

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes
L.S.T.M. – U.M.R. 113, CIRAD / INRA / IRD / Montpellier SupAgro / UM2



PROJET PHYTOSTABILISATION SITE DES AVINIÈRES :

Etat des connaissances et perspectives

J.C. Cleyet-Marel

Fait le 20 décembre 2013

Avant-propos

Les travaux conduits depuis plus de 12 ans sur le site des Avinières par J.C. Cleyet-Marel (LSTM Montpellier) et J. Escarré (CEFE Montpellier) ont permis d'identifier plusieurs espèces végétales et des microorganismes d'intérêt pour des opérations de phytostabilisation des déblais miniers riches en zinc, plomb et cadmium.

Le potentiel de ces espèces pour une phytostabilisation efficace et les conséquences sur la mobilité des ETMs sont en cours d'évaluation dans le cadre du projet **SyMetal**. Nous présenterons dans ce rapport l'état actuel des connaissances en insistant sur les aspects finalisés du projet SyMetal. Les principaux points mis en exergue sont ceux visant à implanter une couverture végétale homogène et pérenne. Cette dernière, en favorisant l'activité biologique du substrat minier peut conduire sinon à une immobilisation totale des contaminants, du moins à une réduction significative de leurs transferts dans le milieu environnant soit par voie hydrique, soit par voie éolienne. Le projet SyMetal est inséré dans un ensemble de recherches plus large et au-delà des résultats acquis dans le cadre du dispositif expérimental placé dans les bassins de décantation, nous montrerons comment les résultats acquis et les observations issus d'autres expérimentations conduites depuis plus de dix ans peuvent être valorisés pour des opérations de phytostabilisation des déblais miniers de l'ancienne mine des Avinières.

L'ensemble des données présentées ont été obtenues dans le cadre de quatre thèses soutenues entre 2004 et 2013 (H. Frérot, 2004 ; C. Vidal, 2008 ; G. Maynaud, 2012 ; S. Soussou 2013) et dans le cadre du projet SyMetal avec des équipes dirigées par J. Escarré (CEFE Montpellier), D. van Tuinen (Agroécologie, Dijon), J. Martins (LTHE, Grenoble), M.P. Isaure (LCABIE, Pau), J.C. Cleyet-Marel (LSTM, Montpellier)

1 - Objectifs du projet SyMetal

SyMetal est un projet intégratif focalisé sur le site des Avinières à Saint Laurent le Minier. Il comporte 3 axes de recherche (i) l'inventaire des végétaux métallocoles, l'identification et la sélection de symbiotes bactériens et fongiques adaptés aux milieux chargés en métaux (ii) l'utilisation de Fabacées métallocoles et de leurs bactéries symbiotiques fixatrices d'azote pour favoriser une entrée significative de matière organique dans l'écosystème métallifère (iii) l'analyse de la rhizostabilisation sur le devenir des métaux en terme de spéciation et de mobilité dans le substrat sous le couvert végétal. L'installation d'un couvert végétal a été prévu *in situ* pour tester son fonctionnement sur le site même avec des analyses poussées de la spéciation des contaminants métalliques au contact des racines des plantes et l'influence du couvert végétal sur le transfert vertical de ces contaminants. Les recherches proposées, constituent un préalable indispensable à des opérations de phytoremédiation débouchant sur des stratégies d'ingénierie écologique et de mise en sécurité des anciens sites miniers, aujourd'hui à l'abandon.

L'objectif finalisé est donc de proposer, à l'issue du projet et à partir de données objectives, des stratégies innovantes en ingénierie écologique pour phytostabiliser, de façon efficace et durable les polluants métalliques des déblais miniers à l'abandon.

1.1 – Données sur les plantes métallocoles susceptibles d'être utilisées pour la phytostabilisation des déblais miniers.

Nous avons concentré nos recherches vers des plantes susceptibles d'améliorer la fertilité des substrats miniers et notamment les Fabacées qui ont la capacité de s'associer avec des bactéries fixatrices d'azote.

