (Ahmad et al. 2011).

Le succès d'un essai de mycoremédiation est fonction de la survie du champignon et des conditions environnementales lui permettant de se développer (Ali et al. 2017). Il est impératif d'étudier la faisabilité d'un essai de mycoremédiation afin d'en définir les conditions optimales. Les éléments à prendre en compte pour un site contaminé donné sont la distribution spatiale du polluant, son comportement ainsi que le type de sol et ses propriétés. Il est également souhaitable d'étudier la physiologie et l'écologie des espèces utilisées afin de définir le protocole optimal de mycoremédiation (Kulshreshtha et al. 2014).

Srivastava et Thakur (2006) ont réalisé une étude de bioaugmentation en microcosme de sol avec la souche fongique *Aspergillus niger*, isolée à partir d'effluents de tannage de cuir. Leur étude s'est basée sur deux volets : (i) l'essai de tolérance au Cr et l'estimation du potentiel de biosorption du métal par le champignon en milieu liquide ; (ii) l'introduction du champignon au sein d'un microcosme de sol artificiellement contaminé en Cr à différentes concentrations (de 250 à 2000 mg.kg<sup>-1</sup>). Le microcosme est réalisé en couches avec une souche fongique inoculée à la surface du sol dans de grands containers de 2 L. Les résultats montrent que plus la teneur en chrome est élevée dans le sol, plus la croissance de la souche est inhibée. Néanmoins, 70% du chrome a pu être retiré des sols contenant 250 et 500 mg.kg<sup>-1</sup> de Cr par sa biosorption par le mycélium fongique.

Sierra et Cáliz (2012) réalisent une étude en microcosme de sol (avec une durée d'incubation de 28 jours) basée sur l'atténuation naturelle (ou bio-atténuation). Leur but est d'évaluer l'activité des micro-organismes autochtones au sein d'un sol de forêt acide artificiellement contaminé en Cd, Cr et Pb à des teneurs allant de 0,1 à 5000 mg.kg<sup>-1</sup> et d'identifier les souches fongiques résistantes qui peuvent tolérer des teneurs élevées en métaux et donc peuvent potentiellement être candidates à des essais de bioremédiation.

A l'issue de l'étude, des champignons appartenant au groupe taxonomique des Ascomycètes et des bactéries des genres *Actinobacteria* et *Firmicutes* ont été isolés.

Le tableau 3 montre la grande diversité des champignons employés en bioremédiation de sols pollués en métaux. Ce tableau regroupe des Basidiomycètes, des Ascomycètes et des Mucoromycètes qui représentent les divisions taxonomiques des champignons les plus représentés dans l'environnement. Par ailleurs, les espèces *Aspergillus* (*A. alliaceus*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. niger*), ainsi que les espèces *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride*) sont très étudiées dans des essais de bioremédiation.

La majorité des études de mycoremédiation se base sur la biosorption des métaux en milieu liquide enrichi en métaux. Sur les études présentées en tableau 3, une seule étude emploie un sol artificiellement contaminé en métaux pour étudier la biosorption de la souche fongique *Galerina vittiformis* (Damodaran et al. 2014). Ceci montre qu'il existe un nombre restreint d'études de mycoremédiation en milieu réel (employant des sols) comparé aux études réalisées en milieu (de culture) liquide offrant souvent toutes les conditions favorables au développement de la souche fongique, ce qui n'est pas forcément le cas en milieu réel (en terrain). Ces essais présentent effectivement moins de contraintes liées à la manipulation et l'analyse. Il suffit de prélever le mycélium (souvent en pelote) de son milieu de culture pour l'analyser, contrairement aux essais avec des sols où une méthode de séparation du mycélium et du sol doit être développée pour pouvoir analyser la concentration en métaux accumulés dans le mycélium et dans le sol séparément.

Ce tableau montre également qu'une large sélection de métaux est étudiée dans le cadre des essais de mycoremédiation, cependant les métaux les plus étudiés sont : Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb et Zn. Ceci permet de dire que les champignons appartenant aux espèces *Aspergillus* et *Trichoderma*, ainsi que les Basidiomycètes et Ascomycètes d'une manière générale ont une grande affinité pour des métaux souvent décrits dans la littérature comme potentiellement toxiques. Possédant la particularité de tolérer et d'accumuler ces métaux, leur application en mycoremédiation est envisageable. Ceci montre non seulement le grand intérêt porté à la mycoremédiation, mais également son vaste champ d'application (diversité des souches fongiques et des métaux étudiés).

Tableau 3. Liste non exhaustive des études de mycoremédiation de métaux.

	Souche fongique	Milieu	métaux	référence
Aspergillus	<i>Aspergillus alliaceus</i>	Suspension semi-solide de Tween 80	Cu	Zotti et al. (2014)
	<i>Aspergillus awamori</i>	Dextrose de pomme de terre et bouillon nutritif	Cd, Ni, Pb	Joshi et al. (2013)
	<i>Aspergillus flavus</i>	Milieu de culture liquide PDB	Hg	Kurniawan et Ekowati (2016)
	<i>Aspergillus foetidus</i>	Milieu de culture standard	Cr, Co, Cu, Ni, Zn, Mg, Mn, Fe, Al	Ge et al. (2011)
	<i>Aspergillus niger</i>	Milieu de culture liquide MEA	Cu, Cr, Pb	Dursun et al. (2003)
	<i>Absidia cylindrospora</i>	Milieu de culture liquide MEA	Cd, Cu, Pb	Albert et al. (2018)
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Milieu de culture en fermenteur	Pb	Zhao et al. (2020)
		Dextrose de pomme de terre et du bouillon nutritif	Cd, Ni, Pb	Joshi et al. (2013)
	<i>Galerina vittiformis</i>	Sol enrichi en métaux	Cd, Cu, Cr, Pb, Zn	Damodaran et al. (2014)
	<i>Mucor rouxii</i>	3 milieux de culture -milieu extrait de levure -bouillon de levure bacto-malt -milieu PD	Cd, Ni, Pb, Zn	Yan et Viraraghavan (2003)
	<i>Clonostachys rosea</i>	Suspension semi-solide de Tween 80	Cu	Zotti et al. (2014)
Trichoderma	<i>Trichoderma harzianum</i>	Suspension semi-solide de Tween 80	Cu	Zotti et al. (2014)
	<i>Trichoderma viride</i>	Milieu PD	Cd et Pb	Joshi et al. (2011)
		Milieu PDB	Cd et Pb	Sahu et al. (2012)
		Milieu minimal Czapek modifié	Cu	Anand et al. (2006)

PDB: Potato Dextrose Broth; PD: Potato Dextrose; MEA: Malt Extract Agar

## VIII. Acides organiques et champignons

### VIII.1) Sécrétions des acides par les champignons

Bien que plusieurs acides soient produits par les champignons comme l'acide citrique, gluconique et malique (Javaid et al. 2019), l'acide oxalique est l'acide organique majoritairement cité dans la littérature (Lapeyrie et al. 1987; Cunningham et Kuiack 1992; Jordan et al. 1996; Dutton et Evans 1996; Gadd 1999; Machuca et al. 2001; Mäkelä et al. 2002; Clausen et Green 2003; Fomina et al. 2005; Jarosz-Wilkolazka et Graz 2006; Trujillo-Vargas et al. 2020). Il est essentiellement produit par les Basidiomycètes. Ce taxon de champignons a été d'ailleurs largement étudié pour sa capacité à le produire (Jarosz-Wilkolazka et Graz 2006; Ribeiro et al. 2007; Liaud et al. 2014; Javaid et al. 2019).

Par ailleurs l'acide oxalique est produit par les champignons de pourriture brune (« *brown-rot fungi* ») en quantités très élevées, car il est sécrété durant tout leur cycle de vie, contrairement aux champignons de pourriture blanche (« *white-rot fungi* ») qui en produisent généralement lors de leur métabolisme secondaire (Mäkelä et al. 2002).

Le tableau 4 présente une liste non exhaustive des études réalisées pour identifier les souches fongiques capables de produire des acides et d'évaluer les quantités d'acides produites en toutes conditions (sans stress métallique).

Les acides organiques de faible poids moléculaire ont particulièrement été employés pour la remédiation des sols contaminés avec des métaux (Onireti et Lin 2016). En effet, les acides organiques ont la particularité d'avoir un pouvoir chélatant et complexant qui leur permet de se lier aux métaux (Arwidsson et al. 2010).

Les groupes taxonomiques les plus étudiés (tableau 4) sont les Ascomycètes et les Basidiomycètes. Ce vaste champ confirme le grand potentiel des champignons à produire des acides. Néanmoins, une grande disparité est observée. Les durées d'incubation de ces souches sont hétérogènes (elles varient de 5 jours à 4 semaines) : en conséquence les quantités sécrétées sont différentes et les résultats ne sont pas comparables.

Tableau 4. Liste non exhaustive des types et quantités d'acides produites par certaines souches fongiques.

Taxon	Champignon	Acide produit	Quantité	Durée de croissance	Référence
Ascomycètes	<i>Aspergillus flavus</i>	malique	50 moles/ moles de glucose consommé	8 jours	Battat et al. (1991)
		succinique	17 moles/ moles de glucose consommé		
		fumarique	1 mole/ moles de glucose consommé		
	<i>Beauveria caledonica</i>	oxalique	0,6 à 2mM	20 jours	Fomina et al. (2005)
		citrique	7 à 13mM		
		malique	0,1mM		
	<i>Aspergillus oryzae</i>	malique	33g/L	7 jours	Dörsam et al. (2017)
<i>Aspergillus terreus</i>	itaconique	25g/L	5 jours	Yang et al. (2020)	
Basidiomycètes	<i>Abortiporus biennis</i>	oxalique	0,19 mM	21 jours	Galkin et al. (1998)
	<i>Cerrena unicolor</i>		0,16 mM	22 jours	
	<i>Phanerochaete chrysosporium F1767</i>		0,48 mM	24 jours	
	<i>Phlebia tremellosa</i>		0,77 mM	21 jours	
	<i>Trametes trogii</i>		0,31mM	23 jours	
	<i>Trametes versicolor</i>		1,34mM	31 jours	
	<i>Gloeophyllum trabeum</i>		12 µmol/mg poids sec	14 jours	Green et al. (1995)
	<i>Serpula incrassata</i>		48 µmol/mg poids sec		
	<i>Postia placenta</i>		39 µmol/mg poids sec		
	<i>Trametes ochracea</i>		61mg/mL	25 jours	Jordan et al. (1996)
	<i>Trametes ochracea</i>		2,4 mM	17 jours	Mäkelä et al. (2002)
	<i>Fomitopsis pinicola</i>		aux alentours de 2mM	4 semaines	Schilling et Jellison (2004)
	<i>Meruliporia incrassata (Poria Incrassata)</i>		aux alentours de 1mM		

## VIII.2) Identification et dosage des acides organiques produits pas les champignons

L'identification des acides organiques produits grâce au métabolisme des champignons a donc suscité l'attention depuis les années 1960 (Takao 1965; Sasaki et Takao 1967; Battat et al. 1991).

Dans la littérature, différentes méthodes d'analyses qualitatives et quantitatives sont employées pour l'identification ainsi que le dosage des acides organiques produits pas les champignons.

D'un point de vue qualitatif, plusieurs études (Cunningham et Kuiack 1992; Jarosz-Wilkolazka et Graz 2006; Scervino et al. 2010 ; Dezam et al. 2017) se sont basées sur la formation d'un halo autour du mycélium comme indicateur de la production d'acides. Certains auteurs ont employé un indicateur coloré. En effet le changement de couleur du milieu où pousse le champignon correspond à une baisse de pH : cette dernière est assimilée à la production d'acides par la souche fongique (Dezam et al. 2017).

D'un point de vue quantitatif, le dosage des acides est réalisé par titrage volumétrique acide-base ou par analyse chromatographique. Il est cependant à noter que les analyses chromatographiques servent aussi à identifier les acides organiques.

Par ailleurs, les acides organiques étant identifiés dans différentes matrices telles que les matrices alimentaires, les fluides biologiques (Pérez-Vásquez 2015) ou les milieux de culture plusieurs méthodes ont été publiées pour la détermination des acides organiques dans des matrices alimentaires tels que le fromage (Mullin et Emmons, 1997 ; Zeppa et al. 2001), le café moulu (Rogers et al. 1999), les légumes (Vazquez Oderiz et al. 1994 ; Velterop et Vos, 2001), les fruits (Walton et De Jong, 1990 ; Romero Rodriguez et al. 1992 ; Bartolozzi et al. 1997 ; El Kossori et al. 1998), les jus de fruits (Hong et Wrolstad, 1986; Sacconi et al. 1995), les moûts et les vins (Castellari et al. 2000 ; Kotani et al. 2004).

La plupart des études citées sont basées sur la séparation par GC<sup>22</sup> ou HPLC<sup>23</sup> (Molnár-Perl, 1999). Pour les fruits et les jus de fruits, il existe des méthodes basées sur l'analyse par GC (Molnár-Perl et Morvai, 1992) qui, malgré une séparation et une sensibilité excellentes, nécessitent des étapes de purifications fastidieuses utilisant des agents purifiants toxiques. De plus, les températures élevées requises pour ces analyses peuvent conduire à la décomposition des échantillons.

---

<sup>22</sup> GC : Chromatographie Gazeuse

<sup>23</sup> HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

Le tableau 5 présente les principales études qui emploient une méthode basée sur la HPLC pour étudier la capacité des champignons à produire les acides organiques. Les conditions d'analyse (type de colonne, débit, température de colonne, détection et éluant) y sont détaillées.

Cunningham et Kuiack (1992) identifient l'acide oxalique et citrique produits par la souche fongique *Penicillium bilaii* par HPLC (détecteur UV à 210 nm) en utilisant une colonne Polypore à échange d'ions avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N comme éluant à un débit de 0,25 mL.min<sup>-1</sup>. Quant à Scervino et al. (2010) et Liaud et al. (2014), ils emploient une colonne Aminex UV (à 210nm) pour déterminer les acides produits (oxalique, citrique, gluconique et valérique) par les souches fongiques de leurs études et cela en employant l'acide sulfurique comme éluant à : 2,5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 35°C (Liaud et al. 2014) ou à 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 50°C (Scervino et al. 2010). Leurs études ont permis d'identifier l'acide butyrique, citrique, gluconique, fumarique, lactique, succinique et formique.

D'autres techniques sont plus rarement utilisées : l'électrophorèse de zone capillaire pour déterminer l'acide oxalique, formique, malonique et tartrique (Galkin et al. 1998; Mäkelä et al. 2002) ; la chromatographie électrocinétique micellaire sur système d'électrophorèse thermo-capillaire employée par Jarosz-Wilkolazka et Graz (2006) pour tester la capacité de 28 souches de champignons de pourriture blanche à pousser sur des milieux de culture solides supplémentés d'oxydes (ZnO, CaO, Cu<sub>2</sub>O). Cette étude a permis d'identifier l'acide oxalique, malique et formique.

La diversité des souches et des techniques utilisées ne permet pas de faire des corrélations ou des comparaisons de résultats. Elle montre cependant la grande diversité des acides produits par les champignons.

Ainsi, il apparaît que les acides majoritairement étudiés et secrétés sont en premier lieu l'acide oxalique (Lapeyrie et al. 1987; Cunningham et Kuiack 1992; Jordan et al. 1996; Whitelaw et al. 1999; Rashid et al. 2004; Schilling et Jellison 2004; Li et al. 2016; Dezam et al. 2017; Trujillo-Vargas et al. 2020; Krull et al. 2020), suivi de l'acide citrique (Cunningham et Kuiack 1992; Jordan et al. 1996; Whitelaw et al. 1999; Rashid et al. 2004; Ribeiro et al. 2007; Dezam et al. 2017; Trujillo-Vargas et al. 2020). L'acide gluconique ou encore l'acide malique sont également étudiés (Jordan et al. 1996; Whitelaw et al. 1999; Ribeiro et al. 2007; Rashid et al. 2004; Li et al. 2016 ; Dezam et al. 2017; Dörsam et al. 2017). L'acide itaconique est moins étudié (Krull et al. 2020; Yang et al. 2020).

Il est constaté que la colonne la plus employée pour le dosage des acides organiques est la colonne « Aminex-Biorad » par HPLC (tableau 5), avec de l'acide sulfurique comme éluant à des débits variants entre 0,25 et 0,6 mL.min<sup>-1</sup>.

Tableau 5. Liste non exhaustive des conditions chromatographiques pour le dosage des acides organiques par HPLC.

Technique	Colonne	Débit ml.min <sup>-1</sup>	Détection	Elution	Composés	Référence
HPLC	Aminex HPX87H (300 x7,6mm) à 55°C	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	UV 210 nm	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,025 N	Acide oxalique	Lapeyrie et al. (1987)
HPLC	Colonne à échange d'ions	0,25 mL.min <sup>-1</sup>	210 nm	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01 N	Acides : oxalique et citrique	Cunningham et Kuiack (1992)
Beckman Systems Gold HPLC	Bio-Rad Aminex HPX-87, H+ (9µm, 300 × 7,8mm I. D.) (Bio-Rad Labs, Richmond, CA)	non fourni	210 nm 35°C	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,008 N	Acides oxalique, citrique, tartrique, malique, succinique, formique et acétique à des concentrations différentes	Jordan et al. (1996)
HPLC Varian 9050	Colonne à exclusion d'ions (7x 250 mm)	0,5 mL.min <sup>-1</sup>	UV 210 nm	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1 mM) et acétonitrile (4%, v/v) avec un pH de 2,7	Acides : acétique, citrique, formique, fumarique, galacturonique, gluconique, glucuronique, glutaconique, glycolique, ketogluconique lactique, maleique, malique, malonique, mesaconique, oxalique, phthalique, propionique, pyruvique, salicylique, succinique et tartrique	Whitelaw et al. (1999)
HPLC unit (Gilson)	Colonne à exclusion d'ions chauffée à 30°C (Nucleogel_ Ion 300 OA (300x7,7 mm).	0,2 mL.min <sup>-1</sup>	UV 214 nm	En mode isocratique avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01 N	Acides : oxalique, aconitique, citrique, malique, ascorbique et fumarique.	Ribeiro et al. (2007)
HPLC	Bio-rad colonne à échange d'ions Aminex 87-H (25*4,6mm) à 25°C.	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	Détection réfractométrie	En mode isocratique avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,001 N	Acides : oxalique, acétique, citrique, malique, gluconique et fumarique.	Rashid et al. (2004)

Technique	Colonne	Débit mL.min <sup>-1</sup>	Détection	Elution	Composés	Référence
HPLC Hitachi system	Aminex HPX-87H (Bio-Rad (9 mm, 300=7,8 mm I.D., pH: 1–3), à 30°C	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	DAD 210 nm	20 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH 1,40)	Oxalate	Schilling et Jellison (2005)
HPLC (Hewlett Packard, Avandale, PA)	Aminex HPX-87H+ (Bio-Rad, Hercules, CA) chauffée à 65°C	0,5 mL.min <sup>-1</sup>	205 nm	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 mM	Acide oxalique	Micales (2005)
HPLC Waters	Colonne à exclusion d'ions Aminex HPX-87H	Non fourni	Non fourni	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (8 mM)	Acide oxalique	Fomina et al. (2005)
HPLC (Agilent 1200)	Colonne chauffée à 30°C	0,5 mL.min <sup>-1</sup>	Non fourni	ammonium et méthanol avec un ratio de 99: 1	Acides : oxalique, tartrique, formique, acétique, lactique, malique, citrique, indole 3-acétique	Li et al. (2016)
HPLC (Waters Co system)	Aminex HPX-87H (Bio-Rad) à 65°C	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	210 nm	En mode isocratique 5 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acides : gluconique, oxalique et citrique	Dezam et al. (2017)
HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent)	Rezex ROA organic acid H+ (8%) column (300x 7,8 mm) à 50°C	0,5 mL.min <sup>-1</sup>	réfractométrie	En mode isocratique 5 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acide malique	Dörsam et al. (2017)
HPLC Prominence (Shimadzu Corporation, USA)	Colonne à exclusion d'ions IC-Pak 7µm (7,8 x 300mm) (Waters, USA) à 40°C	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	UV/VIS DAD at 210 nm	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> testé à des concentrations entre 0,001 et 0,1N en mode isocratique	Acides : oxalique et citrique	Trujillo-Vargas et al. (2019)
HPLC (Shimadzu)	Aminex HPX-87H (Bio-Rad) chauffée à 40°C	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	Détecteur UV 210 nm	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 mM	Acide itaconique	Krull et al. (2020)

Technique	Colonne	Débit ml.min <sup>-1</sup>	Détection	Elution	Composés	Référence
HPLC	Aminex HPX-87H à 55°C	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	Non fourni	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5mmol.L <sup>-1</sup>	Acide itaconique	Yang et al. (2020)
HPLC	Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad) à 55°C	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	Non fourni	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5mmol.L <sup>-1</sup>	Acides : oxalique, citrique et itaconique	Fardelone et al. (2021)

Par ailleurs, la complexité de la matrice (milieu de culture) peut causer l'adsorption de l'échantillon sur les parois de la colonne, ce qui peut réduire son efficacité et sa performance (Chen 1996). Aussi, des interférences lors de l'analyse des acides organiques produits par les champignons peuvent gêner l'analyse.

Les méthodes d'analyse par HPLC présentent certains inconvénients : une résolution faible et des limites de détection élevées. Néanmoins, en raison de sa simplicité et des conditions chromatographiques plus faciles à mettre en œuvre, la séparation par HPLC semble plus intéressante pour avoir une séparation rapide et quantitative de la plupart des acides organiques.

## VIII. Conclusion

Cette synthèse bibliographique a mis en lumière le potentiel des champignons au sein de l'écosystème sol et leur intérêt dans le domaine de la bioremédiation des sols contaminés par des métaux. Ils possèdent en effet plusieurs caractéristiques particulières, notamment leur grande surface de contact (mycélium) avec les xénobiotiques, leur capacité d'adaptation à de nombreux stress, leur tolérance aux polluants, leurs propriétés de biosorption et leur possibilité de produire de nombreux composés extracellulaires. Les champignons jouent également un rôle important dans la modification de la spéciation et la mobilité des métaux en influençant leur solubilité (via les sécrétions de composés extracellulaires) et à plus grande échelle, peuvent avoir des conséquences sur les cycles biogéochimiques. De plus, les essais de mycoremédiation présentés semblent prometteurs, il serait intéressant de réaliser des essais en microsome de sol pour évaluer le potentiel des champignons à traiter la pollution métallique en milieu solide au contact de sols pollués. Par ailleurs, la capacité des champignons à produire des acides a été soulignée par plusieurs auteurs et l'HPLC est la méthode d'analyse la plus préconisée pour l'analyse de ces acides sécrétés. Il serait envisageable de tester la capacité de ces champignons à produire des acides.

## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

Ce chapitre se compose de trois parties. La première partie concerne les techniques de caractérisation des sols (paramètres physicochimiques et méthodes d'analyse des métaux) et la seconde présente les techniques de caractérisation et d'identification des isolats fongiques. La troisième partie est consacrée à l'étude de la production d'acides organiques par les champignons en présence d'ETM.

## I. Techniques de caractérisation des sols

### I.1) pH

La mesure du pH est réalisée selon la norme ISO 10390. Pour cela, un ratio de 1/5 est utilisé (5g de sol mis au contact de 25 mL d'eau ultra pure). Les échantillons sont déposés sur une table d'agitation (IKA KS 501 DIGITAL) à 250 tr.min<sup>-1</sup> pendant 1 heure et laissés au repos pour une durée de 30 minutes. La mesure du pH est ensuite réalisée avec un pH mètre (Hanna instruments HI 2211) préalablement étalonné avec des solutions tampons à pH 4 et pH 7. Les valeurs retenues sont exprimées à partir de la moyenne de 3 réplicats pour chaque mesure.

### I.2) Dosage des carbonates

Le dosage des carbonates adapté de la norme NF ISO 10693 est réalisé à l'aide d'un calcimètre de Bernard. La teneur en carbonates (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) est déterminée par la mesure du gaz (CO<sub>2</sub>) dégagé lors de l'acidification de l'échantillon selon la réaction (6) :  $\text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}_3\text{O}^+ \leftrightarrow \text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$  (6). Pour cela, une masse connue de l'échantillon est introduite dans un erlenmeyer et un volume de 10 mL de HCl 6M (qualité analytique, Carlo Erba<sup>®</sup>) y est ajouté. Le volume de CO<sub>2</sub> dégagé suite à la réaction est donc mesuré. Les teneurs en carbonates sont obtenues après étalonnage externe (CaCO<sub>3</sub> pur).

### I.3) Dosage du carbone organique total

Le protocole est adapté de la norme ISO 14235 modifiée.

Le carbone de la matière organique du sol (C<sub>org</sub>) est oxydé à chaud par un excès de dichromate en milieu acide (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) selon la réaction (7) :  $3\text{C} + 2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + 16\text{H}^+ \leftrightarrow 4\text{Cr}^{3+} + 8\text{H}_2\text{O} + 3\text{CO}_2$ . La quantité de Cr (III) formée est déterminée par mesure au spectromètre à de 585 nm (absorbance UV spectromètre Pharmacia Biotech Novaspec II). L'étalonnage est réalisé à partir de glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) pur et permet de déduire directement la teneur en C<sub>org</sub>.

## I.4) Analyse des teneurs totales en éléments métalliques

Les sols, après échantillonnage sont séchés à l'air libre (en évitant toute exposition au soleil pour ne pas excéder une température de 40°C) afin d'éviter la perte des éléments facilement volatiles selon la norme NF ISO 11464 (2006).

Une minéralisation acide (eau régale) assistée par micro-ondes (Speedwave MWS-2 BERGHOF®) permet de solubiliser les matrices étudiées avant leur analyse élémentaire par spectrométrie d'émission atomique. Le protocole est adapté de la norme NF EN 13656.

Cette technique de minéralisation appliquée sur les sols donne accès aux teneurs pseudo-totales qui sont, pour tous les éléments sauf Al et Si, égales aux concentrations totales (Baize et al. 2006) comme expliqué précédemment dans le chapitre 1 (partie IV).

Une masse de 0,2 g d'échantillon de sol sec est déposée dans une bombe en Teflon® étanche et mise au contact de 10 mL d'eau régale : 6,66 mL de HCl 37% et 3,33 mL de HNO<sub>3</sub> 68% (Carlo Erba Reagents for Analysis-ISO). La minéralisation est réalisée suivant le programme de température (tableau 6).

Après un cycle de minéralisation de 50 minutes, les bombes sont laissées à température ambiante pour refroidir. Le contenu de chaque bombe est récupéré et complété à 50 mL avec de l'eau ultrapure dans des fioles jaugées. Les solutions récupérées sont ensuite filtrées à 0,45µm (Merck Millex®) et stockées à +4°C dans des tubes en polypropylène avant analyse. Chaque minéralisation est effectuée en triplicat.

Par ailleurs, la minéralisation est réalisée également sur : le mycélium, la sciure et la gélose. Le mycélium et la sciure sont séchés à l'étuve à 25°C avant minéralisation, tout comme le sol. La gélose ne subit pas de séchage, car elle est composée essentiellement d'eau. La composition du milieu de culture MEA qui compose la gélose est indiqué en annexe n°1. Elle est directement congelée après récupération pour éviter le développement de micro-organismes et est décongelée au moment de la minéralisation. 3 réplicats sont réalisés lorsque les quantités le permettent (en particulier pour le mycélium).

Tableau 6. Programme pour la minéralisation acide assistée par micro-ondes.

Etape	1	2	3	4	5
Rampe (min)	10	10	5	2	2
Temps (min)	10	10	5	15	15
Température (°C)	175	100	80	180	180

## I.5) Analyse de la fraction potentiellement disponible en éléments métalliques

### I.5.1) Extractions simples

Les quantités de métaux potentiellement disponibles sont estimés par 2 réactifs différents : un acide fort : l'acide chlorhydrique (HCl 1M) (CARLO ERBA), mais aussi un agent complexant : l'EDTA (ACROS ORGANICS) (0,02M). Le choix de ces réactifs a été argumenté en chapitre I, partie (III.4.2.1 et III.4.2.3).

Les extractions sont réalisées avec un ratio liquide solide (L/S) de 1/10 (ratio préconisé par le Bureau Communautaire de Référence (BCR)) dans des flacons en PEHD en triplicats. Pour cela, une prise d'essai de 1g est mise au contact de 10mL d'une solution extractante. Le mélange est agité 1 heure, à 250 tr.min<sup>-1</sup> sur une table d'agitation IKA KS501 digital. Les extraits sont filtrés à 0,45 µm (Millex®) et les filtrats stockés à +4°C avant analyse.

### I.5.2) Extractions séquentielles

Le protocole d'extractions séquentielles sélectionné pour notre étude est le protocole de Leleyter et Probst (1999). Comme détaillé en chapitre I (partie III.4.3), ce type d'extraction présente l'avantage de cibler 7 fractions. Ce protocole a la particularité d'inclure des réactifs caractérisés par leurs sélectivités et leurs efficacités. Il a également été prouvé (Cuvier et al. 2021) que ce protocole est plus efficace que le BCR pour minéraliser les fractions : échangeable, acido-soluble et réductible.

Le protocole consiste à mettre au contact d'une prise d'essai de 1g des réactifs successifs d'une agressivité croissante. Les fractions prises en compte sont décrites ci-dessous. Leur somme représente la fraction potentiellement disponible.

La figure 8 détaille les conditions opératoires : volumes des réactifs utilisés ; temps d'agitation ; température).

A l'issue de chaque étape, les lessivats sont filtrés (filtre HVLP, 0,45 µm) et rincés avec deux fois 10mL d'eau ultra pure (EUP), puis conservés à +4°C avant analyse. Entre chaque étape, les filtres sont récupérés et séchés dans une étuve à 40°C avant l'étape suivante. Trois répliquats sont réalisés par sol testé.

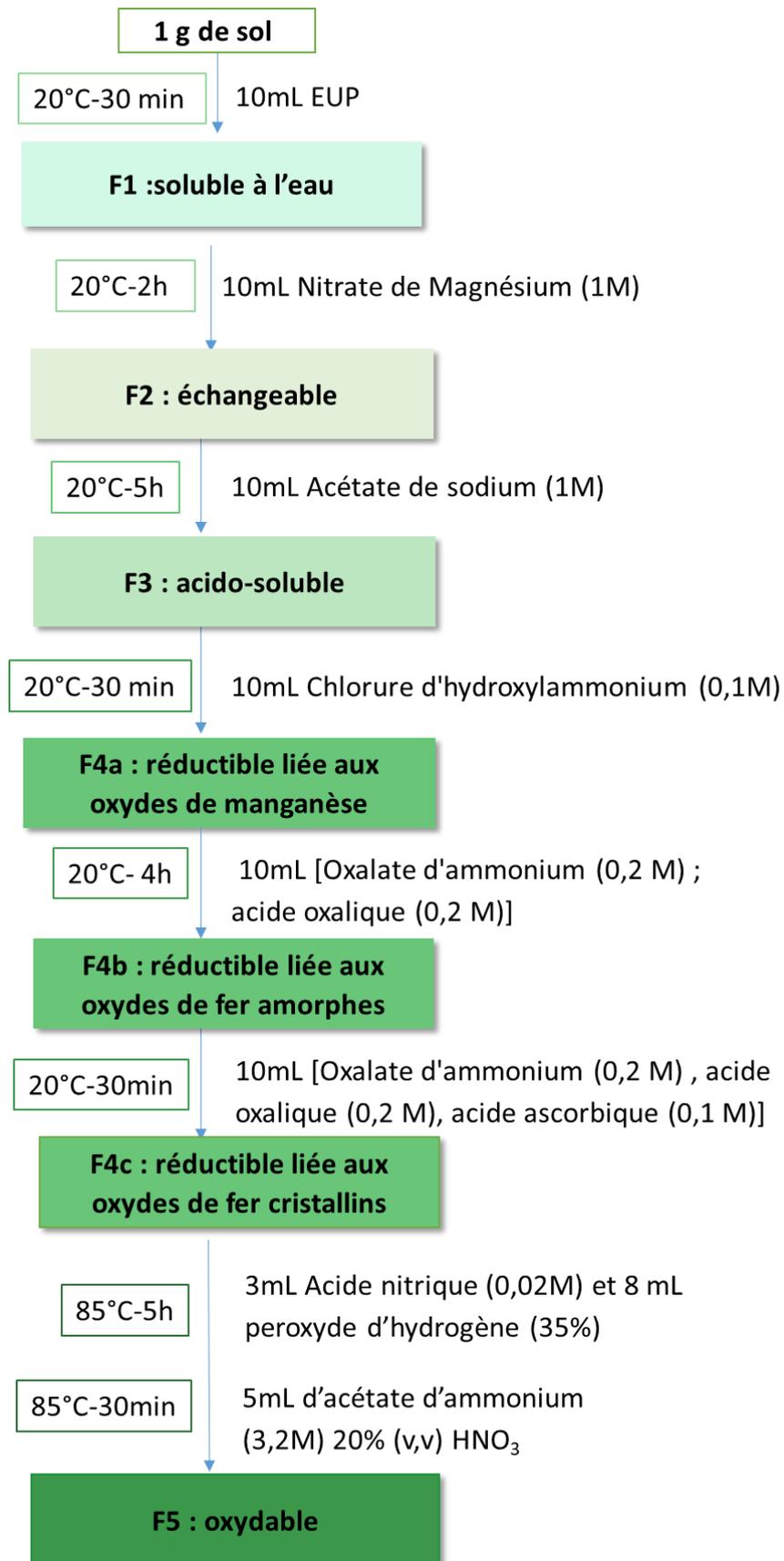


Figure 8. Protocole de l'extraction séquentielle selon Leleyter et Probst (1999).

## I.6) Analyse élémentaire par ICP-AES

### I.6.1) Appareillage

L'analyse chimique élémentaire de l'ensemble des minéralisats et des extraits est réalisée par ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy*) (Agilent Technologies® 5100).

Le logiciel (ICP Expert) permet d'afficher des concentrations en métaux en  $\text{mg.L}^{-1}$  aux différentes longueurs d'ondes sélectionnées pour chaque élément étudié. La longueur d'onde finalement retenue pour chaque élément présente le meilleur compromis entre la meilleure allure de pic (fin et non étalé) avec une intensité importante et avec le minimum d'interférences spectrales. Les critères de choix de la longueur d'onde sont détaillés en annexe n°2.

Des solutions standards PlasmaCal sont utilisées pour réaliser des étalonnages externes avec des gammes de concentrations variant 0 à  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ . Pour chaque échantillon injecté, 5 mesures sont réalisées.

### I.6.2) Limites de détection (LD) et de quantification (LQ)

Selon le Recueil International des Méthodes d'analyses – OIV, la limite de détection est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, mais non quantifiée dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Tandis que la limite de quantification est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée, avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

Les méthodes d'estimation de la limite de détection ont été encadrées par plusieurs réglementations, lignes directrices ou normes (NF ISO 12828-1).

Les méthodes les plus proposées pour déterminer les limites de détection sont : le modèle d'étalonnage et la méthode des blancs. Ces méthodes ont cependant toutes les deux été critiquées (Mermet, 2008).

Pour la méthode des blancs, le bruit de fond du blanc est difficilement négligeable et le choix du « blanc » a également été critiqué. Ce dernier peut correspondre au blanc matrice ou au blanc réactif ou à l'analyte non-cible (ne contient pas l'analyte cible, ce qui fait que la réponse attendue est négative).

Pour ce qui est de déterminer les limites de détection en se basant sur le modèle d'étalonnage, il a été observé que plus la gamme d'étalonnage est élargie, plus les limites de détection sont élevées. Il est donc préférable de travailler avec de faibles concentrations pour obtenir des limites plus faibles.

La limite de cette méthode réside dans le fait que la limite de détection obtenue par cette méthode dépend fortement de la gamme d'étalonnage sélectionnée, mais également du nombre de points choisis et de la position des étalons dans la gamme d'étalonnage (Rivier et Crozet 2014).

Dans notre étude, le calcul des limites de détection (LD) et de quantification (LQ) des métaux étudiés est réalisé suivant les deux méthodes (la méthode d'étalonnage avec régression linéaire et la méthode d'analyse des blancs).

Pour ce qui est de la méthode de régression linéaire, les LD et LQ sont déterminées selon les formules suivantes :

$$LD = \frac{3\sigma}{\text{pente}} \quad (8)$$

$$LQ = \frac{10\sigma}{\text{pente}} \quad (9)$$

$$\sigma \text{ est calculé comme suit: } \sigma = \frac{SE}{\sqrt{n}} \quad (10).$$

SE représente l'erreur standard calculée par le module « Analys tool pack » et n représente le nombre d'étalons utilisés pour tracer la droite d'étalonnage. La méthode de calcul est détaillée en annexe n°3 pour l'élément Cr. Les LD et LQ des autres éléments de l'étude sont calculées suivant le même modèle.

Le tableau 7 présente les limites de détection et de quantification pour les métaux dosés en ICP-AES en mg.L<sup>-1</sup> calculées par la méthode des blancs.

*Tableau 7. Valeurs de limites de détection et de quantification pour les métaux dosés en ICP-AES en mg.L<sup>-1</sup> calculées par la méthode des blancs.*

mg.L <sup>-1</sup>	Cd	Cr	Co	Cu	Ni	Pb	Zn
<b>LD</b>	0,0001	0,0002	0,0007	0,0003	0,0005	0,0014	0,0002
<b>LQ</b>	0,0004	0,0006	0,0022	0,0008	0,0016	0,0043	0,0007

*LD : limite de détection ; LQ : limite de quantification*

Afin de déterminer la LD et la LQ des métaux pour les composants du microcosme (sol, milieu MEA ou gélose et mycélium), la masse de la prise d'essai de chaque composant est prise en compte pour calculer la LD et la LQ en mg.kg<sup>-1</sup> (tableau 8).

Les valeurs sélectionnées pour calculer les LD et LQ en  $\text{mg.kg}^{-1}$  (tableau 8) sont les valeurs calculées par la méthode des blancs. En effet, ces valeurs sont plus basses que celles calculées par la méthode de régression linéaire. Les limites de détection et de quantification calculées à partir de cette dernière sont présentés en annexe n°3.

Tableau 8. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) des métaux étudiés en  $\text{mg.kg}^{-1}$ .

	matrice	Cd	Cr	Co	Cu	Ni	Pb	Zn
<b>LD en</b> $\text{mg.kg}^{-1}$	sol	0,02	0,05	0,17	0,07	0,12	0,35	0,05
	mycélium	0,05	0,10	0,35	0,15	0,25	0,69	0,10
	milieu MEA	0,05	0,10	0,35	0,15	0,25	0,69	0,10
<b>LQ en</b> $\text{mg.kg}^{-1}$	sol	0,10	0,15	0,55	0,20	0,40	1,07	0,17
	mycélium	0,20	0,30	1,09	0,40	0,79	2,13	0,35
	milieu MEA	0,20	0,30	1,09	0,40	0,79	2,13	0,35

### I.6.3) Qualité analytique

La qualité des mesures est évaluée à l'aide d'un matériau de référence : un sédiment naturellement contaminé « TH2 lot 0618 » (*Environment and Climate Change Canada*).

Le sédiment sec est minéralisé selon le protocole décrit (chapitre II partie I.4) et analysés à l'ICP-AES. Le tableau 9 présente les teneurs en métaux obtenues après dosage des éléments contenus dans le « TH2 » ainsi que les valeurs certifiées fournies.

Tableau 9. Bilan sur la minéralisation du sol de référence « clean loam soil » et du sédiment de référence « TH2 ».

<b>Métal</b>	<b>Longueur d'onde (nm)</b>	<b>Concentration (<math>\mu\text{g.g}^{-1}</math>)</b>	
		<b>certifiée TH2</b>	<b>dosée TH2</b>
Cd	226,502	$5,47 \pm 0,87$	$7,6 \pm 0,2$
Cr	267,716	$96,2 \pm 20,9$	$104 \pm 4$
Co	228,615	$11,8 \pm 2,6$	$13,9 \pm 0,6$
Cu	327,395	$116 \pm 21$	$123,0 \pm 0,4$
Pb	220	$187 \pm 25$	$189 \pm 2$
Ni	231,604	$39 \pm 8$	$40 \pm 1$
Zn	213,857	$860 \pm 181$	$947 \pm 7$

Les résultats du tableau 9 montrent que les concentrations dosées en métaux sont conformes à celles certifiées par « Environment and Climate Change Canada », sauf pour le cas de Cd, où une légère surestimation analytique est notée.

## II. Isolation et identification des souches fongiques

La flore fongique (microfonge) des sols de notre étude a été étudiée selon deux approches. Une approche qualitative selon la méthode par incorporation directe (Warcup) et une approche quantitative selon la méthode des suspension-dilutions.

### II.1) Méthode par incorporation directe

La méthode de Warcup (1950) ou méthode par incorporation directe consiste à incorporer quelques grains de sol dans un milieu nutritif. Elle a pour but de réaliser une étude qualitative permettant d'identifier la flore fongique d'un sol.

Pour cela, une prise d'essai de 2 mg de sol est insérée dans une boîte de Petri stérile et 20 mL de milieu *Malt Extract Agar* (MEA) additionné de chloramphénicol ( $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) maintenu en surfusion est coulé sur les grains de sol. Les boîtes de Petri sont ensuite incubées dans une étuve à  $25^{\circ}\text{C}$ . Après 3 jours d'incubation, les boîtes sont observées quotidiennement pour une durée de 15 jours afin d'isoler et de purifier sur milieu MEA chaque isolat fongique. Les isolats fongiques sont ensuite identifiés.

### II.2) Méthode des suspensions-dilutions

Cette méthode complémentaire permet de quantifier le nombre de colonies en  $\text{CFU.g}^{-1}$  qui poussent sur un sol. L'unité employée est « Colonie Formant Unité par gramme de sol » qui représente le nombre de colonies fongiques par gramme de sol.

Le principe est de mettre une quantité déterminée de sol en suspension dans de l'eau stérile et de réaliser diverses dilutions de la suspension dans le milieu d'isolement (Davet et Rouxel 1997).

Pour cela, 1g de sol est ajouté dans un tube contenant 9 mL d'eau stérile additionnée de 0,05% en volume de Tween 80 (Sigma ultra Aldrich), constituant ainsi la solution mère. La solution est ensuite agitée pendant 15 minutes à 300 rpm. Un aliquot de 1mL de cette solution est prélevé et ajouté à 9 mL d'eau stérile, ce qui correspond à une dilution au  $10^{\text{ème}}$ . Des dilutions successives au  $100^{\text{ème}}$  et au  $1000^{\text{ème}}$  sont ensuite réalisées.

Un volume de 1 mL de la solution mère et de chaque dilution est alors prélevé et déposé dans une boîte de Petri dans laquelle 20 mL de milieu MEA en surfusion est coulé.

Les boîtes de Petri sont incubées à 25°C et surveillées quotidiennement afin de réaliser les comptages. Chaque colonie est isolée et purifiée sur milieu MEA additionné de chloramphénicol (0,2g.L<sup>-1</sup>) avant d'être identifiée.

## II.3) Identification des isolats

### II.3.1) Identification des isolats par approche culturelle et microscopique

L'identification des isolats est réalisée à partir des cultures pures des souches fongiques selon des méthodes :

- macroscopiques : observation à l'œil nu de la couleur et de l'aspect de la colonie.
- microscopiques : observation avec le microscope Olympus CX 31<sup>®</sup> avec un grossissement de 100, 400 et 1000 des différentes structures fongiques.

L'identification se fait en s'appuyant sur la mycothèque du laboratoire qui compte plus de 1700 souches fongiques (isolées à partir de plusieurs environnements et représentatives des différents groupes taxonomiques) et sur des ouvrages de référence (Domsch,1980 ; Barnett and Hunter 2006 ...).

### II.3.2) Identification des isolats par approche moléculaire

La biologie moléculaire est employée pour l'identification de certains isolats pour lesquels l'approche culturelle s'est révélée insuffisante. L'ADN d'une culture pure de 15 jours sur milieu MEA est extrait avec un kit Nucleospin<sup>®</sup> Plant II (Macherey-Nagel). Une PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est ensuite effectuée pour amplifier les régions ITS à l'aide d'une FastTaq Polymérase (Applied Biosystems). Les produits de PCR sont ensuite envoyés pour séquençage à Eurofins Genomics. Le résultat du séquençage est utilisé pour retrouver des homologies de séquence à l'aide du logiciel BLAST (NCBI).

## III. Mise en évidence de la production d'acides organiques par les champignons

### III.1) Essai préliminaire en milieu solide

Une étude préliminaire (proposée par Dezam et al. (2017)) est reproduite pour mettre en évidence la production d'acides par les souches fongiques de l'étude (*Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea*).

Pour cela, elles ont été séparément mises en culture sur un milieu MEA solide supplémenté avec un indicateur coloré (vert de bromocrésol- zone de virage : 3,8 (jaune) => 5,4 (bleu)) et exposées à un stress métallique.

### III.2) Essai en milieu liquide

L'expérimentation en milieu liquide synthétique est réalisée avec le milieu de Galzy et Slonimski : milieu GS (dont la composition est détaillée en annexe n°1) dans 3 conditions différentes : milieu témoin (GS) sans métal, milieu (GS) supplémenté en Cd et milieu (GS) supplémenté en Pb (présentés dans le tableau 10).

Tableau 10. Présentation des conditions testées en milieu de culture liquide.

Milieus de culture	Milieu GS	Solution de métal	Masse de sel pesée (g) pour préparer la solution de métal
T1, T2, T3	25mL	Pas d'ajout	0
Cd1, Cd2, Cd3	25mL	125µL de solution de CdSO <sub>4</sub> à 10g.L <sup>-1</sup>	1,8 g de CdSO <sub>4</sub> dans 1L
Pb1, Pb2, Pb3	25mL	125µL de solution de Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> à 10g.L <sup>-1</sup>	1,6 g de Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> dans 1L

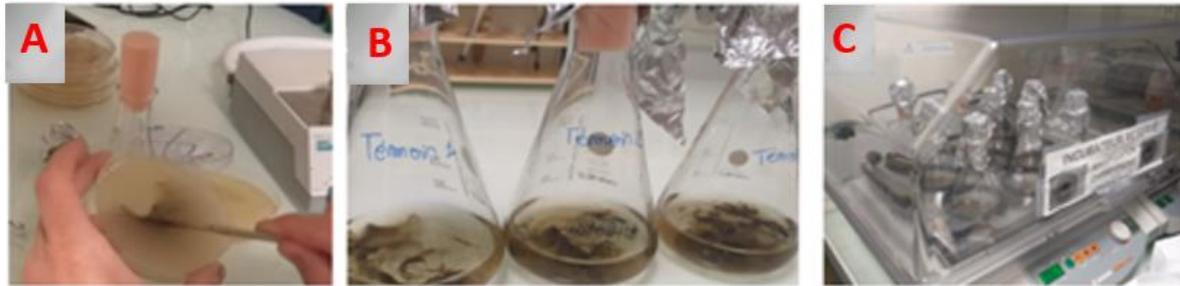
Le mode opératoire suivant est adapté des travaux de thèse de Quentin Albert (2019).

Les milieux de culture sont artificiellement contaminés en Cd et en Pb avec l'emploi de solutions de chaque métal. Les sels de Cd (CdSO<sub>4</sub>) et de Pb (Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) présentés en tableau 10 sont de qualité analytique (Sigma Aldrich®). Les solutions mères (1g.L<sup>-1</sup>) sont préparées en ajoutant une masse de sels de métaux dans de l'eau ultra pure en conditions aseptiques, elles sont conservées à +4°C avant utilisation.

La souche fongique *Absidia cylindrospora* est ensemencée et pousse sur milieu MEA durant 10 jours à 25°C et la souche fongique *Perenniporia fraxinea* est ensemencée pendant 14 jours. Le mycélium (d'une boîte de Petri) est ensuite gratté avec un scalpel stérile (figure 9A) et introduit dans des Erlenmeyers contenant 25 mL de milieu GS (figure 9B). Les erlenmeyers sont incubés à 25°C avec une agitation de 180 rpm pour une durée de 3 jours (temps nécessaire au développement d'une pelote de mycélium) (figure 9C).

Le mycélium est ensuite exposé au métal en réalisant un ajout de 125µL de solution de CdSO<sub>4</sub> ou Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> à 10g.L<sup>-1</sup> permettant d'atteindre une concentration de 50 mg.L<sup>-1</sup> en métal. La durée

d'exposition totale est de 4 jours, avec des prélèvements journaliers réalisés à 24h, 48h, 72h et 96h.



- A) Grattage du mycélium ayant poussé sur boîtes de Petri
- B) Introduction du mycélium gratté dans des erlenmeyers contenant du milieu GS
- C) Erlenmeyers déposés dans l'incubateur employé pour la manipulation

Figure 9. Préparation des essais d'exposition d'*Absidia cylindrospora* aux métaux en milieu de culture liquide

Après 4 jours d'exposition, le mycélium est récupéré et ensuite séché à 30°C jusqu'à obtention d'une masse constante pour déterminer les poids secs des mycéliums. Les milieux de culture sont filtrés avec un filtre seringue d'un diamètre de 25mm et d'une porosité de 0,2µm (VWR INTERNATIONAL) stockés à -20°C avant leur analyse par HPLC.

### III.3) Mise au point d'une méthode d'analyse des acides par HPLC

Les analyses ont été menées par HPLC. La mise au point de la méthode est réalisée avec la colonne Aminex HPX-87H, en testant plusieurs éluants et différents débits pour la détection des acides et l'ordre d'éluion de ces derniers. Les détails de cette mise au point feront l'objet du chapitre 6. Il sera aussi question de présenter dans le même chapitre les résultats de l'analyse des acides organiques dans les milieux de culture liquides des souches fongiques *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* en appliquant la méthode d'analyse développée.

## IV. Analyses statistiques

Des tests non paramétriques (Wilcoxon, Kruskal-Wallis) ont été réalisés pour comparer les concentrations de métaux. Seuls les résultats à  $p < 0,05$  ont été considérés comme statistiquement significatifs. Toutes les analyses statistiques ont été exécutées à l'aide du système SAS version 9.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

## **Chapitre 3 : Présentation et caractérisation des sols de l'étude**

# I. Présentation et caractérisation physico-chimique des sols de l'étude

## I.1) Présentation des sols

Quatre sols différents (notés C, L, R et S) sont étudiés. Le sol noté **C** est un sol de forêt prélevé dans la forêt de Cerisy, située en Normandie (50680, Cerisy-la-Forêt, France, 49,2,-0,8907).

Le sol nommé **L** est un sol contaminé en métaux provenant d'une ancienne mine de plomb et de zinc localisée dans la région Nord Pas de Calais (France) (Gérard et al. 2000).

Les sols C et L ont été séchés à l'air libre, broyés et stockés à +4°C dans des sacs hermétiques en polyéthylène jusqu'à analyse.

Un sol contaminé en métaux et en HAP a été collecté à Rouen quelques jours après l'incendie de 2019 de l'usine Lubrizol, dans un jardin à proximité (moins de 1 km du lieu de l'incendie). Ce sol a été séché à 30°C (5 jours) avant d'être broyé (mortier en agate) et incorporé au sol L (m/m : 2/3). Le mélange ainsi réalisé constitue le sol nommé **R**, stocké à +4°C dans des sacs hermétiques en polyéthylène.

**Le sol S<sup>-</sup>** est un sol synthétique préparé en laboratoire selon la norme NF EN ISO 11268-2 en utilisant 10% de masse sèche de tourbe de sphaigne finement broyée et sans restes de plantes visibles acheté dans un magasin local, 69,5% de masse sèche de sable de Fontainebleau, 20% de kaolin blanc (VWR international) et 0,5% de carbonate de calcium (ACROS ORGANICS). Le tableau 11 présente la composition du sol synthétique.

Tableau 11. Composition du sol synthétique (selon la norme NF EN ISO 11268-2).

Composant	% (m/m) en masse sèche	masse (g)
Tourbe de sphaigne	10,0	30,0
Kaolinite	20,0	60,0
Sable fin de Fontainebleau	69,5	208,5
Carbonate de calcium	0,5	1,5
Total	100	300

A partir des 300g de sol synthétique préparé, une masse de 100 g de ce sol appelée sol synthétique non contaminé (**S<sup>-</sup>**) est humidifiée avec un volume de 15 mL d'eau ultra-pure. Les 200 g de sol restants, appelé sol synthétique contaminé (**S<sup>+</sup>**), sont artificiellement contaminés en Cd, Cu et Pb par addition de solutions concentrées de chaque élément.

Afin d'obtenir une teneur finale de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  de chaque métal, des solutions mères sont préparées par dissolution dans de l'eau ultra-pure des sels de sulfate pour Cd et Cu ( $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  respectivement) et des sels de nitrate pour Pb ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) (tous les sels de qualité analytique Sigma Aldrich). Les solutions sont stockées à  $+4^\circ\text{C}$  avant utilisation. Un volume de 10 ml de chaque solution mère est ajouté à 200 g de sol synthétique S afin d'obtenir un sol synthétique contaminé en métaux noté  $\text{S}^+$ .

Les échantillons de sol ( $\text{S}^-$  et  $\text{S}^+$ ) obtenus sont ensuite maintenus à température ambiante pendant 24h avant utilisation selon la norme (NF EN ISO 11268-2).

Les caractéristiques physicochimiques des sols de l'étude (pH, teneurs en carbonates et carbone organique total (COT), selon les protocoles décrits en chapitre 2 (respectivement partie I.1 ; I.2 et I.3) sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12. Caractéristiques physicochimiques des principaux sols étudiés.

Sol	origine	pH	$\text{CaCO}_3(\%)$	COT (%)
<b>C</b>	forêt	$4,43 \pm 0,20$	$0,4 \pm 0,0$	$10,9 \pm 0,1$
<b>L</b>	industriel	$6,92 \pm 0,20$	$1,4 \pm 0,0$	$2,2 \pm 0,1$
<b>R</b>	industriel-jardin (mélange)	$7,57 \pm 0,02$	$7,6 \pm 1,3$	$5,5 \pm 0,3$
<b><math>\text{S}^+</math></b>	synthétique	$4,85 \pm 0,06$	$0,2 \pm 0,0$	$10,3 \pm 0,1$
<b><math>\text{S}^-</math></b>	synthétique	$4,56 \pm 0,04$	$0,3 \pm 0,0$	$9,7 \pm 0,1$

Le sol C est un sol forestier acide (pH entre 3,5 et 5,5), il fait partie des 22% des sols forestiers acides répertoriés en France par le réseau européen de surveillance de la santé des forêts dont la majorité (62%) ont des valeurs de pH comprises entre 7 et 9,5 (Ranger et al. 2000). Le sol L est un sol industriel avec un pH de 6,9, cependant la valeur mesurée en 2000 par Gérard et al. (2000) est de 7,8. Il s'agit forcément de zones différentes de prélèvements ou de variations dues au vieillissement du sol. Le sol R (contenant en partie (1/3) du sol L) a un pH de 7,6, ce qui est légèrement plus élevé que le sol L, mais reste comparable.

Les sols synthétiques ( $\text{S}^+$  et  $\text{S}^-$ ) ont des pH de 4,8 et de 4,5 respectivement. Il est décrit dans la norme (ISO 11298-2) qu'environ 1% de carbonate de calcium est nécessaire pour obtenir un pH autour de  $6,0 \pm 0,5$ . Cette valeur de pH n'a pas été atteinte, même en ajoutant 1% de carbonate de calcium, ceci est sans doute dû à un problème d'homogénéisation du sol.

Concernant les teneurs en COT, le sol C présente une teneur aux alentours de 10%. Des teneurs similaires sont retrouvées pour les sols synthétiques ( $\text{S}^+$  et  $\text{S}^-$ ) avec des pourcentages de 10,3 % et 9,7% respectivement. Des pourcentages moins élevés sont retrouvés pour les sols industriels, avec des valeurs de 2 et de 5% respectivement pour L et R.

Les sols synthétiques sont préparés avec 0,5% de carbonate de calcium, des pourcentages similaires en  $\text{CaCO}_3$  ont été retrouvés pour les sols synthétiques avec 0,2 % et 0,3 % de  $\text{CaCO}_3$  pour  $\text{S}^+$  et  $\text{S}^-$ . Le sol C présente un pourcentage de carbonates similaire (0,4%). Le % de  $\text{CaCO}_3$  estimé du sol L est de 1,4%, tandis que celui de R s'élève à 7,6%.

## 1.2) Teneurs élémentaires totales dans les sols de l'étude

Les sols (C, L, R,  $\text{S}^+$  et  $\text{S}^-$ ) sont caractérisés pour leurs teneurs élémentaires et potentiellement disponibles en métaux.

Les concentrations totales en éléments métalliques des sols sont déterminées après minéralisation acide assistée par micro-ondes (selon le protocole décrit en chapitre 2, I-5).

Le tableau 13 regroupe les teneurs totales élémentaires des sols étudiés et rappelle les teneurs en métaux dans le cas de la gamme courante, en cas d'anomalie et en cas de forte anomalie par Baize et al. (2000) présentés préalablement dans le tableau 2 (chapitre I).

Tableau 13. Teneurs totales en éléments métalliques dans les sols de l'étude et teneurs et valeurs d'analyse de la situation pour interpréter les concentrations en métaux dans les sols en France métropolitaine (Baize et al. 2000).

	mg.kg <sup>-1</sup>	<b>Cd</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>	<b>Cu</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>
<b>Sols de l'étude</b>	<b>C</b>	<b>1,1 ± 0,1</b>	2,7 ± 0,5	14 ± 3	6 ± 1	6,1 ± 0,4	20 ± 1	21 ± 2
	<b>L</b>	<u><b>20 ± 1</b></u>	7,5 ± 0,4	30 ± 2	<b>36 ± 1</b>	13,9 ± 0,4	<u><b>1029 ± 16</b></u>	<u><b>1455 ± 20</b></u>
	<b>R</b>	<u><b>8 ± 2</b></u>	7,2 ± 0,4	27 ± 3	<u><b>130 ± 10</b></u>	18 ± 1	<u><b>650 ± 54</b></u>	<u><b>795 ± 85</b></u>
	<b>S<sup>-</sup></b>	<LD	<LD	<LD	2,0 ± 0,2	0,3 ± 0,1	3,9 ± 0,3	6 ± 2
	<b>S<sup>+</sup></b>	<u><b>41 ± 3</b></u>	<LD	<LD	46 ± 6	0,242 ± 0,004	49 ± 5	5 ± 1
<b>Gammes des VAS selon Baize 2000</b>	courante	0,05 - 0,45	2-23	10-90	2 - 20	2-60	9 - 50	10 - 100
	<b>anomalie</b>	0,7 - 2,0	23-90	90 - 150	20 - 62	60 - 130	60- 90	100 - 250
	<b><u>forte anomalie</u></b>	2,0 - 46,3	105-148	150 - 3180	65- 160	130 - 2076	100 - 10180	250- 3800

VAS : valeurs d'analyse de la situation

Valeurs d'écart-types en italique

Valeurs en cas d'anomalie en gras

Valeurs en cas de forte anomalie en gras souligné

Les sols étudiés ont des teneurs en métaux différentes en fonction de leur nature et de leur origine. Le sol **L** (prélevé dans une zone contaminée) et le sol **S<sup>+</sup>** (artificiellement contaminé en métaux) contiennent une charge importante en métaux.

### 1.2.1) Cas des sols réels

En prenant en compte les valeurs d'analyse de la situation (VAS) proposées par Baize (2000) (cités dans le tableau 2 (chapitre I), mais également rappelées dans le tableau 13), il est possible de détecter les anomalies sur les sols.

Pour le sol de forêt **C**, la concentration est de 6 mg.kg<sup>-1</sup> pour Cu, 20 mg.kg<sup>-1</sup> pour Pb et 21 mg.kg<sup>-1</sup> pour Zn. Leleyter et al. (2012) ont retrouvé des concentrations du même ordre de grandeur pour un sol agricole se trouvant dans la même région (Normandie). Le sol de leur étude contient 10 mg.kg<sup>-1</sup> de Cu, 20 mg.kg<sup>-1</sup> de Pb et 50 mg.kg<sup>-1</sup> de Zn. Ces concentrations rentrent dans la gamme courante.

Les concentrations des autres métaux étudiés (Cr, Co et Ni) sont également attribuées à la gamme courante sauf pour le cas de Cd, dont la valeur (1,1 mg.kg<sup>-1</sup>) correspond à une anomalie. Ces teneurs en métaux sont cependant faibles comparées aux valeurs retrouvées pour les autres sols de l'étude. Ceci est cohérent avec la localisation du sol (milieu rural).

Le sol **L** est particulièrement riche en Zn (1455 mg.kg<sup>-1</sup>), en Pb (1029 mg.kg<sup>-1</sup>) et en Cd (20 mg.kg<sup>-1</sup>). Ces teneurs sont en accord avec les résultats de Gérard et al. (2000), qui ont travaillé sur le même sol, avec des concentrations en zinc de 1520 mg.kg<sup>-1</sup>, en plomb de 1196 mg.kg<sup>-1</sup> et en cadmium de 25 mg.kg<sup>-1</sup>. Ces teneurs sont comprises dans la gamme de valeurs en cas de forte anomalie. Ceci correspond parfaitement à l'origine du sol, ainsi qu'au type d'activité exercée auparavant sur le site de l'étude. En revanche, les teneurs en Cr (30 mg.kg<sup>-1</sup>), Co (7,5 mg.kg<sup>-1</sup>) et Ni (14 mg.kg<sup>-1</sup>) se situent dans la gamme des valeurs courantes et Cu (36 mg.kg<sup>-1</sup>) dans la gamme des anomalies.

Le sol **R** (contenant du sol L) présente des concentrations assez élevées en Cd (8 mg.kg<sup>-1</sup>), Pb (650 mg.kg<sup>-1</sup>), Zn (795 mg.kg<sup>-1</sup>) et Cu (130 mg.kg<sup>-1</sup>). Ces valeurs appartiennent à la gamme des valeurs en cas de forte anomalie. Comme pour le sol L, les valeurs de Co (7,2 mg.kg<sup>-1</sup>), Cr (27 mg.kg<sup>-1</sup>), Ni (14 mg.kg<sup>-1</sup>) rentrent dans la gamme courante selon Baize (2000). Par ailleurs, la composition élémentaire des sols de l'étude (C, L, R, S<sup>+</sup> et S<sup>-</sup>) est présentée en annexe n°4.

### 1.2.2) Cas des sols artificiels

Le sol artificiel contaminé  $S^+$  contient  $41 \pm 3 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Cd,  $46 \pm 6 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Cu et  $49 \pm 5 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Pb. Les concentrations de métaux sont approximativement similaires pour les trois métaux dans le sol contaminé, proches de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  qui est la concentration attendue.

### 1.3) Teneurs potentiellement disponibles des métaux par extraction simple dans les sols de l'étude

Les sols de l'étude (sols réels : R, L et C et sols artificiels :  $S^+$  et  $S^-$ ) sont soumis au protocole d'extraction simple HCl 1M (présenté en chapitre II-partie I.5.1) afin d'évaluer la fraction potentiellement disponible. La figure 10 présente les « pourcentages potentiellement disponibles » évalués par HCl pour les cinq sols.

Ces pourcentages sont calculés par le rapport de la concentration extraite par HCl sur la concentration totale de métal (extraite par minéralisation totale) suivant la formule suivante (11) :

$$\text{Pourcentage mobile (\%)} = \frac{\text{Concentration du métal extraite par HCl en } \text{mg.kg}^{-1}}{\text{Concentration totale de métal en } \text{mg.kg}^{-1}} \times 100.$$

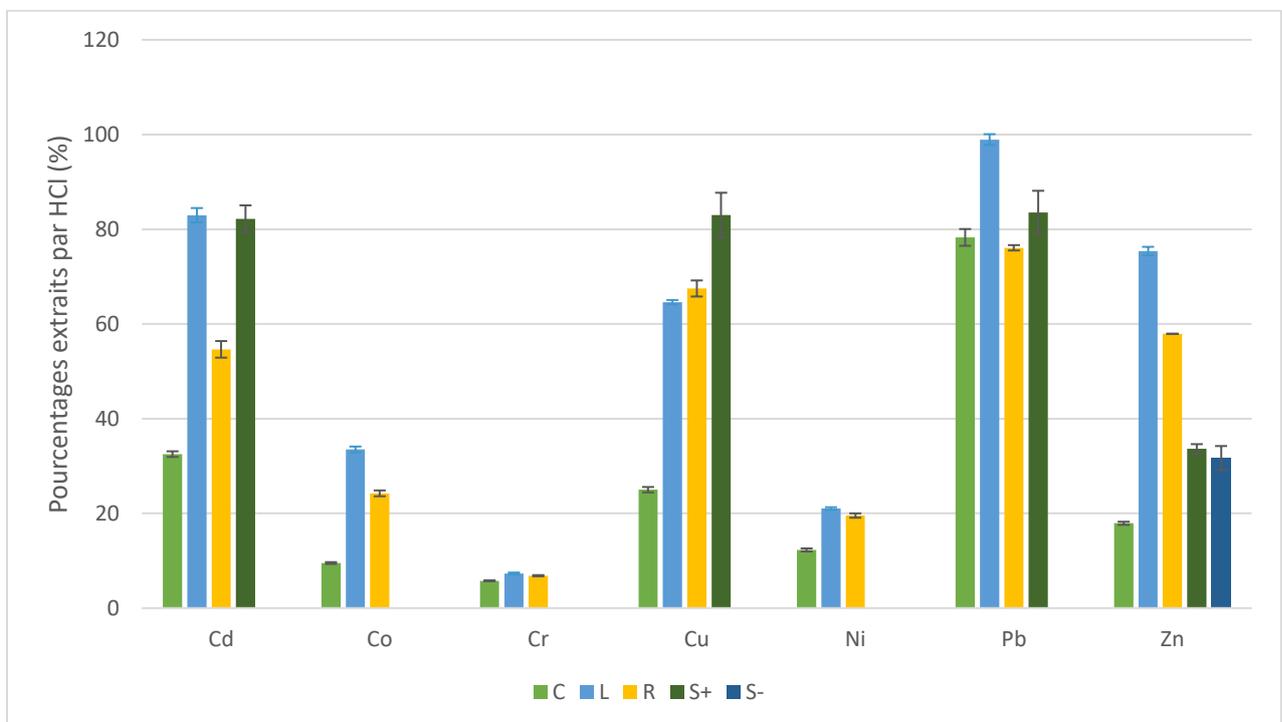


Figure 10. Mobilité des métaux (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn) par extraction HCl sur les sols étudiés : pourcentage extrait.

D'une façon générale, il est observé que le sol synthétique S<sup>+</sup> (dopé artificiellement en métaux) présente les pourcentages les plus élevés, notamment pour Cd (82%), Cu (83%) et Pb (84%) : éléments avec lesquels le sol est dopé, via l'ajout de sels métalliques (chapitre 3-partie I.1). Les sels de nitrate/sulfates de Cd, Cu, Pb sont des formes disponibles et le sol préparé (S<sup>+</sup>) n'a pas vieilli : il est logique d'obtenir des pourcentages élevés. Ceci explique les pourcentages aux alentours de 80% obtenus pour les trois métaux

Les pourcentages des métaux dans le sol S<sup>-</sup> ne peuvent être calculés, car les teneurs potentiellement disponibles en métaux sont inférieures à la limite de détection, sauf pour le cas du Zn pour lequel les pourcentages sont du même ordre de grandeur que le sol S<sup>+</sup> et sont aux alentours de 40%.

Concernant les sols réels, les pourcentages potentiellement disponibles les plus élevés sont notés pour le sol L, suivi du sol R, ensuite du sol C pour tous les métaux.

Le sol C présente les pourcentages les plus faibles, en raison de son origine (forestier) : les métaux dans le sol C sont présents naturellement dans le sol, car non apportés par des activités anthropiques. Les pourcentages potentiellement disponibles sont donc assez faibles (Cr (6%), Co (9%), Ni (12%) et Cu (25%)). Cependant, le pourcentage de Pb (78%) reste assez élevé pour un sol naturel, ceci peut être expliqué par l'emplacement où a été réalisé l'échantillonnage (proximité de l'agglomération, ou du plomb issu de la chasse). Une étude de disponibilité potentielle (HCl 0,05 M) réalisée par Leleyter et al. (2012) sur deux sols de la même région montrent des pourcentages de Pb de 50% et de 20% respectivement pour un sol de jardin privé et un sol agricole. Ces valeurs restent faibles comparées aux valeurs extraites dans le sol C (78%).

Concernant les pourcentages des métaux dans les deux sols industriels de l'étude (R et L), il est observé que les pourcentages potentiellement disponibles de Cr (7%), Cu (64%) et Ni (20%) des deux sols sont similaires. Aussi, Cr et Ni présentent des teneurs totales similaires dans les sols [(Cr)<sub>L</sub> = 30 mg.kg<sup>-1</sup> et (Cr)<sub>R</sub> = 27 mg.kg<sup>-1</sup> ; (Ni)<sub>L</sub> = 14 mg.kg<sup>-1</sup> et (Ni)<sub>R</sub> = 18 mg.kg<sup>-1</sup>]. Cependant, il n'est pas possible de faire une corrélation directe entre les teneurs totales et les pourcentages. En effet, des sols qui ont les mêmes teneurs en ETM n'ont pas forcément des pourcentages identiques.

Pour ce qui est de Cu, la teneur totale dans le sol R est de 130 mg.kg<sup>-1</sup> contre seulement 36 mg.kg<sup>-1</sup> dans le sol L. Concernant les pourcentages de Cu des deux sols L et R, ils sont identiques : 65% et de 67% respectivement. Ce constat permet de confirmer l'impossibilité de lier des teneurs totales identiques de deux sols à leurs pourcentages potentiellement disponibles.

Pour le cas du Co, les teneurs totales dans les sols L et R sont égales et sont de  $7 \text{ mg.kg}^{-1}$ , cependant ils présentent des pourcentages différents extraits par HCl. Le Co est extrait à 24% dans le sol R et 34% dans le sol L. Les pourcentages de Pb et Zn sont plus élevés pour le sol L par rapport au sol R, ceci est également le cas pour les teneurs totales dans ces sols. Les pourcentages potentiellement disponibles dans les sols sont environ 20 % plus faibles dans le sol R et les teneurs totales dans les sols sont réduites de moitié entre le sol L et le sol R.

#### I.4) Distribution des éléments dans les fractions géochimiques dans les sols réels R, L et C

Les sols (C, L et R) sont soumis en plus au protocole d'extractions séquentielles dans le but de quantifier la répartition des métaux dans les fractions minéralogiques définies selon le protocole de Leleyter et Probst 1999 (chapitre 2, I-7).

La figure 14 montre la répartition des métaux (Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb et Zn) au sein des différentes fractions minéralogiques des sols C, L et R. Le détail de ces pourcentages est affiché en annexe n°5.

Comme évoqué dans le chapitre I, la fraction F4 représente la somme des 3 fractions (F4a : fraction liée aux oxydes de manganèse, F4b : fraction liée aux oxydes de fer amorphes et F4c : fraction liée aux oxydes de fer cristallins) constituant la fraction réductible. Seule la fraction F4 sera présentée dans nos résultats.

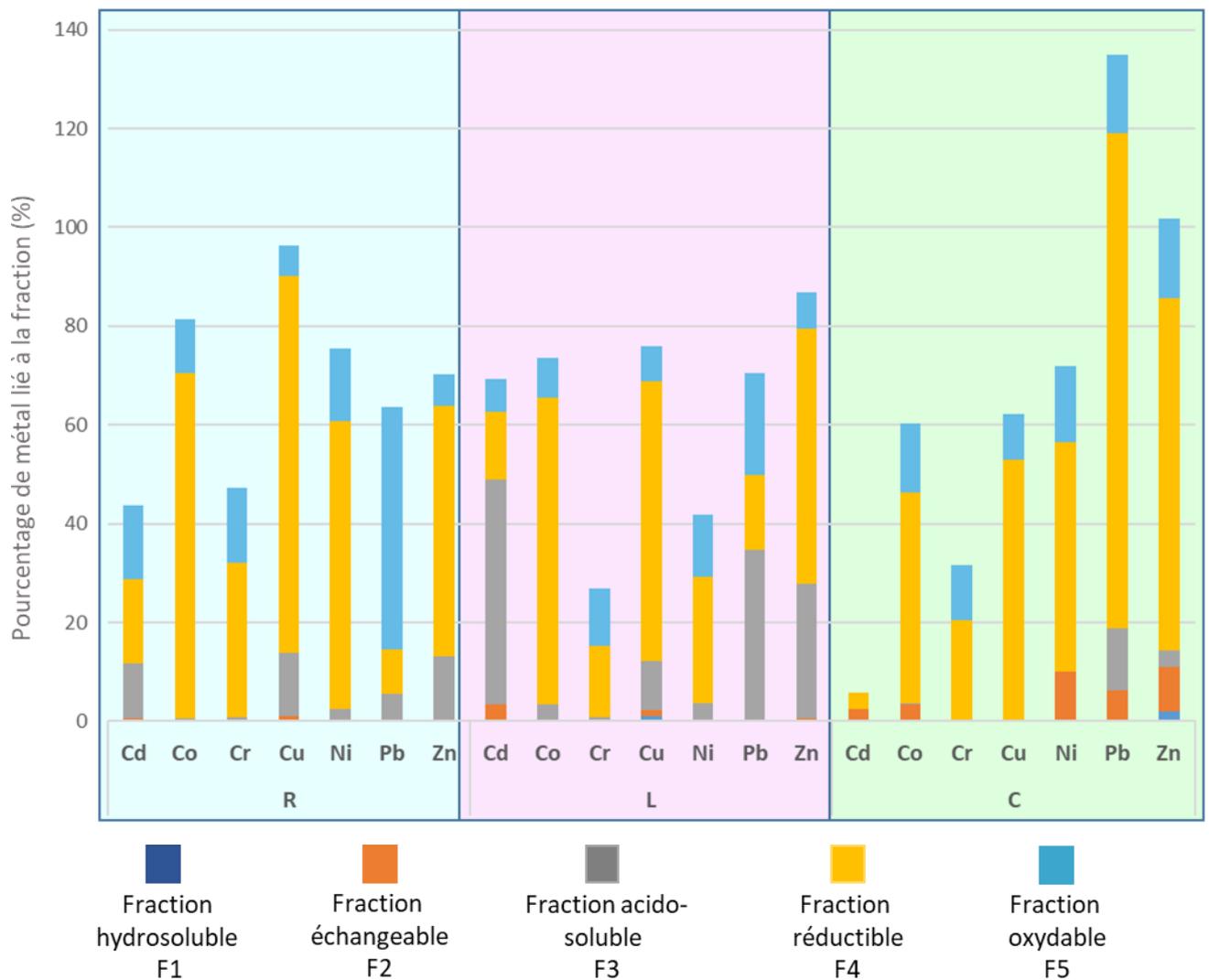


Figure 11. Répartition de Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb et Zn au sein des différentes fractions potentiellement labiles du sol R, C et L et C.

