

M2 SEE

UE SEE3 – Microbiologie environnementale

Intervenants

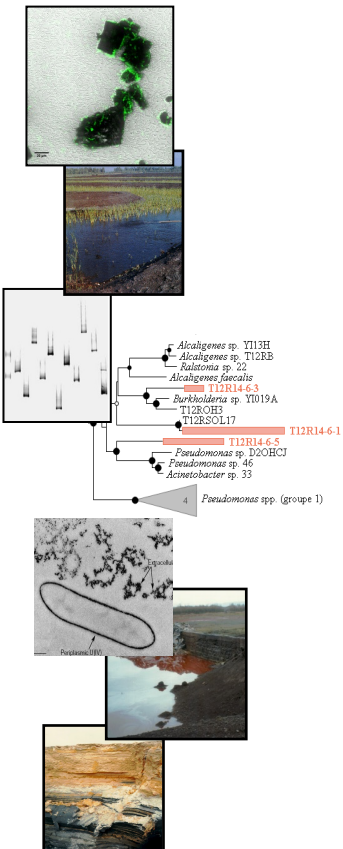
Patrick Billard (patrick.billard@univ-lorraine.fr)
Frédérique Changey
Fredéric Jorand
Christophe Merlin

Objectifs

Comportement des microorganismes dans les milieux naturels et anthropisés
Impact de leur activité sur le fonctionnement des écosystèmes
Utilisation dans le domaine de la protection de l'environnement

MCC

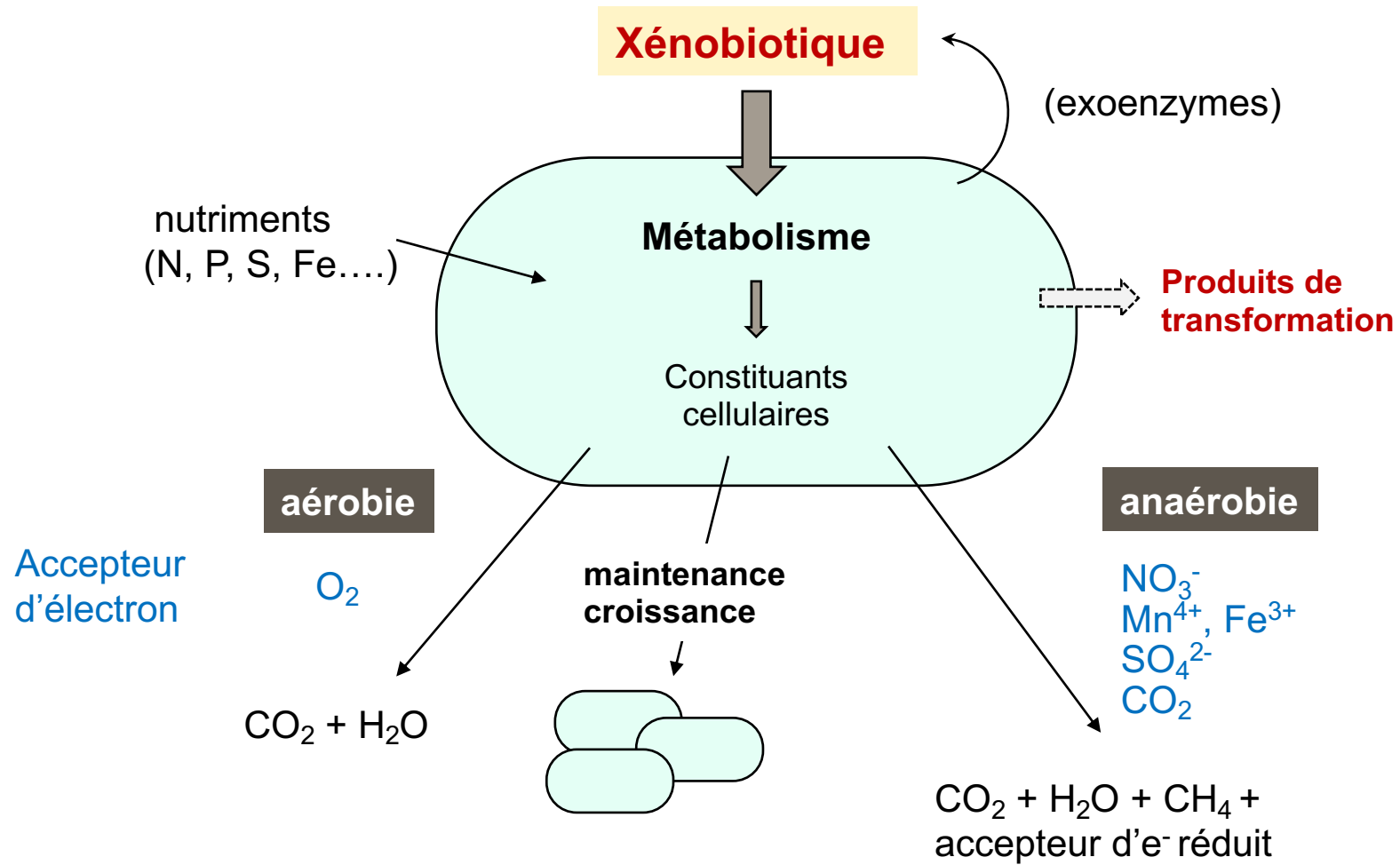
- Analyse d'articles (restitution orale) - 30% note UE
- Contrôle écrit 2h – 70% note UE



UE 903 – Microbiologie environnementale

P. BILLARD – 4h CM + 5 hTD

- **Biodégradation des polluants organiques**
- **Techniques de bioremédiation**
- **Transformations microbienne des polluants métalliques**
- **Analyse d'articles (restitution orale)**



Biodégradation – quelques principes

Notion de facteur limitant

➤ La vitesse et le degré de biodégradation sont contrôlés par un **facteur limitant** (**loi du minimum de Liebig** : *La croissance est limitée par l'élément dont la concentration est inférieure à une valeur minimum sous laquelle les synthèses ne peuvent plus se faire*)

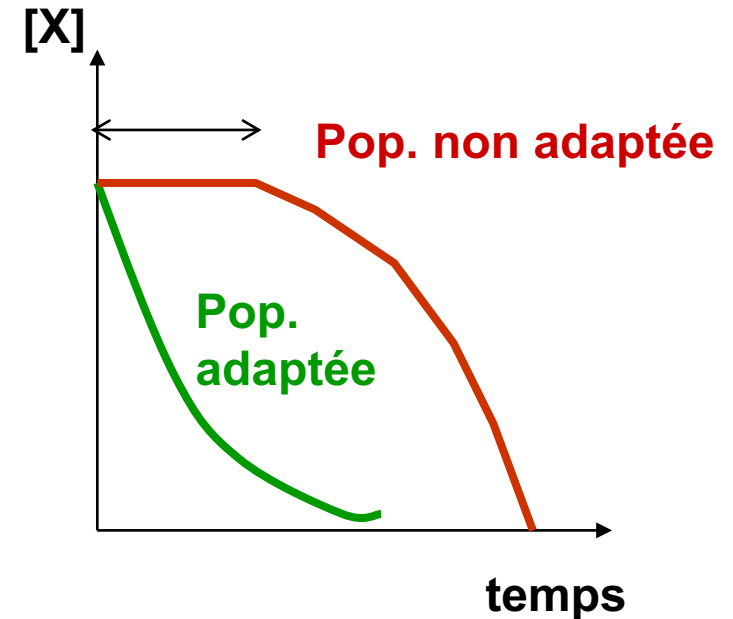
$C/N/P = 106/16/1$ (atomique) [$C_5H_7O_2N_{0,75}P_{0,05}$]

Si ce ratio n'est pas respecté ($C/N > 10$ ou $C/P > 100$), carence en N ou P et arrêt de dégradation.



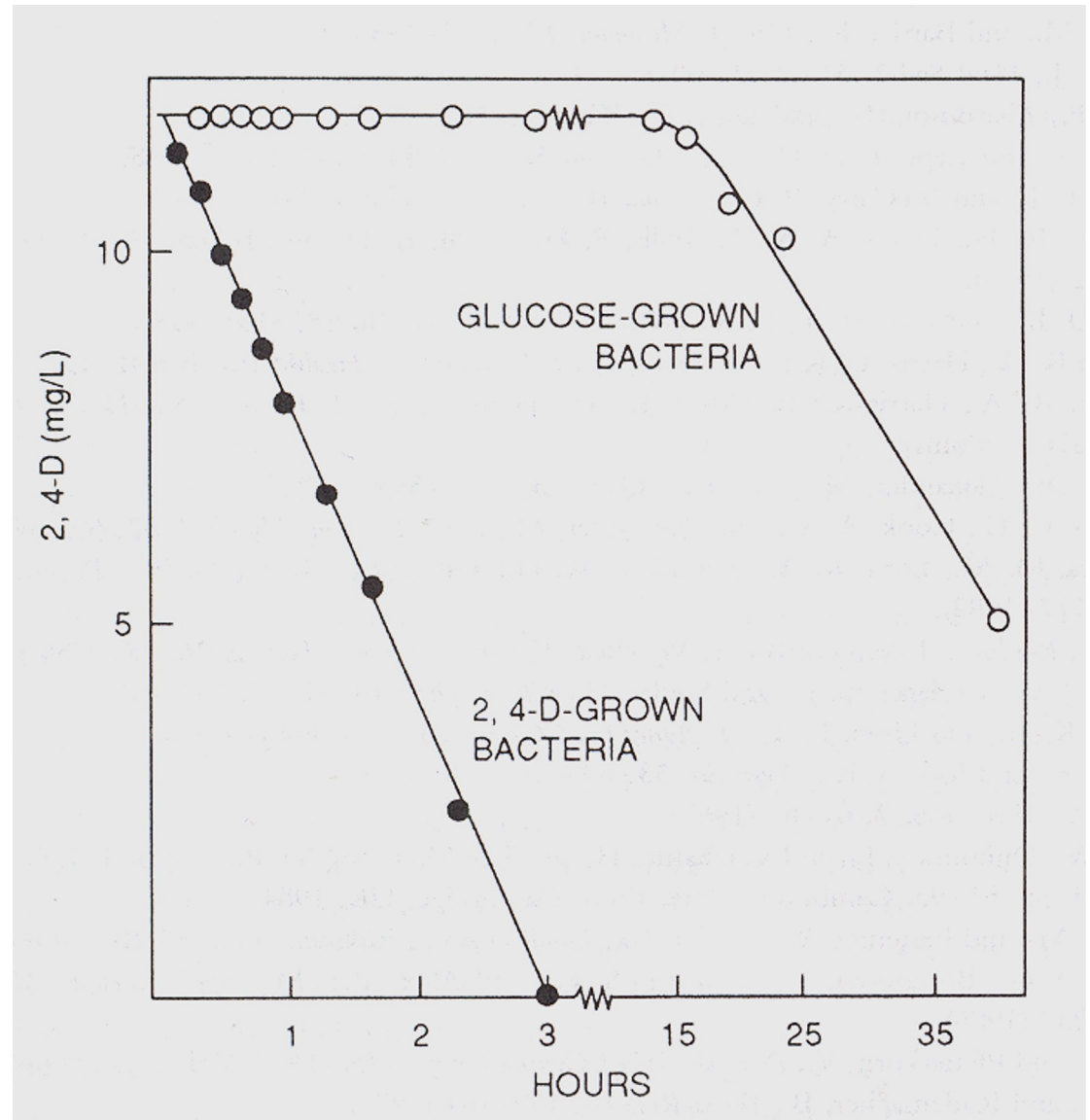
Adaptation / acclimatation

- 1eres études sur herbicides (2,4D - 1949) montraient une baisse d'efficacité au cours du temps
- Démonstration du rôle des microorganismes:
 - Prolongation de l'activité herbicide après stérilisation du sol
 - Isolement de bactéries dégradant le 2,4D
- Dégradation après une phase de latence
- Réduction de cette phase après une première exposition



Exemple d'adaptation

Dégradation du 2,4-D
(dichlorophénoxyacétate, herbicide) par une bactérie
préalablement cultivée sur
2,4-D ou glucose



Transfert de gènes

De nombreux gènes de dégradation sont portés par des plasmides qui peuvent être transmis à d'autres bactéries par conjugaison.

Substrat	Plasmide	Taille	Bactérie hôte
Alkylbenzene sulfonate	ASL	91,5	<i>Pseudomonas testosteroni</i>
Benzoate	pCB1	17,4	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> subsp. <i>denitrificans</i> PN-1
Biphényle	pBS241	195	<i>P. putida</i> BS893
Camphre	PpG1(CAM)	500	<i>Pseudomonas</i> sp.
4-chlorobiphényl	pSS50	53,2	<i>Alcaligenes</i> sp.
2,4-dichloro phénoxyacétate	pJP1	87	<i>A. paradoxus</i> JMP116
dibenzothiophène	pDBT2	82,5	<i>Pseudomonas</i> sp. DBT2
naphtalène	Nah7	83	<i>P. putida</i> PpG7
octane	OCT	500	<i>P. oleovorans</i>
parathion	pPDL2	43	<i>Flavobacterium</i> ATCC27551
styrène	pEG	37	<i>P. fluorescens</i> PAW340
toluène	pWWO (TOL)	117	<i>P. putida</i> mt-2



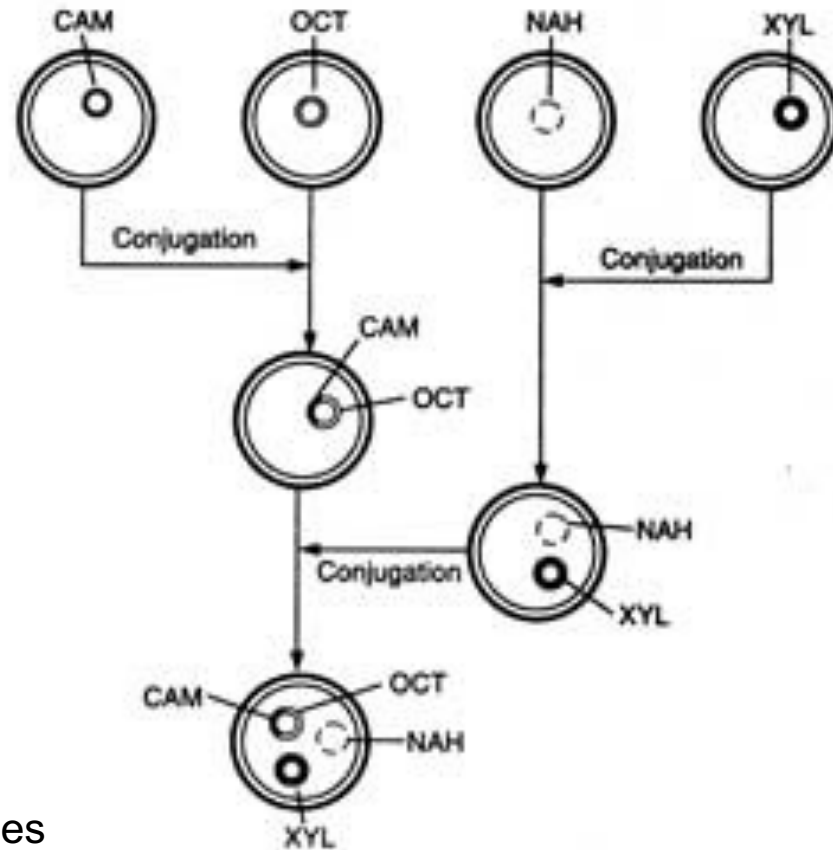
Conjugaison entre deux cellules (donneuse et receveuse) d' *E. coli* via un pili sexuel

Adaptation par transfert de gène dans l'env. non prévisible

Biodégradation et ingénierie génétique

Première expériences : Anand Chakrabarty en 1980, construction d'un « superbug » en introduisant plusieurs plasmides de dégradation dans une souche de *Pseudomonas putida*

*La souche recombinante
dégrade les 4 types de substrats !*

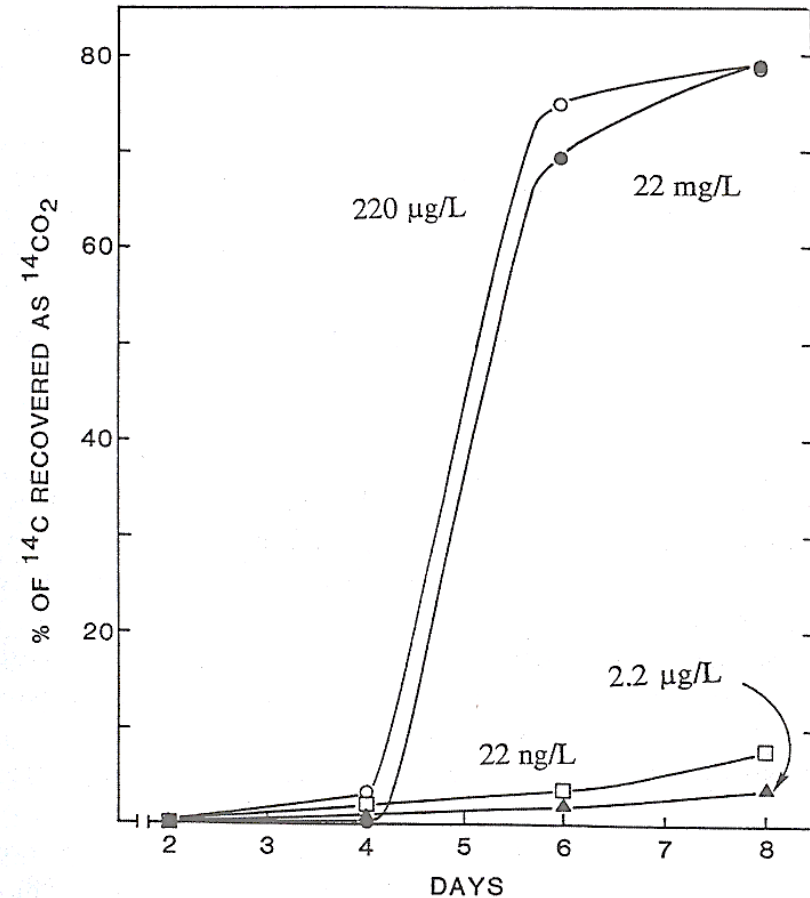


Recherches actuelles:

- isoler de nouveaux microorganismes / enzymes
- améliorer les capacités de dégradation et de survie des microorganismes

Nécessité d' une concentration seuil

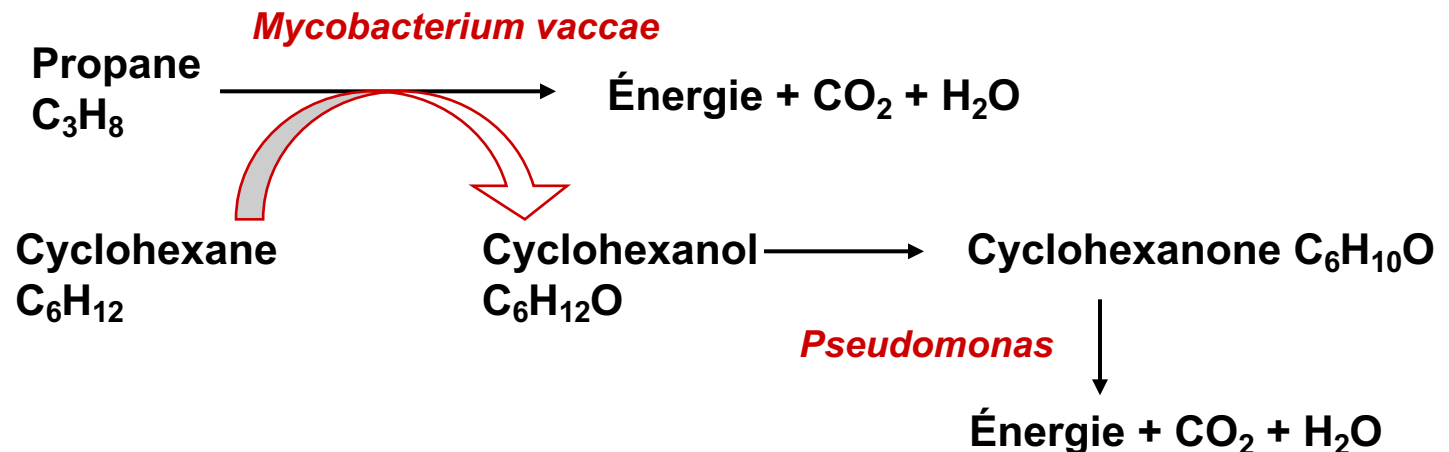
- Le composé à dégrader doit être en quantité suffisante pour **induire les voies métaboliques** du dégradeur
- Si $[X] < \text{concentration seuil}$, pas de dégradation, même si les gènes sont présents



Minéralisation du 2,4-D ajouté à différentes concentrations dans une eau de rivière (Boethling et Alexander, 1979)

Cométabolisme

- Transformation « gratuite » d'un composé par un microorganisme croissant sur un autre substrat
- Le composé cométabolisé n'est pas assimilé et sa transformation ne procure pas d'énergie au microorganisme
- Intéressant car ne dépend pas de la concentration
- Exemple



Cometabolic bioremediation substrates, enzymes, contaminants

Cosubstrates	Methane, Methanol, Propane, Propylene (aerobic)	Ammonia, Nitrate (aerobic)	Toluene, butane, phenol, citral, cumin aldehyde, cumene, and limonene (aerobic)	Methanol (anaerobic)	Glucose, Acetate, Lactate, Sulfate, Pyruvate (anaerobic)
Enzymes (microbes)	Methane Monooxygenase, Methanol Dehydrogenase, Alkene monooxygenase, catechol dioxygenase (Methylosinus)	Ammonia Monooxygenase (<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrobacter</i>)	Toluene Monooxygenase, Toluene Dioxygenase (<i>Rhodococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Arthrobacter</i>)	Alcohol Dehydrogenases (<i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Corynebacterium</i>)	Dehalogenase, AtzA, Dichloromethane Dehalogenase (<i>Dehalococcoides</i> , <i>Methanogens</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Geobacter</i> , <i>Clavibacter</i>)
Contaminants	TCE, DCE, VC, PAHs, PCBs, MTBE, creosote, >300 different compounds	TCE, DCE, VC, TNT	TCE, DCE, VC, 1,1-DCE, 1,1,1- TCA, MTBE	PCE, TCE, DCE, VC, Hexachloro- cyclohexane	BTEX, PCE, PAHs, Pyrene, Atrazine, TNT, etc.