Travaux concernant Anthyllis vulneraria, Koeleria vallesiana et de Festuca arvernensis

Anthyllis vulneraria est une Fabacée naturellement présente sur le site des Avinières. Elle a fait l'objet de plusieurs études et son rôle bénéfique dans l'amélioration de la croissance d'autres espèces végétales qui peuvent être co-cultivées avec elle avait été clairement démontré (Frérot, 2004 ; Frérot *et al.*, 2006). Les principaux résultats montrent une très nette amélioration de la croissance de *Koeleria vallesiana* et de *Festuca arvernensis* (la biomasse de la fétuque cultivée la première année en présence d'*Anthyllis* est doublée deux après l'implantation, figure 1, (Frérot *et al.*, 2006). Cela est dû à la capacité d'*Anthyllis* associée à la bactérie symbiotique, de mobiliser l'azote de l'air en le rendant disponible pour la plante, qui lors de sa sénescence le libère dans le sol. La quantité d'azote initialement disponible dans le substrat minier des bassins de décantation est ainsi passée de 0,042 % à 0,070 % en deux ans,

ce qui correspond à une fertilisation azotée équivalente à un apport d'environ 300 unités d'azote par ha. Cela s'explique par le fait que 70-80 % de l'azote total d'*Anthyllis* provient de l'atmosphère (Mahieu *et al.*, 2013a). Un autre point très important à souligner est l'incorporation de l'azote sous forme organique, et donc stabilisé puisqu'il est directement inséré dans le cycle biologique.



Festuca



Festuca + Anthyllis

Figure 1 : Parcelles de *Festuca arvernensis* en culture monospécifique ou associée à *Anthyllis vulneraria* après deux années d'implantation (Frérot *et al.*, 2006).

Afin d'évaluer le degré d'adaptation de différents éco-types ou sous-espèces d'*Anthyllis* à la présence de fortes concentrations en ETMs, des prospections sur le terrain ont permis d'identifier plusieurs sous espèces d'*Anthyllis vulneraria* susceptibles d'être utilisées en phytoremédiation (Mahieu *et al.*, 2011). Nous avons retenu quatre populations, deux issues d'anciennes mines de Zn-Pb (MET), Avinières dans le Gard ([Zn] = 26000 mg kg⁻¹) et Eylie dans l'Ariège ([Zn] = 4632 mg kg⁻¹) et deux populations issues de sols non contaminés (NMET) des Causses.

Chaque population a été cultivée à la fois dans son sol d'origine et dans ceux des autres populations. Les populations NMET présentent une mortalité élevée et des faibles taux de croissance dans les sols très contaminés alors que les plantes des Avinières ont montré un taux de croissance élevé dans les sols à fortes teneurs en ETMs. Les individus des Avinières semblent bien adaptés à la restauration de sites fortement contaminés (> 30000 mg Zn kg⁻¹) tandis que ceux d'Eylie pourraient être utilisés pour la restauration de sols moins contaminés (<30000 mg Zn kg⁻¹).

Compte tenu de la large distribution d'*A. vulneraria*, il est tout à fait envisageable d'utiliser ces deux populations pour la restauration des sites miniers abandonnés dans les régions tempérées de l'Europe du Sud et de l'Europe Septentrionale (Mahieu *et al.*, 2013b).

Au-delà de l'identification d'espèces végétales et de microorganismes d'intérêt pour la phytostabilisation, l'analyse des interactions plante-bactérie a révélé un effet très positif des bactéries qui contribuent à diminuer la teneur en métal (zinc et cadmium) dans les parties aériennes d'*Anthyllis vulneraria* subsp *carpatica* (sous-espèce présente sur le site des Avinières) (figure 2).