D'une manière générale, il est possible de visualiser que les sols L et R ont des répartitions à peu près similaires, cependant le sol C n'ayant pas la même origine, présente une répartition minéralogique différente, pour tous les éléments présentés quel que soit l'élément considéré.

Une exception est faite pour la répartition minéralogique de Cr : il est observé pour tous les sols (R, L et C) que Cr est plus présent dans les fractions F4 et F5. En effet, les pourcentages des trois premières fractions sont nuls. Une étude sur la répartition minéralogique de Cr par extraction BCR réalisée par Elzinga et Cirno (2010) montre que Cr est majoritairement lié à la fraction réductible et oxydable et très faiblement lié à la fraction échangeable (moins de 5%), ce qui correspond également à nos résultats. De même, l'étude de Giancoli Barreto et al. (2004) montre que Cr est lié majoritairement à la fraction oxydable (62%).

Il existe néanmoins des différences dans la répartition de certains métaux dans les deux sols industriels (R et L).

Cette différence est particulièrement marquée pour la fraction réductible, suivi de la fraction acido-soluble (Cd :  $(L)_{F3}=45\%$  et  $(R)_{F3}=11\%$  ; Pb :  $(L)_{F3}=35\%$  et  $(R)_{F3}=5\%$  ; Zn:  $(L)_{F3}=27\%$  et  $(R)_{F3}=13\%$ ) et la fraction oxydable (Cd:  $(L)_{F5}=7\%$  et  $(R)_{F5}=15\%$  ; Pb:  $(L)_{F5}=21\%$  et  $(R)_{F5}=49\%$ ).

Concernant la fraction réductible, le pourcentage de la F4 du sol R représente environ le double du sol L pour Cr [ $(L)_{F4}=15\%$  et  $(R)_{F4}=31\%$ ], Cu [ $(L)_{F4}=57\%$  et  $(R)_{F4}=77\%$ ] et Ni [ $(L)_{F4}=26\%$  et  $(R)_{F4}=58\%$ ], tandis que pour Pb, c'est plutôt l'inverse :  $(L)_{F4}=15\%$  et  $(R)_{F4}=9\%$ .

Pour ce qui est des différences notées entre les deux sols « R et L » et le sol C, la fraction acido-soluble est particulièrement présente dans la répartition minéralogique des métaux des sols R et L pour tous les éléments, contrairement au sol C, où cette fraction n'est présente que pour Pb ( $(C)_{F3}=13\%$  et  $(R)_{F3}=3\%$ ). Ceci est expliqué par l'acidité du sol. En effet le sol C a un pH de 4,4 ce qui veut dire que la fraction acido-soluble a déjà été solubilisée.

La fraction échangeable est surtout présente dans le sol C [ $(Cd)_{F2}=(Co)_{F2}=3\%$  ;  $(Ni)_{F2}=(Zn)_{F2}=10\%$  et  $(Pb)_{F2}=6\%$ ]. Le pourcentage de cette fraction est nul pour tous les métaux des sols R et L (sauf pour Cd :  $(L)_{F2}=3\%$ ,  $(R)_{F2}=1\%$  et Cu  $(L)_{F2}=(R)_{F2}=3\%$ ). Ces valeurs restent cependant négligeables.

Navas et Lindhorfer (2005) retrouvent des pourcentages négligeables pour le Zn lié à la fraction échangeable pour les sols de leur étude. Ceci est également le cas pour le sol R et le sol L avec des pourcentages nuls retrouvés pour Zn. Cependant, des auteurs (Wang 2014 ; Bellarbi et al. 2015) ont relevé des pourcentages considérables de Zn liés à la fraction échangeable en employant le protocole de Tessier pour des sols urbains pollués. D'une manière générale, pour les trois sols (L, R et C), la fraction majoritaire est la fraction réductible pour tous les métaux de l'étude, sauf pour Pb ( $(R)_{F4}=9\%$ ) où c'est plutôt la fraction oxydable qui est majoritaire ( $(R)_{F5}=49\%$ ). Pour ce qui est de la fraction oxydable, les pourcentages liés aux métaux sont compris entre 6 et 49% avec des pourcentages assez similaires pour certains éléments pour les 3 sols.

Concernant la fraction totale mobile (F6), les pourcentages les plus élevés sont notés pour : Cu et Zn (sol L) et pour Cu et Ni (sol R).

Ceci est en accord avec les résultats de Kouchou et al. (2020) qui indiquent une mobilité décroissante selon : Zn > Cu > Ni > Cr en employant le protocole proposé par Tessier et al. (1979).

**Pour le sol C**, le pourcentage de la fraction hydrosoluble (la fraction la plus mobile) est nul pour Cd, Cu, Co, Cr, Pb et Ni, ce qui veut dire que ces six éléments sont très peu lessivables à l'eau.

Les pourcentages des 3 premières fractions (F1 : hydrosoluble, F2 : échangeable, F3 : acido-soluble) sont nuls pour Cu et Cr. Ces deux éléments sont majoritairement liés à la fraction réductible F4 avec 21% et 53% pour Cr et Cu respectivement. Le Cd est très peu présent dans les 5 fractions (avec 2% et 4% pour la fraction échangeable F2 et réductible F4 respectivement). Co et Ni présentent à peu près la même répartition et sont présents majoritairement au sein de la fraction réductible avec 43 et 47 % respectivement.

Le Zn est réparti dans les 5 fractions, mais domine dans la fraction réductible (72%). Le Pb est également présent dans toutes les fractions, sauf pour F1. Son pourcentage dans les 5 fractions s'affiche à 120%. Son pourcentage extrait par HCl 1M est également très élevé (99%). Cependant, à l'inverse de nos résultats, Leleyter et al. (2012) montrent que le pourcentage de Pb extrait par HCl est souvent sous-estimé. Plusieurs pistes sont envisageables pour expliquer ces pourcentages très élevés en Pb : une mauvaise homogénéisation du sol ou une contamination. Aussi, la faible teneur totale en Pb dans le sol C ( $20 \pm \text{mg.kg}^{-1}$ ) peut induire un pourcentage d'erreur élevé par rapport aux deux autres sols (R et L qui présentent des teneurs en Pb de 650 et 1029  $\text{mg.kg}^{-1}$  respectivement).

Les résultats des extractions séquentielles sur le sol C montrent par conséquent que la fraction totale mobile F6 la plus élevée est notée pour le Pb avec un pourcentage mobile de 135%, suivi du Zn avec 102% et du Ni avec 72%. Pour les autres métaux, le classement est comme suit : Pb (135%)>Zn (102%)> Ni (73%) >Cu (62%) > Co (60%)>Cr (32%)> Cd (6%).

**Pour le sol L**, les pourcentages de la fraction hydrosoluble et échangeable sont nuls pour les sept métaux (Cd, Cu, Co, Cr, Pb, Ni et Zn). Les métaux Cd et Pb sont principalement retrouvés dans la fraction acido-soluble avec 46% pour Cd et 35% pour Pb dans F3.

Les autres métaux de l'étude (Co, Cr, Cu, Ni et Zn) sont majoritairement présents dans la fraction réductible :  $(\text{Co})_{\text{F4}} = 62\%$  ;  $(\text{Cr})_{\text{F4}} = 15\%$  ;  $(\text{Cu})_{\text{F4}} = 56\%$  ;  $(\text{Ni})_{\text{F4}} = 26\%$  ;  $(\text{Zn})_{\text{F4}} = 52\%$ .

Certains métaux présentent les mêmes pourcentages au sein de mêmes fractions, c'est le cas de Co et Ni, présents à 3% dans la F3. Cd, Cr et Pb sont présents à 14% environ dans la F4 et Cd, Co, Cu et Zn sont présents à 7% dans la fraction oxydable (F5).

Les pourcentages liés aux fractions définies par le protocole de Leleyter et Probst (1999) étant similaires pour certains éléments (Cd, Co, Cu et Pb), leur fraction totale F6 (somme des précédentes) est donc en conséquence équivalente. Un ordre décroissant est établi comme suit : Zn (87%) > Cu (76%)> Co (74%) >Pb (70%) > Cd (69%)>Ni (42%)> Cr (27%).

**Concernant le sol R**, d'une façon générale, la plus grande part de métal est retrouvée dans la fraction réductible :  $(\text{Cu})_{\text{F4}} = 77\%$  ;  $(\text{Co})_{\text{F4}} = 70\%$  ;  $(\text{Ni})_{\text{F4}} = 58\%$  ;  $(\text{Zn})_{\text{F4}} = 51\%$ .

Pour Pb, le pourcentage le plus élevé est quant à lui lié à la fraction oxydable (49%). Des résultats similaires sont retrouvés par Baraud et Leleyter (2012), qui affirment que les métaux étudiés (Cd, Cr, Mn, Ni, Fe, Zn, Pb), sont principalement associés aux fractions réductible (F4) et oxydable (F5).

Les pourcentages de métaux liés aux fractions hydrosoluble (la plus mobile) et échangeable sont nuls pour tous les métaux étudiés. Les pourcentages des deux premières fractions (F1 et F2) sont nuls pour Cu et Cr. Les mêmes résultats sont obtenus par Balasoiu et al. (2001) en employant le protocole de Tessier et al. (1979). En effet, ils affirment que Cu et Cr sont moins liés aux fractions solubles et échangeables (qui sont les plus mobiles et par conséquent les plus toxiques) et notent une distribution identique de ces deux métaux (Cu et Cr). Or pour notre sol, le pourcentage lié à la F4 est beaucoup plus élevé pour Cu (77%) que pour Cr (31%) tandis que le pourcentage lié à la F5 est plus élevé pour Cr (15%) que pour Cu (6%).

Certains métaux présentent les mêmes pourcentages liés à la fraction oxydable : 15% pour Cd, Cr et Ni et 6% pour Cu et Zn. Cu et Zn présentent la même répartition ayant également les mêmes pourcentages liés à la fraction acido-soluble (13%) et la fraction réductible liée aux oxydes de fer cristallins (14%).

La fraction totale F6 la plus élevée est notée pour Cu (97%), suivi du Co (81%) et Ni (73%), suivi de Pb, Cr et Cd selon :  $\text{Cu (97\%)} > \text{Co (81\%)} > \text{Ni (73\%)} > \text{Zn (70\%)} > \text{Pb (63\%)} > \text{Cr (47\%)} > \text{Cd (44\%)}$ .

### **Conclusion :**

En comparant la répartition des métaux au sein des différentes fractions pour les trois sols, il ne semble pas y avoir de tendance générale observée mis à part le fait que la plupart des métaux (Cr, Co, Cu, Ni et Zn) sont majoritairement liés à la fraction réductible. Des résultats similaires ont été mis en évidence par Baraud et Leleyter en 2012. Toutefois, il est observé que Cd et Cr présentent les pourcentages de fractions totales (F6) les moins élevés comparés aux autres ETM de l'étude pour les trois sols. Cependant, ils ne présentent pas le même ordre de grandeur pour les trois sols (Cr :  $(\text{C})_{\text{F6}} = 32\%$  ;  $(\text{L})_{\text{F6}} = 27\%$  ;  $(\text{R})_{\text{F6}} = 47\%$  / Cd :  $(\text{C})_{\text{F6}} = 6\%$  ;  $(\text{L})_{\text{F6}} = 69\%$  ;  $(\text{R})_{\text{F6}} = 44\%$ ).

## I.5) Comparaison des résultats de l'extraction simple (HCl) et de l'extraction séquentielle

La fraction totale potentiellement disponible F6 représente la somme des pourcentages des fractions F1, F2, F3, F4 et F5. Il est donc possible d'assimiler la fraction totale F6 à la fraction totale labile et ainsi de réaliser une comparaison entre le pourcentage labile F6 (extraction séquentielle) et le pourcentage de métaux lessivés par extraction simple (HCl) (Baraud et Leleyter 2012). Cette comparaison est présentée sur la figure 12.

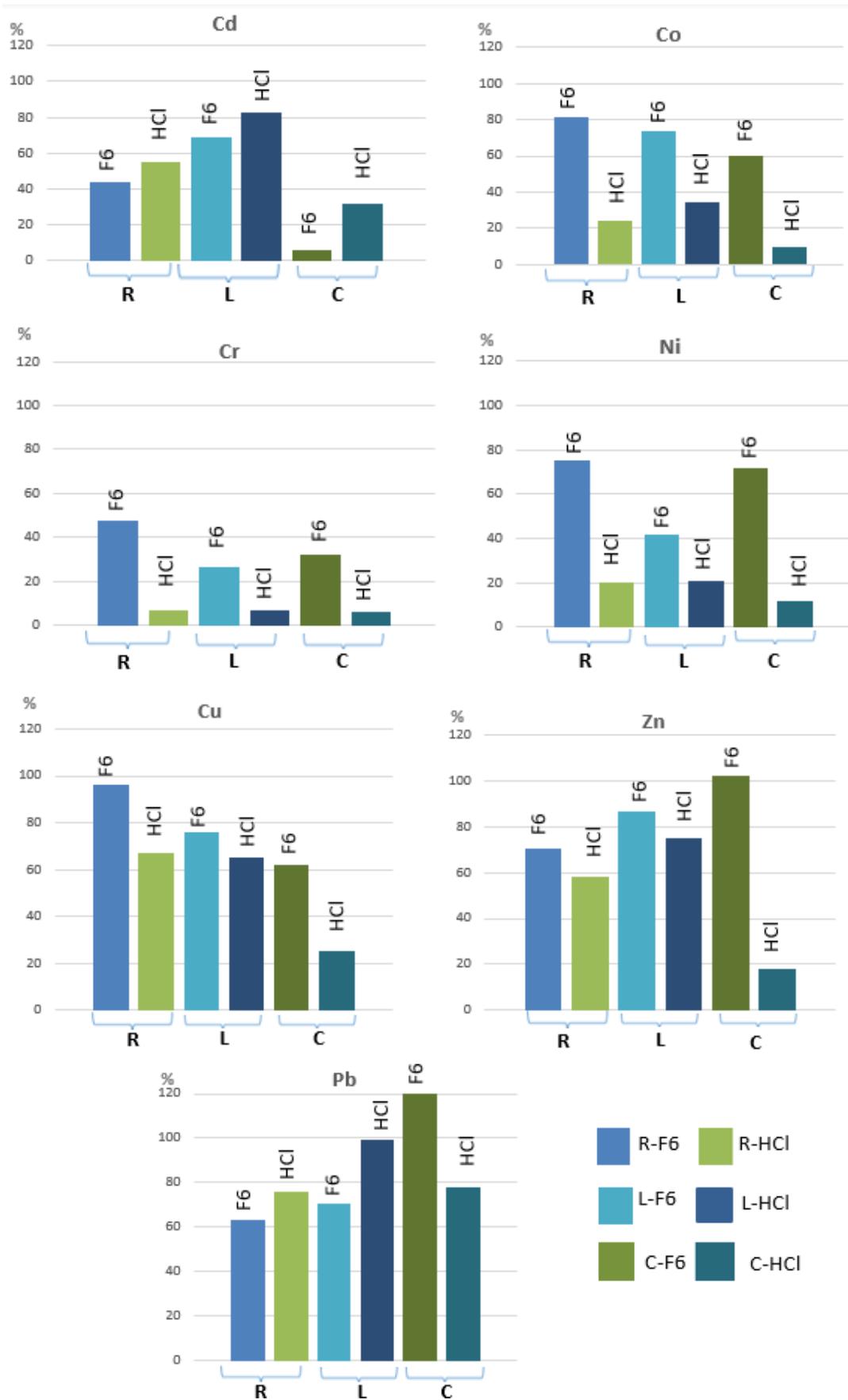


Figure 12. Pourcentages de métaux lessivés par HCl et F6 (extraction séquentielle selon Leleyter et Probst 1999).

Une disparité entre les résultats des extractions est observée que ce soit par type d'élément ou par type de sol. En effet, trois « groupes » peuvent être identifiés : des éléments qui présentent de légères variations entre les deux types d'extractions, des éléments pour lesquels la variation est très marquée et d'autres éléments pour lesquels la variation dépend du type de sol.

Pour la plupart des éléments de l'étude (Cr, Co, Cu, Ni et Zn), l'extraction séquentielle semble être plus agressive que l'extraction simple HCl, comme relevé par l'étude de Baraud et Leleyter (2012). Les extractions simples à HCl même à la concentration de 1M laissent penser à une sous-estimation de la fraction mobile potentiellement disponible. Giancoli Barreto et al. (2004) retrouvent des résultats semblables en comparant une extraction simple à HCl 0,1M à des extractions séquentielles en employant la procédure de Tessier. En effet, leur étude montre que les pourcentages de Cr, Ni et Pb extraits à HCl sont beaucoup plus faibles que ceux extraits avec le protocole d'extractions séquentielles, tandis que pour Cu, les pourcentages extraits sont équivalents.

Pour Cu et Zn, les variations entre les pourcentages extraits par HCl et par l'extraction séquentielle sont plus marquées pour le sol C, pour lequel on relève des écarts respectifs de 37 et 84%, contre 11 et 12 % (sol L) et 29 et 12% (sol R).

Pour Co et Ni, les écarts sont similaires et du même ordre pour le sol R (57 et 55% respectivement) et le sol C (50 et 60%), tandis que pour le sol L, les variations sont de 40% et 21% respectivement pour Co et Ni.

Concernant Cd, pour le sol C, le pourcentage extrait par HCl est de 32% contre 6% seulement pour F6. Pour les sols R et L, la variation est moins marquée avec 44% et 69% pour F6 et 55 et 83% pour HCl respectivement. En effet, Cd est le seul élément de l'étude pour lequel l'extraction HCl est plus agressive que l'extraction séquentielle quel que soit le type de sol (non contaminé (C) ou contaminé (L et R)).

Pour ce qui est du Pb, les variations observées entre les pourcentages extraits par l'extraction séquentielle et HCl 1M sont différentes selon la nature du sol. En effet pour les sols R et L, l'extraction simple HCl est plus agressive que l'extraction séquentielle et le contraire est noté pour le sol C. Les variations pour les sols R et L sont de 13% et 29 % respectivement. Pour ce qui est du sol C, la variation notée est de 57%. Il est à noter que des problèmes analytiques ont été notés pour l'extraction séquentielle concernant Pb (partie I.4-chapitre 3).

Par ailleurs, Cr représente le métal avec le plus grand écart entre les pourcentages extraits par HCl et par l'extraction séquentielle indépendamment du type de sol. En effet, pour tous les sols, les pourcentages en Cr extraits par HCl est de 6%. Pour ce qui est de l'extraction séquentielle : (C)<sub>F6</sub>=32% ; (L)<sub>F6</sub>=27% ; (R)<sub>F6</sub>=47%.

## I.6) Comparaison des résultats de l'extraction simple avec HCl et EDTA

Une étude complémentaire par extraction simple EDTA présentée en annexe n°6 a été réalisée sur les sols C et L et comparée à l'extraction HCl.

En accord avec plusieurs études (Madrid et al. 2007 ; Baraud et Leleyter 2012; Gzar et Gatea 2015), les résultats montrent que pour tous les métaux, excepté Cd, HCl est plus agressif qu'EDTA. D'autre part, une étude de Sahuquillo et al. (2003) montre que l'EDTA extrait Cu et Pb plus que l'acide acétique ( $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ), selon ces mêmes auteurs cela signifie que ces deux éléments sont préférentiellement mobilisables par complexation plutôt que par acidification. En effet, les constantes de complexation sont de  $\log K_{(\text{Cu})}=17,8$  et  $\log K_{(\text{Pb})}= 18,3$ . Il est aussi à noter que EDTA est un agent chélatant hexadentate, il a donc un effet complexant fort, tandis que HCl combine deux effets : l'effet acide du proton acide ( $\text{H}^+$ ) et l'effet complexant de l'ion  $\text{Cl}^-$  (Leleyter 1998).

Le classement de disponibilité potentielle évalué par EDTA est comme suit :  $\text{Cr}<\text{Co}<\text{Zn}<\text{Ni}<\text{Cu}<\text{Cd}<\text{Pb}$ .

L'EDTA extrait 2% du Cr total pour le sol C, ces résultats sont en accord avec ceux de El Ass et al. (2003) qui ont obtenu un pourcentage de 1,5% avec l'extraction simple à l'EDTA. Cr est donc très peu extrait par EDTA.

Les pourcentages extraits par EDTA de Cd et Pb sont plus élevés par rapport aux autres métaux de l'étude : Pb est extrait à 80% par EDTA pour le sol L. Sahuquillo et al. (2003) expliquent que l'EDTA tend à surestimer la disponibilité de Pb, cela est dû à la forte complexation entre Pb et EDTA (avec une constante de complexation de  $\log K=18,3$ ). Dans l'étude de Leleyter et al. (2012), les auteurs affirment que l'EDTA est l'extractant le plus adapté pour évaluer la disponibilité potentielle de Pb pour de nombreux sols et sédiments, comparé à l'extraction simple à HCl et à l'extraction séquentielle par Leleyter et Probst (1999).

Abollino et al. (2002) extraient de même par l'EDTA (0,02M) entre 63 et 97% de Pb, ce qui représente le pourcentage le plus élevé par rapport aux autres métaux de leur étude. Le classement décroissant des pourcentages de leur étude est comme suit :  $\text{Cr}<\text{Fe}<\text{Ni}<\text{Zn}<\text{Cd}<\text{Pb}$ , ce qui correspond également à nos résultats. Dans leur étude, les auteurs rapportent également que dans des sols non pollués, les pourcentages extraits de Cu et Zn par EDTA sont faibles. De même, l'étude de Kouhou el al. (2020) sur des sols agricoles montre que EDTA extrait 16% de Cu et 11% de Zn. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par le sol de C (non pollué), qui présente des pourcentages faibles pour Cu et Zn (13 et 11% respectivement).

Yutong et al. (2016) ont étudié la disponibilité potentielle d'ETM déterminée par EDTA (0,05 M) pour un sol urbain contaminé. Leurs résultats montrent que les pourcentages d'ETM extraits sont très variables et que Cu, Pb et Zn représentaient les métaux les plus disponibles, contrairement à Cr qui présentait les plus faibles pourcentage extrait par EDTA. Ceci est également observé dans nos résultats, en effet Cr représente le métal le moins potentiellement disponible avec l'extraction avec EDTA.

## II. Etude des souches fongiques identifiées dans les sols

### II.1) Présentation des souches fongiques utilisées pour les essais de bioaugmentation

Les souches fongiques étudiées au cours de la thèse sont : *Absidia cylindrospora* (AcS2000) et *Perenniporia fraxinea* (Pf2019). Il s'agit de souches fongiques appartenant à des taxons différents (tableau 14). Ces souches proviennent de la mycothèque du laboratoire Toxemac (ABTE) et ont été préalablement isolées à partir de différents sols pollués d'origine industrielle fortement contaminés en métaux et en HAP. Ceci veut dire que ces souches peuvent tolérer des teneurs élevées en métaux et représentent donc de bons candidats pour des essais de mycoremédiation (Albert 2019). Le genre *Absidia*, en particulier suscite beaucoup d'intérêt ces dernières années. En effet deux nouvelles espèces d'*Absidia* (*A. saloaensis* sp. nov. (URM 8209) et *A. multispora* sp. nov. (URM 8210)) ont été récemment isolées à partir de sols brésiliens (Rafhaella et al. 2020). De plus, deux espèces d'*Absidia* (*A. spinosa* var. *biappendiculata* et *A. cylindrospora* var. *nigra*) ont été élevées à un rang spécifique et nommées : *A. biappendiculata* comb. nov. et *A. nigra* comb. nov. respectivement (Zong et al. 2021). La figure 13 présente les photographies des mycéliums de ces deux souches fongiques. Le tableau 14 présente la taxonomie des deux souches étudiées ainsi que leurs origines.

Tableau 14. Taxonomie et origine des souches étudiées.

Espèce	Division	Ordre	Famille	Origine des isolats et données de contamination des sols
<i>Absidia cylindrospora</i>	Mucoromycota	Mucorales	<i>Cunninghamellaceae</i>	<b>sol industriel</b> HAP 2061 mg.kg <sup>-1</sup> Cd 12 mg.kg <sup>-1</sup> Cu 135 mg.kg <sup>-1</sup> Pb 999 mg.kg <sup>-1</sup>
<i>Perenniporia fraxinea</i>	Basidiomycota	Polyporales	<i>Polyporaceae</i>	<b>sol industriel</b> Cd < LD Cu 100 mg.kg <sup>-1</sup> Pb 140 mg.kg <sup>-1</sup>

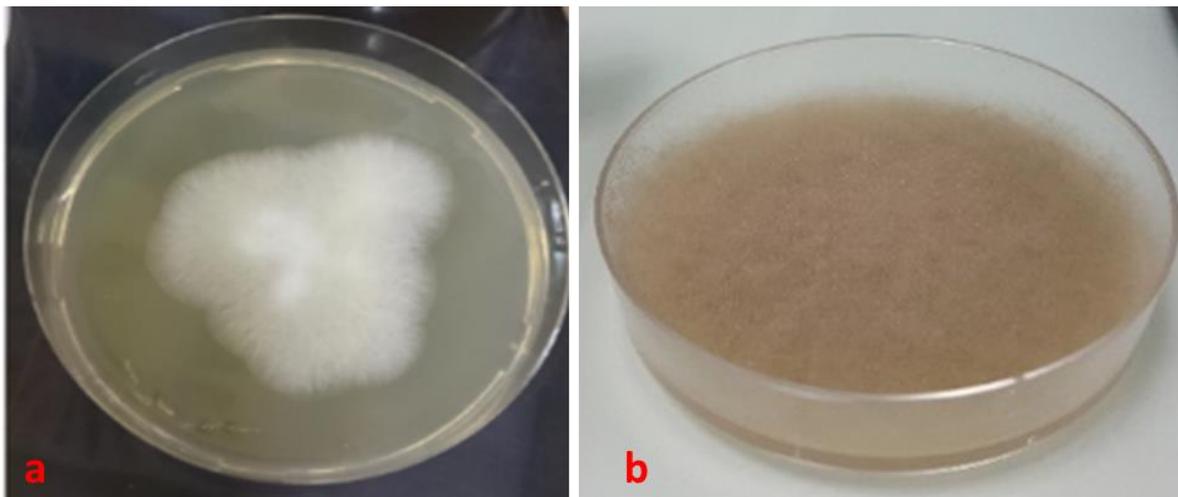


Figure 13. Photographies des mycéliums sur milieu MEA des souches fongiques étudiées. (a) : *Perenniporia fraxinea* ; (b) : *Absidia cylindrospora*.

## II.2) Caractérisation fongique des sols étudiés

La méthode d'incorporation directe (Warcup 1950) et la méthode des suspensions-dilutions ainsi que l'isolement des colonies sur milieu MEA et l'observation des isolats au microscope ont permis d'identifier les colonies fongiques qui se sont développées à partir des sols synthétiques  $S^+$  et  $S^-$  et du sol réel R.

### II.2.1) Identification des souches fongiques dans les sols synthétiques

Trois souches de champignons ont été identifiées dans le sol non contaminé ( $S^-$ ) : *Trichoderma viride*, *Umbelopsis* sp. et *Phialophora* sp. Seules les deux premières sont également retrouvées pour le sol contaminé ( $S^+$ ).

La souche fongique *Phialophora* sp. n'a pas été identifiée dans le sol synthétique après l'avoir contaminé en métaux.

La souche fongique *Umbelopsis* sp. est généralement retrouvée dans les sols. Des espèces du genre *Umbelopsis* (*Mortierella*) ont été isolées à partir de plusieurs sols de forêt en Nouvelle Zélande, en Pologne, en Australie et aux Pays-Bas (Mahoney et al. 2003 ; Meyer et Gams 2003). *Umbelopsis* sp. colonise généralement les feuilles jeunes et sensibles dans des conditions humides (Kowalik, 2013). On retrouve les mêmes conditions (humidité) dans la tourbe de sphaigne qui est l'un des composants utilisés dans la préparation du sol synthétique.

Cette espèce est également connue pour sa capacité à décomposer les débris végétaux, à dégrader les HAPs et à produire l'acide oxalique (Li et al. 2018).

La souche fongique *Phialophora* sp. est un champignon filamenteux que l'on trouve dans le monde entier, principalement dans le sol, sur les plantes et les aliments en décomposition. Elle possède la particularité de dégrader la lignine (Daniel et al. 2019). Cette souche a été décrite dans la littérature comme pathogène pour les plantes (soja) (Malvick et Impullitti 2007) et pour l'être humain (Ajello et al. 1974).

Des espèces de *Phialophora* ont été isolées à partir de racines de plantes ayant poussé sur un tériil contaminé en Pb et Zn (Zhang et al. 2013). Une espèce de *Phialophora* (*P. malorum*) est connue pour sa capacité à tolérer de fortes concentrations en Cu (Daniel et al. 2019). Bien que cette souche ait été isolée à partir de zones contaminées en métaux, elle n'a pas été identifiée dans le sol synthétique après l'avoir contaminé.

### II.2.2) Identification des souches fongiques dans le sol réel R

Dans le sol R, 8 espèces fongiques sont isolées et identifiées : un Mucoromycète et 7 Ascomycètes dont 3 espèces appartenant au genre *Aspergillus*. Cette diversité fongique peut être visualisée sur la photographie de la figure 14 qui représente des colonies fongiques ayant poussé sur milieu MEA à partir de la méthode des suspensions dilutions. En effet, comme le montre la figure 14, plusieurs souches fongiques de différentes couleurs (gris, orange, jaune, marron et blanc) et de différentes morphologies sont observées. Le nombre d'UFC par gramme de sol est de  $3.10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de sol dans le sol R.



Figure 14. Photographie des colonies fongiques isolées du sol R.

La figure 15 présente les 8 espèces fongiques identifiées dans le sol R en précisant leurs appartenances taxonomiques.

Souche fongique	Ordre	Division
- <i>Actinomucor elegans</i>	Mucorales	Mucoromycota
- <i>Aspergillus fumigatus</i>	Eurotiales	Ascomycota
- <i>Aspergillus niger</i>		
- <i>Aspergillus ustus</i>		
- <i>Gliocladium virens</i>	Hypocreales	
- <i>Paecilomyces lilacinus</i>		
- <i>Monodictys sp.</i>	Dothideales	
- <i>Cochliobolus geniculatus</i>	Pleosporales	

Figure 15. Taxonomie des souches fongiques isolées du sol R.

La souche fongique *Actinomucor elegans* est un micromycète du même ordre (Mucorales) que la souche avec laquelle sera réalisée la bioaugmentation : *Absidia cylindrospora* (chapitre 3). Cette souche est souvent retrouvée dans les sols riches en matière organique, dans les excréments mais aussi dans certains aliments fermentés d'origine asiatique, sur d'autres champignons et sur des matières végétales (Benjamin et Hesseltine 1957 ; Jong et Yuan, 1985). Elle a par exemple été isolée par à partir des racines de la plante *Abutilon theophrasti* Medi (Schulz et al. 2017).

La souche fongique *Aspergillus fumigatus* a été isolée dans de nombreuses études à partir de sols contaminés en Cd (Talukdar et al. 2020) en Pb, Cr et Zn (Gupta et al. 2018) et à partir d'air. *Aspergillus fumigatus* est ubiquitaire dans l'environnement, mais aussi un pathogène opportuniste pouvant être la cause de plusieurs infections chez les patients immunodéprimés (Garcia-Rubio et Alcazar-Fuoli 2018).

La souche fongique *Aspergillus niger* a été isolée à partir de sols pollués en métaux et étudiée pour ses propriétés biosorbantes par plusieurs auteurs. Khan et al. (2019) ont isolé *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* à partir de sols riches en Pb et en Hg provenant d'une zone industrielle. Ahmad et al. (2006) ont isolé *Aspergillus niger* à partir d'un sol recevant les déchets municipaux (avec des effluents industriels) riches en Cd, Cr et Ni. Srivastava et Thakur (2006) ont isolé la même souche à partir de sol contaminé en Cr provenant d'effluents de tannage de cuir.

*Aspergillus ustus* est un champignon filamenteux retrouvé dans les aliments, le sol et l'air intérieur. Cette souche peut être la cause de maladies infectieuses (Varga et al. 2008).

*Gliocladium virens* est un champignon saprophyte commun mycoparasitique sur une grande variété de champignons (van Tilburg et Thomas 1993). Les genres fongiques *Gliocladium* et *Trichoderma* sont connus pour leur utilisation en tant qu'agents de lutte biologique (= biofongicide en agriculture ou pour la protection de bois) (Dumroese et al. 1996 ; Verma et al. 2007).

Les espèces du genre *Monodictys* présentent une croissance assez rapide et forment des colonies de couleur verte virant vers le gris. Ces espèces sont retrouvées dans l'air, le sol, le bois, les plantes mortes et en décomposition et les plumes. Elles ne présentent pas de danger pour la santé humaine. Ces espèces ont été isolées à partir de sols chinois (Liu & Zhang 2007 ; Wu et al. 2009) et à partir de plumes de volailles retrouvées dans le sol (Anglesea et Swift 1971).

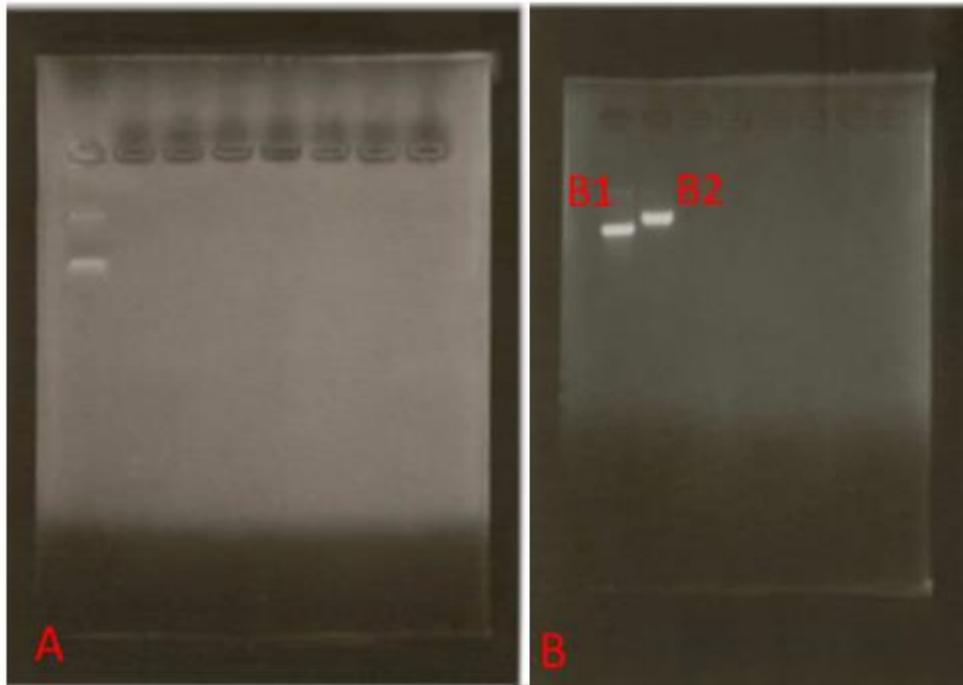
La souche fongique *Paecilomyces lilacinus* est largement utilisée pour son rôle d'agent de lutte biologique contre les nématodes qui parasitent les plantes (Mitchell et al. 1987 ; Khan et al. 2006).

La méthode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a été nécessaire pour identifier *Cochliobolus geniculatus*.

La PCR a été réalisée d'abord en utilisant les amorces ITS 1-4 (*Internal Transcribed Spacer*). Ces amorces sont les plus utilisées en matière d'identification des champignons. Elles présentent généralement une grande efficacité pour l'identification de la plupart des espèces fongiques (Schoch et al. 2012).

Sur le gel d'électrophorèse (figure 16), on visualise deux bandes. En effet, une impureté, une contamination ou encore une hybridation aspécifique des amorces pourrait produire dans le milieu réactionnel l'apparition d'une deuxième bande discrète.

Ensuite, la PCR a été réalisée en utilisant des amorces différentes :  $\beta$  tubuline ( $\beta$ t2ab) et calmoduline (CaM). Les résultats obtenus sur gel d'agarose pour ces deux amorces sont présentés sur la figure 16).



B1 : migration du produit de PCR obtenu par amplification de la beta-tubuline  
 B2 : migration du produit de PCR obtenu par amplification de la calmoduline

Figure 16. Photographie des amplicons obtenus par PCR à partir de l'ADN de la souche *Cochliobolus geniculatus* avec les amorces ITS 1-4 (A) et les amorces  $\beta$ t2ab et CaM (B).

Le séquençage de l'ADN a permis d'identifier cette souche en retrouvant des homologies de séquence comme étant *Cochliobolus geniculatus*. Il existe très peu de données dans la littérature traitant de cette souche. Manamgoda et al. (2011) ont isolé *Cochliobolus geniculatus* à partir des feuilles d'une plante appelée *Gymnema sylvestre*. C'est une plante médicinale utilisée en Asie comme traitement naturel du diabète (aidant à baisser la glycémie). Kang et al. (2018) ont isolé des espèces de *Cochliobolus* à partir de feuilles de maïs présentant une chlorose des feuilles.

### II.3) Conclusion

L'étude de la flore fongique des sols a permis d'identifier le nombre de souches présentes dans les sols de l'étude et de comparer la flore fongique de deux sols de nature différente (un sol réel (R) et un sol synthétique (S) préparé en laboratoire). Cette étude a également permis d'apprécier la diversité fongique d'un sol réel, avec 8 souches identifiées appartenant à des groupes taxonomiques différents : 5 ordres différents (Mucorales, Eurotiales, Pleosporales, Hypocreales et Dothideales) et 2 divisions différentes (*Ascomycota* et *Mucoromycota*).

La mucorale (*Actinomucor elegans*) identifiée dans le sol R, fortement chargé en Cu, Pb et Zn, pourrait être éventuellement testée pour des essais de mycoremédiation, les mucorales étant souvent employées pour des essais de bioaugmentation (Albert et al. 2019).

Concernant le sol synthétique, seulement 3 souches fongiques ont été identifiées et proviennent certainement de la tourbe employée dans la préparation du sol.

De plus, ces deux sols (S et R) présentent la particularité de ne pas contenir les deux souches fongiques (*Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea*) prévues pour les essais de bioaugmentation. Les espèces introduites en bioaugmentation seront certainement plus dominantes par rapport aux souches initialement présentes dans le sol, car elles seront apportées en plus grande quantité.

## **Chapitre 4 : Mise au point du microcosme**

Ce chapitre décrit les étapes mises en œuvre pour la mise au point du microcosme le plus adapté à notre problématique d'étude des interactions champignon-métal. Les objectifs de cette mise au point sont en premier lieu de pouvoir séparer les différents constituants du microcosme (sol dépourvu de mycélium et mycélium dépourvu de sol) et les analyser séparément en fin d'essai. De plus, il est important de pouvoir récupérer le mycélium à la fin de la période d'incubation du microcosme et de déterminer la quantité de métal réellement accumulée dans celui-ci.

La mise au point du microcosme comporte donc deux volets majeurs : un volet pratique et un volet analyse, sur lesquels reposent la sélection du type de microcosme approprié pour l'étude. Le volet pratique concerne la conception du microcosme de départ et la méthode de séparation des couches du microcosme à la fin de la durée d'incubation.

Le volet analyse concerne la possibilité d'analyser de façon efficace les teneurs en métaux dans chaque composant du microcosme, en particulier d'analyser les teneurs en métaux réellement accumulées dans le mycélium.

Ces travaux font suite aux travaux de thèse réalisés par Albert (2019), qui a testé un premier microcosme dit « en mélange » pour étudier l'influence de la souche fongique *Absidia cylindrospora* sur la labilité des métaux. Or, la conception du microcosme ne permettait pas de séparer le mycélium du sol. Le champignon restait incorporé au sol et c'est donc le sol mélangé au mycélium qui était analysé. Par conséquent, les teneurs en métaux accumulées respectivement dans le mycélium et dans le sol n'étaient pas accessibles.

L'objectif est donc d'améliorer la séparation/récupération du mycélium et du sol après la mise au contact du sol avec le champignon pour une meilleure analyse des teneurs en métaux dans ces deux matrices.

Les premiers essais développés au laboratoire ont consisté à réaliser des microcosmes dit « en mélange » contenant le broyat fongique, un milieu de culture minimum, de la sciure de bois et du sol (Albert 2019). Dans l'objectif d'isoler le mycélium, des microcosmes dit « en couches » ont ensuite été développés dans le cadre de notre étude pour permettre une meilleure séparation et récupération des différentes parties du microcosme. Pour cela, des essais ont d'abord été conçus en cristalliseur, ensuite en boîte de Petri d'un diamètre de 90 mm et d'une hauteur de 20 mm avec et sans l'usage de filtres.

La mise au point du microcosme a débuté avec l'emploi du sol C, du fait de son abondance ainsi que sa facilité de manipulation : le sol n'étant pas contaminé, sa manipulation ne nécessite pas de précautions particulières. L'optimisation du microcosme s'est poursuivie avec le sol S<sup>+</sup> pour mieux standardiser le système.

Les deux approches expérimentées au cours de la mise au point des microsomes sont la bioaugmentation et la biostimulation (détaillées en chapitre 1 -partie VI.3.1). Pour rappel (annexe n°7), les microcosmes biostimulés correspondent aux microcosmes où la flore endogène est stimulée en apportant des nutriments, tandis que les microcosmes bioaugmentés correspondent aux microcosmes dans lesquels une espèce allochtone est ajoutée (*Absidia cylindrospora* ou *Perenniporia fraxinea*).

## I. Microcosme en cristallisoir

### I.1) Réalisation du microcosme en cristallisoir

Les microcosmes sont réalisés dans des cristallisoirs (d'un diamètre de 70 mm et d'une hauteur de 40 mm) préalablement stérilisés.

Pour les microcosmes bioaugmentés (C A<sub>ac</sub> 60 et C A<sub>ac</sub> 30), la souche *Absidia cylindrospora* est mise en culture à 25°C sur milieu MEA dans des boîtes de Petri (figure 17A). Après 10 jours de culture, le mycélium est gratté avec un scalpel stérile, puis broyé à l'Ultraturrax en présence de 15 mL de milieu de Galzy et Slonimski (GS) (figure 17B). Le broyat est ensuite incorporé à 3 g de sciure (copeaux de bois de hêtre) dans un cristallisoir stérile (figure 17C). L'ensemble est incubé 3 jours à 25°C (couvert avec du film stérile) jusqu'au développement d'une couche de mycélium à la surface de la sciure (figure 17D). Une masse de 60 g (série 1 : C A<sub>ac</sub> 60) ou 30 g (série 2 : C A<sub>ac</sub> 30) de sol est alors ajoutée sur les deux couches (sciure + mycélium) et humidifiée par 30 mL (série 1) ou 15 mL (série 2) d'eau stérile. Le microcosme « en couches » est ainsi constitué (figure 17E). Les microcosmes biostimulés (CS 60 et CS 30) ne contiennent pas de souche fongique apportée, le sol est directement ajouté sur une sciure imbibée de milieu de culture GS, tandis que le microcosme témoin (CT) est constitué de sol et de sciure imbibée d'eau.

Les microcosmes sont incubés 20 jours à 25°C, puis subissent un séchage à 35°C pendant 2 jours. Les microcosmes secs sont séparés selon leur type en 2 ou 3 couches (sciure, mycélium, sol) qui sont ensuite analysées pour leurs teneurs totales en éléments métalliques.



- A) Boîte de Petri (milieu MEA) contenant le mycélium d'*Absidia cylindrospora* âgé de 10 jours.  
 B) Mycélium gratté et mis en suspension dans le milieu GS.  
 C) Suspension fongique incorporée à la sciure.  
 D) Formation d'une couche de mycélium à la surface de la sciure.  
 E) Microcosme final en 3 couches : sciure, mycélium et sol.

Figure 17. Protocole de réalisation du microcosme en cristallisoir.

Le tableau 15 présente la description des microcosmes en cristallisoirs.

Tableau 15. Tableau descriptif des microcosmes en cristallisoir.

	Nom Microcosme	sol	condition	sciure (g)	biomasse fraîche (g)	milieu GS (mL)	sol (g)	eau (mL)
série 1	CA <sub>ac</sub> 60 <sub>1</sub>	C	bioAugmentation	3	1,47	15	60	30
	CA <sub>ac</sub> 60 <sub>2</sub>	C		3	0,92			
	CA <sub>ac</sub> 60 <sub>3</sub>	C		3	1,63			
	CS 60	C	bioStimulation	3	0			
série 2	CA <sub>ac</sub> 30 <sub>1</sub>	C	bioAugmentation	3	0,83	0	30	15
	CA <sub>ac</sub> 30 <sub>2</sub>	C		3	0,83			
	CS 30	C	bioStimulation	3	0			
	CT	C	témoin	3	0			

Série 1 : 60g de sol C ; Série 2 : 30g de sol C

Sol C : CA<sub>ac</sub> 60<sub>1</sub>, CA<sub>ac</sub> 60<sub>2</sub>, CA<sub>ac</sub> 60<sub>3</sub> : sol C(60g) bioaugmenté avec *Absidia cylindrospora* ; CA<sub>ac</sub> 30<sub>1</sub>, CA<sub>ac</sub> 30<sub>2</sub> : sol C(30g) bioaugmenté avec *Absidia cylindrospora* ; CS30 : sol C(30g) sans champignon (biostimulation) ; CS60 : sol C(60g) sans champignon (biostimulation) ; CT : sol C sans champignon.

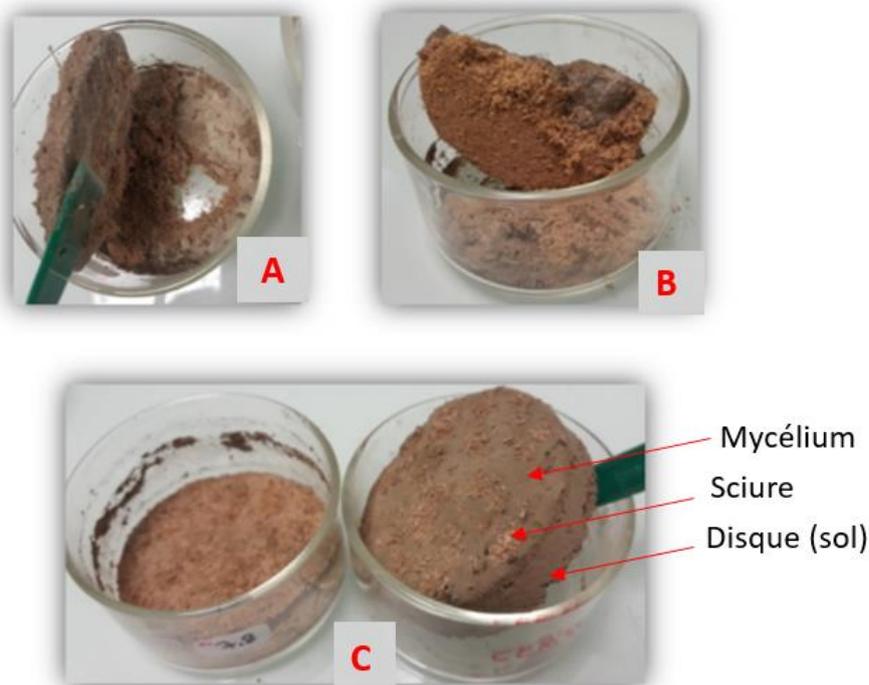
Cette partie présente les résultats de la séparation des composants des microcosmes en cristallisoir et de l'analyse des métaux dans ces composants.

## I.2) Séparation des composants du microcosme en cristallisoir

Après les 20 jours d'incubation à 25°C, les microcosmes sont mis à sécher à une température de 35°C pendant 2 jours. Les différentes couches (sciure, mycélium, sol) ont pu être dissociées, mais pas de façon parfaitement distincte.

La figure 18 représente les photographies prises lors de la séparation des couches du microcosme.

La figure 18-A montre que la couche de sol forme une sorte de disque qui, une fois le cristallisateur renversé, se détache du microcosme. Sur la figure 18-B, on peut observer que la couche de mycélium formée entre la sciure (partie inférieure du microcosme) et le sol (partie supérieure du microcosme) n'est pas apparente. En effet, la couche est tellement fine qu'après les 20 jours d'incubation, elle n'est plus réellement distinguable. Le mycélium est gratté avec une spatule pour le dissocier des deux parties. La sciure restée au fond du cristallisateur (figure 18-C) est également grattée avec une spatule pour être récupérée.



A) Sciure au fond du cristallisateur en contact direct avec le mycélium d'*Absidia cylindrospora*

B) Couche de sciure liée à la couche de sol

C) 3 couches du microcosme : sciure, mycélium et sol

Figure 18. Photographies des microcosmes en cristallisateur prises au moment de la séparation des couches.

La figure 19 présente les photographies des mycéliums issus des trois essais de bioaugmentation (CAac<sub>(1,2,3)</sub>). Il est bien visible que les mycéliums sont emmêlés aux copeaux de sciure et quelques grains de sol y sont adsorbés. Il n'est donc pas possible d'isoler le mycélium du sol et de la sciure. Le mycélium d'*Absidia cylindrospora* obtenu reste en effet intimement mélangé à de la sciure et du sol. L'analyse des teneurs en éléments métalliques dans le mycélium n'est donc pas fiable, car c'est le mélange mycélium + sciure + grains de sol qui sera analysé, malgré le fait que les trois composants ont été dissociés du microcosme et récupérés séparément.



*CAac 60<sub>1</sub>, CA ac 60<sub>2</sub>, CA ac 60<sub>3</sub>: microcosme bioaugmenté avec Absidia cylindrospora*

*Figure 19. Photographies des mycéliums à la fin de l'essai issus des microcosmes en cristallisoir.*

### I.3) Analyse des métaux dans les composants des microcosmes en cristallisoir

Bien que la séparation des composants du microcosme (le sol, la sciure et le mycélium) ne soit pas efficace (adaptée), les trois couches sont tout de même analysées afin de pouvoir avancer sur d'autres paramètres (la taille du microcosme, la masse de sol à ajouter, la durée d'incubation du microcosme). L'objectif est de voir s'il y a une variation des concentrations en métaux après les 20 jours d'incubation dans les différentes couches du microcosme entre les microcosmes biostimulés et bioaugmentés, bien que le sol C soit peu chargé en métaux (sol non contaminé). Les différents composants sont minéralisés et dosés pour leurs teneurs totales en éléments métalliques. Les teneurs en métaux dans la sciure brute (sans aucun traitement) sont présentés dans le tableau 16. En rappel, les teneurs en métaux dans les deux sols C sans traitement sont également présentés dans ce même tableau.

*Tableau 16. Teneurs totales (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn) dans les sols C et la sciure employée pour les microcosmes en cristallisoir.*

Teneur en mg.kg <sup>-1</sup>	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
<b>Sol C</b>	1,1 ± 0,1	2,7 ± 0,5	14 ± 3	6 ± 1	6,1 ± 0,4	20 ± 1	21 ± 2
<b>Sciure non traitée</b>	<LD= 1,04	<LD= 1,65	<LD= 1,30	1,05±0,14	<LQ=1,90	<LD=2,88	<LD=0,52

*Sciure non traitée : sciure brute avant son introduction en microcosme de sol.*

*Sol C : sol C sans traitement avant son introduction en microcosme de sol.*

Les éléments présentés sont Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb et Zn. Les résultats des teneurs en métaux dans le sol et la sciure des microcosmes sont affichés dans le tableau 17. La dernière ligne de ce tableau présente les valeurs de limites de détection.

Tableau 17. Teneurs totales de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn dans le sol et la sciure des microcosmes en cristalliseur.

		Concentrations en mg.kg <sup>-1</sup>														
		Cd		Co		Cr		Cu		Ni		Pb		Zn		
		sol	sciure	sol	sciure	sol	sciure	sol	sciure	sol	sciure	sol	sciure	sol	sciure	
Sol C	Sol Initial C	1±0	<LD	3±1	<LD	14 ± 3	<LD	6±1		6±1	<LD	20 ±1	<LD	21±2	<LD	
	BS	CS 30	1±0	<LD	2±1	1±0	19±4	10±2	10±5	4±0	8±2	4±1	20±1	10±1	24±1	15±1
		CS 60	1±0	<LD	3±1	1±0	15±2	6±1	8±4	2±0	6±2	1±0	20±1	3±1	26±4	14±1
	témoïn	CT	1±0	<LD	2±1	<LD	16±4	4±0	8±2	4±0	9±3	3±1	21±1	8±1	28±2	14±1
	BA <sub>ac</sub>	CA <sub>ac</sub> 60*	1±0	<LD	2±1	<LD	19±1	2±1	9±2	2±1	7±1	<LD	20±1	<LD	24±1	10±1
		CA <sub>ac</sub> 30**	1±0	<LD	3±1	<LD	16±1	<LD	6±0	<LD	8±1	<LD	23±3	<LD	24±2	14±2
LD		0,02		0,17		0,05		0,07		0,12		0,35		0,05		

*Sol C : CA<sub>ac</sub> 60<sub>1</sub>, CA<sub>ac</sub> 60<sub>2</sub>, CA<sub>ac</sub> 60<sub>3</sub>: sol C(60g) bioaugmenté avec Absidia cylindrospora ;*

*CA<sub>ac</sub> 30<sub>1</sub>, CA<sub>ac</sub> 30<sub>2</sub> : sol C (30g) bioaugmenté avec Absidia cylindrospora ;*

*CS30 : sol C(30g) sans champignon (biostimulation) ;*

*CS60 : sol C(60g) sans champignon (biostimulation) ;*

*CT : sol C sans champignon.*

*BA<sub>ac</sub> : bioaugmentation avec Absidia cylindrospora ; BS : biostimulation.*

*LD= limite de détection*

*\*La moyenne de CA<sub>ac</sub> 60 est réalisée à partir de 3 exemplaires*

*\*\*La moyenne CA<sub>ac</sub> 30 est réalisée à partir de 2 exemplaires*

D'après les résultats affichés en tableau 17, les concentrations en ETM dans les sols ne semblent pas varier entre les sols biostimulés et les sols bioaugmentés c'est-à-dire au contact du champignon. Aussi en comparant ces valeurs aux concentrations dans le sol C (initial sans aucun traitement), il n'y a pas de variation notée. D'après ces données, il est possible de dire qu'il n'y a pas réellement d'impact des traitements (biostimulation et/ou bioaugmentation) en microcosmes de sol sur les teneurs totales en ETM dans les conditions de l'étude.

Pour ce qui est de la sciure dans les microcosmes, il est visible qu'un léger transfert d'ETM a eu lieu à partir du sol. Pour Cr, Cu, Pb, Ni et Zn, les teneurs dans la sciure brute sont faibles ou inférieures à la LD, alors que dans les sciures des microcosmes, les teneurs sont plus élevées par rapport à la sciure brute. Les teneurs en ETM proviennent forcément d'un enrichissement via le sol au contact de la sciure durant la durée d'incubation du microcosme.

Tandis que pour Cd et Co, il n'y a pas eu de transfert en ETM noté entre les composants du microcosme. Leurs teneurs sont inférieures à la LD dans la sciure brute, ainsi que dans les sciures des microcosmes. Ceci peut être expliqué par la faible charge du sol C en Cd ( $[Cd]_C=1 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) et en Co ( $[Co]_C= 2,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). On remarque également que les teneurs en ETM dans les sciures des microcosmes bioaugmentés sont inférieures à celles des microcosmes biostimulés, il y a donc un transfert plus faible d'ETM pour les microcosmes dans lesquels le mycélium s'interpose entre le sol et la sciure. Ceci laisse penser que le mycélium agit comme un filtre biologique (Damodaran et al. 2014).

Cette première étude montre par ailleurs que la bioaugmentation avec *Absidia cylindrospora* d'un sol de forêt sur une durée de 20 jours n'a pas été suffisante pour influencer les teneurs en métaux dans les sols.

Le tableau 18 présente les masses en poids sec de mycéliums récupérés à partir des microcosmes bioaugmentés avec la souche fongique *Absidia cylindrospora*, à la fin de l'essai (20 jours d'incubation).

Tableau 18. Masses (en poids sec) de mycéliums obtenus à partir des microcosmes en cristallisoirs à la fin de l'essai.

	CA ac <sub>1</sub>	CA ac <sub>2</sub>	CA ac <sub>3</sub>	Masse moyenne
masse en mg	164	112	78	118± 43

Les résultats du tableau 18 montrent que les masses de mycélium récupérés à la fin de l'essai sur des triplicats de microcosmes sont assez variables, d'autant plus que visuellement les mycéliums obtenus n'ont pas le même aspect (figure 19), ce qui est lié à difficulté de la récupération du mycélium à la fin de la durée d'incubation.

Malgré cette non-représentativité, les teneurs en métaux accumulés au sein des mycéliums de chaque microcosme de sol C bioaugmenté avec *Absidia cylindrospora* ont été tout de même analysées et les résultats d'analyse sont présentés dans le tableau 19.

Tableau 19. Teneurs totales en ETM dans les mycéliums issus des microcosmes en cristallisoir.

		Mycélium <i>Absidia cylindrospora</i>			
Cd	(mg.kg <sup>-1</sup> )	7	1	1	3 ± 3
	(mg)	1,1.10 <sup>-3</sup>	1.10 <sup>-4</sup>	5.10 <sup>-5</sup>	4.10 <sup>-4</sup> ± 6.10 <sup>-4</sup>
Co	(mg.kg <sup>-1</sup> )	4	2	1	2,3 ± 1,5
	(mg)	7.10 <sup>-4</sup>	2.10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	3,3.10 <sup>-4</sup> ± 3.10 <sup>-4</sup>
Cr	(mg.kg <sup>-1</sup> )	25	12	9	15±8
	(mg)	4,1.10 <sup>-3</sup>	1,3.10 <sup>-3</sup>	7.10 <sup>-4</sup>	2,03.10 <sup>-3</sup> ± 2.10 <sup>-3</sup>
Cu	(mg.kg <sup>-1</sup> )	22	6	1	10±10
	(mg)	3,6.10 <sup>-3</sup>	6,5.10 <sup>-4</sup>	5.10 <sup>-5</sup>	1,4.10 <sup>-3</sup> ± 2.10 <sup>-3</sup>
Ni	(mg.kg <sup>-1</sup> )	11	4	5,8	7 ± 3
	(mg)	1,85.10 <sup>-3</sup>	4,5.10 <sup>-4</sup>	4,5.10 <sup>-4</sup>	9,1.10 <sup>-4</sup> ± 8.10 <sup>-4</sup>
Pb	(mg.kg <sup>-1</sup> )	287	12	6	101 ± 160
	(mg)	0,05	1.10 <sup>-3</sup>	4,5.10 <sup>-4</sup>	1,7.10 <sup>-2</sup> ± 2,8.10 <sup>-2</sup>
Zn	(mg.kg <sup>-1</sup> )	376	25	25	142 ± 202
	(mg)	0,06	2,8.10 <sup>-3</sup>	4,5.10 <sup>-4</sup>	3,1.10 <sup>-2</sup> ± 4.10 <sup>-2</sup>

CA ac 60<sub>1</sub>, CA ac 60<sub>2</sub>, CA ac 60<sub>3</sub> : microcosmes avec 60g de sol C bioaugmentés avec *Absidia cylindrospora*

Les quantités accumulées dans les mycéliums sont très faibles, elles sont de l'ordre de 10<sup>-4</sup> mg. Ceci peut être lié à trois phénomènes :

- le fait que le sol C soit initialement peu chargé en métaux (si le sol de départ est peu chargé en métaux, la biosorption de métaux sera moins importante),
- la faible biomasse récupérée à la fin de chaque essai,
- la durée d'incubation (20 jours) qui paraît faible pour la biosorption de métaux à partir d'un sol. Toutefois, une étude de mycoremédiation en microcosme de sol pour traiter Cr a duré au maximum 15 jours (avec des prélèvements à 3, 7 et 15 jours) et a donné des taux d'élimination du Cr de 50% à 80% environ entre le jour 3 et le jour 15 (Srivastava et al. 2006).

Les essais ne sont pas répétables au vu des quantités de métal analysées dans les répliques des microcosmes CA ac 60<sub>1</sub>, CA ac 60<sub>2</sub>, CA ac 60<sub>3</sub> qui sont différentes. En effet, les mycéliums récupérés à la fin de l'essai sont soit mélangés à de la sciure ou à du sol. Les concentrations de métaux accumulés dans le mycélium ne sont donc pas représentatifs de la quantité réellement accumulée par le mycélium, d'où les écart types très élevés.

Néanmoins, en termes de quantité, il est possible d'observer que les métaux s'accumulent dans le mycélium, en particulier Pb et Zn avec des teneurs de l'ordre de  $10^{-2}$  mg avec respectivement  $1,7 \cdot 10^{-2}$  mg et  $3,1 \cdot 10^{-2}$  mg. Le Cr et Cu présentent des teneurs de  $2,0 \cdot 10^{-3}$  mg et  $1,4 \cdot 10^{-3}$  mg respectivement. Les métaux les moins accumulés sont Cd ( $4,2 \cdot 10^{-4}$  mg), Co ( $3,3 \cdot 10^{-4}$  mg) et Ni ( $9,1 \cdot 10^{-4}$  mg).

#### I.4) Limites du microcosme

La séparation des trois couches (sciure, mycélium, sol) n'est pas réalisée avec succès, le mycélium obtenu restant intimement mélangé à la sciure et au sol (visible en figure 19).

Les résultats (masses et concentrations) ne sont pas attribuables aux mycéliums seuls (mais à un mélange : mycélium + sol + sciure), ils ne sont donc pas fiables, ce qui se traduit par un manque de reproductibilité.

Ceci est confirmé par la variabilité des masses de mycéliums récupérés entre chaque microcosme à la fin de la durée d'incubation, mais aussi par les teneurs en ETM accumulées montrant des valeurs d'écart types très élevées. Ce type de microcosme n'est donc pas adapté à nos objectifs : une mise au point de ce microcosme est nécessaire.

## II. Microcosme en boîte de Petri avec filtre

### II.1) Réalisation du microcosme en boîte de Petri avec filtre

Ces microcosmes sont conçus dans les boîtes de Petri (hauteur : 20 mm, diamètre : 90 mm) en déposant directement sur gélose (milieu MEA) un filtre en microfibre de verre d'un diamètre de 70 mm (Whatman). A l'aide d'une micropipette, un volume de 500  $\mu$ L de milieu ou de suspension fongique ou d'eau est ajouté sur le filtre selon les conditions présentées dans le tableau 20. Deux types de microcosmes ont été réalisés : (i) des microcosmes ne contenant que le champignon, soit *Absidia cylindrospora* soit *Perenniporia fraxinea* sans ajout de sol ; (ii) des microcosmes contenant la souche fongique et le sol C. Chaque microcosme est réalisé en 2 réplicats.

Les suspensions fongiques sont préparées selon la méthode suivante : 8 mL de milieu à l'extrait de malt liquide ( $15 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) stérilisé est ajouté au contenu d'une boîte de Petri de chaque souche.

Une boîte âgée de 14 jours pour *Perenniporia fraxinea* et une boîte âgée de 7 jours pour *Absidia cylindrospora* sont utilisées. Le mycélium gratté mis en suspension dans le milieu MEA liquide

a subi un broyage à l'Ultraturrax. Les boîtes de Petri sont incubées pour une durée de 20 jours dans une étuve à 25°C, avec du parafilm sur les bords des boîtes pour éviter les contaminations.

Tableau 20. Conditions de préparation des microcosmes avec filtres.

Condition	Désignation essai	Substrat ajouté	Sol C
<b>Bioaugmentation</b> <i>Absidia cylindrospora</i>	TA <sub>ac</sub>	500µL de suspension <i>Absidia cylindrospora</i>	-
	CA <sub>ac</sub>	500µL de suspension <i>Absidia cylindrospora</i>	+
<b>Bioaugmentation</b> <i>Perenniporia fraxinea</i>	T <sub>pf</sub>	500µL de suspension <i>Perenniporia fraxinea</i>	-
	CA <sub>pf</sub>	500µL de suspension <i>Perenniporia fraxinea</i>	+
<b>Biostimulation</b>	CS	500µL de milieu MEL liquide	+
Témoin	TC	500µL d'eau stérile	+
	T <sub>m</sub>	500µL de milieu MEL liquide	-

T : témoin sans sol ; C : ajout de sol C ; A : bioaugmentation ; S : biostimulation

(+) : ajout de sol ; (-) : pas d'ajout de sol

TA<sub>ac</sub>: microcosme en boîte de Petri avec filtres bioaugmenté avec *Absidia cylindrospora* sans sol.

CA<sub>ac</sub>: microcosme en boîte de Petri avec filtres bioaugmenté avec *Absidia cylindrospora* avec sol C.

TA<sub>pf</sub> microcosme en boîte de Petri avec filtres bioaugmenté avec *Perenniporia fraxinea* sans sol.

CA<sub>pf</sub> microcosme en boîte de Petri avec filtres bioaugmenté avec *Perenniporia fraxinea* avec sol C.

CS : microcosme en boîte de Petri avec filtres biostimulé avec sol C.

TC : microcosme en boîte de Petri avec filtres témoin avec sol C.

T<sub>m</sub> : microcosme en boîte de Petri avec filtres témoin sans sol.

Les résultats de cette partie présentent : la méthode de séparation des couches du microcosme en boîte de Petri avec filtre, puis l'analyse des métaux dans les différents composants du microcosme.

## II.2) Séparation des composants du microcosme en boîte de Petri avec filtre

Pour les microcosmes en boîte de Petri avec filtres (microcosmes préparés avec le sol C), les parties à séparer sont le sol et le filtre, puisque le mycélium pousse directement sur le filtre.

Les photographies sur la figure 20 représentent les filtres sur lesquels ont poussé *Absidia cylindrospora* (figure 20-A) et *Perenniporia fraxinea* (figure 20-B) en l'absence de sol.

Le sol déposé au-dessus du filtre est retiré à l'aide d'une spatule, le filtre est décollé de la gélose à l'aide d'une pince stérile à usage unique.

Les filtres (sur lesquels des grains de sols restent étroitement liés au mycélium sur le filtre rendant difficile la séparation des matrices sol/mycélium) ainsi que les sols ont été séchés à

25°C séparément pendant 6 jours avant d'être minéralisés selon le protocole présenté en chapitre II partie I.4. La gélose restée au fond de la boîte de Petri est raclée et congelée avant minéralisation selon le même protocole.

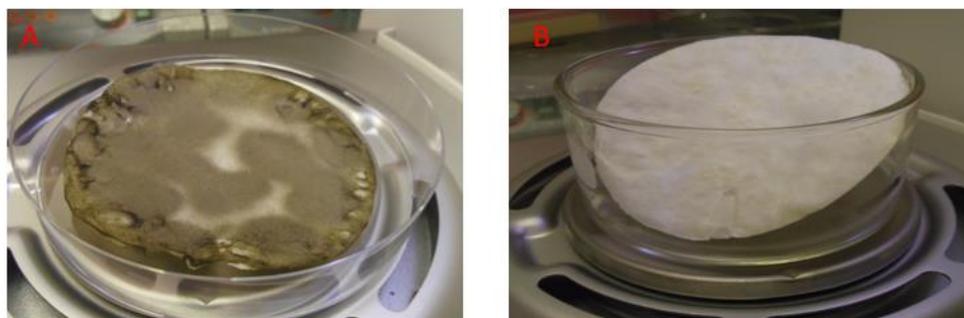


Figure 20. Photographies des filtres avec : *Absidia cylindrospora* (A) et *Perenniporia fraxinea* (B).

### II.3) Analyse des métaux dans les composants des microcosmes en boîte de Petri avec filtre

Les composants du microcosme à analyser sont les filtres, les géloses et les sols. Les filtres minéralisés sont les filtres sur lesquels les suspensions fongiques sont déposées et donc sur lesquels les mycéliums ont poussé. Les teneurs en métaux dans des filtres et la gélose bruts non traités et dans le sol C sans traitement sont présentées dans le tableau 21.

Tableau 21. Teneurs totales de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn dans le sol C, le filtre et la gélose sans traitement.

Teneurs en mg.kg <sup>-1</sup>	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
<b>Sol C</b>	1,1± 0,1	2,7 ± 0,5	14 ± 3	6± 1	6,1 ± 0,4	20 ± 1	21 ± 2
<b>Filtre neutre</b>	<LQ	0,2 ± 0,0	5± 1	0,8 ± 0,2	<LQ	<LQ	27151± 1997
<b>Gélose MEA non traitée</b>	<LQ	<LQ	<LQ	0,24± 0,02	<LQ	<LQ	36±3

*Sol C* : sol C sans traitement avant son introduction en microcosme de sol.

*Filtre neutre* : filtre brut avant son introduction en microcosme de sol.

*Gélose MEA non traitée* : gélose brute avant son introduction en microcosme de sol.

Les teneurs en métaux (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb) dans les composants du microcosme sont affichées sur le tableau 22. Les concentrations en Zn ne sont pas présentées pour cette partie.

Tableau 22. Concentrations totales de Cd, Co, Cr, Cu, Ni et Pb dans les sols et les filtres des microcosmes avec filtres en mg.kg<sup>-1</sup>.

	type	microcosme	Cd		Co		Cr		Cu		Ni		Pb	
			sol	filtre	sol	filtre	sol	filtre	sol	filtre	sol	filtre	sol	filtre
		Filtre neutre et sol C	1±0	<LQ	3±1	0,2 ± 0,0	14±3	5±1	6±1	0,8 ± 0,2	6,1 ± 0,4	<LQ	20 ± 1	<LQ
Sans le sol	Témoin	<b>T<sub>m</sub></b>	(-)	<LQ	(-)	3±1	(-)	16±1	(-)	1±0	(-)	<LQ	(-)	<LQ
	A.c	<b>TA<sub>ac1</sub></b>				4±1		15±6		2±1		<LQ		
		<b>TA<sub>ac2</sub></b>				3±0		18±4		2±0		<LQ		
	P.f	<b>TA<sub>pf1</sub></b>				<LQ		2±1		2±0		<LQ		
		<b>TA<sub>pf2</sub></b>				<LQ		2±1		2±1		<LQ		
Avec le sol	Témoin	<b>CS</b>	1±0	<LQ	2±1	3±0	15±1	18±1	5±0	2±1	7±1	4±1	16±1	4±2
		<b>T C</b>	1±0	<LQ	2±1	3±0	14±1	18±2	5±0	2±1	6±1	3±1	16±1	3±1
	A.c	<b>CA<sub>ac1</sub></b>	1±0	3±0	3±1	2±0	17±6	9±2	5±1	4±0	6±1	4±1	21±1	18±1
		<b>CA<sub>ac2</sub></b>	1±0	1±0	3±1	2±0	15±4	13±2	5±0	3±1	6±1	3±1	22±2	5±1
	P.f	<b>CA<sub>pf</sub></b>	1±0	<LQ	3±1	2±0	15±1	15±2	6±0	2±1	7±1	3±1	19±0	<LQ

Concentration de (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb)<sub>géluse</sub> <LD => non affichée sur le tableau.

**T C** : microcosme témoin avec sol+filtre imbibé d'eau sans bioaugmentation ni biostimulation

**TA<sub>ac1</sub>**, **TA<sub>ac2</sub>** : microcosme *Absidia cylindrospora* sans le sol ;

**TA<sub>pf1</sub>**, **TA<sub>pf2</sub>** : microcosme *Perenniporia fraxinea* sans le sol

**T<sub>m</sub>** : microcosme sans champignon et sans sol

**CA<sub>ac1</sub>**, **CA<sub>ac2</sub>** : microcosme *Absidia cylindrospora* avec le sol ;

**CA<sub>pf</sub>** : microcosme *Perenniporia fraxinea* avec le sol

**CS** : microcosme biostimulé avec le sol

(-) : non présent

D'après les résultats du tableau 22, les teneurs en métaux (Cd, Co, Cr, Cu, Ni et Pb) ne semblent pas varier entre les sols des microcosmes bioaugmentés, biostimulés et le sol initial C. Cela veut dire que la bioaugmentation n'a pas d'effet sur les teneurs totales en métaux dans les sols des microcosmes dans les conditions de l'étude.

La teneur initiale dans les filtres est déterminée : on relève 0,2 ; 0,8 et 5 mg.kg<sup>-1</sup> respectivement pour Co, Cu et Cr. Les teneurs des autres métaux (Cd, Ni et Pb) dans les filtres sont inférieures à la limite de détection.

Dans les filtres des microcosmes sans ajout de sol, après essai, Co, Cu et Cr présentent toujours des teneurs supérieures à la limite de détection et confirment leur présence initiale. Cependant ces valeurs sont supérieures à celles retrouvées dans les filtres avant essai. Ceci suggère que les mycéliums ayant poussé sur les filtres ont biosorbé les métaux présents dans la gélose.

Pour les microcosmes avec emploi de sols, on relève des teneurs similaires pour Cd, Co, Cu, Ni et Pb, c'est-à-dire entre 2 et 4 mg.kg<sup>-1</sup>, sauf pour Cr. En effet, les teneurs notées en Cr dans les filtres sont aux alentours de 15 mg.kg<sup>-1</sup>. Nos résultats montrent qu'il n'y a finalement pas de différence observée entre les teneurs en métal dans les filtres des microcosmes témoins et des microcosmes bioaugmentés. Ce type de microcosme ne donne finalement pas plus d'indication ni sur l'efficacité de chaque souche fongique (*Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea*) à biosorber des métaux, ni sur la manière dont les souches fongiques accumulent les métaux.

#### II.4) Limites du microcosme

La limite de ce type de microcosme réside non seulement dans son élaboration, mais aussi dans la méthode de séparation. En effet, le mycélium n'est pas récupéré seul en fin d'essai, mais avec le filtre sur lequel il a poussé. Ce qui veut dire que les teneurs totales en métaux dans les filtres ne donnent pas accès à la concentration en métaux réellement absorbée par le champignon car c'est une partie du filtre qui est minéralisé et non le champignon directement, ce qui représente une première limite pour la technique et qui donne des valeurs très variables. Ceci peut être néanmoins résolu par la minéralisation d'un filtre neutre sans aucun traitement et soustraire les teneurs de métal contenues dans ce dernier. Cependant, les filtres récupérés à la fin de la période d'incubation contiennent en plus du mycélium des particules de sol adsorbées, ce dernier ayant été ajouté sur la surface du filtre contenant le mycélium. Ceci est en faveur d'un enrichissement en métaux des filtres à partir des métaux contenus dans les sols et suggère que la quantité de métal retrouvée dans la matrice « filtre + mycélium » peut potentiellement provenir des

particules de sol adsorbées sur le filtre. Cet essai nous confirme qu'il faut mettre au point un microcosme évitant l'usage de support du mycélium.

L'idée est donc de supprimer l'usage de filtre et d'essayer de récupérer directement le mycélium. En effet, ce type de microcosme n'apporte finalement pas plus d'informations quant à la biosorption de métaux par *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea*, car aucune variation n'a été observée entre les microsomes contenant des sols et les microsomes sans ajout de sol.

