



Bioengineering *Environmental Solutions*

ENOVEO



**ENOVEO**

Bioengineering *Environmental Solutions*

# **Etude Préliminaire à la Mise en Place d'un traitement *in situ* d'une pollution aux HCHs et TCB**

***HCHs : Isomères de l'HexaChlorocycloHexane***

***TCB : TriChloroBenzene***



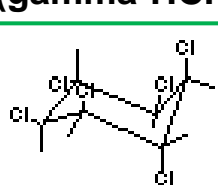
## ***Etude Préliminaire à la Mise en Place d'un Traitement in situ d'une pollution aux HCHs et TCB***

- **But** : Evaluation de l'influence d'un traitement par **bioaugmentation** (*Sphingobium francense*)
- Voie de **biodégradation aérobie** du Lindane ( $\gamma$ -HCH)
- **Microcosmes** mis en place
- **Couplage données chimie et biologie moléculaire** permet la prise en compte de 2 éléments essentiels à la mise en place d'un traitement biologique :
  - la présence d'une **Communauté Microbienne Indigène (CMI)** capable de dégrader le polluant
  - l'**accessibilité** de la pollution (interactions physico-chimiques avec la matrice environnementale)

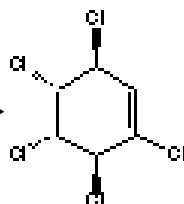


## Initiation de la voie de biodégradation du Lindane en aérobiose (*S. francense*)

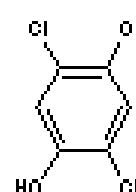
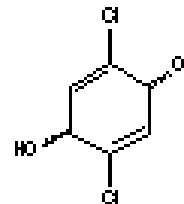
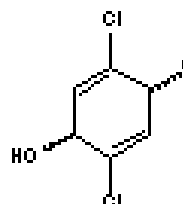
**Lindane  
(gamma-HCH)**



Tetrachlorocyclohexadiene



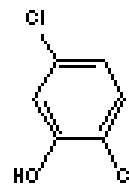
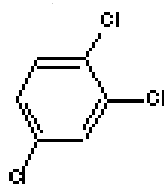
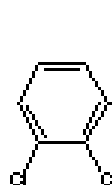
Dichlorocyclohexadiene-diol



Pentachlorocyclohexene

Trichlorocyclohexadienol

**Dichlorohydroquinone**



**1,2,3-Trichlorobenzene**

**1,2,4-Trichlorobenzene**

**2,5-Dichlorophénol**

→ 3 composés potentiellement formés en cas de voie de biodégradation incomplète (1,2,3-TCB, 1,2,4-TCB et 2,5-Dichlorophénol)

→ 1 intermédiaire métabolique de la voie basse de biodégradation (2,5-Dichlorohydroquinone)



# ENOVEO

Bioengineering *Environmental Solutions*

## Echantillons / Microcosmes préparés

Echantillon A

-> **Avec ajout** de Lindane (Pollution récente)



Microcosmes A



- Contrôle + LINDANE 1g/kg
- Bioaugmenté + LINDANE 1g/kg

Echantillon B

-> **Sans ajout** de Lindane (Pollution historique)