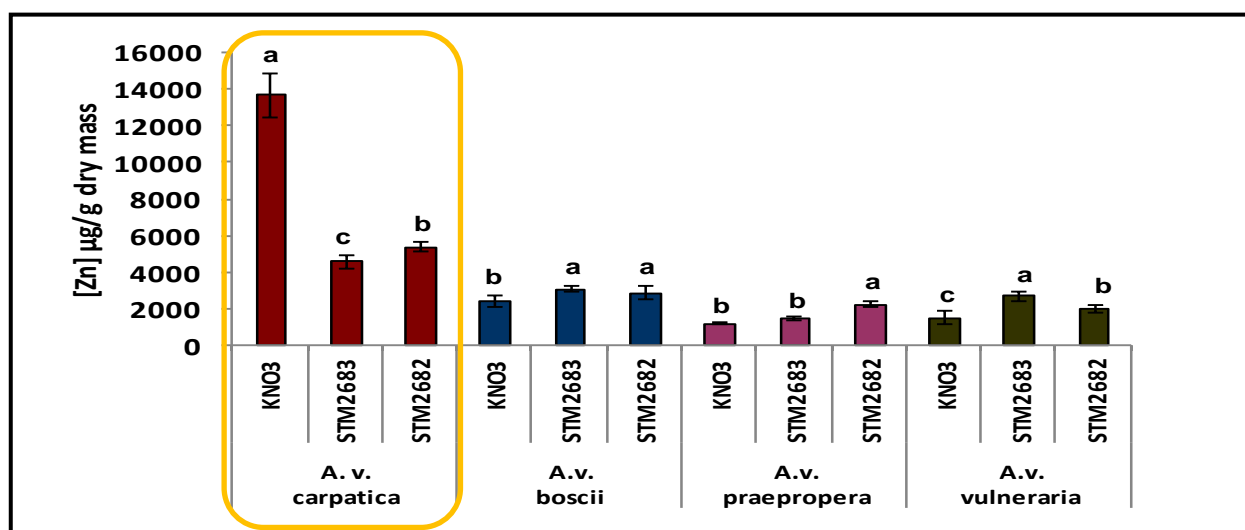


Figure 2 : Concentration de zinc dans les parties aériennes des plantes exposées à 1000 µM de Zn (Soussou, 2013 ; Soussou *et al.*, 2013)

1.2 - Dynamique des ETM dans le substrat minier

La dynamique physique et chimique des métaux dans les remblais miniers du site des Avinières a été appréhendée. L'objectif est de comprendre comment les métaux sont mobilisés ou immobilisés par l'installation du couvert végétal lors de la phytostabilisation.

Les racines des plants d'*Anthyllis* récoltés après un mois de contact avec le remblai minier en colonnes ont été observé en MEB-EDX afin d'identifier une potentielle modification de la spéciation solide des métaux proches des racines (figure 3).