### III. Microcosme en boîte de Petri sans filtre

#### III.1) Réalisation du microcosme

Des microcosmes en boîte de Petri, mais cette fois-ci sans filtre, sont réalisés avec les sols  $S^+$  et  $S^-$ . Réaliser ce type de microcosme avec un sol synthétique et artificiellement contaminé est une étape primordiale qui a permis de finaliser la mise au point du microcosme en réalisant un bilan de matière.

L'emploi de la souche *Absidia cylindrospora* en bioaugmentation semble adapté à notre étude, car elle combine deux avantages majeurs. L'essai en microcosme en cristalliseur a montré que la souche A.c (champignon filamenteux) a tendance à pousser en surface en formant une sorte de couche sur la gélose. Sa pousse est donc particulièrement adaptée à cet essai. De plus, cette souche a montré son efficacité à tolérer et biosorber des teneurs en métal élevées (1000 mg.L<sup>-1</sup> de Cd, 50 mg.L<sup>-1</sup> de Cu et 100 mg.L<sup>-1</sup> de Pb) (Albert 2019).

Les microcosmes sont réalisés en trois répliqués avec le sol artificiel contaminé ( $S^+$ ) et non contaminé ( $S^-$ ).

Les microcosmes bioaugmentés correspondent aux microcosmes  $S^+A_{ac}$  et  $S^-A_{ac}$  et le microcosme biostimulé correspond au microcosme  $S^+S$ .

Les trois conditions testées se présentent comme suit :

- (i) biostimulation avec un sol contaminé ( $S^+S$ )
- (ii) bioaugmentation avec le sol non contaminé ( $S^-A_{ac}$ )
- (iii) bioaugmentation avec un sol contaminé ( $S^+A_{ac}$ ).

La bioaugmentation est réalisée en mettant en culture *Absidia cylindrospora* sur milieu MEA.

Les microcosmes sont préparés dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre.

La base du microcosme est remplie avec 20 ml de milieu MEA, puis la souche fongique *Absidia cylindrospora* est réactivée sur la gélose refroidie. Après 10 jours de croissance à +25°C, une

masse de 20 g de sol est ajoutée à la surface du mycélium qui forme un tapis. Les microcosmes sont incubés pendant 30 jours à +25°C. Le microcosme final est présenté en figure 21.



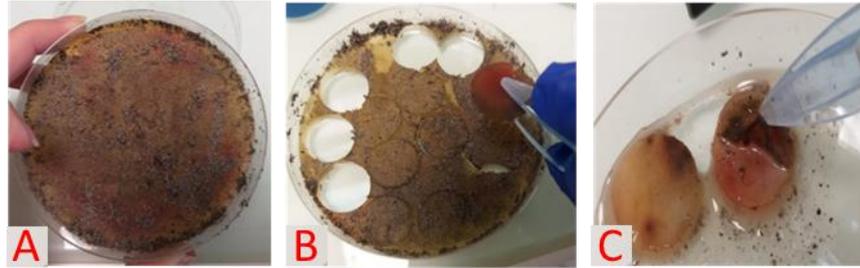
Figure 21. Conception du microcosme en boîte de Petri sans filtres.

### III.2) Séparation des composants du microcosme en boîte de Petri avec le sol synthétique

Après les 30 jours d'incubation à 25°C, les microcosmes n'ont pas subi d'étape de séchage et cela afin de pouvoir conserver la gélose majoritairement composée d'eau. Pour récupérer les différentes composantes du microcosme, des carottages sont réalisés à l'aide d'un emporte-pièce. Le sol (en surface) est d'abord retiré à l'aide d'une spatule en plastique (figure 22-A). Les carottages sont réalisés avec l'emporte-pièce directement sur la gélose recouverte de mycélium (figure 22-B). Des cylindres constitués des deux couches du microcosme (gélose et mycélium) sont ainsi récupérés et centrifugés trois fois à 2357 rpm avec 20 mL d'eau pour dissocier le mycélium de la gélose (figure 22-C). Les grains de sol restants se retrouvent dans le culot.

A la fin de la période d'incubation, les matrices récupérées sont les disques de gélose, le sol, le mycélium et les eaux de centrifugation. Chaque matrice (gélose, mycélium, sol) peut ensuite être analysée séparément pour ses teneurs en éléments métalliques.

Les mycéliums et les sols sont séchés pour une durée de 4 jours à 30°C. Le sol est ensuite stocké à +4°C et le mycélium est congelé avant la minéralisation. Les eaux de centrifugation sont filtrées avec des filtres seringues à 0,45µm et acidifiées à 5% en volume avec HNO<sub>3</sub> 68%, elles sont conservées à +4°C avant analyse à l'ICP-AES. Les disques de géloses sont congelés jusqu'à leur minéralisation. Il a donc été possible de récupérer et d'isoler le mycélium des autres constituants du microcosme. L'analyse des métaux dans les différents composants du microcosme sera ainsi possible. Par ailleurs, les disques de gélose ont été minéralisés juste après leur décongélation. En effet, ils n'ont pas subi de séchage, car ils sont composés majoritairement d'eau. Les valeurs des teneurs en métal dans ces géloses ne sont donc qu'indicatives.



A) microcosme avec le sol retiré,  
 B) carottages et obtention de disques contenant gélose +mycélium,  
 C) mycélium séparé des disques de gélose

Figure 22. Photographies de la méthode de séparation des couches du microcosme bioaugmenté avec *Absidia cylindrospora*.

### III.3) Analyse des métaux dans les composants du microcosme en boîte de Petri sans filtre avec sol synthétique

Les teneurs en métaux dans les composants du microcosme sont déterminées et un bilan de quantité de métal est établi.

Les composants (sol, gélose et mycélium) du microcosme sont minéralisés et analysés pour leurs teneurs en métaux.

Le tableau 23 présente les teneurs en  $\text{mg.kg}^{-1}$  en métaux : Cd, Cu, Pb (métaux avec lesquels le sol a été artificiellement contaminé) ( $S^+A_{ac}$  et  $S^-A_{ac}$  et  $S^+S$ ). Les teneurs en Co, Cr et Ni dans les composants du microcosme ne sont pas présentées dans le tableau 23, car elles sont toutes inférieures à la limite de détection.

Tableau 23. Teneurs en métal dans les composants du microcosme avec le sol synthétique en  $\text{mg.kg}^{-1}$  des microcosmes (sol synthétique).

	$\text{mg.kg}^{-1}$	<b>Cd</b>	<b>Cu</b>	<b>Pb</b>
S <sup>+</sup> S	sol	45 ± 11	51 ± 11	53 ± 14
	gélose	<LQ		
	mycélium	np	np	np
S <sup>+</sup> A <sub>ac</sub>	sol	48 ± 8	53 ± 8	58 ± 12
	gélose	<LQ		
	mycélium	146 ± 27	171 ± 39	119 ± 22
S <sup>-</sup> A <sub>ac</sub>	sol	<LD	2,5 ± 0,4	5 ± 1
	gélose	<LQ		
	mycélium	<LD	7 ± 2	8 ± 3

np: non présent

S<sup>+</sup>S : biostimulation (sol contaminé sans *Absidia cylindrospora*), S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>: bioaugmentation (sol contaminé avec *Absidia cylindrospora*), S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub>: bioaugmentation (sol non contaminé avec *Absidia cylindrospora*).

### III.3.1) Teneurs totales des métaux dans les sols des microcosmes avec le sol synthétique

Après l'incubation de 30 jours, les teneurs en métaux (Cd, Cu et Pb) les plus faibles sont obtenues pour le microcosme préparé avec le sol non contaminé S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub> comme attendu.

Les concentrations dans le sol du microcosme S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub> sont de 2,5 mg.kg<sup>-1</sup> pour Cu et 5 mg.kg<sup>-1</sup> pour Pb, Cd quant à lui est sous la limite de détection. Ces mêmes valeurs sont retrouvées pour le sol initial S<sup>-</sup>. Cela amène à penser que la bioaugmentation avec la souche *Absidia cylindrospora* n'influence pas la teneur en métal (Cd, Cu et Pb) pour le sol non contaminé.

Pour les sols contaminés, les concentrations totales en Cd, Cu et Pb sont respectivement de 45 mg.kg<sup>-1</sup>, 51 mg.kg<sup>-1</sup> et 53 mg.kg<sup>-1</sup> pour le sol biostimulé S<sup>+</sup>S et de 48 mg.kg<sup>-1</sup>, 53 mg.kg<sup>-1</sup> et 58 mg.kg<sup>-1</sup>, pour le sol bioaugmenté S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>. Les valeurs d'écart-type élevées sont expliquées par le grand nombre de mesures. En effet 3 mesures ont été réalisées par microcosme et la moyenne a été calculée à partir des mesures réalisées sur les 3 microcosmes pour chaque condition.

Les concentrations ne sont pas significativement différentes pour les traitements de biostimulation (p = 0,1936) et de bioaugmentation (p = 0,2085). De plus, elles sont proches des teneurs initiales du sol contaminé S<sup>+</sup>(p=0,25). La variation des concentrations totales en métaux dans les sols après 30 jours est donc faible.

### III.3.2) Teneurs en métaux dans le mycélium des microcosmes avec le sol synthétique

Pour le microcosme S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>, Cu est le métal le plus accumulé dans le mycélium (171 mg.kg<sup>-1</sup>), suivi de Cd (146 mg.kg<sup>-1</sup>) et de Pb (119 mg.kg<sup>-1</sup>).

Ainsi Pb a la teneur la moins élevée (par rapport à Cd et Cu) dans le mycélium et en même temps la teneur la plus élevée (comparé à Cd et Cu) dans le sol en fin d'expérience. Ceci peut suggérer que moins la souche fongique accumule de métal à partir du sol, plus la teneur de celui reste élevée en fin d'expérience.

Nos essais permettent de dire que le mycélium de la souche *Absidia cylindrospora* a biosorbé les métaux (Cd, Cu et Pb) à des niveaux similaires (p=0,1767) lorsqu'il est exposé au sol contaminé.

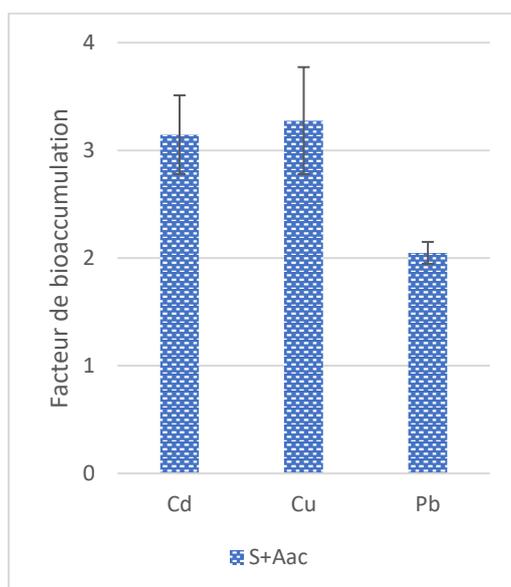
Le facteur de bioaccumulation (BAF : *bioaccumulation factor*) selon la formule (5) présentée dans le chapitre I, partie (V.2.2.2) est calculé comme suit :

$$\text{BAF} = \frac{\text{concentration en métal dans le mycélium sec d'Absidia cylindrospora (mg.kg}^{-1}\text{)}}{\text{concentration en métal dans le sol (mg.kg}^{-1}\text{)}}$$

La figure 23 présente les facteurs de bioaccumulation (BAF) des trois métaux étudiés : Cd, Cu et Pb, qui sont tous supérieurs à 1, ce qui suggère que le mycélium accumule ces métaux (Damodaran et al. 2014). Cu est le métal avec la valeur de BAF la plus élevée (3,3) dans le microcosme S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>, suivi de Cd (3,1) et Pb (2,0).

Ceci confirme les résultats précédents (présentés dans le tableau 23) qui montrent que Cu est le métal le plus accumulé dans le mycélium d'*Absidia cylindrospora* et que plus le sol est concentré en métaux, plus le mycélium accumule des métaux. Ainsi, le microcosme développé nous permet d'estimer des valeurs de BAF, puisqu'il est possible d'analyser les teneurs en métaux contenues dans l'organisme employé en bioaugmentation.

En effet, grâce à la conception du microcosme et à la méthode de séparation des composés du microcosme, il a été possible de parfaitement isoler le mycélium totalement dépourvu de sol et de gélose qui pourraient contaminer le mycélium et surestimer la concentration totale en métaux contenus dans le mycélium.



S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub> : bioaugmentation (sol contaminé S<sup>+</sup> avec *Absidia cylindrospora*).

Figure 23. Facteurs de bioaccumulation des microcosmes bioaugmentés.

### III.3.3) Bilan de matière (quantité de métal)

Comme présenté en partie III.3.1 (Chapitre 3), les matrices (sol, mycélium et gélose) sont minéralisées pour déterminer les teneurs en métaux dans chacune d'elle. Les eaux de centrifugation sont également analysées pour leurs teneurs en métaux. Les résultats en quantités de métal (Cd, Cu et Pb) en mg et en pourcentages dans tous les composants de chaque microcosme (sol, mycélium, gélose et eaux) sont résumés dans le tableau 24.

Le pourcentage en métal correspond au pourcentage en métal dans le compartiment du microcosme par rapport à la quantité en métal dans le microcosme complet (en mg).

Tableau 24. Quantité de métal (Cd, Cu et Pb) dans les composants du microcosme (sol synthétique) en mg.

	microcosme	Sol (mg)	Gélose (mg)	Mycélium (mg)	eau de rinçage (mg)
<b>Cd</b> <b>50mg.kg<sup>-1</sup></b>	S <sup>+</sup> S	0,9 ± 0,2	0,033 ± 0,004	np	4.10 <sup>-3</sup> ± 3.10 <sup>-4</sup>
	S <sup>+</sup> A <sub>ac</sub>	1,0 ± 0,2	0,037 ± 0,008	0,008 ± 0,001	9.10 <sup>-4</sup> ± 4.10 <sup>-4</sup>
<b>Cu</b> <b>50mg.kg<sup>-1</sup></b>	S <sup>+</sup> S	1,0 ± 0,2	0,012 ± 0,003	np	10 <sup>-3</sup> ± 3.10 <sup>-5</sup>
	S <sup>+</sup> A <sub>ac</sub>	1,1 ± 0,2	0,012 ± 0,007	0,006 ± 0,001	3.10 <sup>-4</sup> ± 5.10 <sup>-5</sup>
<b>Pb</b> <b>50mg.kg<sup>-1</sup></b>	S <sup>+</sup> S	1,1 ± 0,3	<LD	np	<LD
	S <sup>+</sup> A <sub>ac</sub>	1,2 ± 0,3	<LD	0,0062 ± 0,0009	<LD

np : non présent

S<sup>+</sup>S : biostimulation avec sol contaminé S<sup>+</sup>

S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub> : bioaugmentation (sol contaminé S<sup>+</sup> avec *Absidia cylindrospora*)

S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub> : bioaugmentation (sol non contaminé S<sup>+</sup> avec *Absidia cylindrospora*).

Le tableau 24 montre que les quantités de métal dans l'eau de centrifugation sont très faibles, la quantité en Pb dans l'eau est inférieure à la limite de détection et des quantités négligeables sont retrouvées pour le Cd et le Cu. Cela signifie que l'étape de centrifugation, qui permet de dissocier le mycélium de la gélose et de nettoyer les disques de gélose ne lessive pas les métaux associés au mycélium. Le protocole employé pour séparer les composants du microcosme ne semble donc pas entraîner un transfert de métaux entre les couches du microcosme. Ceci confirme bien l'efficacité du protocole quant à la séparation des composants du microcosme à la fin de l'expérience et par conséquent l'efficacité de la détermination des concentrations en métaux réellement accumulées au sein du mycélium.

D'une manière générale, les résultats montrent qu'après 30 jours d'expérimentation les niveaux de métaux accumulés au sein des différents compartiments sont différents après la biostimulation (p = 0,0045, p = 0,0045 et p = 0,0335, respectivement pour Cd, Cu et Pb) et après la bioaugmentation (p = 0,0021, p = 0,0020 et p = 0,0090, respectivement pour Cd, Cu et Pb). Les résultats montrent également que la plus grande partie des éléments reste dans le sol (97-99%). De faibles quantités de Cu et de Cd sont retrouvées dans la gélose et dans le mycélium.

Cependant, la quantité de métal accumulée dans le mycélium est faible et ne représente que 1% de la quantité totale en métal dans le microcosme, ce qui est cohérent avec la faible baisse des concentrations dans le sol en essais de bioaugmentation.

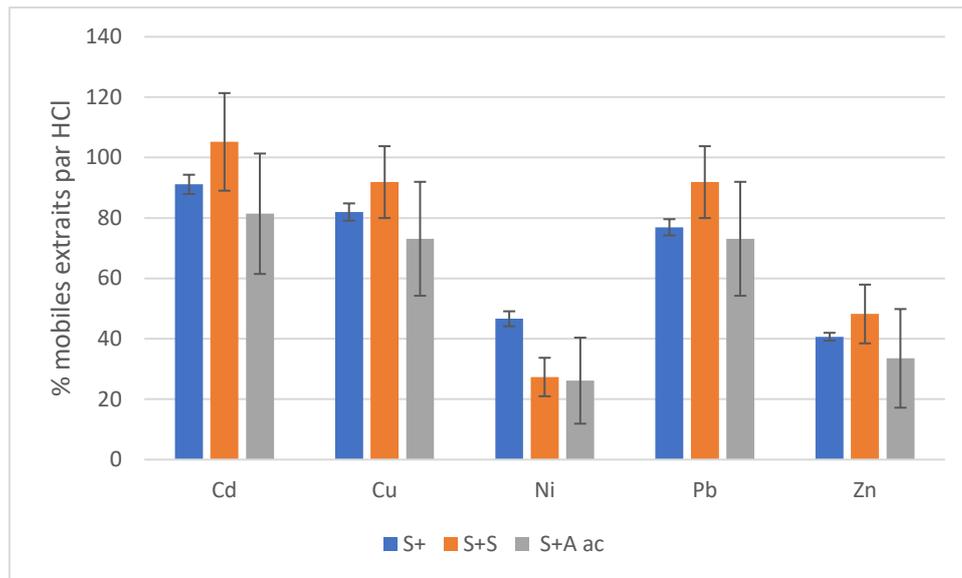
Albert et al. (2018) ont évalué la biosorption du Cd, Cu et Pb par *Absidia cylindrospora* en milieu liquide MEA. Leurs résultats ont montré que le mycélium biosorbe  $13.10^3 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Pb,  $7.10^3 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Cd et  $2.10^3 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Cu dans les 3 jours suivant l'exposition à  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de chaque métal. Le Pb était le métal le plus accumulé au sein du mycélium, alors que dans notre étude, Pb apparaît comme le moins accumulé dans le mycélium. De plus, les concentrations accumulées étaient plus élevées en milieu liquide que dans le microcosme du sol. Néanmoins, les conditions liquides ne permettent pas d'étudier l'ensemble de l'écosystème et de simuler les conditions plus réalistes (conditions qu'on pourrait appliquer en terrain).

⇒ Le microcosme mis au point au cours de ce travail de thèse et validé par la réalisation d'un bilan a permis en effet d'isoler le mycélium des autres composants du microcosme et d'analyser séparément les teneurs accumulées dans le mycélium et dans le sol.

#### III.3.4) Pourcentages des métaux dans les sols synthétiques bioaugmentés et biostimulés extraits par extraction simple

En complément de l'analyse des teneurs totales dans les composants des microsomes, les sols sont soumis au protocole des extractions simples (HCl).

Les sols bioaugmentés ( $S^+A_{ac}$ ) et biostimulés ( $S^+$ ) à la fin de l'essai, ainsi que le sol initial  $S^+$  contaminé ont subi des extractions à HCl 1M. Les pourcentages extraits sont présentés sur la figure 24. En plus de Cd, Cu et Pb, qui sont les métaux avec lesquels le sol S a été artificiellement contaminé, les pourcentages de Ni et Zn extraits par HCl sont également présentés.



$S^+$  : sol contaminé ;

$S^+S$  : biostimulation avec sol contaminé  $S^+$

$S^+A_{ac}$  : bioaugmentation (sol contaminé  $S^+$  avec *Absidia cylindrospora*)

Figure 24. Pourcentages des métaux dans les sols artificiels des microcosmes en boîtes de Petri.

Les pourcentages de Co et Cr extraits avec HCl 1M sont nuls, en effet les teneurs en Co et Cr dans les extraits sont inférieures à la limite de détection et ne sont par conséquent pas montrés sur la figure 24. Pour Ni et Zn, les pourcentages extraits par HCl sont du même ordre de grandeur et sont proches de 40%.

On peut observer que les pourcentages les plus élevés sont notés pour Cd, Cu et Pb, avec lesquels le sol a été dopé par des sels de sulfates (Cd et Cu) et des sels de nitrate (Pb) (chapitre 3-partie I.1). Ces pourcentages sont aux alentours de 90% pour le sol contaminé  $S^+S$ . Ces métaux sont en effet très labiles, car apportés artificiellement en solution par l'ajout de sels métalliques, ce qui témoigne d'une forte disponibilité des métaux et par conséquent d'une importante biosorption des métaux par la souche fongique *Absidia cylindrospora*. Ceci conduit à surestimer le potentiel de bioremédiation d'où l'intérêt d'employer des sols réels pour des études de bioremédiation (Albert et al. 2020).

Pour Cd, Cu, Ni et Zn, la disponibilité a baissé d'environ 10% en fin d'essai de bioaugmentation par rapport au sol initial  $S^+$ .

Les pourcentages des microcosmes bioaugmentés par rapport au sol initial  $S^+$  de : Cd est passé de 91 à 81%, Cu est passé de 82 à 73%, Ni est passé de 46 à 26% et Zn de 41 à 34%.

Ces résultats suggèrent que ces essais que le traitement de bioaugmentation a rendu ces métaux moins disponibles pour les sols pollués.

Pour ce qui est de la biostimulation, la disponibilité des métaux a en revanche augmenté (entre 10 et 20%) entre le sol S<sup>+</sup> et le sol S<sup>+</sup>S pour tous les métaux, sauf pour Ni, rendu moins disponible avec le traitement de biostimulation.

⇒ Cette étude de disponibilité a confirmé qu'en employant des sols artificiellement pollués par des sels de métaux, forme très disponible, les pourcentages de métaux (extraits par extraction simple) étaient très élevés.

Aussi, l'ajout de la souche fongique *Absidia cylindrospora* en bioaugmentation a conduit à baisser la disponibilité potentielle des ETM. Elle a cependant augmenté pour les sols biostimulés, ceci peut être expliqué par l'effet d'autres espèces fongiques ou par une évolution abiotique.

### III.4) Identification des souches fongiques

L'identification des souches fongiques ayant poussé sur les sols issus des microcosmes (S<sup>+</sup>S, S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub> et S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>) est réalisée.

La méthode d'incorporation directe et la méthode des suspensions dilutions (présentées en chapitre 2-partie II.1) appliquées aux sols initiaux (S<sup>+</sup> et S<sup>-</sup>) et aux sols issus des microcosmes (S<sup>+</sup>S, S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub> et S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>) à la fin de la période d'incubation ont permis d'évaluer en priorité la viabilité de la souche *Absidia cylindrospora* (bioaugmentation) à l'issue de la durée d'incubation, mais également d'isoler et d'identifier les autres espèces fongiques viables dans les sols. Les résultats sont présentés dans le tableau 25.

Tableau 25. Souches isolées et identifiées à partir des microcosmes réalisés avec le sol synthétique.

		<i>Absidia cylindrospora</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Umbelopsis</i> sp.	<i>Phialophora</i> sp.	<i>Gliocladium viride</i>
<b>Sols initiaux</b>	<b>S<sup>-</sup></b>		x	x	x	
	<b>S<sup>+</sup></b>		x	x		
<b>Sol biostimulé</b>	<b>S<sup>+</sup>S</b>		x	x		x
<b>Sols Bioaugmentés</b>	<b>S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub></b>	x	x			
	<b>S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub></b>	x	x			

S<sup>+</sup>: sol contaminé initial; S<sup>-</sup>: sol initial non contaminé

S<sup>+</sup>S: biostimulation (sol contaminé sans *Absidia cylindrospora*)

S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>: bioaugmentation (sol contaminé avec *Absidia cylindrospora*)

S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub>: bioaugmentation (sol non contaminé avec *Absidia cylindrospora*)

(x) : souche identifiée ; (case vide) : souche non identifiée

### III.4.1) Souches fongiques dans le sol biostimulé (S<sup>+</sup>S)

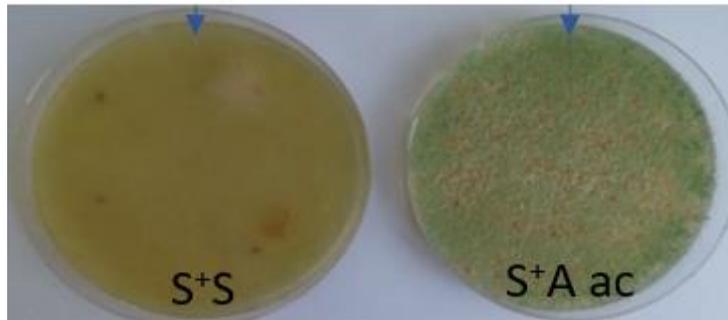
Dans le sol biostimulé S<sup>+</sup>S, les souches fongiques identifiées sont *Gliocladium viride*, *Trichoderma viride* et *Umbelopsis* sp. La souche fongique *Gliocladium viride* n'est pas détectée dans les sols initiaux, on peut supposer que cette souche est stimulée par l'apport de nutriments issus de la gélose (milieu MEA). C'est une souche couramment isolée de sols et de plantes en décomposition (Pereira et al. 2009). Ce champignon filamenteux a également été isolé par Romero et al. (2010) à partir de sédiments provenant d'une zone industrielle fortement contaminée et a démontré son efficacité dans la dégradation du benzo[a]pyrene.

### III.4.2) Souches fongiques dans les sols bioaugmentés (S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub> et S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub>)

Les souches fongiques identifiées dans les sols bioaugmentés (S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub> et S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub>) sont *Absidia cylindrospora* et *Trichoderma viride*.

Il est possible de visualiser dans le microcosme à la fin de l'essai les filaments d'*Absidia cylindrospora* sur les bords du microcosme. Cette observation à l'œil nu permet de dire que la souche fongique initialement introduite entre deux couches qui sont la gélose (partie supérieure du microcosme) et le sol (partie inférieure du microcosme) a bien colonisé le microcosme. Cet aspect de colonisation du milieu représente un atout majeur dans les processus de bioaugmentation (Tyagi et al. 2011). De plus, la souche est encore identifiée à l'issue des 30 jours d'incubation, cela signifie que la souche est toujours viable après toute la durée d'incubation. Ceci est un élément en faveur de la réussite de l'essai de bioaugmentation (El Fantroussi et Agathos 2005).

La figure 25 montre les photographies des boîtes de géloses obtenues à partir du microcosme biostimulé (S<sup>+</sup>S) et du microcosme bioaugmenté (S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>). Les photographies montrent bien que *Trichoderma viride* (qui se caractérise par des colonies vertes) croît avec une densité plus élevée dans le sol bioaugmenté, par rapport au sol biostimulé (qui ne contient pas la souche fongique *Absidia cylindrospora*). La bioaugmentation semble favoriser également le développement de *Trichoderma viride*.



*S<sup>+</sup>S*: biostimulation (sol contaminé sans *Absidia cylindrospora*)

*S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>*: bioaugmentation (sol contaminé avec *Absidia cylindrospora*)

Figure 25. Photographies des cultures obtenues à partir du microcosme biostimulé (*S<sup>+</sup>S*) et du microcosme bioaugmenté (*S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>*).

### III.5) Conclusion

Le tableau 26 résume les avantages et les inconvénients des trois types de microcosmes développés au cours de la thèse.

Le microcosme en cristalliseur n'a pas permis de récupérer le mycélium complètement, le mycélium est resté intimement mélangé à de la sciure. Aussi, le microcosme en boîte de Petri avec filtres n'a pas permis de récupérer le mycélium intégralement, mais avec des particules de sol adsorbées. Toutefois avec le microcosme en boîte de Petri sans filtres, le mycélium a été entièrement récupéré sans traces de sols.

Tableau 26. Avantages et inconvénients des trois types de microcosmes développés au cours de la thèse.

	Microcosme en cristalliseur	Microcosme en boîte de Petri avec filtre	Microcosme en boîte de Petri sans filtres
Avantages	<p>Le sol forme un disque (cylindre) et se détache facilement du cristalliseur</p> <p>Le mycélium est récupéré</p>	<p>Le filtre est facilement détaché du microcosme</p>	<p>Le mycélium est parfaitement récupéré</p> <p>Les teneurs en métaux dans le mycélium proviennent exclusivement du mycélium</p>
Inconvénients	<p>Le mycélium reste très lié à la sciure malgré le fait que le sol se décroche sous forme de disque</p> <p>Pour la série 2 de 30g de sol, le mycélium n'a pas été récupéré</p>	<p>De fines particules de sols restent adsorbées sur le filtre contenant le mycélium en surface</p> <p>L'analyse du filtre ne donne pas directement accès aux teneurs contenus dans le mycélium</p>	

La réalisation du microcosme avec un sol synthétique préparé en laboratoire et artificiellement contaminé a permis de valider la conception du microcosme, mais également de montrer que réaliser des études avec sols artificiellement contaminés fournit des pourcentages extraits par extraction simple très élevés à cause de l'ajout de métaux sous leur forme disponible. Il sera donc important d'employer des sols réels.

Les paramètres pris en compte pour valider le microcosme sont :

- **la répartition des composants sous forme de couches**, ce qui permet de piéger le mycélium sous le sol et non en surface comme la plupart des études réalisées en bioremédiation de sols contaminés (Gautam et al. 2003; Srivastava et Thakur 2006). Le but est que la souche fongique soit bien incorporée dans le sol et pousse comme un organisme autochtone malgré le fait qu'elle soit ajoutée en bioaugmentation.
- **la séparation des différentes couches du microcosme à l'issue de la période d'incubation**. La conception du microcosme et la méthode de séparation permettent une bonne séparation des couches du microcosme et la récupération de tous les composants séparément.
- **l'isolement du mycélium à partir du sol**. En effet, grâce au type de croissance du champignon (formation d'une couche recouvrant la gélose facilement retirable à la fin de l'essai) et à la méthode de séparation des couches, le mycélium est totalement récupéré et surtout dépourvu de particules de sol et de gélose (qui pourraient enrichir le mycélium en métaux et ainsi surestimer la concentration totale en métaux contenue dans le mycélium).

La validation du microcosme en boîte de Petri sans filtres avec un sol synthétique et artificiellement contaminé a constitué l'étape principale de la mise au point du microcosme répondant aux critères de notre étude.

Ce premier objectif de la thèse a fait l'objet d'un article intitulé : « *A new soil microcosm to evaluate the Cd, Cu and Pb biosorption by Absidia cylindrospora* » publié dans la revue : « *Bioremediation Journal* ». Cette publication est disponible en annexe n°8 de ce manuscrit de thèse.

## **Chapitre 5 : Application du microcosme à des sols réels**

Ce chapitre présente trois exemples d'application du microcosme de sol mis au point avec des sols réels. La première application concerne une étude de biostimulation et de bioaugmentation d'une durée d'incubation d'un mois seulement avec la souche fongique *Absidia cylindrospora* puis avec *Perenniporia fraxinea*. Les deuxième et troisième applications portent sur une étude réalisée sur une période d'incubation plus longue de 3 mois avec l'usage des mêmes souches fongiques (*Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea*) toujours séparément.

## I. Microcosmes avec un sol réel non pollué (C)

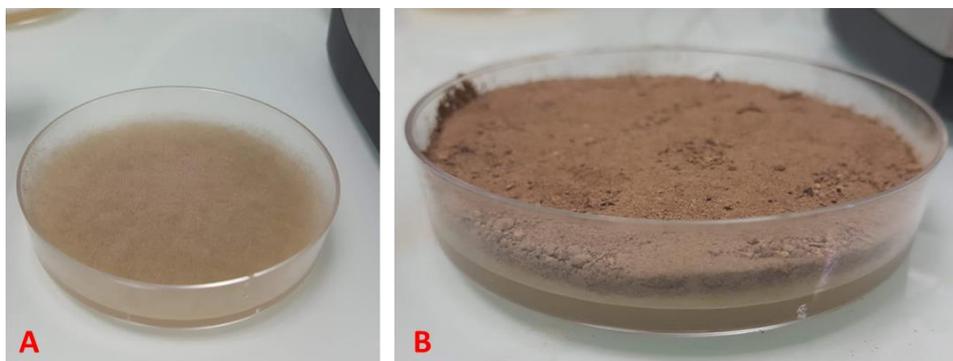
### I.1) Réalisation des microcosmes

Des microcosmes sont réalisés en employant le sol **C** et en réalisant la bioaugmentation avec les deux souches fongiques de l'étude.

Les microcosmes sont réalisés selon le modèle développé en chapitre 4 et sont au nombre de trois : un microcosme biostimulé et deux microcosmes bioaugmentés, le premier avec la souche *Absidia cylindrospora* et le second avec la souche fongique *Perenniporia fraxinea*.

Pour ce faire, le milieu MEA est coulé dans les boîtes de Petri, sur lequel est réalisé un ensemencement central de la souche *Absidia cylindrospora* ou *Perenniporia fraxinea*. Le mycélium se développe sur le milieu pendant 14 jours, formant un tapis (figure 26-A), sur lequel est ajouté 30 g de sol (figure 26-B). Ce microcosme (dit « en couches ») est ensuite incubé pour une durée de 30 jours à 25°C.

Cette étude représente une étude préliminaire avec un seul exemplaire de microcosme réalisé pour chaque souche. Les résultats obtenus pour cette étude ne seront donc qu'indicatifs.



A) Formation d'une couche de mycélium à la surface de la gélose.

B) Ajout du sol sur les deux couches (gélose + mycélium)

Figure 26. Protocole de réalisation du microcosme avec *Absidia cylindrospora* en boîte de Petri.

## I.2) Analyse des métaux dans les composants du microcosme avec le sol non pollué C

Pour ce type de microcosme, les composants du microcosme analysés sont la gélose (des disques de géloses non séchées et calibrés (carottage-taille 12) sont pesés avant d'être minéralisés), le mycélium issu des deux souches *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* et le sol. Le tableau 27 présente les teneurs en  $\text{mg.kg}^{-1}$  des métaux dans ces différents compartiments du microcosme.

Les valeurs des teneurs en métaux dans les sols et dans les géloses sont présentées sous forme « moyenne  $\pm$  écart-type » car les quantités de sol ou de gélose sont suffisantes pour réaliser 3 mesures, excepté pour les mycéliums ( $\text{CA}_{ac}$  et  $\text{CA}_{pf}$ ) recueillis à la fin de la durée d'incubation, pour lesquelles une seule mesure a pu être effectuée (d'où les valeurs présentées sans écart-type), au vu des faibles quantités récupérées.

Par ailleurs, un test est réalisé en faisant pousser chaque souche (*Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea*) sur le milieu MEA, pour une durée de 10 jours et ce pour être dans les mêmes conditions que le mycélium introduit dans les microcosmes de sol. Les mycéliums récoltés après 10 jours de culture, sont été séchés et subissent une minéralisation (selon le protocole présenté en chapitre 2- partie I.4) pour déterminer leurs teneurs en métaux. Les résultats des dosages sont présentés dans le tableau 27 dans les lignes « A.c sans traitement » et « P.f sans traitement » pour le mycélium d'*Absidia cylindrospora* et le mycélium de *Perenniporia fraxinea* respectivement.

Les métaux analysés dans les mycéliums « A.c sans traitement » et « P.f sans traitement » des deux souches fongiques sont pour la plupart au-dessous de la limite de détection (cas du Cd, Co, Ni et Pb). Néanmoins, certains métaux sont présents à de faibles quantités comme le cas du Cr présent à  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour la souche *Absidia cylindrospora* et  $24 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour la souche *Perenniporia fraxinea*, mais aussi le Zn présent à  $44 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour la souche *Absidia cylindrospora* et  $55 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour la souche *Perenniporia fraxinea*. Cela veut dire que les mycéliums biosorbent des métaux initialement contenus dans la gélose (cas du Zn), tandis que pour Cr, l'hypothèse d'une contamination est plus cohérente. Ces résultats expliquent les teneurs élevées en Cr et en Zn retrouvées dans les mycéliums des deux souches en essai de bioaugmentation par rapport aux autres métaux de l'étude.

Tableau 27. Teneurs totales en mg.kg<sup>-1</sup> dans les composants des microcosmes avec le sol (C).

	mg.kg <sup>-1</sup>	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
sol	sol C initial	1±0	3±1	14±3	6±1	6±0	20 ± 1	21 ± 2
	CS	1±0	2±0	15±1	6±0	6±0	16±1	25±2
	CA <sub>ac</sub>	1±0	3±0	15±2	7±1	7±1	18±1	24±2
	CA <sub>pf</sub>	1±0	3±0	15±1	6±0	8±1	18±1	29±7
mycélium	A.c sans traitement	<LD=0,05	<LD=0,35	2,4±0,8	7,6±0,6	<LD=0,25	<LD=0,69	44±7
	CA <sub>ac</sub>	<LD	4	7	2	7	9	35
	P.f sans traitement	<LD	<LD	24±3	<LD	<LD	<LD	55±8
	CA <sub>pf</sub>	<LD	<LD	10	3	12	10	15
gélose	sans traitement	<LD=0,05	<LD=0,35	<LD=0,10	<LD=0,15	<LD=0,25	<LD=0,69	<LD=0,7
	TC							2±1
	CA <sub>ac</sub>							1±1
	CA <sub>pf</sub>							3±1

**Ac** : *Absidia cylindrospora* ; **Pf** : *Perenniporia fraxinea* ; **C** : sol C ; **T** : témoin sans champignon ; **A** : bioaugmentation

**CS** : microcosme biostimulé avec le sol C

**CA ac** : microcosme avec le sol C bioaugmenté avec *Absidia cylindrospora*

**CA pf** : microcosme avec le sol C bioaugmenté avec *Perenniporia fraxinea*

**A.c sans traitement** : mycélium de *A.c* ayant poussé sur milieu MEA

**P.f sans traitement** : mycélium de *P.f* ayant poussé sur milieu MEA

**Gélose sans traitement** : milieu MEA sans mycélium

D'après le tableau 27, les concentrations de certains métaux (Cu et Pb) sont égales dans les mycéliums issus des deux champignons (CA<sub>ac</sub> et CA<sub>pf</sub>). Pour Ni et Cr, les concentrations biosorbées par *P.f* semblent plus élevées que pour *A.c*, le contraire est observé pour Zn. Cependant, ces teneurs restent comparables (Cr<sub>(A.c)}</sub> = 7 mg.kg<sup>-1</sup> et Cr<sub>(P.f)}</sub> = 10 mg.kg<sup>-1</sup> ; Ni<sub>(A.c)}</sub> = 7 mg.kg<sup>-1</sup> et Ni<sub>(P.f)}</sub> = 12 mg.kg<sup>-1</sup>), sauf pour le cas du Zn, où la teneur accumulée dans le mycélium d'*Absidia cylindrospora* représente le triple de la teneur accumulée dans le mycélium de *P.f* (Zn<sub>(A.c)}</sub> = 35 mg.kg<sup>-1</sup> et Cr<sub>(P.f)}</sub> = 15 mg.kg<sup>-1</sup>). Il est difficile de conclure à partir de ces premiers résultats, qui restent indicatifs et basés sur des essais uniques. Des études avec plus de réplicats sont donc nécessaires. Les concentrations en ETM dans les sols ne semblent pas varier en fin d'essai bioaugmenté ou biostimulé par rapport au sol initial.

Les concentrations dans les sols bioaugmentés avec *Absidia cylindrospora* ou *Perenniporia fraxinea* sont similaires, malgré la disparité des teneurs accumulées par chacun des mycéliums.

La durée d'incubation d'un mois ne semble pas affecter significativement les teneurs totales en métaux dans les sols.

Les teneurs en métaux dans les géloses sont les plus faibles comparées aux autres composants du microcosme et sont en dessous de la limite de détection pour la plupart des métaux sauf pour le Zn. Cependant, les valeurs des teneurs en ETM dans les géloses déterminées ne peuvent donner que quelques indications sur le transfert de métaux au sein du microcosme. En comparant les teneurs en Zn dans les géloses des microcosmes bioaugmentés (A.c et P.f) et la gélose du microcosme biostimulé, il n'y a pas de variation observée, ceci pourrait donc suggérer qu'il n'y a pas de transfert de métal entre les couches du microcosme.

## II. Microcosmes avec un sol réel pollué (R) bioaugmenté avec la souche fongique *Absidia cylindrospora*

### II.1) Réalisation des microcosmes

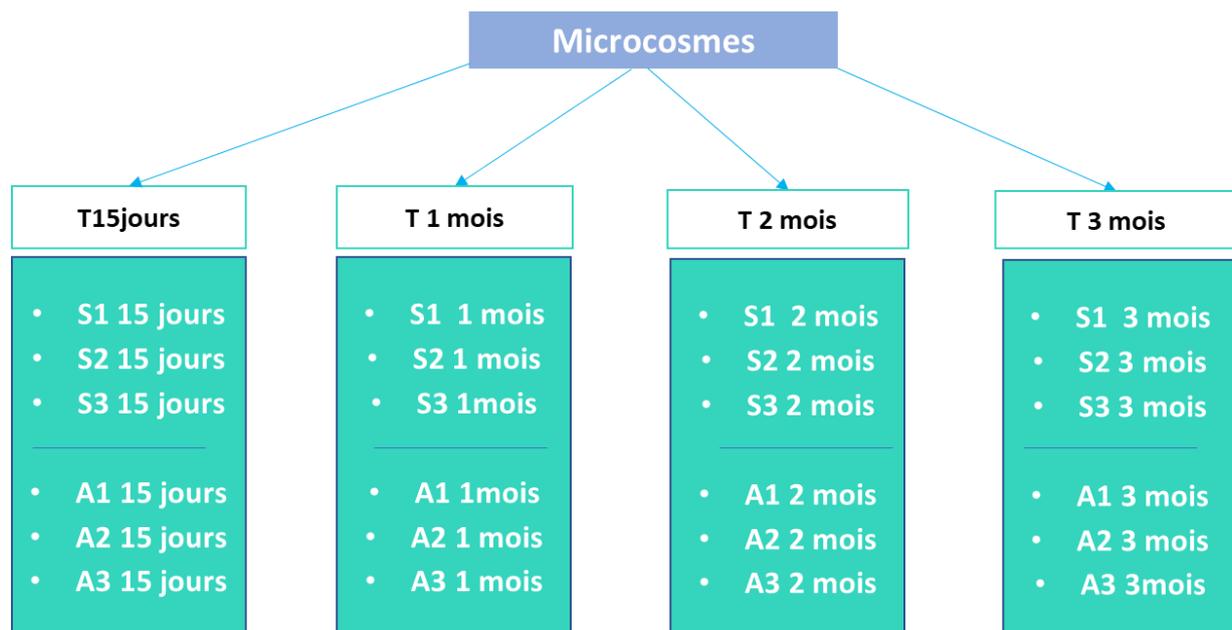
Cette série de microcosmes est réalisée dans l'objectif d'étudier la biosorption de la souche fongique *Absidia cylindrospora* au sein du microcosme au contact d'un sol réel (R) et cela à différentes durées d'incubation qui sont de 15 jours, 1 mois, 2 mois et 3 mois.

Ces microcosmes sont réalisés dans des boîtes de Petri (90 mm de diamètre et 20 mm de hauteur) selon deux conditions :

- les microcosmes biostimulés : réalisés en ajoutant 30 g de sol sur la gélose refroidie (20 ml de milieu gélosé MEA).
- les microcosmes bioaugmentés : réalisés en ensemençant la souche fongique *Absidia cylindrospora* en un point central sur la gélose (20 mL de milieu MEA). Après 14 jours de croissance de la souche fongique à +25°C, une masse de 30 g de sol R est ajoutée à la surface du mycélium qui recouvre toute la boîte (formant un tapis).

Les microcosmes sont réalisés en trois réplicats pour chaque condition et chaque durée d'incubation, soit un total de 6 microcosmes par durée d'incubation.

Le nombre total de microcosmes étudiés est donc de 24 (description en figure 27).



S : bioStimulation / A : bioAugmentation

Figure 27. Conditions d'expérimentations en microcosmes pour une durée de trois mois.

Les résultats de cette étude seront présentés sous forme de :

- suivi de l'évolution de la biomasse (fraîche et sèche) d'*Absidia cylindrospora* obtenue à différents temps d'incubation (à 15 jours, 1 mois, 2 mois et 3 mois) afin d'évaluer la viabilité et l'évolution de cette souche introduite dans un microcosme pour des essais de bioaugmentation.
- suivi de la microfonge viable du sol, afin d'identifier et de quantifier les souches fongiques présentes initialement dans le sol et aux différents temps de l'essai.
- suivi des métaux : le sol et le mycélium sont analysés pour leurs teneurs totales en métaux. La disponibilité potentielle des métaux des sols des microcosmes est estimée par une extraction simple (HCl) et une extraction séquentielle selon Leleyter et Probst (1999) en début et en fin d'expérience de bioaugmentation (3 mois).

## II.2) Evolution de la biomasse fongique

### II.2.1) Description visuelle

Le mycélium a gardé le même aspect et a poussé de la même façon durant les périodes d'incubation de 15 jours à 2 mois. Il a même colonisé les parois du microcosme, ce qui montre un bon développement du mycélium.

Cependant, à 3 mois d'incubation, l'aspect du mycélium semble moins dense dans le microcosme comparé aux temps d'incubation 15 jours, 1 mois et 2 mois. Il est également observé que le mycélium commence à se rétracter (flèches sur la figure 28) ce qui pousse le sol (déposé en surface) vers le centre du microcosme (visible sur la figure 28-A). Sur la figure 28-B, on peut visualiser les bords du mycélium sur la gélose, une fois le sol et le mycélium retirés. Le diamètre occupé par le mycélium est plus petit que celui de la boîte, alors qu'initialement, le mycélium recouvrait la totalité de la boîte. Ce phénomène de rétraction peut être expliqué par l'assèchement du mycélium qui a tendance à subir des modifications morphologiques dans ces conditions particulières (Baldrian 2002; Vaishaly et al. 2015).



A) Microcosme à la fin de la durée d'incubation avant de séparer les couches du microcosme. Il est visible que le mycélium s'est rétracté et ne recouvre plus la surface entière de la gélose.  
B) Gélose au fond du microcosme avec traces du diamètre qu'occupe le mycélium (cercle marron), inférieur au diamètre de la boîte de Petri (en pointillés bleus). Initialement le mycélium occupait tout le diamètre de la boîte de Petri.

Figure 28. Photographies du microcosme bioaugmenté à T 3 mois.

## II.2.2) Masses des mycéliums

La détermination des masses (en poids frais et en poids sec) de mycélium de *Absidia cylindrospora* récupérés à l'issue de l'étape de séparation des couches à chaque fin de période d'incubation permet d'estimer l'évolution de la biomasse fongique (annexe n°9).

Ces résultats prennent en compte la masse moyenne des trois mycéliums obtenus à partir des trois microcosmes bioaugmentés (à chaque durée d'incubation) et sont reportés sur la figure 29. Le champignon perd presque 90% de sa masse au cours du séchage à 30°C, les poids secs des mycéliums représentent environ 12% du poids frais initial. Les poids secs des mycéliums récupérés sont de  $0,14 \pm 0,04$  g à 15 jours,  $0,15 \pm 0,02$  g à 1 mois et  $0,11 \pm 0,02$  g à 2 mois.

Ces résultats montrent que la biomasse fongique reste stable de 15 jours à 2 mois d'incubation, mais tend à la diminution à partir de T3 mois ( $0,07 \pm 0,02$  g). Ceci peut être expliqué par un manque de nutriments et d'eau au sein du microcosme. En effet, aucun ajout d'eau ou de nutriments n'a été réalisé au cours de l'expérimentation de 3 mois. La gélose paraissait en effet très asséchée en fin d'expérience. Ceci présente une première limite de ce microcosme : un milieu gélosé n'est pas adapté pour maintenir en culture un champignon pour une durée de 3 mois. Il serait sans doute envisageable pour des essais futurs sur une aussi longue période d'alimenter le microcosme en injectant des nutriments.

Bien que l'inhibition de la croissance des champignons au contact de métaux ait été décrite dans plusieurs études (Srivastava et Thakur 2006; Vaishaly et al. 2015; Costa et Tavares 2017 ; Kumar et Dwivedi 2021), l'hypothèse d'un manque en nutriments semble plus solide au vu des conditions dans lesquelles le microcosme a été maintenu durant toute la période d'incubation.

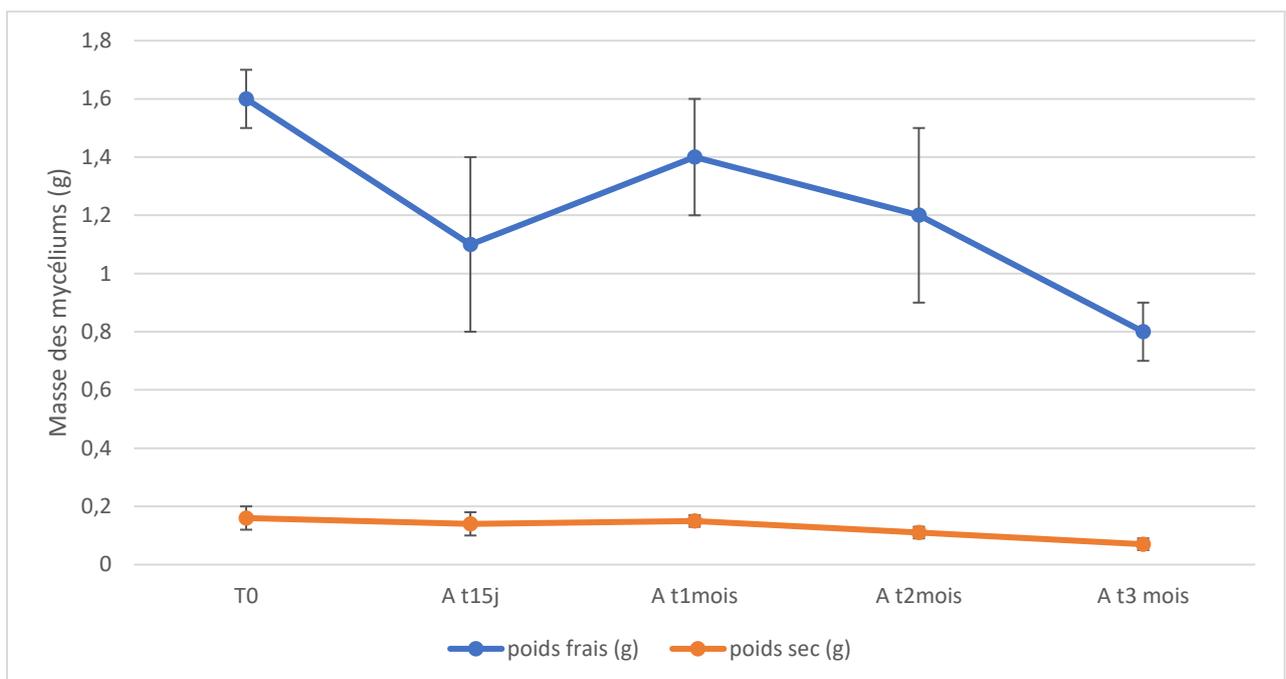


Figure 29. Poids frais et poids secs des mycéliums (à 15 jours, 1 mois, 2 mois et 3 mois).

### II.3) Suivi de la microfonge du sol

L'identification et la quantification des souches fongiques ayant poussé sur les sols des microcosmes à la fin de chaque période (T 15 jours, T1 mois, T2 mois et T3 mois) sont réalisées en combinant les deux méthodes : la méthode Warcup (incorporation directe) et la méthode des suspensions dilutions. Les deux méthodes sont présentées respectivement dans le chapitre II-partie II.2.1 et partie II.2.2.

La méthode des suspensions dilutions a permis en particulier de quantifier la microfonge dans les sols des microcosmes au cours des essais, ce paramètre est important pour déterminer si la population fongique viable (exprimée en UFC.g<sup>-1</sup> de sol) évolue après plusieurs mois en microcosme.

Pour les sols bioaugmentés, l'objectif est d'évaluer la viabilité de la souche fongique *Absidia cylindrospora* préalablement introduite au début de l'expérimentation dans tous les microcosmes bioaugmentés et de déterminer si cette souche reste toujours présente et viable à toutes les durées de l'expérimentation.

Pour les sols biostimulés, le but du suivi fongique est de mettre en évidence la présence d'autres souches fongiques dont la croissance serait stimulée par l'apport de nutriments.

Le tableau 28 récapitule la nature des isolats fongiques identifiés à partir du sol de départ R à T0 (présentés également en chapitre 3) et des sols des microcosmes biostimulés et bioaugmentés des 4 périodes d'incubation (T 15 jours, T1 mois, T2 mois et T3 mois) ainsi que le nombre de colonies identifiées (en UFC.g<sup>-1</sup> de sol).

Pour rappel, plusieurs espèces fongiques ont été isolées à partir du sol R à T0 (une Mucorale et 7 Ascomycètes). Les 8 souches fongiques identifiées étaient les suivantes : *Actinomucor elegans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ustus*, *Cochliobolus geniculatus*, *Gliocladium virens*, *Monodictys* sp. et *Paecilomyces lilacinus*.

Tableau 28. Dénombrement et identification des espèces fongiques viables isolées du sol R (T0) et des sols des essais de biostimulation et bioaugmentation dans les microcosmes après chaque durée d'incubation.

	T0	Biostimulation (S)				Bioaugmentation (A)			
		T15 jours	T1mois	T2mois	T3mois	T15 jours	T1mois	T2mois	T3mois
UFC.g <sup>-1</sup> de sol	3x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	6,0x10 <sup>4</sup>	6,0x10 <sup>4</sup>	9,1x10 <sup>5</sup>	5,5x10 <sup>5</sup>	4,1x10 <sup>5</sup>	5,5x10 <sup>5</sup>
Nombre d'espèces viables identifiées	8	2	5	5	4	3	2	2	2
<i>Absidia cylindrospora</i>						x	x	x	x
<i>Actinomucor elegans</i>	x	x		x		x			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	x								
<i>Aspergillus niger</i>	x								
<i>Aspergillus ustus</i>	x								
<i>Cochliobolus geniculatus</i>	x								
<i>Colletotrichum</i> sp.			x	x	x				
<i>Fusarium equiseti</i>				x					
<i>Fusarium</i> sp.			x						
<i>Gliocladium virens</i>	x		x						
<i>Humicola glauca</i>				x	x				
<i>Monodictys</i> sp.	x								
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	x								
<i>Penicillium</i> sp.			x		x				
<i>Trichoderma</i> sp.		x	x	x	x	x	x	x	x

(x) : souche fongique identifiée à partir du milieu de culture.

(case vide) : souche non identifiée.

Les résultats de l'identification fongique montrent que la plupart des souches fongiques appartiennent au phylum des Ascomycètes, qui représentent les principales souches fongiques retrouvées dans les sols. Aussi, 7 souches initialement présentes dans le sol R ne sont pas retrouvées dans les microcosmes pendant toute la période d'incubation. Ces souches sont les suivantes : 3 *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A.niger*, *A.ustus*), *Cochliobolus geniculatus*, *Monodictys* sp. et *Paecilomyces lilacinus*. L'absence de mise en évidence de ces souches est probablement liée au développement de souches proliférantes telles que *Actinomucor elegans* et *Trichoderma* sp., suite à l'apport de nutriments dans le microcosme.

- Souches apparues dans les microcosmes :

A l'inverse, d'autres souches non présentes dans le sol initial apparaissent dans les sols des microcosmes biostimulés et/ou bioaugmentés

C'est le cas de *Colletotrichum* sp., *Fusarium equiseti*, *Fusarium* sp., *Humicola glauca* et *Penicillium* sp. retrouvées dans les sols biostimulés à partir de 1 mois d'incubation. La croissance de ces souches est probablement favorisée par la biostimulation du fait l'apport de nutriments et d'eau (milieu MEA) au sein des microcosmes.

- Souches présentes dans le sol T0 et dans les sols des microcosmes :

Deux souches de l'étude seulement sont retrouvées dans le sol de départ et dans les sols biostimulés : *Actinomucor elegans* et *Gliocladium virens*.

- *Gliocladium virens* est retrouvée à T0 et seulement à T1mois en biostimulation, elle n'est pas retrouvée en bioaugmentation à aucun temps d'incubation.
- La mucorale *Actinomucor elegans* est retrouvée dans le sol R (T0) et à T15 jours dans les deux conditions (biostimulation et bioaugmentation). Elle est également retrouvée à T2 mois en biostimulation. Cependant, en bioaugmentation, à partir de T15 jours, on peut supposer que des phénomènes de compétition se produisent conduisant à la dominance d'*Absidia cylindrospora* par rapport aux autres souches, ce qui conduit à la diminution ou la disparition d'autres espèces fongiques. On remarque ainsi que le nombre d'espèces fongiques présentes lors des essais de bioaugmentation est plus faible que le nombre de souches retrouvées en biostimulation. Ceci peut être expliquée par la diminution de la biodiversité fongique au dépend de l'augmentation du nombre d'espèces les plus tolérantes aux métaux et qui deviennent dominantes dans le milieu (Bellion 2006), ce qui est le cas ici d'*Absidia cylindrospora*.

La souche fongique *Trichoderma* sp. est identifiée aux quatre durées d'incubation dans les deux conditions (biostimulation et bioaugmentation), mais n'est pas mise en évidence à T0.

En effet l'apport de nutriments a dû stimuler sa croissance dans les sols des microcosmes. Cette souche a également été isolée à partir des essais en microcosmes de sols avec le sol synthétique. Les espèces du genre *Trichoderma* sont connues pour leur excellente adaptation à différentes conditions environnementales et niches écologiques, ainsi que la production d'une grande variété de métabolites. Elles sont considérées comme les principaux décomposeurs de l'écosphère (Hermosa et al. 2014; Felix et al. 2014).

*Trichoderma* spp. a été largement étudié pour ses capacités de bioaccumulation des polluants métalliques et organiques (Anand et al. 2006; Joshi et al. 2011; Sahu et al. 2012; Bandurska et al. 2021). Cette souche a montré son efficacité à traiter Cd, Pb (Joshi et al. 2011; Sahu et al. 2012) et Cu (Anand et al. 2006). Il serait d'ailleurs intéressant de tester cette souche en bioaugmentation.

La remarque primordiale est la mise en évidence de la souche *Absidia cylindrospora*, introduite en bioaugmentation, à tous les temps d'incubation de 15 jours à 3 mois. Ceci confirme sa viabilité au sein du microcosme durant nos essais de bioaugmentation.

Les études avec le sol synthétique avaient montré la viabilité de la souche jusqu'à 1 mois au sein du microcosme au contact d'un sol pollué (chapitre 4-partie III.4. 2), mais cette fois-ci même après une expérimentation de 3 mois, la souche est encore viable. Il est aussi visible sur les photographies (figure 30), qu'*Absidia cylindrospora* est dominante dans le microcosme à tous les temps d'incubation.

On dénombre initialement  $3 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de sol pour le sol R. Ce nombre d'UFC.g<sup>-1</sup> de sol augmente pour les essais de biostimulation et atteint  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> à T 15 jours, ce qui confirmerait l'hypothèse que des souches se développent durant la biostimulation.

Pour les sols bioaugmentés (pour lesquels Ac est dominante), le nombre d'UFC.g<sup>-1</sup> de sol atteint  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> dès T15 jours, puis diminue à partir de 1 mois pour se stabiliser autour de  $5.10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>. Ceci est cohérent avec la diminution de la biomasse d'*Absidia cylindrospora* constatée précédemment.

En conclusion, 8 souches sont initialement identifiées dans le sol R, alors qu'un nombre moins important de souches est identifié dans les sols des microcosmes dans les deux conditions (A et S) et pour les quatre durées d'incubation. Le nombre de souches identifiées dans les microcosmes biostimulés est plus important que celui identifié dans les microcosmes bioaugmentés. Ceci est dû au phénomène de dominance de la souche *Absidia cylindrospora* introduite en bioaugmentation qui conduit à la diminution de la biodiversité fongique au dépend d'*Absidia cylindrospora*. Ceci n'a pas empêché d'isoler des souches à partir des microcosmes qui initialement n'étaient pas présentes dans le sol R, comme *Colletotrichum* sp, des espèces

*Fusarium* sp. et *F. equiseti*, *Humicola glauca*, *Penicillium* sp. et *Trichoderma* sp. Ces espèces ont toutes été décrites dans plusieurs études (Zafar et al. 2007; Porri et al. 2011 ; Awad et Kraume 2011; Iram et al. 2013; Mohammadian et al. 2017) comme des espèces fongiques tolérantes aux métaux et ont été isolées à partir de sols ou d'effluents pollués. En effet, les nutriments apportés par la biostimulation et la bioaugmentation ont stimulé la croissance et le développement de ces souches, qui étaient sans doute présentes dans le sol R à T0, mais peut être en trop faible quantité pour être isolées et par conséquent identifiées.

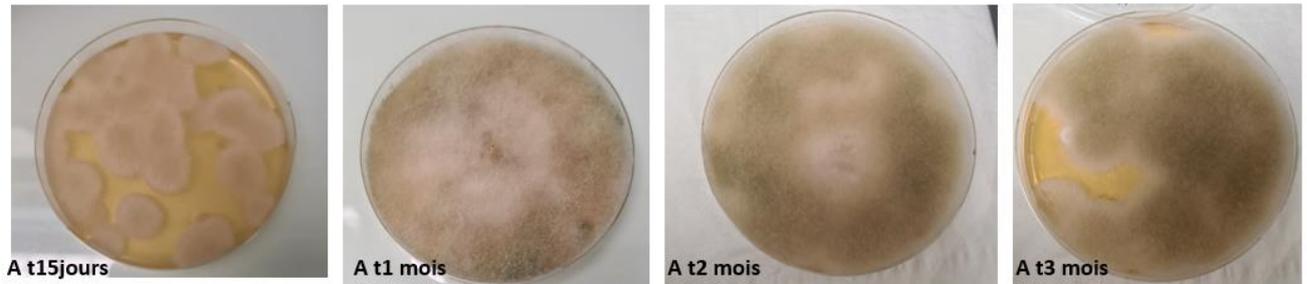


Figure 30. Photographies des cultures obtenues par la méthode d'incorporation directe à partir du sol des microcosmes bioaugmentés aux différents temps d'incubation.

## II.4) Suivi des métaux

### II.4.1) Teneurs totales dans les composants des microcosmes

Les matrices (sol et mycélium) sont minéralisées selon le protocole de minéralisation totale présenté en chapitre II partie I-4 pour déterminer les teneurs en métaux dans chacune d'elle.

#### II.4.1.1) Teneurs des métaux dans les sols

Le tableau 29 présente les teneurs des métaux dans le sol initial R, ainsi que les teneurs dans les sols issus des essais de biostimulation et de bioaugmentation, aux différents temps d'incubation (15 jours ,1 mois, 2 mois, 3 mois).

Tableau 29. Teneurs en métaux dans les sols biostimulés et bioaugmentés aux temps d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois).

mg.kg <sup>-1</sup>	sol R (T0)	condition	T15 j	T1 mois	T2 mois	T3 mois
<b>Cd</b>	8 ±2	S	8 ± 1	8 ± 2	8 ± 1	7 ± 1
		A	8 ± 1	7 ±1	7 ±1	8 ± 1
<b>Cr</b>	27±3	S	28 ± 1	25 ± 1	25 ± 1	23 ± 3
		A	27 ± 1	25 ± 1	27 ± 1	25 ± 3
<b>Co</b>	7±1	S	8 ± 1	8 ± 1	11±3	8 ± 1
		A	8 ± 1	8 ± 1	9±1	9±1
<b>Cu</b>	130±10	S	129 ± 11	132 ± 7	139 ± 4	128 ± 4
		A	133 ± 9	128 ± 8	140 ± 2	134 ± 1
<b>Ni</b>	18±1	S	18 ±1	20 ± 1	21 ± 1	20± 1
		A	19 ±1	20± 1	21 ± 1	21± 2
<b>Pb</b>	650±56	S	693 ± 27	706 ± 182	666 ± 52	634 ± 82
		A	637 ± 38	718 ± 153	613 ± 14	615 ± 24
<b>Zn</b>	795±85	S	811 ± 30	786 ± 39	795 ± 17	763 ± 25
		A	781 ± 45	785 ± 15	776 ± 10	767 ±12

S : biostimulation ; A : bioaugmentation

A partir des résultats présentés dans le tableau 29, il est observé que les niveaux de métaux dans les sols des essais de bioaugmentation et de biostimulation sont similaires et ne varient pas en fonction du temps (stables de T0 à T3 mois). Cd est à un niveau de 8 mg.kg<sup>-1</sup> dans le sol R à T0 et les sols biostimulés et bioaugmentés, Cr est entre 23 et 28 mg.kg<sup>-1</sup>, Co est à des teneurs variant de 8 à 11 mg.kg<sup>-1</sup>, Cu à des teneurs variant entre 128 et 140 mg.kg<sup>-1</sup>. Ni est retrouvé à des teneurs entre 18 et 21 mg.kg<sup>-1</sup>, Pb entre 613 et 693 mg.kg<sup>-1</sup> et Zn entre 763 et 811 mg.kg<sup>-1</sup> (p>0,05)

Il serait sans doute envisageable d'augmenter la biomasse de départ introduite dans le microcosme pour atteindre des niveaux plus élevés de biosorption, ce qui pourrait conduire à des teneurs en métaux dans les sols plus faibles à la fin de l'essai de la durée de la bioaugmentation.

Une autre solution peut être proposée, qui est l'utilisation d'un consortium qui permettrait de se rapprocher des conditions d'un environnement réel présentant une diversité (Tyagi et al. 2011). En effet, plusieurs études sont basées sur l'emploi d'un consortium de bactéries (Fuentes et al. 2014 ; Joutey et al. 2015) ou de champignons (Awasthi et al. 2014) pour traiter une contamination métallique (Fulekar et al. 2012 ; Hassan et al. 2020) ou organique (Blanco-Enríquez et al. 2018) ou mixte (Mishra et Malik 2014).

Plusieurs auteurs (Anand et al. 2006; Dey et al. 2016; Amin et al. 2016; Mishra et al. 2019) évaluent le « pourcentage d'élimination » à partir de la différence entre la concentration initiale et finale (après traitement). Cette différence rend compte de la capacité d'une espèce à la bioremédiation pour un polluant donné. Cependant, ces études sont réalisées en milieu liquide et traitent d'un autre champ de compétences (cinétique, modèles de Langmuir, équation de Freundlich). Leur objectif est d'évaluer l'efficacité d'un traitement. Cependant, dans les études en milieu solide (microsome de sol), le calcul du « facteur de bioaccumulation » est le plus préconisé (Li et al. 2010; Damodaran et al. 2014; Wang et al. 2018) et vise à évaluer la capacité d'accumulation d'une espèce.

L'étude en microcosme de sol de Srivastava et al. (2006) a montré que pour un microcosme témoin (sans champignon), le pourcentage d'élimination de Cr est de 5%. Tandis que pour les microsomes bioaugmentés (*Aspergillus niger*), le taux d'élimination de Cr pour un sol contaminé en Cr à 250 ppm est de 75% à 15 jours d'incubation. Cependant, pour notre étude, les variations inexistantes de concentrations entre le sol de départ et le sol traités par bioaugmentation ne permettent pas de faire un calcul de ce pourcentage.

#### II.4.1.2) Teneurs des métaux dans les mycéliums issus des essais de bioaugmentation

La figure 31 présente les teneurs en métaux accumulées au sein des mycéliums des microcosmes aux différents temps d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois).

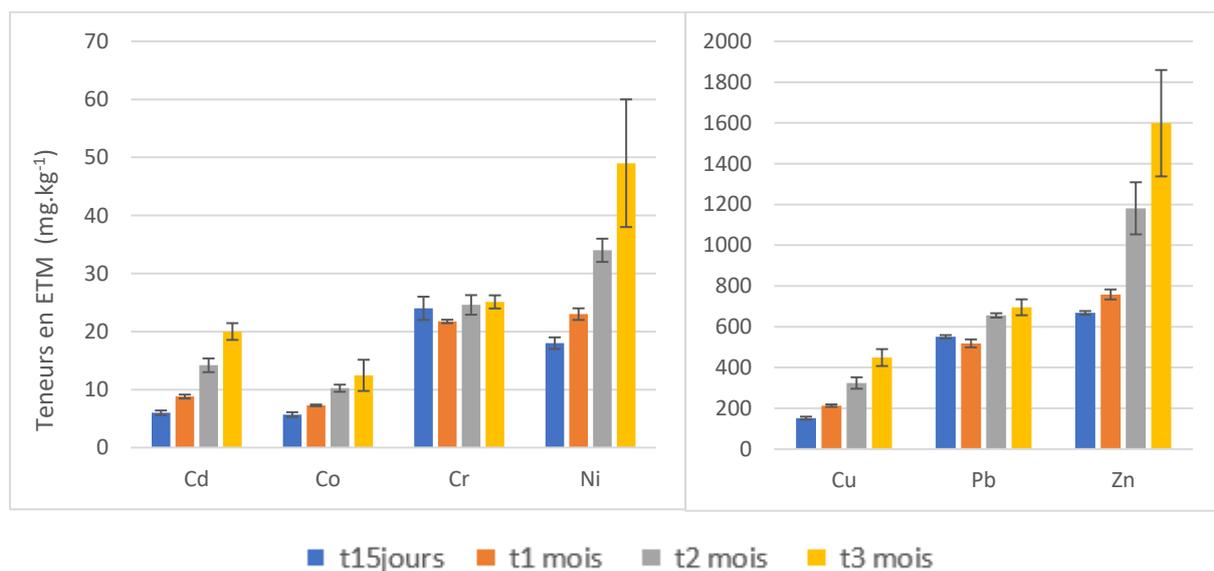


Figure 31. Teneurs en Cd, Co, Cr, Ni et Cu, Pb, Zn dans les mycéliums des essais de bioaugmentation aux temps d'incubation (15j, 1 mois, 2 mois, 3 mois).

Dès 15 jours les concentrations en métaux retrouvées dans les mycéliums sont non nulles (annexe n°10) pour tous les métaux étudiés (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn). Il y a donc biosorption, principalement par la souche fongique *Absidia cylindrospora* introduite dans les microcosmes.

Cette souche fongique semble donc capable d'accumuler simultanément tous les métaux de l'étude. Cette propriété est caractéristique de certaines souches fongiques comme *Aspergillus niger* qui a démontré son efficacité à traiter simultanément Pb, Cd, Ni, Cr, Zn, Mn (Kumari et al. 2019). Cependant, l'accumulation est variable selon l'élément. On note que les teneurs en Cd, Co, Cu, Ni et Zn accumulées dans les mycéliums ont tendance à augmenter au cours du temps, tandis que Cr et Pb semblent stables dans le temps.

Il est important de noter que la masse des mycéliums recueillis à l'issue des temps d'incubation n'augmente pas en fonction du temps (figure 29), donc l'évolution de l'accumulation des métaux au sein des mycéliums n'est pas liée à une biomasse plus importante. Autrement dit, le paramètre qui influence l'accumulation des métaux au sein du mycélium est le temps (âge du mycélium).

L'hypothèse que plus l'âge du mycélium est avancé, plus il biosorbe de métaux, formulée par plusieurs auteurs (Kalač et Svoboda 2000; Ali et al. 2017), est vérifiée dans le cas de Cd, Co, Cu, Ni et Zn dans les conditions de notre étude.

Pour le cas de Cr et Pb, deux hypothèses seraient envisageables. Il est possible que ces deux métaux soient uniquement biosorbés au niveau de la surface (paroi) cellulaire et non accumulés à l'intérieur des cellules du champignon, ce qui expliquerait la stabilité de leurs concentrations au sein du mycélium en fonction du temps.

En effet, la bioaccumulation, comme décrit précédemment (chapitre I, partie VI.3.2) se déroule en deux étapes : une première étape consiste à adsorber les métaux sur la paroi cellulaire et une seconde étape à transporter les métaux à l'intérieur des cellules via des systèmes de transport actif consommant de l'énergie. Les métaux sont généralement stockés au niveau des vacuoles (Abbas et al. 2014 ; Hlihor et al. 2017 ; Castro et al. 2019).

La deuxième hypothèse est que les sites de fixation de métaux (Cr et Pb) soient saturés à partir de 15 jours d'incubation. En effet, comme la biomasse n'augmente pas, la surface d'échange n'augmente pas et par conséquent le nombre de sites de fixation n'évolue pas. Ceci pourrait donc expliquer les concentrations stables de Cr et Pb dans les mycéliums d'*Absidia cylindrospora* à tous les temps d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois et 3 mois).

De plus, une corrélation peut être faite entre la teneur en ETM dans le sol (R) et les teneurs en ETM dans le mycélium tout au long des périodes d'incubation. Ces corrélations sont présentées dans la figure 32. Les coefficients de détermination ( $r^2$ ) des 4 courbes correspondant aux 4 périodes d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois et 3 mois) sont tous supérieurs à 0,98. En effet, les données montrent une bonne corrélation entre les teneurs en ETM dans le sol (R) et les teneurs en ETM dans le mycélium tout au long des périodes d'incubation, ce qui confirme les hypothèses formulées précédemment dans ce paragraphe (les métaux les moins concentrés dans les mycéliums correspondent aux métaux les moins concentrés dans le sol).

