

2. LA BIOREMEDIATION

2.1. Introduction

Avec l'accélération du développement économique, l'homme est de plus en plus responsable de la pollution de l'environnement. La diversité des produits d'origine industrielle conduit à une augmentation considérable du nombre de substances totalement étrangères au monde vivant, dites xénobiotiques. Certains de ces polluants ont contaminé les sols et proviennent des décharges, des installations industrielles, comme conséquence d'accidents de transport ou encore par le biais des rejets urbains et industriels ou en raison de pratiques agricoles (Abdelli (2007)

2. 2. Définition

La bioremédiation, c'est-à-dire l'emploi de procédés biologiques pour éliminer les polluants industriels qui contaminent le cycle biogéochimique des substances naturelles, est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement. La bioremédiation consiste à utiliser des systèmes biologiques pour réduire le niveau de pollution présents dans l'air, l'eau ou le sol (Abdelli, 2007).

Selon Roger et Jacq (2000), la bioremédiation désigne un ensemble de techniques mettant en œuvre des procédés de biodépollution des sites contaminés (sol, sédiments, eaux de surface, ou souterraines). Ces techniques sont utilisées pour réduire la toxicité, la mobilité ou le volume d'un contaminant dans le milieu, et font appel à l'utilisation de champignons, de bactéries en inoculant des micro-organismes spécifiques (bioaugmentation) ou en stimulant l'activité de populations microbiennes indigènes, par biostimulation, par apport de nutriments et par ajustement des conditions de milieu (potentiel d'oxydoréduction, humidité).

La bioremédiation ne peut être utilisée pour confiner un volume d'eau ou de sol pollué. Elle peut s'effectuer directement dans l'environnement pollué (in situ) ou après transfert de l'agent polluant (ex situ).

La bioremédiation est donc réalisée par de multiples réactions de dégradation de la part de la microflore microbienne présente dans le milieu (Roger et Jacq (2000),

2.3. Les différentes techniques utilisées dans les processus de bioremédiation

La bioremédiation est un ensemble de techniques mettant en œuvre des procédés de biodépollution, utilisables pour réduire la toxicité, la mobilité ou le volume d'un contaminant

dans les sols, le sous-sol, les eaux et les effluents gazeux. Elle ne peut être utilisée pour confiner un volume d'eau ou de sol pollué. Elle peut s'effectuer directement dans l'environnement pollué (*insitu*) ou après transfert de l'agent polluant (*ex situ*). *Ex situ* La mise en œuvre de ces techniques passe par l'extraction soit du polluant, soit du polluant et du matériau contaminé, et leur traitement dans des dispositifs clos ou semi-clos.

Les effluents liquides ou gazeux pollués sont traités dans des bioréacteurs (réacteurs, digesteurs, biofiltres, biolaveurs, etc...)

Les sols contaminés sont excavés, puis traités suivants des procédés adaptés (compostage, traitement sous forme de boues, etc.).

Les principales technologies utilisées dans la bioremédiation sont les suivantes :

2.3.1. La bioaugmentation

Cette technologie consiste à introduire des cultures de microorganismes à la surface du milieu contaminé dans l'objectif d'augmenter la biodégradation des contaminants organiques. Généralement les microorganismes sont sélectionnés sur la base de leur aptitude à dégrader les composés organiques présents dans le site à dépolluer. La culture peut comprendre une ou plusieurs espèces de microorganismes. Des éléments nutritifs sont généralement apportés dans la solution contenant les microorganismes. Cette suspension de microorganisme est apporté à la surface du sol dans les conditions naturelles ou injecte dans le site contaminé sous pression (Davet, 1998)

2.3.2. La biofiltration

Elle consiste à l'utilisation d'un biofiltre pour traiter les émissions gazeuses : Le principe consiste à utiliser des microorganismes pour dégrader les polluants contenus dans l'air à traiter : la phase aqueuse (l'air contaminé) est mise en contact avec une phase aqueuse dans laquelle se développe la population microbienne, connue aussi sous le nom de la biomasse.