Synergisme et consortium

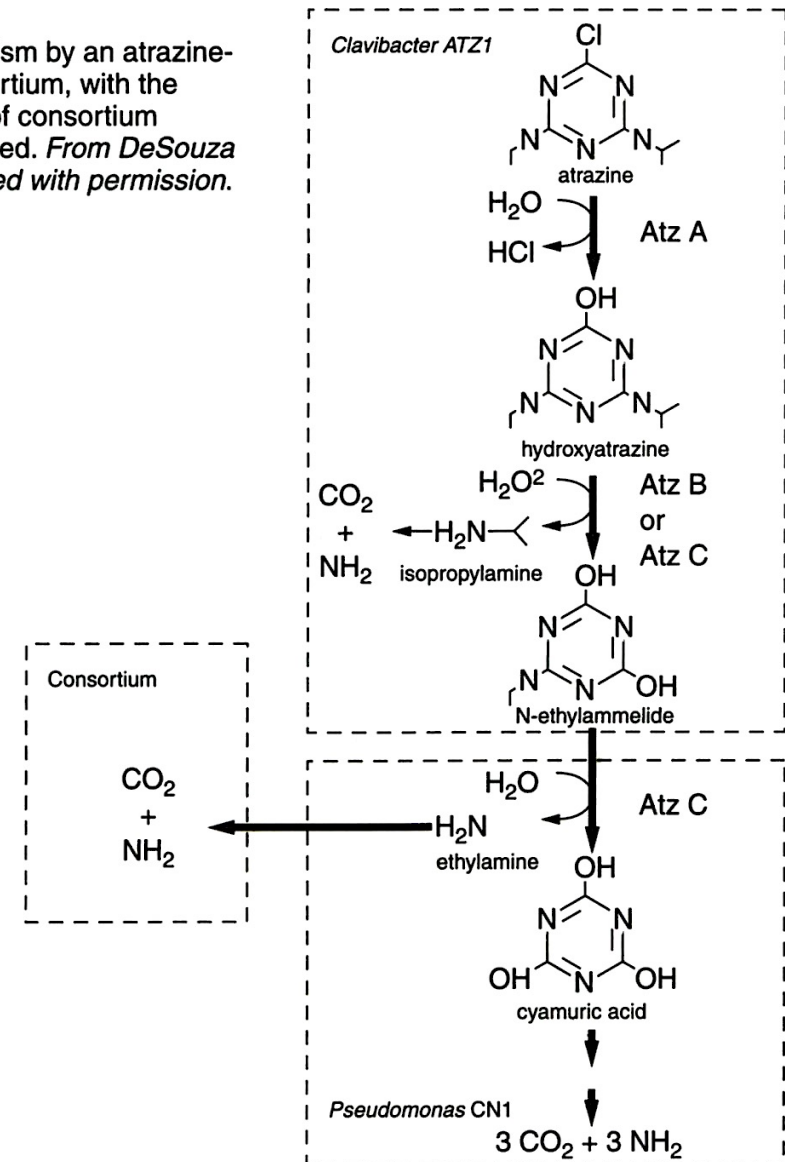
➤ **Synergisme:** les populations en présence bénéficient de l'association

ex: **consortium** bactérien dégradant et croissant sur atrazine (herbicide)

- *Clavibacter* ATZ1: dechloration + élimination chaînes latérales
- *Pseudomonas* CN1: clivage du cycle
- Autres membres du consortium : catabolisme alkylamines toxiques créés par déalkylation des chaînes lat: pas d'accumulation, pas de toxicité.

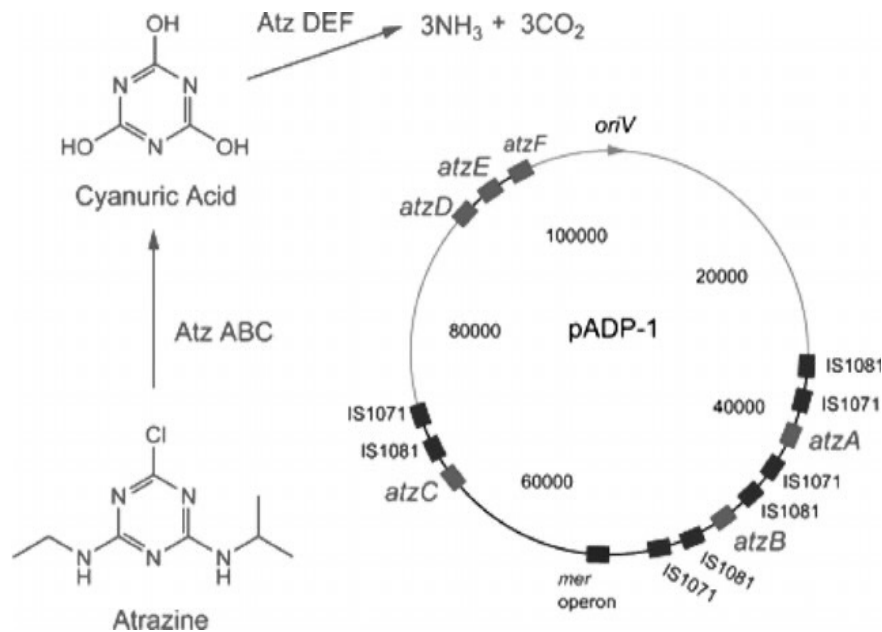
FIGURE 10-5

Atrazine catabolism by an atrazine-degrading consortium, with the individual roles of consortium members indicated. From DeSouza et al. (1998). Used with permission.



Années 90, isolement de souches capables de minéraliser atrazine à partir de sols présentant une dégradation accélérée.

Gènes de dégradation portés par les plasmides conjugatifs.



Utilisation de ces souches comme inoculum en bioremédiation (bioaugmentation)

- seules : risques de survie et/ou activité limitée
- en consortium : peut augmenter l'efficacité de dégradation MAIS pb de stabilité de l'association

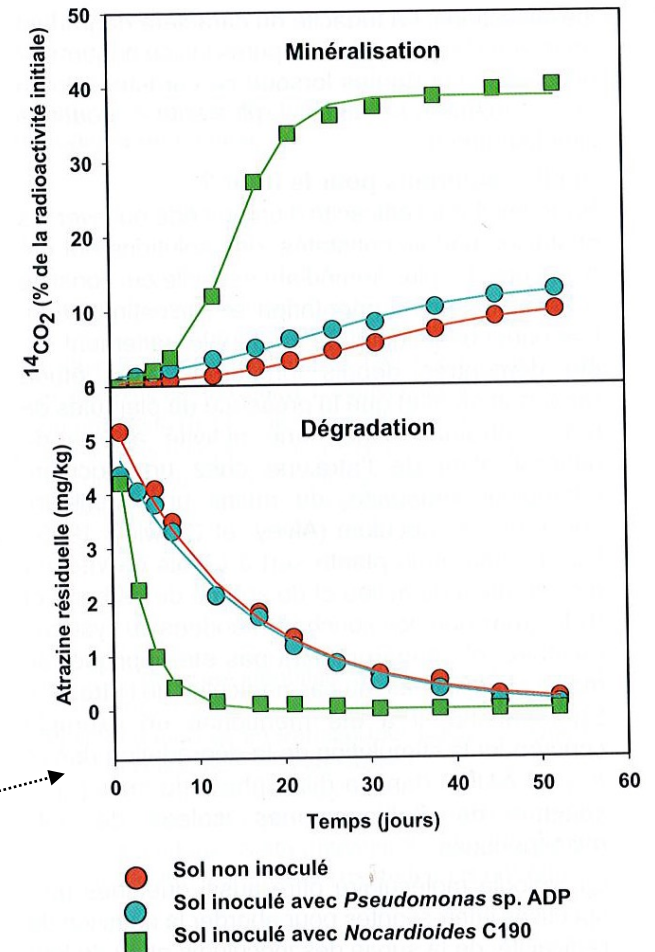


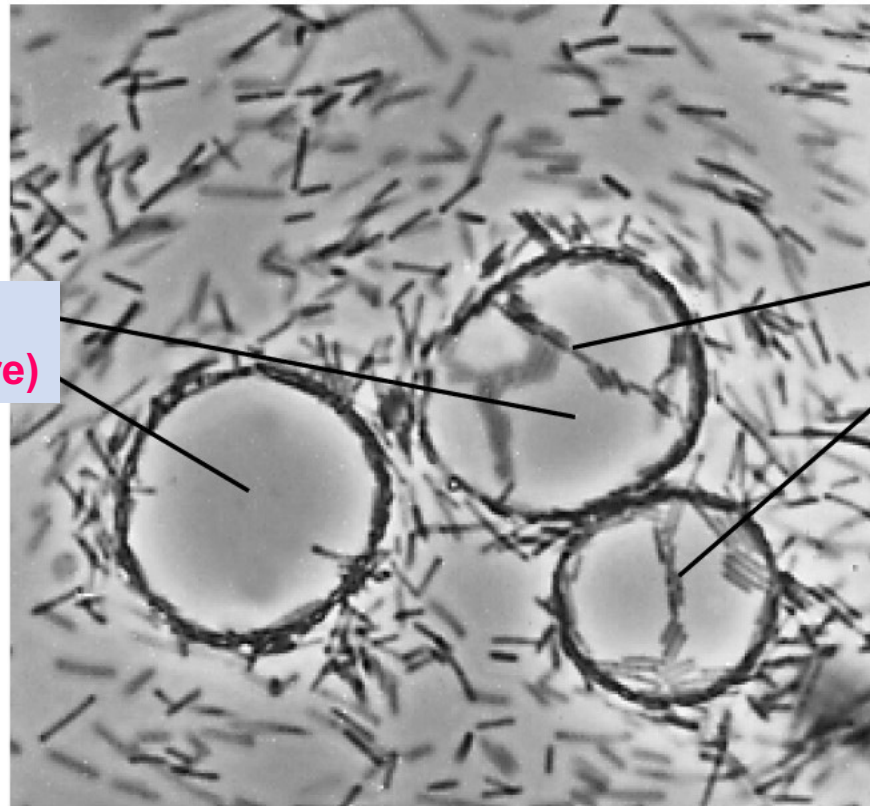
Figure 16-26 : Minéralisation et dissipation de l'atrazine dans un sol après inoculation avec deux souches microbiennes dégradantes. (Modifiée et redessinée d'après Topp, 2001).

Biodisponibilité du polluant

Comment assimiler des composés liquides non solubles ?

- Assimilation de la fraction soluble
- Contact direct avec des microgouttes dispersées en phase aqueuse (hydrophobicité de surface)

NAPL
(hydrocarbure)



bactéries

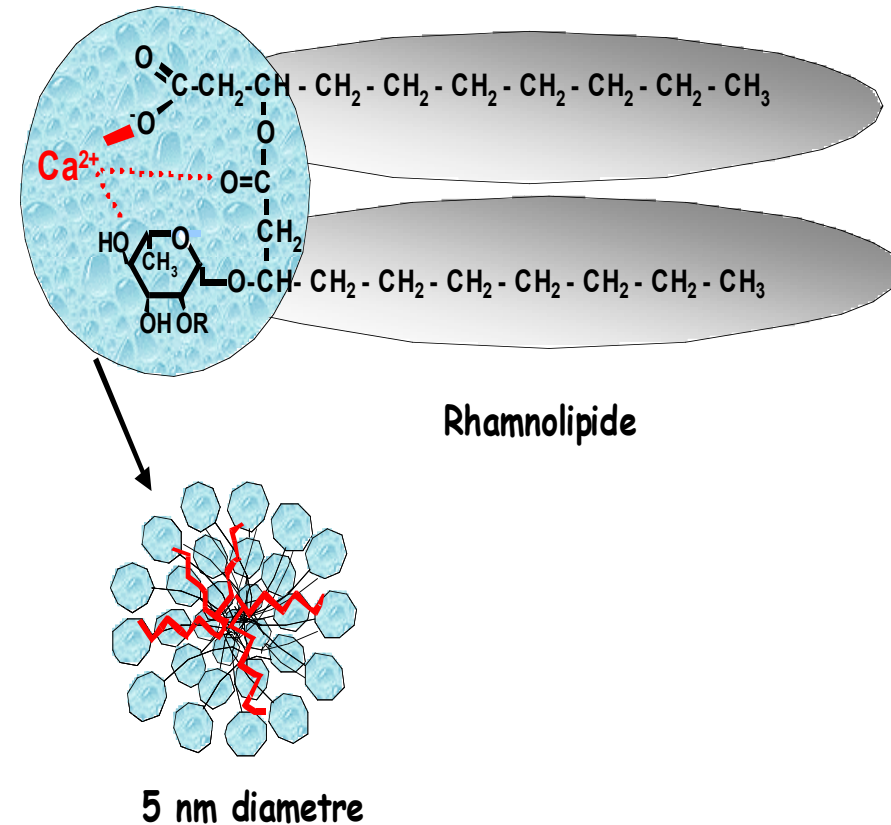
T. D. Brock

(NAPL: non aqueous phase liquid) ?

Biodisponibilité et biosurfactants

L'accessibilité des microorganismes aux composés hydrophobes peut être améliorée par la synthèse de **biosurfactants**.

- solubilité du composé (formation de micelles)
- hydrophobicité de surface de la bactérie facilitant le contact avec le composé (élimination du LPS de la mb. ext.)



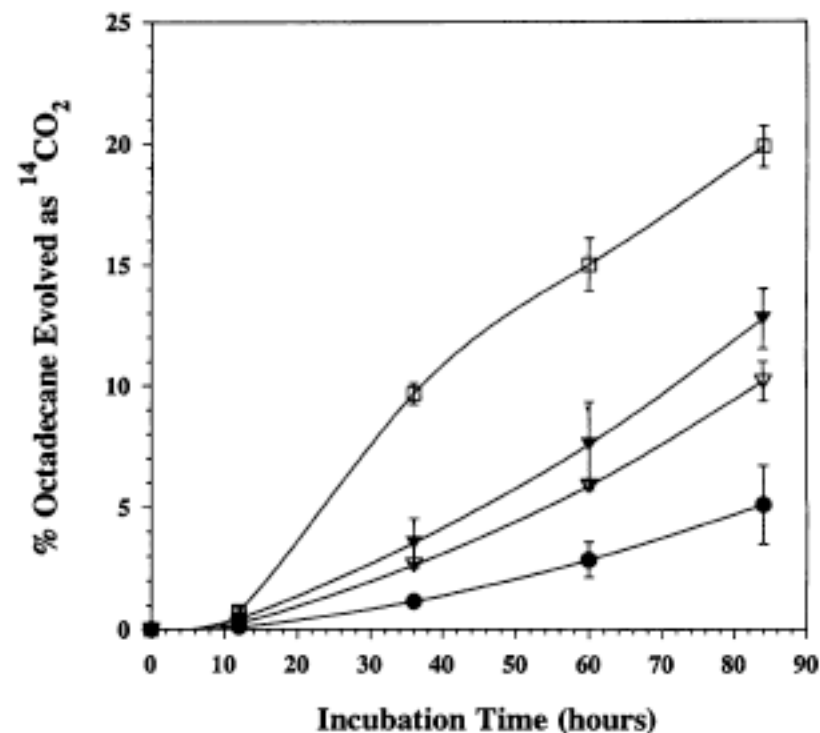
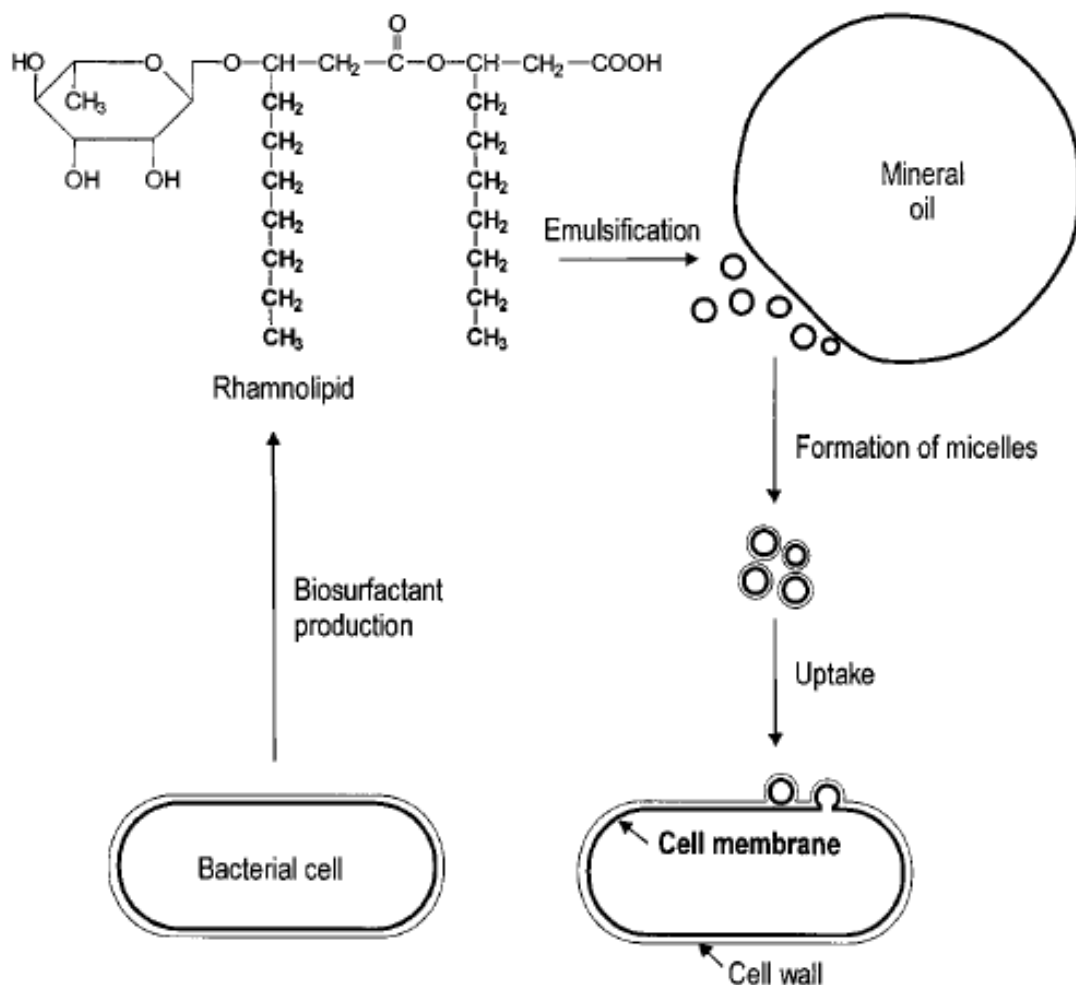
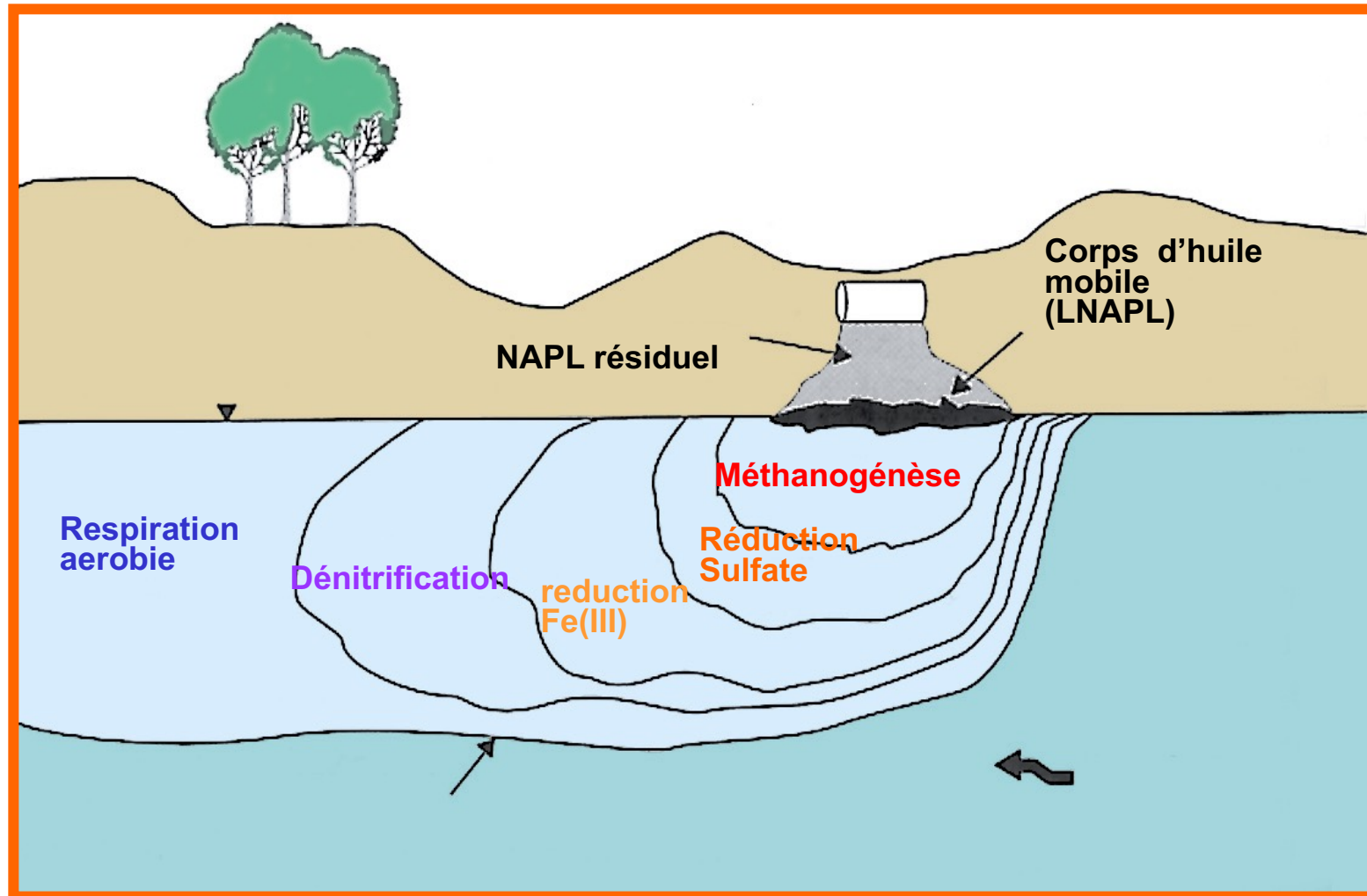


FIG. 7. Effect of rhamnolipid concentration on the mineralization of octadecane by *P. aeruginosa* ATCC 9027. A mixture of [^{14}C]octadecane (1.55 g/liter) and rhamnolipid was incubated in mineral salts medium with *P. aeruginosa* ATCC 9027 with gyratory shaking (200 rpm) at 23°C. Mineralization was measured as described in Materials and Methods. Symbols: ●, no rhamnolipid; ▽, rhamnolipid at 100 mg/liter; ▼, rhamnolipid at 125 mg/liter; □, rhamnolipid at 300 mg/liter.

Facteurs influençant la biodégradation : disponibilité en accepteur d'électrons

Formation de gradients de potentiel redox

(Adapté de Lovley et al., 1994b.)