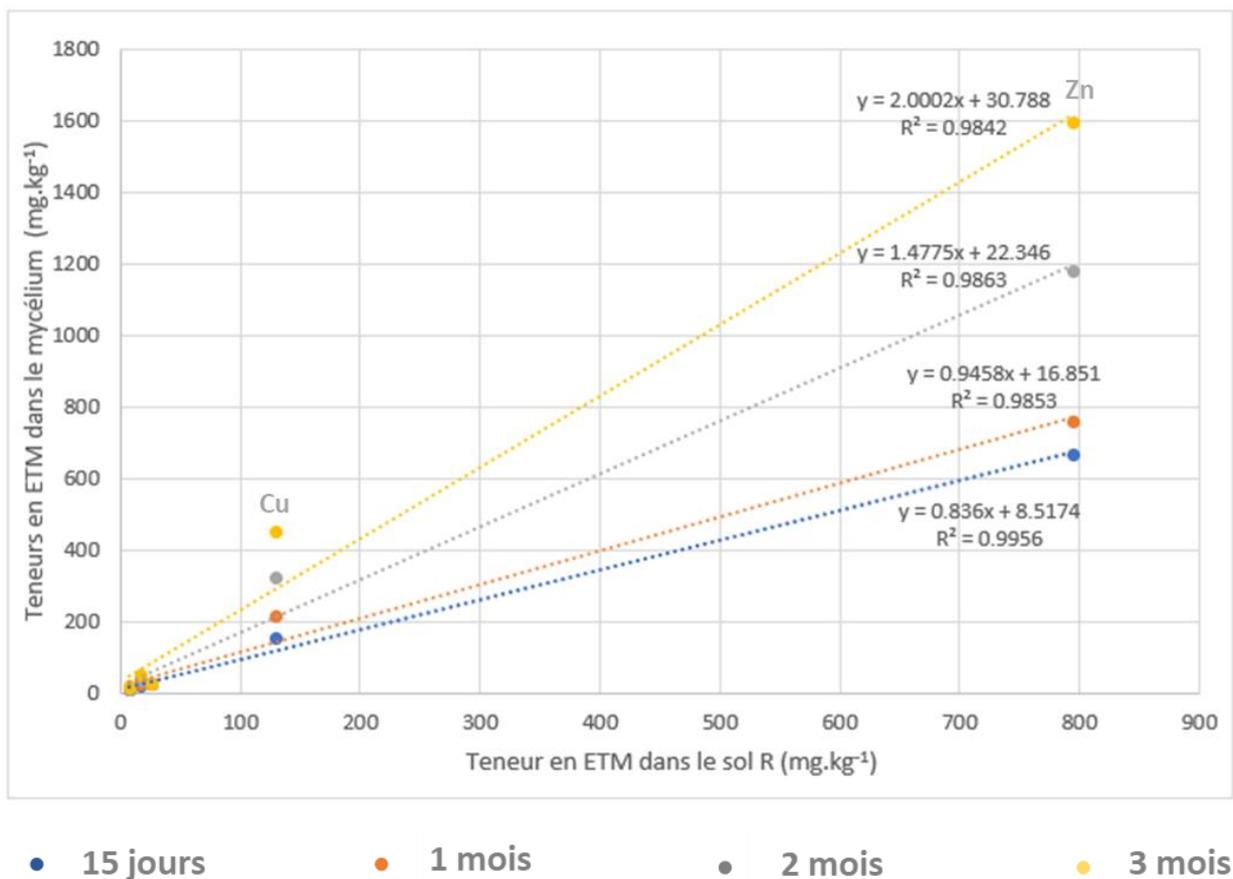


Figure 32. Corrélations entre les teneurs en ETM dans le sol R et dans les mycéliums des microcosmes bioaugmentés.

Ainsi Cd et Co sont les métaux les moins concentrés dans le mycélium et dans le sol. Ces métaux présentent les mêmes concentrations dans les sols ( $7,2 \pm 0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$  et  $8 \pm 2 \text{ mg.kg}^{-1}$  respectivement pour Co et Cd) et approximativement les mêmes teneurs dans les mycéliums aux premiers temps d'incubation (15 jours et 1 mois). En effet, *Absidia cylindrospora* a biosorbé à 15 jours  $5,8 \pm 0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Cd et  $5,7 \pm 0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Co et à 1 mois d'incubation, la souche a biosorbé  $8,8 \pm 0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Cd et  $7,3 \pm 0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Co.

D'autre part, si on prend l'exemple de Zn, la concentration dans le sol R (substrat) est de  $795 \pm 85 \text{ mg.kg}^{-1}$  et la concentration dans le mycélium à T3 mois est de  $1598 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Ces valeurs représentent les valeurs les plus élevées par rapport aux autres métaux de l'étude tant pour le sol que pour le mycélium. Ceci permet de confirmer que la biosorption des métaux par la biomasse fongique semble donc dépendre fortement de leur concentration dans le sol, c'est-à-dire que plus le substrat (sol) est concentré en un métal donné, plus l'organisme de bioremédiation accumulera de métal. Ceci est en accord avec l'étude de Abbas et al. (2014) qui constate qu'en augmentant les teneurs initiales dans le sol, les teneurs accumulées dans la biomasse seront plus importantes. De même, Farhan et Khadom (2015) constatent que la capacité d'accumulation du Pb, Cd, Cr, Cu, Co et Zn par *Saccharomyces Cerevisiae* augmente avec l'augmentation de la concentration initiale en métal dans le substrat.

Ce constat est également confirmé pour des études en milieu liquide. Joshi et al (2013) affirment que la biosorption du Pb par les champignons de leur étude augmente avec la concentration en métal dans le milieu. Une étude menée par Sturini et al. (2017) montre également que la capacité de la souche fongique *Perenniporia fraxinea* à bioaccumuler Cd et Hg augmente en augmentant la concentration de ces métaux dans le milieu de culture.

Afin d'interpréter les résultats obtenus, les facteurs de bioaccumulation (BAF) sont calculés à chaque période d'incubation (présentés en figure 33).

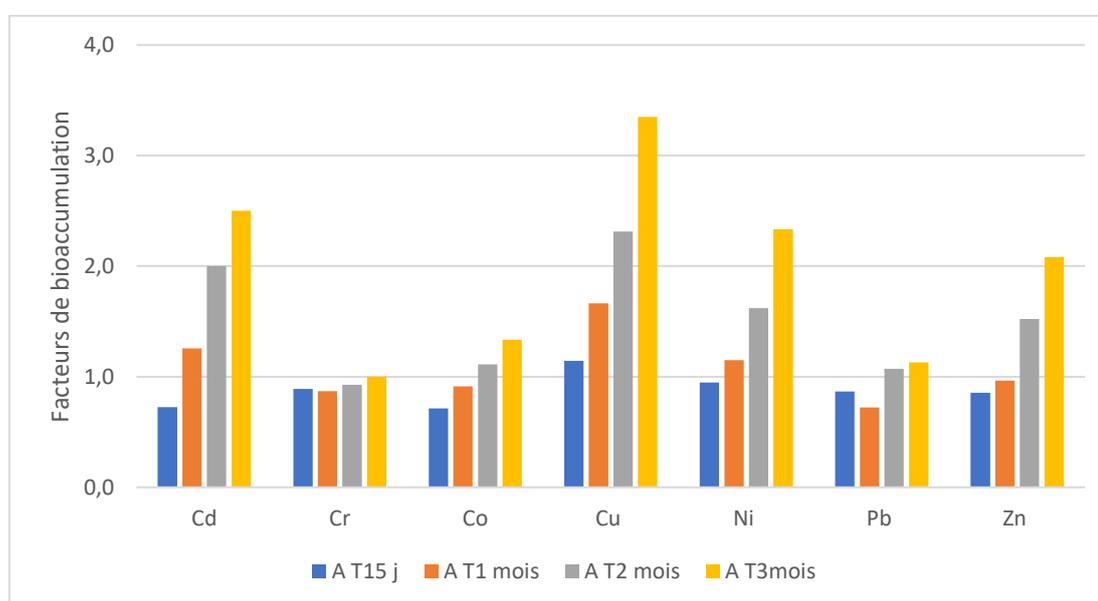


Figure 33. Facteurs de bioaccumulation des microcosmes bioaugmentés à 15 jours, 1 mois, 2 mois et 3 mois.

Les résultats montrent que tous les BAF sont supérieurs à 1, ce qui suggère que le mycélium accumule ces métaux (Damodaran et al. 2014) et confirme donc le constat qu'*Absidia cylindrospora* biosorbe ces éléments.

Les valeurs de BAF les plus faibles sont relevées pour Cr et Pb (entre 0,7 et 1,1), ce qui confirme les faibles niveaux d'accumulation de ces métaux au sein des mycéliums. En comparant les valeurs de BAF de Cr et Pb sur les 4 temps d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois et 3 mois), on remarque qu'il n'y a pas de variation au cours du temps. Cela veut dire que les niveaux d'accumulation de ces deux métaux sont non seulement faibles, mais également stables durant toute la durée de l'expérimentation. Pour Cd, Cu, Ni et Zn les BAF tendent à augmenter en fonction du temps : les valeurs varient de 0,7 à 15 jours à 2,5 à T3 mois pour Cd, de 1,1 à 3,4 pour Cu, de 0,9 à 2,3 pour Ni et de 0,9 à 2,1 pour Zn.

D'une manière générale, les valeurs de BAF des métaux pour la durée d'incubation T3 mois, peuvent être classés par ordre croissant : Cr (1,0) < Pb (1,1) < Co (1,3) < Zn (2,1) < Ni (2,3) < Cd (2,5) < Cu (3,4). Ce paramètre permet par conséquent de réaliser un classement par ordre décroissant des métaux accumulés par *Absidia cylindrospora* dans les conditions de l'étude.

Damodaran et al. (2014) ont réalisé une étude de bioaccumulation de ces mêmes métaux par un basidiomycète appelé *Galerina vittiformis*. Le classement suivant porte sur le potentiel de bioaccumulation des métaux par cette souche : Cr < Zn < Cu < Pb < Cd. Le Cr est le métal le moins accumulé par le basidiomycète, ce qui apparaît également dans nos résultats. L'étude menée par Mohammadian et al. (2017) montre que pour certaines souches fongiques, Pb est le métal le moins accumulé pour *Penicillium simplicissimum*, *Seimatosporium pistaciae*, *Trichoderma harzianum* et *Fusarium verticillioides*, l'ordre est : Pb < Cd < Zn < Cu, tandis que pour *Acremonium persicinum* et *Alternaria chlamydosporigena* l'ordre est le suivant : Pb < Cd < Cu < Zn. Ceci est en accord avec nos résultats, en effet Pb arrive à la deuxième position des métaux les moins accumulés par A.c.

Par ailleurs, bien que nos essais aient montré une biosorption de quantités assez importantes de métal en microcosme de sol, les teneurs totales en métaux dans les sols bioaugmentés ne varient pas. Ceci souligne la pertinence des essais en microcosmes de sol pour réaliser des essais de mycoremédiation. En effet, les études de biosorption en milieu liquide sont insuffisantes pour prédire l'efficacité de l'emploi d'une souche fongique en mycoremédiation. Plusieurs études (Wu et al. 2016; Sturini et al. 2017; Albert et al. 2019) font l'hypothèse que des souches fongiques montrant une biosorption efficace de métaux en milieu liquide peuvent être candidates à des essais de mycoremédiation. Selon les résultats de nos études, il est nécessaire de passer par « l'étape microcosme de sol » pour pouvoir appuyer cette hypothèse. En effet, Baldrian (2002) décrit le phénomène de biosorption des métaux à partir d'une solution liquide comme le mécanisme le plus simple déployé par les champignons pour absorber les métaux que ce soit en conditions réelles ou en laboratoire. En effet, les métaux ont une solubilité élevée en

milieu liquide et sont par conséquent plus aisément biosorbés par les champignons (Kumar et al. 2021). Pour cette raison, il n'est pas possible de lier directement l'efficacité de biosorption d'une souche fongique en milieu liquide à son efficacité en mycoremédiation de sols.

## II.4.2) Mobilité des métaux dans les sols des microcosmes

### II.4.2.1) Mobilité des métaux par extraction simple

Les sols des microcosmes issus des essais de bioaugmentation et de biostimulation sont soumis au protocole d'extraction simple avec HCl 1M (présenté en chapitre 2- partie I.2.5).

Les pourcentages extraits sont présentés en figure 34 (Cd, Cu, Pb et Zn) et 35 (Co, Cr et Ni).

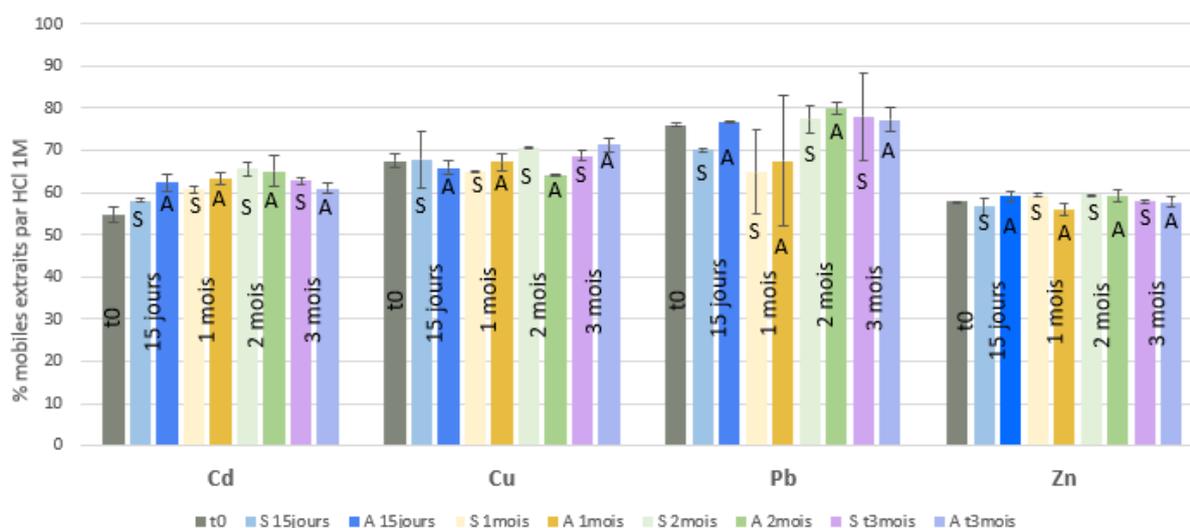


Figure 34. Pourcentages de Cd, Cu, Pb et Zn extraits par HCl 1M dans les sols des essais de bioaugmentation (A.c) et biostimulation aux temps d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois).

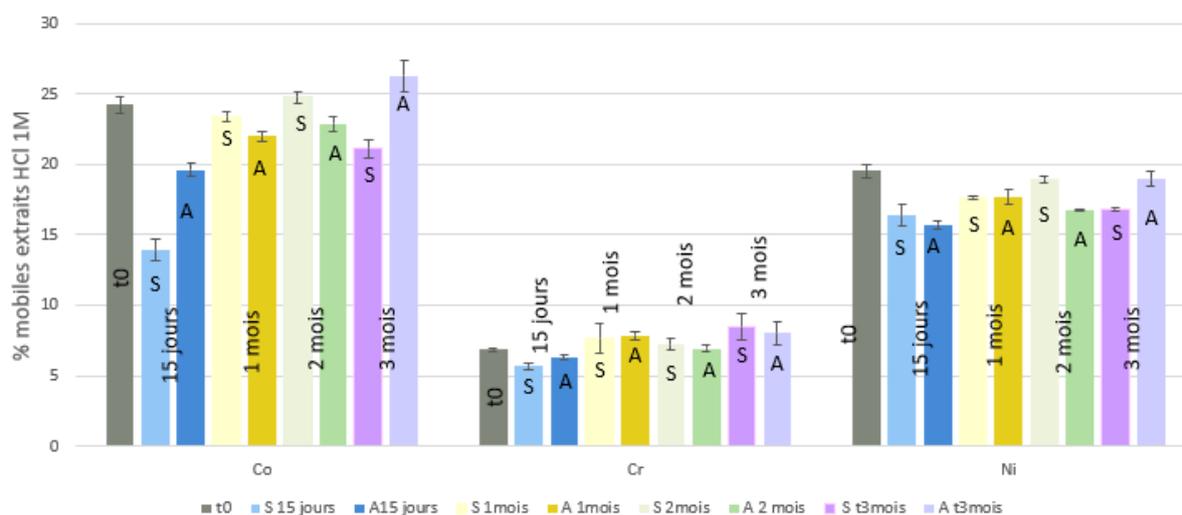


Figure 35. Pourcentages de Co, Cr et Ni extraits par HCl 1M dans les sols des essais de bioaugmentation (A.c) et biostimulation aux temps d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois).

D'une manière générale, il n'y a pas de variation observée entre les pourcentages des métaux ni entre les essais de biostimulation et de bioaugmentation ni entre les durées d'incubation de l'expérience dans les mêmes conditions ( $p < 0,05$ ). La bioaugmentation avec la souche fongique *Absidia cylindrospora* ne semble pas agir sur la disponibilité potentielle des métaux même après 3 mois d'incubation.

Il est observé que Cd, Cu, Pb et Zn présentent les pourcentages les plus élevés et sont compris entre 60 et 80%, tandis que les pourcentages de Co, Cr et Ni sont compris entre 10 et 25% (environ 8% pour Cr ; entre 15-20% pour Ni ; environ 25% pour Co). On peut classer les métaux par ordre de disponibilité décroissante : Pb>Cu>Cd>Zn>Co>Ni>Cr.

Globalement, cet ordre-là est globalement cohérent avec l'ordre d'accumulation des métaux au sein du mycélium (Cu>Cd>Ni>Zn>Co>Cr) pour tous les métaux, en ne considérant pas Pb. Ces résultats suggèrent d'une part que les métaux les plus disponibles sont les métaux les plus biosorbés au sein du mycélium dans les conditions de l'étude et que d'autre part l'extraction HCl 1M est un bon indicateur de la disponibilité potentielle des métaux vis-à-vis de la souche *Absidia cylindrospora*. Pour le cas de Pb, bien qu'ayant une fraction potentiellement disponible assez élevée (estimée à environ 80% avec l'extraction HCl 1M), son BAF est de 1,1 seulement pour T3 mois. L'hypothèse que la biodisponibilité du métal vis-à-vis de l'organisme (ici *Absidia cylindrospora*) peut être liée directement à son accumulation par ce dernier n'est donc pas vérifiée pour Pb dans le cas de notre étude. Cependant il a été montré que l'extraction à HCl tend à sous-estimer la fraction potentiellement mobile (Leleyter et al. 2012) ou à la sur-estimer (Albert 2019) surtout pour Pb. En effet, cette hypothèse serait plus cohérente avec nos résultats qui montrent des pourcentages potentiellement disponibles en Pb assez élevés (environ 80%).

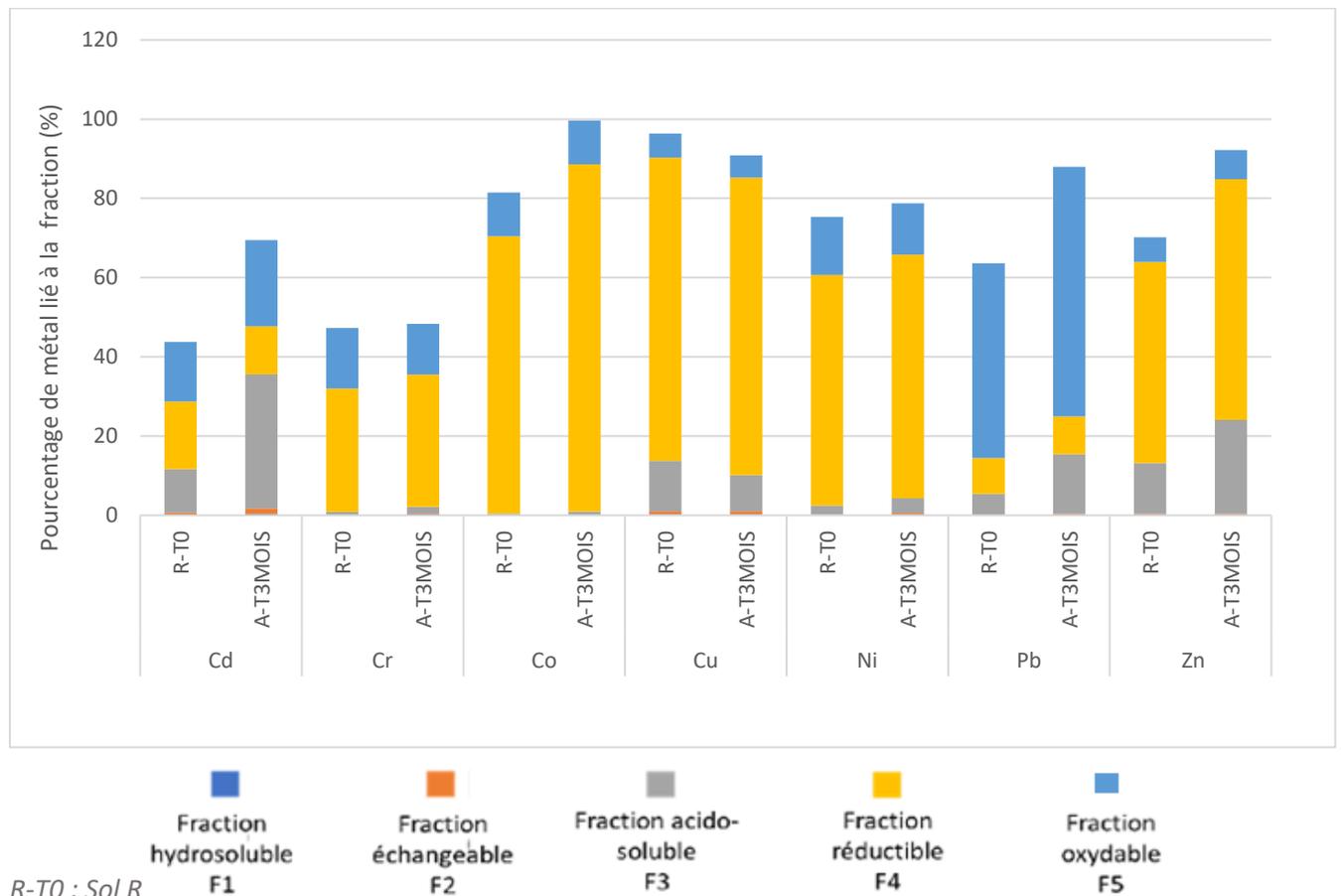
#### *II.4.2.2) Mobilité des métaux par extraction séquentielle*

Le sol issu du microcosme de bioaugmentation à la fin de l'expérimentation (T 3 mois) est soumis au protocole d'extraction séquentielles, selon Leleyter et Probst (1999) présenté en chapitre 2- partie I.5.2.

La répartition des métaux (Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb et Zn) au sein des différentes fractions minéralogiques du sol bioaugmenté en fin d'expérience à T 3 mois (appelé A T 3 mois) est présentée en figure 36. Elle est comparée sur cette même figure à la répartition observée sur le sol initial R (R-T0) afin d'estimer l'impact potentiel de la bioaugmentation avec la souche *Absidia cylindrospora* sur la spéciation minéralogique des métaux étudiés.

Les études de l'influence de micro-organismes sur la spéciation minéralogique de métaux sont très peu disponibles (Albert 2019), néanmoins des études ont été réalisées sur l'influence du compost (humus, matière organique) sur la spéciation minéralogique des métaux (L. Wang et al. 2019 ; Liang et al. 2017).

Toutefois, le métabolisme fongique peut induire la sécrétion de composés tels que les acides organiques, qui favorisent l'acidification du sol, ou encore des sidérophores ou des métallothionéines, connus pour complexer les métaux (Renshaw et al. 2002) (chapitre I-partie VII). L'hypothèse serait que ces composés potentiellement sécrétés interagissent avec les ETM à travers des mécanismes de sorption, de chélation et/ou de volatilisation et par conséquent modifient la répartition minéralogique de ces derniers (Gadd, 1999 ; Gadd 2004).



A-T3 mois : sol R bioaugmenté (A) à 3 mois d'incubation

Figure 36. Répartition de Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb et Zn au sein des différentes fractions potentiellement labiles du sol R (t0) et du sol A 3 mois.

D'une manière générale, il est observé après les essais que la fraction mobile totale F6 a augmenté pour Cd, Co, Ni, Pb et Zn de 26, 18, 3, 24 et 22% respectivement en comparant le sol à T0 (sol R) au sol à T 3 mois (A- T3 mois).

Seule la fraction mobile totale de Cr ne subit pas de variation entre le sol T0 et le sol à 3 mois, aussi il n'y a pas eu des transferts de Cr entre les différentes fractions minéralogiques.

Les fractions : acido-soluble (F3), réductible (F4) et oxydable (F5) ont vu leur pourcentage varier après bioaugmentation à 3 mois pour les métaux de l'étude sauf Cr, tandis que les fractions F1 et F2 restent négligeables (0 et 1%) pour tous les métaux de l'étude.

Dans la F3 (acido-soluble), des pourcentages sont très faibles voire négligeables sont notés pour Cr et Co (entre 0 et 2%), ceci veut dire que la bioaugmentation (A.c) n'a pas eu d'influence sur ces 2 métaux associés à cette fraction. Pour d'autres métaux, après le traitement de bioaugmentation, cette fraction a doublé ( $F3(Zn)_{T0}=13\%$  et  $F3(Zn)_{T3mois}=24\%$ ) et triplé (Cd :  $(Cd)_{T0}=11\%$  et  $(Cd)_{T3mois}=34\%$  ; Pb :  $(Pb)_{T0}=5\%$  et  $(Cd)_{T3mois}=15\%$ ), tandis que pour Cu, elle a légèrement baissé (de 13 à 9%).

Tous les métaux de l'étude restent liés majoritairement à la fraction réductible (F4), sauf Pb, majoritairement lié à la F5 (oxydable) (49 et 63% pour T0 et T3 mois respectivement). Pb est le métal qui présente donc le moins d'affinité pour la F4, suivi du Cd. Ainsi, le classement croissant des métaux au sein de cette fraction est comme suit :  $Pb_{(F4)} (10\%) < Cd_{(F4)} (entre\ 12\ et\ 17\%) < Cr_{(F4)} (entre\ 31\ et\ 33\%) < Zn_{(F4)} (entre\ 51\ et\ 61\%) < Ni_{(F4)} (58\ et\ 62\%) < Cu_{(F4)} (entre\ 75\ et\ 77\%) < Co_{(F4)} (entre\ 70\ et\ 88\%)$ .

Pour ce qui est de la fraction oxydable (F5), tous les métaux y sont faiblement liés (entre 6 et 22%), sauf pour Pb qui présente une très grande affinité à cette fraction, il y est associé à 49% pour le sol R (T0) et 63% pour le sol à T3 mois. Les pourcentages de Co et Zn dans cette fraction sont similaires (environ 6%). Il en est de même pour Cr et Ni (environ 14%). Le pourcentage de Co, Cr, Ni et Zn associé à cette fraction n'a pas été influencé par la bioaugmentation avec A.c.

Les paragraphes suivants détaillent la répartition minéralogique de chaque ETM.

Par ailleurs, en prenant en compte l'accumulation des ETM par *Absidia cylindrospora* à travers cette étude de 3 mois, on remarque que Cu est le métal le plus accumulé avec un BAF de 3,4 alors que Cr est le métal le moins accumulé par *Absidia cylindrospora* avec un BAF de 1 seulement. Ceci peut être mis en regard de la proportion mobile totale de Cu et Cr. En effet, Cu présente la proportion F6 la plus élevée (96%) et Cr la plus faible (47%). Ce constat n'est pas vérifié pour les autres métaux de l'étude. L'hypothèse que le métal le plus accumulé par *Absidia cylindrospora* est le métal qui présente la plus grande proportion de la F6 n'est cependant valable que pour Cu et le contraire est vrai pour Cr seulement.

- **Cr :**

Cr est resté majoritairement lié à la fraction réductible (31% à T0 et 33% à T3 mois) et a baissé de 2% seulement au sein de la F5 en passant de 15 à 13% pour T 3 mois. Albert (2019) a étudié la spéciation minéralogique du Cr dans des sols bioaugmentés avec la même souche en employant le même protocole d'extraction (Leleyter et Probst 1999). Ce dernier constate que la fraction réductible n'a pas varié et que la fraction oxydable a augmenté de 6%. Nos résultats sont comparables pour la fraction réductible (qui a seulement augmenté de 2%), cependant pour la fraction oxydable, une légère baisse de 2% ne peut être comparée à une augmentation de 6%. Une variation de 2% reste toutefois contestable, il est possible de dire que la répartition de Cr n'a finalement pas évolué entre le sol R et le sol à T3 mois, la bioaugmentation avec *Absidia cylindrospora* n'a pas eu d'incidence sur sa répartition minéralogique.

- **Cu :**

La répartition de Cu au sein des fractions minéralogiques est restée inchangée entre le sol R (T0) et le sol bioaugmenté à T3 mois. Les fractions F1, F2 et F5 restent inchangées (0%, 1% et 6% respectivement pour T0 et T 3 mois), tandis que les pourcentages de Cu retenus dans les fractions F3 et F4 ont légèrement baissé après 3 mois. Cu reste prédominant dans la fraction réductible (F4) (77% à T0 et 75 % à 3 mois) par rapport aux autres fractions et présent dans la fraction acido-soluble F3 à hauteur de 13%. En effet, Cu est passé de 13 à 9%, soit une diminution de 4% seulement entre le sol T0 et le sol bioaugmenté. Albert (2019), en réalisant la bioaugmentation avec la même souche, note une baisse de 10% de la fraction réductible et une augmentation de 5% de la fraction oxydable. Il assimile cette augmentation à un transfert de Cu depuis la fraction réductible vers la fraction oxydable. Cependant, nous n'obtenons pas les mêmes résultats puisque la fraction réductible a subi une légère baisse de 2% et que la fraction oxydable est restée inchangée. Selon Farrell et Jones (2009), Cu a une grande affinité avec la matière organique et serait préférentiellement transféré d'une phase faiblement liée à la MO à une phase plus riche en MO (fraction oxydable). Ceci confirme l'hypothèse émise par l'étude de Albert (2019). Or, pour notre étude, cette hypothèse n'est pas vérifiée, le Cu est faiblement lié à la fraction oxydable (6%) et préférentiellement lié à la fraction réductible (75%).

- **Cd :**

Cd est le métal ayant la plus grande variation de la fraction totale mobile comparé aux métaux de l'étude. En effet, la fraction mobile totale de Cd a augmenté de 26% (44% à T0 à 70% à 3 mois).

L'étude de bioaugmentation réalisée par Albert (2019) sur trois souches fongiques (*Absidia cylindrospora*, *Chaetomium atrobrunneum* et *Coprinellus micaceus*) a montré que *Absidia cylindrospora* a la plus grande influence sur la répartition minéralogique de Cd par rapport aux deux autres souches testées. Toutefois, les résultats montrent une légère baisse de la proportion mobile de Cd.

Pour notre étude, la fraction acido-soluble (F3) a triplé entre T0 (11%) et T3 mois (34%). Cette fraction est connue pour être sensible aux variations du pH (Leleyter et Baraud 2006), une augmentation de pH induit une baisse de compétition des protons et conduit donc à des formes plus stables (Peng et al. 2009). Une mesure de pH devrait confirmer l'hypothèse. La quantité limitée de sol n'a pas permis de réaliser cette mesure en appliquant le protocole de mesure de pH décrit en chapitre 2- partie I.1). Les variations des pourcentages dans les autres fractions sont beaucoup plus faibles (-5 et +7% pour la fraction F4 et F5 respectivement). Le Cd reste faiblement lié à ces fractions et les variations assez faibles pour pouvoir conclure.

- **Co :**

Les fractions F1, F2 et F3 sont négligeables à T0 et le restent à T3 mois. Co est faiblement lié à la fraction oxydable et son pourcentage reste inchangé après la bioaugmentation (11% pour T0 et T 3 mois). Le Co est majoritairement lié à fraction réductible et une augmentation significative (+18%) est notée : elle passe de 70% à T0 à 88% à 3 mois. Ceci peut laisser penser à un transfert de la fraction résiduelle vers celle-ci, d'autant plus que la F6 augmente de 18%.

- **Ni :**

Les pourcentages de Ni liés à la fraction lessivable à l'eau et la fraction échangeable sont nuls. Ni est très faiblement lié à la fraction acido-soluble F3 avec 2% seulement dans le sol R (T0) et 4% pour le sol T3 mois. Il est associé à la fraction oxydable à 15 (T0) et 13% (T3 mois).

La majorité du Ni est fixée à la fraction réductible avec 58% pour le sol R (T0) et 62% pour le sol bioaugmenté à 3 mois. La bioaugmentation avec *Absidia cylindrospora* semble donc avoir peu d'influence sur la répartition minéralogique, en effet les variations notées sont de l'ordre de 2 et 4%, ce qui reste faible.

- **Pb :**

La fraction totale F6 de Pb a fortement augmenté en fin d'essai de bioaugmentation, passant de 64 % à 88% à 3 mois. Ces résultats sont cohérents avec ceux retrouvés par Albert (2019) qui indique une augmentation de F6. Pour son étude, la fraction potentiellement mobile de Pb a également augmenté, mais seulement de 5% environ après le traitement de bioaugmentation.

Pour notre étude, les fractions F1 et F2 de Pb sont nulles, alors que les fractions F3 et F5 ont connu une augmentation : F3 varie de 5 à 15% (+10%) et F5 de 49 à 63% (+14%).

Le pourcentage de F4 ne varie pas. Il est également observé que Pb reste majoritairement lié à la fraction oxydable (49 et 63% respectivement pour T0 et T3 mois). L'étude de Farrel et Jones (2009) montre également que Pb est lié majoritairement à la fraction réductible et oxydable.

Une acidification du milieu par des acides potentiellement produits par *Absidia cylindrospora*, que ce soit pour son métabolisme ou en réponse au stress métallique (Arwidsson et al. 2010) peut expliquer l'augmentation du pourcentage de Pb lié la F5 en bioaugmentation par rapport au sol témoin. En effet, Pb serait plus associé à la fraction oxydable (matière organique, acides organiques). De plus, l'extractabilité de Pb est fortement influencée par le pH (Leleyter 1999).

- **Zn :**

La fraction totale potentiellement disponible de Zn a augmenté de 22% passant de 70 (T0) à 92% (T3 mois), ce qui n'est pas en accord avec les résultats obtenus par Albert (2019) qui montre une forte diminution de la F6 de 76% à 44% après la bioaugmentation (A.c).

L'augmentation observée de F6 dans notre étude est due principalement à une augmentation des pourcentages liés à F3 (+11%) et F4 (+10%). En effet, la fraction oxydable (F5) n'a pas varié et le pourcentage de Zn lié à cette fraction reste faible (7%). Tandis que, les pourcentages de Zn liés à F1 et F2 restent nuls.

#### II.4.2.3) Comparaison de la fraction mobile totale F6 (extraction séquentielle) et l'extraction simple HCl

En comparant les pourcentages extraits par HCl et la fraction F6 totale extraite par le protocole des extractions séquentielles du sol bioaugmenté (A3 mois), il apparaît que ces dernières sont nettement plus agressives et extraient beaucoup plus les métaux par rapport à l'extraction simple HCl. Les pourcentages de métaux sont présentés en figure 37.

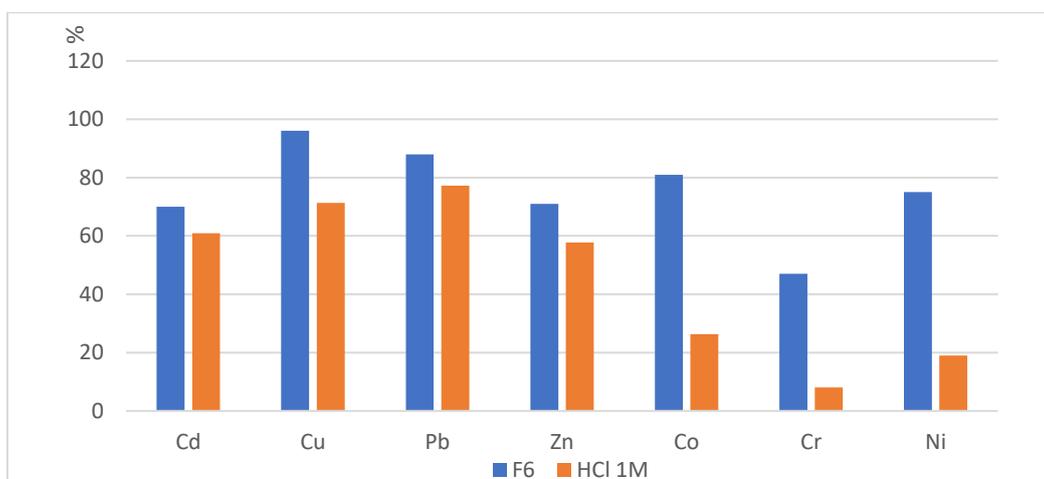


Figure 37. Pourcentages de Cd, Cr, Co, Cu, Ni et Zn lessivés par HCl et F6 dans le sol bioaugmenté à la fin de l'expérimentation (3 mois).

Les métaux peuvent encore une fois être regroupés en deux groupes :

« Cd, Cu, Pb, Zn » où les pourcentages de métaux extraits par HCl et par l'extraction séquentielle sont à peu près du même ordre de grandeur et sont estimés entre 58 et 96%. En effet, des variations entre 9 et 25% sont notées pour ces métaux entre les deux types d'extractions. Les variations sont de 9% pour Cd, 11% pour Pb, 13% pour Zn et 25% pour Zn.

« Co, Cr, Ni » où les pourcentages de métaux extraits par HCl sont beaucoup plus faibles par rapport à ceux extraits par l'extraction séquentielle. Les pourcentages extraits par HCl sont compris entre 8 et 25%, tandis que les pourcentages extraits par l'extraction séquentielle sont compris entre 50 et 80%. Les variations entre ces deux types d'extraction sont par conséquent beaucoup plus marquées. La variation la plus importante est notée pour Ni (66%), suivi de Co avec un écart de 55% et ensuite de Cr avec un écart de 55%.

Cuvier et al. (2021) ont réalisé une étude comparative des types d'extractions : simples (HCl et EDTA) et séquentielles (BCR et de Leleyter et Probst 1999) sur un sédiment de référence pour étudier la disponibilité de Al, Ca, Fe, Mn, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn. Les résultats de leur étude montrent que la fraction F6 (extraite par le protocole de Leleyter et Probst 1999) extrait d'avantage les métaux que l'extraction simple HCl, ce qui apparaît également dans nos résultats.

Pour leur étude, l'extraction séquentielle extrait environ deux fois plus de Ni (64% pour l'extraction séquentielle et 37% pour l'extraction HCl) et de Cu (100% contre 65% pour HCl) et trois fois plus de Zn (90% contre 65% pour HCl). Cependant des variations beaucoup plus faibles sont notées pour Cr (65% pour l'extraction séquentielle et 50% pour HCl) et Pb (30% pour l'extraction séquentielle et 25% pour HCl). Nos résultats ne sont pas tous en accord avec les données de Cuvier et al. (2021). En effet, nos résultats ont montré des variations assez faibles pour Cd, Cu, Pb et Zn, alors que les variations les plus importantes sont notées pour Ni, Co et Cr. Cependant, leur étude a pour objet un sédiment sans aucun traitement, contrairement à notre étude qui analyse un sol bioaugmenté par l'introduction d'une souche fongique, ce qui implique les mécanismes (sorption/ complexation) liés au métabolisme fongique (production d'acides organiques/ sidérophores).

## II.5) Conclusion

Les essais en microsomes de sol avec différentes périodes d'incubation nous ont permis de réaliser une étude détaillée du comportement des métaux présents dans le sol en présence de la souche fongique *Absidia cylindrospora*.

Cette souche a démontré sa capacité à accumuler simultanément Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb et Zn dans les conditions de l'étude. L'évaluation de l'accumulation des métaux au sein du mycélium dans des conditions réelles a révélé des écarts et disparités des niveaux d'accumulation des métaux. L'accumulation de Cr et Pb est stable au cours de l'essai (elle semble atteindre en effet un maximum dès 15 jours), tandis qu'elle augmente pour Cd, Co, Cu, Ni et Zn. En effet leur accumulation augmente avec le vieillissement du mycélium. La capacité d'accumulation des métaux par la souche fongique est corrélée aux niveaux des concentrations initiales dans le sol. Les métaux qui présentent les teneurs les plus élevées dans les sols sont les mêmes métaux qui se retrouvent les plus concentrés dans les mycéliums.

Aussi, l'ordre de disponibilité potentielle estimée par HCl des métaux est cohérent avec l'ordre d'accumulation de ces derniers au sein du mycélium (Cu>Cd>Ni>Zn>Co>Pb>Cr) pour tous les métaux, sauf pour Pb. Ceci est principalement dû aux difficultés d'extractibilité de Pb expliquées dans la partie I.4 (chapitre 3).

Ces essais nous ont également permis d'étudier l'influence de la bioaugmentation avec *Absidia cylindrospora* sur la répartition minéralogique des métaux au sein des fractions définies par le protocole de Leleyter et Probst (1999). L'évolution de la fraction totale mobile est différente selon les métaux étudiés : Cr ne subit pas de modification concernant la répartition des fractions minéralogiques, cependant la modification est plus marquée pour Cd, Co, Pb et Zn.

Par ailleurs, Cu est le métal le plus accumulé avec un BAF de 3,4 alors que Cr est le métal le moins accumulé par *Absidia cylindrospora* avec un BAF de 1 seulement. Ces deux métaux (Cu et Cr) présentent la fraction totale F6 la plus élevée ( $Cu_{(F6)} = 96\%$ ) et la plus faible ( $Cr_{(F6)} = 47\%$ ) respectivement par rapport aux autres métaux de l'étude.

Le suivi des espèces fongiques durant les différentes périodes d'incubation du microcosme (T15 jours à T3 mois) a permis de mettre en évidence des différences dans la composition de la microfonge après biostimulation et bioaugmentation. Ces observations pourraient être complétées par un suivi moléculaire des espèces présentes dans les sols des microcosmes.

### III. Microcosmes avec un sol réel pollué (R) bioaugmenté avec la souche fongique *Perenniporia fraxinea*

Cette série de microcosmes est réalisée de la même manière que les microcosmes avec la souche fongique *Absidia cylindrospora* présentés précédemment (partie II- chapitre 5), en employant cette fois-ci la souche fongique *Perenniporia fraxinea*. Les durées d'incubation sont semblables à l'essai en bioaugmentation avec le sol R et la souche fongique *Absidia cylindrospora*.

Les microcosmes sont aussi réalisés en trois réplicats pour chaque condition et chaque durée d'incubation, soit un total de 6 microcosmes par durée d'incubation (comme décrit en figure 27).

Les résultats de cette étude concernent le suivi de la microfonge à toutes les durées d'incubation, ainsi que la détermination des teneurs totales et potentiellement disponibles dans les sols des microcosmes bioaugmentés et biostimulés. Pour cet essai, la méthode de séparation n'a pas été efficace pour séparer le mycélium du sol, malgré une préparation identique du microcosme à celle du microcosme avec la souche fongique *Absidia cylindrospora* (présenté en partie II.1- figure 27) c'est-à-dire en laissant pousser un tapis de mycélium avant d'ajouter le sol par-dessus. Par conséquent, le mycélium n'a pas pu être récupéré en fin d'essai et ceci en raison de la pousse intra-matricale (c'est à dire dans la gélose) de la souche fongique *Perenniporia fraxinea*. La biosorption de métaux par la souche fongique P.f ne peut donc pas être évaluée avec l'usage de ce microcosme.

#### III.1) Analyse des métaux dans les composants des microcosmes bioaugmentés avec la souche fongique *Perenniporia fraxinea*

##### III.1.1) Teneurs totales dans les sols des microcosmes

Le tableau 30 présente les teneurs en métaux dans le sol R employé pour réaliser les microcosmes (deuxième colonne du tableau 30), ainsi que les teneurs en métaux dans les sols des microcosmes biostimulés et bioaugmentés aux différentes durées d'incubation.

Tableau 30. Teneurs en métaux dans les sols biostimulés et bioaugmentés (P.f) aux temps d'incubation (15j, 1 mois, 2 mois, 3 mois).

mg.kg <sup>-1</sup>	T0	condition	T 15 jours	T1 mois	T2 mois	T3 mois
<b>Cd</b>	13± 0	<b>S</b>	13 ± 1	12 ± 1	13 ± 1	13 ± 1
		<b>A</b>	13 ± 1	13 ± 1	13 ± 1	14 ± 1
<b>Cr</b>	25± 4	<b>S</b>	28 ± 2	29 ± 2	29 ± 0	26 ± 4
		<b>A</b>	30 ± 4	28 ± 1	29 ± 1	26 ± 3
<b>Co</b>	7± 0	<b>S</b>	7 ± 0	7± 0	7± 0	7± 0
		<b>A</b>	8 ± 1	8 ± 1	7± 0	7± 0
<b>Cu</b>	92 ± 3	<b>S</b>	80 ± 1	81 ± 3	82 ± 2	86 ± 4
		<b>A</b>	89 ± 7	85 ± 3	94 ± 21	91 ± 8
<b>Ni</b>	19 ± 1	<b>S</b>	17 ± 0	18 ± 1	18 ± 1	17 ± 1
		<b>A</b>	22 ± 6	19 ± 0	19 ± 1	18 ± 1
<b>Pb</b>	780 ± 12	<b>S</b>	794 ± 16	734 ± 27	742 ± 10	791 ± 45
		<b>A</b>	761 ± 9	754 ± 20	841 ± 168	780 ± 20
<b>Zn</b>	1065± 30	<b>S</b>	1110 ± 57	1030 ± 26	1077 ± 27	1113 ± 49
		<b>A</b>	1070 ± 14	1073 ± 25	1054 ± 27	1098 ± 31

Les teneurs dans le sol R employé pour réaliser les microcosmes avec P.f sont légèrement différentes des teneurs dans le sol R (présentées dans le tableau 30) employé pour préparer les microcosmes avec *Absidia cylindrospora*. Ceci est en raison de la préparation de deux mélanges différents de sol R à deux moments différents du projet de thèse. Les teneurs en métaux restent cependant comparables entre les deux mélanges préparés.

Pour ce qui est des teneurs en métaux dans les sols des microcosmes, il n'y a pas de variation observée ni entre les traitements (biostimulation et bioaugmentation) et les teneurs initiales ni entre les différentes durées d'incubation. La bioaugmentation avec la souche fongique P.f ne semble pas avoir d'incidence sur les teneurs totales en métaux dans les sols. Ces essais en microcosme de sols confirment encore une fois que la corrélation entre la biosorption de métaux par des souches fongiques en milieu de culture liquide et leur potentielle biosorption en microcosme de sol n'est pas possible. En effet, les études réalisées par Albert (2019) en milieu liquide sur les deux souches étudiées (*Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea*) ont montré une biosorption rapide et efficace de métaux (Cd, Cu et Pb) par ces dernières, ce qui a conduit à faire l'hypothèse que ces souches pourraient être employées en mycoremédiation. L'étude en milieu liquide de Sturini et al. (2017) montre également une bioaccumulation importante de métaux (Cd, Hg, Pb, Ni, Cr, Cu, Fe, Mn, Zn) par *Perenniporia fraxinea*. Le milieu de culture est enrichi avec Cd (1–10 mg L<sup>-1</sup>), Hg (0,1–5 mg L<sup>-1</sup>) et Cu (10–50 mg L<sup>-1</sup>). Cette souche a montré des teneurs allant jusqu'à 35 mg.kg<sup>-1</sup> de Cu et 57 mg.kg<sup>-1</sup> de Zn.

La bioaccumulation des autres métaux dits toxiques est beaucoup plus faible avec des teneurs de 0,15 mg.kg<sup>-1</sup> en Cd et 0,35 mg.kg<sup>-1</sup> en Pb.

Les auteurs expliquent qu'ils s'attendaient à des teneurs plus élevées, dans les mycéliums, en métaux dits essentiels par rapport aux métaux toxiques et ne remplissant aucun rôle biologique.

### III.1.2) Teneurs potentiellement disponibles dans les sols des microcosmes

Les sols des microcosmes issus des essais de bioaugmentation et de biostimulation sont également soumis au protocole d'extraction simple avec HCl 1M (présenté en chapitre 2- partie I.2.5). Les pourcentages extraits sont présentés en figure 38 (Cd, Cu, Pb et Zn) et en figure 39 (Co, Cr et Ni).

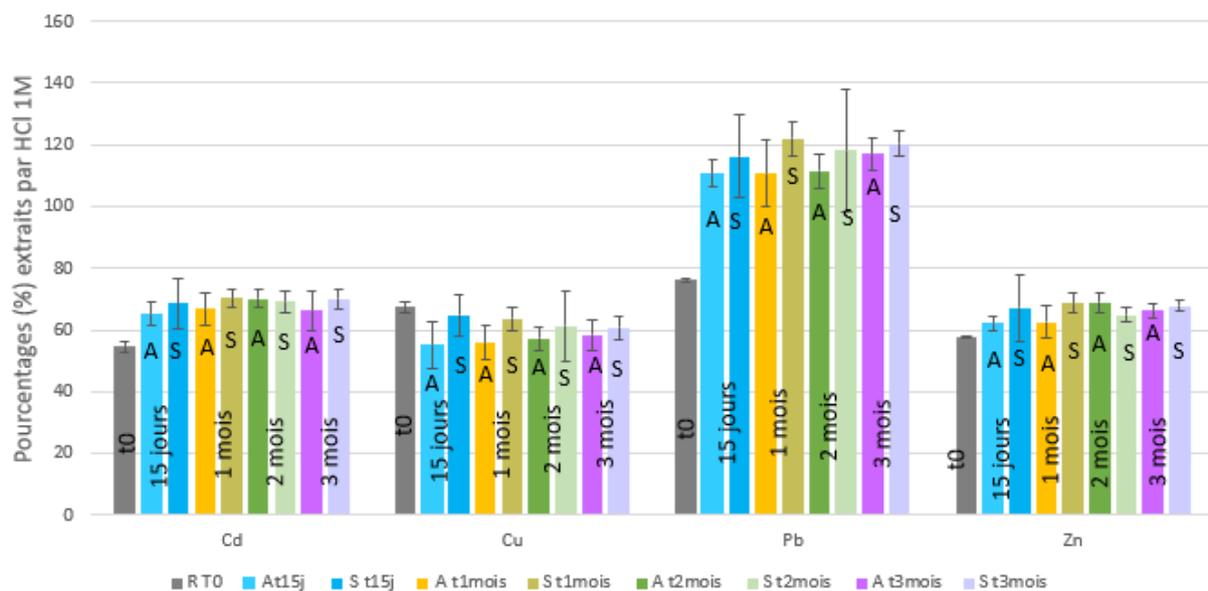


Figure 38. Pourcentages de Cd, Cu, Pb et Zn extraits par HCl 1M dans les sols des essais de bioaugmentation (P.f) et biostimulation aux temps d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois).

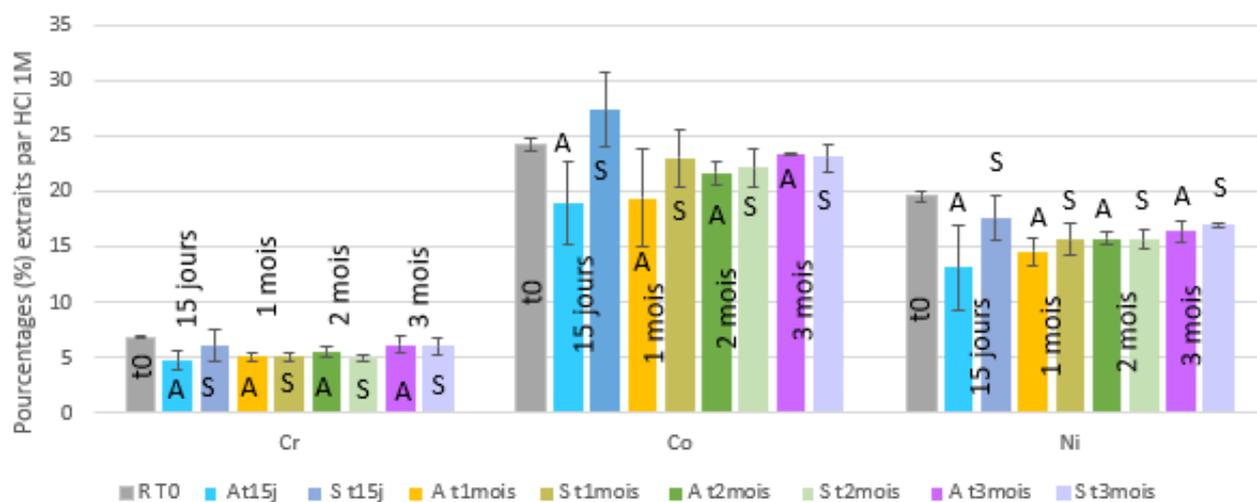


Figure 39. Pourcentages de Cr, Co et Ni extraits par HCl 1M dans les sols des essais de bioaugmentation (P.f) et biostimulation aux temps d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois).

D'après les figures 38 et 39, les pourcentages des métaux extraits par HCl dans les sols des microcosmes ne semblent pas varier entre les essais de biostimulation et de bioaugmentation. Aussi, il n'existe pas de variation observée pour les différentes durées d'incubation de l'expérience dans les mêmes conditions. Pour cet essai aussi, la bioaugmentation avec la souche fongique P.f ne semble pas avoir d'influence sur la disponibilité potentielle des métaux.

Les pourcentages de métaux extraits de manière générale sont du même ordre de grandeur que les pourcentages en métaux potentiellement disponibles obtenus pour la bioaugmentation avec la souche fongique A.c.

En effet, les ETM : Cd, Cu et Zn sont les plus labiles, avec des pourcentages compris entre 60 et 80%, suivis de Co, Cr et Ni avec des pourcentages compris entre 10 et 25% (environ 8% pour Cr ; entre 15-20% pour Ni ; environ 25% pour Co). Seul Pb présente des pourcentages beaucoup plus élevés (de l'ordre de 120%) avec la bioaugmentation avec P.f comparé à l'étude de bioaugmentation avec A.c (de l'ordre de 80%).

Cette étude de disponibilité en employant l'extraction simple HCl ne semble donc pas montrer de variations quant à la labilité des métaux entre les sols bioaugmentés par les souches *Absidia cylindrospora* ou *Perenniporia fraxinea*.

### III.2) Suivi de la microfonge du sol

De la même façon, les souches fongiques ayant poussé sur les sols des microcosmes à la fin de chaque période (T 15 jours, T1 mois, T2 mois et T3 mois) ont été mises en évidence en combinant les deux méthodes : la méthode Warcup (incorporation directe) et la méthode des suspensions dilutions.

Le tableau 31 regroupe les isolats fongiques identifiés à partir du sol de départ R à T0 et des sols des microcosmes biostimulés et bioaugmentés des 4 périodes d'incubation (T 15 jours, T1 mois, T2 mois et T3 mois) ainsi que le nombre de colonies identifiées (en UFC.g<sup>-1</sup> de sol).

Tableau 31. Dénombrement et identification des espèces fongiques viables isolées du sol R (T0) et des sols des essais de biostimulation et bioaugmentation dans les microcosmes (avec *Perenniporia fraxinea*) après chaque durée d'incubation.

	T0	Biostimulation (S)				Bioaugmentation (A)			
		T15jours	T1mois	T2mois	T3mois	T15jours	T1mois	T2mois	T3mois
UFC.g <sup>-1</sup> de sol	3x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>	3,6x10 <sup>4</sup>	5,5x10 <sup>4</sup>	5,5 x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>	5,5x10 <sup>4</sup>	7,7x10 <sup>4</sup>	7,7x10 <sup>4</sup>
Nombre d'espèces viables identifiées	5	6	2	7	3	4	3	6	2
<i>Actinomucor elegans</i>		x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Albifimbria verrucaria</i>		x							
<i>Aspergillus fumigatus</i>	x								
<i>Aspergillus niger</i>	x								
<i>Aspergillus ustus</i>				x				x	x
<i>Cylindrocarpon</i> sp.								x	
<i>Colletotrichum</i> sp.				x	x				
<i>Fusarium equiseti</i>		x		x	x			x	
<i>Fusarium</i> sp.		x				x	x	x	
<i>Gliocladium virens</i>	x			x		x	x	x	
<i>Humicola glauca</i>		x	x						
<i>Monodictys</i> sp.	x								
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	x								
<i>Papulospora</i> sp.		x							
<i>Penicillium</i> sp.				x					
<i>Perenniporia fraxinea</i>									
<i>Trichoderma</i> sp.				x		x		x	
<i>Trichurus spiralis</i>			x						

(x) : souche fongique identifiée à partir du milieu de culture. (case vide) : souche non identifiée.

Le tableau 31 montre que trois nouvelles souches isolées par rapport aux essais rapportés dans le tableau 28 : *Papulospora* sp., *Trichurus spiralis* et *Cylindrocarpon* sp. Cette dernière est isolée à partir du sol bioaugmenté à 2 mois, tandis que les deux premières souches ont été isolées à partir de sol biostimulés à 15 jours et 1 mois respectivement.

La souche fongique *Trichurus spiralis* est une souche cellulolytique, qui fait partie du phylum des *Ascomycètes*, elle a déjà été isolée à partir de matériel végétal en décomposition (Hart et al. 2003) et d'un mélange de paille déchiquetée de *Miscanthus* et de lisier de porc (Klamer et Lind 2001). Elle a été étudiée pour sa capacité à bioaccumuler Cu. En effet l'étude de Novakova et al. (2010) a montré que cette souche pouvait accumuler jusqu'à  $165\mu\text{g.g}^{-1}$  de Cu.

*Papulospora* sp. est une souche fongique du sol appartenant au phylum des *Ascomycètes*, elle a été isolée à partir de copeaux de bois (Esllyn et Highley 1976). Elle est connue pour produire des mélanines, qui sont des polymères phénoliques d'une couleur sombre, composés participant à la formation de l'humus du sol (Mahmood et al. 1985).

Les souches fongiques du genre *Cylindrocarpon* sont des champignons endophytes connus pour produire une large variété de métabolites secondaires (Kawaguchi et al. 2013 ; Kamdem et al. 2018).

Après 2 mois d'incubation, on observe à nouveau une grande diversité fongique, plus élevée que pour les autres durées d'incubation. Il est observé le nombre de souches viables identifiées à 2 mois est de 7 pour la biostimulation et 6 pour la bioaugmentation. Pourtant pour la même étude avec A.c, les résultats sont différents pour la bioaugmentation. En effet, 5 souches viables sont identifiées en biostimulation, mais seulement 2 en bioaugmentation à 2 mois d'incubation. Ceci montre la différence de la bioaugmentation avec *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* et la grande dominance d'*Absidia cylindrospora* ajoutée en bioaugmentation, contrairement à *Perenniporia fraxinea*. En effet, la présence importante d'*Absidia cylindrospora* au sein du microcosme a probablement empêché d'autres souches de se développer, alors que la présence de *Perenniporia fraxinea* n'a pas eu d'incidence sur les souches présentes initialement dans le sol. De plus, la combinaison des méthodes employées (la méthode Warcup (incorporation directe) et la méthode des suspensions dilutions) n'a pas été suffisante pour détecter la présence de *Perenniporia fraxinea* au sein des microcosmes. Ainsi sa viabilité n'a pas pu être confirmée à partir du sol au cours de l'expérimentation, seuls de fins filaments de mycélium ont été observés dans la gélose (pousse intra-matricale mentionnée précédemment).

A 3 mois d'incubation, une baisse drastique du nombre de souches viables est observée. Le nombre de souches identifiées est de 3 et 2 respectivement pour la biostimulation et la bioaugmentation. Cette baisse de la biodiversité s'explique par : un manque de nutriments qui n'a pas permis de maintenir les souches fongiques du sol dans de bonnes conditions.

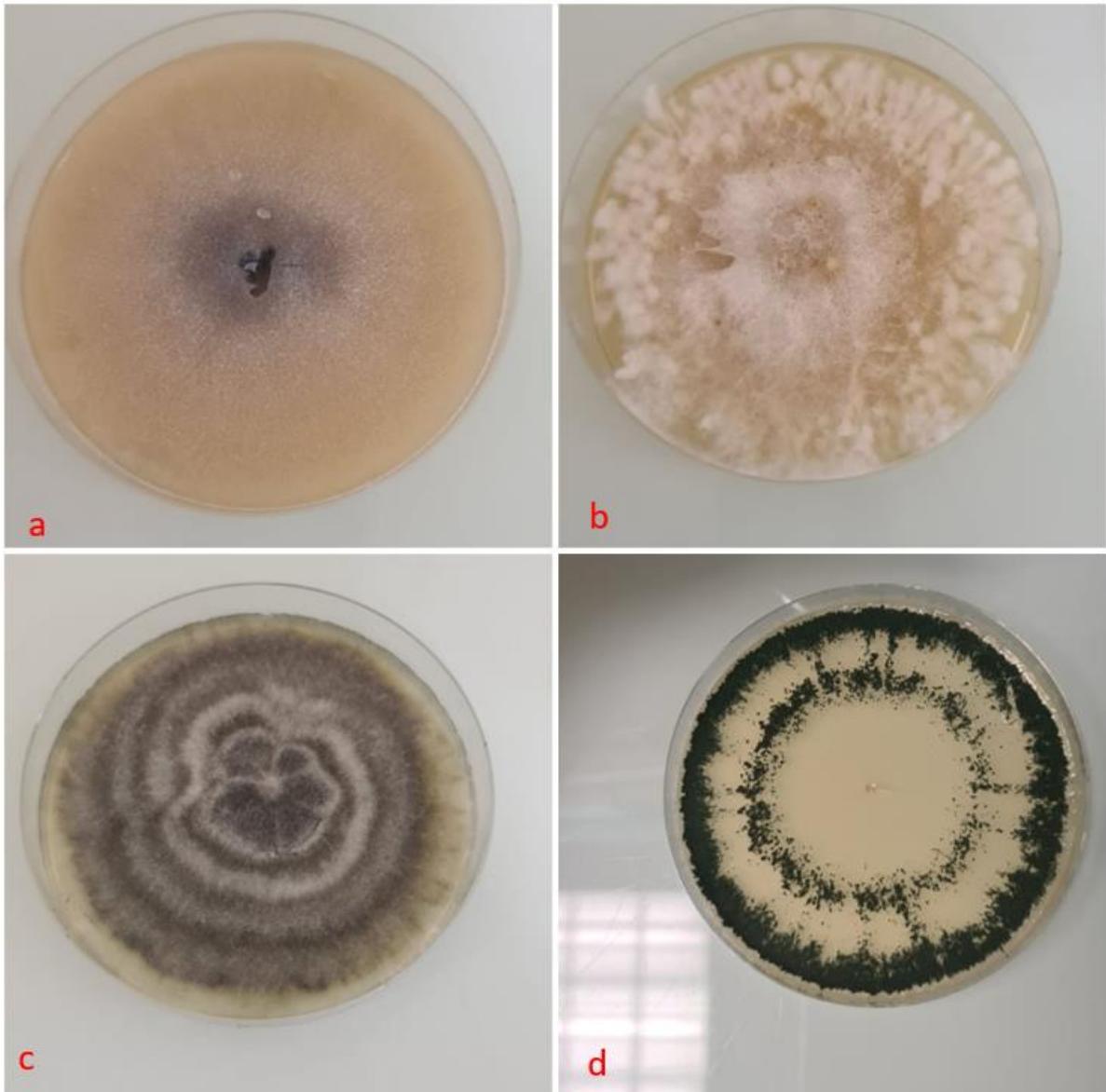
Cette hypothèse est confortée par des observations visuelles qui montrent une gélose (source de nutriments) complètement desséchée à la fin de l'expérimentation. Ce même phénomène a eu lieu pour l'expérimentation avec *Absidia cylindrospora*, qui a été réalisée dans les mêmes conditions. Le nombre de souches viables détectées à 3 mois d'incubation est de 4 pour la biostimulation et de 3 pour la bioaugmentation.

Pour ce qui est du dénombrement évalué par le nombre de colonies par gramme de sol (en UFC.g<sup>-1</sup> de sol), il est noté pour les durées d'incubation à 2 et 3 mois : 7,7 x10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de sol pour la bioaugmentation à 2 et 3 mois, contre seulement 5,5 x10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> pour la biostimulation. Donc malgré le fait que P.f n'est pas viable dans les conditions de l'étude, il est bien visible que le nombre de colonies par gramme de sol est plus important pour les essais de bioaugmentation. Cela veut dire que la bioaugmentation avec P.f a tout de même eu une incidence sur la flore fongique quantifiable. Par ailleurs, les nutriments apportés par la gélose ont permis d'augmenter le nombre de colonies par gramme de sol. En effet, le nombre est de 3x10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> à T0 (sol R) et augmente à 5 x10<sup>4</sup> avec la biostimulation à T 15 jours.

La figure 40 montre des photographies d'isolats fongiques identifiés à partir des sols après 3 mois.

Ces photographies montrent la diversité des souches fongiques isolées à partir d'un même sol. En effet, ces 4 souches sont des Ascomycètes et présentent des aspects phénotypiques différents.

Aussi, une observation au microscope a permis de réaliser une photographie (présentée en annexe n°11) de la souche fongique *Trichoderma* présentée en figure 40-d.



a) *Fusarium* sp.; b) *Fusarium* sp.; c) *Humicola glauca*; d) *Trichoderma* sp.

Figure 40. Photographies de quelques souches identifiées à partir des microcosmes de 3 mois.

### III.3) Conclusion

Cet essai de bioaugmentation avec la souche fongique *Perenniporia fraxinea* a montré quelques limites et nous a permis de réfuter l'hypothèse formulée par plusieurs études. En effet, le lien direct entre la biosorption efficace de métaux par des souches fongiques en milieu de culture liquide et leur potentielle biosorption en microcosme de sol n'est finalement pas toujours vérifiée, en particulier dans les conditions de notre étude.

Les deux essais de bioaugmentation (avec *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea*) montrent que malgré une tolérance et une biosorption efficace de métaux en milieu liquide par ces deux souches rapportées par Albert (2019), les essais en microcosme de sol ne montrent pas de variations des teneurs totales des ETM avant et après bioaugmentation et de légères variations des teneurs potentiellement disponibles même après trois mois d'incubation. Ceci nous a conduit à formuler des étapes nécessaires à tout essai de mycoremédiation ou de bioremédiation en général. Ainsi, d'après nos résultats, un essai de mycoremédiation peut être mis en œuvre selon 4 étapes :

- (1) identifier et isoler des souches fongiques à partir de sols contaminés. Cette étape permet de réaliser un screening de souches fongiques potentiellement tolérantes à des teneurs élevées en polluants.
- (2) réaliser des essais en milieu liquide pour tester la tolérance de ces souches fongiques aux polluants et ceci en exposant les organismes à des concentrations croissantes en milieux enrichis en polluants.
- (3) réaliser des essais en microcosmes de sol et ceci en mettant la souche fongique au contact de sols pollués, ce qui permet de se rapprocher des conditions de terrain. L'objectif de cette étape est de pouvoir isoler le mycélium fongique après une certaine durée d'incubation pour évaluer la biosorption de métaux par ce dernier à partir d'un sol pollué préférentiellement naturel.
- (4) réaliser un essai de mycoremédiation en conditions réelles, c'est-à-dire en terrain.

Il faudrait cependant tester d'autres conditions en microcosme de sol pour affirmer ces étapes, au vu du grand potentiel des champignons. Pour ce qui est des limites recensées à partir de cet essai, la première limite est que ce type de microcosme n'est finalement pas adapté à tout type de souche, mais uniquement à des souches qui forment un « tapis mycélien ». En effet, la pousse intramatricale de la souche fongique *Perenniporia fraxinea* dans la gélose a rendu impossible la récupération du mycélium à la fin de la durée d'incubation. La deuxième limite, également rapportée pour l'essai de bioaugmentation de 3 mois avec la souche *Absidia cylindrospora*, est le manque de nutriments pour une durée d'expérimentation aussi longue. Ceci est visible par l'assèchement de la gélose et confirmé par la baisse de la diversité fongique en employant les méthodes d'identification fongique. Une injection de nutriments semble donc indispensable pour maintenir les espèces fongiques dans de bonnes conditions pour ce type d'étude.

## **Chapitre 6 : Mise en évidence qualitative et quantitative de la production d'acides organiques**

## I. Mise en évidence de la production d'acides

### I.1) En milieu solide

#### I.1.1) Protocole en milieu solide

Plusieurs auteurs se sont basés sur la formation d'un halo autour du mycélium comme indicateur de la production d'acides (Cunningham et Kuiack 1992; Jarosz-Wilkolazka et Graz 2006; Scervino et al. 2010 ; Dezam et al. 2017). En effet, le changement de coloration du milieu de culture (par l'usage d'un indicateur coloré) a permis aux auteurs de révéler une baisse de pH, ce qui les a conduits à analyser les acides potentiellement produits par ces souches fongiques. Cette approche est donc intéressante en tant qu'étude préliminaire permettant de prédire la production d'acides par des souches fongiques grâce à l'acidification du milieu de culture.

Pour cela, les souches fongiques *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* sont mises au contact d'un milieu enrichi en métal (Cd), supplémenté d'un indicateur coloré, ce qui a permis de mettre en évidence une variation de pH (présenté en chapitre 2- partie III.1).

La figure 41 et le tableau 32 présentent respectivement le protocole et les données de préparation des milieux de culture.



Figure 41. Mode opératoire pour la préparation des boîtes de Petri supplémentées en Cd et en vert de bromocrésol.

Tableau 32. Données de préparation des milieux de culture supplémentés en vert de bromocrésol.

Milieux	Milieu MEA (g)	Vert de bromocrésol (mg)	Volume (mL) de solution de CdSO <sub>4</sub> (10g.L <sup>-1</sup> ) ajouté	Concentration finale en Cd (mg.L <sup>-1</sup> )
500mL de milieu MEA supplémenté en Cd	24g de milieu MEA dissous dans 500mL d'eau stérile.	50mg	2,5 mL pour boîtes <i>Absidia cylindrospora</i>	50
			200 µL pour boîte <i>Perenniporia fraxinea</i>	10
250 mL de milieu MEA témoin	12g de milieu MEA dissous dans 250mL d'eau stérile.	25 mg	Pas d'ajout	0

Les boîtes de Petri sont remplies avec 20 mL de milieu MEA témoin ou enrichi en Cd et stockées à +4°C avant de réaliser un ensemencement central des 2 souches.

Avec la pointe, les souches sont déposées séparément au centre des boîtes de Petri (ensemencement central). Quatre boîtes par souches sont réalisées : deux boîtes témoins sans métal et deux boîtes supplémentées en Cd.

## 1.1.2) Résultats de l'expérimentation en milieu solide

### 1.1.2.1) Croissance des souches fongiques

La figure 42 montre les photographies des souches fongiques ayant poussé sur milieu supplémenté en indicateur coloré au jour 2 et jour 6 d'exposition dans le cas du milieu témoin (figure 42/a-e-c-g), mais aussi du milieu enrichi en Cd (figure 42/b-f-d-h).

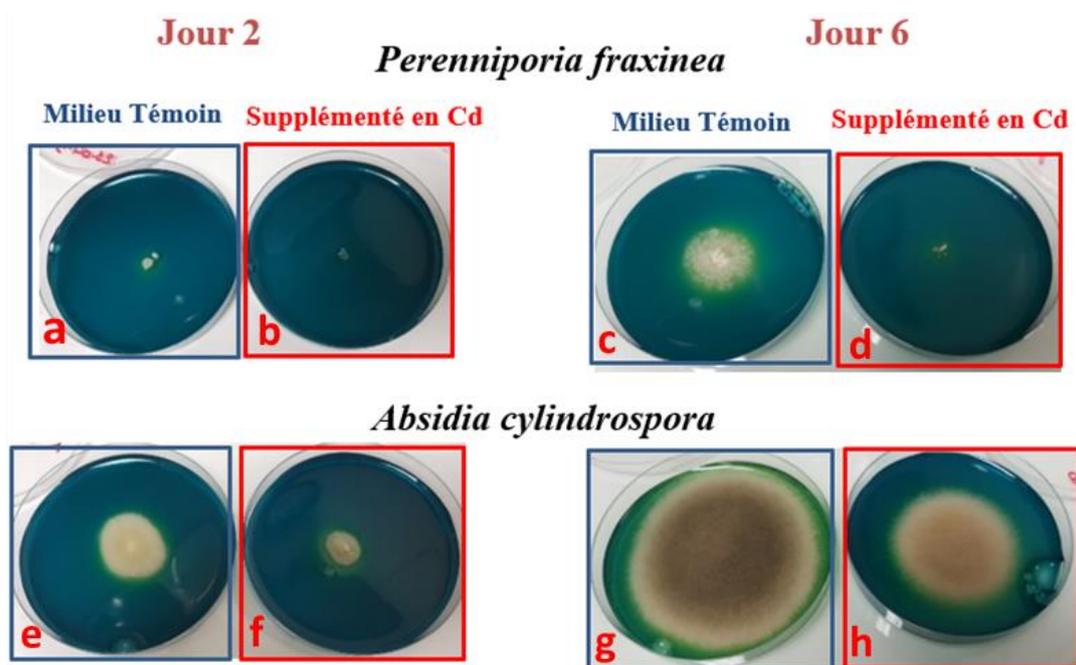


Figure 42. Photographies des mycéliums au 2<sup>ème</sup> et au 6<sup>ème</sup> jour d'exposition au métal en milieu solide.

Ces photographies (figure 42) montrent que la croissance des souches fongiques est impactée par l'ajout de Cd. En effet, il est visible sur les photographies au jour 2 (figure 42/b-f) et au jour 6 (figure 42/d-h) que les diamètres des mycéliums des deux souches ayant poussé sur les milieux enrichis en Cd sont plus faibles comparé aux mycéliums ayant poussé sur le milieu témoin sans ajout de métal.

L'exposition au Cd conduit donc à une inhibition de la croissance des souches fongiques mise en évidence par la diminution du diamètre du mycélium enrichi en Cd par rapport au mycélium témoin.

L'inhibition de la croissance des champignons par les métaux a été largement décrite dans la littérature (Xu et al. 2015; Costa et Tavares 2017). Baldrian (2002) affirme que l'exposition des champignons aux métaux conduit à une baisse de la croissance et à des modifications morphologiques. En effet, son étude montre que la souche fongique *Daedalea quercina* cultivée dans un milieu liquide enrichi en Cd présente une apparence irrégulière des hyphes. L'étude de Costa et Tavares (2017) montre également une inhibition de la croissance d'*Alternaria* sp. et *Penicillium* sp. exposés à des concentrations de Cd supérieures à 40 mg.L<sup>-1</sup>.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Albert et al. (2018) qui montrent que la toxicité du Cd vis-à-vis de *Absidia cylindrospora* se manifeste par une production de biomasse plus faible par rapport à un témoin (sans métal). Une observation en microscope aurait pu confirmer si des altérations morphologiques au niveau des hyphes ont eu lieu, comme une pigmentation ou une ramification (Baldrian 2002).

Au jour 2, seule la souche fongique *Absidia cylindrospora* a vu sa croissance démarrer en milieu supplémenté en Cd, contrairement à *Perenniporia fraxinea* qui, 48 heures après son ensemencement, n'a pas encore poussé. Ceci suggère qu'A.c tolère mieux l'exposition au Cd par rapport à *Perenniporia fraxinea*. En effet, le mycélium de la souche fongique *Perenniporia fraxinea* au jour 6 de l'exposition ne s'est pas développé. Cette souche a été plus impactée par l'exposition au Cd, elle est par conséquent moins tolérante au Cd qu'*Absidia cylindrospora*. Une étude en milieu liquide réalisée par Albert et al. (2018) montre que cette souche peut tolérer jusqu'à 10 mg.L<sup>-1</sup> de Cd, tandis qu'*Absidia cylindrospora* peut tolérer jusqu'à 100 fois plus (1000 mg.L<sup>-1</sup>). Une autre étude menée par le même auteur Albert (2019) confirme qu'*Absidia cylindrospora* a pu développer une adaptation à Cd. En complément, les diamètres des mycéliums des souches ont été mesurés quotidiennement (entre jour 2 et jour 7). Les résultats complets de cette étude ont été présentés dans un poster au cours des « Journée de l'Ecole Doctorale Normande de Chimie » à Caen en Juillet 2019 et sont présentés en annexe n°12.