Dans une unité de biofiltration, l'air à épurer (à dépolluer) traverse d'abord un filtre et un humidificateur afin de supprimer les particules (poussières, graisses) présentes dans le gaz et d'amener le niveau d'humidité à 100%. L'air est ensuite introduit dans un réacteur (une cuve) contenant un garnissage formé de matériaux très poreux (très avide pour l'humidité). A la surface des particules qui constituent le garnissage se trouve un biofilm qui correspond à une pellicule d'eau contenant des microorganismes (bactéries et champignons) dont la fonction est de dégrader les polluants présents dans l'air à traiter. Cette technologie est par exemple

utilisée pour traiter l'air pollué par le xylène ou par des composés azotés (Roger et Jacq (2000)).

2.3.3. La biostimulation

La biostimulation consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes (présentes dans le sol ou dans les eaux souterraines) par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité).

2.3.4. Le compostage

Le compostage peut être défini comme un procédé biologique contrôlé qui assure la transformation et la valorisation des matières organiques (sous produits de la biomasse, déchets organiques d'origine biologique) en un produit stabilisé, hygiénique, semblable à un terreau riche en composés humiques le compost. C'est la fermentation des ordures ménagères organiques (résidus alimentaires) et des déchets verts (feuillages, résidus de jardinage) afin de produire un compost réutilisable en agriculture ou dans le jardin pour fertiliser la terre. L'aération et l'humidité sont deux éléments indispensables pour entretenir les conditions d'une bonne fermentation. Le compostage peut se faire chez soi ou collectivement par des procédés industriels (Abdelli, 2007).

2.3.5. La biolixiviation

Il s'agit de la lixiviation favorisée par la voie biologique (généralement bactérienne). Elle correspond à une méthodologie de solubilisation des métaux lourds grâce à des bactéries acidophiles fonctionnant en présence ou en l'absence d'oxygène. Deux facteurs sont importants pour la biolixiviation : la température qui doit être comprise entre 25 et 35 °C. La taille des particules qui doivent être très proches de celle des bactéries.

De nombreux agents polluants et pesticides peuvent être transformés ou décomposés à la fois par des réactions physico-chimiques et biologiques. Toutefois décomposition et transformations sont généralement plus rapides dans des environnements comportant une microflore que dans les environnements stériles. Les méthodes biologiques faisant appel aux microorganismes dépolluants ont prouvé leur efficacité pour les polluants organiques : dépollution biologique de l'air, des eaux usées, des milieux marins et des sites pollués par les hydrocarbures polycycliques, les composés chlorés ou les explosifs.

2.4. Les critères de sélection des souches microbiennes aptes pour la biorémediation

L'intervention des microbiologistes tend à augmenter les populations de microorganismes dégradant l'agent polluant pour en accélérer la dégradation et peut prendre deux formes :

Le renforcement des populations autochtones aptes à dégrader l'agent polluant par apport d'éléments nutritifs et modification des conditions de milieu, afin de diminuer la durée de la phase d'acclimatation (ou de latence) et leur permettre de dégrader plus rapidement le contaminant. Cette optimisation repose sur plusieurs critères:

2.4.1. Adaptation et phase de latence

L'implication des microorganismes dans la dégradation des polluants est indirectement établie par l'existence d'une phase de latence suivie d'une disparition plus rapide correspondant à une adaptation de la microflore et au fait que l'application répétée d'un polluant ou d'un pesticide provoque assez fréquemment un raccourcissement de la phase de latence.