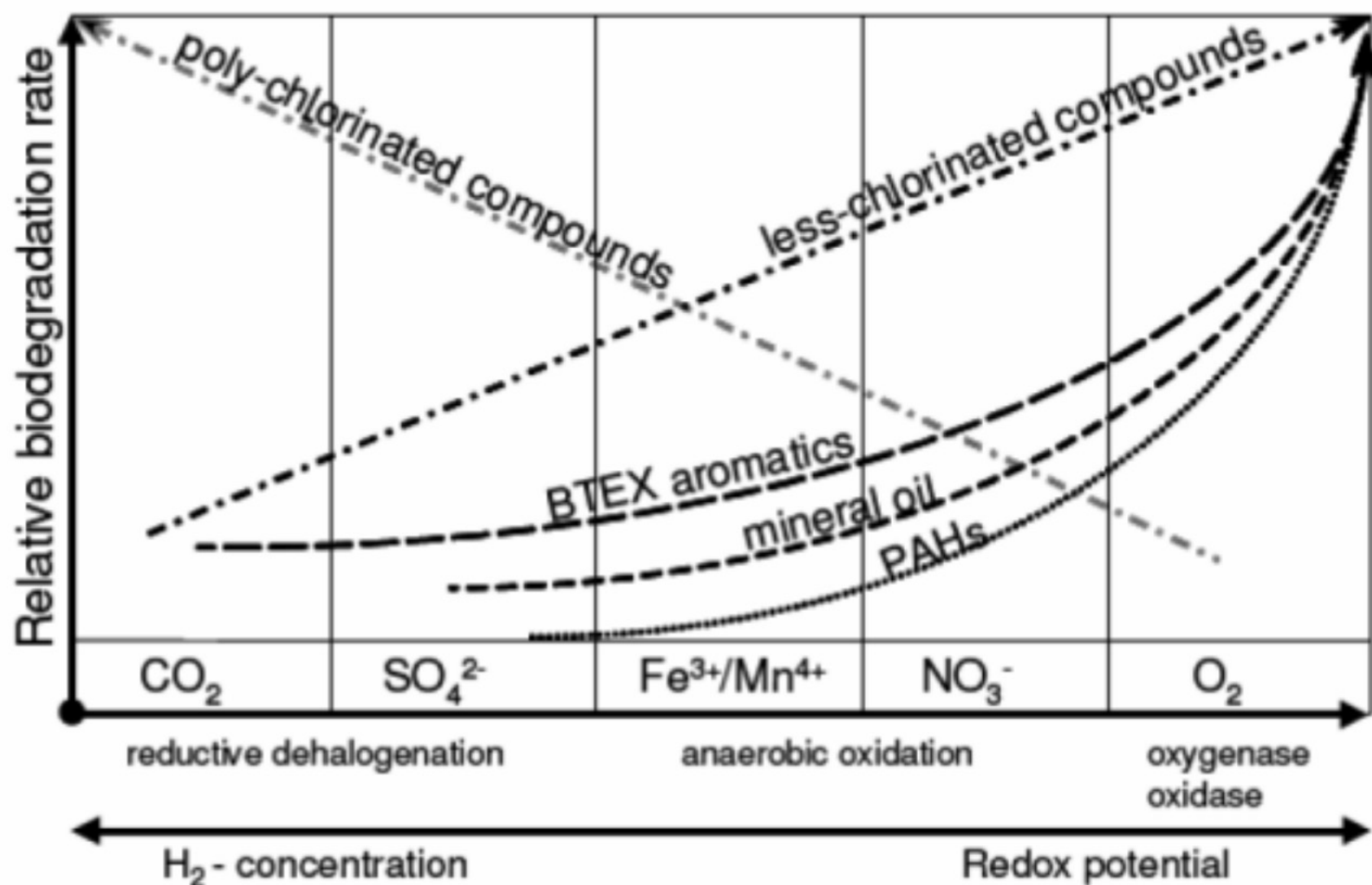


Figure 40 : Présentation des taux de biodégradation de différents polluants organiques en fonction des conditions d'oxydoréduction (Langenhoff, 2007)

Dépendance de la biodégradation / potentiel redox

Composés(s)	Aérobie	Anaérobie
Acetone	1	1
BTEX	1	2 à 4
HAP	1	3 à 4
PCB		
Fortement substitué	4	2
Faiblement substitué	2	4
Solvants chlorés		
PCE	4	1 à 2
TCE	3	1 à 2
DCEs	3	2 à 3
Chlorure de vinyle	1 to 2	3 à 4

1 biodegradable

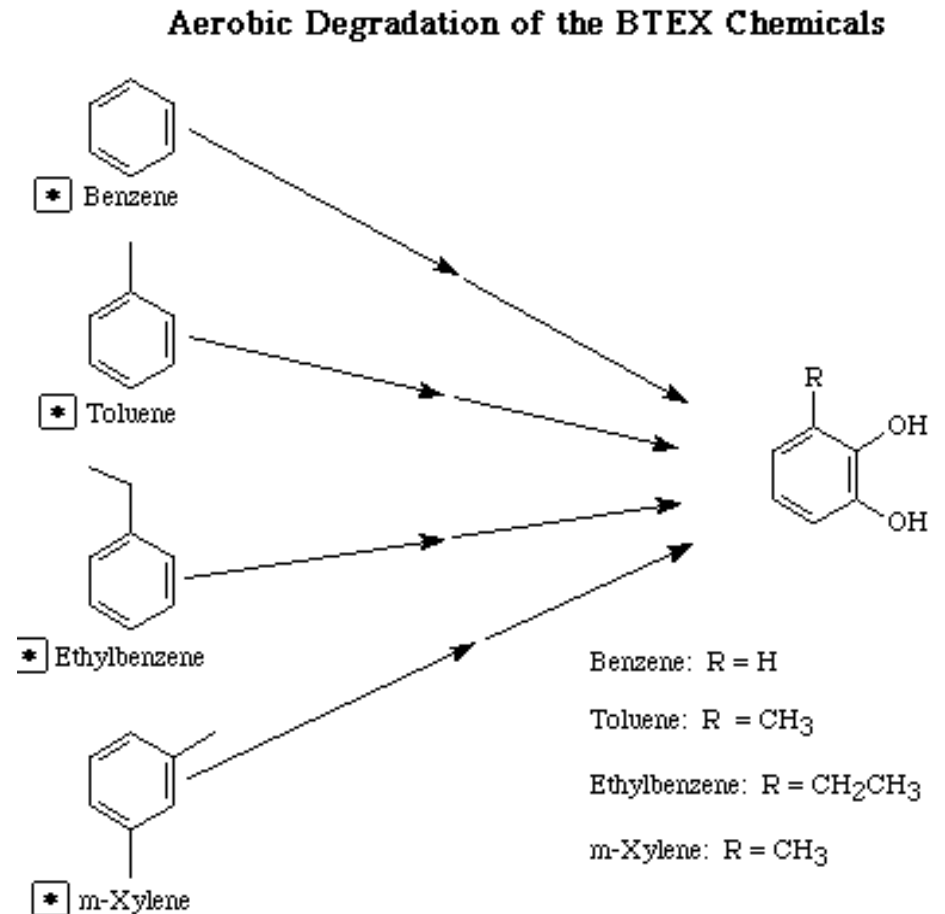
2 modérément biodegradable

3 lente biodégradation

4 non biodegradé

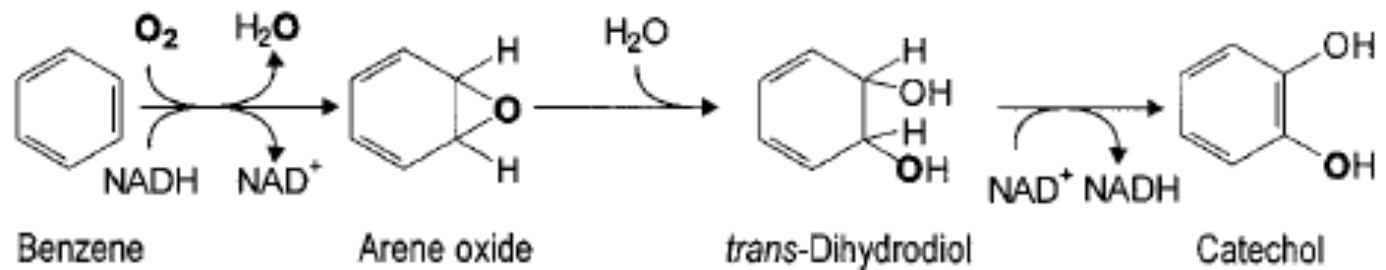
Dégradation des composés monoaromatiques

- **Composés** : Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylène, (BTEX), Phénols (substitués)
- **Processus aérobie**
 - Oxydation du noyau aromatique par une mono/dioxygénases
 - Ouverture du noyau par une dioxygénase en *ortho* ou *méto*
 - Produit de dégradation entre dans le cycle de Krebs

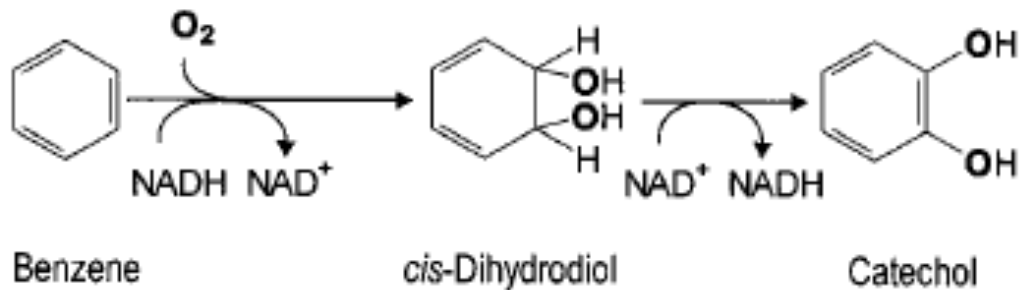


Monooxygénases - Dioxygénases

Monooxygenase reaction

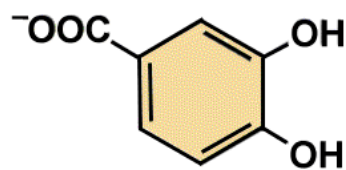


Dioxygenase reaction

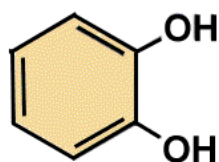


Produits d'oxydation des aromatiques

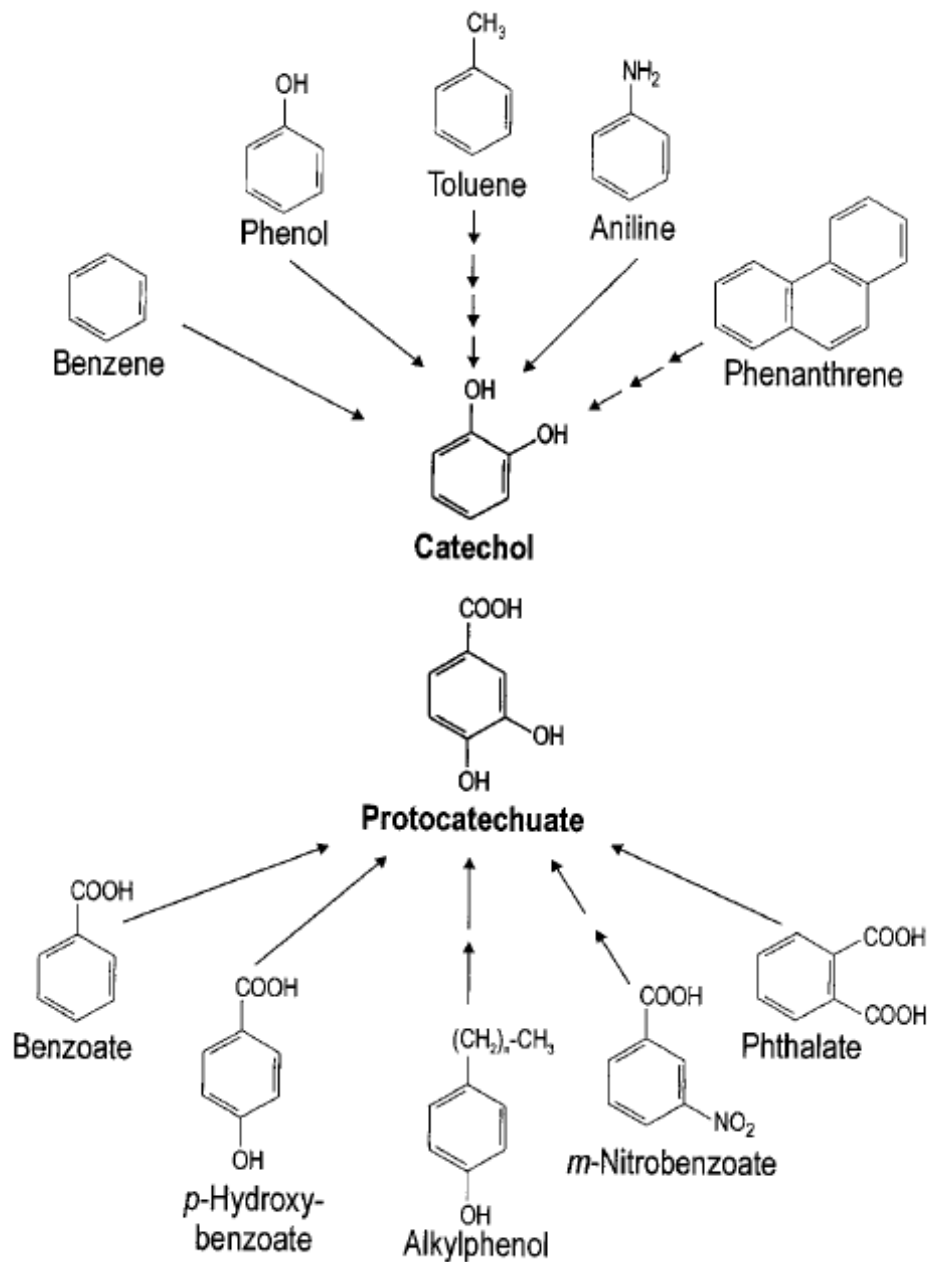
La dégradation de nbx aromatiques aboutit à intermédiaires centraux facilement métabolisé



Protocatechuate

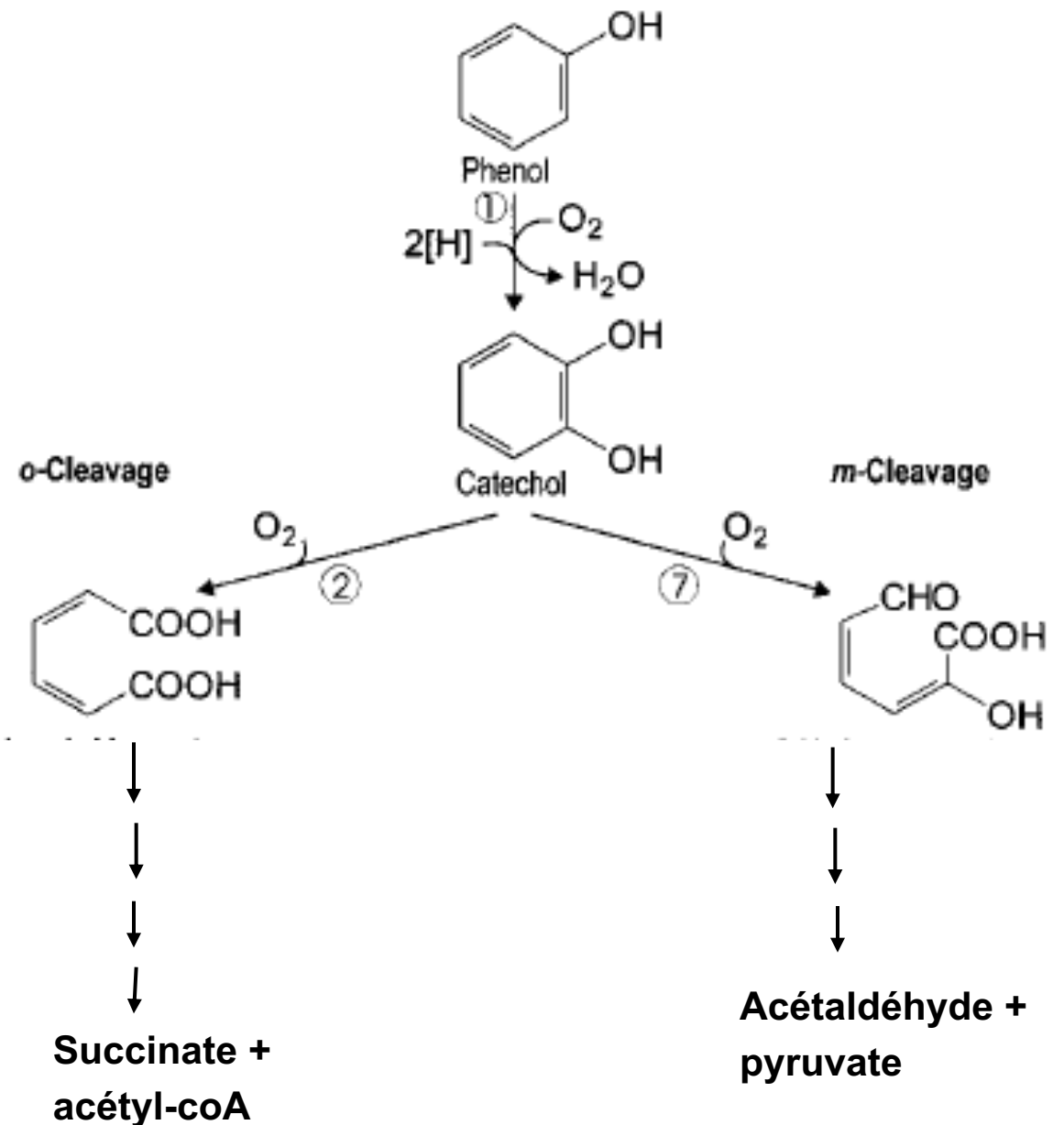


Catechol



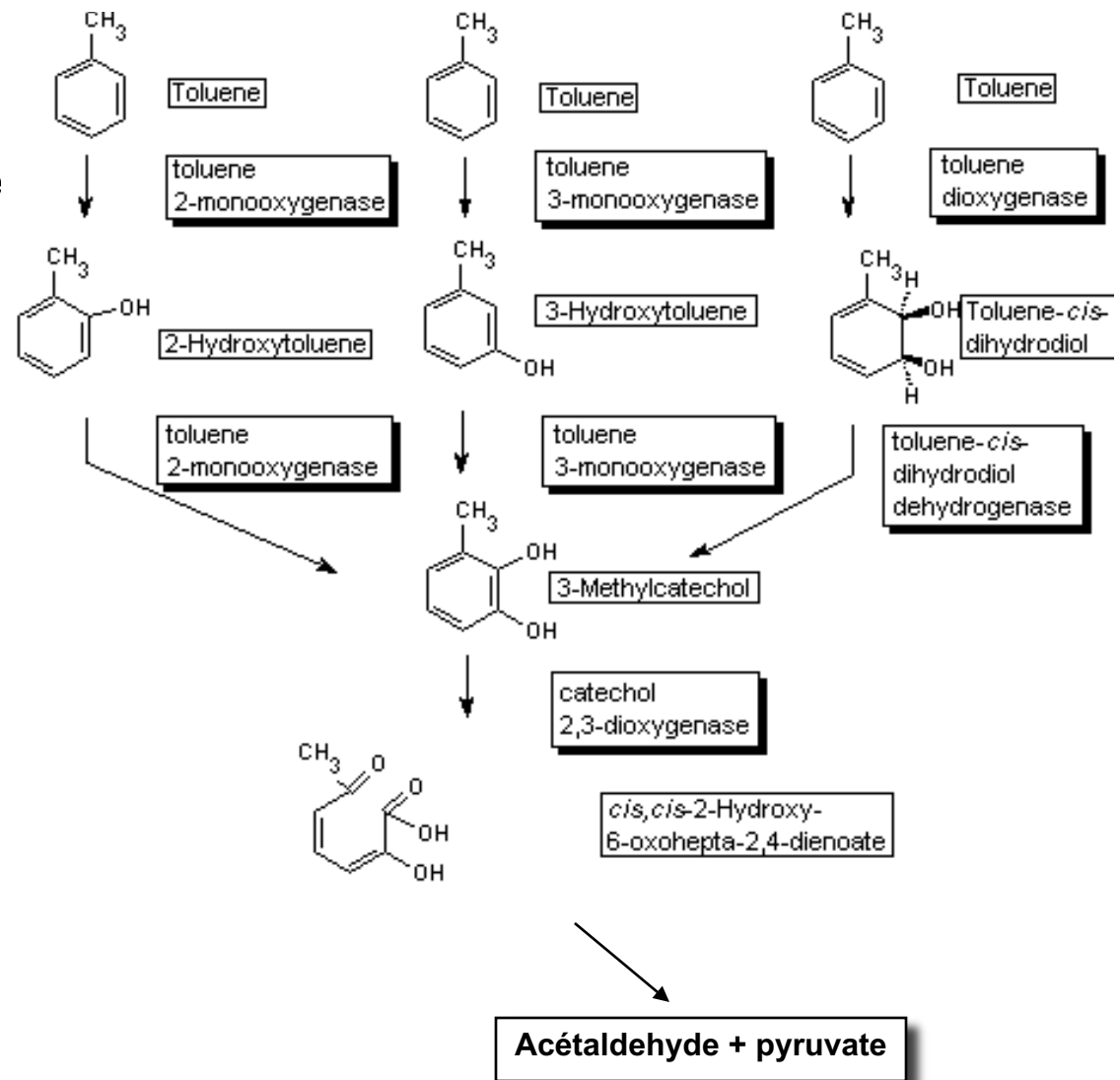
Ouverture du noyau / dégradation

Ouverture du cycle aromatique
en ortho ou méta
par une **dioxygénase**



Diversité des mécanismes de dégradation des aromatiques

- Dégradation du toluène par trois souche différentes de *Pseudomonas*



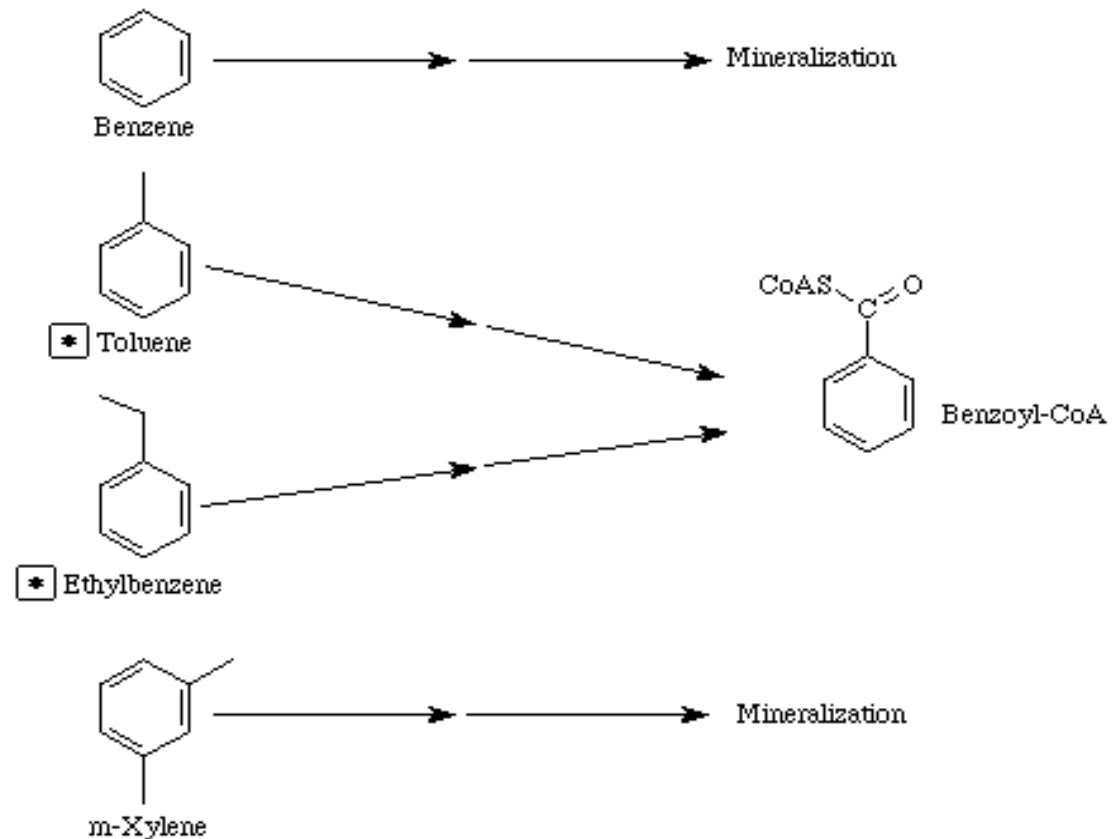
- Certaines dioxygénases ont une large spécificité de substrat