### 1.1.2.2) Acidification du milieu de culture

Il est possible de visualiser sur les photographies prises entre le 2<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour la formation d'un halo jaune (figure 42) autour des souches fongiques ensemencées sur milieu supplémenté en indicateur coloré. Ce halo s'est formé à la suite du changement de pH. En effet, la zone de virage de l'indicateur coloré (vert de bromocrésol) utilisé est de : 3,8 (jaune) → 5,4 (bleu). Le virage de la coloration du bleu au jaune est signe d'une baisse de pH. Nous avons assimilé cette acidification du milieu à une potentielle production d'acides par les champignons.

Seulement, cette coloration a été détectée dans les deux cas : témoin et supplémenté en Cd. Ce test ne permet pas donc d'apprécier l'effet du stress métallique sur la production d'acides par les souches fongiques étudiées. Toutefois, les champignons sont connus pour produire des acides dans leur milieu sans être en condition de stress métallique (Das et al. 2007). Par ailleurs, la littérature révèle que l'un des plus importants mécanismes de tolérance développé par les champignons est la production d'acides (Gadd 1993; Xu et al. 2015). Ceci conforte l'hypothèse que l'acidification du milieu par *Absidia cylindrospora* est en lien avec sa tolérance élevée au Cd.

En conclusion, cette méthode colorimétrique a pu révéler une baisse de pH visualisée par un changement de coloration, dans les deux milieux de culture témoin et supplémenté en Cd, ce qui témoigne d'une production d'acide quel que soit les conditions. Bien que cette étude ne soit qu'indicative, ses résultats nous ont confirmé le potentiel des deux souches fongiques à acidifier le milieu de culture et nous a conduit à réaliser une étude plus globale en mettant en œuvre des essais en milieu de culture liquide.

## 1.2) En milieu liquide

Comme présenté en chapitre 2-partie III.2, les souches fongiques *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* ont été mises en culture dans un milieu liquide supplémenté en métal (50 mg.L<sup>-1</sup> de Cd ou Pb). Ces milieux de culture liquide correspondent aux échantillons analysés en HPLC.

Les parties « aspect visuel » et pH seront consacrées à l'étude de la souche fongique *Absidia cylindrospora*. Pour ce qui est de la partie « biomasse », les deux souches seront comparées.

Un pH de 5,9 est mesuré dans les milieux de culture avant l'introduction de la souche fongique et avant l'ajout de métal et donne une valeur de pH de 5,9. Après les 4 jours d'exposition, les valeurs de pH des milieux supplémentés en Cd ou en Pb sont respectivement 5,2 et 5,3, ce qui conforte l'hypothèse de la baisse de pH constatée dans les milieux solides colorés.

### 1.2.1) Aspect visuel

La figure 43 montre les mycéliums récupérés à la fin de la durée d'incubation, à gauche le mycélium provenant du milieu témoin (figure 43-A) et à droite le mycélium provenant du milieu supplémenté en Cd (figure 43-B).

L'aspect des mycéliums récupérés est différent entre les mycéliums ayant poussé dans les milieux témoins et ceux ayant poussé dans les milieux supplémentés en Cd. Une différence de coloration et de densité sont observées sur les photographies (figure 43).

L'inhibition de la croissance et le changement de couleur sont vraisemblablement liés à la toxicité des métaux vis-à-vis des champignons (Vaishaly et al. 2015; Kumar et Dwivedi 2021). En effet, Cd est connu pour être le métal le plus toxique pour les basidiomycètes et peut causer des perturbations morphologiques qui se caractérisent par un changement de la densité ou de la couleur du mycélium (Hatvani et Mécs 2003).



Figure 43. Photographies des mycéliums ayant poussé en milieu liquide sans métal (gauche) et supplémenté en Cd (droite).

### 1.2.2) Biomasse

Par ailleurs, les mycéliums frais d'*Absidia cylindrospora* et de *Perenniporia fraxinea* ont été pesés après récupération. Ils ont été séchés jusqu'à masse constante pour déterminer les masses sèches. Les résultats des masses sèches des mycéliums d'A.c et P.f sont présentés sur le tableau 33, tandis que les résultats des masses fraîches sont présentés en annexe n°13.

Tableau 33. Masses des mycéliums de *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* issus des milieux liquides en poids frais et en poids secs.

Poids sec (g)	<i>Absidia cylindrospora</i>	<i>Perenniporia fraxinea</i>
Témoin	0,145 ± 0,007	0,179 ± 0,093
Pb	0,132 ± 0,003	0,149 ± 0,047
Cd	0,136 ± 0,012	0,175 ± 0,006

Nos résultats suggèrent que l'ajout des métaux Cd et Pb a eu un effet sur la biomasse d'A.c et de P.f, puisqu'une baisse de la biomasse est constatée pour les deux souches par rapport au témoin. La baisse est plus marquée pour A.c en étant exposée à Cd et Pb. En effet, la biomasse sèche d'A.c passe de 145 mg pour le mycélium témoin à 132 mg pour le mycélium exposé au Pb et 136 mg pour le mycélium exposé au Cd. Ceci représente une baisse d'environ 10% de la

biomasse témoin par rapport à la biomasse ayant été mise en culture dans les milieux enrichis en métaux.

La baisse de la biomasse notée pour *Absidia cylindrospora* exposé au Cd est cohérente avec les observations visuelles (photographies de la figure 43), qui montrent un mycélium moins développé exposé au Cd (figure 43-B) par rapport à un mycélium témoin (figure 43-A). La contamination par chacun des deux métaux a eu le même effet sur la biomasse d'*Absidia cylindrospora*. Les résultats d'Albert (2019) affirment que cette même souche présente des perturbations morphologiques moins marquées en présence de Pb qu'en présence de Cd et qu'elle tolère mieux Cd (jusqu'à 1000 mg.L<sup>-1</sup>) que Pb (100 mg.L<sup>-1</sup>). Leurs résultats rapportent également la diminution de la biomasse d'*Absidia cylindrospora* en présence de Cd.

Pour P.f, on observe un effet plus marqué de Pb ( $\approx -17\%$ ), tandis que l'influence de Cd n'est pas vraiment significative ( $\approx -2\%$ ). Ceci est en contradiction apparente avec les conclusions de Albert (2019), qui indiquent une tolérance de P.f à Pb jusqu'à 1000 mg.L<sup>-1</sup>, contre seulement 10 mg.L<sup>-1</sup> pour Cd, mais sur des essais en milieu MEA. Ceci suggère une influence de la méthode de culture et de la composition du milieu de culture sur l'impact des ETM et donc sur les résultats de tolérance.

Pour ce qui est de la comparaison entre les masses sèches des biomasses fongiques des deux souches, il est possible de dire que la souche fongique P.f développe légèrement plus de mycélium par rapport à *Absidia cylindrospora*. En effet, les biomasses de P.f sont aux alentours de 175 mg contre 145 g mg pour *Absidia cylindrospora*.

## II. Mise au point de la méthode d'analyse par HPLC

Les analyses chromatographiques sont menées sur un chromatographe HPLC Varian composé d'une pompe à 3 voies de série PROSTAR 230, d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD) UV visible PROSTAR 310. La vanne d'injection est une vanne Rhéodyne avec une boucle d'injection de 20 $\mu$ L. La colonne « Aminex HPX-87H colonne 300 x 7,8 mm » est employée. Le choix de la colonne employée pour la mise au point a également émané de la littérature, en effet la majorité des études emploient la colonne Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) pour le dosage des acides organiques. Sur le tableau 5- page 60, dix études sur les seize présentées emploient cette colonne. Cette colonne est adaptée à notre étude, en effet elle est doublement avantageuse, car elle est optimisée pour la séparation des acides organiques d'une part et pour l'analyse des milieux de culture ou de fermentation d'autre part. Cette colonne a également

l'avantage de réaliser des analyses rapides (n'excédant pas généralement 20 minutes d'analyse), avec un mode isocratique en employant de l'eau légèrement acidifiée comme éluant. La préparation d'échantillon ne demande pas de matériel particulier, en effet seule une filtration est nécessaire avant d'injecter les échantillons dans la boucle d'injection de l'HPLC. Les débits préconisés par le fournisseur pour cette colonne sont entre 0,4 et 1 mL.min<sup>-1</sup>.

Pour mettre au point une méthode de dosage des acides organiques, plusieurs tests ont été réalisés en modifiant l'éluant, le débit et la température. Le programme d'éluion optimisé est isocratique avec 100% d'une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,008N, un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, une température de 35°C et un détecteur fixé à 210 nm. La longueur d'onde a été fixée à 210 nm dès le début de la mise au point de la méthode, comme la quasi-totalité des études de dosage des acides organique en HPLC là (tableau 5- page 60).

Un mélange avec une concentration de 0,1g.L<sup>-1</sup> de 5 acides organiques correspondant potentiellement aux acides secrétés par les champignons, comprenant l'acide oxalique, l'acide citrique, l'acide gluconique, l'acide malique et l'acide succinique, est préparé. Ce choix a émané de la littérature, en effet comme le montre le tableau 5, ces acides sont les acides majoritairement produits par les champignons. Des solutions d'acides sont également préparées avec de l'eau ultra pure à une concentration massique de 0,1g.L<sup>-1</sup> chacun. Les différents essais concernant les paramètres de l'analyse HPLC et sont présentés ci-après : la colonne, l'éluant, la température et le débit.

Le tableau 34 résume les temps de rétention, les intensités et les aires de pics des chromatogrammes (figures : 44, 45, 46, 47, 48) nécessaires à la mise au point de la méthode d'analyse permettant de séparer et d'analyser les acides : oxalique, citrique, succinique, gluconique et malique.

Tableau 34. Intensités et aires des pics des acides étudiés.

Pic		Figure 44	Figure 45	Figure 46	Figure 47	Figure 48
1 Oxalique	Tr (min)	7,7 min	7,98 min	8,16 min	8,08 min	7,23 min
	Intensité (μV)	311 μV	297μV	286μV	224μV	16 μV
	Aire de pic	7655	6858	6483	5133	181
2 Citrique	Tr (min)	9,9 min	9,80 min	10,19 min	9,98 min	7,89 min
	Intensité (μV)	25 μV	27 μV	19 μV	29 μV	4 μV
	Aire de pic	322	439	410	611	6
3 Gluconique	Tr (min)	10,2 min	10,48 min	10,89 min	10,70 min	9,6 min
	Intensité (μV)	39 μV	37 μV	40 μV	52 μV	5 μV
	Aire de pic	514	776	571	1307	65
4 Malique 1	Tr (min)	11,6 min	11,83 min	12,28 min	12,03 min	10,2 min
	Intensité (μV)	20 μV	17 μV	11 μV	18 μV	7 μV
	Aire de pic	476	402	412	624	142
5 Succinique	Tr (min)	14,8 min	14,77 min	15,65 min	15,18 min	11,54 min
	Intensité (μV)	12 μV	7 μV	14 μV	3μV	2μV
	Aire de pic	282	283	253	381	
6 Malique 2	Tr (min)	17,4 min	18,24 min	20,65 min	19,13 min	12,86 min
	Intensité (μV)	12 μV	7 μV	12 μV	8 μV	1 μV
	Aire de pic	252	399	429	551	8
7	Tr (min)					14,12 min
	Intensité (μV)					1μV
	Aire de pic					
8	Tr (min)					16,51 min
	Intensité (μV)					2 μV
	Aire de pic					64

## II.1) Eluant

L'éluant préconisé par le fournisseur (Bio-rad) de la colonne Aminex HPX-87H et par la majorité des études réalisées avec cette même colonne avec l'objectif d'analyser des acides organiques est l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Cet éluant a été employé à différentes concentrations :

- 0,004 N (Sanarico et al. 2003),
- 0,008 N (Jordan et al. 1996),
- 0,01N (Dörsam et al. 2017; Dezam et al. 2017; Krull et al. 2020; Yang et al. 2020),
- 0,025 N (Lapeyrie et al. 1987).

Les concentrations testées sont 0,004 N et 0,008 N.

Le mélange d'acides a été injecté avec un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 0,004 N avec une colonne chauffée à 42°C. Le chromatogramme résultant est affiché en figure 44.

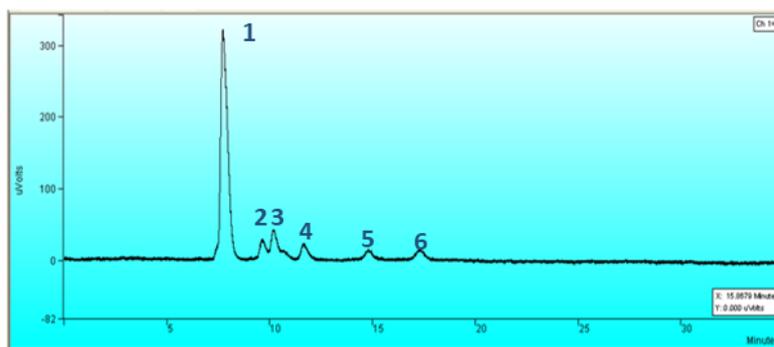


Figure 44. Chromatogramme du mélange des acides étudiés dans les conditions :  $H_2SO_4$  à 0,004N à  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  avec colonne chauffée à  $42^\circ\text{C}$ .

Les pics du chromatogramme ne sont pas fins, à part le premier pic qui a une forme gaussienne spécifique des pics chromatographiques. Les pics 5 et 6 sont légèrement trainés à la fin de l'analyse. Concernant la résolution des pics, la majorité des pics du chromatogramme sont séparés, à part les pics 2 et 3 qui sont co-élus. Leurs temps de rétention sont respectivement 9,9 min et 10,2 min, soit une différence de 0,3 min. Cet écart est donc insuffisant pour permettre d'avoir des pics bien résolus.

Le mélange d'acides est ensuite injecté en doublant la concentration de l'éluant avec un débit de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de  $H_2SO_4$  à 0,008 N avec une colonne chauffée à  $42^\circ\text{C}$ . Le chromatogramme résultant est affiché en figure 45.

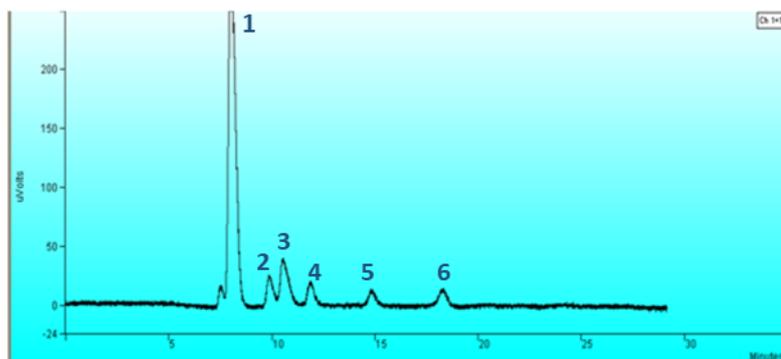


Figure 45. Chromatogramme du mélange d'acides injecté dans les conditions :  $H_2SO_4$  à 0,008N à  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  avec colonne chauffée à  $42^\circ\text{C}$ .

La finesse des six pics du chromatogramme a été améliorée par rapport aux pics du chromatogramme de la figure 44. Les pics 5 et 6 sont à présent plus fins par rapport au chromatogramme précédent, mais sont toujours « trainés ». Concernant la résolution des pics, tous les pics du chromatogramme sont séparés. Les pics 2 et 3 qui étaient co-élus avec le programme précédent sont à présent bien résolus. Leurs temps de rétention sont respectivement 9,80 min et 10,48 min, ils sont donc éloignés de 0,68 min.

Cet écart représente plus que le double de l'écart entre ces deux pics avec le programme précédent (figure 44). La concentration d'acide sulfurique qui donne une meilleure résolution des pics est donc 0,008 N.

## II.2) Température

Les températures appliquées à la colonne Aminex HPX-87H pour séparer des acides organiques varient entre 25°C et 65°C. Rashid et al. (2004) ont utilisé une colonne (Aminex 87-H 25\*4,6mm) chauffée à 25°C pour analyser les acides oxalique, acétique, citrique, malique, gluconique et fumarique. Schilling et Jellison (2004) ont testé une température de 30°C pour analyser l'acide oxalique. Jordan et al. (1996) ont appliqué une température de 35°C pour analyser l'acide oxalique, citrique, tartrique, malique, succinique, formique et acétique. Des auteurs se sont basés sur des températures de chauffage plus élevées de 55°C (Lapeyrie et al. 1987; Yang et al. 2020) et 65°C (Micales 1996; Dezam et al. 2017).

Les températures testées sont 25°C, 35°C, 42°C et 65°C.

Le mélange est injecté avec un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 0,008 N avec la colonne chauffée à une température de 25°C, le détecteur est fixé à 210 nm. Le chromatogramme résultant est affiché en figure 46.

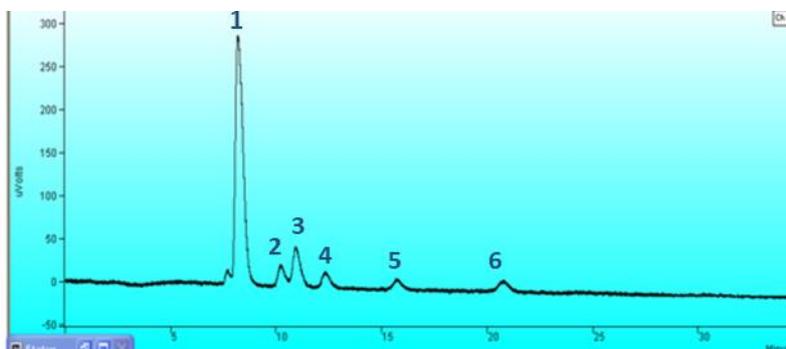


Figure 46. Chromatogramme du mélange d'acides injectés dans les conditions : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 0,008 N à 0,5 mL.min<sup>-1</sup> avec colonne chauffée à 25°C.

Du point de vue résolution, les pics sont bien séparés. Le temps d'écart entre les acides est plus d'une minute pour tous les pics, sauf pour le pic 2 et 3 qui ont un écart de 0,7 min. Cet écart n'empêche pas d'avoir des pics résolus et de réaliser l'intégration des pics qui a permis de déterminer les aires de pics. Les pics 5 et 6 du chromatogramme apparaissent respectivement à 15,65 min et 20,65 min, ce qui fait une différence de 5 minutes. Nous avons gardé les mêmes conditions d'élution en augmentant uniquement la température de chauffage de la colonne.

La température est donc augmentée à 35°C en restant sur le même éluant, la même concentration et le même débit d'élution. Le chromatogramme obtenu est présenté en figure 47.

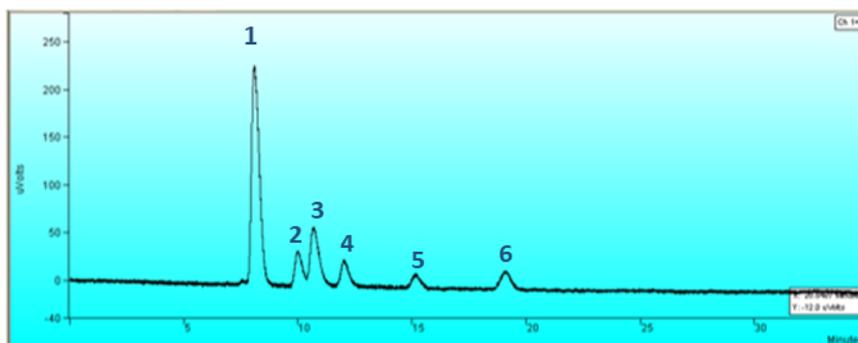


Figure 47. Chromatogramme du mélange d'acides injectés dans les conditions :  $H_2SO_4$  à 0,008 N à 0,5  $mL.min^{-1}$  avec colonne chauffée à 35°C.

L'ensemble des pics du chromatogramme (figure 47) présente une bonne résolution à l'exception des pics 2 et 3 qui n'ont pas été totalement séparés (malgré l'écart de 0,8 minutes). L'écart entre les pics 5 et 6 a pu lui être diminué, il est passé de 5 minutes pour la température 25°C (figure 46) à moins de 4 minutes pour la température 35°C (figure 47).

La température à 42°C a également été testée (chromatogramme de la figure 45). Il est visible que les deux pics (2 et 3) sont coélués. En effet, les temps de rétention de ces deux pics sont respectivement de 9,9 min et 10,2 min, ce qui représente un écart de seulement 0,3 minutes. Cette température ne semble pas adaptée à notre étude.

La température est fixée à 65°C comme préconisé par certains auteurs (Fomina et al. 2005 ; Dezam et al. 2017). La figure 48 présente le chromatogramme obtenu en employant cette température. Il apparaît que les temps de rétention sont très proches et les pics mal résolus. Cette température n'est donc pas adaptée à notre étude.

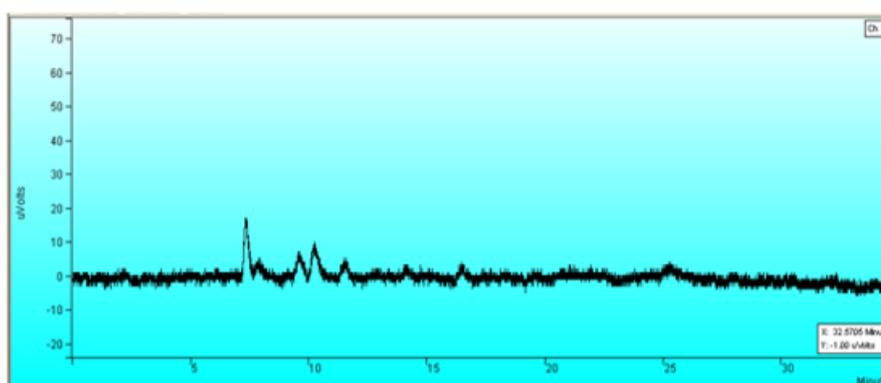


Figure 48. Chromatogramme du mélange d'acides injectés dans les conditions :  $H_2SO_4$  à 0,008 N à 0,5  $mL.min^{-1}$  avec colonne chauffée à 65°C.

La figure 49 résume les temps de rétention des 6 pics des 5 acides étudiés en fonction des températures appliquées à la colonne. D'après la figure 49, plus la température de chauffage de la colonne augmente, plus la durée d'analyse diminue.

En effet le dernier pic sort respectivement à 20,6 min , 19,1 min , 18,2 min et 16,5 min en appliquant les températures de 25°C, 35°C, 42°C et 60°C. Les temps de rétention de tous les pics et l'écart entre les pics d'une manière générale sont diminués en augmentant la température. Les températures de chauffage à 42 et 60°C écourtent d'une manière considérable la durée de l'analyse, ce qui par conséquent conduit à une mauvaise séparation des pics, dû à leur rapprochement. Les températures les plus adaptés à l'analyse doivent être inférieures à 42°C : les températures 25°C et 35°C semblent plus adaptées. Pour trancher entre ces deux températures, il faudrait regarder l'allure des pics sur les chromatogrammes des figures 46 et 47. La figure 47 montre des pics plus fins et moins trainés. En comparant les pics 5 et 6 de la figure 46 (25°C), la différence entre ces deux pics est de 5,09 min et en augmentant la température à 35°C, cette différence est réduite à 3,95 min. L'objectif n'est pas de réduire la durée d'analyse, qui signifie souvent une moins bonne séparation, mais plutôt d'avoir un compromis entre une bonne résolution des pics et une belle allure (= finesse) des pics. Par ailleurs, en comparant l'intensité et les aires de pics (figure 46 et 47 présentés dans le tableau 34), il apparaît que les aires de pics et les intensités les plus élevés d'une manière générale, sont ceux du chromatogramme de la figure 47, avec une température de chauffage de 35°C. La température qui semble la mieux adaptée à la séparation des acides de l'étude en prenant en compte la résolution des pics, leur finesse et le temps d'analyse est la température 35°C.

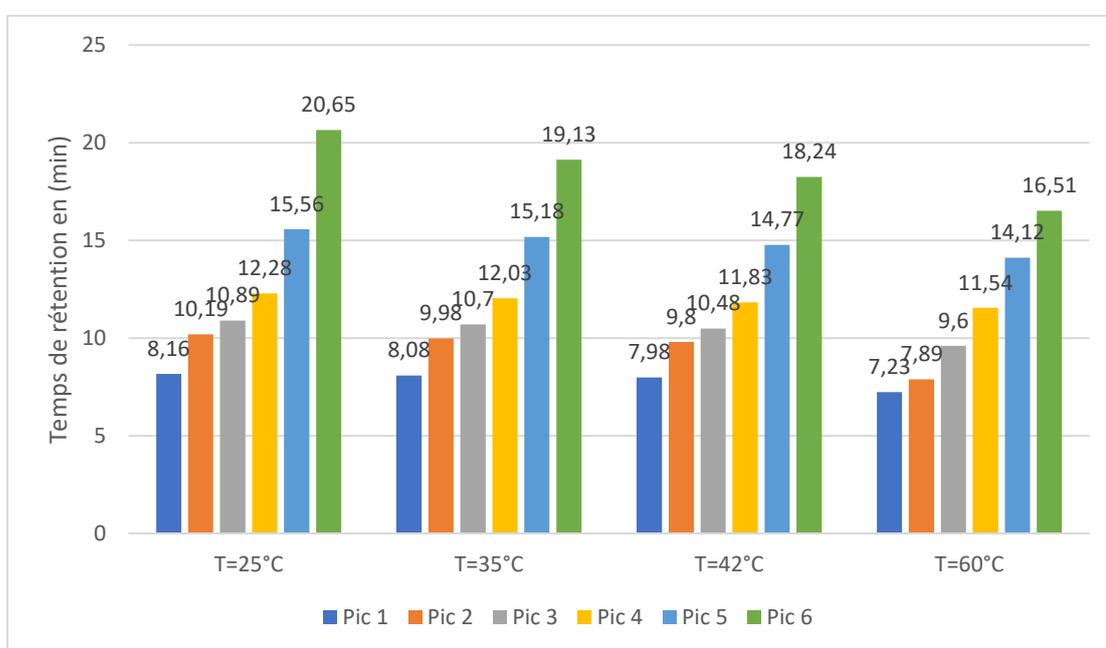


Figure 49. Résumé des temps de rétentions des 6 pics en fonction de la température de la colonne.

### II.3) Débit

Différents débits ont été testés pour déterminer le débit optimal pour séparer les acides de l'étude.

Le débit de  $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  a été préconisé dans plusieurs études avec l'objectif d'analyser des acides en HPLC (Lapeyrie et al. 1987; Rashid et al. 2004; Schilling et Jellison 2005; Xie et al. 2011; Dezam et al. 2017; Krull et al. 2020; Yang et al. 2020).

Le mélange d'acide a donc été injecté dans les conditions suivantes : l'éluant  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à  $0,008 \text{ N}$  avec la colonne chauffée à une température de  $35^\circ\text{C}$  à un débit de  $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . La détection à  $210 \text{ nm}$ . Le chromatogramme résultant est affiché en figure 50.

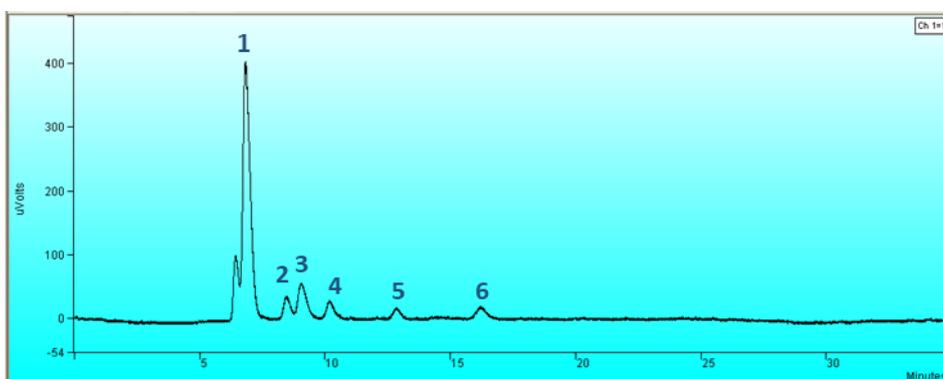


Figure 50. Chromatogramme du mélange d'acides injectés dans les conditions :  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à  $0,008 \text{ N}$  à  $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  avec colonne chauffée à  $35^\circ\text{C}$ .

Sur le chromatogramme (figure 50), il apparaît que les pics ne sont pas assez fins et que le pic 1 est légèrement dédoublé. Le temps d'analyse est tout de même réduit à environ 17 minutes par rapport aux chromatogrammes précédents, dont certains (figure 46 et figure 47) durent environ 20 minutes. Les pics sont donc très rapprochés.

Un débit plus faible est testé en ne modifiant que ce paramètre-là. Le débit testé est de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Ce débit a été employé dans plusieurs études analysant les acides organiques en HPLC (Whitelaw et al. 1999; Z. Li et al. 2016; Dörsam et al. 2017). Le chromatogramme correspondant est affiché en figure 47, car il correspond à un test réalisé pour déterminer la température adéquate. Il apparaît en effet que ce débit ( $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) est plus adapté qu'un débit de  $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

## II.5) Conditions retenues

Différents essais ont été réalisés pour comparer différents débits, différentes températures de chauffage de la colonne, ainsi que différentes concentrations d'acide sulfurique (éluant). Ainsi, la figure 51 présente un schéma résumant les étapes de mise au point de la méthode d'analyse en présentant les conditions chromatographiques testées.

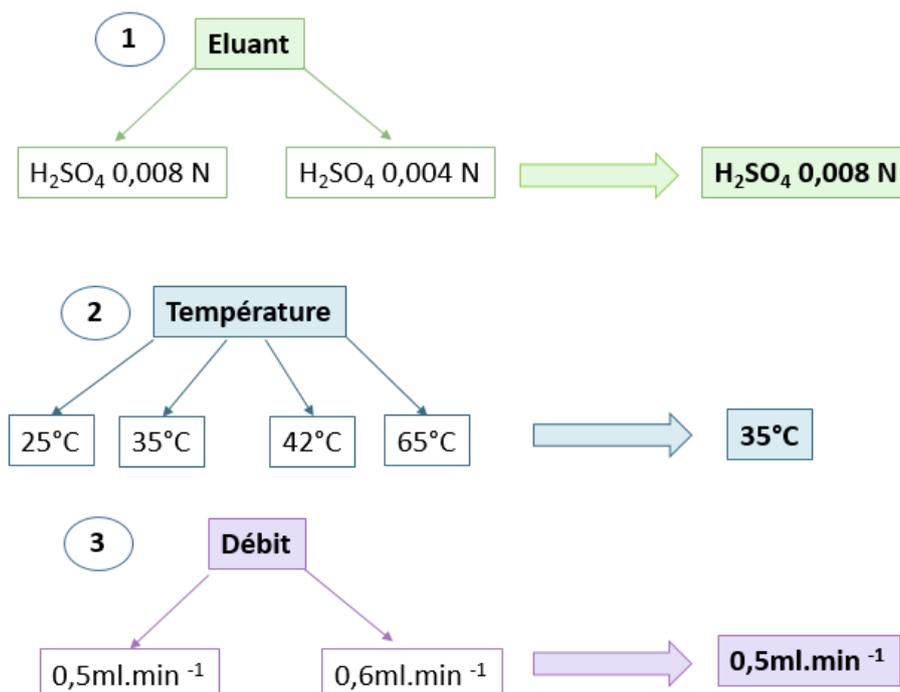


Figure 51. Schéma résumant la mise au point de la méthode d'analyse.

Au vu de ces essais, il a été possible de retenir les conditions suivantes. L'éluant sélectionné est une solution d'acide sulfurique concentré à 0,008N avec un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. La température optimale est de 35°C. Le détecteur est réglé à 210 nm.

## II.6) Application de la méthode d'analyse à chaque acide séparément

Les acides de l'étude (l'acide oxalique, l'acide citrique, l'acide malique, l'acide gluconique, et l'acide succinique) ont été injectés à 0,1 g.L<sup>-1</sup> séparément pour déterminer leur temps de rétention et leur intensité de pic avec le programme sélectionné.

Les chromatogrammes de ces acides injectés séparément sont présentés en figure 52.

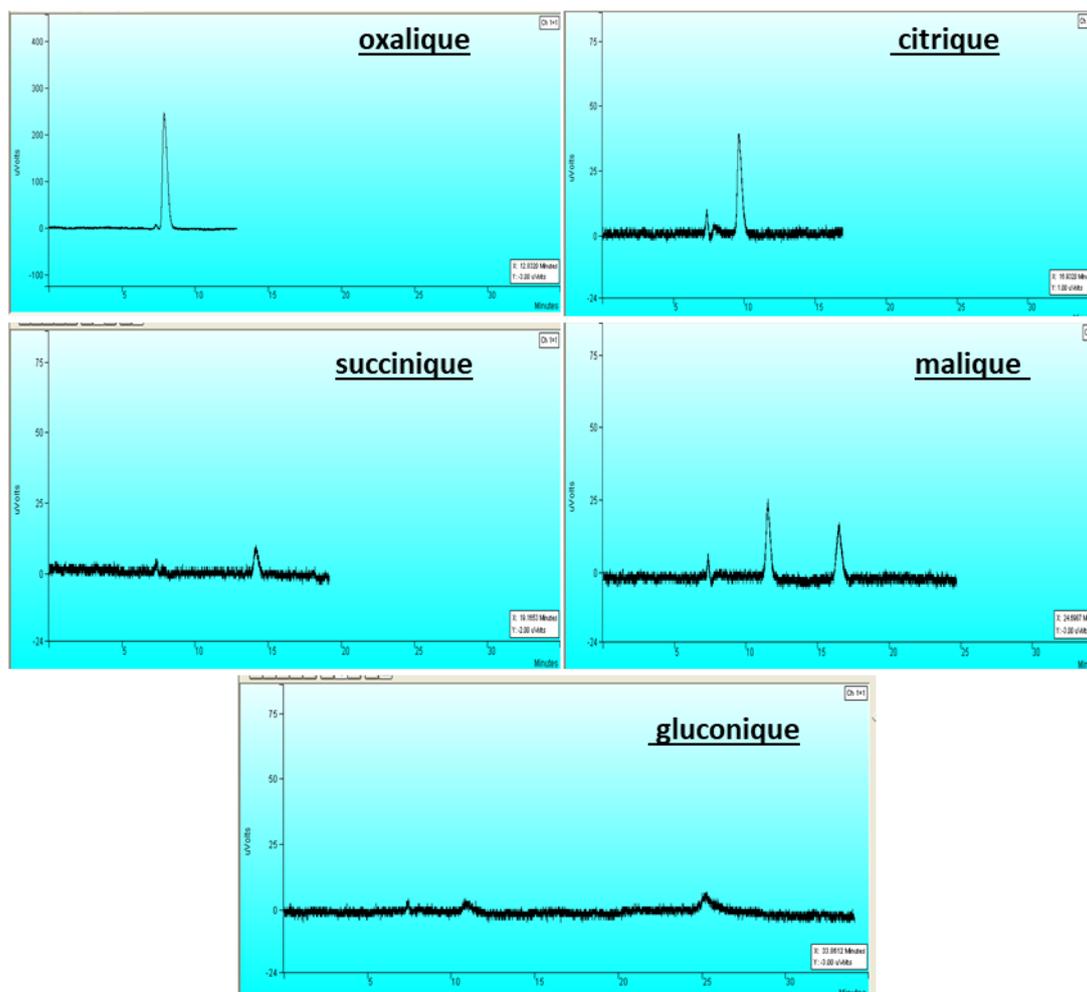


Figure 52. Chromatogrammes des 5 acides étudiés injectés dans les conditions :  $H_2SO_4$  à 0,008N à 0,5  $mL \cdot min^{-1}$  avec colonne chauffée à 35°C.

Le tableau 35 présente les temps de rétention des acides étudiés (oxalique, citrique, gluconique, malique et succinique), ainsi que les intensités et les aires des pics.

Tableau 35. Temps de rétention, intensités et aires des pics des acides étudiés injectés dans les conditions :  $H_2SO_4$  à 0,008N à 0,5  $mL \cdot min^{-1}$  avec colonne chauffée à 35°C.

Acides	Temps de rétention (min)	Intensité ( $\mu V$ )	Aire des pics
<b>Oxalique</b>	8,09	218	5240
<b>Citrique</b>	10,02	34	761
<b>Gluconique</b>	10,89	52	260
<b>Malique</b>	12,03 et 19,09	13	521 et 562
<b>Succinique</b>	15,14	14	374

D'après le tableau 35 à concentration identique l'acide oxalique présente une intensité plus élevée que celle des autres acides de l'étude (4 à 15 fois supérieur). Par ailleurs, l'acide malique présente 2 pics qui sont détectés à 12,03 min et à 19,09 min. L'acide malique a des isomères D et L. Il provient généralement de l'acide maléique ou fumarique. En effet, il est reporté qu'il est produit par l'hydratation catalytique de l'acide maléique ou fumarique ou encore par la conversion catalysée par des enzymes (généralement produite par les bactéries) de l'acide fumarique (Mondala 2015). Le pic à 19,09 min peut correspondre à l'acide maléique ou fumarique. L'acide fumarique a été injecté en HPLC aux mêmes conditions, il a été détecté à 20,4 min.

### III. Validation de la méthode HPLC

#### III.1) Gamme d'étalonnage des acides

Une gamme d'étalonnage de 17 étalons est préparée à partir d'une solution mère à  $1\text{g.L}^{-1}$  d'acides. La solution d'acides est préparée en mélangeant 100 mg de poudre de chaque acide en mélange : oxalique, citrique, malique, gluconique et succinique dans 100 mL d'eau ultrapure. Les acides sont tous de qualité analytique (SIGMA ALDRICH).

Les solutions d'étalonnage sont préparées à partir de la solution mère d'acides et sont complétées avec le milieu GS pour qu'elles soient préparées dans la même matrice que celles des échantillons à analyser (la composition de ce milieu est détaillée en annexe n°1). Chaque étalon a été injecté trois fois et la moyenne des aires de pics a été prise en compte pour tracer les droites d'étalonnage.

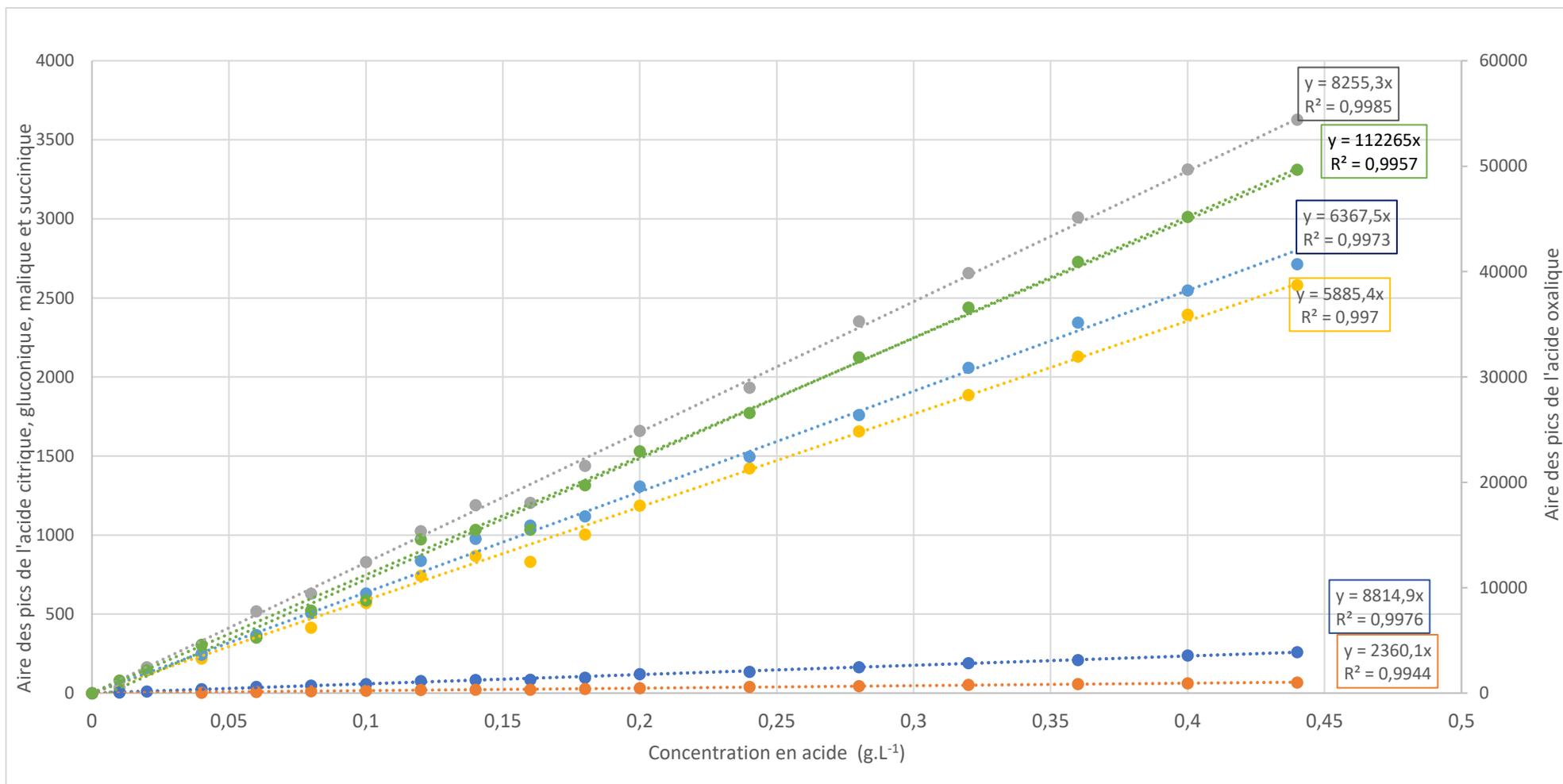
Le tableau 36 présente les données de préparation de la gamme d'étalonnage des acides étudiés.

Tableau 36. Données de préparation de la gamme d'étalonnage des acides étudiés.

Etalon	Concentration (g.L <sup>-1</sup> )	V solution mère à 1g.L <sup>-1</sup> (mL)	V milieu GS (mL)	Vf (mL)
1	0,01	0,1	9,9	10
2	0,02	0,2	9,8	10
3	0,04	0,4	9,6	10
4	0,06	0,6	9,4	10
5	0,08	0,8	9,2	10
6	0,1	1	9	10
7	0,12	1,2	8,8	10
8	0,14	1,4	8,6	10
9	0,16	1,6	8,4	10
10	0,18	1,8	8,2	10
11	0,20	2,0	8,0	10
12	0,24	2,4	7,6	10
13	0,28	2,8	7,2	10
14	0,32	3,2	6,8	10
15	0,36	3,6	6,4	10
16	0,4	4	6	10
17	0,44	4,4	5,6	10

Les droites d'étalonnage des acides sont ainsi tracées en prenant en compte les aires des pics intégrés grâce au logiciel STAR 6.0 du fournisseur VARIAN et sont présentées en figure 53.

Les droites d'étalonnage des acides montrent des coefficients de détermination ( $r^2$ ) satisfaisants, tous supérieurs à 0,99.



● malique 1 ● oxalique ● malique 2 ● succinique ● citrique ● gluconique

Figure 53. Droites d'étalonnage des acides étudiés.

### III.2) Calcul des limites de détection et de quantification

En HPLC, les limites de détection et de quantifications sont le plus souvent déterminées à partir du signal du bruit. Le bruit est alors considéré comme un « blanc ». Le signal et le bruit sont estimés directement à partir du chromatogramme sur la ligne de base 30 secondes avant et après le pic (Vial et Jardy 1999; Wells et al. 2011).

Le calcul des limites de détection (LD) et de quantification (LQ) est réalisé à partir des pentes des droites d'étalonnage signal/bruit. La LD est considérée comme étant égale à 3 fois le bruit de fond et la LQ en étant égale à 9 fois le bruit de fond. Le bruit de fond est déterminé à tous les temps de sortie de pics au moyen de l'injection du milieu de culture GS 3 fois. Une moyenne de ces trois bruits de fond est réalisée.

Le rapport signal/bruit est calculé en prenant en compte les intensités de pics des acides à toutes les concentrations ainsi que la moyenne du bruit de fond. Les droites rapport signal/bruit en fonction des concentrations de chaque acide à chaque concentration sont alors tracées. Les pentes de ces droites sont employées pour le calcul de la LD et LQ. Les limites de détection et de quantification des acides étudiés sont présentées en tableau 37.

Tableau 37. Les limites de détection et de quantification des acides étudiés.

	oxalique	citrique	gluconique	malique 1	succinique	malique 2
LD (g.L <sup>-1</sup> )	0,004	0,01	0,07	0,03	0,06	0,05
LQ (g.L <sup>-1</sup> )	0,01	0,04	0,21	0,08	0,17	0,16

Une étude en HPLC par Trujillo-Vargas et al. (2021) montre des LD de 0,006 g.L<sup>-1</sup> pour l'acide oxalique et citrique et des valeurs de LQ de 0,02 et 0,05 g.L<sup>-1</sup> respectivement. Ces valeurs restent comparables avec les valeurs obtenues par notre méthode d'analyse. Une autre étude par Scherer et al. (2012) relèvent des valeurs de LD de 0,0019 g.L<sup>-1</sup> et de LQ de 0,0062 g.L<sup>-1</sup> pour l'acide citrique et 0,0072 g.L<sup>-1</sup> de LD et 0,0024 g.L<sup>-1</sup> de LQ pour l'acide tartrique. Tandis que pour l'acide malique, des valeurs sont de 0,0033 g.L<sup>-1</sup> de LD et 0,011 de LQ. Jain et al. (2011) présentent des valeurs de LD de 0,008 g.L<sup>-1</sup> et 0,026 g.L<sup>-1</sup> pour l'acide citrique. Nos valeurs restent donc assez élevées par rapport aux valeurs retrouvées dans la littérature.

## IV. Analyse des milieux de culture en HPLC

### IV.1) Analyse des milieux de culture de *Absidia cylindrospora*

Les milieux de culture filtrés sont injectés avec les mêmes conditions chromatographiques :  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 0,008N à  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  avec une colonne chauffée à  $35^\circ\text{C}$ . Les concentrations en acides par  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  sont calculées en se basant sur les pentes des droites d'étalonnage établies. Chaque échantillon est injecté 3 fois, les concentrations présentées représentent donc la moyenne de 3 mesures.

Les teneurs en acides dans les milieux de culture dans lesquels a poussé la souche fongique *Absidia cylindrospora* sont supérieures aux limites de quantification pour 2 acides : l'acide oxalique (LQ=  $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et l'acide citrique (LQ=  $0,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La souche fongique *Absidia cylindrospora* a donc produit l'acide oxalique et l'acide citrique. Pour ce qui est de l'acide gluconique (LD=  $0,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), malique (LD=  $0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et succinique (LD=  $0,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), leurs concentrations sont inférieures à la limite de détection.

Les concentrations en acide oxalique et citrique produits par *Absidia cylindrospora* sont détaillés en annexe n°14.

#### IV.2.1) Production de l'acide oxalique par *Absidia cylindrospora*

La figure 54 montre les teneurs en acide oxalique analysées à chaque période de prélèvement (24h, 48h, 72h et 96h).

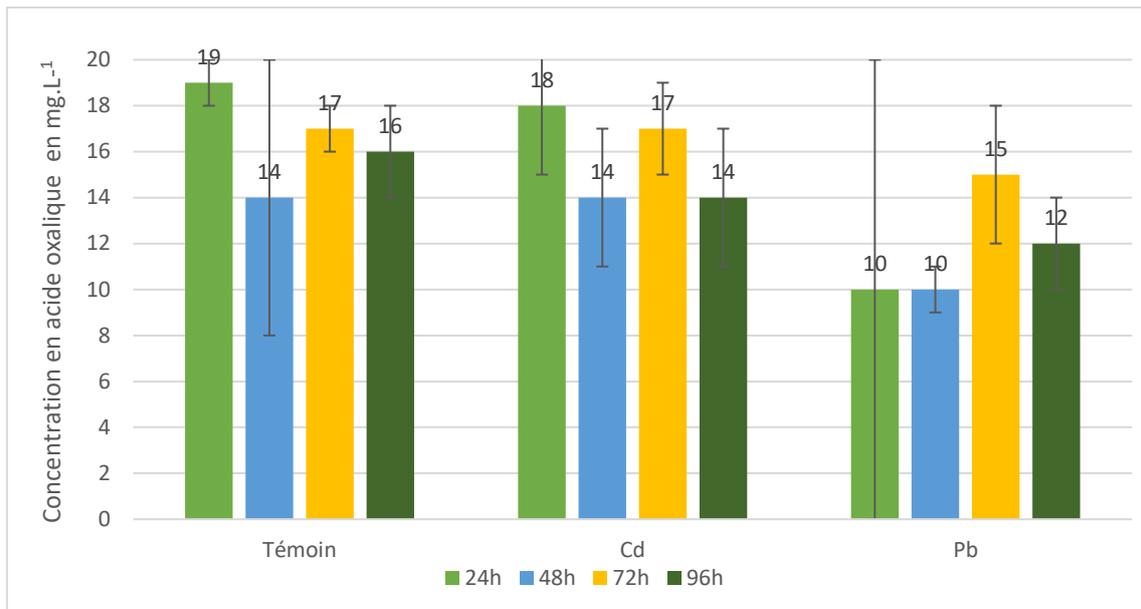


Figure 54. Concentrations en acide oxalique en  $\text{mg.L}^{-1}$  analysées à chaque période de prélèvement (24h, 48h, 72h et 96h) dans les milieux de culture d'*Absidia cylindrospora*.

#### IV.2.1.1) Influence du métal sur la production d'acide oxalique

Les résultats de la figure 54 montrent d'une manière générale que les concentrations d'acide oxalique produites par *Absidia cylindrospora* sont du même ordre de grandeur (entre 10 et 19  $\text{mg.L}^{-1}$ ) pour tous les milieux de culture (témoin sans ajout de métal ou dans le milieu enrichi en Cd ou en Pb). La production d'acide oxalique par la souche fongique n'est donc pas influencée par l'ajout de métal (Cd ou Pb). Une légère diminution des teneurs produites en acide oxalique est cependant observée dans les milieux de culture enrichis en Pb par rapport aux milieux de culture témoin et aux milieux enrichis en Cd. En effet, en réalisant une moyenne des concentrations en acide oxalique produit par la souche fongique sur les 4 durées d'incubation, il s'avère que dans le milieu de culture enrichi en Pb, la teneur en acide est de  $12 \pm 2 \text{ mg.L}^{-1}$ , contre  $16 \pm 2 \text{ mg.L}^{-1}$  pour le milieu enrichi en Cd et  $17 \pm 2 \text{ mg.L}^{-1}$  pour le milieu témoin.

Bien que Cd soit décrit comme un élément toxique pour les champignons (Hatvani et Mécs 2003), Pb semblerait donc avoir un impact éventuellement plus marqué sur le métabolisme d'*Absidia cylindrospora*, en particulier sur la production d'acides. De même, l'étude de tolérance sur 3 métaux (Cd, Cu et Pb) menée par Albert et al. (2018) en milieu liquide sur la même souche fongique montre que Pb apparaît comme plus perturbateur que Cd et Cu. Les auteurs suggèrent que Pb inhibe la production de biomasse.

Ces premiers résultats montrent qu'il semblerait nécessaire de reproduire ces essais en augmentant la concentration en métal (Cd et/ou Pb) et de tester d'autres types de stress métalliques (tels que Cu, Ni ou Zn) pour mieux visualiser de potentielles variations de concentrations des acides produits, ou plus globalement, de leur nature. En effet, une étude menée par Johansson et al. (2008) a révélé une production d'acide oxalique plus élevée en exposant les champignons ectomycorhiziens<sup>24</sup> (*Hebeloma velutipes*, *Paxillus involutus*, *Piloderma byssinum*, *Rhizopogon roseolus*, *Suillus bovinus*, *Suillus variegatus*) à des concentrations élevées en Pb (100 µM) par rapport à des concentrations basses du même métal (10 µM). Cependant pour Cd, les teneurs produites en acide oxalique ont baissé en exposant les souches fongiques à des teneurs élevées en Cd (10 µM) par rapport aux teneurs basses en Cd (1 µM). Wang et al. (2019) ont montré que la concentration en acide oxalique produite par *Pleurotus ostreatus* a augmenté d'environ 12 fois dans un milieu enrichi en Pb (50 mg.L<sup>-1</sup>) par rapport au milieu témoin sans métal. Cependant, une étude menée par Ahonen-Jonnarth et al. (2000) sur deux souches fongiques (*Suillus variegatus* et *Paxillus involutus*) exposées au Cd (0,44 mM), Ni (17µM) et Cu (157µM) a montré que la production d'acide oxalique par ces dernières n'a pas été affecté par l'ajout de métaux comparé à un milieu témoin sans métal. D'ailleurs, il a été décrit dans la littérature que des acides spécifiques peuvent être produits sous l'influence d'un métal en particulier. L'étude de Xu et al. (2015) montre ainsi que l'ajout de Cd dans le milieu de culture de la souche fongique *Phanerochaete chrysosporium* engendre la production d'acide oxalique. Jarosz-Wilkolazka et Gadd (2003) ont détecté l'acide oxalique dans des milieux de culture enrichis en Zn dans lesquels ont poussé des souches fongiques de pourriture blanche (*Bjerkandera fumosa*, *Phlebia radiata* et *Trametes versicolor*).

Par ailleurs, des études ont montré que l'ajout de champignons ectomycorhiziens (le plus souvent décrits dans la littérature pour leur capacité à produire des acides organiques) pouvaient protéger la plante en symbiose de la toxicité du métal et ceci grâce à la densité de leur mycélium. En effet, le développement d'un mycélium dense pourrait avoir un effet protecteur et augmenter le potentiel de rétention de métal sans pour autant affecter la croissance du champignon (Colpaert et Assche 1993). Le même phénomène pourrait avoir eu lieu dans le cas de notre étude, car le mycélium de la souche fongique *Absidia cylindrospora* (filamenteuse) a tendance à former une pelote, ce qui pourrait expliquer que *Absidia cylindrospora* tolère bien les ETM (Cd et Pb) et par conséquent son métabolisme n'est pas fortement affecté par leur toxicité.

---

<sup>24</sup> La symbiose ectomycorhizienne est la combinaison des racines fines des plantes et du mycélium fongique du sol. Les Basidiomycètes et des Ascomycètes sont les phylums les plus représentés dans le monde des champignons ectomycorhiziens (Nounsi et al. 2014).

En effet, nos résultats montrent une très légère différence des teneurs en acide oxalique produites par *Absidia cylindrospora* dans les milieux enrichis en ETM [(oxalique)<sub>Cd</sub> = 16 ± 2 mg.L<sup>-1</sup> ; (oxalique)<sub>Pb</sub> = 12 ± 2 mg.L<sup>-1</sup>] et le milieu de culture témoin (17 ± 2 mg.L<sup>-1</sup>). Cependant, il a été décrit que la morphologie des champignons filamenteux est difficilement contrôlable en milieu de culture liquide et que la formation de pelote a tendance à ralentir le métabolisme de ce type de champignons. Sakuragawa et al. (2021) expliquent que la forme que peut prendre le mycélium en pelote prive le champignon d'oxygène et de l'accès aux nutriments, ce qui peut par conséquent inhiber la production d'acides par les champignons.

#### IV.2.1.2) Influence de la durée d'incubation sur la production d'acide oxalique

Nos résultats (figure 54) montrent que les teneurs en acide oxalique produites sont entre 14 et 19 mg.L<sup>-1</sup> pour les milieux témoins, entre 14 et 18 mg.L<sup>-1</sup> pour les milieux enrichis en Cd et entre 10 et 15 mg.L<sup>-1</sup> pour les milieux de culture enrichis en Pb de 24h à 96h respectivement. L'hypothèse que la production d'acide oxalique atteint un maximum à 24h, puis s'arrête semble cohérente avec les légères variations des teneurs en acide oxalique mesurées à toutes les durées d'incubation. Cette production paraît donc relativement stable à partir de 24h, sur le temps de l'étude, alors que l'évolution de la production d'acide oxalique (sans exposition au stress métallique) au cours du temps est très souvent reportée dans la littérature. L'étude de Trujillo-Vargas et al. (2020) montre que *Aspergillus niger* produit 1316 mg.L<sup>-1</sup> d'acide oxalique au jour 4 et 5079 mg.L<sup>-1</sup> au jour 9 d'incubation dans le milieu de culture. L'étude menée par Espejo et Agosin (1991) montre que les teneurs en acide oxalique produites dans les milieux de culture dans lesquels ont poussé *Postia placenta* et *Woifiporia cocos* ont tendance à augmenter avec le temps d'incubation. En effet, les teneurs en acide oxalique sont de 950 et 2000 mg.L<sup>-1</sup> respectivement pour *P. placenta* et *W. cocos* au jour 4 d'incubation. L'étude de Swain et Rai (2009) montre également que la production d'acide est plus importante dans le milieu de culture en augmentant le temps d'incubation. En effet, les teneurs en acide oxalique produites par *Fusarium oxysporum* et *Botryodiplodia theobromae* sont d'environ 60 mg.L<sup>-1</sup> au jour 2 et atteignent plus de 120 mg.L<sup>-1</sup> au jour 10. Ceci amène donc à penser qu'une augmentation de la durée d'incubation serait en faveur d'une production d'une quantité plus élevée d'acides. Par ailleurs, la littérature décrit que les champignons de pourriture brune ont tendance à produire des quantités plus importantes d'acide oxalique que les champignons de pourriture blanche (Liaud et al. 2014).

En effet, Hastrup et al. (2012) expliquent que les champignons de pourriture brune n'ont pas la capacité de réguler les taux d'acide oxalique produit, d'où les quantités élevées d'acide oxalique retrouvées dans les milieux de culture dans lesquels ils poussent. *Postia placenta* et *Woifiporia cocos* sont deux champignons de pourriture brune largement étudiés pour leur capacité à produire l'acide oxalique (Espejo et Agosin 1991 ; Micales 1995 ; Clausen et Green 2003). Il serait donc intéressant de se pencher vers les champignons de pourriture brune pour étudier la production d'acide oxalique, au vu leur capacité à produire des concentrations élevées en acide oxalique.

#### IV.2.2) Production de l'acide citrique par *Absidia cylindrospora*

La figure 55 montre les teneurs en acide citrique analysées à toutes les périodes de prélèvement (24h, 48h, 72h et 96h).

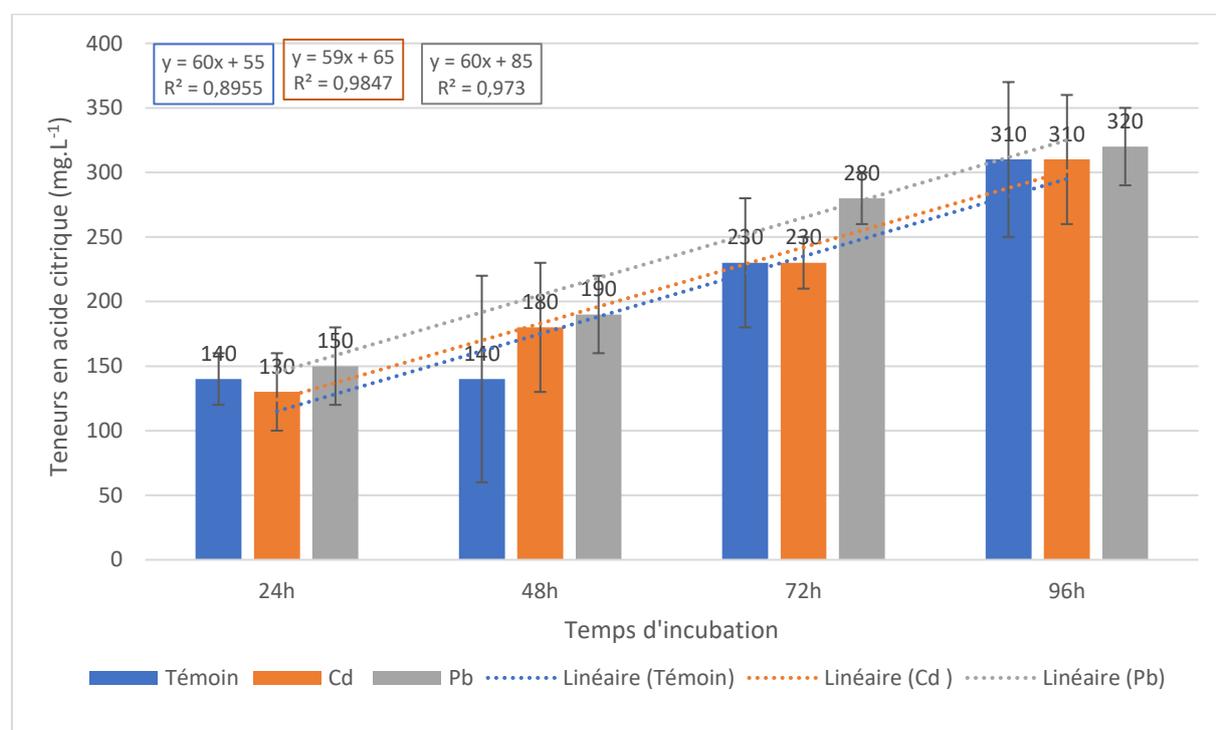


Figure 55. Concentrations en acide citrique analysées à toutes les périodes de prélèvement (24h, 48h, 72h et 96h) dans les milieux de culture d'*Absidia cylindrospora*.

#### IV.2.2.1) Influence du métal sur la production d'acide citrique

Les teneurs en acide citrique produites par *Absidia cylindrospora* sont comprises entre 130 et 320 mg.L<sup>-1</sup> dans tous les milieux de culture (figure 55). En effet, l'ajout de métal (Cd ou Pb) ne semble pas affecter la production d'acide citrique.

Les mêmes concentrations en acide citrique sont retrouvés dans les 3 milieux de culture (témoin, enrichi en Cd et enrichi en Pb) au même temps d'incubation. Les concentrations en acides sont respectivement de 140±20, 130±30 et 150±30 mg.L<sup>-1</sup> dans les milieux de culture témoin, enrichi en Cd et enrichi en Pb après 24h d'incubation. Ces teneurs atteignent 310±60 mg.L<sup>-1</sup> pour les milieux de culture témoin et enrichis en Cd et 320±30 mg.L<sup>-1</sup> pour les milieux enrichis en Pb à 96h d'incubation. Par ailleurs, les courbes de tendances établies sur l'histogramme (figure 55) montrent que les pentes des courbes (témoin, enrichi en Cd et enrichi en Pb) sont similaires et sont de l'ordre de 60. Ceci confirme la production similaire de l'acide citrique par *Absidia cylindrospora* dans les 3 milieux de culture.

Une étude menée par Arwidsson et al. (2010) sur la production d'acides par 3 souches fongiques (*Aspergillus niger*, *Penicillium bilaiae* et *Penicillium* sp.), montre que seule la production d'acide citrique par les champignons est influencée par le stress métallique amené par des nitrates de Pb 8mg.L<sup>-1</sup> (Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) après 5 jours d'incubation. En effet, *Aspergillus niger* produit 3 fois plus d'acide citrique exposée au Pb par rapport au témoin (environ 600 mg.L<sup>-1</sup> et 200 mg.L<sup>-1</sup> respectivement). Pour *Penicillium bilaiae* et *Penicillium* sp., elles produisent respectivement 2000 mg.L<sup>-1</sup> et 2 mg.L<sup>-1</sup> d'acide citrique dans les deux milieux (témoin et enrichi en Pb).

Une étude menée par Deng et al. (2014) sur la production d'acides organiques par *Penicillium chrysogenum* montre qu'après 15 jours d'incubation, la concentration d'acide citrique est de 0,02 mg.L<sup>-1</sup> dans le milieu de culture enrichi en métaux [(Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, CrCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O)] contre moins de 0,01mg.L<sup>-1</sup> dans le milieu de culture témoin. Ces résultats ne sont pas compatibles avec ceux de notre étude, en effet l'ajout de stress métallique (Cd ou Pb) ne semble pas affecter la production d'acide citrique.

#### IV.2.2.2) Influence de la durée d'incubation sur la production d'acide citrique

Comme le montre la figure 55, la production d'acide citrique par *Absidia cylindrospora* tend à augmenter avec le temps d'incubation et ceci dans tous les milieux de culture (témoin, enrichi en Cd et enrichi en Pb) contrairement à l'acide oxalique.

En effet, la production d'acide a doublé entre 24 et 96h passant de 130 à 320 mg.L<sup>-1</sup>. Pour aller plus en détail, entre le jour 1 et le jour 2, les teneurs en acide n'ont pas augmenté pour le milieu de culture témoin et sont restées à 140 mg.L<sup>-1</sup>. L'évolution des teneurs n'a commencé qu'à partir de 72h d'incubation.

Pour ce qui est des milieux enrichis en métaux, les teneurs en acides produites ont progressivement augmenté du jour 1 au jour 4 et sont aux mêmes niveaux de production : 130 et 150 mg.L<sup>-1</sup> à 24h, 180 et 190 mg.L<sup>-1</sup> à 48h, 230 et 280 mg.L<sup>-1</sup> à 72h et 310 et 320 mg.L<sup>-1</sup> à 96h d'incubation respectivement pour Cd et Pb. Par ailleurs, les courbes de tendances établies sur l'histogramme (figure 55) montrent des coefficients de détermination ( $r^2$ ) aux alentours de 0,9 pour les milieux de culture (témoin, enrichi en Cd et enrichi en Pb). Ceci confirme l'évolution de la production d'acide citrique par *Absidia cylindrospora* dans les milieux de culture. Par ailleurs, une étude de Trujillo-Vargas et al. (2020) montre qu'*Aspergillus niger* produit sans stress métallique au jour 1 d'incubation environ 9 mg.L<sup>-1</sup> d'acide citrique, contre 140 mg.L<sup>-1</sup> pour *Absidia cylindrospora*. Tandis qu'au jour 4 d'incubation, *A. niger* produit 10 mg.L<sup>-1</sup> d'acide citrique contre 300 mg.L<sup>-1</sup> environ pour *Absidia cylindrospora*. Dans l'étude de Yang et al. (2014), *Aspergillus carbonarius* produit 5 fois plus d'acide citrique entre le jour 3 et le jour 7 (3 g.L<sup>-1</sup> et 15 g.L<sup>-1</sup> d'acide citrique respectivement). Les résultats de ces études correspondent à ceux relevés pour *Absidia cylindrospora*.

#### IV.2.3) Comparaison de la production d'acide oxalique et d'acide citrique

La figure 56 résume les concentrations d'acide oxalique et citrique produits dans les milieux de culture témoin, enrichi en Cd et enrichis en Pb pour toutes les durées d'incubation.

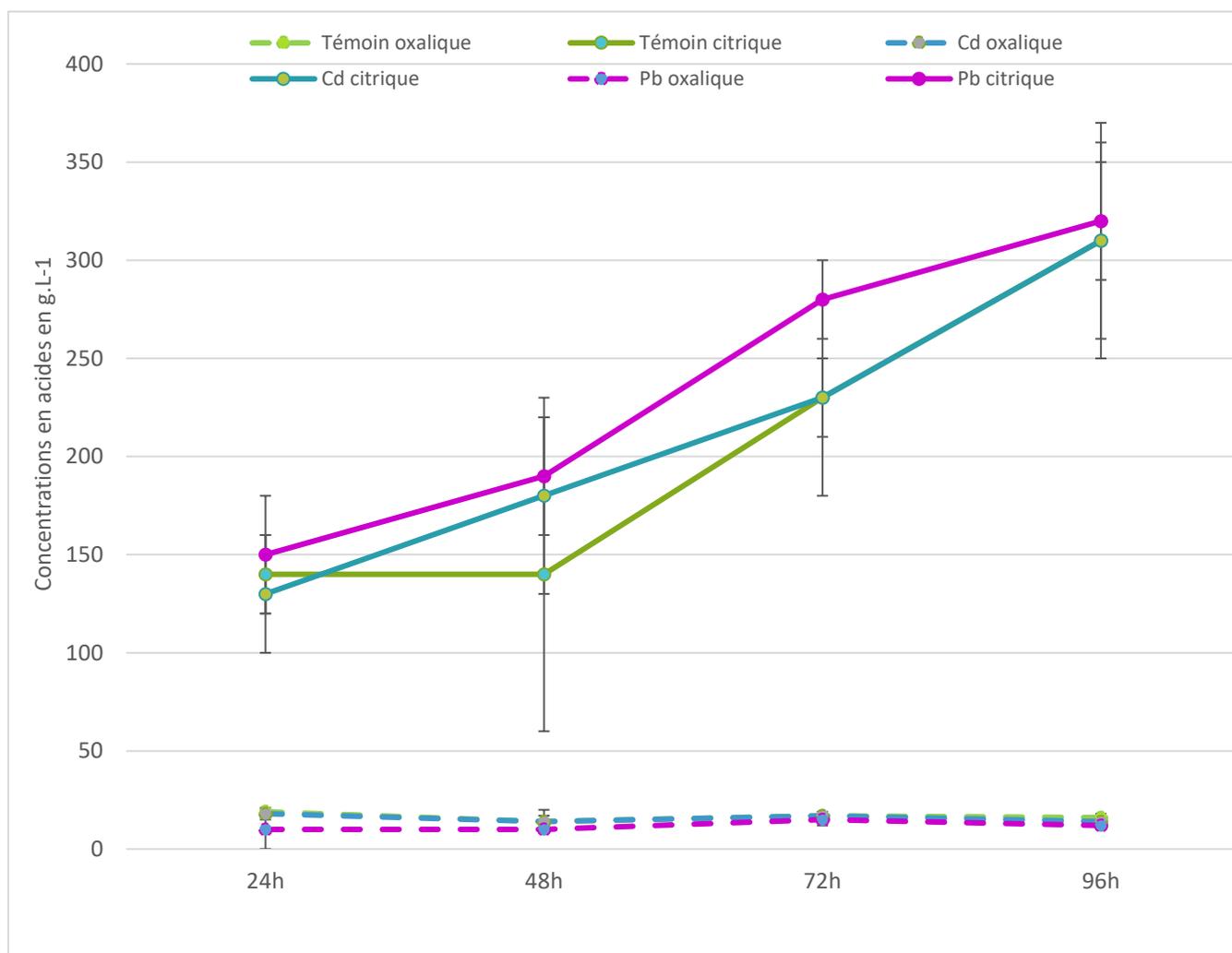


Figure 56. Concentrations en mg.L<sup>-1</sup> en acides (oxalique et citrique) dans les milieux de culture à toutes les durées d'incubation.

D'après la figure 56, les niveaux de production d'acides oxalique et citrique par la souche *Absidia cylindrospora* sont différents. En effet, il apparaît que cette souche fongique produit dans les mêmes conditions environ 15 fois plus d'acide citrique que d'acide oxalique (140 et 320 mg.L<sup>-1</sup> et 10 et 19 mg.L<sup>-1</sup> respectivement). Ces résultats sont cohérents avec les études de Fomina et al. (2005) et Yang et al. (2014), qui constatent une production d'acide citrique supérieure à celle de l'acide oxalique, avec respectivement les souches *Beauveria caledonica* et *Aspergillus carbonarius* sans condition de stress métallique. Aussi, Jain et al. (2011) détectent l'acide oxalique à une concentration de 0,9 g.L<sup>-1</sup> et l'acide citrique à 4 g.L<sup>-1</sup> produit dans le milieu de culture d'*Aspergillus awamori* après 6 jours d'incubation dans un milieu Pikovsakya.

Cependant, plusieurs autres études montrent que l'acide oxalique est l'acide majoritairement produit par une large variété de champignons de pourriture blanche (Lapeyrie et al. 1987; Cunningham et Kuiack 1992; Jordan et al. 1996; Dutton et Evans 1996; Gadd 1999; Machuca et al. 2001; Mäkelä et al. 2002; Clausen et Green 2003; Fomina et al. 2005; Jarosz-Wilkolazka et Graz 2006; Trujillo-Vargas et al. 2020), mais aussi par les champignons de pourriture brune et les champignons mycorhiziens (Karaffa et Kubicek 2020). Parallèlement, de nombreuses études montrent également que l'acide oxalique est produit par les champignons en plus grande quantité par rapport à d'autres acides comme l'acide citrique, malique, ou encore tartrique. En effet, l'étude de Trujillo-Vargas et al. (2020) montre qu'*Aspergillus niger* produit 100 fois plus d'acide oxalique (1136 mg.L<sup>-1</sup>) que d'acide citrique (10 mg.L<sup>-1</sup>) après 4 jours d'incubation. Une autre étude (Liaud et al. 2014) sur la production d'acides par la même souche (*Aspergillus niger*-BRFM420) montre que l'acide oxalique est produit à hauteur de 1,6 g.L<sup>-1</sup> contre 0,1 g.L<sup>-1</sup> pour l'acide tartrique, soit environ 16 fois plus. Une autre étude par Li et al. (2016) montre qu'à pH 6,5, les champignons filamenteux *Penicillium oxalicum* et *Aspergillus niger* produisent respectivement 0,9 et 2,3 g.L<sup>-1</sup> d'acide oxalique contre 0,5 et 0,3 d'acide citrique après 5 jours d'incubation. Aussi, l'étude de Deng et al. (2014) montre que *Penicillium chrysogenum* produit 150 mg.L<sup>-1</sup> d'acide oxalique, contre 0,02 mg.L<sup>-1</sup> d'acide citrique, 0,03 mg.L<sup>-1</sup> d'acide malique, 70 mg.L<sup>-1</sup> d'acide succinique et 100 mg.L<sup>-1</sup> d'acide gluconique. Ces dernières études présentées, qui montrent que l'acide oxalique est produit en plus grande quantité par rapport à d'autres acides organiques, emploient exclusivement des *Penicillium* (*P. oxalicum* et *P. Penicillium oxalicum*) et *Aspergillus niger*. Cependant, cette dernière souche est plus connue pour la production de l'acide citrique à l'échelle industrielle. Cette production industrielle est basée sur le concept de l'hyperproduction spécifique à certaines souches de champignons filamenteux. L'hyperproduction fait référence à la capacité d'un organisme à réaliser une production avec de très grands rendements en quelques jours (Kristiansen et Sinclair, 1978). *Aspergillus niger* est également connue pour produire l'acide oxalique, mais pas à l'échelle industrielle (Kubicek et al. 2010).-Autrement, les études qui réfutent ce constat (l'acide oxalique est produit en plus grande quantité par rapport à d'autres acides organiques) emploient également d'autres espèces d'*Aspergillus* (*A. carbonarius* et *A. awamori*) moins décrites dans la littérature pour leur capacité à produire l'acide citrique. Par ailleurs, les espèces appartenant au genre *Aspergillus* font partie de la division des *Ascomycota*, tandis que notre souche fongique appartient à la division des *Mucoromycota*. Il est décrit que certaines divisions de champignons sont plus connues pour produire certains types d'acides en particulier.