Avant le démarrage de la dégradation d'un polluant, on note généralement une période de latence qui correspond à une phase d'adaptation de la microflore. La liste des composés pour lesquels une telle phase a été rapportée est longue et comprend des herbicides (2,4-D, MCPA,

Mecoprop, TCA, amitrole, dalapon, monuron, chlorpropham...), des insecticides (methyl parathion, azinphosmethyl), des aromatiques polycycliques (naphtalène, anthracène), et des produits divers tels que le phénol, des chlorophénols, des chlorobenzènes etc.

La durée de la phase de latence peut varier dans de larges limites entre une heure et plusieurs mois. Elle varie avec la nature des produits mais également avec leur concentration et les conditions environnementales. Elle est souvent très longue pour les molécules chlorées en anaérobiose.

Actuellement il n'existe aucune méthode permettant de prédire la durée de la phase de latence de la biodégradation d'un composé dans un environnement donné.

Lors d'une seconde addition de polluant on observe généralement une diminution ou même une disparition de la phase de latence mais ceci n'est pas une règle absolue. Un aspect important de cette adaptation de la microflore est une diminution de l'efficacité de certains pesticides.

2.4.2. Spécificité et non spécificité polluant/ genre microbien

Les données actuelles identifiant les microorganismes dégradant un polluant ou les différents polluants pouvant être dégradés par un même microorganisme ne sont pas extrêmement nombreuses. Les données disponibles indiquent cependant que la spécificité polluant /espèce ou genre microbien n'est, dans certains cas, pas très marquée. Par exemple, un même pesticide peut être dégradé par différents microorganismes et réciproquement un même microorganisme peut dégrader un nombre élevé de substrats.

La spécificité microbienne est bien entendu corrélée avec la spécificité enzymatique. Un cas bien étudié de faible spécificité enzymatique est celui des méthane-mono-oxygénases (MMO). Des préparations brutes de la MMOs de *Methylococcus capsulatus* catalysent l'incorporation d'un oxygène diatomique dans un spectre très large de substrats, permettant à cet organisme de dégrader des alcanes, haloalcanes, alcènes, éthers et autres composés alicycliques, aromatiques et hétérocycliques (Lotto *et al.*, 2004).

Les MMO solubles et membranaires des bactéries méthanotrophes peuvent dégrader des hydrocarbures saturés, insaturés, linéaires, branchés ou cycliques (benzène, toluène, styrène, naphthalène) et jusqu'à environ 8 atomes de carbone, des alcools et des crésols

2.4.3. Seuils inférieurs et supérieurs

De nombreux polluants sont présents à de très faibles concentrations dans les sols et les eaux. Ils n'en restent pas moins dangereux, en particulier en raison des phénomènes de bioconcentration. L'étude des problèmes liés à la dégradation de composés présents à de très faibles concentrations est relativement récente et a mis en évidence l'existence d'un seuil inférieur en deçà duquel la microflore ne peut plus se multiplier et aucune dégradation n'est observée. A l'opposé, une concentration trop élevée en polluants peut causer une inhibition de la microflore (Agarwal *et al.*, 1998).

2.5. Facteurs qui influencent le processus de biodégradation d'un matériau

Les facteurs influençant le processus de biodégradation d'un matériau sont d'ordre physique et chimique et biologique

2.5.1. La température

Certains facteurs sont déterminants non seulement pour la croissance des micro-organismes intervenant dans la dégradation mais aussi pour le matériau amené à être dégradé. Citons notamment la température (Lotto *et al.*, 2004 Agarwal *et al.*, 1998). C'est un facteur qui

a un rôle très important en raison de son effet sur l'activité microbienne, puisqu'elle détermine la vitesse de métabolisation des nutriments. Le métabolisme de nombreux microorganismes (mésophiles) est ralenti à des températures, soit supérieures à 40°C, soit inférieures à 5°C.

2.5.2. L'humidité

C'est la disponibilité en eau plutôt que la quantité d'eau présente dans un environnement donné qui est le facteur critique. Les champignons sont favorisés quand le potentiel hydrique est inférieur à $-15,8 \cdot 10^5$ Pa.