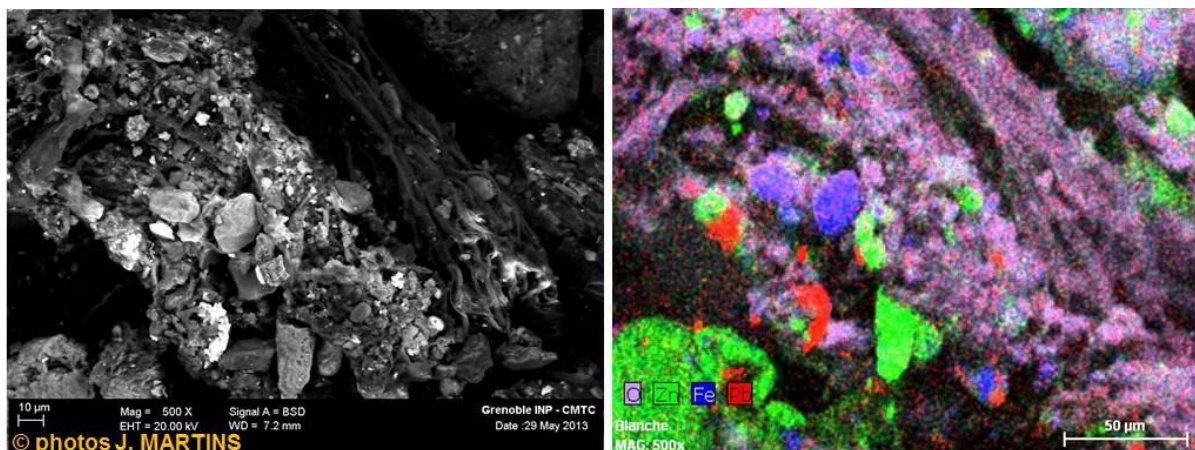


Figure 3 : Observation de racines d'*Anthyllis* en contact avec le remblai minier des Avinières en colonnes ayant subi des lessivages successifs à l'eau simulant une pluie, après un mois d'incubation à 20°C.

Les analyses en MEB-EDX ont permis de montrer qu'après un mois d'incubation en colonnes, les racines d'*Anthyllis* se retrouvaient entourées d'une gangue de constituants de remblai riche en métaux autour de la racine (figure 3). Les cartographies élémentaires obtenues par EDX (analyse spécifique des éléments présents par diffraction X) ont permis de mettre en évidence des cristaux de Zn et de Pb de tailles variables, alors que dans le remblai sans plantes, seul le plomb apparaissait sous forme de cristaux, le zinc étant présent de manière beaucoup plus diffuse dans toute la matrice observée.

Ces résultats semblent indiquer qu'au contact des racines d'*Anthyllis*, le zinc est concentré et re-précipité sous forme de particules.

D'autres observations ont été réalisées avec des échantillons de plantes et de sol prélevés en 2011 sur le terrain, sur des parcelles installées 10 ans auparavant. L'objectif était de voir si les formes des métaux (Zn et Pb) étaient modifiées par l'installation du couvert végétal en comparaison avec le sol nu. La comparaison des sols rhizosphériques et sols sans couvert végétal a montré que les spectres EXAFS étaient similaires à la fois pour le Zn et le Cd, indiquant que les formes métalliques n'avaient pas changé dans le sol total sous l'effet du couvert végétal. Les métaux se trouvent principalement sous forme carbonatée (smithsonite $ZnCO_3$ et otavite $CdCO_3$).

2 - Utilisation des résultats et de l'expérience acquise au cours des dix dernières années pour une phytostabilisation raisonnée de l'ancienne mine des Avinières.

2.1 - Reproductibilité et pérennité de la végétalisation

2.1.1 - Essai 2002 (Frérot et al., 2006)

L'essai initial mis en place en 2002 est toujours visible. La vigueur initiale liée à la présence d'*Anthyllis* et la robustesse de *Festuca* et *Koeleria* a assuré une fixation du substrat minier (figure 4 et 5).



Figure 4 : Septembre 2013
Placettes installées en 2002



Figure 5 : La présence de la végétation à
fortement limité l'érosion du substrat minier

(Frérot et al., 2006)

2.1.2 – Parcelles essai SyMetal

L'essai mis en place en avril 2012 avec une optimisation de la croissance des végétaux par l'apport de microorganismes symbiotiques montre que l'installation des végétaux peut être très rapide (figure 6). Dans les conditions du bassin de décantation n° 2, aucun apport d'eau n'a été nécessaire en dehors de celui apporté à la plantation. L'installation des végétaux et en particulier d'*Anthyllis* a été facilitée par la biotisation des plantes lors de la transplantation sur le terrain (inoculation avec *Mesorhizobium metallidurans* (Vidal, 2008 ; Vidal et al., 2009 ; Maynaud, 2012) et un cortège de champignons endomycorhiziens).



Implantation Avril 2012



Juin 2012



Juillet 2012



Août 2012



Novembre 2012

La végétation installée au printemps a passé l'été sans arrosage (photos juillet et août) et s'est bien développée à l'automne (photo novembre 2012).



Mai 2013



Septembre 2013

Figure 6 : Evolution du couvert végétal depuis la mise en place de l'essai (avril 2012)

213 - Transposition des résultats obtenus dans les bassins de décantation vers la partie haute du site des Avinières.