L'acide lactique par exemple, est plutôt produit par des *Zygomycota*, alors que des *Ascomycota* n'en produisent pas (Kubicek et al. 2010)

## IV.2) Analyse des milieux de culture de *Perenniporia fraxinea*

Les milieux de culture filtrés sont injectés avec les mêmes conditions chromatographiques :  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 0,008N à 0,5 mL.min<sup>-1</sup> avec une colonne chauffée à 35°C. Les concentrations en acides par g.L<sup>-1</sup> sont calculées en se basant sur les pentes des droites d'étalonnage établies. Chaque échantillon est injecté 3 fois.

Les concentrations en acides (oxalique, citrique, malique et succinique) dans les milieux de culture dans lesquels a poussé la souche fongique *Perenniporia fraxinea* sont toutes inférieures à la limite de détection. Seul l'acide gluconique est détectable (concentrations supérieures à la limite de détection : 0,07 g.L<sup>-1</sup>) dans les milieux de culture, mais reste inférieur à la limite de quantification (0,21 g.L<sup>-1</sup>). En effet, la technique par HPLC n'est pas assez sensible pour détecter de très faibles quantités d'acides. Des champignons du même phylum (basidiomycète) que la souche fongique *Perenniporia fraxinea* sont pourtant connus pour produire tous types de métabolites, en particulier l'acide oxalique et l'acide malique (Takao 1965). Cependant l'étude de Jarosz-Wilkolazka et Graz (2006) a montré qu'une souche nommée *Perenniporia subacida* s'est montré inefficace quant à la production d'acide oxalique. Dans une étude récente, Ngo et al. (2021) ont testé 40 souches dont *Perenniporia cft tephropora*. Ils ont trouvé que seulement 8 souches avaient la capacité de produire des acides organiques, la souche *Perenniporia* ne fait pas partie de ces dernières. Une étude menée par Arantes et Milagres (2007) a également montré que *Perenniporia medulla-panis* ne produisait pas d'acides organiques dans les conditions testées.

## IV.3) Influence de la composition du milieu de culture sur la production d'acides par les champignons

### IV.3.1) Source de glucose

La composition du milieu de culture (milieu GS sélectionné pour l'étude dans lequel ont poussé les souches fongiques *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea*) a été choisie en prenant en compte la composition des milieux de culture employés dans la littérature pour étudier la production d'acides par des souches fongiques. Le composé de base retrouvé dans les milieux de culture est le glucose.

En effet, un micro-organisme a besoin d'une source de carbone pour puiser l'énergie et les nutriments que ce soit un glucide simple (tel le glucose) ou un glucide complexe (tel que la cellulose ou l'amidon) (Restino 2012).

Le glucose est donc toujours présent dans les milieux de culture avec des proportions différentes : 5 g.L<sup>-1</sup> (Lapeyrie et al. 1987 ; Mäkelä et al. 2002), 10 g.L<sup>-1</sup> (Jarosz-Wilkoazka and Graz 2006), 20 g.L<sup>-1</sup> (Tsao 1963), 40 g.L<sup>-1</sup> (Peleg et al. 1988) et peut atteindre jusqu'à 50 g.L<sup>-1</sup> (Yin et al. 1997). Dans notre étude, la concentration de glucose employée est de 10 g.L<sup>-1</sup>, ce qui se situe à peu près dans les gammes basses de glucose employées pour produire des acides. Ainsi, une augmentation de la proportion de glucose devrait pouvoir augmenter le potentiel de production des acides par les souches fongiques.

Il est à noter qu'une production d'acide trop importante dans le milieu de culture pourrait baisser considérablement le pH du milieu de culture et par conséquent inhiber la croissance du champignon (Fardelone et al. 2021). Le pH est donc également un paramètre important à prendre en compte dans la production d'acides par des champignons filamenteux. En effet, des études ont montré que des pH faibles pourraient augmenter les taux de production de l'acide citrique par *Aspergillus niger* et des pH de l'ordre de 6 pourraient favoriser la production de l'acide malique par *Aspergillus flavus* (Peleg et al. 1988 ; Yang et al. 2014).

Il serait également intéressant de pouvoir évaluer la consommation de glucose par la souche fongique dans le milieu. Ceci peut être réalisé par le moyen d'un dosage de glucose en employant des kits enzymatiques facilement accessibles. L'évaluation de la consommation de glucose pourrait sans doute donner des indications quant au besoin de la souche fongique en nutriments et en source de carbone en général. Par ailleurs, les niveaux de concentrations en acide oxalique assez stables observés (figure 54) pourraient être expliqués par une consommation intégrale du glucose qui compose le milieu de culture. En effet, les métabolites produits par *Absidia cylindrospora* comme l'acide oxalique sont issus de la conversion d'un substrat (glucose), ainsi dès que ce dernier n'est plus présent dans le milieu de culture, le métabolite en question n'est plus produit, d'où la nécessité d'augmenter la proportion de glucose introduite dans le milieu de culture au départ.

D'autres sources de carbone peuvent cependant être employées tel que le maltose, xylose ou encore le fructose. L'étude de Dörsam et al. (2017) montre que selon la source de carbone employée, la production de l'acide malique par *Aspergillus oryzae* est différente.

Ces dernières peuvent être classées comme suit selon la production d'acide malique : glucose ( $40\text{g.L}^{-1}$ ) > maltose ( $34\text{g.L}^{-1}$ ) > mannose ( $30\text{g.L}^{-1}$ ) > fructose ( $25\text{g.L}^{-1}$ ) > xylose ( $24\text{g.L}^{-1}$ ) > ribose ( $21\text{g.L}^{-1}$ ) > lévoglucosan ( $17\text{g.L}^{-1}$ ). *Aspergillus oryzae* est un champignon filamenteux, employé dans des aliments fermentés et dans la production industrielle d'enzymes (Sakuragawa et al. 2021).

De même, Yin et al. (1997) ont testé plusieurs sources de carbone (telles que : glucose, mannose, fructose, maltose...) à la même concentration dans le milieu de culture pour évaluer la production d'acide lactique par *Rhizopus oryzae*. Les résultats de leur étude ont montré qu'en employant le glucose, la concentration en acide lactique était de  $92\text{g.L}^{-1}$ , suivi du fructose avec  $88\text{g.L}^{-1}$ , ensuite du mannose avec  $84,5\text{g.L}^{-1}$  et du sucrose avec  $52,4\text{g.L}^{-1}$ . La source de carbone est donc un paramètre important conditionnant la production d'acides organiques par les champignons, sans oublier d'autres paramètres, tels que la température et l'humidité (Arwidsson et al. 2010).

#### IV.3.2) Source d'azote

La source d'azote peut également influencer la production d'acides. En effet, des études montrent d'une manière générale que les champignons de pourriture blanche ont tendance à produire plus d'acide oxalique en milieu riche en azote, tandis que les champignons de pourriture brune ont tendance à produire l'acide oxalique préférentiellement dans des milieux limités en azote (Gadd, 1999 ; Jarosz-Wilkolazka et Gadd 2003). Par ailleurs, l'étude de Cunningham et Kuyack (1992) a montré que des conditions limitantes en azote favoriseraient la production d'acide citrique, en revanche des conditions limitantes en carbone stimuleraient la production d'acide oxalique. Un apport moindre en azote pourrait donc potentiellement induire une production plus importante d'acide oxalique ou d'acide citrique. En effet, le métabolisme de la souche fongique est fortement influencé par le type de milieu de culture employé, comme explique l'étude de Kim et al. (2016) qui montre que selon les nutriments disponibles, le métabolisme du genre fongique *Aspergillus* peut être orienté vers la production de l'acide citrique ou de l'acide oxalique. Pour notre étude, l'ajout de nitrates de plomb dans le milieu de culture GS n'a pas réellement influencé la production d'acides par les souches fongiques *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea*. En conclusion, la composition du milieu de culture peut avoir une incidence sur la production d'acides, il est donc important d'orienter le choix de sa composition vers la production d'un métabolite en particulier (Arwidsson et al. 2010).

#### IV.4) Conclusion

Les travaux de ce chapitre ont permis en premier lieu de mettre au point une méthode de dosage d'acides organiques produits par les champignons dans leur milieu de culture. En second lieu, les prélèvements quotidiens (24h, 48h, 72h et 96h) des milieux de culture où se sont développés les souches fongiques ont permis de suivre la production d'acides par ces dernières et cela en conditions de stress métallique (milieux artificiellement contaminés en Cd et en Pb). L'identification et la quantification des acides organiques produits par la souche fongique *Absidia cylindrospora* a été possible suite à l'injection des milieux de culture. Nos résultats ont montré que dans les conditions testées, les teneurs en acides (oxalique, citrique, succinique et malique) produits par P.f sont inférieures à la limite de détection, seul l'acide gluconique est détectable dans les milieux de culture de P.f, mais non quantifiable. En revanche, l'acide oxalique et l'acide citrique ont été quantifiés dans les milieux de culture dans lequel a poussé *Absidia cylindrospora*. Pour ce qui est de l'acide gluconique, malique et succinique, ils ne sont pas détectables dans les milieux de culture d'*Absidia cylindrospora* employés ici.

La souche fongique *Absidia cylindrospora* produit l'acide oxalique à des teneurs variant entre 10 et 19 mg.L<sup>-1</sup> dans tous les milieux de culture (témoin, enrichi en Cd et enrichi en Pb), mais la concentration reste stable après 24h. Les facteurs : temps et stress métallique n'ont pas impacté la production d'acide oxalique. Cependant, pour ce qui est de l'acide citrique, sa concentration produite par *Absidia cylindrospora* a doublé de 24h (140 mg.L<sup>-1</sup>) à 96h (320 mg.L<sup>-1</sup>) pour tous les milieux (témoins et enrichis en métaux). Seul le facteur « temps » a affecté la production d'acide citrique, le stress métallique n'a pas eu d'effet sur sa production.

## **Conclusion générale et perspectives**

## Conclusion générale et perspectives

Nos travaux ont en premier lieu, permis de mettre au point un microcosme de sol avec l'avantage de séparer le mycélium de la souche fongique *Absidia cylindrospora* du sol à la fin des différents temps d'incubation et de pouvoir ainsi évaluer l'accumulation de métaux par la souche à partir d'un sol contaminé. Ce modèle de microcosme mis au point a été le résultat de plusieurs essais avec notamment l'emploi de microcosmes en cristallisoirs, mais également en boîte de Petri avec des filtres en microfibre de verre.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'accumulation d'éléments traces métalliques par les souches fongiques *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* au cours d'une expérimentation de 3 mois en employant le microcosme de sol optimisé.

Cette étude de bioaugmentation en microcosme de sol avec la souche fongique *Absidia cylindrospora* a tout d'abord montré que cette souche est capable de se développer et de survivre dans un sol contaminé. Aussi, il a été possible avec ce microcosme développé de déterminer les teneurs en ETM accumulés dans le mycélium, ce qui est généralement rapporté pour des études en milieu liquide. Ceci a permis de révéler la capacité de cette souche à accumuler simultanément des ETM (Cd, Cu, Cr, Co, Pb, Ni et Zn) dans les conditions testées. Cette accumulation d'ETM évolue avec le temps d'incubation. En effet, plus le mycélium reste au contact de sol contaminé, plus il va accumuler de métaux, notamment Cd, Cu, Co, Ni et Zn. Cette étude a également montré que l'accumulation de métaux par *Absidia cylindrospora* diffère selon l'élément. Ainsi pour Cr et Pb, le facteur temps n'a pas influencé les teneurs accumulées au sein du mycélium, qui sont restées stables de 15 jours à 3 mois.

Cependant, ce microcosme n'a pas été efficace pour la séparation du mycélium de *Perenniporia fraxinea* du sol, puisque le mycélium n'a pas pu être récupéré en fin d'essai, en raison de la pousse intra-matricale de la souche fongique dans la gélose. Ceci a mis en lumière une limite de ce microcosme qui ne peut finalement pas être appliqué à tout type de souches dans le but d'évaluer leur potentiel d'accumulation de métaux à partir de sols.

Il serait donc intéressant de tester ce microcosme de sol avec d'autres souches fongiques adaptées à ce type de microcosme, c'est à dire ayant une croissance similaire à *Absidia cylindrospora* (autres *Mucoromycota* en particulier) ou encore avec un autre groupe de champignons comme les *Ascomycota* par exemple.

Il serait également intéressant d'améliorer la biomasse de *Perenniporia fraxinea* (phase de pré-culture, inoculum, ...) afin de favoriser sa croissance au sein du microcosme. Il paraît donc

important de poursuivre la mise au point du microcosme et la séparation finale champignon sol pour des souches types.

De plus, le manque de nutriments au sein du microcosme a conduit à un assèchement de la gélose et par conséquent une baisse de la diversité fongique observée dans le microcosme. Il serait donc envisageable d'ajouter des nutriments au cours de l'essai afin de maintenir les espèces fongiques présentes dans le sol dans de bonnes conditions de croissance.

Par ailleurs, des études complémentaires en employant le MEB<sup>25</sup> permettraient une étude plus fine des interactions entre le mycélium et les métaux dans les sols pollués. Ceci permettrait de mieux visualiser à l'échelle des hyphes : la structure du mycélium au contact de métaux, les processus déployés par les souches fongiques pour accumuler les métaux à partir de sols contaminés et ainsi pouvoir comprendre les mécanismes liés au stress métallique (Fomina et Gadd 2008; Talukdar et al. 2020 ; Zhao et al. 2020).

D'autre part, le suivi fongique réalisé au cours de cette étude a permis d'identifier les souches fongiques ayant poussé sur les sols bioaugmentés et biostimulés tout au long de la période d'incubation (de 15 jours à 3 mois). Nos résultats suggèrent que la souche fongique *Actinomucor elegans*, une mucorale de la même famille qu'*Absidia cylindrospora*, pourrait être testée en bioaugmentation. En effet, cette souche a été isolée à partir d'un sol fortement chargé en métaux. Il serait cependant plus sûr de réaliser d'abord des tests de tolérance en milieu liquide avant d'entamer une étude en microcosme de sol.

Le troisième objectif de la thèse était d'affiner l'étude de l'impact des champignons sur la spéciation minéralogique des métaux dans les sols, par l'utilisation de techniques d'extractions chimiques simples et séquentielles. Ainsi, il a été possible d'estimer l'impact de la bioaugmentation avec la souche *Absidia cylindrospora* sur la spéciation minéralogique des métaux étudiés avec l'expérimentation de 3 mois. Nos résultats ont montré que la fraction potentiellement disponible des sols (F6) a augmenté pour Cd, Co, Pb et Zn de 26, 18, 24 et 22% respectivement en comparant le sol à T0 au sol à T 3 mois. Pour ce qui est des autres ETM (Cu, Cr et Ni), cette fraction est restée stable, en effet les variations sont de l'ordre de 5% au maximum, ce qui reste négligeable. Cette étude de bioaugmentation fongique a donc permis d'observer que la labilité des ETM augmente avec l'ajout d'*Absidia cylindrospora*. Ce résultat souligne l'efficacité de la souche à modifier la spéciation minéralogique des ETM dans le sol. Cet aspect peut être valorisé pour des études de mycoremédiation couplé à de la phytoextraction.

---

<sup>25</sup> **MEB** : microscopie électronique à balayage

Il serait également intéressant de tester les mêmes souches étudiées sur d'autres sols pollués avec des teneurs en ETM similaires aux sols de notre étude pour voir si les comportements des ETM sont les mêmes. Aussi, il serait envisageable de tester d'autres souches fongiques sur les mêmes sols pour étudier leur influence sur le comportement des ETM.

Le quatrième et dernier objectif de la thèse était de dresser des profils de composés sécrétés par les champignons, en l'occurrence des acides organiques produits par les deux souches fongiques *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* sous conditions de stress métallique (présence de Cd ou de Pb).

Cette étude a permis en premier lieu de développer une méthode d'analyse en HPLC permettant d'analyser 5 acides organiques produits par les souches fongiques à partir d'un milieu de culture liquide. En second lieu, le dosage de ces acides dans les milieux de culture (à 24h, 48h, 72h et 96h) a permis d'identifier et de quantifier les acides produits par la souche fongique *Absidia cylindrospora*. Nos résultats ont montré que les teneurs en acides (oxalique, citrique, succinique et malique) produits par *Perenniporia fraxinea* sont inférieures à la limite de détection dans les conditions testées. Seul l'acide gluconique est détecté dans les milieux de culture de *Perenniporia fraxinea*, mais sa teneur reste inférieure à la limite de quantification.

Pour ce qui est d'*Absidia cylindrospora*, l'acide oxalique et citrique ont été identifiés et quantifiés dans les milieux de culture dans lesquels elle a poussé, tandis que les acides : succinique, gluconique et malique ne sont pas détectables.

Cette souche a sécrété l'acide oxalique à des teneurs variant entre 10 et 19 mg.L<sup>-1</sup> à toutes les durées d'incubation (24h, 48h, 72h et 96h), ce qui veut dire que pour la durée testée (96h), le facteur temps n'a pas eu d'influence sur les quantités produites. Cependant, pour l'acide citrique, une évolution marquée de la quantité produite a été observée : la concentration d'acide citrique produite par *Absidia cylindrospora* a doublé entre 24 h et 96 h, en passant de 140 mg.L<sup>-1</sup> à 320 mg.L<sup>-1</sup> pour tous les milieux (témoins et enrichis en Cd ou Pb). En effet, la nature de l'élément métallique n'a ni influencé le taux de production des acides, ni la nature des acides sécrétés. Il serait sans doute envisageable de réaliser cette même étude sur une durée d'incubation plus longue pour visualiser l'influence du facteur temps sur la production d'acides, tout en prenant les précautions de maintenir la souche fongique dans de bonnes conditions de croissance. Il serait également intéressant d'étudier les profils d'acides sécrétés en ayant soumis les isolats fongiques à différents stress métalliques. Ceci pourrait amener à développer également une méthode qui permettrait d'analyser les acides organiques contenus dans les sols pollués en ETM, en passant par une étape d'extraction de ces derniers à partir de la matrice sol. Cette étude pourrait être élargie à l'analyse de sidérophores et de métallothionéines, qui sont

également des composés sécrétés par les champignons, connus pour complexer les métaux (Renshaw et al. 2002 ; Das et al. 2007).

En conclusion, nos résultats confirment le grand potentiel des champignons à être candidats à des essais de bioremédiation de sol. En effet, l'accumulation d'ETM par les champignons, la production d'acides par ces derniers, mais aussi l'influence de la bioaugmentation fongique sur la spéciation minéralogique des ETM dans les sols constituent des atouts considérables pour leur utilisation en mycoremédiation des sols. Néanmoins, la grande diversité fongique, les spécificités liées à chaque groupe de champignons, mais aussi le comportement souvent difficilement appréhendable des ETM dans les sols et au contact de champignons rendent complexes le développement d'une méthode de mycoremédiation. C'est pour cette raison qu'il est indispensable d'optimiser les conditions à grande échelle en développant des microcosmes adaptés aux souches fongiques étudiées avant toute étude en terrain. La grande diversité du monde fongique offre justement plusieurs solutions qui devraient permettre de traiter les différents types de sols pollués.

## Références bibliographiques

## Références bibliographiques

### A

- Abad-Valle, P., E. Álvarez-Ayuso, et A. Murciego. 2015. « Evaluation of Ferrihydrite as Amendment to Restore an Arsenic-Polluted Mine Soil ». *Environmental Science and Pollution Research International* 22 (9): 6778-88. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3868-6>.
- Abbas, A, D Jiang, et Y Fu. 2017. « Trichoderma Spp. as Antagonist of Rhizoctonia Solani ». *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 8 (3): 1-9. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000402>.
- Abbas, Salman H., Ibrahim M. Ismail, Tarek M. Mostafa, et Abbas H. Sulaymon. 2014. « Biosorption of heavy metals: a review ». *J Chem Sci Technol* 3 (4): 74–102.
- Abollino, Ornella, Maurizio Aceto, Mery Malandrino, Edoardo Mentasti, Corrado Sarzanini, et Renzo Barberis. 2002. « Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles ». *Environmental Pollution* 119 (2): 177-93. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00333-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00333-5).
- Adelekan, B. A., et Ka Abegunde. 2011. « Heavy Metals Contamination of Soil and Groundwater at Automobile Mechanic Villages in Ibadan, Nigeria ». *International Journal of Physical Sciences*, 6(5), 1045-1058.
- Adeleke, R., C. Nwangburuka, et Bilainu Oboirien. 2017. « Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review ». *South African Journal of Botany* 108 (janvier): 393-406. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.09.002>.
- Agrawal, Yamini, Isha Gunwal, et Payal Mago. 2021. « Review on Bioremediation of Metal Contaminated Soils ». *Journal of Bioremediation & Biodegradation* 11 (septembre): 469.
- Ahmad, Anwar. 2009. « Study on Effect of HCl and CaCl<sub>2</sub> on Extraction of heavy metals from contaminated soils ». *Asian Journal of Chemistry* 21.3 (2009): 1690.
- Ahmad, Iqbal, Mohd Ikram Ansari, et Farrukh Aqil. 2006. « Biosorption of Ni, Cr and Cd by Metal Tolerant Aspergillus Niger and Penicillium Sp. Using Single and Multi-Metal Solution ». *Indian Journal of Experimental Biology* 44 (1): 73-76.
- Ahmad, Iqbal, Mohd Imran, Mohd Ikram Ansari, Abdul Malik, et John Pichtel. 2011. « Metal Tolerance and Biosorption Potential of Soil Fungi: Applications for a Green and Clean Water Treatment Technology ». *Microbes and Microbial Technology*, édité par Iqbal Ahmad, Farah Ahmad, et John Pichtel, 321-61. New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7931-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7931-5_13).

- Ahmed, E, et S J M Holmström. 2014. « Siderophores in environmental research: roles and applications ». *Microbial Biotechnology* 7 (3): 196-208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>.
- Ahonen-Jonnarth, Ulla, Patrick a. W. Van Hees, Ulla S. Lundström, et Roger D. Finlay. 2000. « Organic Acids Produced by Mycorrhizal Pinus Sylvestris Exposed to Elevated Aluminium and Heavy Metal Concentrations ». *The New Phytologist* 146 (3): 557-67. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00653.x>.
- Ajello, Libero, Lucille K. Georg, Roy T. Steigbigel, et C. J. K. Wang. 1974. « A Case of Phaeohyphomycosis Caused by a New Species of *Phialophora* ». *Mycologia* 66 (3): 490-98. <https://doi.org/10.2307/3758492>.
- Akan, Joseph Clement, Stephen I. Audu, Audu Mohammed Zakari, et Victor Obioma Ogugbuaja. 2013. « Assessment of Heavy Metals, pH, Organic Matter and Organic Carbon in Roadside Soils in Makurdi Metropolis, Benue State, Nigeria ». *Journal of Environmental Protection* 04 (06): 618-28. <https://doi.org/10.4236/jep.2013.46071>.
- Akhtar, Nahid, et M. Amin-ul Mannan. 2020. « Mycoremediation: Expunging Environmental Pollutants ». *Biotechnology Reports* 26 (juin): e00452. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00452>.
- Alan, Mesut, et Derya Kara. 2018. « Comparison of a new sequential extraction method and the BCR sequential extraction method for mobility assessment of elements around boron mines in Turkey ». *Talanta*, octobre. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.030>.
- Albert, Quentin, Lydia Leleyter, Mélanie Lemoine, Natacha Heutte, Jean-Philippe Rioult, Lucile Sage, Fabienne Baraud, et David Garon. 2018. « Comparison of Tolerance and Biosorption of Three Trace Metals (Cd, Cu, Pb) by the Soil Fungus *Absidia cylindrospora* ». *Chemosphere* 196 (avril): 386-92. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.156>.
- Albert, Quentin. 2019. « Sélection de souches fongiques performantes dans la biosorption de 3 éléments traces métalliques (Cd, Cu et Pb) et étude de leur spéciation minéralogique en microcosme de sol ». Thèse de doctorat, Normandie. <http://www.theses.fr/2019NORMC202>.
- Albert, Quentin, Fabienne Baraud, Lydia Leleyter, Mélanie Lemoine, Natacha Heutte, Jean-Philippe Rioult, Lucile Sage, et David Garon. 2019. « Use of Soil Fungi in the Biosorption of Three Trace Metals (Cd, Cu, Pb): Promising Candidates for Treatment Technology? » *Environmental Technology*, mars, 1-12. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1602170>.
- Albert, Quentin, Lydia Leleyter, Mélanie Lemoine, Natacha Heutte, Lucile Sage, David Garon, et Fabienne Baraud. 2020. « Industrial Cd-Contaminated Soil Bioaugmented with *Absidia cylindrospora*: Influence on the Mineralogical Speciation of Cadmium ».

- Ali, Amjad, Di Guo, Amanullah Mahar, Ping Wang, Feng Shen, Ronghua Li, et Zengqiang Zhang. 2017. « Mycoremediation of Potentially Toxic Trace Elements—a Biological Tool for Soil Cleanup: A Review ». *Pedosphere* 27 (2): 205-22. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60311-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60311-4).
- Ali, Hazrat, Ezzat Khan, et Muhammad Anwar Sajad. 2013. « Phytoremediation of Heavy Metals—Concepts and Applications ». *Chemosphere* 91 (7): 869-81. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>.
- Allègre, Claude J., et Gil Michard. 1973. *Introduction à la géochimie*. Presses universitaires de France.
- Álvarez-Ayuso, E., V. Otones, A. Murciego, et A. García-Sánchez. 2013. « Evaluation of Different Amendments to Stabilize Antimony in Mining Polluted Soils ». *Chemosphere* 90 (8): 2233-39. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.086>.
- Amin, Farah, Farah N. Talpur, Aamna Balouch, Zaheer A. Chandio, Muhammad Ali Surhio, et Hassan Imran Afridi. 2016. « Biosorption of Mercury(II) from Aqueous Solution by Fungal Biomass *Pleurotus Eryngii*: Isotherm, Kinetic, and Thermodynamic Studies ». *Environmental Progress & Sustainable Energy* 35 (5): 1274-82. <https://doi.org/10.1002/ep.12342>.
- Amoakwah, E., S. Vanslycken, Tack F.M.G, et D. Essumang. 2013. « Assessing the Extraction Efficiency of CaCl<sub>2</sub> and Rhizon Extraction Methods after the Application of Organic Matter and CaCl<sub>2</sub> as Soil Amendments to Enhance the Mobility of Cd and Zn ». <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000167>.
- Anahid, S., S. Yaghmaei, et Z. Ghobadinejad. 2011. « Heavy metal tolerance of fungi ». *Scientia Iranica* 18 (3): 502-8. <https://doi.org/10.1016/j.scient.2011.05.015>.
- Anand, Purnima, Jasmine Isar, Saurabh Saran, et Rajendra Kumar Saxena. 2006. « Bioaccumulation of Copper by *Trichoderma Viride* ». *Bioresource Technology* 97 (8): 1018-25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.046>.
- Andujar, P., L. Bensefa-Colas, et A. Descatha. 2010. « Intoxication aiguë et chronique au cadmium ». *La Revue de Médecine Interne* 31 (2): 107-15. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2009.02.029>.
- Anglesea, D., et M. J. Swift. 1971. « The Keratinophilic Ability of *Monodictys Levis* and *Trichophyton Ajelloi* ». *Transactions of the British Mycological Society* 57 (2): 333-IN8. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80015-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80015-3).

- Arantes, V., et A. M. F. Milagres. 2007. « Identification of Iron-Regulated Cellular Proteins, Fe<sup>3+</sup>-Reducing and -Chelating Compounds, in the White-Rot Fungus *Perenniporia Medulla-Panis* ». *Canadian Journal of Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1139/W07-102>.
- Archana, Hem Singh, et A. K. Jaitly. 2014. « Bioremediation: Environmental biotechnology for heavy metal decontamination of soil and water ». *Biochemical and Cellular Archives* 14 (2): 259–281.
- Arwidsson, Zandra, Emma Johansson, Thomas von Kronhelm, Bert Allard, et Patrick van Hees. 2010. « Remediation of Metal Contaminated Soil by Organic Metabolites from Fungi I—Production of Organic Acids ». *Water, Air, and Soil Pollution* 205 (1-4): 215-26. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0067-z>.
- Asal Gzar, Hatem Asel, et Israa Mohammed Gatea. 2015. « Extraction of Heavy Metals from Contaminated Soils Using EDTA and HCl ». *Journal of Engineering* 21 (1): 45-61.
- Awad, Mohamed F., et M. Kraume. 2011. « Keratinophilic fungi in activated sludge of wastewater treatment plants with MBR in Berlin, Germany ». *Mycology* 2 (4): 276-82. <https://doi.org/10.1080/21501203.2011.603103>.
- Awasthi, Mukesh Kumar, Akhilesh Kumar Pandey, Jamaluddin Khan, Pushpendra Singh Bundela, Jonathan W. C. Wong, et Ammayappan Selvam. 2014. « Evaluation of Thermophilic Fungal Consortium for Organic Municipal Solid Waste Composting ». *Bioresource Technology*, Special Issue on Advance Biological Treatment Technologies for Sustainable Waste Management (ICSWHK2013), 168 (septembre): 214-21. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.048>.
- Azubuike, Christopher Chibueze, Chioma Blaise Chikere, et Gideon Chijioke Okpokwasili. 2016. « Bioremediation Techniques—Classification Based on Site of Application: Principles, Advantages, Limitations and Prospects ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (11). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>.

## B

- 
- Baize, Denis, Nicolas Saby, et Christian Walter. 2006. « Le cuivre extrait à l'EDTA dans les sols de France. Probabilités de carences et de toxicités selon la BDAT ». *Etude et Gestion des Sols* 13 (4): 259.
- Bakircioglu, Dilek, Yasemin Bakircioglu Kurtulus, et Hilmi İbar. 2011. « Comparison of Extraction Procedures for Assessing Soil Metal Bioavailability of to Wheat Grains ». *CLEAN – Soil, Air, Water* 39 (8): 728-34. <https://doi.org/10.1002/clen.201000501>.
- Balasoïu, Cristina F, Gérald J Zagury, et Louise Deschênes. 2001. « Partitioning and Speciation of Chromium, Copper, and Arsenic in CCA-Contaminated Soils: Influence of Soil Composition ». *Science of The Total Environment* 280 (1): 239-55. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00833-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00833-6).

- Baldrian, Petr. 2002. « Interactions of Heavy Metals with White-Rot Fungi ». *Enzyme and Microbial Technology* 32 (1): 78-91.
- Bandurska, Katarzyna, Piotr Krupa, Agnieszka Berdowska, Igor Jatulewicz, et Iwona Zawierucha. 2021. « Mycoremediation of Soil Contaminated with Cadmium and Lead by sp. » *Ecological Chemistry and Engineering S* 28 (2): 277–286.
- Baraud, Fabienne, et Lydia Leleyter. 2012. « Prediction of Phytoavailability of Trace Metals to Plants: Comparison between Chemical Extractions and Soil-Grown Radish ». *Comptes Rendus Geoscience* 344 (8): 385-95. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2012.07.003>.
- Barnett, H. L, et Barry B Hunter. 2006. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. St. Paul, Minnesota: APS (The American Phytopathological Society) Press.
- Barra Caracciolo, Anna, Paola Bottoni, et Paola Grenni. 2013. « Microcosm Studies to Evaluate Microbial Potential to Degrade Pollutants in Soil and Water Ecosystems ». *Microchemical Journal* 107 (mars): 126-30. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.022>.
- Bartolozzi, Francesco, Gianpaolo Bertazza, Daniele Bassi, et Graziella Cristoferi. 1997. « Simultaneous Determination of Soluble Sugars and Organic Acids as Their Trimethylsilyl Derivatives in Apricot Fruits by Gas-Liquid Chromatography ». *Journal of Chromatography A* 758 (1): 99-107. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00709-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00709-1).
- Battat, E., Y. Peleg, A. Bercovitz, J. S. Rokem, et I. Goldberg. 1991. « Optimization of L-Malic Acid Production by *Aspergillus Flavus* in a Stirred Fermentor ». *Biotechnology and Bioengineering* 37 (11): 1108-16. <https://doi.org/10.1002/bit.260371117>.
- Beck, Raven. 1996. « Soil and Ground-Water Remediation Techniques ». *Geoscience Canada* 23 (1): 22-40.
- Bellarbi, Meriém, Naoual Rais, Françoise Elsass, Joelle Duplay, et Mustapha Ijjaali. 2015. « Speciation of Cr, Cu, Ni and Zn in Soils Irrigated with Contaminated Waters: A Case Study of Agricultural Soils from the Plain of Saiss (Fez, Morocco) ». *Environmental Earth Sciences* 73 (7): 3465-74. <https://doi.org/10.1007/s12665-014-3631-9>.
- Bellion, Marc, Mikaël Courbot, Christophe Jacob, Damien Blaudez, et Michel Chalot. 2006. « Extracellular and Cellular Mechanisms Sustaining Metal Tolerance in Ectomycorrhizal Fungi ». *FEMS Microbiology Letters* 254 (2): 173-81. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00044.x>.
- Benjelloun, Ilham, David Garon, Natacha Heutte, Lydia Leleyter, et Fabienne Baraud. 2021. « A new soil microcosm to evaluate the Cd, Cu and Pb biosorption by *Absidia cylindrospora* ». *Bioremediation Journal* 0 (0): 1-10. <https://doi.org/10.1080/10889868.2021.1974333>.

- Bispo, Antonio, Camille Guellier, Edith Martin, Jurgis Sapijanskas, Hélène Soubelet, et Claire Chenu. 2016. « Les sols Intégrer leur multifonctionnalité pour une gestion durable ». Editions Quae, 384 p., 2016, Savoir Faire (Quae), 978-2-7592-2392-3. (hal-01531711). <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01531711>.
- Blanco-Enríquez, Esmeralda G., Francisco Javier Zavala-Díaz de la Serna, María del Rosario Peralta-Pérez, Lourdes Ballinas-Casarrubias, Iván Salmer  n, H  ctor Rubio-Arias, et Beatriz A. Rocha-Gutiérrez. 2018. « Characterization of a Microbial Consortium for the Bioremoval of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Water ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15 (5): 975. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050975>.
- Boamponsem, G. A., A. K. Obeng, M. Osei-Kwateng, et A. O. Badu. 2013. « Accumulation of heavy metals by *Pleurotus ostreatus* from soils of metal scrap sites ». *International Journal of Current Research and Review* 5 (4): 01-09.
- Bogomolov, D. M., S. -K. Chen, R. W. Parmelee, S. Subler, et C. A. Edwards. 1996. « An ecosystem approach to soil toxicity testing: a study of copper contamination in laboratory soil microcosms ». *Applied Soil Ecology* 4 (2): 95-105. [https://doi.org/10.1016/0929-1393\(96\)00112-6](https://doi.org/10.1016/0929-1393(96)00112-6).
- Bolan, Nanthi, Anitha Kunhikrishnan, Ramya Thangarajan, Jurate Kumpiene, Jinhee Park, Tomoyuki Makino, Mary Beth Kirkham, et Kirk Scheckel. 2014. « Remediation of Heavy Metal(Loid)s Contaminated Soils – To Mobilize or to Immobilize? » *Journal of Hazardous Materials* 266 (février): 141-66. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.018>.
- Bonet, Amandine. 2016. « Réponses de plusieurs espèces de mélèzes et du sapin de Douglas aux éléments traces :   tude de mécanismes de tolérance et des capacités d'accumulation ». Thèse de doctorat, Limoges. <https://www.theses.fr/2016LIMO0018>.
- Bosco, Francesca, et Chiara Mollea. 2019. « Mycoremediation in Soil ». *Environmental Chemistry and Recent Pollution Control Approaches*, février. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84777>.
- Bosso, Luciano, Rosalia Scelza, Antonino Testa, Gennaro Cristinzio, et Maria Antonietta Rao. 2015. « Depletion of Pentachlorophenol Contamination in an Agricultural Soil Treated with *Byssochlamys Nivea*, *Scopulariopsis Brumptii* and Urban Waste Compost: A Laboratory Microcosm Study ». *Water, Air, & Soil Pollution* 226 (6): 183. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2436-0>.
- Bourrelrier, P. H., Paris (FRA) Académie des Sciences, J. Berthelin, et P.H. Bourrelrier. 1998. Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion. *Académie des Sciences, Paris Rapport (FRA)*. Paris: Lavoisier.

- Brito, Gabriella, Regina Geris, Messias Passos, Marcos Malta, Joselito Ribeiro, Marcus Licínio, Daniel Freitas, et al. 2021. « Mycoremediation of Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> from Aqueous Media by Dead Biomass of *Phialomyces macrosporus* ». *Water, Air, & Soil Pollution* 232 (décembre). <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05427-2>.
- Brown, Richard J. C., et Martin J. T. Milton. 2005. « Analytical techniques for trace element analysis: an overview ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Trace-metal analysis, 24 (3): 266-74. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.010>.
- Buffle, J., et M. -L. Tercier-Waeber. 2005. « Voltammetric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Trace-metal analysis, 24 (3): 172-91. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.013>.
- Bur, Thomas. 2008. « Impact anthropique sur les éléments traces métalliques dans les sols agricoles de Midi-Pyrénées : Implications en termes de limites et de charges critiques ». Thèse de doctorat, Toulouse, INPT. <https://www.theses.fr/2008INPT025A>.
- Burrows, Lisa A., et Clive A. Edwards. 2004. « The Use of Integrated Soil Microcosms to Assess the Impact of Carbendazim on Soil Ecosystems ». *Ecotoxicology* 13 (1/2): 143-61. <https://doi.org/10.1023/B:ECTX.0000012411.14680.21>.

## C

---

- Cadene, Anthony. 2005. « Etude expérimentale multiéchelle du transport ionique et aqueux en milieu poreux chargé : argiles ». Thèse de doctorat, Paris 6. <https://www.theses.fr/2005PA066276>.
- Castellari, M., A. Versari, U. Spinabelli, S. Galassi, et A. Amati. 2000. « An Improved Hplc Method for the Analysis of Organic Acids, Carbohydrates, and Alcohols in Grape Musts and Wines ». *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 23 (13): 2047-56. <https://doi.org/10.1081/JLC-100100472>.
- Castro, C., M. S. Urbieta, J. Plaza Cazón, et E. R. Donati. 2019. « Metal Biorecovery and Bioremediation: Whether or Not Thermophilic Are Better than Mesophilic Microorganisms ». *Bioresource Technology* 279 (mai): 317-26. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.028>.
- Cervantes, Carlos, Jesús Campos-García, Silvia Devars, Félix Gutiérrez-Corona, Herminia Loza-Tavera, Juan Carlos Torres-Guzmán, et Rafael Moreno-Sánchez. 2001. « Interactions of chromium with microorganisms and plants ». *FEMS Microbiology Reviews* 25 (3): 335-47. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x>.

- Chand, Vimlesh, et Surendra Prasad. 2012. « ICP-OES assessment of heavy metal contamination in tropical marine sediments: A comparative study of two digestion techniques » *Microchemical Journal* 111 (juillet): 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.11.007>.
- Chen, Jian. 1996. « Determination of organic acids in industrial streams by ion chromatography after solid-phase extraction ». *Journal of Chromatography A, International Ion Chromatography Symposium 1995*, 739 (1): 273-80. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00036-2](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00036-2).
- Chen, Jiaping Paul, Lawrence K. Wang, Mu-Hao S. Wang, Yung-Tse Hung, et Nazih K. Shammass. 2016. *Remediation of heavy metals in the environment*. Crc Press.
- Chen, Ming, Xiao-ming Li, Qi Yang, Guang-ming Zeng, Ying Zhang, De-xiang Liao, Jing-jin Liu, Jing-mei Hu, et Liang Guo. 2008. « Total concentrations and speciation of heavy metals in municipal sludge from Changsha, Zhuzhou and Xiangtan in middle-south region of China ». *Journal of Hazardous Materials* 160 (2): 324-29. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.036>.
- Chibuike, G. U. 2013. « Use of mycorrhiza in soil remediation: a review ». *Scientific Research and Essays* 8 (35): 679–1687.
- Chowdhury, M. T. A., L. Nesa, et SM Imamul Huq. 2015. « Assessment of the phytoavailability of Cu and Ni using various extraction procedures ». *Dhaka University Journal of Biological Sciences* 24 (1): 1–16.
- Cismasu, A. Cristina, F. Marc Michel, Jonathan F. Stebbins, Clément Levard, et Gordon E. Brown. 2012. « Properties of impurity-bearing ferrihydrite I. Effects of Al content and precipitation rate on the structure of 2-line ferrihydrite ». *Geochimica et Cosmochimica Acta* 92 (septembre): 275-91. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.06.010>.
- Clark, M. W, F Davies-McConchie, D McConchie, et G. F Birch. 2000. « Selective chemical extraction and grainsize normalisation for environmental assessment of anoxic sediments: validation of an integrated procedure ». *Science of The Total Environment* 258 (3): 149-70. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00532-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00532-5).
- Clausen, Carol A, et Frederick Green. 2003. « Oxalic Acid Overproduction by Copper-Tolerant Brown-Rot Basidiomycetes on Southern Yellow Pine Treated with Copper-Based Preservatives ». *International Biodeterioration & Biodegradation* 51 (2): 139-44. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00098-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00098-7).
- Clipson, Nicholas, et Deirdre B. Gleeson. 2012. « Fungal Biogeochemistry: A Central Role in the Environmental Fate of Lead ». *Current Biology* 22 (3): R82-84. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.12.037>.

- Colombano, Stéfan, Bataillard, Philippe, Séré, Geoffrey, Morel, Jean Louis, & Rouvreau, Laurent. 2014. « Le sol en contexte de sites pollués. 1. Connaissance et remédiation ». *Géosciences*, (18), 56-61.
- Colpaert, Jan V., et Jozef a. Van Assche. 1993. « The Effects of Cadmium on Ectomycorrhizal *Pinus Sylvestris* L. » *New Phytologist* 123 (2): 325-33. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03742.x>.
- Costa, Filomena, et Teresa Tavares. 2017. « Bioremoval of Ni and Cd in the presence of diethylketone by fungi and by bacteria – A comparative study ». *International Biodeterioration & Biodegradation* 120 (mai): 115-23. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.018>.
- Crouzet, Olivier, Isabelle Batisson, Pascale Besse-Hoggan, Frédérique Bonnemoy, Corinne Bardot, Franck Poly, Jacques Bohatier, et Clarisse Mallet. 2010. « Response of Soil Microbial Communities to the Herbicide Mesotrione: A Dose-Effect Microcosm Approach ». *Soil Biology and Biochemistry* 42 (2): 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.016>.
- Cunningham, J E, et C Kuiack. 1992. « Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. » *Applied and Environmental Microbiology* 58 (5): 1451-58.
- Cuvier, A., L. Leleyter, A. Probst, J. -L. Probst, J. Prunier, L. Pourcelot, G. Le Roux, M. Lemoine, L. Reinert, et F. Baraud. 2021. « Why Comparison between Different Chemical Extraction Procedures Is Necessary to Better Assess the Metals Availability in Sediments ». *Journal of Geochemical Exploration* 225 (juin): 106762. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2021.106762>.
- Cycoń, Mariusz, Agnieszka Mroziak, et Zofia Piotrowska-Seget. 2017. « Bioaugmentation as a Strategy for the Remediation of Pesticide-Polluted Soil: A Review ». *Chemosphere* 172 (avril): 52-71. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.129>.

## D

---

- Damodaran, Dilna, K. Vidya Shetty, et B. Raj Mohan. 2014. « Uptake of certain heavy metals from contaminated soil by mushroom—*Galerina vittiformis* ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104 (juin): 414-22. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.033>.
- Daniel, Geoffrey, Jindrich Volc, Petr Halada, Hasanthi Karunasekera, et Jong Sik Kim. 2019. « Method for Characterizing Extracellular Proteins from the Cell Wall Proteome of the Copper Tolerant Fungus *Phialophora Malorum* ». *International Biodeterioration & Biodegradation* 144 (octobre): 104769. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104769>.

- Das, Aparajita, Ram Prasad, Abhishek Srivastava, Pham Huong Giang, Kamy Bhatnagar, et Ajit Varma. 2007. « Fungal Siderophores: Structure, Functions and Regulation ». *Microbial Siderophores*, édité par Ajit Varma et Sudhir B. Chincholkar, 1-42. Soil Biology. Berlin, Heidelberg: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-71160-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-71160-5_1).
- Dave, Kirti I., Crystal Lauriano, Biwen Xu, James R. Wild, et Charles M. Kenerley. 1994. « Expression of Organophosphate Hydrolase in the Filamentous Fungus *Gliocladium Virens* ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 41 (3): 352-58. <https://doi.org/10.1007/BF00221231>.
- Degryse, F., K. Broos, E. Smolders, et R. Merckx. 2003. « Soil Solution Concentration of Cd and Zn Can Be Predicted with a CaCl<sub>2</sub> Soil Extract ». *European Journal of Soil Science*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300960688>.
- Delil, Aydeniz Demir, et Nurcan Köleli. 2018. « The Removal of Pb and Cd from Heavily Contaminated Soil in Kayseri, Turkey by a Combined Process of Soil Washing and Electrodeposition ». *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 27 (6): 469-84. <https://doi.org/10.1080/15320383.2018.1485630>.
- Demirbaş, Ayhan. 2002. « Metal Ion Uptake by Mushrooms from Natural and Artificially Enriched Soils ». *Food Chemistry* 78 (1): 89-93. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00389-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00389-2).
- Deng, Xinhui, Li-yuan Chai, Zhi-hui Yang, et Yangyang Wang. 2014. « Influence of heavy metal stress on morphology and physiology of *Penicillium chrysogenum* during bioleaching process ». *Journal of Central South University* 21 (août): 3254-62. <https://doi.org/10.1007/s11771-014-2298-4>.
- Dermont, G., M. Bergeron, G. Mercier, et M. Richer-Lafèche. 2008. « Soil Washing for Metal Removal: A Review of Physical/Chemical Technologies and Field Applications ». *Journal of Hazardous Materials* 152 (1): 1-31. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.043>.
- Deschamps, Thomas, Mostafa Benzaazoua, Bruno Bussière, Tikou Belem, et Mamert Mbonimpa. 2006. « Mécanismes de rétention des métaux lourds en phase solide : cas de la stabilisation des sols contaminés et des déchets industriels ». *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement*, n° Volume 7 Numéro 2 (septembre). <https://doi.org/10.4000/vertigo.2171>.
- Desjardin, Valérie. 2002. « Réduction du chrome (VI) par la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 isolée à partir d'un sol pollué ». Thèse de doctorat, Lyon, INSA. <http://www.theses.fr/2002ISAL0030>.
- Dey, Priyadarshini, Deepak Gola, Abhishek Mishra, Anushree Malik, Peeyush Kumar, Dileep Kumar Singh, Neelam Patel, Martin von Bergen, et Nico Jehmlich. 2016. « Comparative Performance Evaluation of Multi-Metal Resistant Fungal Strains for Simultaneous Removal of Multiple Hazardous Metals ». *Journal of Hazardous Materials* 318 (novembre): 679-85. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.025>.

- Dezam, A. P. G., Vasconcellos, V. M., Lacava, P. T., & Farinas, C. S. 2017. « Microbial production of organic acids by endophytic fungi ». *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 282-287.
- Doherty, Steven J., Matthew K. Tighe, et Susan C. Wilson. 2017. « Evaluation of Amendments to Reduce Arsenic and Antimony Leaching from Co-Contaminated Soils ». *Chemosphere* 174 (mai): 208-17. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.100>.
- Domsch KH (1980) Compendium of soil fungi. Academic Press, London, New York. 860 p.
- Dörsam, Stefan, Jana Fessler, Olga Gorte, Thomas Hahn, Susanne Zibek, Christoph Syldatk, et Katrin Ochsenreither. 2017. « Sustainable carbon sources for microbial organic acid production with filamentous fungi ». *Biotechnology for Biofuels* 10 (1): 242. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0930-x>.
- Dumroese, R. Kasten, Robert L. James, et David L. Wenny. 1996. « Gliocladium Virens in an Alginate Prill Ineffective as a Biological Control of Fusarium Root Disease in Container-Grown Douglas-Fir ». *New Forests* 12 (2): 113-24. <https://doi.org/10.1007/BF00036624>.
- Duprarque, A., and P. Rigalle. « Composition des MO et turn over; Rôles et fonctions des MO, actes du colloque ». *Gestion de l'état organique des sols*. Vol. 27. 2011.
- Durand, Rémi, et P. Vachier. 1988. « Etude de la pédogenèse par l'analyse des phases gazeuse et liquide (Study of the pedogenesis by analyze of the gazous and liquid phases) ». *Bulletin de l'Association de Géographes Français* 65 (1): 47-54. <https://doi.org/10.3406/bagf.1988.1416>.
- Dursun, A. Y., G. Uslu, Y. Cuci, et Z. Aksu. 2003. « Bioaccumulation of Copper(II), Lead(II) and Chromium(VI) by Growing Aspergillus Niger ». *Process Biochemistry* 38 (12): 1647-51. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00075-4).
- Dutheil, Camille. 2003. « Dépollution des sols par extraction sous pression réduite : étude de quelques paramètres ». Thèse de doctorat, Lyon, INSA. <https://www.theses.fr/2003ISAL0016>.
- Dutton, Martin V., et Christine S. Evans. 1996. « Oxalate Production by Fungi: Its Role in Pathogenicity and Ecology in the Soil Environment ». *Canadian Journal of Microbiology* 42 (9): 881-95. <https://doi.org/10.1139/m96-114>.
- Dzionic, Anna, Danuta Wojcieszewska, et Urszula Guzik. 2016. « Natural Carriers in Bioremediation: A Review ». *Electronic Journal of Biotechnology* 23 (septembre): 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.003>.

## E

---

- Edwards, Clive A. 2002. « Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems ». 2002. <https://eurekamag.com/research/003/652/003652824.php>.
- El Ass, K., A. Laachach, et M. Azzi. 2003. « Étude de la biodisponibilité des métaux lourds dans des sols agricoles irrigués par des eaux polluées ». *Déchets Sciences et Techniques* 32: 31–36.
- El Fantroussi, Saïd, et Spiros N Agathos. 2005. « Is Bioaugmentation a Feasible Strategy for Pollutant Removal and Site Remediation? » *Current Opinion in Microbiology, Ecology and industrial microbiology/Edited by Sergio Sánchez and Betty Olson · Techniques/Edited by Peter J Peters and Joel Swanson*, 8 (3): 268-75. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.011>.
- El Kossori, R.L., Villaume, C., El Boustani, E., Sauvaire, Y., Mejean, L. 1998. « Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indicasp.*) ». *Plant Foods for Human Nutrition* 52, 263–27.
- Eisele, Thomas A., et Stephen R. Drake. 2005. « The Partial Compositional Characteristics of Apple Juice from 175 Apple Varieties ». *Journal of Food Composition and Analysis* 18 (2): 213-21. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.01.002>.
- Eller, Gundula, Martin Krüger, et Peter Frenzel. 2005. « Comparing Field and Microcosm Experiments: A Case Study on Methano- and Methylo-Trophic Bacteria in Paddy Soil ». *FEMS Microbiology Ecology* 51 (2): 279-91. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.09.007>.
- Elzinga, Evert J., et Ashley Cirimo. 2010. « Application of Sequential Extractions and X-Ray Absorption Spectroscopy to Determine the Speciation of Chromium in Northern New Jersey Marsh Soils Developed in Chromite Ore Processing Residue (COPR) ». *Journal of Hazardous Materials* 183 (1): 145-54. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.06.130>.
- Eslyn, Wallace E., et Terry L. Highley. 1976. « Decay resistance and susceptibility of sapwood of fifteen tree species ». *Phytopathology* 66 (8): 1010–1017.
- Eshghi Malayeri, Behrouz. 1995. « Décontamination des sols contenant des métaux lourds à l'aide de plantes et de microorganismes ». Thèse de doctorat, Nancy 1. <http://www.theses.fr/1995NAN10353>.
- Espejo, E., et E. Agosin. 1991. « Production and Degradation of Oxalic Acid by Brown Rot Fungi ». *Applied and Environmental Microbiology* 57 (7): 1980-86. <https://doi.org/10.1128/aem.57.7.1980-1986.1991>.

## F

---

- FAO, et ITPS. 2015. Status of the World's Soil Resources: Main Report. Rome, Italy: FAO. <http://www.fao.org/documents/card/fr/c/c6814873-efc3-41db-b7d3-2081a10ede50/>.
- Fahr, Mouna. 2014. « Étude physiologique et moléculaire de la tolérance et l'accumulation du Pb chez une population métallicole et une population non métallicole d'*Hirschfeldia incana* (Brassicacée récoltée au Maroc) : Perspectives pour la phytoremédiation ». Thèse de doctorat, Université Mohammed V - Agdal, Faculté des Sciences, Rabat, Maroc. <http://thesesenafrique.imist.ma/handle/123456789/1640>.
- Fardelone, Lucidio Cristovão, Taciani dos Santos Bella de Jesus, Gabriela Chaves da Silveira, Ynae Padilha David, Gustavo Paim Valença, et Paulo José Samenho Moran. 2021. « Organic Acid Production by Biotechnology ». In *Environment and Innovation Strategies to Promote Growth and Sustainability*. CRC Press.
- Farhan, Salah N., et Anees A. Khadom. 2015. « Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces Cerevisiae* ». *International journal of industrial chemistry* 6 (2): 119–130.
- Farrell, Mark, et Davey Jones. 2009. « Heavy Metal Contamination of a Mixed Waste Compost: Metal Speciation and Fate ». *Bioresource technology* 100 (juin): 4423-32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.023>.
- Felix, Carlos Roberto, Eliane Ferreira Noronha, et Robert NG Miller. 2014. « Trichoderma: a dual function fungi and their use in the wine and beer industries ». *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, 345–349. Elsevier.
- Fendorf, Scott E. 1995. « Surface Reactions of Chromium in Soils and Waters ». *Geoderma* 67 (1-2): 55-71. [https://doi.org/10.1016/0016-7061\(94\)00062-F](https://doi.org/10.1016/0016-7061(94)00062-F).
- Fernandez-Cornudet, Christelle. 2006. « Devenir du Zn, Pb et Cd issus de retombées atmosphériques dans les sols, à différentes échelles d'étude. -Influence de l'usage des sols sur la distribution et la mobilité des métaux». Thèse de doctorat. INAPG (AgroParisTech). 233.
- Fomina, M., S. Hillier, J. M. Charnock, K. Melville, I. J. Alexander, et G. M. Gadd. 2005. « Role of Oxalic Acid Overexcretion in Transformations of Toxic Metal Minerals by *Beauveria Caledonica* ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (1): 371-81. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.371-381.2005>.
- Fomina, Marina, et G.M. Gadd. 2008. « Metal and mineral transformations: A mycoremediation perspective ». *Exploitation of Fungi*, 236-54. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511902451.014>.

Fourest, Eric, Catherine Canal, et Jean-Claude Roux. 1994. « Improvement of Heavy Metal Biosorption by Mycelial Dead Biomasses (Rhizopus Arrhizus, Mucor Miehei and Penicillium Chrysogenum): pH Control and Cationic Activation ». *FEMS Microbiology Reviews* 14 (4): 325-32. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00106.x>.

Francoys - De Brabandere Cédric et Isabelle. 2014. « Le complexe argilo-humique ».

Fuentes, M. S., A. Alvarez, J. M. Saez, C. S. Benimeli, et M. J. Amoroso. s. d. « Methoxychlor Bioremediation by Defined Consortium of Environmental Streptomyces Strains ». *International Journal of Environmental Science and Technology* 11 (4): 1147-56.

Fulekar, Madhusudan Hiranman, Jaya Sharma, et Akalpita Tendulkar. 2012. « Bioremediation of Heavy Metals Using Biostimulation in Laboratory Bioreactor ». *Environmental Monitoring and Assessment* 184 (12): 7299-7307. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2499-3>.

## G

---

Gadd, Geoffrey M. 1994. « Interactions of Fungi with Toxic Metals ». *The Genus Aspergillus: From Taxonomy and Genetics to Industrial Application*, édité par Keith A. Powell, Annabel Renwick, et John F. Peberdy, 361-74. Federation of European Microbiological Societies Symposium Series. Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0981-7\\_28](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0981-7_28).

Gadd, Geoffrey M. 1999. « Fungal Production of Citric and Oxalic Acid: Importance in Metal Speciation, Physiology and Biogeochemical Processes ». *Advances in Microbial Physiology*, 41:47-92. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60165-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60165-4).

Gadd, Geoffrey M. 2004. « Mycotransformation of Organic and Inorganic Substrates ». *Mycologist* 18 (2): 60-70. [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(04\)00202-2](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(04)00202-2).

Galkin, Sari, Tamara Vares, Mika Kalsi, et Annele Hatakka. 1998. « Production of Organic Acids by Different White-Rot Fungi as Detected Using Capillary Zone Electrophoresis ». *Biotechnology Techniques* 12 (4): 267-71. <https://doi.org/10.1023/A:1008842012539>.

Garcia-Rubio, Rocio, et Laura Alcazar-Fuoli. 2018. « Diseases Caused by Aspergillus Fumigatus ». *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12078-3>.

Garon D, Sage L, Wouessidjewe D, Seigle-Murandi F. 2004. « Enhanced degradation of fluorene in soil slurry by Absidia cylindrospora and maltosyl-cyclodextrin ». *Chemosphere* 56:159–166.

- Gautam, Sumit Kumar, Rajeev Sharma, A.H. Ahmad, et Indu Shekhar Thakur. 2003. « Evaluation of Pentachlorophenol-Degrading Potentiality of Pseudomonas Sp. in a Soil Microcosm ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (1): 73-78. <https://doi.org/10.1023/A:1022517718775>.
- Ge, W., D. Zamri, H. Mineyama, et M. Valix. 2011. « Bioaccumulation of Heavy Metals on Adapted *Aspergillus Foetidus* ». *Adsorption* 17 (5): 901. <https://doi.org/10.1007/s10450-011-9359-x>.
- Gérard, Émilie. 2000. « Caractérisation du cadmium phytodisponible des sols par méthodes isotopiques ». These de doctorat, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL. <http://www.theses.fr/2000INPL092N>.
- Gérard, Emilie, Guillaume Echevarria, Thibault Sterckeman, et Jean Louis Morel. 2000. « Cadmium Availability to Three Plant Species Varying in Cadmium Accumulation Pattern ». *Journal of Environmental Quality* 29 (4): 1117-23. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900040012x>.
- Ghormade, Vandana, Ejaj Pathan, et Mukund Deshpande. 2017. « Can fungi compete with marine sources for chitosan production? » *International Journal of Biological Macromolecules* 104 (Pt B): 1415-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112>.
- Giancoli Barreto, Sonia R., Jorge Nozaki, Elisabeth De Oliveira, Virgilio F. Do Nascimento Filho, Pedro Henrique A. Aragão, Ieda S. Scarminio, et Wagner J. Barreto. 2004. « Comparison of Metal Analysis in Sediments Using EDXRF and ICP-OES with the HCl and Tessie Extraction Methods ». *Talanta* 64 (2): 345-54. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.02.022>.
- Gitipour, Saeid, Soheil Ahmadi, Edris Madadian, et Mojtaba Ardestani. 2016. « Soil washing of chromium and cadmium-contaminated sludge using acids and ethylenediaminetetra acetic acid chelating agent ». *Environmental Technology* 37 (1): 145-51. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.597784>.
- Gleyzes, Christine, Sylvaine Tellier, et Michel Astruc. 2002. « Fractionation Studies of Trace Elements in Contaminated Soils and Sediments: A Review of Sequential Extraction Procedures ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21 (6): 451-67. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00603-9](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00603-9).
- Gómez Ariza, J.L., I. Giráldez, D. Sánchez-Rodas, et E. Morales. 2000. « Metal Sequential Extraction Procedure Optimized for Heavily Polluted and Iron Oxide Rich Sediments ». *Analytica Chimica Acta* 414 (1-2): 151-64. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00804-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00804-7).
- Green III, Frederick, et Carol A Clausen. 2003. « Copper Tolerance of Brown-Rot Fungi: Time Course of Oxalic Acid Production ». *International Biodeterioration & Biodegradation* 51 (2): 145-49. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00099-9](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00099-9).

- Gremion, Fabienne, Antonis Chatzinotas, Karin Kaufmann, William Von Sigler, et Hauke Harms. 2004. « Impacts of Heavy Metal Contamination and Phytoremediation on a Microbial Community during a Twelve-Month Microcosm Experiment ». *FEMS Microbiology Ecology* 48 (2): 273-83. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.02.004>.
- Gube, Matthias. 2016. « 4 Fungal Molecular Response to Heavy Metal Stress ». *Biochemistry and Molecular Biology*, édité par Dirk Hoffmeister, 47-68. The Mycota. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27790-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27790-5_4).
- Guo, Qingjun, Tai-Yi Liu, Xinwu Zeng, Guanhua Chen, et Wei. 2014. « Global research on soil contamination from 1999 to 2012: A bibliometric analysis ». *Acta Agriculturae Scandinavica* 64 (5): 377-91.. <https://doi.org/10.1080/09064710.2014.913679>.
- Gupta, S. K., M. K. Vollmer, et R. Krebs. 1996. « The Importance of Mobile, Mobilisable and Pseudo Total Heavy Metal Fractions in Soil for Three-Level Risk Assessment and Risk Management ». *Science of The Total Environment*, Harmonization of Leaching/Extraction Tests for Environmental Risk Assessment, 178 (1): 11-20. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04792-1](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04792-1).

## H

---

- Hakeem, Khalid, Muhammad Sabir, Munir Ozturk, et Ahmet Ruhi Mermut. 2014. *Soil Remediation and Plants: Prospects and Challenges*. Academic Press.
- Hamba, Yosef, et Melkamu Tamiru. 2016. « Mycoremediation of heavy metals and hydrocarbons contaminated environment ». *Asian Journal of Natural & Applied Sciences* 5 (2): 48-58.
- Hamdoun, Hakim. 2013. « Valorisation de sédiments de dragage en techniques routières et acceptabilité environnementale : caractérisation globale et études de mobilités d'éléments métalliques par extractions simples, séquentielles et cinétiques. Cas de sédiments de la Manche dans le cadre du projet SETARMS ». Thèse de doctorat, Caen. <http://www.theses.fr/2013CAEN2033>.
- Hanfi, M., Mostafa Mostafa, et Michael Zhukovsky. 2019. « Heavy metal contamination in urban surface sediments: sources, distribution, contamination control, and remediation ». *Environmental Monitoring and Assessment* 192 (décembre). <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7947-5>.
- Hart, T. D, J. M Lynch, et F. A. A. M De Leij. 2003. « Production of *Trichurus Spiralis* to Enhance the Composting of Cellulose-Containing Waste ». *Enzyme and Microbial Technology* 32 (6): 745-50. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00049-8).
- Haselwandter, K. 2008. « Mycorrhizal Fungi: Siderophore Production ». *Critical Reviews in Biotechnology*, septembre. <https://doi.org/10.3109/07388559509147414>.

- Hassan, Auwalu, Agamuthu Pariatamby, Innocent C. Ossai, et Fauziah S. Hamid. 2020. « Bioaugmentation Assisted Mycoremediation of Heavy Metal and/Metalloid Landfill Contaminated Soil Using Consortia of Filamentous Fungi ». *Biochemical Engineering Journal*, mars, 107550. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107550>.
- Hastrup, Anne Christine Steenkjær, Frederick Green Iii, Patricia K. Lebow, et Bo Jensen. 2012. « Enzymatic Oxalic Acid Regulation Correlated with Wood Degradation in Four Brown-Rot Fungi ». *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 75, 2012; Pp. 109-114. 75: 109-14. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.030>.
- Hattab, Nour, et Mikael Motelica-Heino. 2014. « Application of an Inverse Neural Network Model for the Identification of Optimal Amendment to Reduce Copper Toxicity in Phytoremediated Contaminated Soils ». *Journal of Geochemical Exploration* 136: 14. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.09.002>.
- Hatvani, Nora, et Imre Mécs. 2003. « Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes* ». *Ecotoxicology and environmental safety* 55 (juillet): 199-203. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00133-1](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00133-1).
- Heltai, György, Zoltán Győri, Ilona Fekete, Gábor Halász, Katalin Kovács, Anita Takács, Norbert Boros, et Márk Horváth. 2018. « Longterm Study of Transformation of Potentially Toxic Element Pollution in Soil/Water/Sediment System by Means of Fractionation with Sequential Extraction Procedures ». *Microchemical Journal, Pharmacological Research and Analytical Approaches*, 136 (janvier): 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.01.026>.
- Hermosa, Rosa, Rosa Elena Cardoza, María Belén Rubio, Santiago Gutiérrez, et Enrique Monte. 2014. « Chapter 10 - Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Trichoderma* ». *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, édité par Vijai K. Gupta, Monika Schmoll, Alfredo Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, Irina Druzhinina, et Maria G. Tuohy, 125-37. Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00010-2>.
- Hesseltine, CW. 1991. « Zygomycetes in Food Fermentations ». *Mycologist* 5 (4): 162-69. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(09\)80475-8](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(09)80475-8).
- Hlihor, Raluca-Maria, Laura-Carmen Apostol, et Maria Gavrilescu. 2017. « Environmental Bioremediation by Biosorption and Bioaccumulation: Principles and Applications ». *Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants: Volume 1: Biological Approaches*, édité par Naser A. Anjum, Sarvajeet Singh Gill, et Narendra Tuteja, 289-315. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-55426-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55426-6_14).

- Hlihor, Raluca Maria, Mariana Diaconu, Florin Leon, Silvia Curteanu, Teresa Tavares, et Maria Gavrilescu. 2015. « Experimental Analysis and Mathematical Prediction of Cd(II) Removal by Biosorption Using Support Vector Machines and Genetic Algorithms ». *New Biotechnology* 32 (3): 358-68. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.08.003>.
- Hollender, Juliane, Katrin Althoff, Matthias Mundt, et Wolfgang Dott. 2003. « Assessing the Microbial Activity of Soil Samples, Its Nutrient Limitation and Toxic Effects of Contaminants Using a Simple Respiration Test ». *Chemosphere* 53 (3): 269-75. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00556-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00556-3).
- Hong, Victor, et Ronald E Wrolstad. 1986. « Cranberry Juice Composition ». *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 69 (2): 199-207. <https://doi.org/10.1093/jaoac/69.2.199>.
- Houba, V. J. G., E. J. M. Temminghoff, G. A. Gaikhorst, et W. van Vark. 2000. « Soil analysis procedures using 0.01 M calcium chloride as extraction reagent ». *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31 (9-10): 1299-1396. <https://doi.org/10.1080/00103620009370514>.
- Hu, Ke-Jin, Kwok-Wing Yeung, Kwok-Ping Ho, et Jin-Lian Hu. 1999. « Rapid Extraction of High-Quality Chitosan from Mycelia of *Absidia Glauca* ». *Journal of Food Biochemistry* 23 (2): 187-96. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1999.tb00013.x>.

---

## I

- Ibragimow, Aleksandra, Grażyna Głosińska, Marcin Siepak, et Barbara Walna. 2010. « Heavy Metals in Fluvial Sediments of the Odra River Flood Plains - Introductory Research ». *Quaestiones Geographicae* 29 (1): 37-47. <https://doi.org/10.2478/v10117-010-0004-7>.
- Iram, Shazia, Ayesha Zaman, Zaiba Iqbal, et Rabia Shabbir. 2013. « Heavy Metal Tolerance of Fungus Isolated from Soil Contaminated with Sewage and Industrial Wastewater. » *Polish Journal of Environmental Studies* 22 (3).
- Isildak, Ömer, Ibrahim Turkekul, Mahfuz Elmastas, et Mustafa Tuzen. 2004. « Analysis of Heavy Metals in Some Wild-Grown Edible Mushrooms from the Middle Black Sea Region, Turkey ». *Food Chemistry* 86 (4): 547-52. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.007>.

---

## J

- Jain, Rachana, Jyoti Saxena, et Vinay Sharma. 2011. « Determination of organic acids in fermentation media by HPLC », *International Journal of Biological Sciences*. 2.4 (2011): 261-265.

- Jarosz-Wilkolazka, Anna, et Marcin Graz. 2006. « Organic Acids Production by White Rot Basidiomycetes in the Presence of Metallic Oxides ». *Canadian Journal of Microbiology* 52 (8): 779-85. <https://doi.org/10.1139/w06-032>.
- Jarosz-Wilkolazka, Anna, et Geoffrey M Gadd. 2003. « Oxalate Production by Wood-Rotting Fungi Growing in Toxic Metal-Amended Medium ». *Chemosphere, Biogeochemical Processes and Cycling of Elements in the Environment*, 52 (3): 541-47. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00235-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00235-2).
- Javaid, Rehman, Aqsa Sabir, Nadeem Sheikh, et Muhammad Ferhan. 2019. « Recent Advances in Applications of Acidophilic Fungi to Produce Chemicals ». *Molecules* 24 (4). <https://doi.org/10.3390/molecules24040786>.
- Jean, Liliane. 2007. « Mobilisation Du Chrome et Du Nickel à Partir de Sols Contaminés, En Présence de Complexants : Transfert et Accumulation de Ces Métaux Chez *Datura Innoxia* ». *Thèse de doctorat, Limoges*.
- Johansson, Emma M., Petra M. A. Fransson, Roger D. Finlay, et Patrick A. W. van Hees. 2008. « Quantitative Analysis of Root and Ectomycorrhizal Exudates as a Response to Pb, Cd and As Stress ». *Plant and Soil* 313 (1): 39-54. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9678-1>.
- John, David A., et Joel S. Leventhal. 1995. « Bioavailability of metals ». *Preliminary compilation of descriptive geoenvironmental mineral deposit models*, 10–18.
- Jones, David L. 1998. « Organic Acids in the Rhizosphere – a Critical Review ». *Plant and Soil* 205 (1): 25-44. <https://doi.org/10.1023/A:1004356007312>.
- Jong, S. C., et G. F. Yuan. 1985. « *Actinomucor Taiwanensis* Sp. Nov., for Manufacture of Fermented Soybean Food ». *Mycotaxon (USA)*.
- Jongh, Wian de. 2006. Organic Acid Production by *Aspergillus Niger*. Technical University of Denmark. Thèse de doctorat. <https://orbit.dtu.dk/en/publications/organic-acid-production-by-aspergillus-niger>.
- Jordan, C. R., W. V. Dashek, et T. L. Highley. 1996. « Detection and Quantification of Oxalic Acid from the Brown-Rot Decay Fungus, *Postia Placenta* ». *Holzforschung* 50 (4): 312-18. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1996.50.4.312>.
- Joshi, P. K., Anand Swarup, Sonu Maheshwari, Raman Kumar, et Namita Singh. 2011. « Bioremediation of Heavy Metals in Liquid Media Through Fungi Isolated from Contaminated Sources ». *Indian Journal of Microbiology* 51 (4): 482-87. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0110-9>.

Joshi, P.K., Raman Kumar, Vishnu Rajput, et Kirti. 2013. « Removal of Heavy Metals - Lead, Cadmium and Nickel by Fungi and Bacteria from Liquid Medium ». *Journal of Soil Salinity and Water Quality* 5 (décembre): 60-64.

Joutey, Nezha Tahri, Wifak Bahafid, Hanane Sayel, Hajar Maâtaoui, Faouzi Errachidi, et Naïma El Ghachtouli. 2015. « Use of Experimental Factorial Design for Optimization of Hexavalent Chromium Removal by a Bacterial Consortium: Soil Microcosm Bioremediation ». *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 24 (2): 129-42. <https://doi.org/10.1080/15320383.2014.922931>.

## K

---

Kalač, Pavel, et Lubomír Svoboda. 2000. « A Review of Trace Element Concentrations in Edible Mushrooms ». *Food Chemistry* 69 (3): 273-81. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00264-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00264-2).

Kamdem, Ramsay S. T., Wafo Pascal, Nidja Rehberg, Lasse van Geelen, Simon-Patrick Höfert, Tim-Oliver Knedel, Christoph Janiak, et al. 2018. « Metabolites from the Endophytic Fungus *Cylindrocarpon* Sp. Isolated from Tropical Plant *Sapium Ellipticum* ». *Fitoterapia* 128 (juillet): 175-79. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.05.020>.

Kampichler, C., A. Bruckner, et E. Kandeler. 2001. « Use of Enclosed Model Ecosystems in Soil Ecology: A Bias towards Laboratory Research ». *Soil Biology and Biochemistry* 33 (3): 269-75. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00140-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00140-1).

Kang, In Jeong, Hyeong Kwon Shim, Jae Hwan Roh, Sunggi Heu, et Dong Bum Shin. 2018. « Simple Detection of *Cochliobolus* Fungal Pathogens in Maize ». *The Plant Pathology Journal* 34 (4): 327-34. <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.10.2017.0209>.

Kapahi, Meena, et Sarita Sachdeva. 2017. « Mycoremediation potential of *Pleurotus* species for heavy metals: a review ». *Bioresources and Bioprocessing* 4 (1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0162-8>.

Karaffa, Levente, et Christian Kubicek. 2020. « Production of Organic Acids by Fungi ». *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21066-2>.

Kawaguchi, Mio, Takashi Fukuda, Ryuji Uchida, Kenichi Nonaka, Rokuro Masuma, et Hiroshi Tomoda. 2013. « A New Ascochlorin Derivative from *Cylindrocarpon* Sp. FKI-4602 ». *The Journal of Antibiotics* 66 (1): 23-29. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.75>.

Kersten, Michael, et Ulrich Förstner. 1986. « Chemical Fractionation of Heavy Metals in Anoxic Estuarine and Coastal Sediments ». *Water Science and Technology* 18 (4-5): 121-30. <https://doi.org/10.2166/wst.1986.0187>.