L'activité de tous les microorganismes cesse lorsque le potentiel devient très faible (Calvet et al., 2005 ; Copinet et al., 2004).

2.5.3. L'oxygène

lorsque l'oxygénation du milieu est importante (potentiel rédox de l'ordre de 750 à 800 mV), elle favorise le développement d'une population aérobie susceptible de dégrader de nombreux pesticides. Quand l'oxygène vient à manquer, le milieu devient anoxique et d'autres population microbiennes aérobies facultatives, voire anaérobies strictes prennent le relais. L'activité de ces microorganismes capables d'utiliser d'autres accepteurs d'électrons que l'oxygène est particulièrement importante dans le cas de la dégradation de composés halogénés (Haggbloom et Bossert, 2003).

2.5.4. Le pH

Le pH affecte la diversité, l'activité et la taille des populations microbiennes. Le pH optimal de développement des bactéries se situe entre 5 et 8,5 alors que les champignons sont favorisés dans les milieux plus acides. Le pH agit également sur l'état d'ionisation des enzymes, ce qui modifie leur affinité pour les substrats (Li et al., 1999).

2.5.5. Influence du nombre de substituants halogénés sur la biodégradation

Les polluants présentant une structure chimique électroniquement stable ou ayant de nombreux substituants halogénés sont généralement les plus difficiles à dégrader (Sims et al., 1986 ; Scheneurt et al., 1993). Dans ce cas, la stratégie communément retenue par la microflore peut consister en l'introduction de groupes polaires qui ont pour effet d'accroître le caractère hydrophile et de faciliter ainsi leur dégradation ultérieure.

2.5.6. Les adjuvants des produits phytosanitaires

ils entraînent des modifications des populations microbiennes, de l'activité globale de la microflore du sol et de l'activité spécifique de la microflore dégradante (Rouse et *al.*, 1994 ; Sanchez-Camazano et *al.*, 1995 ; Beigel et *al.*, 1999 ; Charnay et *al.*, 2000). Soit ils stimulent la dégradation du pesticides par un accroissement des populations microbiennes, due à la source additionnelle de carbone résultant des cellules microbiennes tuées par les adjuvants et facilement assimilable par la microflore survivante, ou à certains adjuvants de formulations facilement assimilables, soit ils ralentissent la dégradation du pesticides en raison de l'altération des microorganismes dégradant et du piégeage de la matière active à l'intérieur de micelles de composés tensioactifs (Calvet et *al.*, 2005).

2.5.7. Présence d'accepteurs d'électrons

Les microorganismes assurent une fonction essentielle grâce à leur grande diversité (Topp, 2003). Cette diversité des communautés microbiennes telluriques jouerait un rôle important dans la dégradation des pesticides (Entry et Emmingham, 1995 ; Voos et Groffman, 1997). Cependant. Une des conditions fondamentales à la dégradation biologique est la présence d'accepteurs d'électrons. Dans les systèmes aérobies, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène moléculaire (Castillo et Tortensson, 2007) alors qu'en conditions anaérobies, les accepteurs d'électrons inorganiques sont très majoritairement le NO_3^- , SO_4^{2-} , S, CO_2 ou Fe^{3+} . Les premières étapes de la dégradation provoquent les transformations de la structure moléculaire du pesticide avec l'apparition de métabolites pouvant, dans certains cas, être plus toxiques que la molécule mère. La minéralisation de la substance active, avec la transformation du carbone organique en CO_2 est le processus ultime. Il n'y a pas de relation univoque entre la stabilité chimique d'une molécule et sa stabilité biologique (Charnay et *al.*, 2000)

2.6. Principales réactions de la biodégradation

Les réactions de transformation ou de dégradation des pesticides par les populations microbiennes telluriques sont essentiellement des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Les réactions d'oxydation sont majoritairement représentées par les mécanismes d'hydroxylation, déalkylation, époxydation et sulfoxydation. Ces systèmes réactionnels sont généralement catalysés par les familles d'enzymes suivantes : les mono et di-oxygénases, les laccases et les peroxydases (Voos et Groffman, 1997).