Un essai ponctuel a été réalisé en 2009 pour une première vérification de la faisabilité de l'implantation d'un couvert végétal sur les déblais miniers de la partie haute du site des Avinières. Les végétaux ont été implantés par transfert de plants en godets. Il ressort de cet essai qu'en présence d'*Anthyllis*, la vigueur des fétuques est plus forte qu'en absence de la légumineuse (figure 7 et 8). Ce résultat est évidemment conforme à tout ce qui avait été observé antérieurement dans les bassins de décantation et montre bien que l'installation d'une végétation suffisamment dense dans la partie haute du site des Avinières ne peut être envisagée sans une entrée significative d'azote par voie biologique avec *Anthyllis vulneraria* dans une première séquence de végétation.



Figure 7 : Végétalisation avec *Festuca* sans *Anthyllis*



Figure 8 : Végétalisation avec *Festuca* et *Anthyllis*

La présence d'*Anthyllis*, en favorisant l'entrée d'azote facilite une réelle dynamique de la végétation avec l'installation de nouvelles plantes de *Festuca* (figure 9).



Figure 9 : Végétalisation avec *Festuca* et *Anthyllis* : densification du couvert végétal

L'essai de semis direct réalisé dans le bassin de décantation n° 1 montre que l'implantation d'une végétation diversifiée est possible et donne des résultats comparables à ce qui a été obtenu avec des transferts de plants. Cette approche par semis direct est celle qui devra être envisagée pour la végétalisation de la partie haute du site des Avinières (figure 10 et 11).



Figure 10 : Couvert végétal obtenu par semis direct



Figure 11 : Le semis direct a favorisé l'installation d'une végétation diversifiée

3 - Conclusions et perspectives

Les travaux réalisés au cours des dix dernières années ont permis d'identifier une dizaine d'espèces végétales métallophiles sur le site des Avinières et sur d'autres sites du district minier de Saint Laurent le Minier.

- Plusieurs espèces (*Anthyllis*, *Festuca*, *Koeleria*) sont d'intérêt pour la phytostabilisation des anciens sites miniers avec des substrats à forte teneur en zinc, plomb, cadmium.
- La diversité génétique et fonctionnelle des bactéries fixatrices d'azote symbiotiques d'*Anthyllis vulneraria* et des champignons symbiotiques endomycorhiziens a été décrite. Des inoculums bactériens efficaces sont disponibles.
- La fonctionnalité et la complémentarité des associations végétales et microbiennes ont été établies.
- L'importance de l'entrée d'azote par voie biologique avec l'insertion d'une plante fixatrice d'azote (*Anthyllis vulneraria*) en première séquence de végétation dans l'amélioration de l'installation et de la pérennité d'un couvert végétal a été démontrée.

Il est possible de définir aujourd'hui un itinéraire technique assez précis reposant sur une articulation étroite entre des travaux de Génie Civil et d'Ingénierie Ecologique :

- L'apport de compost (la nature du compost est « critique » car il permet de lever les carences en oligo-éléments essentiels à la croissance des plantes sans apporter d'azote)
- Introduction par transfert de plants ou par semis direct : les périodes d'intervention doivent respecter rigoureusement les saisons et deux périodes sont possibles pour les semis directs : **septembre – octobre ; mars – avril**
- Les interventions sur les déblais miniers de la partie haute des Avinières devront être limitées et l'intervention d'engins lourds n'est pas recommandée. Il est suggéré de respecter le plus possible le modelé actuel en aménageant des pistes d'accès permettant le déplacement d'engins légers (pistes n'excédant pas 2 m de largeur) et de prévoir des interventions manuelles pour l'apport de compost et les semis

La phytostabilisation des déblais miniers de la partie haute des Avinières a plusieurs limites :

- Il est envisageable de phytostabiliser des pentes jusqu'à 60 % avec de bonnes chances de succès. Au-delà, il sera nécessaire d'envisager l'utilisation de matériaux biodégradables spécifiques pour fixer le compost et les semences.
- La possibilité de produire des semences pour les plantes métallophiles d'intérêt est réelle mais cependant limitée par le manque d'espace disponible pour cette opération dans les bassins de décantation. Il convient de programmer les

opérations de phytostabilisation de la partie haute du site des Avinières sur 3-5 années.