- Kertesz, Michael, et Emmanuel Frossard. 2015. « Chapter 16. Biological Cycling of Inorganic Nutrients and Metals in Soils and Their Role in Soil Biogeochemistry ». *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, 471-503. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00016-5>.
- Khalkhaliani, D. Naghipoor, Alireza Mesdaghinia, A. H. Mahvi, Jafar Nouri, et F. Vaezi. 2006. « An Experimental Study of Heavy Metal Extraction, Using Various Concentration of EDTA in a Sandy Loam Soils ». *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9 (5): 837-42. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2006.837.842>.
- Khan, Alamgir, Keith L. Williams, et Helena K. M. Nevalainen. 2006. « Control of Plant-Parasitic Nematodes by *Paecilomyces Lilacinus* and *Monacrosporium Lysipagum* in Pot Trials ». *BioControl* 51 (5): 643-58. <https://doi.org/10.1007/s10526-005-4241-y>.
- Khan, Ibrar, Madiha Ali, Maryam Aftab, SajidUllah Shakir, Sadia Qayyum, Kashif Syed Haleem, et Isfahan Tauseef. 2019. « Mycoremediation: A Treatment for Heavy Metal-Polluted Soil Using Indigenous Metallotolerant Fungi ». *Environmental Monitoring and Assessment* 191 (10): 622. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7781-9>.
- Kim, Rog-Young, Jeong-Ki Yoon, Tae-Seung Kim, Jae E. Yang, Gary Owens, et Kwon-Rae Kim. 2015. « Bioavailability of Heavy Metals in Soils: Definitions and Practical Implementation--a Critical Review ». *Environmental Geochemistry and Health* 37 (6): 1041-61. <https://doi.org/10.1007/s10653-015-9695-y>.
- Klamer, Morten, et A.-M Lind. 2001. « Fungal succession during composting of miscanthus straw and pig slurry ». *Acta Horticulturae* 549 (mars): 37-46. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.549.3>.
- Komárek, Michael, Aleš Vaněk, et Vojtěch Ettler. 2013. « Chemical Stabilization of Metals and Arsenic in Contaminated Soils Using Oxides – A Review ». *Environmental Pollution* 172 (janvier): 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.045>.
- Košnář, Zdeněk, Tereza Částková, Lucie Wiesnerová, Lukáš Praus, Ivan Jablonský, Martin Koudela, et Pavel Tlustoš. 2019. « Comparing the Removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil after Different Bioremediation Approaches in Relation to the Extracellular Enzyme Activities ». *Journal of Environmental Sciences* 76 (février): 249-58. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.05.007>.
- Kotani, Akira, Yuji Miyaguchi, Eiji Tomita, Kiyoko Takamura, et Fumiyo Kusu. 2004. « Determination of Organic Acids by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection during Wine Brewing ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (6): 1440-44. <https://doi.org/10.1021/jf0306486>.

- Kouchou, Aziza, Naima El Ghachtouli, Joelle DUPLAY, Malika Ghazi, Françoise Elsass, Jeanne-Chantal Thoisy, Meriém Bellarbi, Mustapha Ijjaali, et Naoual Rais. 2020. « Evaluation of the environmental and human health risk related to metallic contamination in agricultural soils in the Mediterranean semi arid area (Saiss plain, Morocco) ». *Environmental Earth Sciences* 79 (6). <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02623927>.
- Krull, Susan, Malin Lünsmann, Ulf Prüße, et Anja Kuenz. 2020. « *Ustilago Rabenhorstiana*—An Alternative Natural Itaconic Acid Producer ». *Fermentation* 6 (1): 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010004>.
- Kubicek, Christian P., Peter Punt, et Jaap Visser. 2011. « Production of Organic Acids by Filamentous Fungi ». In *Industrial Applications*, édité par Martin Hofrichter, 215-34. The Mycota. Berlin, Heidelberg: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-11458-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-11458-8_10).
- Kulshreshtha, Shweta, Nupur Mathur, et Pradeep Bhatnagar. 2014. « Mushroom as a product and their role in mycoremediation ». *AMB Express* 4 (avril): 29. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0029-8>.
- Kumar, Vinay, et Shiv Kumar Dwivedi. 2021. « Mycoremediation of Heavy Metals: Processes, Mechanisms, and Affecting Factors ». *Environmental Science and Pollution Research* 28 (9): 10375-412. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11491-8>.
- Kumari, Poonam, Priyanka Aley, Chandramohan Mehta, Kumar, et Shivam Mca. 2019. « Mycoremediation of heavy metals ». *SSRN Electronic Journal* 6 (février): 325-42.
- Kurniawan, Andri, et Nuraeni Ekowati. 2016. « Mycoremediation of Heavy Metal: A Review ». *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia* 3.1 (2016): 36-45.
- Kwiatkowska-Malina, Jolanta. 2018. « Functions of Organic Matter in Polluted Soils: The Effect of Organic Amendments on Phytoavailability of Heavy Metals ». *Applied Soil Ecology, HUMUSICA* 3 - Reviews, Applications, Tools, 123 (février): 542-45. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.021>.

## L

---

- Lacalle, Rafael G., José M. Becerril, et Carlos Garbisu. 2020. « Biological Methods of Polluted Soil Remediation for an Effective Economically-Optimal Recovery of Soil Health and Ecosystem Services ». *Journal of Environmental Science and Public Health* 4 (2): 112-33.
- Lallemand-Barres, A. 1993. Méthodes de dépollution des sols et des eaux pollués par les métaux. Ministère de l'Ecologie et du développement durable : direction de l'eau et Bureau de recherches géologiques et minières. BRGM. PARIS <http://www.side.developpementdurable.gouv.fr/ACCIDR/doc/SYRACUSE/61260/met-hodes-de-depollution-des-sols-et-des-eaux-pollues-par-les-metaux>.

- Lapeyrie, F., G. A. Chilvers, et C. A. Bhem. 1987. « Oxalic Acid Synthesis by the Mycorrhizal Fungus *Paxillus involutus* (Batsch. Ex Fr.) Fr ». *The New Phytologist* 106 (1): 139-46.
- Lavollay, Jean. 1956. « Principes et conditions d'emploi des oligoéléments essentiels en agriculture ». Encyclopædia Universalis. <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/oligoelements/>.
- Lebourg, A, T Sterckeman, H Ciesielski, et N Proix. 1996. « Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en traces du sol ». *Agronomie* 16 (4): 201-15.
- Leleyter, Lydia. 1998. « Spéciation chimique des éléments majeurs, traces et des terres rares dans les matières en suspension et dans les sédiments de fond des cours d'eau : application aux fleuves de Patagonie (Argentine), à la Piracicaba (Brésil), à l'oued Sebou (Maroc) et à l'Ill (France) ». Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur (Strasbourg) (1971-2008). <http://www.theses.fr/1998STR13188>.
- Leleyter, Lydia. 2017. *Sols et sédiments pollués : Teneurs élémentaires totales et biodisponibles*. 978-3-330-87630-9.
- Leleyter, Lydia, et Fabienne Baraud. 2006. « Selectivity and Efficiency of the Acido-Soluble Extraction in Sequential Extraction Procedure ». *International Journal of Soil Science* 1 (2): 168-70.
- Leleyter, Lydia, et Jean Luc Probst. 1999. « A New Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Elements in River Sediments ». *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 1999. <https://doi.org/10.1080/03067319908032656>.
- Leleyter, Lydia, Christelle Rousseau, Laëticia Birée, et Fabienne Baraud. 2012. « Comparison of EDTA, HCl and Sequential Extraction Procedures, for Selected Metals (Cu, Mn, Pb, Zn), in Soils, Riverine and Marine Sediments ». *Journal of Geochemical Exploration* 116-117 (mai): 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.03.006>.
- Lévesque Michaud, Maude. 2016. « Développement d'une méthode de prédiction cinétique du drainage neutre contaminé avec agent complexant: application au projet minier blackrock ». Masters, École Polytechnique de Montréal. <https://publications.polymtl.ca/2274/>.
- Liaquat, Fiza, Muhammad Munis, Urooj Haroon, Samiah Arif, Saddam Saqib, Wajid Zaman, Ali Khan, Jianxin Shi, Shengquan Che, et Qunlu Liu. 2020. « Evaluation of Metal Tolerance of Fungal Strains Isolated from Contaminated Mining Soil of Nanjing, China ». *Biology* 9 (décembre): 469. <https://doi.org/10.3390/biology9120469>.

- Li, Fang, Lin Chen, Marc Redmile-Gordon, Jiabao Zhang, Congzhi Zhang, Qi Ning, et Wei Li. 2018. « *Mortierella Elongata's Roles in Organic Agriculture and Crop Growth Promotion in a Mineral Soil* ». *Land Degradation & Development* 29 (6): 1642-51. <https://doi.org/10.1002/ldr.2965>.
- Li, Lingxiangyu, Zhenlan Xu, Jianyang Wu, et Guangming Tian. 2010. « Bioaccumulation of Heavy Metals in the Earthworm *Eisenia Fetida* in Relation to Bioavailable Metal Concentrations in Pig Manure ». *Bioresource Technology* 101 (10): 3430-36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.085>.
- Li, Zhen, Tongshuo Bai, Letian Dai, Fuwei Wang, Jinjin Tao, Shiting Meng, Yunxiao Hu, Shimei Wang, et Shuijin Hu. 2016. « A Study of Organic Acid Production in Contrasts between Two Phosphate Solubilizing Fungi: *Penicillium Oxalicum* and *Aspergillus Niger* ». *Scientific Reports* 6 (1): 25313. <https://doi.org/10.1038/srep25313>.
- Liang, Jie, Zhaoxue Yang, Lin Tang, Guangming Zeng, Man Yu, Xiaodong Li, Haipeng Wu, Yingying Qian, Xuemei Li, et Yuan Luo. 2017. « Changes in Heavy Metal Mobility and Availability from Contaminated Wetland Soil Remediated with Combined Biochar-Compost ». *Chemosphere* 181 (août): 281-88. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.081>.
- Liaud, Nadège, Christian Giniés, David Navarro, Nicolas Fabre, Sylvaine Crapart, Isabelle Herpoël- Gimbert, Anthony Levasseur, Sana Raouche, et Jean-Claude Sigoillot. 2014a. « Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi ». *Fungal Biology and Biotechnology* 1 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s40694-014-0001-z>.
- Lima, Dênis P. de, Edson dos A. dos Santos, Maria R. Marques, Giovana C. Giannesi, Adilson Beatriz, Murilo K. A. Yonekawa, et Arthur dos S. Montanholi. 2018. « Fungal bioremediation of pollutant aromatic amines ». *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, Pharmaceuticals / Green Processes and Technologies*, 11 (juin): 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.03.012>.
- Liu, Hui, Ping Li, Bin Lu, Yu Wei, et Yuhan Sun. 2009. « Transformation of Ferrihydrite in the Presence or Absence of Trace Fe(II): The Effect of Preparation Procedures of Ferrihydrite ». *Journal of Solid State Chemistry* 182 (7): 1767-71. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2009.03.030>.
- Lo, Irène, et Xiaoyun Yang. 1999. « EDTA Extraction of Heavy Metals from Different Soil Fractions and Synthetic Soils ». *Water, Air, and Soil Pollution*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302944267>.
- Luo, Xiao-San, Jing Ding, Bo Xu, Yi-Jie Wang, Hong-Bo Li, et Shen Yu. 2012. « Incorporating Bioaccessibility into Human Health Risk Assessments of Heavy Metals in Urban Park Soils ». *Science of The Total Environment* 424 (mai): 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.053>.

## M

---

- Ma, Carl, John Kingscott, et Mark Evans. 1997. « Recent developments for in situ treatment of metal contaminated soils ».
- Machuca, A., D. Napoleão, et A.M.F. Milagres. 2001. « Detection of Metal-Chelating Compounds from Wood-Rotting Fungi *Trametes Versicolor* and *Wolfiporia Cocos* ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17 (7): 687-90. <https://doi.org/10.1023/A:1012929112523>.
- Machuca, A., G. Pereira, A. Aguiar, et A. M. F. Milagres. 2007. « Metal-Chelating Compounds Produced by Ectomycorrhizal Fungi Collected from Pine Plantations ». *Letters in Applied Microbiology* 44 (1): 7-12. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02046.x>
- Madrid, F., R. Reinoso, M. C. Florido, E. Díaz Barrientos, F. Ajmone-Marsan, C. M. Davidson, et L. Madrid. 2007. « Estimating the Extractability of Potentially Toxic Metals in Urban Soils: A Comparison of Several Extracting Solutions ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 147 (3): 713-22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.09.005>.
- Mahmood, T., F. Azam, et K. A. Malik. 1985. « Decomposition and Humification of Plant Residues by Some Soil Fungi ». *Biotechnology Letters* 7(3), 207-212.
- Mahoney, Daniel, Walter Gams, Wieland Meyer, et Mieke Starink-Willemse. 2004. « *Umbelopsis Dimorpha* Sp. Nov., a Link between *U. Vinacea* and *U. Versiformis* ». *Mycological Research* 108 (1): 107-11. <https://doi.org/10.1017/S0953756203008876>.
- Mäkelä, Miia, Sari Galkin, Annele Hatakka, et Taina Lundell. 2002. « Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi ». *Enzyme and Microbial technology* 30 (4): 542–549.
- Malvick, D. K., et A. E. Impullitti. 2007. « Detection and Quantification of *Phialophora Gregata* in Soybean and Soil Samples with a Quantitative, Real-Time PCR Assay ». *Plant Disease* 91 (6): 736-42. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0736>.
- Manamgoda, Dimuthu S., Lei Cai, Ali H. Bahkali, Ekachai Chukeatirote, et Kevin D. Hyde. 2011. « *Cochliobolus*: An Overview and Current Status of Species ». *Fungal Diversity* 51 (1): 3-42. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0139-4>.
- Martins, Bruno L., Claudio C. V. Cruz, Aderval S. Luna, et Cristiane A. Henriques. 2006. « Sorption and Desorption of  $Pb^{2+}$  Ions by Dead *Sargassum* Sp. Biomass ». *Biochemical Engineering Journal* 3 (27): 310-14. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.007>.
- McCarthy, John F., et John M. Zachara. 1989. « Subsurface transport of contaminants ». *Environmental Science & Technology* 23 (5): 496-502. <https://doi.org/10.1021/es00063a001>.

- McGeer, Jim. 2004. *Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals*. US Environmental Protection Agency.
- McGregor, Erin B., K. R. Solomon, et M. L. Hanson. 2008. « Effects of planting system design on the toxicological sensitivity of *Myriophyllum spicatum* and *Elodea canadensis* to atrazine ». *Chemosphere* 73 (3): 249-60. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.045>.
- Meers, E., R. Samson, F. M. G. Tack, A. Ruttens, M. Vandegehuchte, J. Vangronsveld, et M. G. Verloo. 2007. « Phytoavailability Assessment of Heavy Metals in Soils by Single Extractions and Accumulation by *Phaseolus Vulgaris* ». *Environmental and Experimental Botany* 60 (3): 385-96. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.12.010>.
- Mermet, Jean-Michel. 2008. « Limit of Quantitation in Atomic Spectrometry: An Unambiguous Concept? » *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, Honoring Issue A Collection of Papers on Atomic, Molecular and Laser Spectroscopy Dedicated to James D. Winefordner, 63 (2): 166-82. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2007.11.029>.
- Meyer, Joseph S. 2002. « The Utility of the Terms “Bioavailability” and “Bioavailable Fraction” for Metals ». *Marine Environmental Research* 53 (4): 417-23. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(01\)00121-0](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(01)00121-0).
- Micales, J. A. (USDA Forest Service. 1996. « Localization of Oxalate Decarboxylase in the Brown-Rot Fungus *Postia Placenta* ». *Document - the International Research Group on Wood Preservation (Sweden)*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=SE9710993>.
- Mishra, Abhishek, et Anushree Malik. 2014. « Novel Fungal Consortium for Bioremediation of Metals and Dyes from Mixed Waste Stream ». *Bioresource Technology* 171 (novembre): 217-26. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.047>.
- Mishra, Sandhya, Ram Naresh Bharagava, Nandkishor Vithalrao More, Ajit S. Yadav, Surabhi Zainith, Sujata Mani, et Pankaj Chowdhary. 2019. « Heavy Metal Contamination: An Alarming Threat to Environment and Human Health ». *Environmental Biotechnology: For Sustainable Future*. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0_5).
- Mitchell, D. J., M. E. Kannwischer-Mitchell, et D. W. Dickson. 1987. « A Semi-selective Medium for the Isolation of *Paecilomyces lilacinus* from Soil ». *Journal of Nematology* 19 (2): 255-56.
- Mohammadian, Elham, Asadollah Babai Ahari, Mahdi Arzanlou, Shahin Oustan, et Sayyed Hossein Khazaei. 2017. « Tolerance to Heavy Metals in Filamentous Fungi Isolated from Contaminated Mining Soils in the Zanjan Province, Iran ». *Chemosphere* 185 (octobre): 290-96. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.022>.

- Mohsenzadeh, Fariba, et Farzad Shahrokhi. 2014. « Biological removing of Cadmium from contaminated media by fungal biomass of *Trichoderma* species ». *Journal of environmental health science & engineering* 12 (juillet): 102. <https://doi.org/10.1186/2052-336X-12-102>.
- Molnár-Perl, I., et M. Morvai. 1992. « Rapid method for the simultaneous GC quantitation of acids and sugars in fruits and vegetables. » *Food additives and contaminants*. <https://doi.org/10.1080/02652039209374104>.
- Mondala, Andro H. 2015. « Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids: current and future prospects ». *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 42 (4): 487-506. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1575-4>.
- Mulchi, C. L., C. A. Adamu, P. F. Bell, et R. L. Chaney. 1992. « Residual heavy metal concentrations in sludge amended coastal plain soils - II. Predicting metal concentrations in tobacco from soil test information ». *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 23 (9-10): 1053-69. <https://doi.org/10.1080/00103629209368649>.
- Mullin, W. J., et D. B. Emmons. 1997. « Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography ». *Food research international* 30 (2): 147–151.

## N

- 
- Nadarajah, Kalaivani, Dawn Carmel Paul, et Abdul Jalil Abdul Kader. 2006. « Effects Of Alkaline And Acid Treatment To The Yield And Quality Of Chitosan Extracted From *Absidia* Sp. Dr ». *Jurnal Teknologi*, 33â€“42-33â€“42. <https://doi.org/10.11113/jt.v44.366>.
- Navas, Ana, et Harald Lindhorfer. 2005. « Chemical Partitioning of Fe, Mn, Zn and Cr in Mountain Soils of the Iberian and Pyrenean Ranges (NE Spain) ». *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 14 (3): 249-59. <https://doi.org/10.1080/15320380590928311>.
- Navel, Aline. 2011. « Distribution, spéciation impact et transfert du cuivre dans un sol sous vigne : rôle de la structuration spatiale et du statut organique ». Thèse de doctorat, Grenoble. <https://www.theses.fr/2011GRENU042>.
- Ngo, Cao Cuong, Quang Huy Nguyen, Thu Hoai Nguyen, Ngoc Tung Quach, Pravin Dudhagara, Thi Hanh Nguyen Vu, Thi Thanh Xuan Le, et al. 2021. « Identification of Fungal Community Associated with Deterioration of Optical Observation Instruments of Museums in Northern Vietnam ». *Applied Sciences* 11 (12): 5351. <https://doi.org/10.3390/app11125351>.

Nguyen, Thuong T. T., Hee-Young Jung, Youn Su Lee, Kerstin Voigt, et Hyang Burm Lee. 2017. « Phylogenetic Status of Two Undescribed Zygomycete Species from Korea: *Actinomucor elegans* and *Mucor minutus* ». *Mycobiology* 45 (4): 344-52. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.344>.

Nounsi, A., A. Outcoumit, K. Selmaoui, A. Ouazzani Touham, R. Benkirane, et A. Douira. 2014. « Inventaire des champignons ectomycorhiziens du Maroc ». *Journal of Applied Biosciences* 79 (août): 6826-54. <https://doi.org/10.4314/jab.v79i1.10>.

Novakova, Alena, Jan Frouz, et J. Bastl. 2010. « Bioaccumulation of copper in various species of soil microscopic fungi in laboratory conditions ». *Acta Universitatis Carolinae, Environmentalica* 24 (janvier): 45-49.

## O

---

O. Alibrahim, Zahid, et Craig D. Williams. 2016. « Assessment of bioavailability of some potential toxic metals in mining-affected soils using EDTA extraction and principle component analysis (PCA) approach, Derbyshire, UK ». *Interdisciplinary Journal of Chemistry* 1 (2). <https://doi.org/10.15761/IJC.1000110>.

Oladipo, Oluwatosin Gbemisola, Olusegun Olufemi Awotoye, Akinyemi Olayinka, Cornelius Carlos Bezuidenhout, et Mark Steve Maboeta. 2018. « Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites ». *Brazilian Journal of Microbiology* 49 (1): 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.003>.

Olaniran, Ademola O., Adhika Balgobind, et Balakrishna Pillay. 2013. « Bioavailability of Heavy Metals in Soil: Impact on Microbial Biodegradation of Organic Compounds and Possible Improvement Strategies ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (5): 10197-228. <https://doi.org/10.3390/ijms140510197>.

Onireti, Olaronke O., et Chuxia Lin. 2016. « Mobilization of soil-borne arsenic by three common organic acids: Dosage and time effects ». *Chemosphere* 147 (mars): 352-60. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.129>.

## P

---

Panagos, Panos, Marc Van Liedekerke, Yusuf Yigini, et Luca Montanarella. 2013. « Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network ». Research article. *Journal of Environmental and Public Health*. <https://doi.org/10.1155/2013/158764>.

Pansu, Marc, et Jacques Gautheyrou. 2003. *L'analyse du sol : minéralogique, organique et minérale*. Paris, Springer.

- Parent, L. E., et G. Gagné. 2010. « Guide de référence en fertilisation ». *Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec*, 473.
- Pédrot, Mathieu. 2009. « Colloïdes et compositions élémentaires des solutions de sols ». Thèse de Doctorat, Rennes. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00533848>.
- Peleg, Yoav, Barry Stieglitz, et Israel Goldberg. 1988. « Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus* ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 28 (mars): 69-75. <https://doi.org/10.1007/BF00250501>.
- Pelfrêne, Aurélie. 2008. « Spéciation des métaux traces (Cd, Cu, Pb, Zn) dans les eaux d'un Planosol non pollué (Massif Central, France) ». Thèse de doctorat, Tours. <http://www.theses.fr/2008TOUR4008>.
- Pérez-Vásquez, Naira. 2015. « Contribution au profilage des acides organiques urinaires, chez l'enfant ». Thèse de doctorat, Université Paris Sud - Paris XI. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01217357>.
- Pernet-Coudrier, Benoît. « Influence de la matière organique dissoute sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux : cas de la Seine, un milieu sous forte pression urbaine. Sciences de la Terre ». Université Paris-Est, 2008. Français. (NNT : 2008PEST0063). (tel-00366692v2)
- Porri, Aimone, Riccardo Baroncelli, Lorenzo Guglielminetti, Sabrina Sarrocco, Lorenzo Guazzelli, Maurizio Forti, Giorgio Catelani, et al. 2011. « *Fusarium Oxysporum* Degradation and Detoxification of a New Textile-Glycoconjugate Azo Dye (GAD) ». *Fungal Biology* 115 (1): 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.10.001>.
- Proffit, Sylvain. 2011. « Etude de la répartition géochimique du cuivre dans les sols du vignoble champenois : approche par modèles synthétiques de complexité croissante ». Thèse de doctorat, Reims. <https://www.theses.fr/2011REIMS026>.
- Pueyo, M, J. F López-Sánchez, et G Rauret. 2004. « Assessment of CaCl<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> Extraction Procedures for the Study of Cd, Cu, Pb and Zn Extractability in Contaminated Soils ». *Analytica Chimica Acta* 504 (2): 217-26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.047>.

## Q

- Qasim, Bashar Hussein. 2015. « Détermination, spéciation et biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols contaminés et technosols ». Thèse de doctorat, Orléans. <https://www.theses.fr/2015ORLE2069>.

Quevauviller P, Rauret G, López-Sánchez J-F, Rubio R, Ure A, Muntau H.1997. Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure. *Science of The Total Environment* 205:223–234.

## R

---

Radojčić Redovniković, Ivana, Alessandra De Marco, Chiara Proietti, Karla Hanousek, Marija Sedak, Nina Bilandžić, et Tamara Jakovljević. 2017. « Poplar response to cadmium and lead soil contamination ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 144 (octobre): 482-89. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.011>.

Rafhaella, Thalline, Leite Cordeiro, Thuong Thuong, Thi Nguyen, Diogo Lima, Suzana Silva, Catarina Lima, et al. 2020. « Two new species of the industrially relevant genus *Absidia* (Mucorales) from soil of the Brazilian Atlantic Forest ». *Acta Botanica Brasilica* 34 (octobre). <https://doi.org/10.1590/0102-33062020abb0040>.

Ranjard, Lionel, Abdelwahad Echairi, Virginie Nowak, David P. H. Lejon, Rachida Nouaïm, et Rémi Chaussod. 2006. « Field and Microcosm Experiments to Evaluate the Effects of Agricultural Cu Treatment on the Density and Genetic Structure of Microbial Communities in Two Different Soils ». *FEMS Microbiology Ecology* 58 (2): 303-15. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00157.x>.

Rashid, Maliha, Samina Khalil, Najma Ayub, Sadia Alam, et Farooq Latif. 2004. « Organic Acids Production and Phosphate Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) Under in vitro Conditions ». *Pakistan Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.3923/PJBS.2004.187.196>.

Rathore, Himanshi, Shalinee Prasad, Mandira Kapri, Abhay Tiwari, et Satyawati Sharma. 2019. « Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications ». *Journal of Functional Foods* 56 (mai): 182-93. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.016>.

Rauret, Gemma. 1998. « Extraction Procedures for the Determination of Heavy Metals in Contaminated Soil and Sediment ». *Talanta* 46 (3): 449-55. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00406-2](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00406-2).

Record, Association de bioprocédés à d'autres procédés dans le traitement ex situ de déchets et sols pollués, 2006, 227 p, n° 04-0416/1A.

Recueil International des Méthodes d'Analyses – OIV Estimation de la limite de détection et de quantification OIV-MA-AS1-10 : R2000 1 Estimation de la limite de détection et de quantification d'une méthode d'analyse (Résolution oeno 7/2000).

- Renshaw, Joanna, GD Robson, Anthony P.J. Trinci, Marilyn Wiebe, Francis R. Livens, David Collison, et Robin Taylor. 2002. « Fungal siderophores: Structures, functions and applications ». *Mycological Research*, 106, 1123-1142. Vol. 106. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006548>.
- Restino, Clémence. 2012. « Production d'acide itaconique par des souches d'Aspergilli par fermentation en milieu solide ». Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne Ardenne. <https://hal.inrae.fr/tel-02803534>.
- Ribeiro, Bárbara, Patrícia Valentão, Paula Baptista, Rosa M. Seabra, et Paula B. Andrade. 2007. « Phenolic Compounds, Organic Acids Profiles and Antioxidative Properties of Beefsteak Fungus (*Fistulina Hepatica*) ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 45 (10): 1805-13. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.03.015>.
- Robidas, Maryse. 2011. « Évaluation du potentiel de risques toxicologiques et écotoxicologiques de teneurs naturelles en métaux dans les Appalaches et les Basses-Terres au Québec ». Essai, Université de Sherbrooke. <https://savoirs.usherbrooke.ca/handle/11143/7432>.
- Rodríguez-Eugenio, N., M. McLaughlin, et D. Pennock. 2018. *Soil Pollution: A Hidden Reality*. FAO. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2018001459>.
- Rogers, William John, Stéphane Michaux, Maryse Bastin, et Peter Bucheli. 1999. « Changes to the Content of Sugars, Sugar Alcohols, Myo-Inositol, Carboxylic Acids and Inorganic Anions in Developing Grains from Different Varieties of Robusta (*Coffea Canephora*) and Arabica (*C. Arabica*) Coffees ». *Plant Science* 149 (2): 115-23. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00147-8).
- Romero, M. Cristina, M. Ines Urrutia, H. Enso Reinoso, et M. Moreno Kiernan. 2010. « Benzo[a]Pyrene Degradation by Soil Filamentous Fungi ». *Journal of Yeast and Fungal Research* 1 (2): 025-029. <https://doi.org/10.5897/JYFR.9000008>.
- Romero Rodriguez, M.A., M.L. Vazquez Oderiz, J. Lopez Hernandez, et J. Simal Lozano. 1992. « Determination of Vitamin C and Organic Acids in Various Fruits by HPLC ». *Journal of Chromatographic Science* 30 (11): 433-37. <https://doi.org/10.1093/chromsci/30.11.433>.
- Rorat, Agnieszka, Franck Vandenbulcke, Adrianna Gałuszka, Beata Klimek, et Barbara Plytycz. 2017. « Protective role of metallothionein during regeneration in *Eisenia andrei* exposed to cadmium ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 203 (décembre): 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.10.002>.

- Saccani, G., S. Gherardi, A. Trifirò, C. Soresi Bordini, M. Calza, et C. Freddi. 1995. « Use of Ion Chromatography for the Measurement of Organic Acids in Fruit Juices ». *Journal of Chromatography A*, International Ion Chromatographic Symposium 1994, 706 (1): 395-403. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00206-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00206-3).
- Saha, Jayanta K., Rajendiran Selladurai, M. Vassanda Coumar, M. L. Dotaniya, Samaresh Kundu, et Ashok K. Patra. 2017. « Organic Pollutants ». *Soil Pollution - An Emerging Threat to Agriculture*, par Jayanta K. Saha, Rajendiran Selladurai, M. Vassanda Coumar, M.L. Dotaniya, Samaresh Kundu, et Ashok K. Patra, 10:105-35. Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4274-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4274-4_5).
- Sahu, Asha, Asit Mandal, Jyoti Thakur, M. C. Manna, et A. Subba Rao. 2012. « Exploring Bioaccumulation Efficacy of *Trichoderma Viride*: An Alternative Bioremediation of Cadmium and Lead ». *National Academy Science Letters* 35 (4): 299-302. <https://doi.org/10.1007/s40009-012-0056-4>.
- Sahuquillo, A., A. Rigol, et G. Rauret. 2003. « Overview of the Use of Leaching/Extraction Tests for Risk Assessment of Trace Metals in Contaminated Soils and Sediments ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22 (3): 152-59. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00303-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00303-0).
- Saidi, Djamel, Yves Le Bissonnais, Odile Duval, Yessmine Daoud, et Daniel Tessier. 2008. « Estimation et signification de la capacité d'échange cationique des sols salés du Cheliff (Algérie) ». *Etude et Gestion des sols* 15 (4): 241–253.
- Sakuragawa, Taku, Satoshi Wakai, Silai Zhang, Hideo Kawaguchi, Chiaki Ogino, et Akihiko Kondo. 2021. « Accelerated Glucose Metabolism in Hyphae-Dispersed *Aspergillus Oryzae* Is Suitable for Biological Production ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 132 (2): 140-47. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.03.017>.
- Sales da Silva, Israel Gonçalves, Fabíola Carolina Gomes de Almeida, Nathália Maria Padilha da Rocha e Silva, Alessandro Alberto Casazza, Attilio Converti, et Leonie Asfora Sarubbo. 2020. « Soil Bioremediation: Overview of Technologies and Trends ». *Energies* 13 (18): 4664. <https://doi.org/10.3390/en13184664>.
- Sanarico, D., S. Motta, L. Bertolini, et A. Antonelli. 2003. « HPLC Determination of Organic Acids in Traditional Balsamic Vinegar of Reggio Emilia ». *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 26 (13): 2177-87. <https://doi.org/10.1081/JLC-120022402>.
- Santos, Sabrina Novaes dos, et Luís Reynaldo Ferracciú Alleoni. 2013. « Methods for Extracting Heavy Metals in Soils from the Southwestern Amazon, Brazil ». *Water, Air, & Soil Pollution* 224 (2). <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1430-z>.

- Sarma, Hemen, S. Sonowal, et M. N. V. Prasad. 2019. « Plant-Microbiome Assisted and Biochar-Amended Remediation of Heavy Metals and Polyaromatic Compounds – a Microcosmic Study ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 176 (juillet): 288-99. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.081>.
- Sasaki, Y., et S. Takao. 1967. « Organic Acid Production by Basidiomycetes. 3. Cultural Conditions for L-Malic Acid Production ». *Applied Microbiology* 15 (2): 373-77.
- Scervino, Jose Martin, Milton Prieto Mesa, Ivana Della Mónica, Marina Recchi, Nubia Sarmiento Moreno, et Alicia Godeas. 2010. « Soil Fungal Isolates Produce Different Organic Acid Patterns Involved in Phosphate Salts Solubilization ». *Biology and Fertility of Soils* 46 (7): 755-63. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0482-8>.
- Scheckel, Kirk G., et Donald L. Sparks. 2001. « Temperature Effects on Nickel Sorption Kinetics at the Mineral–Water Interface ». *Soil Science Society of America Journal* 65 (3): 719-28. <https://doi.org/10.2136/sssaj2001.653719x>.
- Scherer, Rodrigo, Ana Cecília Poloni Rybka, Cristiano Augusto Ballus, Adriana Dillenburg Meinhart, José Teixeira Filho, et Helena Teixeira Godoy. 2012. « Validation of a HPLC Method for Simultaneous Determination of Main Organic Acids in Fruits and Juices ». *Food Chemistry* 135 (1): 150-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.111>.
- Schilling, Jonathan S., et Jody Jellison. 2004. « High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Soluble and Total Oxalate in Ca- and Mg-Amended Liquid Cultures of Three Wood Decay Fungi ». *Holzforschung* 58 (6): 682-87. <https://doi.org/10.1515/HF.2004.124>.
- Schilling, Jonathan S., et Jody Jellison. 2005. « Oxalate Regulation by Two Brown Rot Fungi Decaying Oxalate-Amended and Non-Amended Wood » 59 (6): 681-88. <https://doi.org/10.1515/HF.2005.109>.
- Schneider, Arnaud. 2016. « Comportement et mobilité des éléments traces métalliques dans des sols environnant une usine de seconde fusion du plomb. Approches expérimentales et modélisation. » Thèse de doctorat. Reims. <http://www.theses.fr/2016REIMS043>.
- Schoch, Conrad L., Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, Vincent Robert, John L. Spouge, C. André Levesque, Wen Chen, Fungal Barcoding Consortium, et Fungal Barcoding Consortium Author List. 2012. « Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (16): 6241-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.

- Schulz, Margot, Dieter Sicker, Oliver Schackow, Lothar Hennig, Andrey Yurkov, Meike Siebers, Diana Hofmann, et al. 2017. « Interspecies-cooperations of abutilon theophrasti with root colonizing microorganisms disarm BOA-OH allelochemicals ». *Plant Signaling & Behavior* 12 (8): e1358843. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1358843>.
- Schwartz, Christophe, Guillaume Echevarria, et Jean Louis Morel. 2003. « Phytoextraction of Cadmium with *Thlaspi Caerulescens* ». *Plant and Soil* 249 (1): 27-35. <https://doi.org/10.1023/A:1022584220411>.
- Siegel, S. M., Margalith Galun, et B. Z. Siegel. 1990. « Filamentous Fungi as Metal Biosorbents: A Review ». *Water, Air, and Soil Pollution* 53 (3): 335-44. <https://doi.org/10.1007/BF00170747>.
- Sierra, Jordi, et Joan Cáliz. 2012. « Emerging Resistant Microbiota from an Acidic Soil Exposed to Toxicity of Cr, Cd and Pb Is Mainly Influenced by the Bioavailability of These Metals ». *Journal of Soils and Sediments*.
- Silva, Ygor Jacques Agra Bezerra da, Clístenes Williams Araújo do Nascimento, et Caroline Miranda Biondi. 2014. « Comparison of USEPA Digestion Methods to Heavy Metals in Soil Samples ». *Environmental Monitoring and Assessment* 186 (1): 47-53. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3354-5>.
- Simes, Dina C., Maria João Bebianno, et José J.G. Moura. 2003. « Isolation and Characterisation of Metallothionein from the Clam *Ruditapes Decussatus* ». *Aquatic Toxicology* 63 (3): 307-18. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00185-6).
- Singh, Harbhajan. 2006. *Mycoremediation*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0470050594>.
- Sinha, Rajiv, D. Valani, S. Sinha, S. Singh, et S. Herat. 2011. « Bioremediation of contaminated sites: A low-cost nature's biotechnology for environmental clean up by versatile microbes, plants and earthworms ». *Solid Waste Management and Environmental Remediation*, février, 1-72.
- Siveris, Wagner Luis, Guilherme Victor Vanzetto, Gabriel Immich, et Antônio Thomé. 2019. « Application and efficiency of vitrification and electrokinetic techniques in soil remediation ». *Ciência e Natura* 41: 32.
- Souza, Lilian, Luiza Pomarolli, et Márcia Veiga. 2020. « From classic methodologies to application of nanomaterials for soil remediation: an integrated view of methods for decontamination of toxic metal(oid)s ». *Environmental Science and Pollution Research* 27 (avril). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08032-8>.
- Srivastava, Shaili, et Indu Shekhar Thakur. 2006. « Evaluation of Bioremediation and Detoxification Potentiality of *Aspergillus Niger* for Removal of Hexavalent Chromium in Soil Microcosm ». *Soil Biology and Biochemistry* 38 (7): 1904-11. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.12.016>.

- Sturini, Michela, Carolina Girometta, F. Maraschi, Elena Savino, et Antonella Profumo. 2017. « A Preliminary Investigation on Metal Bioaccumulation by *Perenniporia fraxinea* ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 98 (avril). <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2038-1>.
- Sun, B, F. J Zhao, E Lombi, et S. P McGrath. 2001. « Leaching of Heavy Metals from Contaminated Soils Using EDTA ». *Environmental Pollution* 113 (2): 111-20. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00176-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00176-7).
- Sunahara, Geoffrey I., Agnès Y. Renoux, Claude Thellen, Connie L. Gaudet, et Adrien Pilon. 2002. *Environmental Analysis of Contaminated Sites*. John Wiley & Sons.
- Swain, Manas, et Ramesh Ray. 2009. « Oxalic acid production by *Fusarium oxysporum* Schlecht and *Botryodiplodia theobromae* Pat., post-harvest fungal pathogens of yams (*Dioscorea rotundata* L.) and detoxification by *Bacillus subtilis* CM1 isolated from culturable cowdung microflora ». *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42 (juillet). <https://doi.org/10.1080/03235400701288444>.

## T

---

- Takao, S. 1965. « Organic Acid Production by Basidiomycetes. I. Screening of Acid-Producing Strains ». *Applied Microbiology* 13 (5): 732-37.
- Talukdar, D., R. Sharma, S. Jaglan, R. Vats, R. Kumar, Mater H. Mahnashi, et Ahmad Umar. 2020. « Identification and Characterization of Cadmium Resistant Fungus Isolated from Contaminated Site and Its Potential for Bioremediation ». *Environmental Technology & Innovation* 17 (février): 100604. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100604>.
- Tessier, A., P. G. C. Campbell, et M. Bisson. 1979. « Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals ». *Analytical Chemistry* 51 (7): 844-51. <https://doi.org/10.1021/ac50043a017>.
- Tessier, D. 2002. « Le sol, lieu d'échange et de transferts. Conséquences de leur utilisation par l'homme : un exemple français ». *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science* 15: 9-26. <https://doi.org/10.7202/705483ar>.
- Tian, Rui, Xinmin Liu, Xiaodan Gao, Rui Li, et Hang Li. 2021. « Observation of Specific Ion Effects in Humus Aggregation Process ». *Pedosphere* 31 (5): 736-45. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60033-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60033-4).
- Tilburg, A.-U. B. van, et M. D. Thomas. 1993. « Production of Extracellular Proteins by the Biocontrol Fungus *Gliocladium virens* ». *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1): 236-42.

- Touceda-González, Maria, Vanessa Álvarez-López, Ángeles Prieto-Fernández, Beatriz Rodríguez-Garrido, Carmen Trasar-Cepeda, Michel Mench, Marcus Puschenreiter, Celestino Quintela-Sabarís, Felipe Macías-García, et Petra Susan Kidd. 2017. « Aided phytostabilisation reduces metal toxicity, improves soil fertility and enhances microbial activity in Cu-rich mine tailings ». *Journal of Environmental Management, Biogeochemistry of trace elements in the environment*, 186 (janvier): 301-13. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.019>.
- Tremel-Schaub, Anne, et Isabelle Feix. 2005. « Contamination des sols : transferts des sols vers les plantes ». *Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie. Angers : EDP Sciences, Les Ulis 106 (2005)*.
- Trujillo-Vargas, Laura, Margarita Enid Ramírez-Carmona, Yesid Vélez-Salazar. 2020. « Determination of Citric and Oxalic Acid in Fungi Fermentation Broth through HPLC-DAD and Solid-Phase Extraction ». *DYNA* 87 (212): 26-30. <https://doi.org/10.15446/dyna.v87n212.76240>.
- Tuin, B. J. W., et M. Tels. 1990. « Removing heavy metals from contaminated clay soils by extraction with hydrochloric acid, edta or hypochlorite solutions ». *Environmental Technology* 11 (11): 1039-52. <https://doi.org/10.1080/09593339009384958>.
- Tyagi, Meenu, M. Manuela R. da Fonseca, et Carla C. C. R. de Carvalho. 2011. « Bioaugmentation and Biostimulation Strategies to Improve the Effectiveness of Bioremediation Processes ». *Biodegradation* 22 (2): 231-41. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>.

## U

---

- Uddin, Minhaz, Dan Zhang, Ram Proshad, et M. K. Haque. 2020. « Role of mushrooms in soil mycoremediation: a review ». *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology* 26(2): 460-68.
- Ure, A. M., Ph Quevauviller, H. Muntau, et B. Griepink. 1993. « Speciation of Heavy Metals in Soils and Sediments. An Account of the Improvement and Harmonization of Extraction Techniques Undertaken Under the Auspices of the BCR of the Commission of the European Communities ». *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51 (1-4): 135-51. <https://doi.org/10.1080/03067319308027619>.

## V

---

- Vaishaly, A. G., B. B. Mathew, N. B. Krishnamurthy, et T. P. Krishnamurthy. 2015. « Bioaccumulation of heavy metals by fungi ». *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 1 (1): 15–21.

- Varga, János, Jos Houbraken, Henrich A. L. Van Der Lee, Paul E. Verweij, et Robert A. Samson. 2008. « *Aspergillus calidoustus* sp. nov., Causative Agent of Human Infections Previously Assigned to *Aspergillus ustus* ». *Eukaryotic Cell* 7 (4): 630-38. <https://doi.org/10.1128/EC.00425-07>.
- Vaseem, Huma, V. K. Singh, et M. P. Singh. 2017. « Heavy metal pollution due to coal washery effluent and its decontamination using a macrofungus, *Pleurotus ostreatus* ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 145 (novembre): 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.001>.
- Vasseur, Paule, Marc Bonnard, Frederic Palais, I Eom, et Jean-Louis Morel. 2008. « Bioavailability of chemical pollutants in contaminated soils and pitfalls of chemical analyses in hazard assessment ». *Environmental toxicology* 23 (octobre): 652-56. <https://doi.org/10.1002/tox.20401>.
- Vazquez Oderiz, M L, M E Vazquez Blanco, J Lopez Hernandez, J Simal Lozano, et M A Romero Rodriguez. 1994. « Simultaneous Determination of Organic Acids and Vitamin C in Green Beans by Liquid Chromatography ». *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 77 (4): 1056-59. <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.4.1056>.
- Velterop, Joyce S., et Femke Vos. 2001. « A Rapid and Inexpensive Microplate Assay for the Enzymatic Determination of Glucose, Fructose, Sucrose, L-Malate and Citrate in Tomato (*Lycopersicon Esculentum*) Extracts and in Orange Juice ». *Phytochemical Analysis* 12 (5): 299-304. <https://doi.org/10.1002/pca.598>.
- Verma, Mausam, Satinder K. Brar, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli, et J. R. Valéro. 2007. « Antagonistic Fungi, *Trichoderma* Spp.: Panoply of Biological Control ». *Biochemical Engineering Journal* 37 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>.
- Vial, Jérôme, et Alain Jardy. 1999. « Experimental Comparison of the Different Approaches To Estimate LOD and LOQ of an HPLC Method ». *Analytical Chemistry* 71 (14): 2672-77. <https://doi.org/10.1021/ac981179n>.
- Vidali, M. 2001. « Bioremediation. An Overview ». *Pure and Applied Chemistry* 73 (7): 1163-72. <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>.

## W

---

- Wali, Ahmed, Gilles Colinet, et Mohamed Ksibi. 2014. « Speciation of Heavy Metals by Modified BCR Sequential Extraction in Soils Contaminated by Phosphogypsum in Sfax, Tunisia ». *Environmental Research, Engineering and Management* 70 (4): 14-25. <https://doi.org/10.5755/j01.erem.70.4.7807>.

- Walton, E. F., et T. M. De Jong. 1990. « Growth and Compositional Changes in Kiwifruit Berries from Three Californian Locations ». *Annals of Botany* 66 (3): 285-98. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088027>.
- Wang, Kun, Yuhui Qiao, Huiqi Zhang, Shizhong Yue, Huafen Li, Xionghui Ji, et Longsheng Liu. 2018. « Bioaccumulation of Heavy Metals in Earthworms from Field Contaminated Soil in a Subtropical Area of China ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148 (février): 876-83. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.058>.
- Wang, Youjing, Baizhu Yi, Xiaowei Sun, Lei Yu, Longhua Wu, Wuxing Liu, Daichang Wang, Yilun Li, Rui Jia, Hao Yu, Xuazhen Li. 2019. « Removal and Tolerance Mechanism of Pb by a Filamentous Fungus: A Case Study ». *Chemosphere* 225 (juin): 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.027>.
- Warcup JH. 1950. «The Soil-Plate Method for Isolation of Fungi from Soil». *Nature* 166:117-118.
- Wells, Greg, Harry Prest, et Charles William Russ IV. 2011. « Signal, bruit, et limites de détection en spectrométrie de masse ». Agilent Technologies, Inc. 2850 Centerville Road Wilmington, DE 19809-1610 USA.
- Whitelaw, M. A., T. J. Harden, et K. R. Helyar. 1999. « Phosphate Solubilisation in Solution Culture by the Soil Fungus *Penicillium Radicum* ». *Soil Biology and Biochemistry* 31 (5): 655-65. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00130-8).
- WHO. 2007. « [WHO] World Health Organization. 2007. « Nickel in Drinking-water. Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. 30 pp. », 2007.
- Wu, Minghui, Yongan Xu, Wenbo Ding, Yuanyuan Li, et Heng Xu. 2016. « Mycoremediation of Manganese and Phenanthrene by *Pleurotus Eryngii* Mycelium Enhanced by Tween 80 and Saponin ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (16): 7249-61. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7551-3>.
- Wu, Yue-Ming, Yue-Hua Geng, et Tian-Yu Zhang. 2009. « Three new species of *Monodictys* from soil ». *Mycotaxon* 109 (1): 263-67. <https://doi.org/10.5248/109.263>.

## X

- 
- Xie, Rui, Maobing Tu, Yonnie Wu, et Sushil Adhikari. 2011. « Improvement in HPLC Separation of Acetic Acid and Levulinic Acid in the Profiling of Biomass Hydrolysate ». *Bioresource Technology* 102 (7): 4938-42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.050>.

Xu, Piao, Yang Leng, Guangming Zeng, Danlian Huang, Cui Lai, Meihua Zhao, Zhen Wei, et al. 2015. « Cadmium Induced Oxalic Acid Secretion and Its Role in Metal Uptake and Detoxification Mechanisms in Phanerochaete Chrysosporium ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (1): 435-43. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5986-y>.

Xu, Yunfeng, Qinqin Lu, Jiangpeng Li, Lingyu Wan, Shuang Chen, et Yongsheng Lu. 2021. « Effect of Humus on the Remediation of Arsenic-Contaminated Soil by Electrokinetic Technology ». *Environmental Technology & Innovation* 21 (février): 101297. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101297>.

## Y

Yan, Guangyu, et Thiruvengkatachari Viraraghavan. 2003. « Heavy-Metal Removal from Aqueous Solution by Fungus *Mucor Rouxii* ». *Water Research* 37 (18): 4486-96. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00409-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00409-3).

Yang, Jing, Hao Xu, Jianchun Jiang, Ning Zhang, Jingcong Xie, Jian Zhao, Quan Bu, et Min Wei. 2020. « Itaconic Acid Production from Undetoxified Enzymatic Hydrolysate of Bamboo Residues Using *Aspergillus Terreus* ». *Bioresource Technology* 307 (juillet): 123208. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123208>.

Yateem, A., M. T. Balba, N. Al-Awadhi, et A. S. El-Nawawy. 1998. « White Rot Fungi and Their Role in Remediating Oil-Contaminated Soil ». *Environment International, The Long-term Environmental Effects of the Gulf War*, 24 (1): 181-87. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(97\)00134-7](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(97)00134-7).

Yıldırım, Gülşen, et Şerife Tokaloğlu. 2016. « Heavy Metal Speciation in Various Grain Sizes of Industrially Contaminated Street Dust Using Multivariate Statistical Analysis ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124 (février): 369-76. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.006>.

Yin, Peimin, Naoki Nishina, Yuuko Kosakai, Kazutoyo Yahiro, Yongsoo Pakr, et Mitsuyasu Okabe. 1997. « Enhanced Production of l(+)-Lactic Acid from Corn Starch in a Culture of *Rhizopus Oryzae* Using an Air-Lift Bioreactor ». *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84 (3): 249-53. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82063-6](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82063-6).

Yutong, Zong, Xiao Qing, et Lu Shenggao. 2016. « Distribution, Bioavailability, and Leachability of Heavy Metals in Soil Particle Size Fractions of Urban Soils (Northeastern China) ». *Environmental Science and Pollution Research International* 23 (14): 14600-607. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6652-y>.

## Z

Zafar, Shaheen, Farrukh Aqil, et Iqbal Ahmad. 2007. « Metal Tolerance and Biosorption Potential of Filamentous Fungi Isolated from Metal Contaminated Agricultural Soil ».

*Bioresource Technology* 98 (13): 2557-61.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.051>.

Zaragoza, O. 2017. « Mycology ». *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12378-7>.

Zeppa, Giuseppe, Lorenza Conterno, et Vincenzo Gerbi. 2001. « Determination of Organic Acids, Sugars, Diacetyl, and Acetoin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (6): 2722-26.  
<https://doi.org/10.1021/jf0009403>.

Zhang, Yan, Tao Li, et Zhi-Wei Zhao. 2013. « Colonization Characteristics and Composition of Dark Septate Endophytes (DSE) in a Lead and Zinc Slag Heap in Southwest China ». *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 22 (5): 532-45.  
<https://doi.org/10.1080/15320383.2013.750267>.

Zhao, Wei-Wei, Gangqiang Zhu, Andrew J. Daugulis, Qi Chen, Hong-Yan Ma, Peng Zheng, Jian Liang, et Xiao-kui Ma. 2020. « Removal and Biomineralization of Pb<sup>2+</sup> in Water by Fungus *Phanerochaete Chrysosporium* ». *Journal of Cleaner Production* 260 (juillet): 120980. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120980>.

Zhu, Rui, Min Wu, et Jian Yang. 2011. « Mobilities and Leachabilities of Heavy Metals in Sludge with Humus Soil ». *Journal of Environmental Sciences* 23 (2): 247-54.  
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60399-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60399-3).

Zotti, Mirca, Simone Di Piazza, Enrica Roccotiello, Gabriella Lucchetti, Mauro Giorgio Mariotti, et Pietro Marescotti. 2014. « Microfungi in Highly Copper-Contaminated Soils from an Abandoned Fe–Cu Sulphide Mine: Growth Responses, Tolerance and Bioaccumulation ». *Chemosphere* 117 (décembre): 471-76.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.057>.

# Annexes

**Annexe 1. Composition des milieux de culture**

**Annexe 2. Choix de la longueur d'onde de la méthode ICP-AES.**

**Annexe 3. Calcul des limites de détection et de quantification par la méthode d'étalonnage par régression linéaire**

**Annexe 4. Composition élémentaire des sols de l'étude**

**Annexe 5. Répartition des métaux au sein des différentes fractions labiles des sols de l'étude (L, C et R)**

**Annexe 6. Pourcentages évalués par extraction simple (HCl et EDTA) sur les sols C et L.**

**Annexe 7. Légende des microcosmes étudiés**

**Annexe 8. Publication**

**Annexe 9. Poids frais et poids secs des mycéliums d'*Absidia cylindrospora* issus des essais de bioaugmentation aux temps d'incubation**

**Annexe 10. Teneurs en métaux dans les mycéliums d'*Absidia cylindrospora* issus des essais de bioaugmentation aux temps d'incubation**

**Annexe 11. Photographies microscopie d'isolats fongiques isolés à partir des méthodes par incorporation directe et méthode suspensions- dilutions.**

**Annexe 12. Poster présenté le 5 Juillet 2019 à la Journée de l'Ecole Doctorale Normande de Chimie**

**Annexe 13. Masses des mycéliums de *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* issus des milieux liquides en poids frais et en poids secs.**

**Annexe 14. Teneurs en acides oxalique et citrique dans les milieux de culture de *Absidia cylindrospora* (24h, 48h, 72h, 96h).**

## Annexe 1. Composition des milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pendant la thèse sont le milieu GS et le milieu MEA leurs compositions sont présentées respectivement dans le tableau 38 et le tableau 42.

Les tableaux 38, 39 et 40 détaillent la composition du milieu GS. Les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave durant de 20 minutes à 120°C.

- **Milieu de Galzy et Slonimski (GS) :**

Le milieu GS est composé de 5 solutions préparées séparément en plus de l'agar et de l'eau. La composition détaillée de chaque milieu est présentée dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 38. Composition du milieu de Galzy et Slonimski (GS).

Produit	composition
Solution de sels minéraux	100 mL
Solution d'oligo-éléments	1 mL
Solution EDTA ferrique (200 mg.L <sup>-1</sup> )	1 mL
Solution de vitamines	5 mL
Solution de mésoinositol (4 mg.L <sup>-1</sup> )	5 mL
H <sub>2</sub> O	qsp 1L

Tableau 39. Composition de la solution de sels minéraux.

Produit	composition
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma®)	60 g
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sigma®)	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma®)	10 g
NaCl (Sigma®)	1 g
CaCl <sub>2</sub> (Sigma®)	1 g
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O (Sigma®)	5 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1L

Tableau 40. Composition de la solution d'oligo-éléments.

Produit	composition
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Sigma®)	0,4 g
MnSO <sub>4</sub> (Sigma®)	0,4 g
ZnSO <sub>4</sub> (Sigma®)	0,4 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (Sigma®)	0,2 g
KI (Sigma®)	0,1 g
CuSO <sub>4</sub> (Sigma®)	0,04 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1L

Tableau 41. Composition de la solution de vitamines.

Produit	composition
Pantothénate de Ca (Sigma®)	0,4 g
Chlorhydrate de thiamine (Sigma®)	0,4 g
Inositol (Sigma®)	0,4 g
Pyridoxine (Sigma®)	0,4 g
Acide nicotinique (Sigma®)	0,1 g
Biotine (Sigma®)	0,004 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1 L

- **Milieu Malt Extract Agar (MEA) :**

Tableau 42. Composition du milieu MEA.

Produit	composition
Extrait de malt (Difco®)	15 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1L

## Annexe 2. Choix de la longueur d'onde de la méthode ICP-AES.

Pour un élément donné, exemple Cr : 5 longueurs d'onde sont disponibles. Des captures d'écran sont réalisées à partir de la feuille d'analyse du logiciel d'ICP pour montrer les pics obtenus à partir de chaque longueur d'ondes et sont présentées en figure 57.

Nom de la solution	Cr 205,560 nm ppm	Cr 206,158 nm ppm	Cr 206,550 nm ppm	Cr 283,563 nm ppm	Cr x 267,716 nm ppm
Miné sol S1 (1)	0,062	0,060	0,061	Noncal	0,062
Miné sol S1 (2)	0,058	0,056	0,058	Noncal	0,058
Miné sol S1 (3)	0,063	0,062	0,062	Noncal	0,063

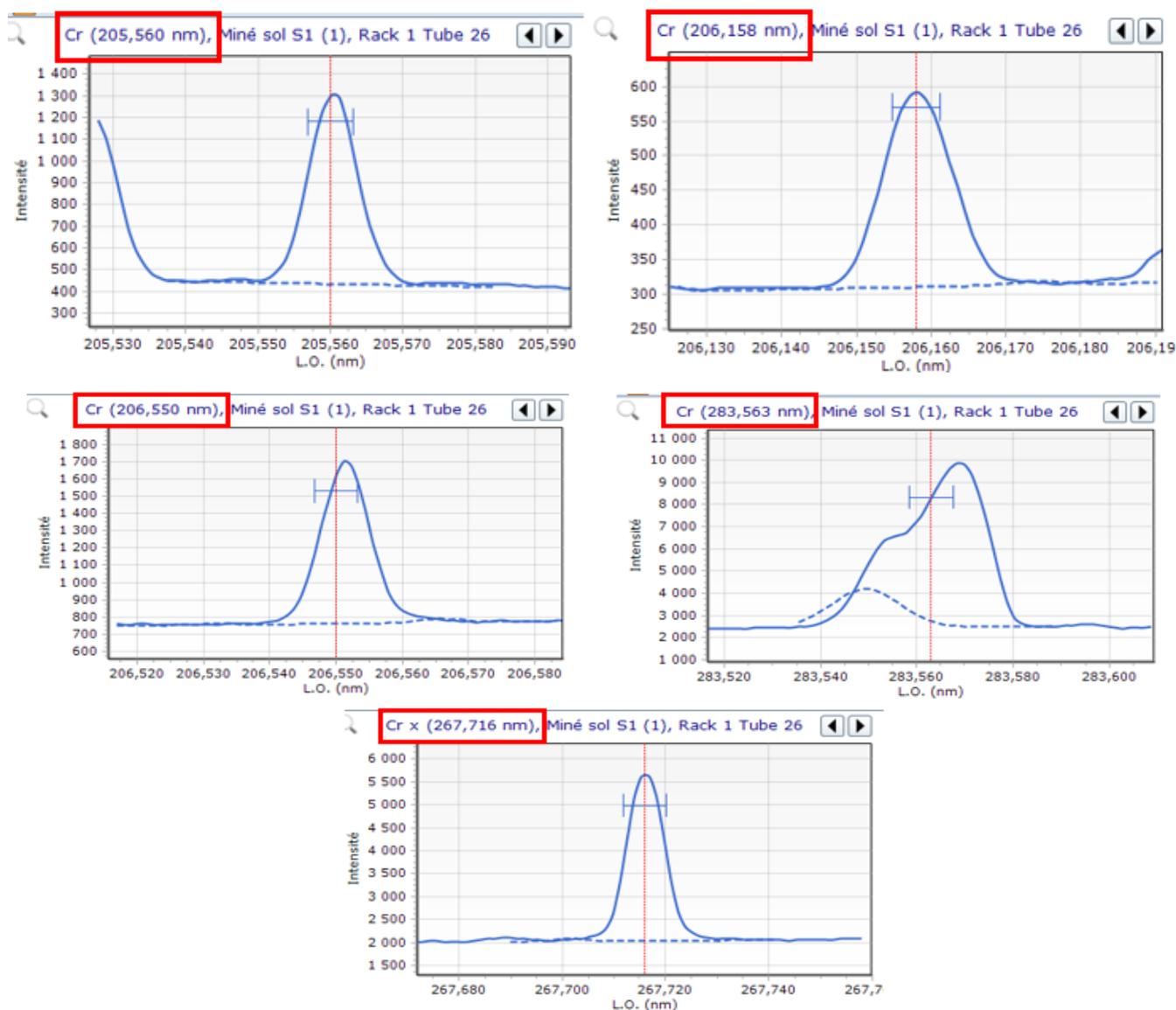


Figure 57. Allure des pics du Cr en fonction des longueurs d'onde issus du logiciel ICP-AES.

La longueur d'onde appropriée à l'analyse est 267,716 nm. Le choix de cette longueur d'onde est basé sur la finesse du pic, ainsi que son intensité.

### Annexe 3. Calcul des limites de détection et de quantification par la méthode d'étalonnage par régression linéaire

La méthode de calcul des limites de détection et de quantification par la méthode d'étalonnage par régression linéaire est présentée ci-dessous dans la figure 58.

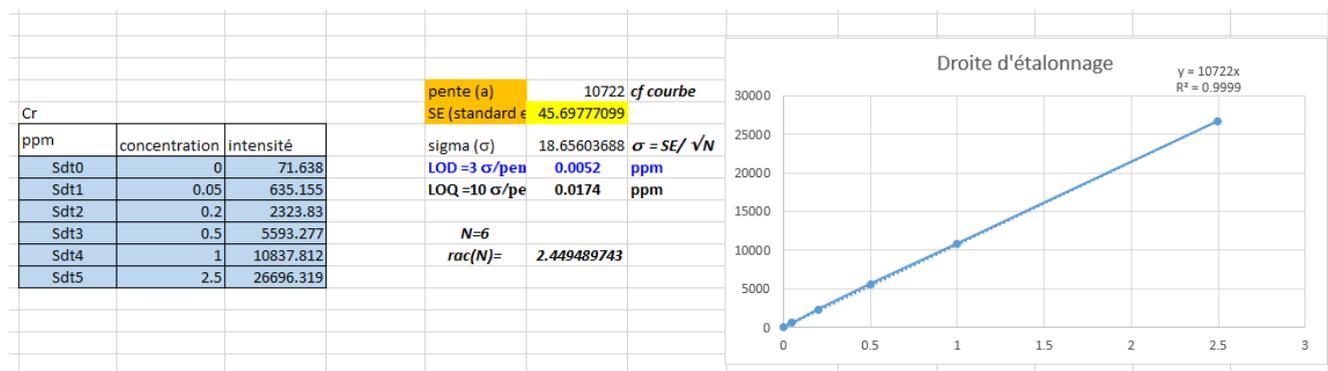


Figure 58. Méthode de calcul des LD et LQ par la méthode d'étalonnage par régression linéaire.

On peut observer les valeurs de concentrations en  $\text{mg.L}^{-1}$  des standards en fonction de leurs intensités. La droite d'étalonnage ainsi tracée à partir de ces valeurs donne accès à la pente. Cette valeur de pente est employée dans la formule de calcul de la LD et de la LQ. Les valeurs de limites de détection et de quantification en  $\text{mg.L}^{-1}$  sont présentées en tableau 43, tandis que les valeurs en  $\text{mg.kg}^{-1}$  sont présentées en tableau 44.

Tableau 43. Limites de détection et de quantification déterminées par régression linéaire ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

$\text{mg.L}^{-1}$	Cd	Cr	Co	Cu	Ni	Pb	Zn
<b>LD</b>	0,003	0,005	0,006	0,002	0,007	0,011	0,002
<b>LQ</b>	0,010	0,017	0,022	0,008	0,025	0,038	0,007

Tableau 44. Limites de détection et de quantification déterminées par régression linéaire ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ).

	matrice	Cd	Cr	Co	Cu	Ni	Pb	Zn
<b>LD en <math>\text{mg.kg}^{-1}</math></b>	sol	0,8	1,3	1,6	0,6	1,9	2,9	0,5
	mycélium	1,5	2,6	3,3	1,2	3,8	5,8	1,0
	milieu MEA	1,0	1,8	3,3	1,2	2,5	3,9	0,7
<b>LQ en <math>\text{mg.kg}^{-1}</math></b>	sol	2,6	4,3	5,5	1,9	6,3	9,6	1,8
	mycélium	5,2	8,6	10,9	3,9	12,6	19,1	3,5
	milieu MEA	3,5	5,8	10,9	3,9	8,5	12,9	2,3

## Annexe 4. Composition élémentaire des sols de l'étude

Le tableau 45 présente les teneurs totales de la totalité des éléments analysés en ICP-AES dans les sols de l'étude (C, L, R, S<sup>-</sup> et S<sup>+</sup>).

Tableau 45. Teneurs totales de 24 éléments dans les sols étudiés.

mg.kg <sup>-1</sup>	C	L	R	S <sup>-</sup>	S <sup>+</sup>
<b>As</b>	14±0	23 ± 0	17 ± 2	3 ± 1	3 ± 0
<b>Ba</b>	42±3	77 ± 0	268 ± 2	10 ± 3	9 ± 2
<b>Ca</b>	315 ± 6	8932 ± 298	47450 ± 5562	902 ± 49	828 ± 15
<b>Cd</b>	1± 0	20 ± 0	8 ± 2	<LQ	38 ± 1
<b>Co</b>	3±0	8 ± 0	7 ± 0	<LQ	<LQ
<b>Cu</b>	6± 1	36 ± 1	130 ± 10	2 ± 0	39 ± 5
<b>Cr</b>	14 ± 3	30 ± 2	27 ± 3	<LQ	<LQ
<b>Fe</b>	14779 ± 1214	14616 ± 507	17780 ± 2397	653 ± 347	400 ± 45
<b>K</b>	1835 ± 487	2497 ± 392	2806 ± 626	375 ± 91	341 ± 64
<b>Mg</b>	829 ± 141	1969 ± 133	2002 ± 302	99 ±18	88 ± 15
<b>Mn</b>	146 ± 35	354 ± 18	623 ± 7	6 ± 2	5 ± 1
<b>Mo</b>	0,49 ± 0,01	0,41 ± 0,14	0,5 ± 0,2	<LQ	<LQ
<b>Na</b>	149 ± 8	197 ±7	469 ± 33	151 ±14	137 ± 8
<b>Ni</b>	6,1 ± 0,4	14 ± 0	18 ± 1	0,3± 0,1	0,242 ± 0,004
<b>P</b>	543 ±55	1099 ± 6	3413 ± 365	117 ±11	107 ± 5
<b>Pb</b>	20 ± 1	1029 ± 16	650 ± 54	1,9 ± 0,5	38 ± 2
<b>S</b>	339 ± 41	348 ± 20	600 ± 80	224 ± 8	229 ± 5
<b>Sc</b>	1,4 ± 0,4	3±0	2,8 ± 0,5	<LQ	<LQ
<b>Se</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>Si</b>	396 ±175	519 ± 322	150 ± 94	343 ±159	409 ± 160
<b>Sn</b>	1,1 ± 0,4	3,3 ± 0,2	17 ± 9	5 ± 1	4 ± 1
<b>Sr</b>	10 ± 2	24 ± 2	92 ± 3	7± 2	7 ± 1
<b>Zn</b>	21 ± 2	1455 ± 20	795±85	6±2	5±1

## Annexe 5. Répartition des métaux au sein des différentes fractions labiles des sols de l'étude (L, C et R)

Le tableau 46 présente la répartition des métaux au sein des différentes fractions labiles des sols de l'étude (L, C et R) en employant le protocole de Leleyter et Probst (1999).

Tableau 46. Répartition de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn au sein des fractions labiles des sols L, C et R.

% Elément	sol	F1 labile eau	F2 échangeable	F3 acido- soluble	F4 réductible	F5 oxydable	F6 totale potentiellement disponible
<b>Cd</b>	C	0	3	0	3	0	6
	L	0	3	45	14	7	69
	R	0	1	11	17	15	44
<b>Co</b>	C	0	3	0	42	14	60
	L	0	0	3	62	8	74
	R	0	0	0	70	11	81
<b>Cr</b>	C	0	0	0	21	11	32
	L	0	0	1	15	11	27
	R	0	0	1	31	15	47
<b>Cu</b>	C	0	0	0	53	9	62
	L	1	1	10	57	7	76
	R	0	1	13	77	6	96
<b>Ni</b>	C	0	10	0	46	15	72
	L	0	0	4	26	13	42
	R	0	0	2	58	15	75
<b>Pb</b>	C	0	6	13	100	16	135
	L	0	0	35	15	21	70
	R	0	0	5	9	49	64
<b>Zn</b>	C	2	9	3	71	16	102
	L	0	0	27	52	7	87
	R	0	0	13	51	6	70

## Annexe 6. Pourcentages évalués par extraction simple (HCl et EDTA) sur les sols C et L.

Les figures 59 et 60 présentent les pourcentages évalués par extraction simple (HCl et EDTA) sur le sol C et le sol L respectivement.

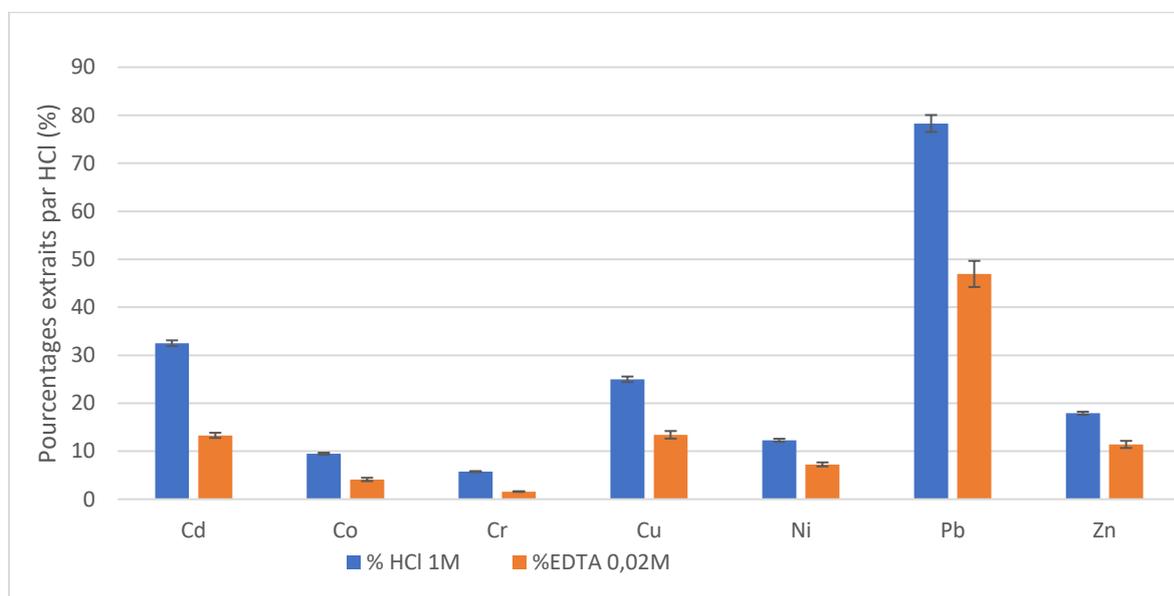


Figure 59. Pourcentages évalués par extraction simple (HCl et EDTA) sur le sol C.

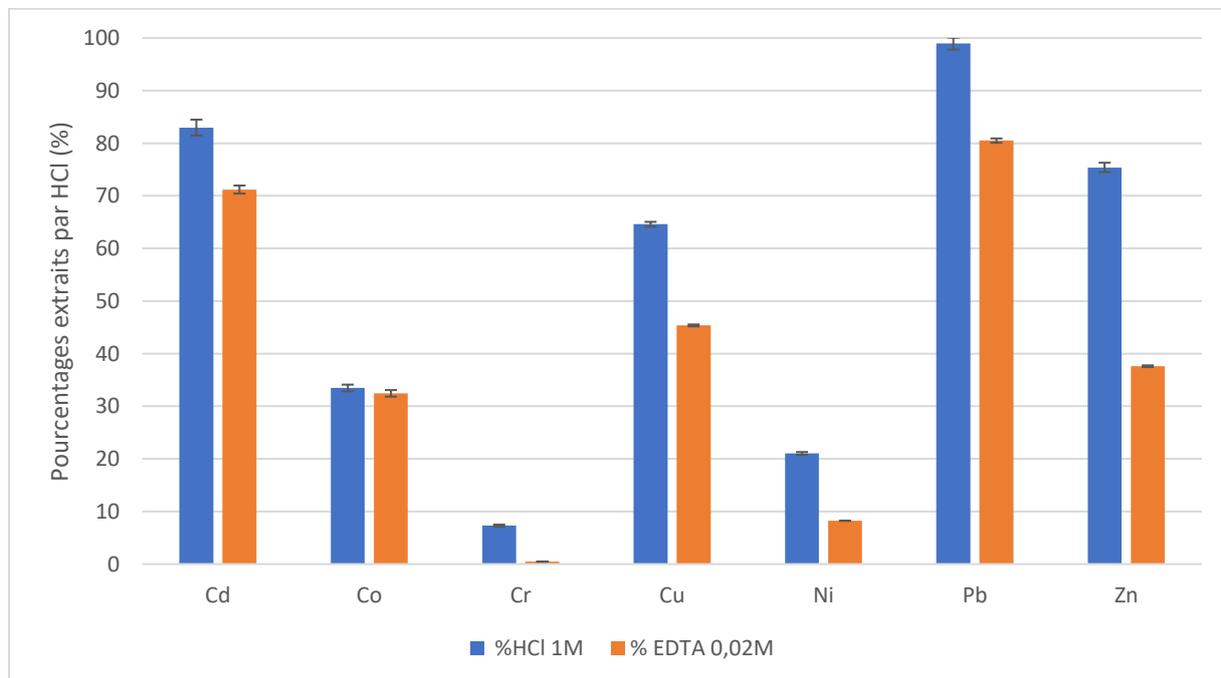


Figure 60. Pourcentages évalués par extraction simple (HCl et EDTA) sur le sol L.

## Annexe 7. Légende des microcosmes étudiés

Pour tous les microcosmes, « A » signifie bioaugmentation et « S » signifie biostimulation.

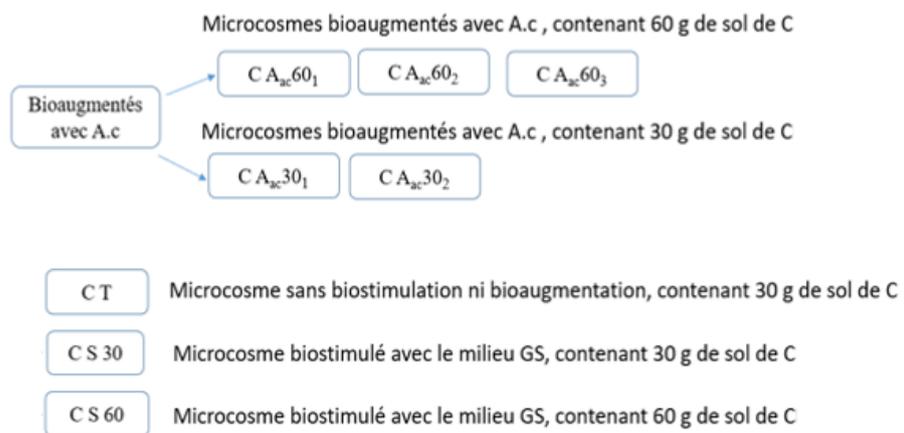
– Le « C » fait référence au sol de forêt C.

- « ac » fait référence à la souche fongique *Absidia cylindrospora* et « pf » fait référence à *Perenniporia fraxinea*.