2.6.1. Hydrolyse

Le clivage d'une liaison par addition d'eau est une réaction fréquente effectuée par les microorganismes et qui inactive un certain nombre de substances toxiques.

Ces réactions peuvent consister en la simple hydrolyse microbienne d'une liaison ester par unecarboxylase microbienne telle que dans le cas de l'inactivation de l'insecticide Malathion.

Une réaction identique peut causer le clivage d'une anilide par une amidase.

2.6.2. Hydroxylation

L'addition d'un ion OH à une molécule aromatique ou aliphatique la rend généralement moins toxique. Par exemple, le simple remplacement d'un H par OH inactive le fongicide carbendazime (MBC) et l'herbicide 2,4-D.

2.6.3. Déhalogénéation

De nombreux pesticides et des polluants industriels contiennent du chlore ou d'autres halogènes. L'enlèvement de l'halogène détoxifie généralement ces composés. Les enzymes impliqués sont appelés déhalogénases. Ces réactions peuvent consister dans le remplacement de l'halogène: soit par un ion H, soit par un ion OH, Elles peuvent également résulter dans l'enlèvement de l'halogène et d'un H adjacent (deshydrodéhalogénéation)

2.6.4. Déméthylation et autres déalkylations

De nombreux pesticides contiennent des radicaux méthyl ou alkyl liés à un N- ou un O-. Une déalkylation du N- ou du O- généralement inactive ces pesticides. Dans le cas du Diuron, l'enlèvement d'un premier radical méthyl conduit au dérivé monométhylé nettement moins actif comme herbicide que le Diuron. L'enlèvement du second radical méthyl rend la molécule complètement inefficace. Une transformation du même type se produit avec l'atrazine et d'autres herbicides du groupe des triazines par perte d'un groupement N-éthyl.

2.6.5. Méthylation

La réaction inverse (addition d'un groupe méthyle peut inactiver les phénols toxiques. Par exemple les fongicides penta- et tétra-chlorophénols peuvent être inactivés par l'addition d'un o-méthyl. D'autres exemples de détoxification par méthylation sont ceux du penta-chloronitrobenzène (fongicide) transformé en pentachloroaniline et du parathion (insecticide) transforméenamino-parathion.

2.6.6. Réduction d'une fonction NO₂

Les composés organiques comportant un radical NO₂ sont toxiques pour de nombreux organismes supérieurs et inférieurs. Le remplacement du radical NO₂ par un radical NH₂ diminue généralement la toxicité du produit.

2.6.7. Désamination

Exemple de L'herbicide Metamitron est inactivé par l'enlèvement du radical NH₂.

2.6.8. Clivage d'une liaison éther (C-O-C)

Les phénoxy herbicides contiennent des liaisons éther (C-O-C) dont le clivage inactive la molécule. Un exemple surprenant est celui du 2,4-D pour lequel la transformation microbienne demande la fourniture d'énergie par le microorganisme (l'énergie de liaison C-O est de 85,5 kcal/mole).

2.6.9. Conversion d'un nitrile en amide

L'herbicide sélectif 2-6-dichloro-benzonitrile est inactivé par la microflore du sol qui le transforme en 2,6-dichloro-benzamide.

2.6.10. Conjugaison

Ce sont des réactions qui associent un composé courant des voies métaboliques à un composé toxique dont elles provoquent l'inactivation. Par exemple *Cunninghamella elegans* peut conjuguer le pyrène avec du glucose. Certains organismes peuvent conjuguer un fongicide de la famille des dithiocarbamates avec de l'acide butyrique produisant une conjugaison moins toxique que le fongicide.