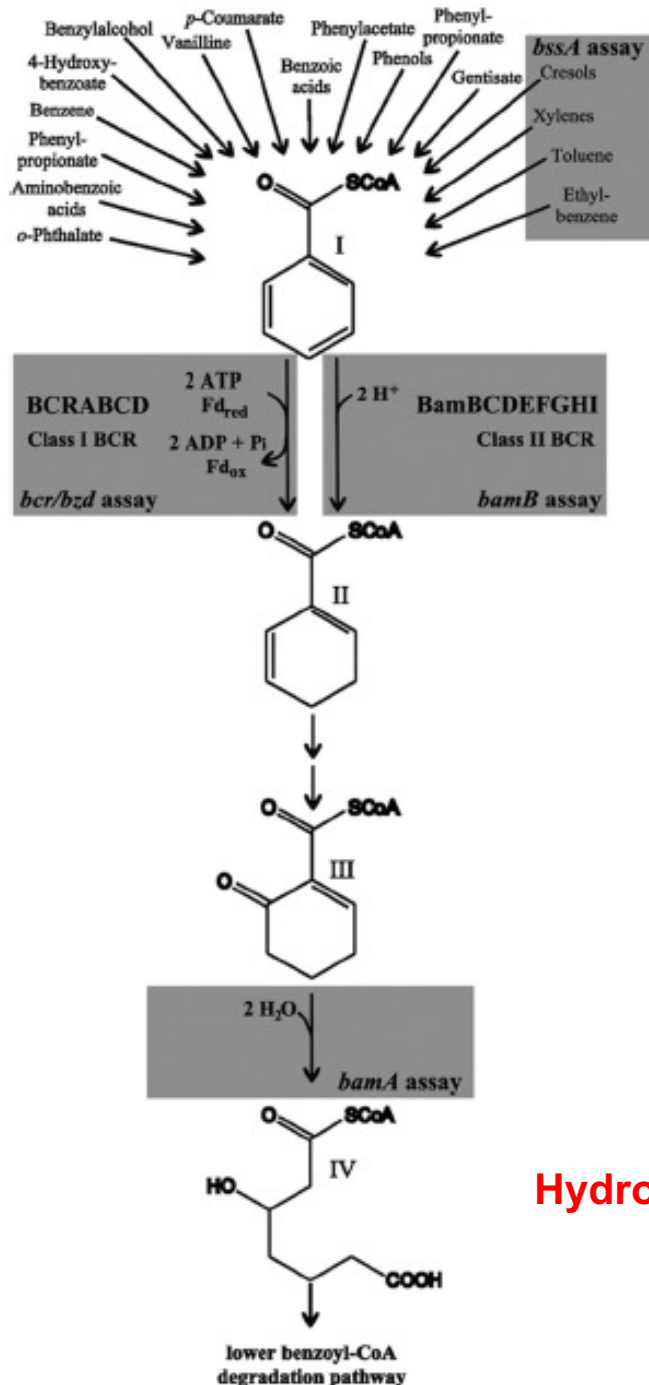
Ex: la TDO de *P. putida* F1 peut oxyder 109 substrats différents

Dégradation anaérobie des aromatiques

- Possibilité de dégradation par bactéries dénitrifiantes, sulfato- ou ferri-réductrices
- voie du benzoyl-CoA la mieux connue

Anaerobic Degradation of the BTEX Chemicals





Benzoyl succinate synthase (Bss)

Gènes fonctionnels cibles pour la détection de bactéries dégradant les aromatiques en anaérobie

Benzoyl coA réductases (Bcr; BamB)

FIG. 1. Degradation of selected aromatic compounds via the benzoyl-CoA degradation pathway and the availability of functional-gene-targeting assays. The *bssA*-targeting assay is applicable for detecting ACDA that degrade toluene and related alkylated aromatic compounds. The *bcr* and *bzd* assays target class I BCRs from facultatively anaerobic ACDA, and the *bamB* assay targets class II BCRs from obligately anaerobic ACDA. The *bamA* assay targets the ring-hydrolyzing enzyme present in all ACDA. Benzene is initially activated either via carboxylation to benzoate or via methylation to toluene; in each case, benzene will be degraded via enzymes of the benzoyl-CoA degradation pathway.

Hydrolase (BamA)

Oxydation anaérobie du benzène couplée à la réduction du Fe(III) dans un aquifère contaminé par du pétrole

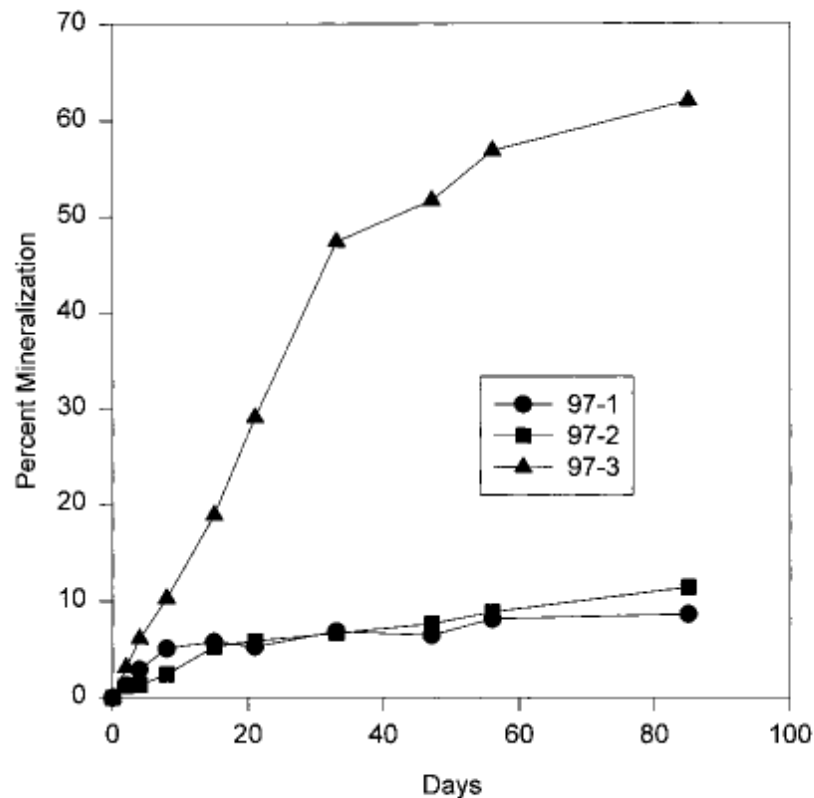


FIGURE 5. Anaerobic production of $^{14}\text{CO}_2$ from $[^{14}\text{C}]$ benzene in sediments collected from the Bemidji aquifer in 1997. The data are the means of triplicate determinations.

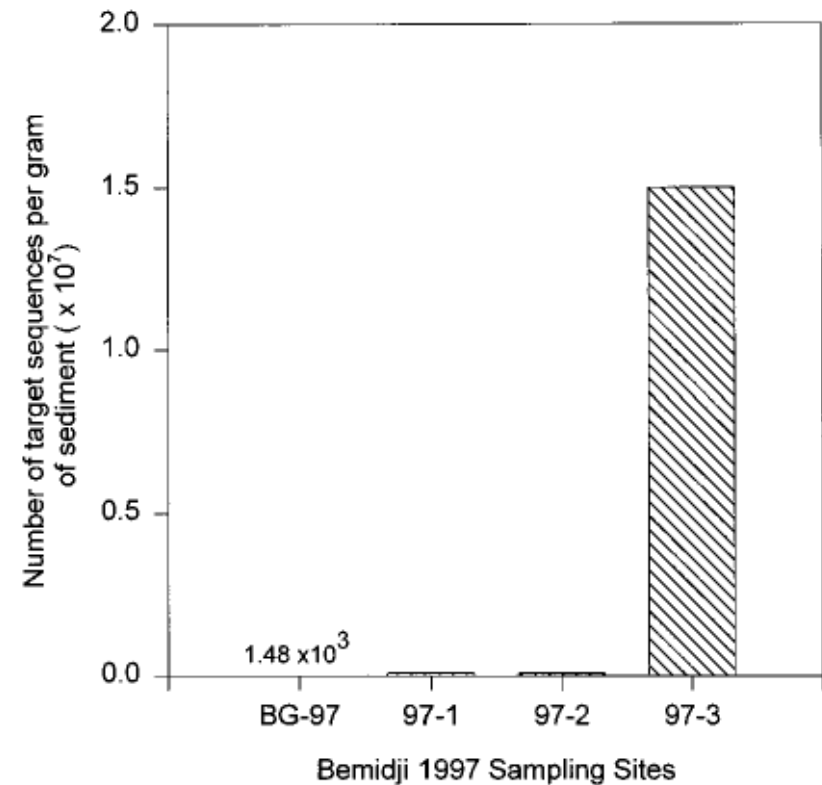
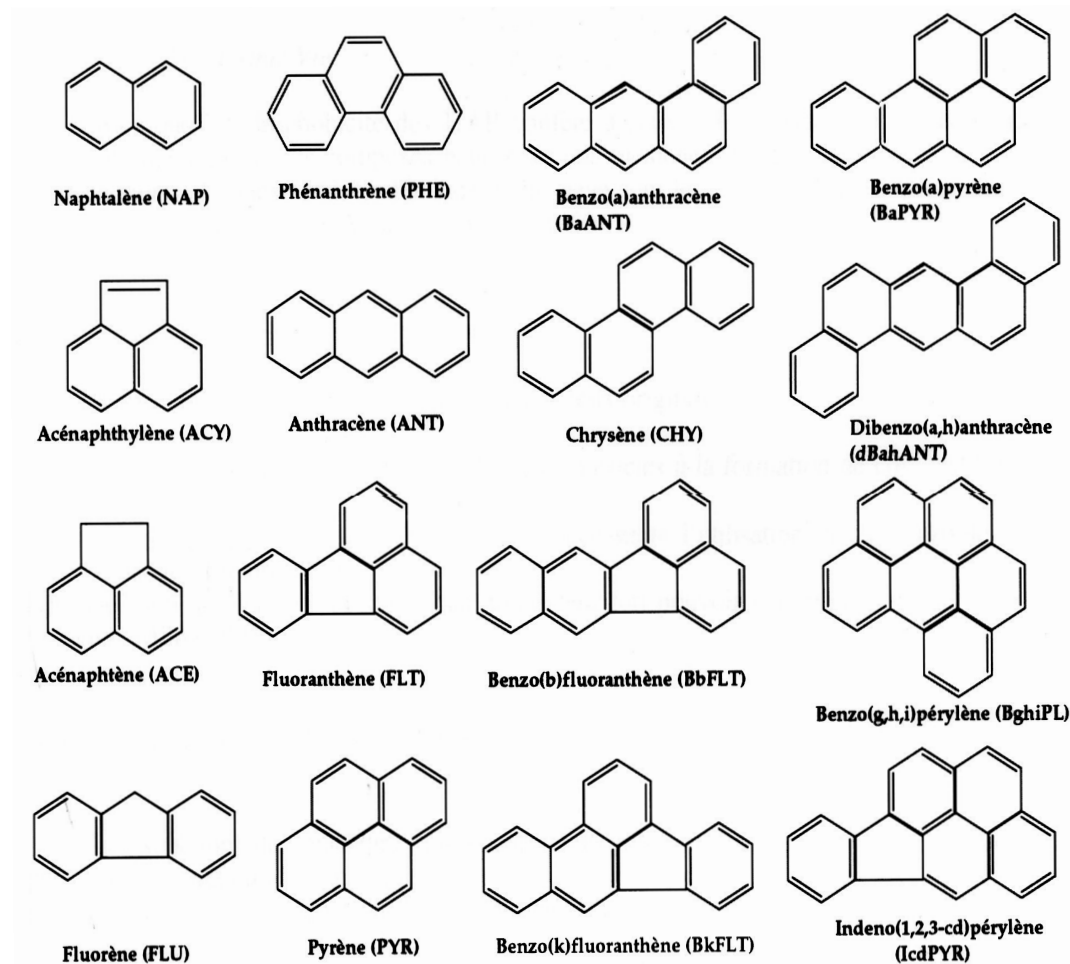


FIGURE 6. Numbers of target sequences per gram of sediment corresponding to members of the *Geobacteraceae* detected by MPN-PCR in Bemidji sediments collected in 1997. Samples 97-1, 97-2, and 97-3 are from contaminated Fe(III)-reducing sites whereas BG-97 is from an uncontaminated background site. Sample 97-3 is from the active benzene-degrading site.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

- Issus de la combustion incomplète de composés organiques, polluants ubiquistes
- Toxiques et potentiellement cancérigènes (> 4 cycles)
- Faible solubilité, forte hydrophobicité, certains volatils

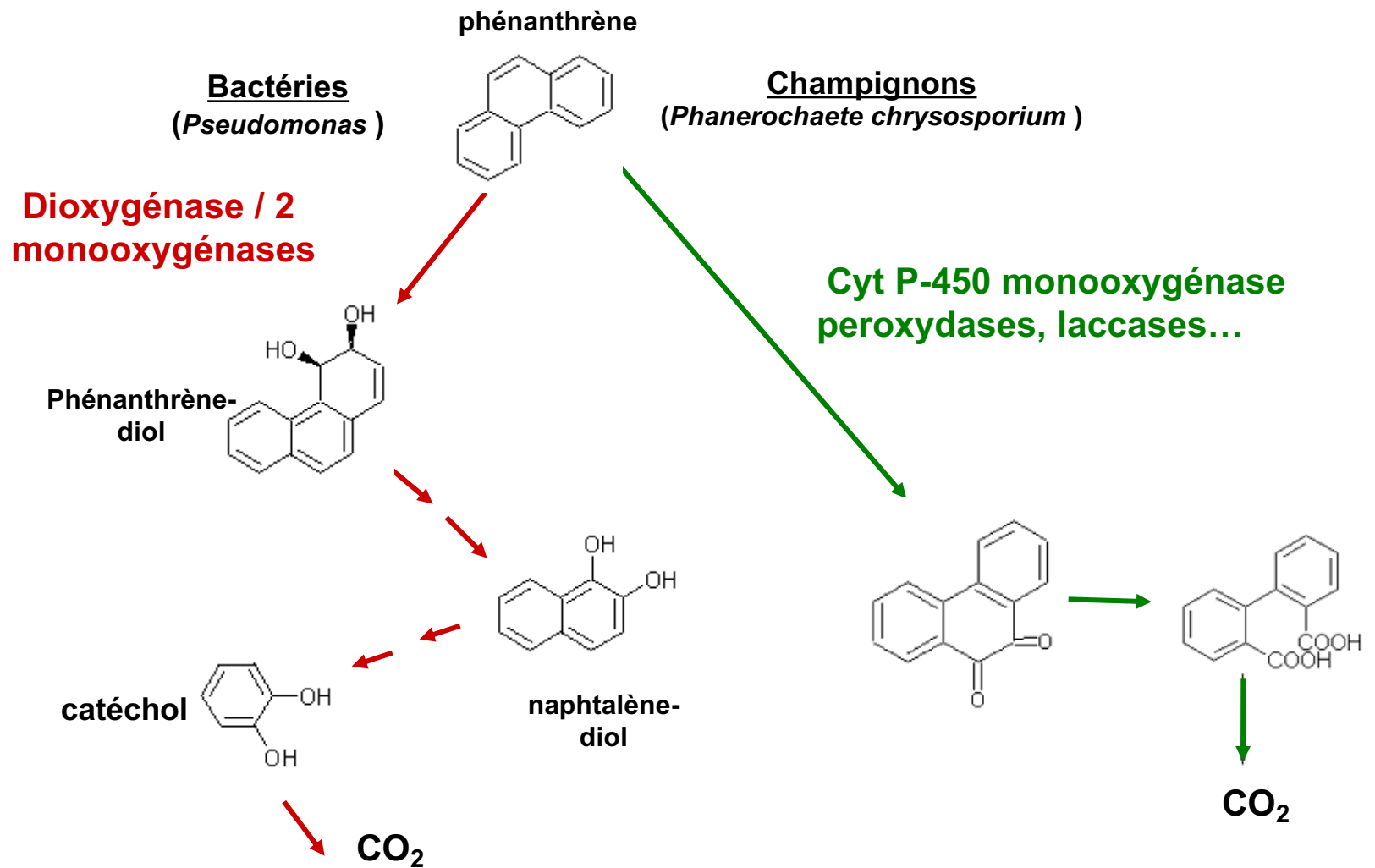


- Forte capacité de bioconcentration
- Adsorption aux particules du sol et MO : faible biodisponibilité, forte rémanence

HAP	Solubilité(mg l ⁻¹)	Log Kow	Temps de demi-vie - sol
Naphtalène	33	3,37	16-48 j
Fluorène	1,685	4,18	32-60 j
Phénanthrène	1,6	4,46	16-200 j
Anthracène	0,075	4,45	50 j-1,3 a
Fluoranthène	0,265	5,33	140 j-1,2 a
Pyrène	0,175	5,18	210 j-5,2 a
Benzo(a)anthracène	0,01	5,61	102 j-1,9 a
Chrysène	0,006	5,61	1-2,7 a
Benzo(a)pyrène	0,002	5,98	57 j-1,5 a
Dibenzo(ah)anthracène	n.d.	5,97	361 j-2,6 a
Benzo(a)fluoranthène	n.d.	6,57	360 j-1,7 a
Benzo(k)fluoranthène	n.d.	6,84	2,5-5,9 a
Benzo(ghi)pérylène	n.d.	7,23	0,25-1,8 a
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	n.d.	7,66	1,6-2a

Solubilité, hydrophobicité et persistance dans l'environnement des principaux HAP (rapport Agence de l'Eau, 1996)

Dégradation des aromatiques: bactéries vs mycètes



Exemple

- Sol contaminé par 3 HAP et amendé par
- sol anciennement contaminé HAP (ACS) ———
 - Boues de STEP compostées (SSC) ———
 - Paille de riz en décomposition (DRS) ———
 - Contrôle non amendé ———

Hamdi et al. 2007, SBB 39, 1926

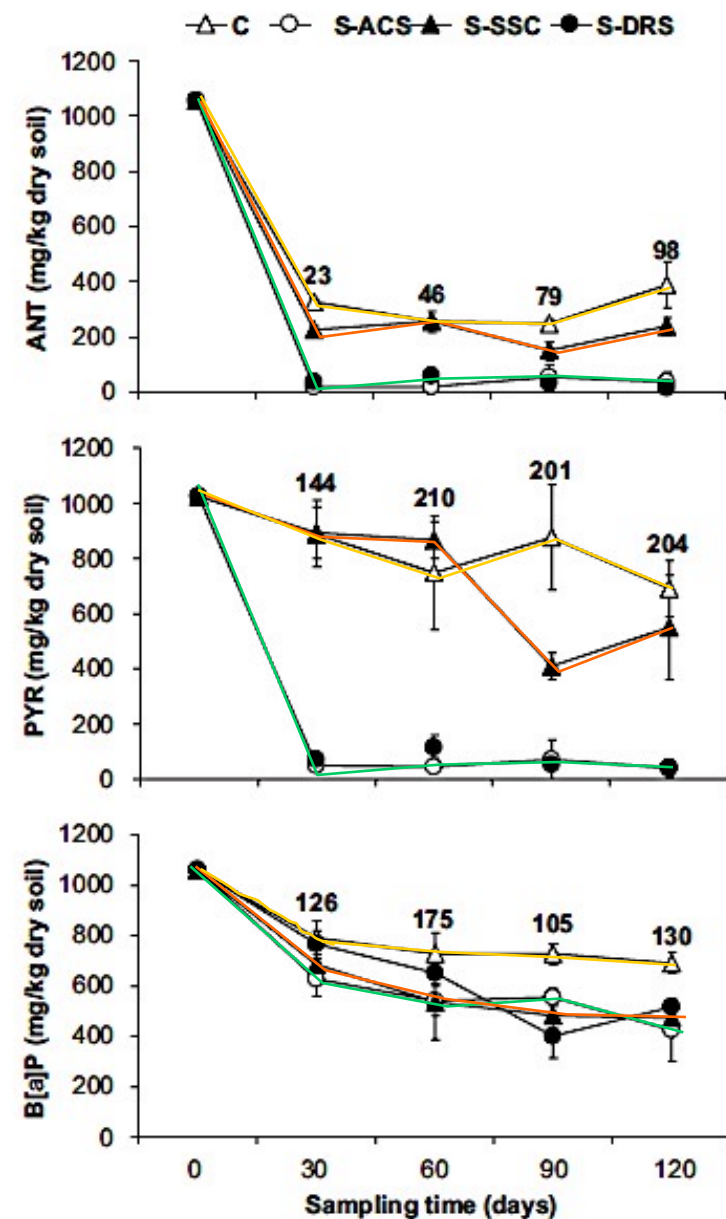
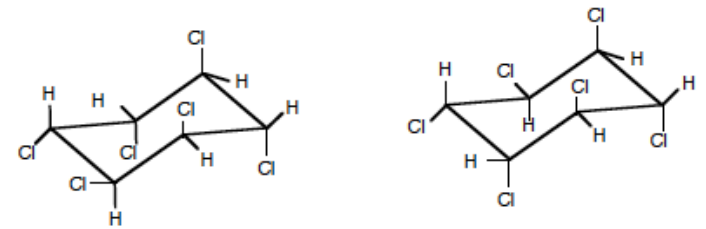


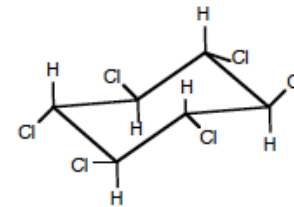
Fig. 1. Anthracene (ANT), pyrene (PYR) and benzo[a]pyrene (B[a]P) dissipation in soil as function of sampling time. PAH concentrations are means $\pm$ standard deviations of triplicate measurements. Numerical values for LSD are shown at each sampling time. Treatments are shown in the legend.