- Un suivi rigoureux, pendant la mise en place de la végétation et pendant son installation est indispensable.
- Le savoir-faire et le matériel biologique pour phytostabiliser le site des Avinières et d'autres sites du même type est actuellement disponible au Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes. Il conviendrait, lors des opérations de phytostabilisation du site des Avinières, de ne pas oublier le savoir faire acquis au cours de 10 années de travaux sur le site.

Sur la base des connaissances scientifiques et du savoir faire actuellement disponible, on peut envisager une évolution de la végétation qui pourrait être la suivante :

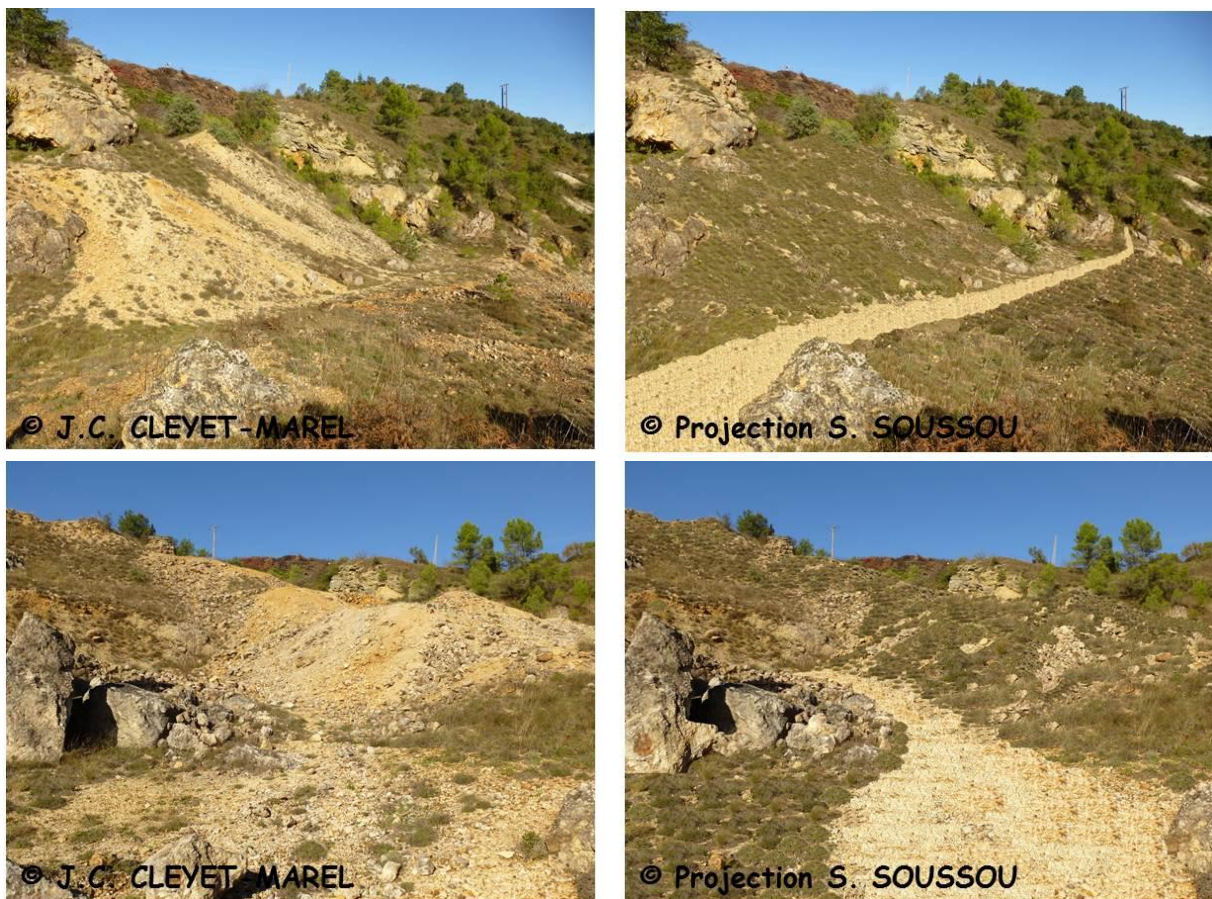


Figure 12 : Evolution potentielle de la végétation après phytostabilisation du site des Avinières

Références bibliographiques

Mahieu, S., Escarré, J., Brunel, B., Méjamolle, A., Soussou, S., Galiana, A., Cleyet-Marel, J.-C., 2013a. Soil nitrogen balance resulting from N fixation and rhizodeposition by the symbiotic association *Anthyllis vulneraria*/Mesorhizobium metallidurans grown in highly polluted Zn, Pb and Cd mine tailings. *Plant and Soil*. DOI:10.1007/s11104-013-1941-4

Mahieu, S., Soussou, S., Cleyet-Marel, J.-C., Brunel, B., Mauré, L., Lefèbvre, C., Escarré, J., 2013b. Local Adaptation of Metallicolous and Non-Metallicolous *Anthyllis vulneraria* Populations: Their Utilization in Soil Restoration. *Restoration Ecology* 21, 551-559.

Soussou, S., Mahieu, S., Brunel, B., Escarré, J., Lebrun, M., Banni, M., Boussetta, H., Cleyet-Marel, J.-C., 2013. Zinc accumulation patterns in four *Anthyllis vulneraria* subspecies supplemented with mineral nitrogen or grown in the presence of their symbiotic bacteria. *Plant and Soil* 371, 423-434.

Soussou, S., 2013. Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium*. Thèse pour l'obtention de diplôme de doctorat à Montpellier SupAgro.