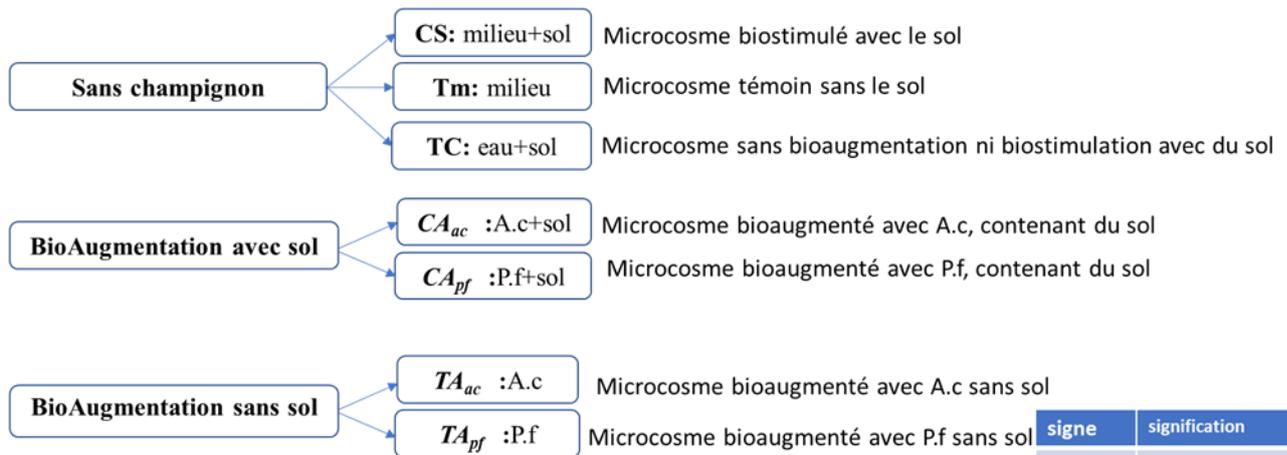
La figure 61 présente la légende de chaque microcosme.

signe	signification
C	Pour sol C
A	bioAugmenté
ac	<i>Absidia cylindrospora</i>
60	Pour 60g de sol
30	Pour 30g de sol
S	Pour sol
T	témoin

### Microcosmes en cristallisoirs

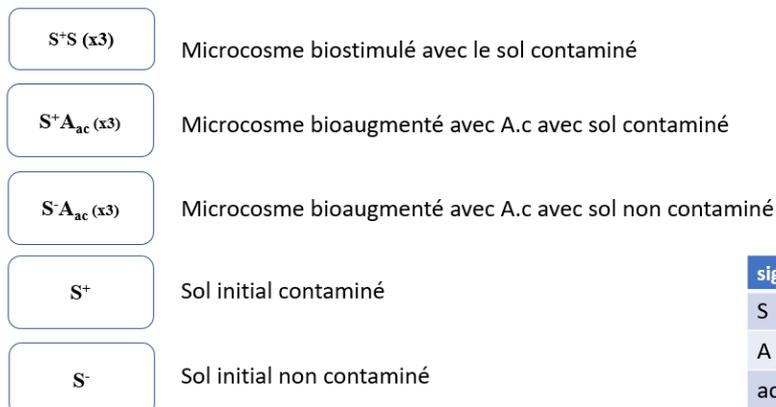


## Microcosmes en boite de Petri avec filtres (sol C)



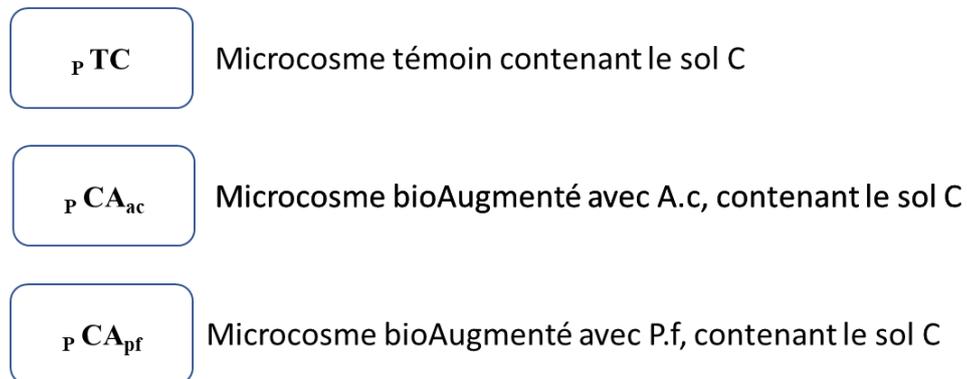
signe	signification
C	Sol C
S	bioStimulation
A	bioAugmentation
ac	<i>Absidia cylindrospora</i>
pf	<i>Perenniporia fraxinea</i>
T	Témoin sans sol

## Microcosmes en boite de Petri (sol synthétique)

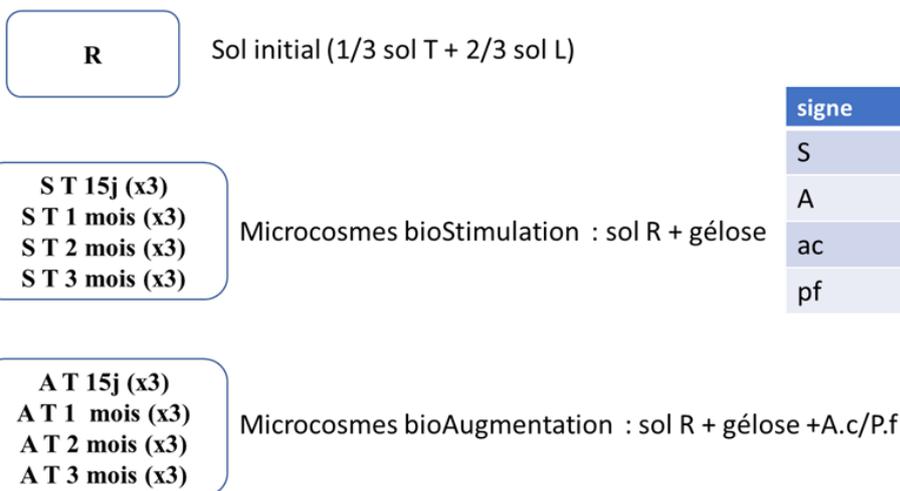


signe	signification
S	biostimulation
A	bioAugmenté
ac	<i>Absidia cylindrospora</i>
S <sup>+</sup>	Sol contaminé
S <sup>-</sup>	Sol non contaminé

## Microcosmes en boite de Petri sans filtre (sol C)



## Microcosmes en boite de Petri (sol R)



signe	signification
S	biostimulation
A	bioAugmenté
ac	<i>Absidia cylindrospora</i>
pf	<i>Perenniporia fraxinea</i>

Figure 61. Légende de chaque microcosme.

## Annexe 8. Publication.

Benjelloun, Ilham, David Garon, Natacha Heutte, Lydia Leleyter, et Fabienne Baraud. 2021. « A new soil microcosm to evaluate the Cd, Cu and Pb biosorption by *Absidia cylindrospora* ». *Bioremediation Journal* 0 (0): 1-10. <https://doi.org/10.1080/10889868.2021.1974333>.

NOTE



## A new soil microcosm to evaluate the Cd, Cu and Pb biosorption by *Absidia cylindrospora*

Q3 Ilham Benjelloun<sup>a</sup>, David Garon<sup>a</sup> , Natacha Heutte<sup>b</sup>, Lydia Leleyter<sup>a</sup> and Fabienne Baraud<sup>a</sup>

<sup>a</sup>UNICAEN, UR ABTE, Normandie Univ, Caen Cedex, France; <sup>b</sup>UNIROUEN, UR CETAPS, Normandie Univ, Mont Saint Aignan Cedex, France

### ABSTRACT

Fungi could be considered as an effective tool for treating metal pollution in soils because of their metal tolerance and biosorption capacity. While most of biosorption studies intended for bioremediation trials are carried out in liquid medium, this study presents the development of a new type of soil microcosm, designed to evaluate the fungal biosorption of metals in a solid medium. The research focused on the bioaugmentation with the fungus *Absidia cylindrospora* of a soil artificially contaminated by metals (Cd, Cu, and Pb). Soil microcosms were performed in layers, and a separation technique including a centrifugation step was developed. The results showed that the centrifugation step does not cause the leaching of metals from the soil. The developed procedure allows to effectively separate the mycelium from the soil at the end of the experiment. It leads to an accurate evaluation of the metal accumulated by the fungus, by better estimating the bioaccumulation factor (BAF) which was superior to 1 for the metals studied. In addition, *Absidia cylindrospora* was viable after 30 days experiment, and able to biosorb considerable amounts of the metals studied from the contaminated soil; it accumulates 171 mg.kg<sup>-1</sup> of Cu, 146 mg.kg<sup>-1</sup> of Cd and 119 mg.kg<sup>-1</sup> of Pb. These results confirm the ability of the fungal strain to be used for bioremediation studies.

### KEYWORDS

*Absidia cylindrospora*; bioaugmentation; bioremediation; microcosm; mycelium

### Introduction

Industrial and agricultural practices have caused soil contamination with metals and organic contaminants. Metals and hydrocarbons are the common contaminants found in soil (Damodaran, Vidya Shetty, and Raj Mohan 2014). Some microorganisms like fungi can tolerate high amounts of contaminants. Indeed, fungi are able to adapt to complex soil matrices and to survive in extreme environmental conditions. The contaminants tolerance and the adaptability represent the main benefits of microorganisms used in bioremediation (Castro et al. 2019). Among these microorganisms, filamentous fungi are good candidates for soil bioremediation because of their type of growth. Indeed, the multitude hyphae's development forms a mycelial network that facilitates the soil colonization and the translocation of nutrients, also increasing the contact surface (Ali

et al. 2017). When white rot fungi are widely studied in bioremediation trials for their effectiveness in the biosorption of metals (Hamba and Tamiru 2016; Bosco and Mollea 2019), few studies are available on fungi belonging to *Mucoromycota*. Also, basidiomycetes fungi responsible of the white rot in wood are very effective in bioremediation processes (Yateem et al. 1998).

Generally, bioremediation is a process which uses microorganisms and their products to remove contaminants from the soil (Leung 2004). It is a biological treatment that involves living organisms like bacteria, fungi, algae and plants (Bosco and Mollea 2019). Mycoremediation is an effective bioremediation technique based on the use of fungi (Ali et al. 2017). Mycoremediation can be developed through two main processes called biostimulation and bioaugmentation. Biostimulation involves introducing nutrients

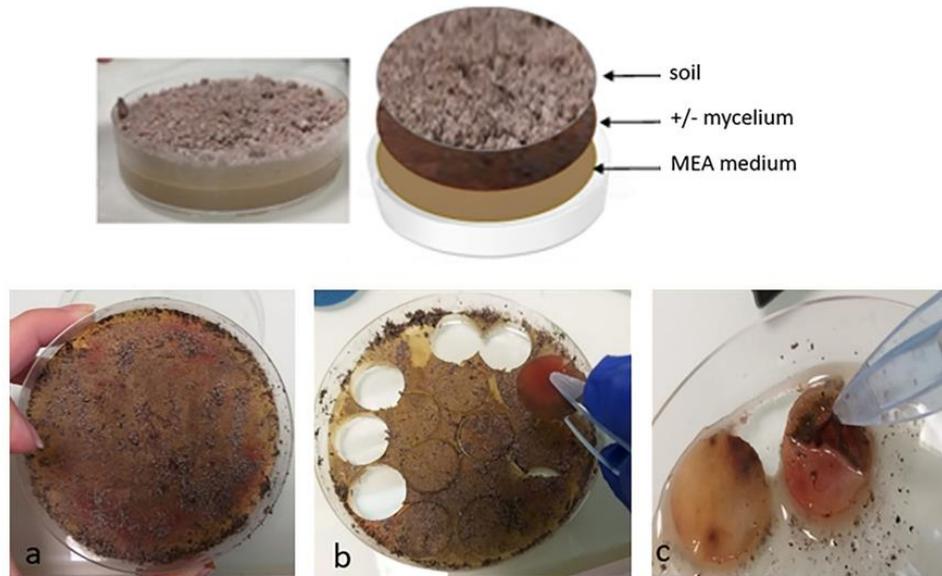
CONTACT Ilham Benjelloun  ilham.benjelloun@unicaen.fr  UNICAEN, UR ABTE, Normandie Univ, Campus 2 - Bât Sciences 2 Bd du Maréchal Juin - F 14032, 14000 Caen Cedex, France

© 2021 Taylor & Francis Group, LLC

97	into a contaminated site to stimulate the degradation capacity of native species capable of bioremediation. Bioaugmentation consists of introducing exogenous species or enriched indigenous species, which have the capacity to metabolize contaminants in the soil (Bosco and Mollea 2019).	146
98		147
99		148
100		149
101		150
102		151
103		152
104	The toxicity and mobility of metals can be influenced by fungi by production of metal-binding molecules, but also by precipitation and active transport reactions. Fungi have higher binding capacities of metals to cell walls than other microorganisms (Ahmad et al. 2011). Soil microorganisms do not have the capacity to degrade the metals, but can highly influence their speciation and bind them from the soil solution (Prakash 2017; Qayyum et al. 2020).	153
105		154
106		155
107		156
108		157
109		158
110		159
111		160
112		161
113		162
114		163
115	It is essential to understand mechanisms and interactions between the pollutant and the living organism involved in the bioremediation process. With this objective, numerous studies have been conducted in liquid media to study the metal biosorption by fungal strains (Albert, Baraud, et al. 2020; Mohammadian et al. 2017; Mohsenzadeh and Shahrokhi 2014). Biosorption tests in liquid media are simple, economic and can be done in a short time at ambient conditions (Taştan, Ertuğrul, and Dönmez 2010). Joshi et al. (2013) worked on the uptake of metals (Cd, Ni, Pb) by <i>Aspergillus awamori</i> and <i>Phanerochaete chrysosporium</i> in potato dextrose and nutrient broth. Zotti et al. (2014) worked on the copper accumulation by <i>Clonostachys rosea</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , and <i>Aspergillus alliaceus</i> in a semisolid suspension of Tween 80. However studies in liquid media did not provide enough information and did not represent realistic conditions (Kampichler, Bruckner, and Kandeler 2001).	164
116		165
117		166
118		167
119		168
120		169
121		170
122		171
123		172
124		173
125		174
126		175
127		176
128		177
129		178
130		179
131		180
132		181
133		182
134		183
135		184
136	Microcosms studies constitute a good approach to study at small scale interactions between living organisms and pollutants in soils. The microcosms produced in laboratories are models of reduced ecosystems, representing a portion of the environment. The species constituting the microcosm are maintained under controlled, representative of the natural environment. The study at the microcosm scale is affordable, does not require much place in the laboratory and has a	185
137		186
138		187
139		188
140		189
141		190
142		191
143		192
144		193
145		194
	short duration (Kampichler, Bruckner, and Kandeler 2001).	
	Soil microcosm was defined as a replicable, experimental unit containing soil measuring the response of one or more biotic species (Burrows and Edwards 2004).	
	Numerous experiments were conducted in several sizes and designs in the recent years to study the effect of microorganisms on pollutants. However, most of these toxic compounds are agriculture pollutants, like mesotrione (Crouzet et al. 2010), carbendazim (Burrows and Edwards 2002), atrazine (McGregor, Solomon, and Hanson 2008) and pentachlorophenol (Bosso et al. 2015). Some studies focused on the ability of microorganisms to degrade PAHs (Sarma, Sonowal, and Prasad 2019; Prasad 2019; Košnář et al. 2019).	
	Few published papers deal with the soil microcosms to study the effectiveness of microbes (Gremion et al. 2004) and fungi to face a metal contamination (Albert, Baraud, et al. 2020; Hassan et al. 2020).	
	This technical paper reports the new design of a soil microcosm in layers which allowed a separation of the different microcosm's compartments (soil and mycelium) at the end of the experiment (30 days incubation). An efficient separation of the mycelium from the soil is necessary to correctly determine the metals contents in each microcosm compartment, in order to evaluate the accurate biosorption of <i>Absidia cylindrospora</i> in soil.	
	<b>Materials and methods</b>	
	<b>Design of the microcosm</b>	
	<b>Synthetic soil preparation</b>	
	The microcosms are prepared with a synthetic soil artificially contaminated with metallic salts to better control the soil parameters, particularly the metal concentrations. The synthetic soil (named S <sup>-</sup> ) is prepared according to NF EN ISO 11268-2 by mixing 10% of dry mass of sphagnum peat finely ground and with no visible plant remains purchased from a local store, 69.5% of dry mass of Fontainebleau sand, 20% of bole white (VWR	

195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243

COLOR  
Online /  
B&W in  
Print



244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292

**Figure 1.** Design of the microcosm in layers (higher part) and separation of the microcosm components (lower part).

Pictures above:

Design of the final microcosm with 3 layers (from below to above: MEA medium, mycelium and soil)

Pictures below:

Figure 1a: the soil is removed from the top of the microcosm.

Figure 1b: disk samples are obtained with a cutting plug agar cork borer.

Figure 1c: the mycelium recovering each cylindrical disk is taken off by a polystyrene clamp.

international) and 0.5% of calcium carbonate (ACROS organics).

The synthetic soil is then artificially contaminated (named  $S^+$ ) with Cd, Cu and Pb by addition of concentrated solutions ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) of each element to achieve a final content of  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  of each metal.

This concentration ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) was chosen in order to obtain a contaminated soil with levels that can be considered as anomalous according to Baize (2000) and is tolerated by the fungi (Albert et al. 2018).

Stock solutions are prepared by dissolution in ultrapure water of sulfate salts for Cd and Cu ( $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  respectively) and nitrate salt for Pb ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) (Sigma Aldrich-analytical grade). The solutions are stored at  $+4^\circ\text{C}$  before use. The synthetic soil (200 g) is spiked by 10 mL of each stock solution and then mixed by hand with a spoon spatula. This mixture is the contaminated soil  $S^+$ . In the same way, 15 mL of ultra-pure water is added to 100 g of the synthetic soil to constitute a control sample (non-

contaminated soil named  $S^-$ ). The obtained soil samples are then remained at room temperature for 24 h before use.

#### Microcosm preparation

The microcosms are prepared in Petri dishes (90 mm diameter and 20 mm height). The bottom of the Petri dish is filled with 20 mL of Malt Extract Agar (MEA) medium and constitutes the lower layer of the microcosm (Figure 1). The fungal strain used for the bioaugmentation experiment was initially studied in our laboratory in a liquid media for its effectiveness in metal biosorption of Cd, Cu and Pb (Albert et al. 2018).

Three conditions are tested in the microcosms as follows:

- i. biostimulation with contaminated soil ( $S^+S$ ): the microcosm contains MEA medium and 20 g of soil added on the surface without adding the fungal strain.  $S$  refers to bioStimulation.
- ii. bioaugmentation with non-contaminated soil ( $S^-A_{ac}$ ): the fungal strain *Absidia cylindrospora*

293 is deposited in the middle of the MEA  
294 medium, incubated for 10 days at 25 °C and  
295 then 20 g of non-contaminated soil is added  
296 on the surface of the growing mycelium (final  
297 fresh weight around 800 mg).

298 iii. bioaugmentation with contaminated soil  
299 ( $S^+A_{ac}$ ) as described above.

300  
301  $A_{ac}$  refers to bioAugmentation with the fungal  
302 strain *Absidia cylindrospora*.

303 All the microcosms tested were realized in  
304 triplicates and incubated for 30 days at 25 °C.

### 305 **Separation of the microcosm layers**

306 After the 30 days of incubation, the soil is  
307 removed from the top of the microcosm with a  
308 spoon spatula (Figure 1a). A cutting plug agar  
309 cork borer (size 12) allows to obtain samples  
310 disks (Figure 1b). The disks contain the MEA  
311 medium recovered by the mycelium and some  
312 soil grains.

313 To facilitate the separation of the mycelium  
314 from the agar disks, a centrifugation with 25 mL  
315 of ultra-pure water (3 min-2000g) is performed.  
316 The mycelium recovering each cylindrical disk is  
317 taken off by a polystyrene clamp (Figure 1c). The  
318 soil and mycelium are dried during 3 days at  
319 30 °C. The water collected from the centrifugation  
320 and the agar disks are stored at -18 °C for fur-  
321 ther analyses.

### 322 **Analysis of the microcosm's components**

323 The different parts of microcosms are the soil,  
324 the MEA medium and the mycelium. The myce-  
325 lium and the soil are dried at 30 °C for 3 days,  
326 until constant mass.

327 For the determination of the total metal con-  
328 centrations in the different microcosm compo-  
329 nents, 0.2 g of each test sample (dried soil, dried  
330 mycelium and fresh MEA medium) are digested  
331 in Teflon® hermetic tank with the presence of  
332 10 mL of aqua regia (1:3 HNO<sub>3</sub> 68%; 2:3 HCl  
333 37%) using a microwave oven (Speedwave MWS-  
334 2 BERGHOF®). The digests are then filtered at  
335 0.45 μm by using a syringe filter (Millex-HA) and  
336 stored at +4 °C before metal analysis. In order to  
337 check that the centrifugation step does not leach  
338 metals from the disks, the metal concentration is  
339 also measured in the centrifugation water. The  
340 water is filtered (0.45 μm by using a syringe filter  
341 Millex-HA) and acidified (5% volume with  
342 HNO<sub>3</sub> 68%).

343  
344  
345  
346

347 Digests and centrifugation water analysis are  
348 carried out (in triplicate) using Inductively  
349 Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry  
350 ICP-OES (5100 Agilent Technologies®). The ana-  
351 lytical quality of the chemical data is validated  
352 using various standard certified materials: "TH-2  
353 (lot 0618)" from the Canadian Environment and  
354 Climate Change Canada and "Clean Loam soil  
355 (No.6-LRAB5755)" from Sigma Aldrich. The lim-  
356 its of detection (LOD) and quantification (LOQ)  
357 of the metals studied are determined by the cali-  
358 bration curve approach. LOD and LOQ are deter-  
359 mined by the formulas:  $LOD = 3 \sigma / \text{slope} (1)$  and  
360  $LOQ = 10 \sigma / \text{slope} (2)$ .  $\sigma$  is calculated as:  $\sigma = SE /$   
361  $\sqrt{n} (3)$ . SE represents the standard error and n  
362 represents the number of the standards used for  
363 the calibration curve. The limits of detection  
364 (LOD) and quantification (LOQ) of Cd, Cu and  
365 Pb are in mg.L<sup>-1</sup>. The LOD values for Cd, Cu  
366 and Pb are respectively 0.010 mg.L<sup>-1</sup>,  
367 0.004 mg.L<sup>-1</sup> and 0.011 mg.L<sup>-1</sup>. For LOQ, the  
368 values obtained for Cd, Cu and Pb are  
369 0.032 mg.L<sup>-1</sup>, 0.015 mg.L<sup>-1</sup> and 0.038 mg.L<sup>-1</sup>  
370 respectively. In order to determine the LOD and  
371 LOQ of the metals for the microcosm compo-  
372 nents (soil, MEA medium and mycelium), the  
373 mass of the test samples is taken in account to  
374 calculate LOD and LOQ in mg.kg<sup>-1</sup>.

### 375 **Bioaccumulation ability of the fungal strain**

376 Bioaccumulation ability of the strain can be eval-  
377 uated by calculating the bioaccumulation fac-  
378 tor (BAF).

379 BAF is calculated as the ratio of the metal con-  
380 centration in the organism (mycelium in our study)  
381 to the metal concentration in its environment. If  
382  $BAF > 1$ , it means that the fungi is able to accu-  
383 mulate the metal in high concentrations  
384 (Damodaran, Vidya Shetty, and Raj Mohan 2014).

$$385 \text{BAF} = \frac{\text{metal concentration in the dried biomass (mg.kg}^{-1}\text{)}}{\text{metal concentration in the soil (mg.kg}^{-1}\text{)}} \quad 386$$

387 The metal contribution in MEA medium is  
388 negligible compared to the contents in soils, the  
389  
390

391 reason why it does not appear in the  
392 BAF formula.

393 **Statistical analysis**

394 Non parametric tests (Wilcoxon, Kruskal-Wallis)  
395 were performed to compare metal concentrations.  
396 Only results at  $p < 0.05$  were considered statistic-  
397 ally significant. All statistical analyses were exe-  
398 cuted using SAS system version 9.3 (SAS Institute  
399 Inc. Cary, NC, USA).

400 **Isolation and identification of the fungal strains  
401 from microcosms**

402 Two methods are used to isolate and to identify  
403 *Absidia cylindrospora* and others fungal strains  
404 that grew on both initial soils ( $S^+$  and  $S^-$ ) and  
405 soils of the microcosms at the end of the experi-  
406 ment ( $S^+S$ ;  $S^+A_{ac}$  and  $S^-A_{ac}$ ).

407 The direct spreading (Warcup 1950) consists  
408 of spraying 2 mg of soil in a sterile Petri dish and  
409 then pouring 25 mL of MEA medium maintained  
410 in supercooling onto the soil grains. The plates  
411 are then incubated at 25 °C. After 2 days of incu-  
412 bation, the dishes are observed daily for a period  
413 of 15 days.

414 For the dilution plate method, 1 g of soil is  
415 suspended in 9 mL of sterile water containing  
416 0.05% of tween 80 (Sigma Aldrich). After  
417 15 minutes of orbital shaking (300 rpm) at room  
418 temperature, 1 mL of each suspension is sprayed  
419 in a Petri dish (80 mm diameter) and 25 mL of  
420 malt extract medium (MEA) added with chlor-  
421 amphenicol (0.05%, w/v) is poured onto the plate  
422 (Davet and Rouxel 1997). The plates are incu-  
423 bated at 25 °C. The strains are isolated, purified  
424 and identified by macro and microscopic obser-  
425 vations according to conventional mycology  
426 methods (Domsch, Gams, and Anderson 1995).

427 **Results and discussion**

428 **Biomass evaluation after the  
429 microcosm experiment**

430 The myceliums (biomass of *Absidia cylindro-*  
431 *spora*) collected from the bioaugmented micro-  
432 cosms at the end of the experiment were  
433 weighted to evaluate the biomass obtained.

440 **Table 1.** Cd, Cu and Pb contents in soils in  $mg.kg^{-1}$  (total  
441 concentration: average value  $\pm$  SD;  $n = 3$ ).

Soil	Cd ( $mg.kg^{-1}$ )	Cu ( $mg.kg^{-1}$ )	Pb ( $mg.kg^{-1}$ )
$S^-$	<LOQ	$2.0 \pm 0.4$	$3.9 \pm 0.3$
$S^+$	$41 \pm 3$	$46 \pm 6$	$49 \pm 5$
$S^+S$	$45 \pm 11$	$51 \pm 11$	$53 \pm 14$
$S^+A_{ac}$	$48 \pm 8$	$53 \pm 8$	$58 \pm 12$
$S^-A_{ac}$	<LOQ	$2.5 \pm 0.4$	$5 \pm 1$

442  $S^-$ : initial contaminated soil;  $S^+$ : initial non-contaminated soil;  $S^+S$ : biosti-  
443 mulation (contaminated soil without *Absidia cylindrospora*),  $S^+A_{ac}$ : bio-  
444 augmentation (contaminated soil with *Absidia cylindrospora*),  $S^-A_{ac}$ :  
445 bioaugmentation (non-contaminated soil with *Absidia cylindrospora*).  
446 LOD (Cd)<sub>soil</sub> = 2.4  $mg.kg^{-1}$ ; LOQ (Cd)<sub>soil</sub> = 8.0  $mg.kg^{-1}$ ;  
447 LOD (Cu)<sub>soil</sub> = 1.1  $mg.kg^{-1}$ ; LOQ (Cu)<sub>soil</sub> = 3.7  $mg.kg^{-1}$ ;  
448 LOD (Pb)<sub>soil</sub> = 2.9  $mg.kg^{-1}$ ; LOQ (Pb)<sub>soil</sub> = 9.5  $mg.kg^{-1}$ .

449 The dry weight of the mycelium collected from  
450 the contaminated and the non-contaminated  
451 microcosms are respectively  $54 \pm 14$  mg and  
452  $103 \pm 62$  mg. It means that even if the mycelium  
453 were in contact with metals (metal polluted soil),  
454 it was viable and could grow until the end of  
455 the experiment.

456 **Metal content in microcosm compartments**

457 Table 1 reports the total concentration of Cd, Cu  
458 and Pb in the initial soils ( $S^+$  and  $S^-$ ) and the  
459 soils from the microcosms after the 30 days incu-  
460 bation ( $S^+S$ ;  $S^-A_{ac}$  and  $S^+A_{ac}$ ).

461 The control soil  $S^-$  contains  $2.3 \pm 0.4$   $mg.kg^{-1}$   
462 of Cu,  $3.9 \pm 0.3$   $mg.kg^{-1}$  of Pb and the cadmium's  
463 concentration is inferior to the LOD value  
464 ( $2.4$   $mg.kg^{-1}$ ) ( $Cd < Cu < Pb$ ). The spiked soil  $S^+$   
465 contains  $41 \pm 3$   $mg.kg^{-1}$  of Cd,  $46 \pm 6$   $mg.kg^{-1}$  of  
466 Cu and  $49 \pm 5$   $mg.kg^{-1}$  of Pb. The values obtained  
467 for the three metals are approximately about  
468  $50$   $mg.kg^{-1}$ , but they are not equal  
469 ( $Cd < Cu < Pb$ ) because the control soil contains  
470 initially Cu and Pb. The values are also less than  
471 the set concentration  $50$   $mg.kg^{-1}$  for Cd and Cu.

472 After the 30 days of incubation, the metals  
473 concentrations in the non-contaminated soil  
474  $S^-A_{ac}$  are  $2.5 \pm 0.4$   $mg.kg^{-1}$  for Cu,  
475  $4.6 \pm 1.1$   $mg.kg^{-1}$  for Pb and the cadmium's con-  
476 centration is inferior to the LOD value  
477 ( $2.4$   $mg.kg^{-1}$ ). The bioaugmentation assay  
478 (30 days) with the non-contaminated soil does  
479 not affect the metal concentrations ( $p = 0.25$ ).  
480 Indeed, the variation of the metal content  
481 between the initial soil ( $S^-$ ) and the microcosm  
482 soil  $S^-A_{ac}$  is not important, maybe due to the low  
483 levels of metals initially present in  $S^-$ .

489 For the microcosms with contaminated soil,  
 490 the total concentration of Cd, Cu and Pb are  
 491 respectively  $45 \pm 11 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,  $51 \pm 11 \text{ mg.kg}^{-1}$  and  
 492  $53 \pm 14 \text{ mg.kg}^{-1}$  for the biostimulated soil ( $S^+S$ ),  
 493 and  $48 \pm 8 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,  $53 \pm 8 \text{ mg.kg}^{-1}$  and  
 494  $58 \pm 12 \text{ mg.kg}^{-1}$  for the bioaugmented soil  
 495 ( $S^+A_{ac}$ ). The concentrations are not significa-  
 496 tively different for both biostimulation  
 497 ( $p=0.1936$ ) and bioaugmentation treatments  
 498 ( $p=0.2085$ ). In addition, we found almost the  
 499 same concentrations for the initial contaminated  
 500 soil  $S^+$  ( $p=0.25$ ). The total concentration vari-  
 501 ation in the soils at 30 days is low.

502 The non-treated MEA medium was analyzed,  
 503 and the concentrations of the metals are inferior  
 504 to the LOD. The MEA medium from the non-  
 505 contaminated microcosm also does not contain  
 506 metals (the concentrations of the metals are  
 507 inferior to the LOD). However, metals (Cd and  
 508 Cu) are found in the MEA medium from the  
 509 contaminated microcosms (the biostimulated  $S^+S$   
 510 and the bioaugmented  $S^+A_{ac}$  microcosm). Cd is  
 511 the metal with the highest concentration in MEA  
 512 medium, with  $2.9 \pm 0.1 \text{ mg.kg}^{-1}$  and  
 513  $2.5 \pm 0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$  respectively for  $S^+S$  and  $S^+A_{ac}$ .  
 514 Cu concentrations are lower, with values of  
 515  $1.0 \pm 0.1 \text{ mg.kg}^{-1}$  for  $S^+S$  and  $0.8 \pm 0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$   
 516 for  $S^+A_{ac}$  and Pb is not detected in any of the  
 517 microcosms. This metal enrichment of the MEA  
 518 medium can only result from the contact with  
 519 the contaminated soil, because the MEA medium  
 520 from the non-contaminated microcosm does not  
 521 contain metals. It means that a little transfer of  
 522 metals occurred from the soil to the  
 523 MEA medium.

524 Concerning metal contents in the mycelium,  
 525 only  $8 \text{ mg.kg}^{-1}$  of Cu was detected in a mycelium  
 526 of *Absidia cylindrospora* grown only on MEA  
 527 medium (without soil).

528 In the myceliums of the contaminated micro-  
 529 cosms, approximately same levels ( $119$ -  
 530  $171 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) of Cd, Cu and Pb were biosorbed  
 531 by the mycelium of *Absidia cylindrospora*  
 532 ( $p=0.1767$ ). However, Cu appeared to be the  
 533 most accumulated metal with  $171 \pm 39 \text{ mg.kg}^{-1}$   
 534 found in the mycelium of  $S^+A_{ac}$ , followed by Cd  
 535 with  $146 \pm 27 \text{ mg.kg}^{-1}$ , Pb is the less concentrated  
 536 metal in the mycelium with  $119 \pm 22 \text{ mg.kg}^{-1}$   
 537 while it was the most concentrated one in the

538 soil (Table 1). The metal contents represent the  
 539 average value for the three contaminated bioaug-  
 540 mented microcosms.

541 Comparing the two bioaugmentation experi-  
 542 ments ( $S^+A_{ac}$  and  $S^+A_{ac}$ ), we note that the con-  
 543 centrations of Cu and Pb are 24 and 15 times  
 544 higher in the mycelium grown on the contami-  
 545 nated soil. However, if we calculate the percent-  
 546 age of metals accumulated in the mycelium, it  
 547 only represents 1% of the metal total content in  
 548 the microcosm. That is why, the total metal con-  
 549 centrations in the soils remain similar.

550 Table 2 presents the metal content in all  
 551 microcosm compartments in mg. Globally, the  
 552 results show that after 30 days of experiment the  
 553 levels of metals are different between the com-  
 554 partments after biostimulation treatment  
 555 ( $p=0.0045$ ,  $p=0.0045$ ,  $p=0.0335$ , respectively  
 556 for Cd, Cu and Pb) and after bioaugmentation  
 557 treatment ( $p=0.0021$ ,  $p=0.0020$ ,  $p=0.0090$ ,  
 558 respectively for Cd, Cu and Pb).

559 The main part of the metal remains in the soil  
 560 part (97-99%), whereas a small fraction (approx-  
 561 imately 1%) of Cu and Cd is transferred in the  
 562 medium and absorbed by the mycelium.  
 563 Moreover, the metal content in the centrifugation  
 564 water is very low (under the limit of detection  
 565 for Pb, and negligible amounts for Cd and Cu in  
 566 order of  $10^{-4} \text{ mg}$  of metal). It means that the  
 567 centrifugation step used to clean up the agar  
 568 disks does not cause the leaching of metals from  
 569 the soil.

570 Albert et al. (2018) evaluated the biosorption  
 571 of Cd, Cu and Pb by *Absidia cylindrospora* in  
 572 MEA liquid medium. Their results showed that  
 573 the mycelium biosorbed  $13.10^3 \text{ mg.kg}^{-1}$  of Pb,  
 574  $7.10^3 \text{ mg.kg}^{-1}$  of Cd and  $2.10^3 \text{ mg.kg}^{-1}$  of Cu  
 575 within 3 days of exposure at  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  of each  
 576 metal. Pb was the most concentrated metal inside  
 577 the mycelium, whereas in our study, Pb was the  
 578 least accumulated in the mycelium. Also, the con-  
 579 centrations accumulated were higher in liquid  
 580 medium than in soil microcosm. Nevertheless,  
 581 the liquid conditions do not allow to study the  
 582 whole ecosystem and to simulate the field condi-  
 583 tions. The same authors (Albert, Baraud, et al.  
 584 2020) tested a microcosm with *Absidia cylindro-*  
 585 *spora* but could not isolate the mycelium at the  
 586 end of the experiment.

587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635

**Table 2.** Metal content (in mg) of each microcosm compartment.

metal (mg)		soil	MEA medium	mycelium	centrifugation water
Cd	S <sup>+</sup> S	0.9 ± 0.2	0.033 ± 0.004	–	4.10 <sup>-3</sup> ± 3.10 <sup>-4</sup>
	S <sup>+</sup> A <sub>ac</sub>	1.0 ± 0.2	0.037 ± 0.008	0.008 ± 0.001	9.10 <sup>-4</sup> ± 4.10 <sup>-4</sup>
	S <sup>-</sup> A <sub>ac</sub>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Cu	S <sup>+</sup> S	1.0 ± 0.2	0.012 ± 0.003	–	0.001 ± 0
	S <sup>+</sup> A <sub>ac</sub>	1.1 ± 0.2	0.012 ± 0.007	0.006 ± 0.001	3.10 <sup>-4</sup> ± 5.10 <sup>-5</sup>
	S <sup>-</sup> A <sub>ac</sub>	<LOD	<LOD	0.001 ± 0.001	<LOD
Pb	S <sup>+</sup> S	1.1 ± 0.3	<LOD	–	<LOD
	S <sup>+</sup> A <sub>ac</sub>	1.2 ± 0.3	<LOD	0.0062 ± 0.0009	<LOD
	S <sup>-</sup> A <sub>ac</sub>	0.09 ± 0.02	<LOD	0.0012 ± 0.0008	<LOD

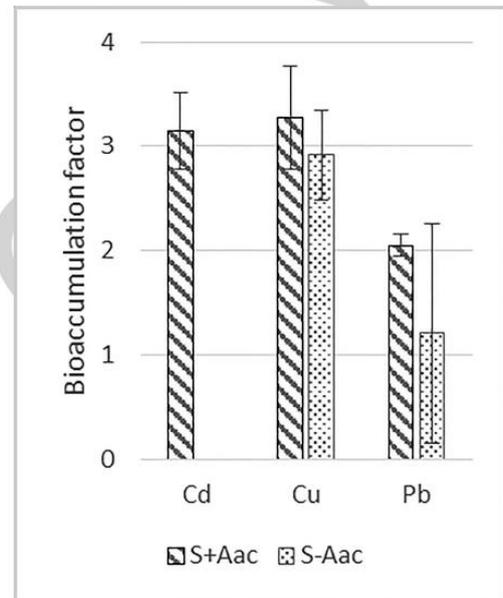
S<sup>+</sup>S: biostimulation (contaminated soil without *Absidia cylindrospora*), S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>: bioaugmentation (contaminated soil with *Absidia cylindrospora*), S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub>: bioaugmentation (non-contaminated soil with *Absidia cylindrospora*), (-): mycelium non present.

LOD (Cd)<sub>mycelium</sub> = 9.0 mg.kg<sup>-1</sup>; LOD (Cd)<sub>MEA medium</sub> = 1.4 mg.kg<sup>-1</sup>  
LOD (Cu)<sub>mycelium</sub> = 2.2 mg.kg<sup>-1</sup>; LOD (Cu)<sub>MEA medium</sub> = 0.6 mg.kg<sup>-1</sup>  
LOD (Pb)<sub>mycelium</sub> = 10.7 mg.kg<sup>-1</sup>; LOD (Pb)<sub>MEA medium</sub> = 1.6 mg.kg<sup>-1</sup>

In another study, Damodaran, Vidya Shetty, and Raj Mohan (2014) studied the ability of the mushroom *Galerina vittiformis* to uptake Cd, Cu, Cr, Pb and Zn from an artificially contaminated soil with 50 mg.kg<sup>-1</sup> of each metal. The strain accumulated in the mycelium 390 mg.kg<sup>-1</sup> of Cd, 240 mg.kg<sup>-1</sup> of Cu, 58 mg.kg<sup>-1</sup> of Cr, 690 mg.kg<sup>-1</sup> of Pb and 380 mg.kg<sup>-1</sup> of Zn after 25 days of incubation. With the same metal's concentrations initially in the soil and with roughly the same incubation period, this strain biosorbed approximately 8 times more Cd, Cu and Pb than *Absidia cylindrospora*. These results make us think that more biomass of *Absidia cylindrospora* should be added to the microcosm to increase the fungal strain biosorption potential.

Figure 2 represents the bioaccumulation factors (BAF) of the three studied metals Cd, Cu and Pb. It shows that all BAF are higher than 1, suggesting that the mycelium accumulates these metals. It also shows that copper is the metal with the highest BAF in both microcosms S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub> and S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub>, followed by Cd and Pb. Also, the BAF of the metals from S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub> are higher than those calculated for S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub>. It confirms that Cu is the most accumulated metal in the mycelium of *Absidia cylindrospora* (Cu is found in the mycelium of S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub> with 171 mg.kg<sup>-1</sup>, followed by Cd with 146 mg.kg<sup>-1</sup>, then by Pb with 119 mg.kg<sup>-1</sup>), also the more the soil is concentrated in metals, the more the mycelium accumulates metals. It suggests that the biosorption of metals by *Absidia cylindrospora* is related to the metal concentration in soil, in the conditions tested.

The microcosm developed in our study allowed a better estimation of BAF because its design



**Figure 2.** Bioaccumulation factors (BAF) of metals in the bioaugmentation assays.

Bioaccumulation factors (BAF) calculated for the 3 metals (Cd, Cu, Pb) for the bioaugmented microcosms (S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>; S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub>). S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>: bioaugmentation (contaminated soil with *Absidia cylindrospora*); bars with dashes  
S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub>: bioaugmentation (non-contaminated soil with *Absidia cylindrospora*); bars with dots;

enabled the specific separation of the mycelium from soil and solid medium which allowed the accurate evaluation of fungal biosorption.

**Isolation of fungal strains from soil microcosms**

Several fungal strains were found in both contaminated (S<sup>+</sup>) and non-contaminated (S<sup>-</sup>) initial soils: *Trichoderma viride*, *Umbelopsis* sp., and *Phialophora* sp. (Table 3). Moreover, the fungal

636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684

685 **Table 3.** Fungal strains identified in soils.

		<i>Absidia cylindrospora</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Umbelopsis</i> sp.	<i>Phialophora</i> sp.	<i>Gliocladium viride</i>
Initial soils	S <sup>-</sup>	-	×	×	×	-
	S <sup>+</sup>	-	×	×	-	-
Bioaugmented soils at day 30	S <sup>+</sup> S	-	×	×	-	×
Bioaugmented soils at day 30	S <sup>+</sup> A <sub>ac</sub>	×	×	-	-	-
	S <sup>-</sup> A <sub>ac</sub>	×	×	-	-	-

690 (x): identified ; (-) : non-identified

691 S<sup>+</sup>: initial contaminated soil; S<sup>-</sup>: initial non contaminated soil; S<sup>+</sup>S: biostimulation, S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub>: bioaugmentation (contaminated soil with *Absidia cylindrospora*,692 S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub>: bioaugmentation (non-contaminated soil with *Absidia cylindrospora*).693 strain *Absidia cylindrospora* was not present in  
694 these initial soils.695 *Trichoderma* species are commonly occurring in  
696 all types of soils and have been previously studied for  
697 their bioaccumulation capacities of pollutants,  
698 including metallic and organic pollutants. Joshi et al.  
699 (2011) studied the tolerance of *Trichoderma viride*  
700 for Pb and Cd and showed in solid medium a high  
701 level in Cd uptake. Sahu et al. (2012) studied the effi-  
702 ciency of the same strain to accumulate Cd and Pb  
703 from a medium containing Cd and Pb at different  
704 levels (from 5 to 200 ppm), the mycelium could accu-  
705 mulate 52% of Cd and 84% of Pb with a concentra-  
706 tion of 200 ppm of each metal. Anand et al. (2006)  
707 showed that *Trichoderma viride* could grow to 100%  
708 in a medium with 3000 mg.L<sup>-1</sup> of Cu compared to  
709 the control. It was also able to remove 80% of Cu at  
710 the concentration of 100 mg.L<sup>-1</sup> of Cu in a liquid  
711 media in flasks.712 *Umbelopsis* sp. and *Phialophora* sp. are also  
713 known as soil fungi (Mahoney et al. 2004; Yip 1986).  
714 A species of *Umbelopsis* called *Umbelopsis isabellina*  
715 has shown efficient removal of heavy metals and  
716 xenobiotics from aqueous solution (Janicki,  
717 Długoński, and Krupiński 2018). *Phialophora* species  
718 are well known to be tolerant to copper (Daniel and  
719 Nilsson 1988; Karunasekera et al. 2019).720 In the biostimulated soil S<sup>+</sup>S, we also observed  
721 *Gliocladium viride* which can suggest that this  
722 strain, commonly isolated from soil and decom-  
723 posing plants (Pereira et al. 2009), has been pro-  
724 moted by biostimulation treatment.725 In the bioaugmented soils (S<sup>+</sup>A<sub>ac</sub> and S<sup>-</sup>A<sub>ac</sub>)  
726 *Absidia cylindrospora* has been isolated which  
727 means that *Absidia cylindrospora* is always viable  
728 after the 30 days of incubation.730 **Conclusions**731 The microcosm used in this study enabled an  
732 effective separation of the different components  
733734 (soil, medium, and mycelium) and the analysis of  
735 the metals actually accumulated in the mycelium  
736 of *Absidia cylindrospora* without overestimating  
737 the metal concentrations with the presence of soil  
738 adsorbed onto the mycelium. This fungal strain  
739 used for the bioaugmentation assay was able to  
740 biosorb and concentrate metals from the syn-  
741 thetic contaminated soil (171 mg.kg<sup>-1</sup> of Cu,  
742 146 mg.kg<sup>-1</sup> of Cd and 119 mg.kg<sup>-1</sup> of Pb in the  
743 mycelium) within 30 days of experiment.744 **Acknowledgments**745 The authors would like to thank the French Ministry of  
746 Higher Education and Scientific Research for the finan-  
747 cial support.748 **Disclosure statement**749 No potential conflict of interest was reported by  
750 the authors.751 **Author's statement**752 We confirm that this work is original and has not been  
753 published elsewhere, nor is it currently under consideration  
754 for publication elsewhere.755 **ORCID**756 David Garon  <http://orcid.org/0000-0003-3545-6641>757 **References**

- 758 Ahmad, I., M. Imran, M. I. Ansari, A. Malik, and J. Pichtel.
- 
- 759 2011. Metal tolerance and biosorption potential of soil
- 
- 760 fungi: applications for a green and clean water treatment
- 
- 761 technology. In
- Microbes and microbial technology*
- , ed. I.
- 
- 762 Ahmad, F. Ahmad, and J. Pichtel, 321–61. New York,
- 
- 763 NY: Springer New York.
- 
- 764 Albert, Q., F. Baraud, L. Leleyter, M. Lemoine, N. Heutte,
- 
- 765 J.-P. Rioult, L. Sage, and D. Garon. 2020. Use of soil
- 
- 766 fungi in the biosorption of three trace metals (Cd, Cu,
- 
- 767 Pb): promising candidates for treatment technology?
- 
- 768

- 783 *Environmental Technology* 41 (24):3166–12. doi: 10.1080/  
784 09593330.2019.1602170.
- 785 Albert, Q., L. Leleyter, M. Lemoine, N. Heutte, J.-P. Rioult,  
786 L. Sage, F. Baraud, and D. Garon. 2018. Comparison of  
787 tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu,  
788 Pb) by the soil fungus *Absidia cylindrospora*.  
*Chemosphere* 196:386–92.
- 789 Albert, Q., L. Leleyter, M. Lemoine, N. Heutte, L. Sage, D.  
790 Garon, and F. Baraud. 2020. Industrial Cd-contaminated  
791 soil bioaugmented with *Absidia cylindrospora*: Influence  
792 on the mineralogical speciation of cadmium. *Geomicrobiology Journal* 0 (0):1–11.
- 793 Ali, A., D. Guo, A. Mahar, P. Wang, F. Shen, R. Li, and Z.  
794 Zhang. 2017. Mycoremediation of potentially toxic trace  
795 elements—a biological tool for soil cleanup: A review.  
796 *Pedosphere* 27 (2):205–22. doi: 10.1016/S1002-  
797 0160(17)60311-4.
- 798 Anand, P., J. Isar, S. Saran, and R. K. Saxena. 2006.  
799 Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*.  
800 *Bioresource Technology* 97 (8):1018–25.
- 801 Baize, D. 2000. Teneurs totales en « métaux lourds » dans  
802 les sols français : résultats généraux du programme  
803 ASPITET. *Courrier de L'Environnement de L'Inra* 39  
804 (février).
- 805 Q1 Bosco, F., and C. Mollea. 2019. Mycoremediation in Soil.  
806 *Environmental Chemistry and Recent Pollution Control*  
807 *Approaches*.
- 808 Q2 Bosso, L., R. Scelza, A. Testa, G. Cristinzio, and M. A. Rao.  
809 2015. Depletion of pentachlorophenol contamination in  
810 an agricultural soil treated with *Byssoschlamys nivea*,  
811 *Scopulariopsis brumptii* and urban waste compost: A  
812 laboratory microcosm study. *Water, Air, & Soil Pollution*  
813 226 (6):183. doi: 10.1007/s11270-015-2436-0.
- 814 Burrows, L. A., and C. A. Edwards. 2002. The use of inte-  
815 grated soil microcosms to predict effects of pesticides on  
816 soil ecosystems. *European Journal of Soil Biology* 38 (3-4):  
817 245–9. doi: 10.1016/S1164-5563(02)01153-6.
- 818 Burrows, L. A., and C. A. Edwards. 2004. The use of inte-  
819 grated soil microcosms to assess the impact of carbenda-  
820 zim on soil ecosystems. *Ecotoxicology (London, England)*  
821 13 (1-2):143–61.
- 822 Castro, C., M. S. Urbieto, J. Plaza Cazón, and E. R. Donati.  
823 2019. Metal biorecovery and bioremediation: Whether or  
824 not thermophilic are better than mesophilic microorgan-  
825 isms. *Bioresource Technology* 279:317–26. doi: 10.1016/j.  
826 biortech.2019.02.028.
- 827 Crouzet, O., I. Batisson, P. Besse-Hoggan, F. Bonnemoy, C.  
828 Bardot, F. Poly, J. Bohatier, and C. Mallet. 2010.  
829 Response of soil microbial communities to the herbicide  
830 mesotrione: A dose-effect microcosm approach. *Soil*  
831 *Biology and Biochemistry* 42 (2):193–202. doi: 10.1016/j.  
832 soilbio.2009.10.016.
- 833 Damodaran, D., K. Vidya Shetty, and B. Raj Mohan. 2014.  
834 Uptake of certain heavy metals from contaminated soil  
835 by mushroom—*Galerina vittiformis*. *Ecotoxicology and*  
836 *Environmental Safety* 104:414–22.
- 837 Daniel, G. F., and T. Nilsson. 1988. Studies on preservative  
838 tolerant *Phialophora* species. *International*  
839 *Biodeterioration* 24 (4-5):327–35. doi: 10.1016/0265-  
840 3036(88)90018-8.
- 841 Davet, P., and F. Rouxel. 1997. *Détection et isolement des*  
842 *champignons du sol*. Paris: Institut national de la  
843 recherche agronomique, 208.
- 844 Domsch, K. H., W. Gams, and T.-H. Anderson. 1995. 838  
839 *Compendium of soil fungi*. Eching: Lubrecht & Cramer  
840 Ltd, 860.
- 841 Gremion, F., A. Chatzinotas, K. Kaufmann, W. Von Sigler,  
842 and H. Harms. 2004. Impacts of heavy metal contamin-  
843 ation and phytoremediation on a microbial community  
844 during a twelve-month microcosm experiment. *FEMS*  
845 *Microbiology Ecology* 48 (2):273–83.
- 846 Hambra, Y., and M. Tamiru. 2016. Mycoremediation of  
847 heavy metals and hydrocarbons contaminated environ-  
848 ment. *Asian Journal of Natural & Applied Sciences* 58  
849 (avril):48–58.
- 850 Hassan, A., A. Pariatamby, I. C. Ossai, and F. S. Hamid.  
851 2020. Bioaugmentation assisted mycoremediation of  
852 heavy metal and/metalloid landfill contaminated soil  
853 using consortia of filamentous fungi. *Biochemical*  
854 *Engineering Journal* 157:107550. doi: 10.1016/j.bej.2020.  
855 107550.
- 856 Janicki, T., J. Długoński, and M. Krupiński. 2018. 854  
855 Detoxification and simultaneous removal of phenolic  
856 xenobiotics and heavy metals with endocrine-disrupting  
857 activity by the non-ligninolytic fungus *Umbelopsis isabel-  
858 lina*. *Journal of Hazardous Materials* 360:661–9.
- 859 Joshi, P. K., A. Swarup, S. Maheshwari, R. Kumar, and N.  
860 Singh. 2011. Bioremediation of heavy metals in liquid  
861 media through fungi isolated from contaminated sources.  
862 *Indian Journal of Microbiology* 51 (4):482–7.
- 863 Joshi, P. K., Kumar, R. Rajput, and V. Kirti. 2013. Removal  
864 of heavy metals - lead, cadmium and nickel by fungi and  
865 bacteria from liquid medium. *Journal of Soil Salinity and*  
866 *Water Quality* 5:60–4.
- 867 Kampichler, C., A. Bruckner, and E. Kandeler. 2001. Use of  
868 enclosed model ecosystems in soil ecology: A bias  
869 towards laboratory research. *Soil Biology and*  
870 *Biochemistry* 33 (3):269–75. doi: 10.1016/S0038-  
871 0717(00)00140-1.
- 872 Karunasekera, H., J. Pettersson, J. Mi, J. Bergquist, and G.  
873 Daniel. 2019. Copper tolerance of the soft-rot fungus  
874 *Phialophora malorum* grown in-vitro revealed by micros-  
875 copy and global protein expression. *International*  
876 *Biodeterioration & Biodegradation* 137:147–52. doi: 10.  
877 1016/j.ibiod.2018.12.001.
- 878 Košnář, Z., T. Částková, L. Wiesnerová, L. Praus, I.  
879 Jablonský, M. Koudela, and P. Tlustoš. 2019. Comparing  
880 the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil  
881 after different bioremediation approaches in relation to  
882 the extracellular enzyme activities. *Journal of*  
883 *Environmental Sciences* 76:249–58. doi: 10.1016/j.jes.2018.  
884 05.007.

881	Leung, M. 2004. Bioremediation: Techniques for cleaning up a mess. <i>Journal of Biotechnology</i> 2:18–22.	930
882		931
883	Mahoney, D., W. Gams, W. Meyer, and M. Starink-Willemsse. 2004. <i>Umbelopsis dimorpha</i> sp. nov., a link between <i>U. vinacea</i> and <i>U. versiformis</i> . <i>Mycological Research</i> 108 (Pt 1):107–11.	932
884		933
885		934
886	McGregor, E. B., K. R. Solomon, and M. L. Hanson. 2008. Effects of planting system design on the toxicological sensitivity of <i>Myriophyllum spicatum</i> and <i>Elodea canadensis</i> to atrazine. <i>Chemosphere</i> 73 (3):249–60.	935
887		936
888		937
889	Mohammadian, E., A. Babai Ahari, M. Arzanlou, S. Oustan, and S. H. Khazaei. 2017. Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. <i>Chemosphere</i> 185: 290–6.	938
890		939
891		940
892		941
893		942
894	Mohsenzadeh, F., and F. Shahrokhi. 2014. Biological removing of Cadmium from contaminated media by fungal biomass of <i>Trichoderma</i> species. <i>Journal of Environmental Health Science &amp; Engineering</i> 12:102. doi: 10.1186/2052-336X-12-102.	943
895		944
896		945
897		946
898	Pereira, E., S. da, M. I. Sarquis, M. de, R. L. Ferreira-Keppler, N. Hamada, and Y. B. Alencar. 2009. Filamentous fungi associated with mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in municipalities of the Brazilian Amazon. <i>Neotropical Entomology</i> 38 (3):352–9.	947
899		948
900		949
901		950
902	Prakash, V. 2017. Mycoremediation of environmental pollutants. <i>International Journal of ChemTech Research</i> 10 (3): 149–55.	951
903		952
904		953
905	Qayyum, S., I. Khan, K. Meng, Y. Zhao, and C. Peng. 2020. A review on remediation technologies for heavy metals contaminated soil. <i>Central Asian Journal of Environmental Science and Technology Innovation</i> 1 (1): 21–9.	954
906		955
907		956
908		957
909		958
910		959
911		960
912		961
913		962
914		963
915		964
916		965
917		966
918		967
919		968
920		969
921		970
922		971
923		972
924		973
925		974
926		975
927		976
928		977
929		978

## Annexe 9. Poids frais et poids secs des mycéliums d'*Absidia cylindrospora* issus des essais de bioaugmentation aux temps d'incubation

Le tableau 47 présente les poids frais et secs obtenus à l'issue des essais de bioaugmentation aux temps d'incubation 15 jours, 1 mois, 2 mois et 3 mois.

Tableau 47. Poids frais et poids secs des mycéliums d'*Absidia cylindrospora* issus des essais de bioaugmentation aux temps d'incubation.

mycélium	poids frais (g)	poids sec (g)
A1 T 15j	0,782	0,094
A2 T 15j	1,317	0,171
A3 T 15j	1,251	0,149
<b>A T 15j</b>	<b>1,1 ± 0,3</b>	<b>0,14 ± 0,04</b>
A1 T1mois	1,411	0,133
A2 T1mois	1,617	0,165
A3 T1mois	1,181	0,138
<b>A T1mois</b>	<b>1,4 ± 0,2</b>	<b>0,15 ± 0,02</b>
A1 T2 mois	1,461	0,131
A2 T2 mois	0,886	0,089
A3 T2 mois	1,176	0,123
<b>A T2 mois</b>	<b>1,2 ± 0,3</b>	<b>0,11 ± 0,02</b>
A1 T3 mois	0,8	0,0497
A2 T3 mois	0,712	0,0617
A3 T3 mois	0,926	0,093
<b>A T3 mois</b>	<b>0,8 ± 0,1</b>	<b>0,07 ± 0,02</b>

## Annexe 10. Teneurs en métaux dans les mycéliums d'*Absidia cylindrospora* issus des essais de bioaugmentation aux temps d'incubation

Le **tableau 48** montre les teneurs en métaux (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn) dans les mycéliums issus des essais de bioaugmentation aux temps d'incubation (15 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois).

*Tableau 48. Teneurs en Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn dans les mycéliums des essais de bioaugmentation aux temps d'incubation (15j, 1 mois, 2 mois, 3 mois).*

Élément en mg.kg <sup>-1</sup>	<b>Cd</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>	<b>Cu</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>
Mycélium T 15 jours	5,8±0,4	5,7±0,4	24 ±2	152±7	18±1	551±8	668±9
Mycélium T 1 mois	8,8±0,3	7,3±0,1	21,7 ±0,3	213±6	23±1	519±20	758±25
Mycélium T 2 mois	14 ± 1	10 ±1	25±2	324±28	34±2	656±11	1181±128
Mycélium T 3 mois	20 ±1	12 ±3	25 ±1	449±42	49±11	695±39	1598±261

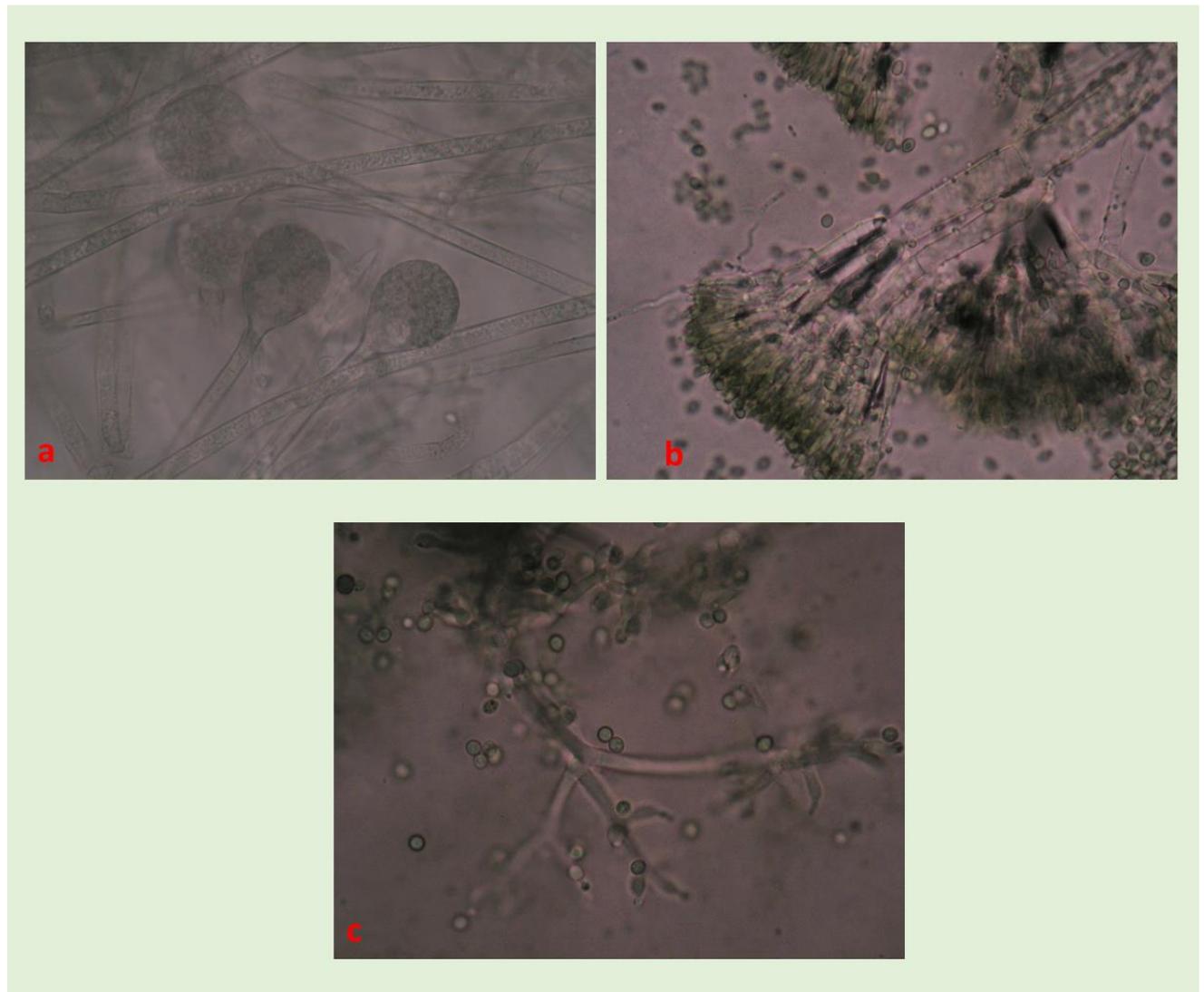
Le **tableau 49** montre les facteurs de bioaccumulation des métaux (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn) dans les microcosmes bioaugmentés aux temps d'incubation (15j, 1 mois, 2 mois, 3 mois).

*Tableau 49. Facteurs de bioaccumulation des sols des microcosmes bioaugmentés à 15 jours, 1 mois, 2 mois et 3 mois.*

<b>BAF</b>	<b>A T15 jours</b>	<b>A T1 mois</b>	<b>A T2 mois</b>	<b>A T3mois</b>
<b>Cd</b>	0,7	1,3	2,0	2,5
<b>Cr</b>	0,9	0,9	0,9	1,0
<b>Co</b>	0,7	0,9	1,1	1,3
<b>Cu</b>	1,1	1,7	2,3	3,4
<b>Ni</b>	0,9	1,2	1,6	2,3
<b>Pb</b>	0,9	0,7	1,1	1,1
<b>Zn</b>	0,9	1,0	1,5	2,1

## Annexe 11. Photographies microscopie d'isolats fongiques isolés à partir des méthodes par incorporation directe et méthode suspensions- dilutions.

La figure 62 montre les photographies prises en microscopie en grossissement de souches fongiques fréquemment isolées à partir des sols de l'étude. La figure 66-a montre la souche fongique *Absidia cylindrospora* employée en bioaugmentation. Les souches *Gliocladium viride* et *Trichoderma viride* sont présentées sur la figure 62-b et 62-c respectivement.



a) *Absidia cylindrospora* x1000 ; b) *Gliocladium viride* x1000 ; c) *Trichoderma viride* x1000 (source ToxEMAC)

Figure 62. Photographies en microscopie d'isolats fongiques purifiés à partir des méthodes par incorporation directe et méthode suspensions- dilutions.

**Annexe 12. Poster présenté le 5 Juillet 2019 à la Journée de l'Ecole Doctorale  
Normande de Chimie**

**Impact des sécrétions des champignons sur la disponibilité environnementale des  
métaux**

**Ilham BENJELLOUN**, Lydia LELEYTER, Quentin ALBERT, David GARON,  
Fabienne BARAUD

*UNICAEN, ABTE, IUT de Caen, Campus 2, Boulevard Maréchal Juin, 14032  
Caen, France*

## Impact des sécrétions des champignons sur la disponibilité environnementale des métaux

Ilham BENJELLOUN, Lydia LELEYTER, Quentin ALBERT, David GARON, Fabienne BARAUD  
UNICAEN, ABTE, IUT de Caen, Campus 2, Boulevard Maréchal Juin, 14032 Caen, France

### INTRODUCTION

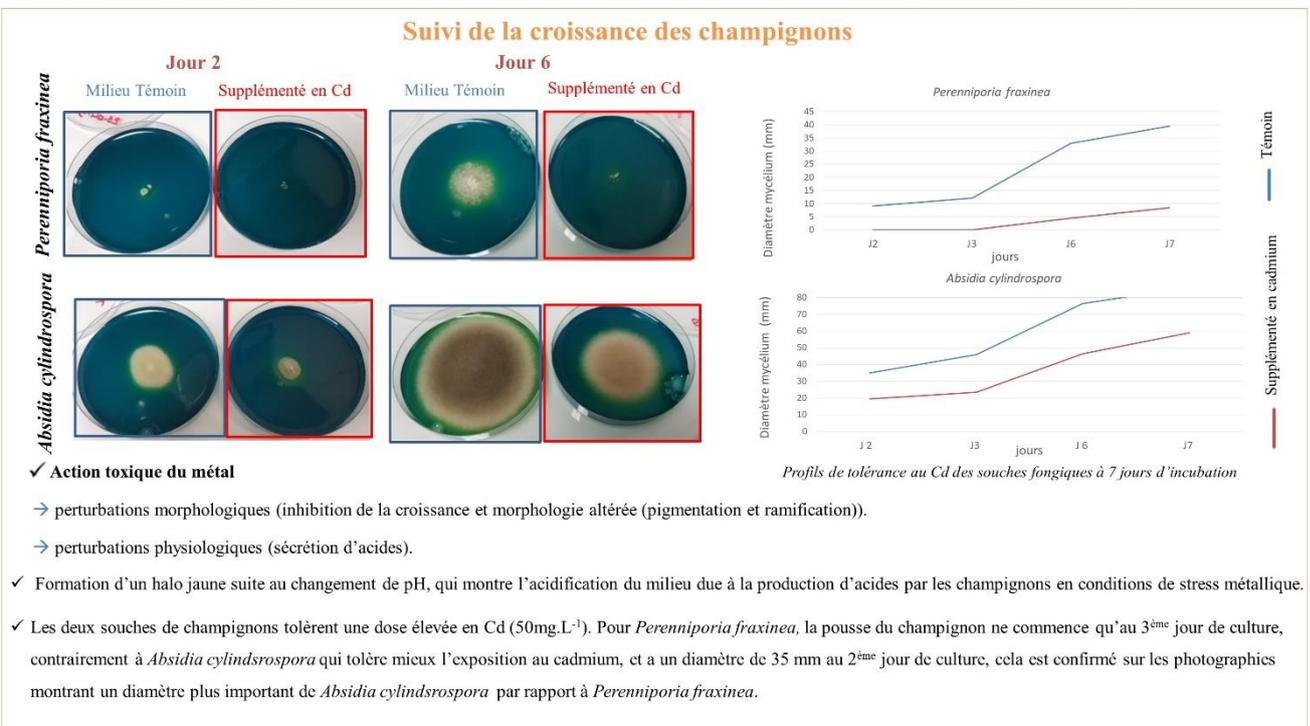
La mycoremédiation est une technique de bioremédiation basée sur l'usage des champignons afin de décontaminer un site (Ali et al, 2017). Une partie du champignon appelée mycélium a le pouvoir de sécréter des exsudats, comme des enzymes et des acides qui seraient capables de modifier la disponibilité des métaux. La présence d'acides organiques peut modifier le pH du milieu ce qui peut solubiliser la fraction acido-soluble et constitue une source potentielle de ligands, qui ont un pouvoir complexant sur les métaux (Ahmad et al, 2011).

Pour mettre en évidence la production d'acides par les champignons, deux souches de champignons: *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* ont été mises en culture sur un milieu MEA (Malt Extract Agar) supplémenté avec un indicateur coloré (vert de bromocrésol) et exposées à un stress métallique.

### MATERIEL ET METHODES



### RESULTATS ET DISCUSSION



### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce test représente une étude préliminaire, qui a permis de mettre en évidence la sécrétion d'acides par les deux souches de champignons étudiées.

Les travaux en cours consistent à mettre au point une méthode de dosage par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) permettant d'identifier ces acides.

Ahmad, et al, 2011. « Metal Tolerance and Biosorption Potential of Soil Fungi: Applications for a Green and Clean Water Treatment Technology ». In *Microbes and Microbial Technology*, 321-61. Springer New York.

Ali, et al, 2017. « Mycoremediation of Potentially Toxic Trace Elements—a Biological Tool for Soil Cleanup: A Review ». *Pedosphere* 27 (2): 205-22.

### Annexe 13. Masses des mycéliums de *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* issus des milieux liquides en poids frais et en poids secs.

Les masses des mycéliums frais d'*Absidia cylindrospora* et de *Perenniporia fraxinea* récupérés à partir des milieux de culture liquide sont présentées dans le tableau 50.

Tableau 50. Masses des mycéliums d'*Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* issus des milieux liquides en poids frais et en poids secs.

masse (g)	<i>Absidia cylindrospora</i>		<i>Perenniporia fraxinea</i>	
	fraîche (A.c)	sèche (A.c)	fraîche (P.f)	sèche (P.f)
<b>Témoin</b>	3,01 ± 0,45	0,145 ± 0,007	3,34 ± 1,89	0,179 ± 0,093
<b>Pb</b>	2,23 ± 0,12	0,132 ± 0,003	2,91 ± 0,75	0,149 ± 0,047
<b>Cd</b>	2,29 ± 0,23	0,136 ± 0,012	2,29 ± 0,23	0,175 ± 0,006

## Annexe 14. Teneurs en acides oxalique et citrique dans les milieux de culture d'*Absidia cylindrospora* (24h, 48h, 72h, 96h).

Le tableau 51 montre les teneurs en g.L<sup>-1</sup> en acides oxalique et citrique dans les milieux de culture d'*Absidia cylindrospora* (24h, 48h, 72h, 96h).

Tableau 51. Teneurs en g.L<sup>-1</sup> en acides oxalique et citrique dans les milieux de culture d'*Absidia cylindrospora* (24h, 48h, 72h, 96h).

g.L <sup>-1</sup>	Témoin		Cd		Pb	
	oxalique	citrique	oxalique	citrique	oxalique	citrique
24h	0,019±0,001	0,14±0,02	0,018±0,003	0,13±0,03	0,01±0,01	0,15±0,03
48h	0,014±0,006	0,14±0,08	0,014±0,003	0,18±0,05	0,010±0,001	0,19±0,03
72h	0,017±0,001	0,23±0,05	0,017±0,002	0,23±0,02	0,015±0,003	0,28±0,02
96h	0,016±0,002	0,31±0,06	0,014±0,003	0,31±0,05	0,012±0,002	0,32±0,03

## Etude de l'influence de la bioaugmentation fongique sur la spéciation minéralogique d'éléments traces métalliques en microcosmes de sol

La pollution des sols est un problème mondial majeur. Les polluants métalliques (ETM) en particulier représentent plus de 35% des polluants retrouvés dans les sols Européens, ce qui peut affecter la santé des citoyens et leur qualité de vie et peut engendrer des risques environnementaux. La mycoremédiation, employant les champignons, semble être un bon compromis pour le traitement de la pollution métallique des sols, du fait de leur présence dans le sol autant que décomposeurs de polymères naturels, leur grande capacité d'adaptation à différents écosystèmes, leur tolérance aux contaminants et leur capacité d'accumulation des polluants.

Dans le cadre de ce travail, des souches fongiques, préalablement isolées à partir de sols pollués et testées pour leur tolérance aux métaux en milieu de culture liquide, ont été introduites en bioaugmentation dans des microcosmes au contact de sols pollués par des ETM. Ainsi, un microcosme permettant d'isoler le mycélium du sol a été mis au point. Ce qui permet de mesurer séparément les concentrations d'ETM accumulés dans le mycélium et dans le sol. Ce microcosme a été ensuite appliqué à des sols pollués réels en employant les souches *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* en bioaugmentation. *Absidia cylindrospora* a la capacité d'accumuler simultanément Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb et Zn. Les concentrations de certains ETM (Cd, Co, Cu, Ni, Zn) accumulés dans le mycélium augmentent avec le temps d'incubation. Aussi, l'ordre de disponibilité potentielle des ETM dans les sols, estimée par extractions chimiques, est cohérent avec l'ordre d'accumulation de ces derniers au sein du mycélium (Cu>Cd>Ni>Zn>Co>Cr).

Par ailleurs, une étude en milieu liquide a permis de quantifier par HPLC la quantité d'acides organiques produits par *Absidia cylindrospora* et *Perenniporia fraxinea* en présence de Cd et/ou Pb. Cette étude a révélé la capacité d'*Absidia cylindrospora* à produire l'acide oxalique et citrique.

**Mots clés :** sols pollués, métaux, microcosmes, bioaugmentation, spéciation minéralogique, disponibilité environnementale, *Absidia cylindrospora*, *Perenniporia fraxinea*, mycoremédiation.

## Study of the influence of fungal bioaugmentation on the mineralogical speciation of trace metal elements in soil microcosms

Soil pollution is a major global problem. Metallic pollutants (TMEs) in particular represent more than 35% of the pollutants found in European soils, which can affect the citizens health and their quality of life and can lead to environmental risks. Mycoremediation, using fungi, seems to be a good compromise for the treatment of metallic pollution in soils, due to their presence in the soil as decomposers of natural polymers, their great capacity of adaptation to different ecosystems, their tolerance to contaminants and their accumulation of pollutants capacity.

As part of that work, fungal strains, previously isolated from polluted soils and tested for their tolerance to metals in liquid culture medium, were introduced (bioaugmentation) within microcosms in contact with soils polluted by TME. Thus, a microcosm allowing to isolate the mycelium from the soil was developed, which allows the measurement of the concentrations of ETM accumulated in the mycelium and in the soil separately. The microcosm was then applied to real polluted soils using the strains *Absidia cylindrospora* and *Perenniporia fraxinea* in bioaugmentation. *Absidia cylindrospora* can accumulate Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb and Zn simultaneously. The concentrations of some of the TMEs (Cd, Co, Cu, Ni, Zn) accumulated in the mycelium increase with incubation time. Also, the order of potential availability of TMEs in soils, estimated by chemical extractions, is consistent with the order of accumulation of the latter within the mycelium (Cu>Cd>Ni>Zn>Co>Cr).

Furthermore, a study in liquid medium allowed to quantify by HPLC the amount of organic acids produced by *Absidia cylindrospora* and *Perenniporia fraxinea* in the presence of Cd and/or Pb. This study revealed the ability of *Absidia cylindrospora* to produce oxalic and citric acid.

Key words: polluted soils, metals, microcosms, bioaugmentation, mineralogical speciation, environmental availability, *Absidia cylindrospora*, *Perenniporia fraxinea*, mycoremediation.