Dégradation de l'héxachlorocyclohexane (Lindane)

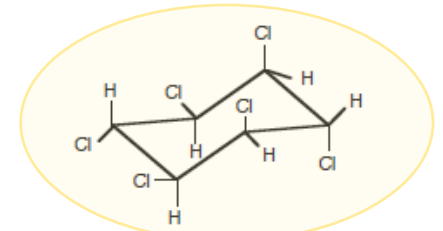
- HCH utilisé comme insecticide (phytophages, parasites...) depuis 1940
- 5 isomères stables diffèrent position Cl / cycle
- Purification γ -HCH (= lindane, seul isomère à potentiel insecticide) génère 90% déchets toxiques svts déversés illégalement ds envt (estimé 4-6 Mt en 2008)
- Cancérigène possible - neuro/reprotoxique
- Peu soluble (7 mg/l) - persistant (1/2 vie sol = 30 -300j)
- Dégradation anaérobie incomplète, aboutit à chlorobenzène



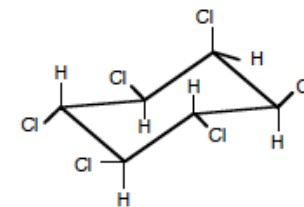
α -HCH isomers



β -HCH



γ -HCH
Lindane

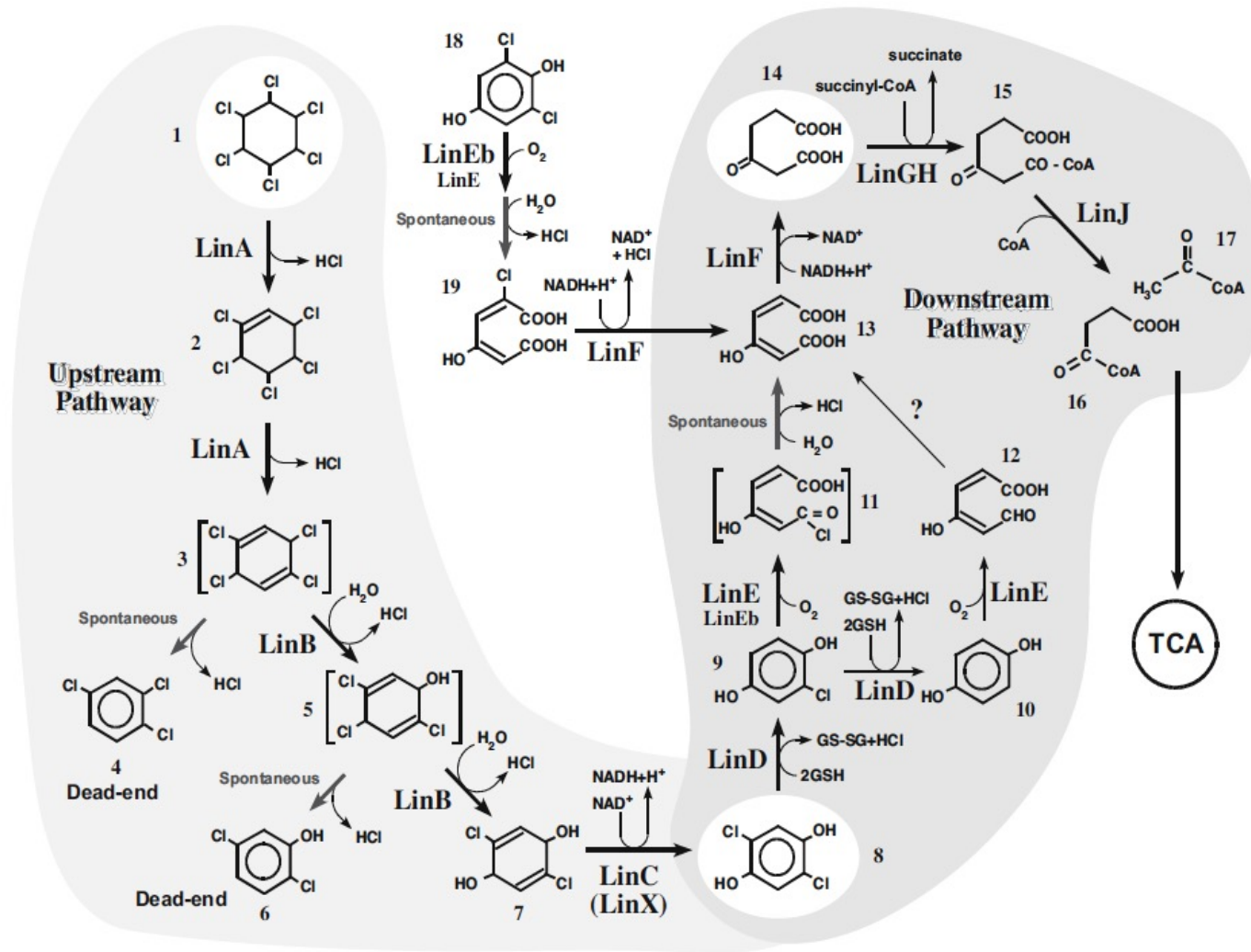


δ -HCH

Dégradation aérobie du lindane

Sphingobium japonicum UT26

- Plupart souches dégradant membres *Sphingomonadaceae* (30 isolats env.)
- Une seule voie connue impliquant LinA à LinJ, LinX, régulateur LinR et un transporteur ABC (LinKLMN)
- Gènes *lin* très conservés malgré origines diversifiées



Evolution du système *lin*

Acquisition rapide (<50 ans) des voies cataboliques impliquant transferts horizontaux

- Fortes similarités de séquences entre gènes *lin* de différentes espèces
 - ex: *linA*, *linB* et *linC* de *Sphingobium* UT26 et *Microbacterium* sp. ITRC1
 - %GC *linA* différent de %GC des autres gènes *lin*, suggérant une origine différente

- Nbx gène *lin* portés par des plasmides et/ou associés à IS6100
- Dispersion gènes *lin* sur le chromosomes et/plasmides

-IS6100 associé à duplications (*linA* avec specif. substrat diff) - assemblage de gènes *lin* en opérons en cours

→ système *lin* encore en pleine évolution –
Recrutement des voie métaboliques chez *Sphingomonadaceae* serait due à préexistence des voies aval chez certains isolats

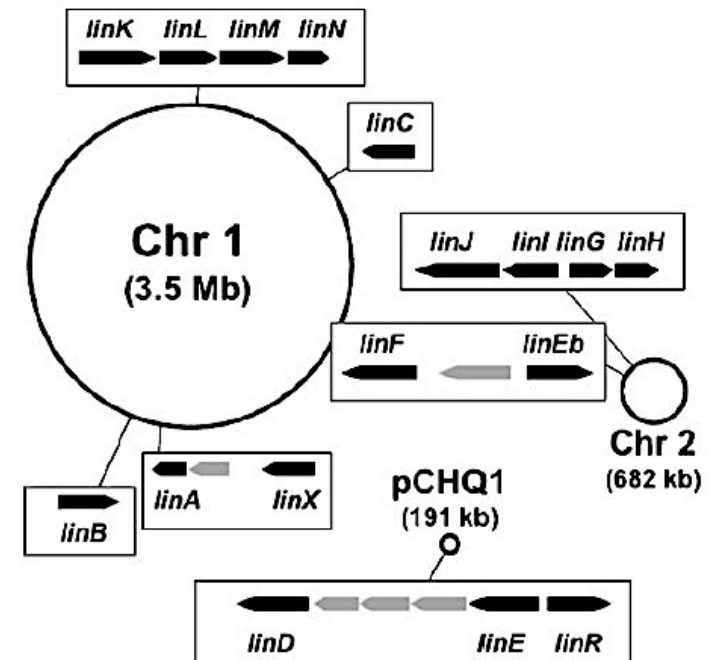
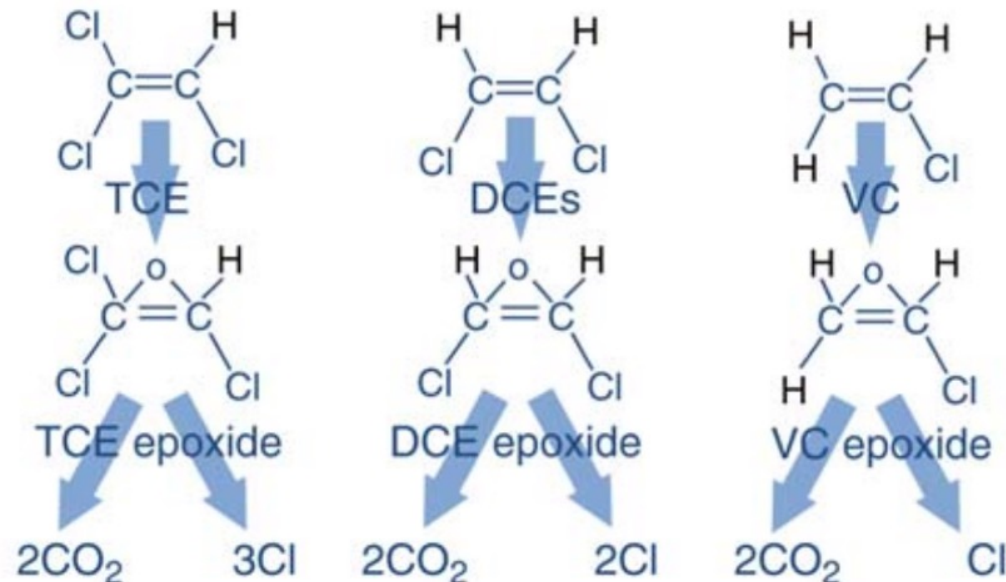


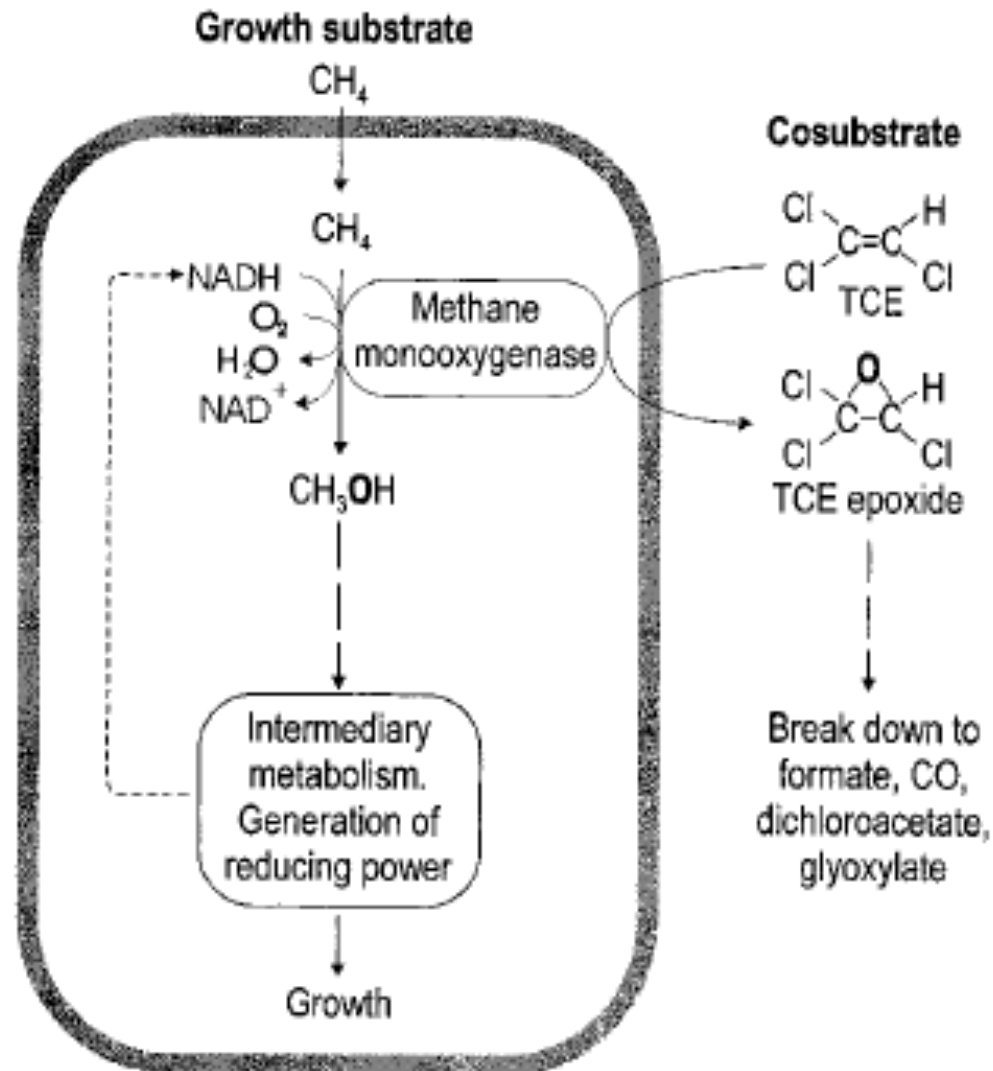
Fig. 2 Distribution of *lin* genes on three main replicons of UT26 genome. Organizations of *lin* genes are shown in boxes. Black and gray arrows indicate *lin* genes and open reading frames whose functions are unclear, respectively. The open reading frame between *linF* and *linEb* encodes a LysR-type regulator (a PcpR homologue; Endo et al. 2005)

Biodégradation des solvants chlorés

- **Composés** : , perchloréthylène (PCE), trichloréthylène (TCE), dichloréthylène (DCE), trichloréthane, dichlorométhane, chloroforme... Solvants, dégraissant, diluant peinture: polluants courants
- **Dégradation aérobie** : cométabolisme
 - Bactéries méthylophiles (méthane monooxygénase)
 - Bactéries dégradant les aromatiques (toluène monooxygénase)
 - Bactéries nitrifiantes (ammonium monooxygénase)



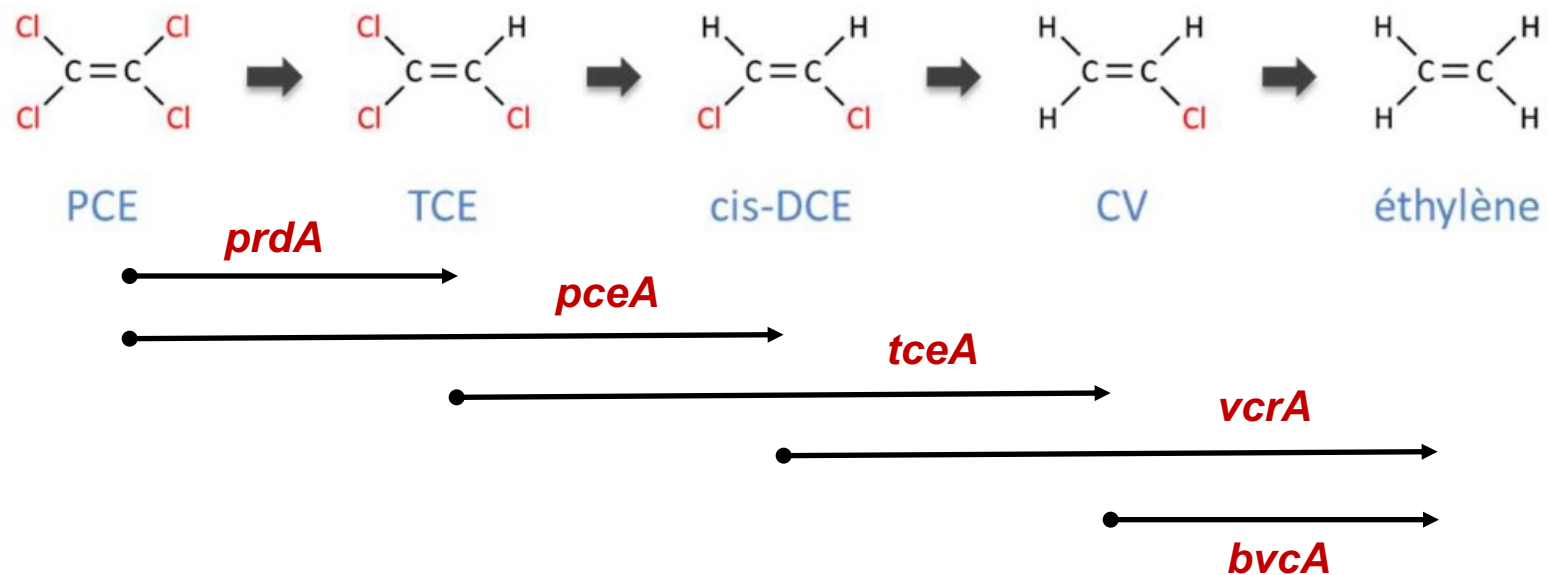
Dégradation par cométabolisme du TCE par une bactérie méthylotrophe



Dégradation anaérobie des solvants chlorés

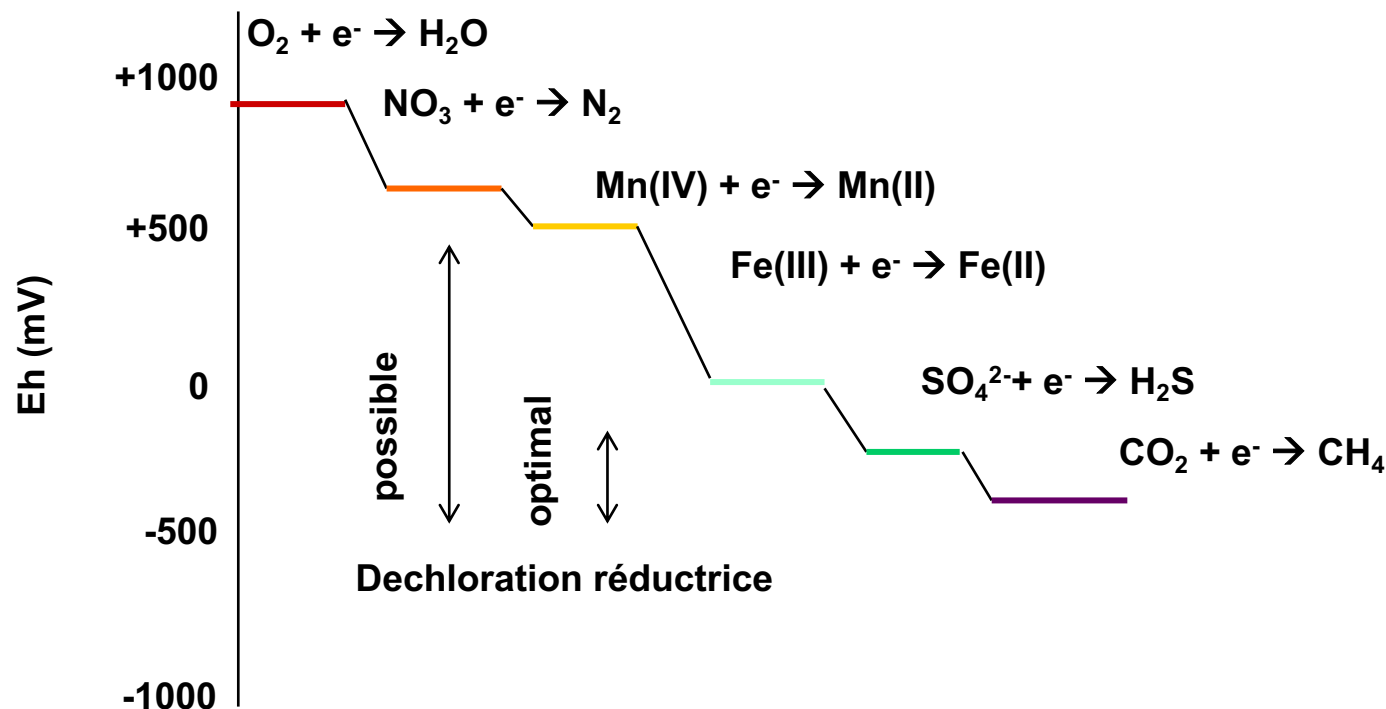
Dégradation anaérobie : déhalogénéation réductrice

- Bactéries méthanogènes, dénitrifiantes, sulfatoréductrices
- Utilisé comme accepteur final d' électron (**déhalorespiration**). Elimination Cl par **déhalogénases**
- Besoin d' un donneur d' e- (acétate, H₂...)



Réaction rarement totale, accumulation d' intermédiaires toxiques (ex: chlorure de vinyle)

Indicateurs de dégradation anaérobie des solvants chlorés



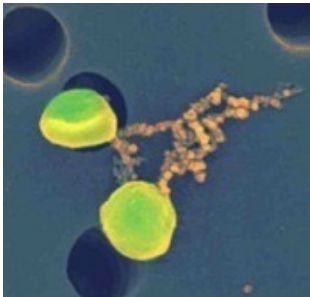
- Conditions anaérobies: O_2 faible et présence de $Fe(II)$
- Indicateur de fermentation : présence de CH_4 et H_2
- Présence de produits de dégradation: DCE, CV, concentration en chlore élevée

Table 1. Indicators/methods applied for the investigation of organohalide degradation *in situ* (adapted from Bombach *et al.* 2010).