2.6.11. Ouverture de cycles (composés benzéniques) par Clivage ortho et méta

Les bactéries méthanogènes peuvent dégrader un certain nombre de composés benzéniques polycycliques. Les microorganismes ont la possibilité de dégrader les polluants aromatiques par ortho ou métaclivage. La position des substituants a également un impact important sur la biodégradation de la molécule (Baker et Woods, 1977, Baker et Mayfield, 1980). Les microorganismes ont la possibilité de dégrader les polluants aromatiques par ortho ou métaclivage.

2.7. Intérêts économiques de la bioremédiation

Le marché de la dépollution est estimé à un chiffre d'affaire en France de 138 milliards de francs en 1996 et près de 300000 emplois, les activités de protection de l'environnement sont

devenues une véritable industrie. Au niveau communautaire, le marché de l'environnement était estimé en 1994 à 580 milliards de francs. Selon l'UPDS (2000) Le marché français de la dépollution des sols, hors incinération et mise en décharge, se chiffrait en 1995 à 350 millions de francs qui se décomposent en 150 millions pour la partie ingénierie (diagnostic et maîtrise d'œuvre) et 200 millions pour la réalisation des travaux proprement dite (U.N.,1997).

La bioremédiation est souvent applicable sur le site (bioremédiation in situ) ou à proximité immédiate (quand des installations ex situ sont nécessaires), ce qui réduit les coûts de transport et de manutention. Par contre, la bioremédiation est une technologie qui demande une approche scientifique multidisciplinaire. Elle doit être adaptée cas par cas aux différentes situations. Pour cette raison, le coût des études préliminaires pour la caractérisation du site à dépolluer, et les études de faisabilité sont généralement nettement plus élevés que ceux des méthodes conventionnelles. Comme pour toutes les techniques de dépollution, il convient de d'effectuer un suivi du procédé. Par rapport aux méthodes classiques, le suivi de la bioremédiation doit ajouter des études microbiologiques qui en augmentent le coût.

2.8. Limites techniques

La bioremédiation se heurte à des difficultés techniques multiples liées :

- à la nature, la concentration et le volume des produits à traiter. Les microflores sont plus efficaces à des dilutions relativement faibles, situées entre un seuil minimum nécessaire pour induire l'activité enzymatique (ou un cométabolisme) et un seuil maximum inhibiteur de l'activité microbienne.
- à la non existence ou aux difficultés d'adaptation des souches indigènes et/ou à l'obtention de souches efficaces in situ.
- à l'hétérogénéité de la dispersion du polluant dans le biotope, liée elle-même à la nature du sous-sol et à la porosité de celui-ci. Dans certains sols très hétérogènes sur le plan granulométrique, la circulation (naturelle ou forcée) des fluides (gaz et eaux) utilisés pour une dépollution in situ se fait uniquement par les zones de grande perméabilité, excluant de la dépollution une grande masse de sol.
- aux modifications physico-chimiques qui surviennent dans ce biotope, modifications des teneurs en oxygène et variations de température saisonnières qui rendent la bioremédiation inefficace en hiver, dilution due aux pluies, etc. à des effets négatifs possibles sur l'environnement. Par exemple, la transformation microbienne de polluants peut produire des composés plus toxiques que le composé d'origine. Les bioremédiations sont impossible à

mettre en œuvre pour les composés récalcitrants, en particulier certains polymères et composés organiques dont des halogénés riches en chlore (<http://www.techniques-ingenieur.fr/>). Les xénobiotiques accessibles aux seules microflore aérobie et ayant atteint une nappe anaérobie profonde ne peuvent être traités in situ. Les bioremédiation sont peu performantes vis-à-vis de certains produits à forte concentration, qui nécessitent une dilution importante pour descendre en-dessous du seuil de toxicité. Ceci complique la bioremédiation dans les zones arides. Elles sont difficiles à mettre en œuvre dans le cas de pollution multiforme massive (Roger et Jacq, 2000).