Maynaud, G., 2012. Adaptation aux métaux lourds de populations de rhizobia impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers : Identification des mécanismes d'adaptation au Zn et au Cd, et structuration des populations de rhizobia adaptées aux sites miniers. Thèse pour l'obtention de diplôme de doctorat à Université Montpellier II.

Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L., Brunel, B., Lefèbvre, C., Escarré, J., Cleyet-Marel, J.-C., 2011. *Anthyllis vulneraria*/Mesorhizobium metallidurans, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. *Plant and Soil* 342, 405-417.

Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Maure, L., Escarre, J., Bena, G., Brunel, B., Cleyet-Marel, J.C., 2009. *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 850-855.

Vidal, C., 2008. Etude taxonomique, phylogénétique et génétique des bactéries symbiotes des légumineuses métallicoles adaptées aux sites contaminés par le zinc et le cadmium. Thèse pour l'obtention de diplôme de doctorat à Université Montpellier II.

Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Santos, A.D., Escarré, J., 2006. Specific Interactions between Local Metallicolous Plants Improve the Phytostabilization of Mine Soils. *Plant and Soil* 282, 53-65.

Frérot, H., 2004. Aspects génétiques et écologiques de la tolérance aux métaux lourds et de l'hyperaccumulation chez *Thlaspi caerulescens* (*Brassicaceae*): Perspectives en phytoremédiation. Thèse pour l'obtention de diplôme de doctorat à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier.

Conférences (invité)

Cleyet-Marel JC. Le phytomagement au service de l'après-mine. Ecole thématique "Ressources Minérales : défis scientifiques et sociétaux ". Genève 5-7 février 2013.

Cleyet-Marel JC. Les phytotechnologies au service de la gestion des anciens sites miniers. Montpellier congrès Biotrace 30 janvier-1 février 2013.

Cleyet-Marel JC. Le phytomagement au service de l'après-mine. Les Entretiens Jacques Cartier 2013. Le Bourget du Lac. 26-27 novembre 2013.