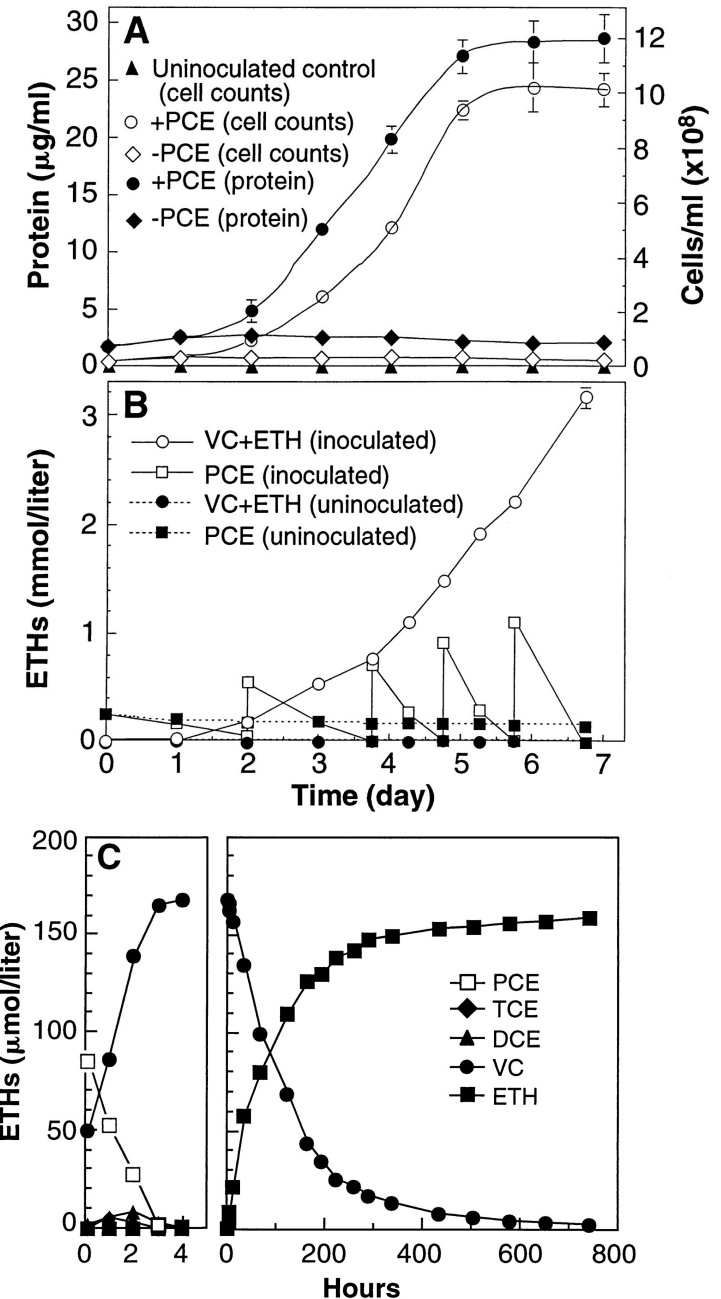
Approach/ concept	Direct/ indirect proof	Indicators and principle	Advantage	Challenges
Hydrochemistry Redox processes	Indirect	Presence of methane, sulphide and reduced iron (FeII), low redox and absence of oxygen indicate anoxic conditions required for reductive dehalogenation	Easy to analyse (iron, sulphate, nitrate etc.)	Process may be linked to other substrates
Contamination pattern	Direct	Concentration decrease may be a result of degradation but also dilution or sorption	Easy to analyse (GC-FID/MS; HPLC, etc.)	Co-contaminations, decrease of concentration due to sorption, dilution, etc.
Metabolite detection	Direct	Detection of dehalogenation products such as TCE, DCE, VC and ethene	Proof for pathway	Metabolite may be present as co-contaminant or as degradation product from multiple processes
Compound-specific stable isotope analysis	Direct	Enrichment of heavy stable isotopes (^{13}C , ^2H , ^{37}Cl) indicates degradation of the compound; in reductive dehalogenation correlated with a depleted signature in the final product	Qualitative and potentially quantitative assessment of biodegradation	Equipment not universally accessible and applicable; complementary methods needed for quantitative assessment; reference laboratory studies not always available; isotope compositions of intermediates are difficult to interpret
Biomarker/molecular biology PCR/qPCR	Direct	rRNA and rRNA genes of OHRB	Rapid identification of organisms present	Not or only an indirect indicator of activity; only known organisms and genes can be detected
FISH	Direct	Fluorescent <i>in situ</i> hybridisation, microscopic detection of labelled microorganisms; possibility to label specific groups of microorganisms and/or genes	Direct visualisation of microorganisms present	Challenging for <i>Dehalococcoides</i> spp. due to low amount of target
Metagenomics	Indirect	Sequencing of the extractable DNA from the bacterial community of the site	Primer-independent detection/relative quantification of known dehalogenating bacteria and resp. enzymes	Handling and processing of large datasets
Metaproteomics	Direct	Analysis of enzymes present	Direct evidence of functionality	No methods available/published so far for complex natural environments
Tracer experiments Application of <i>in situ</i> stable isotope tracers (BACTRAP)	Direct	Detection of the incorporation of a stable isotope label (^{13}C) into biomass or metabolites	Direct evidence for use as growth substrate (analysis biomass), pathways (metabolites, protein-SIP), identification of microbial community involved (DNA/RNA SIP)	Only usable if the contaminant is used as the carbon source; still under development
Ex situ Laboratory microcosms with spiked organohalides	Direct evidence for the potential	Dehalogenation products	Direct evidence for the potential capacity of the <i>in situ</i> community	Long time frame; change of environment (laboratory vs. <i>in situ</i>)

Dehalococcoïdes

- Genre bactérien « spécialisé » dans la déchloration réductrice
- *D. ethenogenes* : première espèce décrite pour réduire totalement PCE et TCE en éthylène (*strain 195*).
- Anaérobie stricte, H₂ donneur d'e- et acétate source de C – généralement en consortium avec autres bactéries anaérobies fermentaires, BSR, méthanogènes
- Utilisés dans des processus de bioremediation : biostimulation ou bioaugmentation



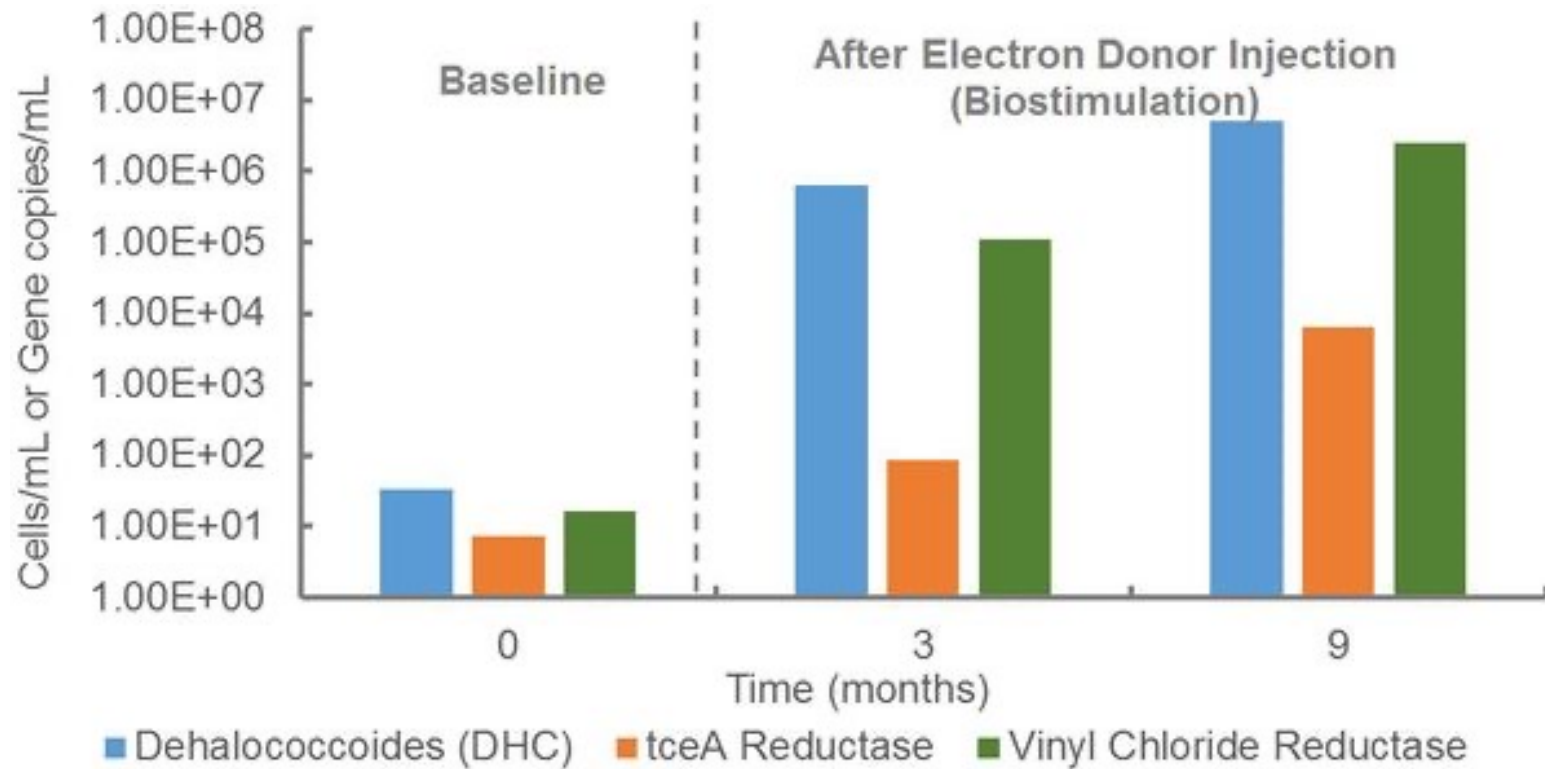
Dehalococcoides sp. FL2
(loefflerlab.ce.gatech.edu)



-Biomarqueur d'atténuation de la pollution

Quantification des populations de *Dehalococcoides*

Quantification de gènes de déhalogénases (RDase)



Traitement anaérobie de nappes contaminées par des solvants chlorés

Injection source de C
zone contaminée
→ Création de
conditions
ana érobie

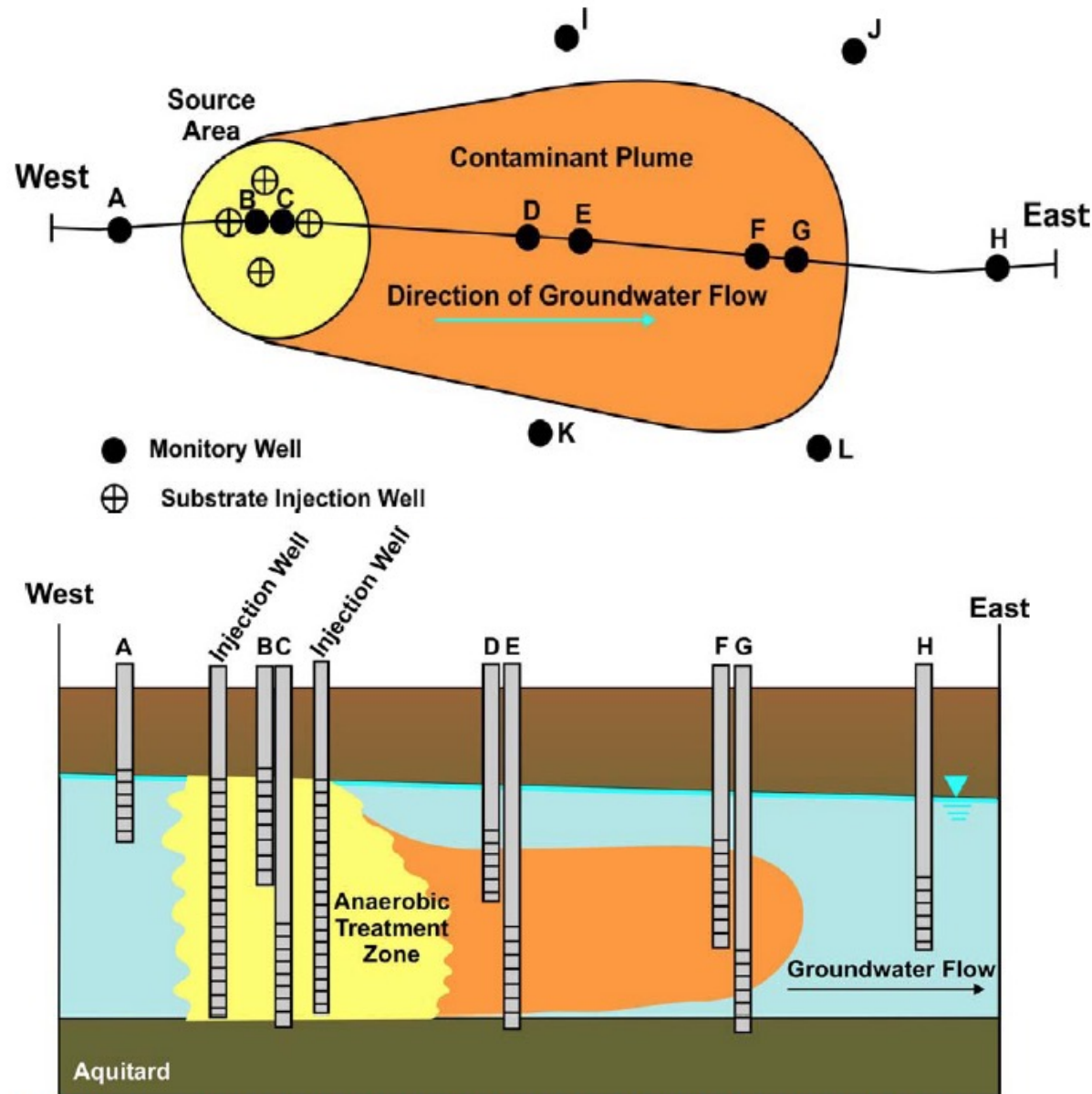


Figure 6.2 Cross-Section View of a Monitoring Well Network for Enhanced Bioremediation

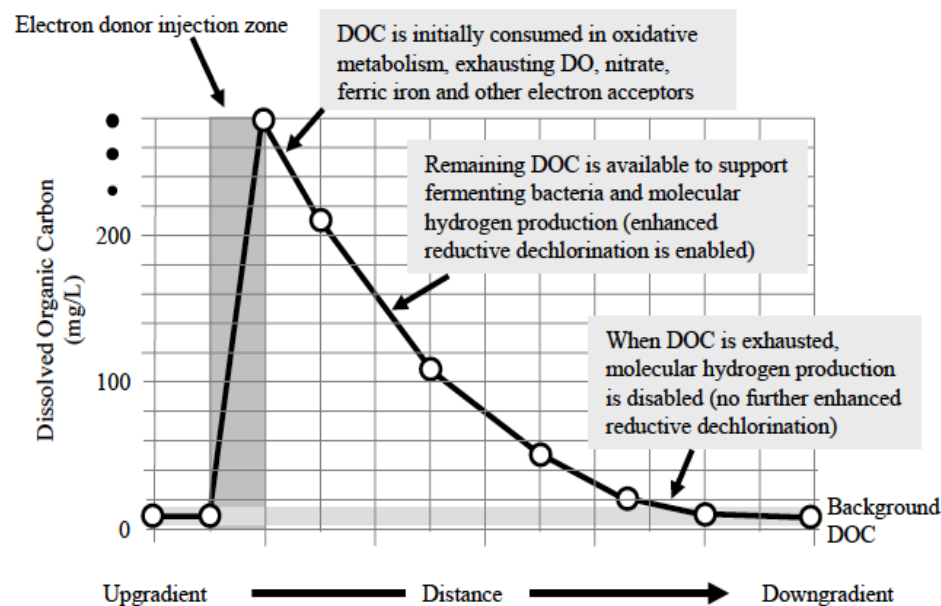


Figure 5-2. Substrate concentrations along the groundwater flow path.

Enhanced reductive dechlorination (ISB of DNAPL) is based on the injection of organic carbon in various forms to achieve DOC concentrations that significantly exceed background levels. Consumption of the carbon exhausts electron acceptors such as DO, nitrate, ferric iron and sulfates. DOC that remains supports fermenting bacteria that form molecular hydrogen, the foodstock of bacteria that dechlorinate solvents such as PCE and TCE.

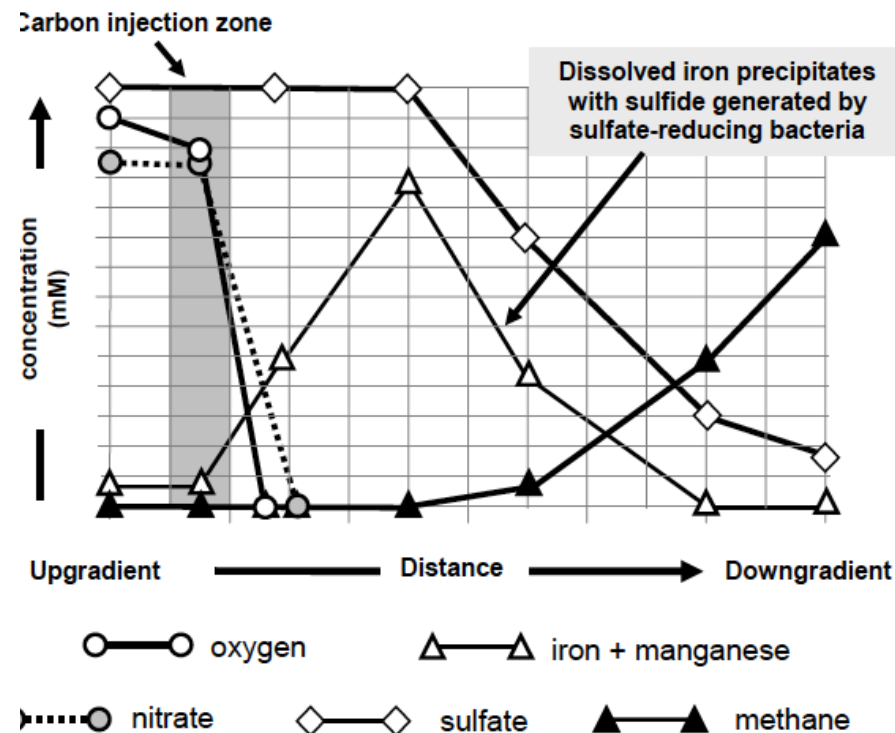


Figure 5-3. Patterns in redox indicator concentrations associated with the enhanced reductive dechlorination process.

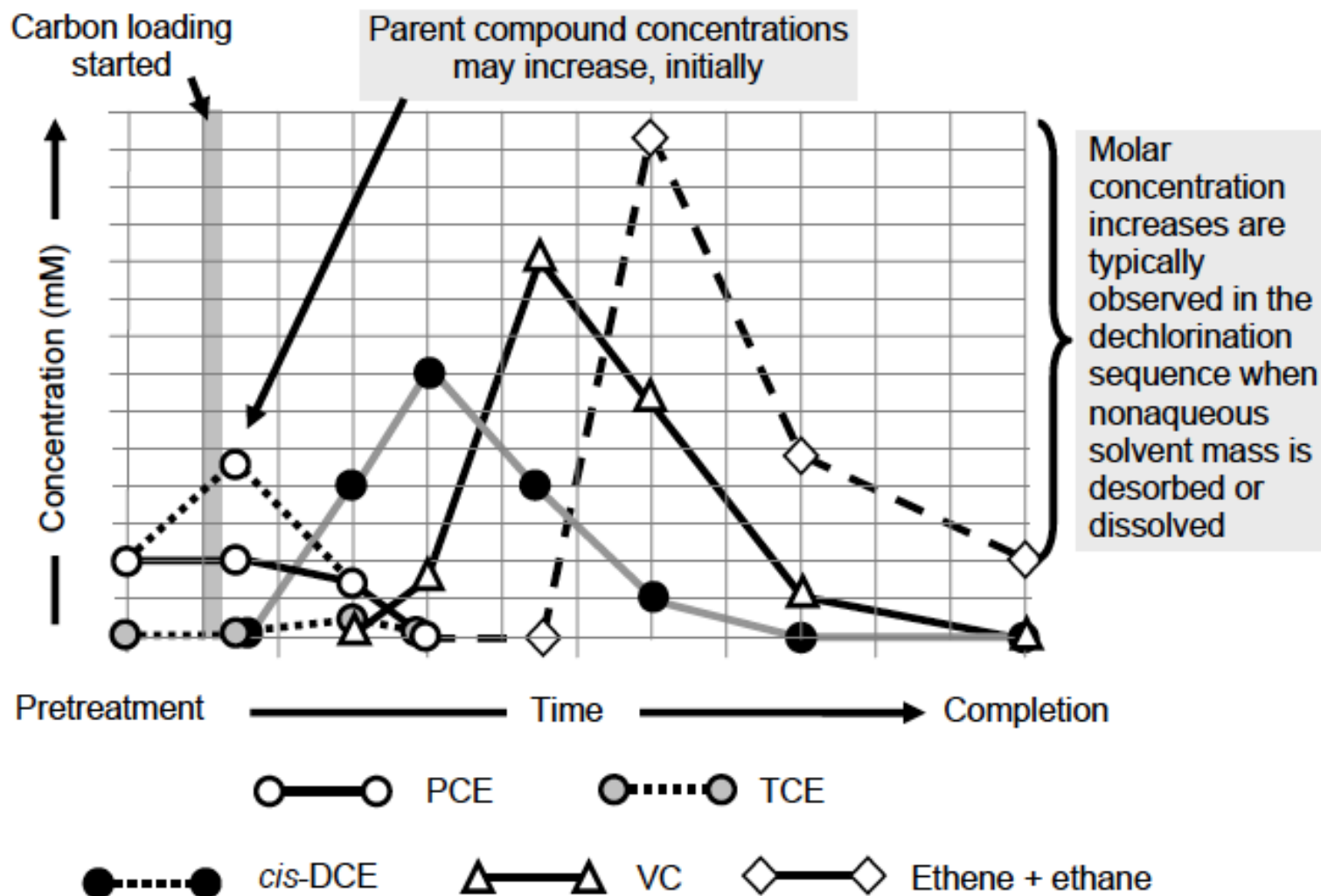


Figure 5-5. Concentration patterns in the chlorinated ethene dechlorination sequence typically observed when DNAPL source mass is dissolved or desorbed during ERD.

PROCEDES DE DEPOLLUTION BIOLOGIQUE DES SITES ET SOLS CONTAMINES

Dépollution - Réhabilitation : techniques destinées soit :

- à éliminer les polluants
- à immobiliser / stabiliser les polluants

afin de limiter leur transfert aux chaînes trophiques

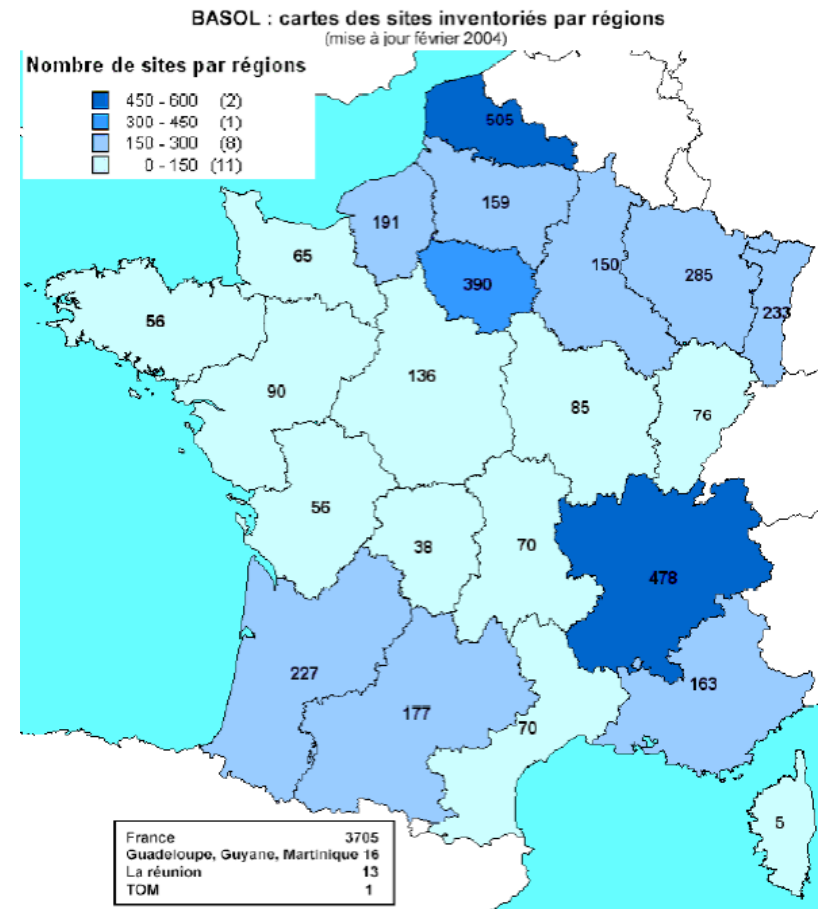
Les techniques :

- Physiques ou chimiques
 - **Confinement et stabilisation**
 - **Incineration, gazéification, volatilisation**
 - **Lessivage, ozonation, floculation**
- Biologiques :
 - **micro-organismes (90%) et les végétaux (10%)**



Pollution et Contamination

- En France, >4000 sites industriels (potentiellement) pollués (<http://basol.developpement-durable.gouv.fr/>)
- **Contamination:** Accroissement de la concentration d'un composé dans l'environnement
- **Pollution :** Contamination importante présentant des risques
 - pour les organismes vivants (toxicité)
 - dans l'usage habituel de l'environnement
 - pour le fonctionnement de l'écosystème



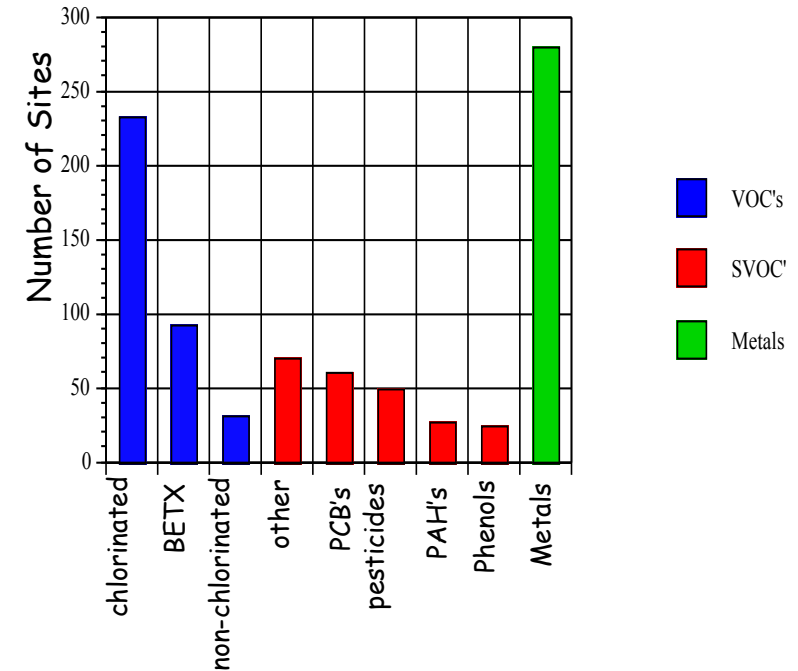
Sources majeures de contaminants

➤ Industries

- Gaz, Raffineries
- Usine thermique, métallurgie
- Chimie industrielle
- Industrie du bois

➤ En général

- Mélange de produits chimiques
- Organique et inorganique
- Contamination complexe



Frequency of Contaminant Subgroups (US EPA TIO, 1992)

Hydrocarbures	40.99 %
H.A.P	17.80 %
Pb	18.13 %
Zn	10.36 %
Solvants halogénés	15.37 %
Cr	15.87 %
Cu	14.80 %
As	12.50 %
Ni	10.49 %
Cd	6.40 %

Principaux polluants des sols en France (BASOL, 2008)

PROPRIETES DES POLLUANTS

Propriété	Signification	Incidence
Solubilité dans l'eau	Tendance à la mobilisation par lessivage	Solubilité élevée: facteur aggravant de la pollution mais biodégradabilité ↗
Densité		Comportement / nappe
Temps de 1/2 vie	Stabilité	Persistance dans l'environnement
Kow (hydrophobicité) Koc (coef. d'adsorption au Corg. du sol)	Rétention	Influe la rétention par MO du sol, mobilisation par l'eau d'infiltration et l'extractabilité Influe la biodispo. et le potentiel de bioaccumulation
Tension de vapeur Constante de Henry	Volatilité	Influe sur le mode d'infiltration dans le sol, sur son élimination par volatilisation (naturelle ou lors de la dépollution)

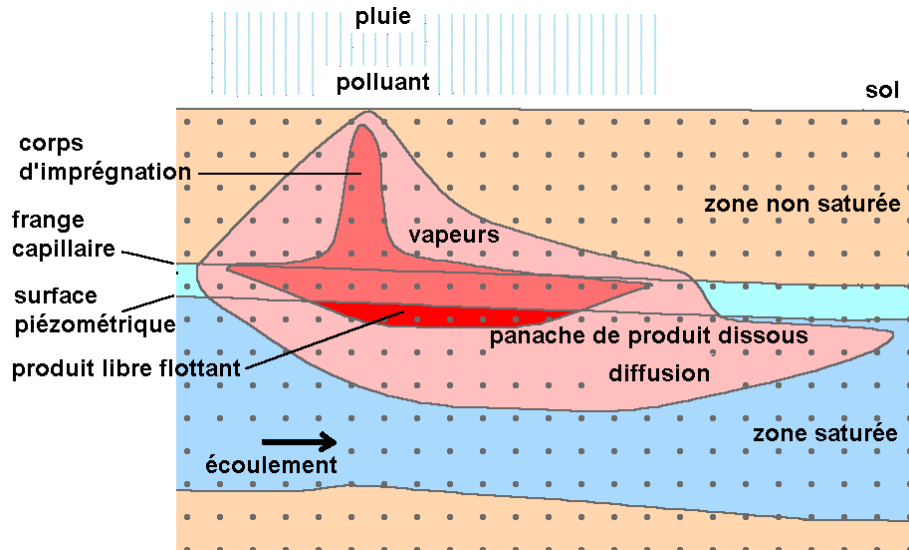
Comportement des polluants dans le sol

Propriété du milieu	Influence sur le comportement
Nature du sol (granulométrie, minéralogie, compo. chimique globale)	Sorption du contaminant fonction du contenu en C orga et minéraux argileux (taille < 2 μm), en oxydes/hydroxydes métalliques, carbonates et silicates
Porosité / Perméabilité de l'aquifère	Transfert du contaminant : convection, dispersion et diffusion
Teneur en eau	- Transfert du contaminant : convection, dispersion et diffusion - Dissolution et hydrolyse du contaminant - Activité microbienne (Biodégradation)
Potentiel redox	- Mobilité des métaux - Dégradation abiotique de certains polluants organiques
pH	- Solubilité des métaux - Phénomènes de sorption - Développement microbien (Biodégradation)
Capacité d'échange cationique	Sorption des contaminants cationiques (métaux)

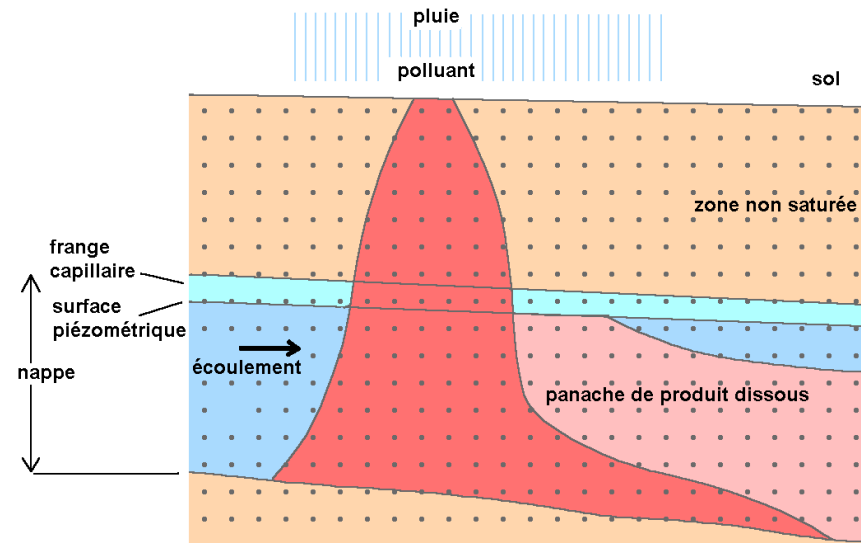
Transfert des polluants vers les nappes

Temps de transfert d'un polluant à la nappe variable (qq jours → années). Dépend de :

- épaisseur de la zone non saturée
- perméabilité du réservoir (fissuration) ou pouvoir de filtration
- caractère du polluant



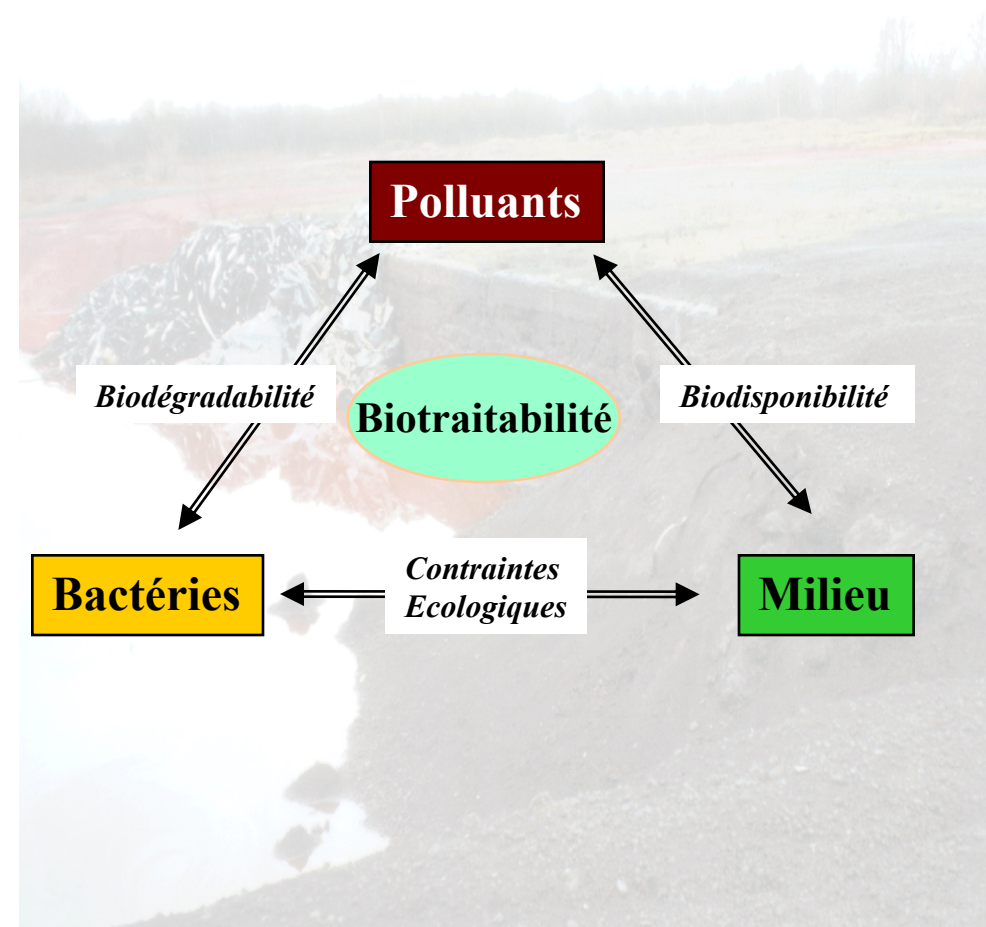
- Pollution de la nappe par un produit plus léger que l'eau (LNAPL)
(BTEX, hydrocarbures aliphatiques)



- Pollution de la nappe par un produit plus lourd que l'eau (DNAPL)
Ex: HAP, organochlorés

Dépollution biologique: un vaste sujet !

- Concerne une large gamme de composés
- Degradables (composés organiques)
- métaux, radionucléides, composés inorganiques (composés N, S, P)
- Processus impliquant de nombreux microorganismes agissant souvent de concert ou de façon séquentielle
- Dépend des caractéristiques du milieu (sol, eau)
- Implique disciplines variées (hydrogéologie, microbiologie, écotoxicologie, géochimie, génie des procédés...)



Approches de la dépollution biologique

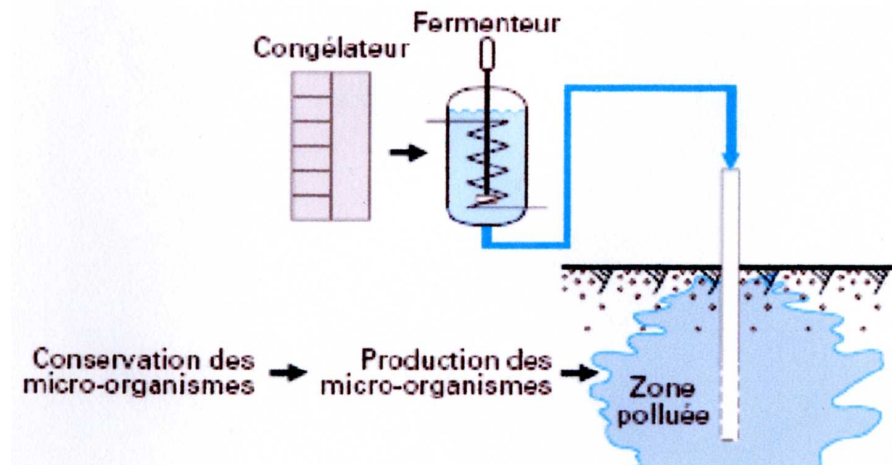
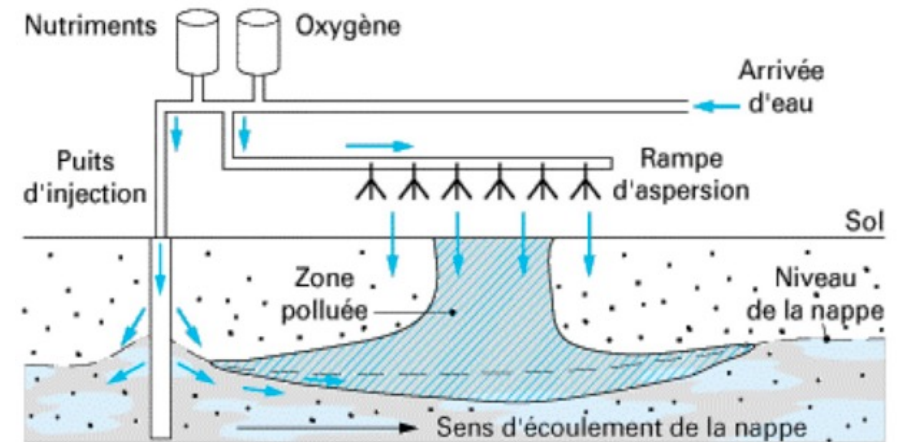
Objectif: améliorer les capacités naturelles de dépollution

➤ Biostimulation:

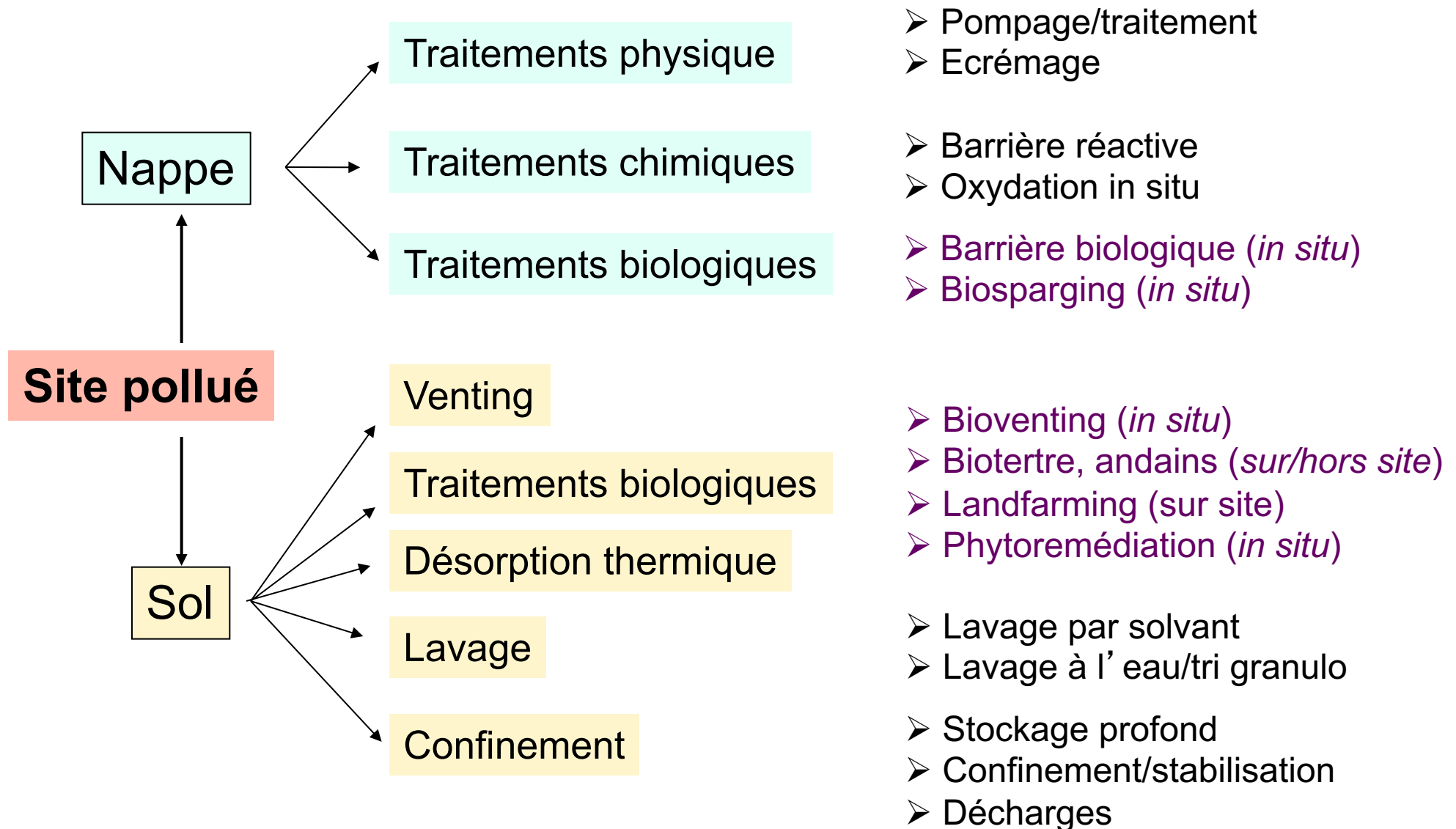
- Ajout nutriments (N, P, O₂...) pour stimuler l'activité des microorganismes indigènes
- ajout de faible qtés de polluant ou d'analogues pour induire voies de dégradation
- Concept à la base de nbx procédés de traitements

➤ Bioaugmentation

- Inoculer des microorganismes sélectionnés pour leur potentiel de dépollution (étrangers ou indigènes)
- Quand biostimulation peu efficace
- Limite: adaptation des microorganismes au milieu contaminé

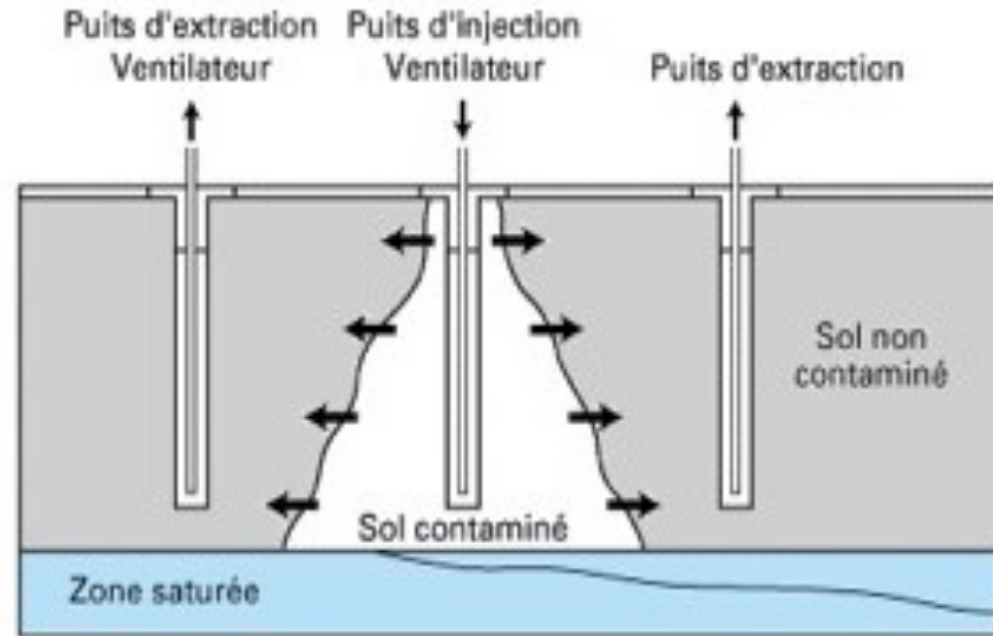


Principaux procédés de dépollution



Traitements *in situ*: Bioventing

- **Aération de la zone non saturée** contaminée, stimulation de la biodégradation aérobie (+ nutriments si nécessaire)
- **Polluants**: COVs (venting) + composés organiques plus lourds adsorbés :



- **Avantages**: ceux des traitements *in situ* : site en activité, pollution étendue, excavation impossible / coûteuse
- **Limites**: hétérogénéité du sol (fractures..) et de la pollution , profondeur de la pollution (> 1 m) , volume de sol (> 350 m³)
- **Chiffres clé** (ADEME) :
 - taux d' utilisation / techniques *in situ*: 61% hors confinement/ ensemble des techniques : 11%
 - coût: 15 - 50 € / T
 - délais: 6 mois – 5ans

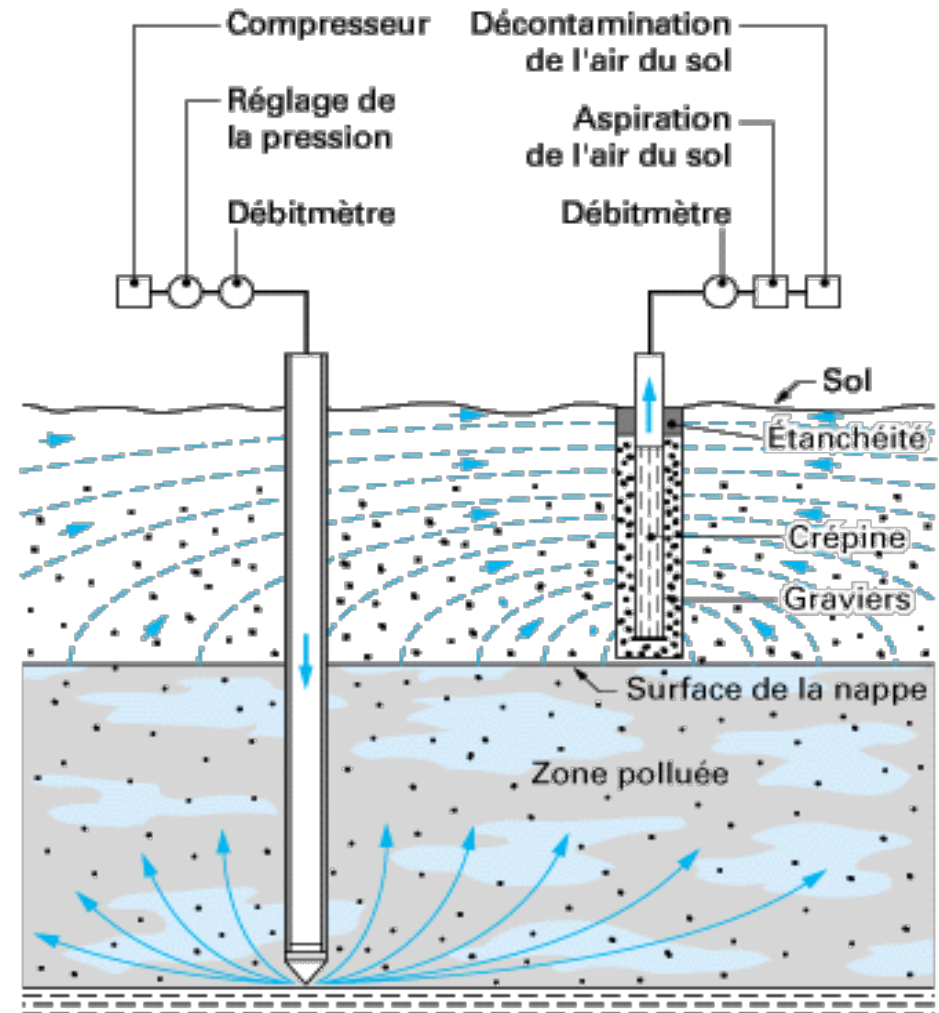
Biosparging

- injection d'air dans la **zone saturée** pour:
 - stimuler la biodégradation en milieu liquide
 - vaporiser les contaminants dissous dans nappe, qui seront dégradés dans la zone insaturée.
- souvent couplé au venting

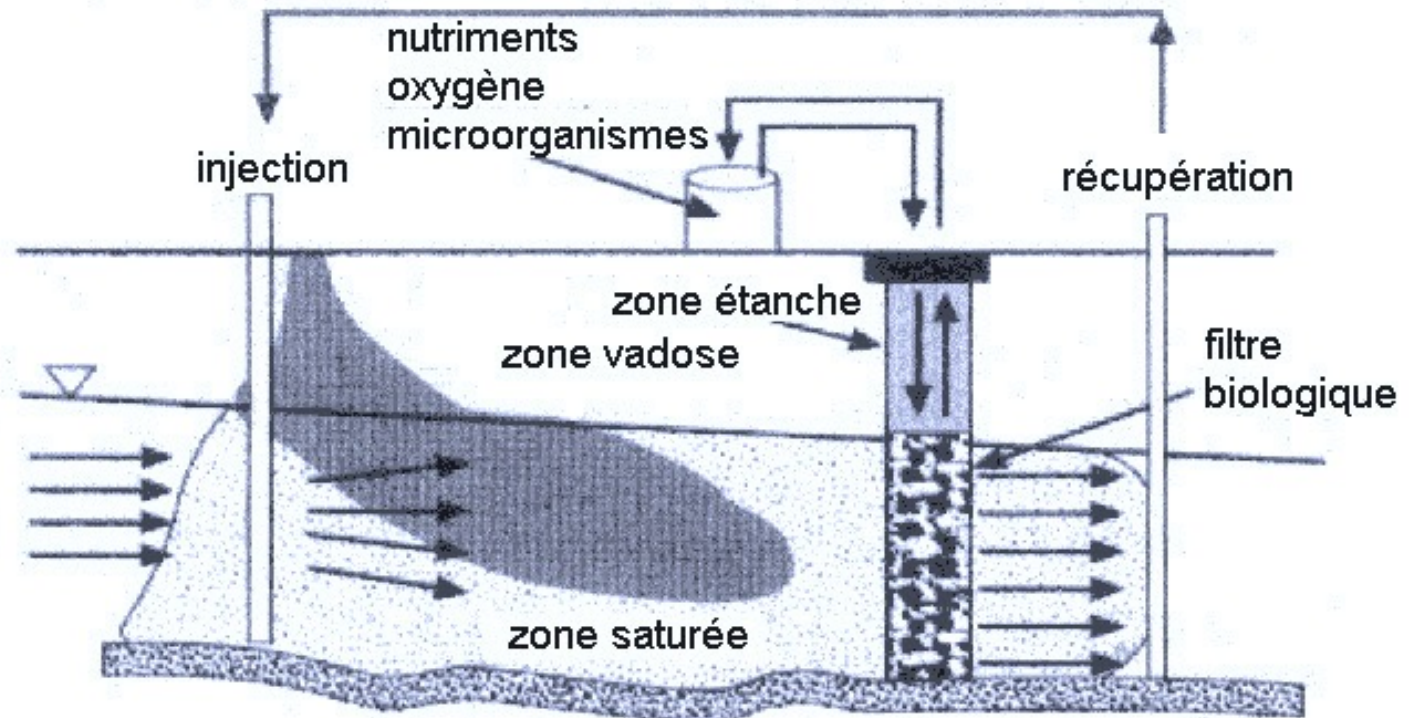
Gaz extraits traités physiquement (charbon actif, incinération...) ou biologiquement (Biofiltre: gravier, tourbe + microflore dégradante)

➤ Chiffres clé :

- 1% des volumes traités (2010)
- coût: 15 - 50 € / T
- délais: 6 mois – 5ans



Barrière biologique



- Aérobie (e.g. biodégradation des BTEX) apport d' O₂,
- Anaérobie, (e.g. biodégradation de composés chloré) avec apport de lactate, mélasse ou autre support carboné.
- En aval hydrogéologique du point de pollution, orientation perpendiculaire.

Traitement ex situ : biotertres / biopiles

Mise en tas sur une surface imperméable

contrôle de l'oxygénation
apports d'eau, nutriments, (bactéries)
contrôle de la température, récupération des lixiviats

Avantages

mise en œuvre facile, coût limité / désorption thermique,
incinération
Contrôle des paramètres de biodeg.

Inconvénients:

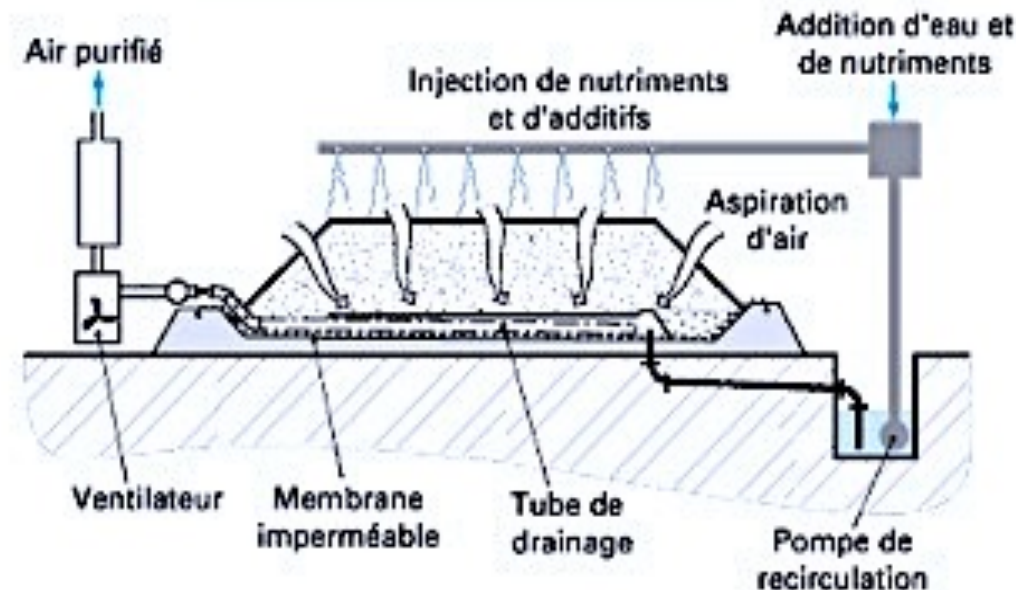
Excavation et transport (si hors site)
Surfaces nécessaires importantes
Durée de traitement (6 mois → 3 ans)

Chiffres clé (ADEME) :

taux d'utilisation / techniques sur site: 39%
/ ensemble des techniques : 12,7%
coût: 50 – 60 € / T

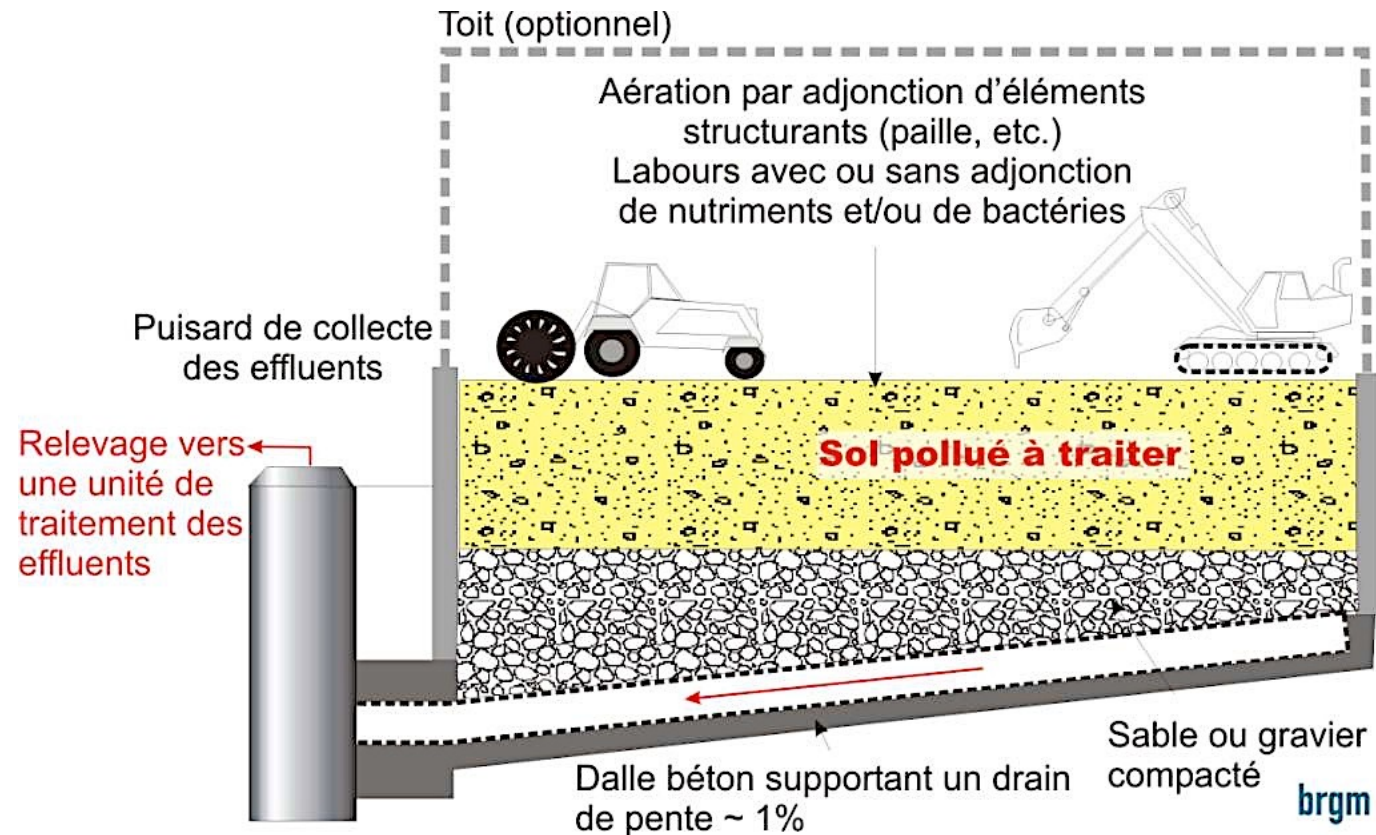


Site d'Homécourt (57) Pollution mixte
(HAP - Métaux lourds)



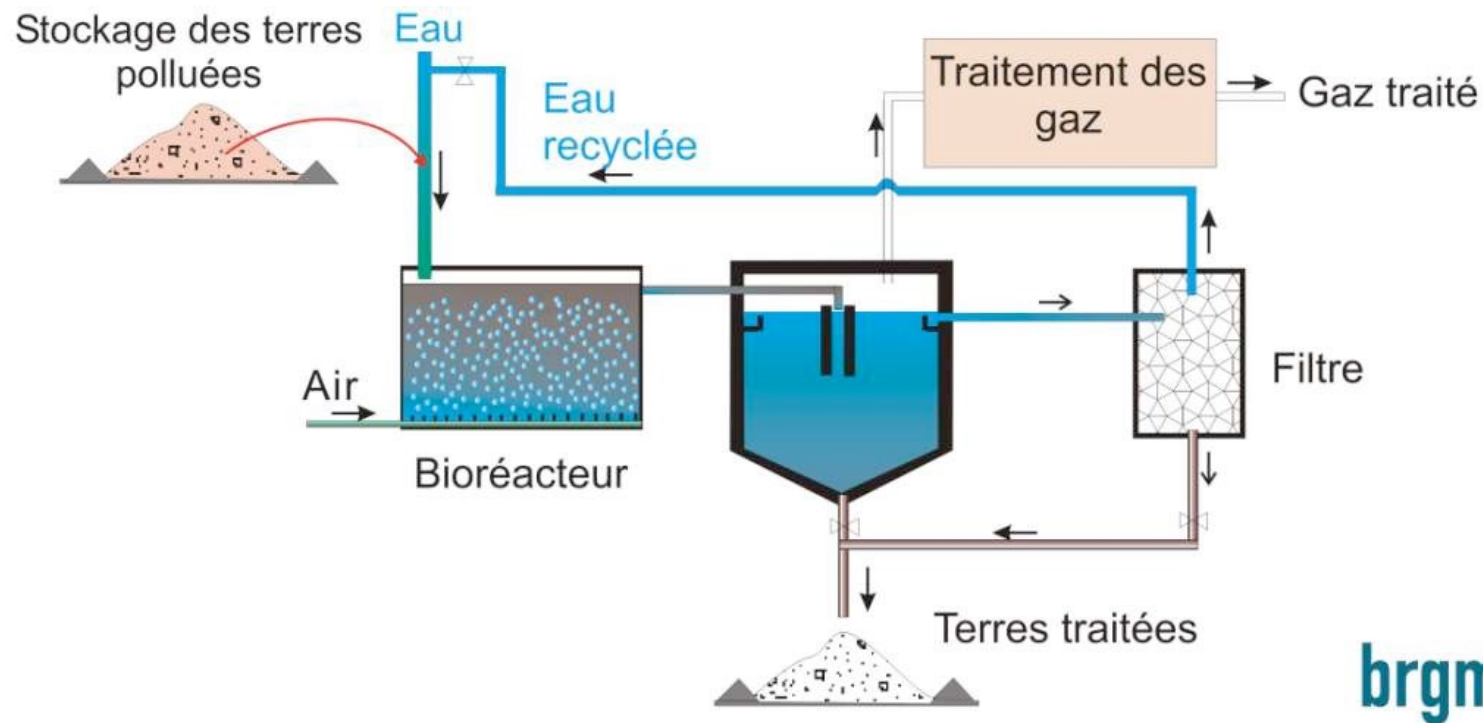
Traitement sur site: le landfarming

- Sol étalé sur une membrane étanche (0,1 à 1,5 m) après homogénéisation et $\pm$ agents structurants pour améliorer la porosité
- Sol amendé (N,P,K), retourné, et arrosé régulièrement (biostimulation)
- Avantages /inconvénients : idem biotertre



Décontamination *ex situ* des sols pollués : bioreacteurs

- Traitement du sol en réacteur après tamisage et addition d'eau (boue 10-50% P/V)
- Contrôle des conditions (pH, T° , O_2 , nutriments, surfactants...) et des populations microbiennes (biostimulation ou bioaugmentation)



- **Polluants traités :**
HC, HAP, BTEX, phénols, organo-halogénés (déchloration réductrice), explosifs TNT (gpts nitrés --> aminés), cyanures...

Phytoremédiation

Utilisation de plantes pour éliminer les polluants ou diminuer le risque lié à leur présence dans l'environnement

- **Avantages:**
 - améliore la qualité des sols et restaure leur fonction,
 - approche *in situ* : sols en place utilisables après traitement
 - faible production d'effluents et déchets
 - technologie peu coûteuse (25-100 €/t)
 - bien perçue par le grand public (technologie « verte »)
- **Inconvénients**
 - technologie longue et parfois incomplète
 - limitée aux contaminations superficielles

Principales techniques de phytoremédiation

- **Phytoextraction** : accumulation du polluant (métaux) dans les parties aériennes (env. 1%), assistée par chélatants chimiques, récolte et incinération
- **Rhizodégradation**: dégradation des polluants par microorganismes rhizosphère stimulée par les racines
- **Phytovolatilisation**: stimulation de la volatilisation du polluant absorbé par évapotranspiration (Hg)
- **Phytostabilisation**: séquestration des polluants (métaux), limite le risque de lessivage et contamination des nappes

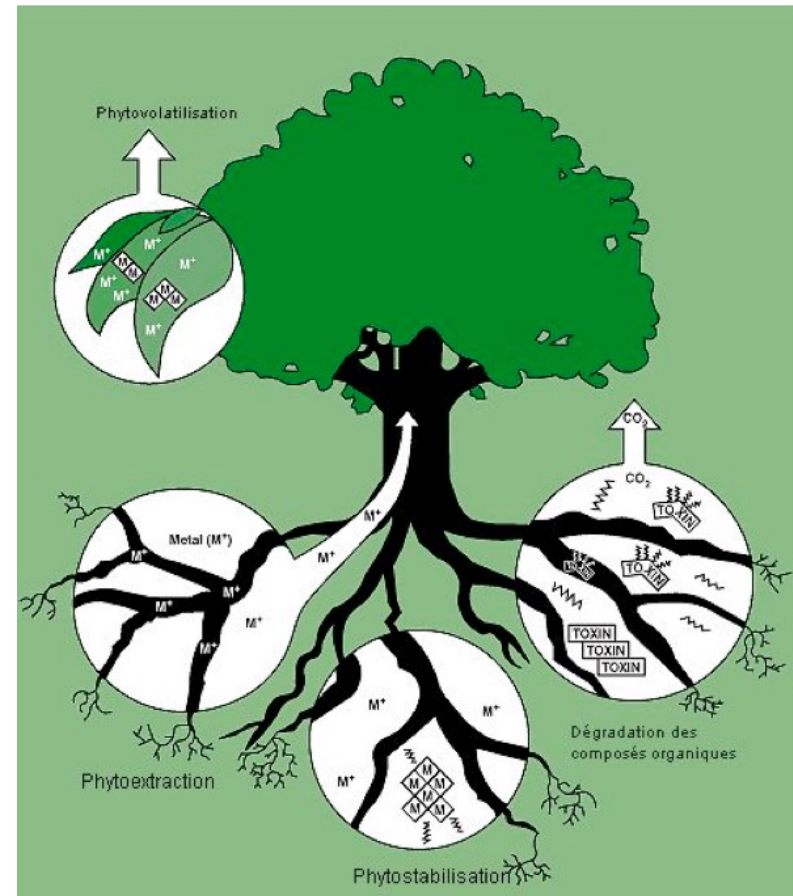


Tableau A : Techniques biologiques de dépollution des sols retenues par l'ADEME (2/2)

	Technique	Principe	Polluant	Niveau de développement	Exemple
in situ et ex situ	Bioremédiation	Biorestauration Ajout de nutriments (azote/phosphore) pour stimuler la croissance des microorganismes indigènes et favoriser la dégradation des polluants	pollution organique (hydrocarbures pétroliers, HAP), métaux lourds	Commercialisé en ex-situ pour les traitements en biotertre et bioslurry	GRS Valtech
		Bioaugmentation Introduction dans le sol de microorganismes exogènes adaptés aux polluants à traiter	hydrocarbures lourds, HAP, PCB		
		Biostimulation Réensemencement de populations prélevées sur le site, dont la croissance a été stimulée en laboratoire ou en bioréacteurs installés sur site	hydrocarbures pétroliers, HAP		
	Phytoremédiation	Phytoextraction Utilisation de plantes capables d'extraire, de transporter et de concentrer les polluants du sol dans les parties récoltables (feuilles, tiges, racines).	métaux (Pb, Cd, Zn, Cu), nitrate	Stade expérimental avancé (sites pilotes, serres, etc.), commercialisation possible, SITA Remediation	Plantes hyper-accumulatrices : <i>Thalasspi</i> , <i>Alyssum</i> , <i>Brassica</i> (moutarde)
		Phytostabilisation Séquestration des métaux par des plantes pour limiter le risque de lessivage des polluants et de contamination des nappes phréatiques	métaux (Pb, Cd, Zn, Cu, As, Cr, Se), polluants organiques (PCB)	Stade expérimental avancé (sites pilotes, serres, etc.),	Plantes à racines fibreuses et profondes
		Phytodégradation / Phytotransformation Transformation par la plante de molécules organiques complexes en composés plus simples, qui seront intégrés dans les tissus de la plante.	composés organiques, nitrate, phosphate	Stade expérimental avancé (sites pilotes, serres, etc.),	Arbres (famille du saule, peuplier), herbes, légumes
		Phytovolatilisation / Phytostimulation Stimulation de la volatilisation du polluant absorbé par la plante et éliminé par évapo-transpiration.	métaux (As, Hg, Se), composés organiques volatils (COV)	Stade expérimental avancé (sites pilotes, serres, etc.),	<i>Brassica Juncea</i> (moutarde), plantes marécageuses
		Rhizodégradation Dégradation des polluants par les racines (processus interne) et l'activité microbienne associée (externe). Traitement plus profond, complémentaire aux traitements biologiques (phytostimulation)	composés organiques (HAP, PCB, PCP, BTEX), solvants, produits phytosanitaires	Stade expérimental avancé (sites pilotes, serres, etc.),	Herbes à racines fibreuses : Bermuda, blé, seigle, fétuque