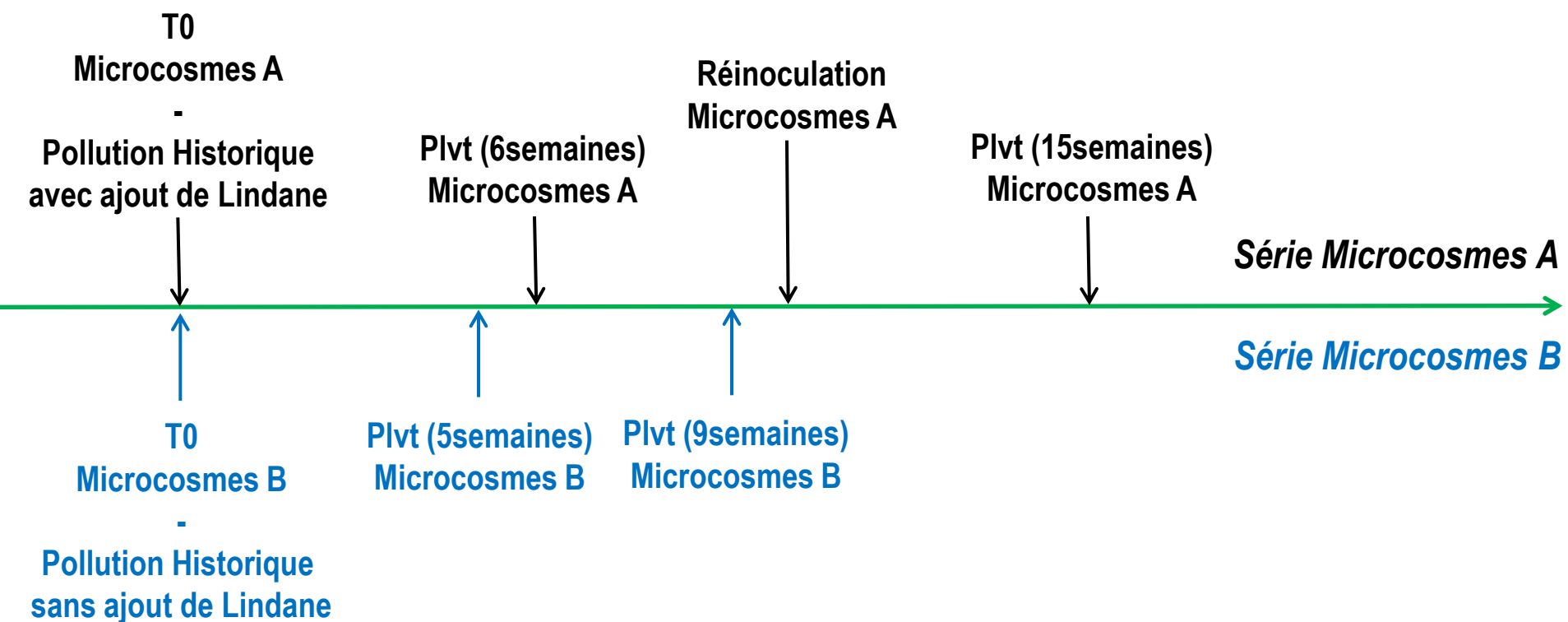
Microcosmes B



- Contrôle
- Bioaugmenté



## Chronogramme de l'étude





## ***Série de Microcosmes A***

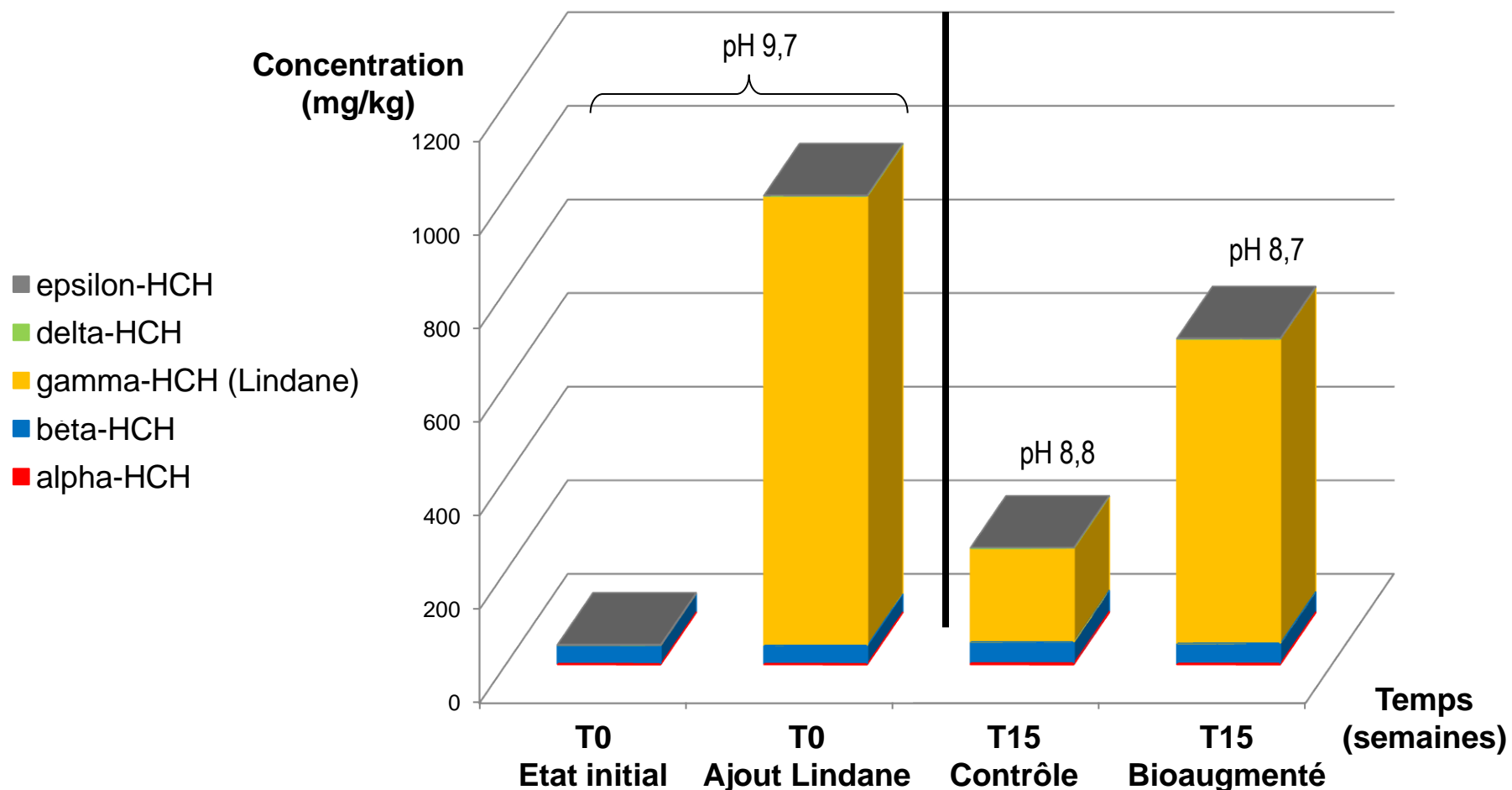
→ Echantillons de sol historiquement pollué avec ajout de Lindane (1 g/kg)

2 microcosmes :

- Contrôle + LINDANE 1g/kg
- Bioaugmenté + LINDANE 1g/kg



## Répartition des isomères de HCHs dans un sol historiquement pollué *après ajout de Lindane*

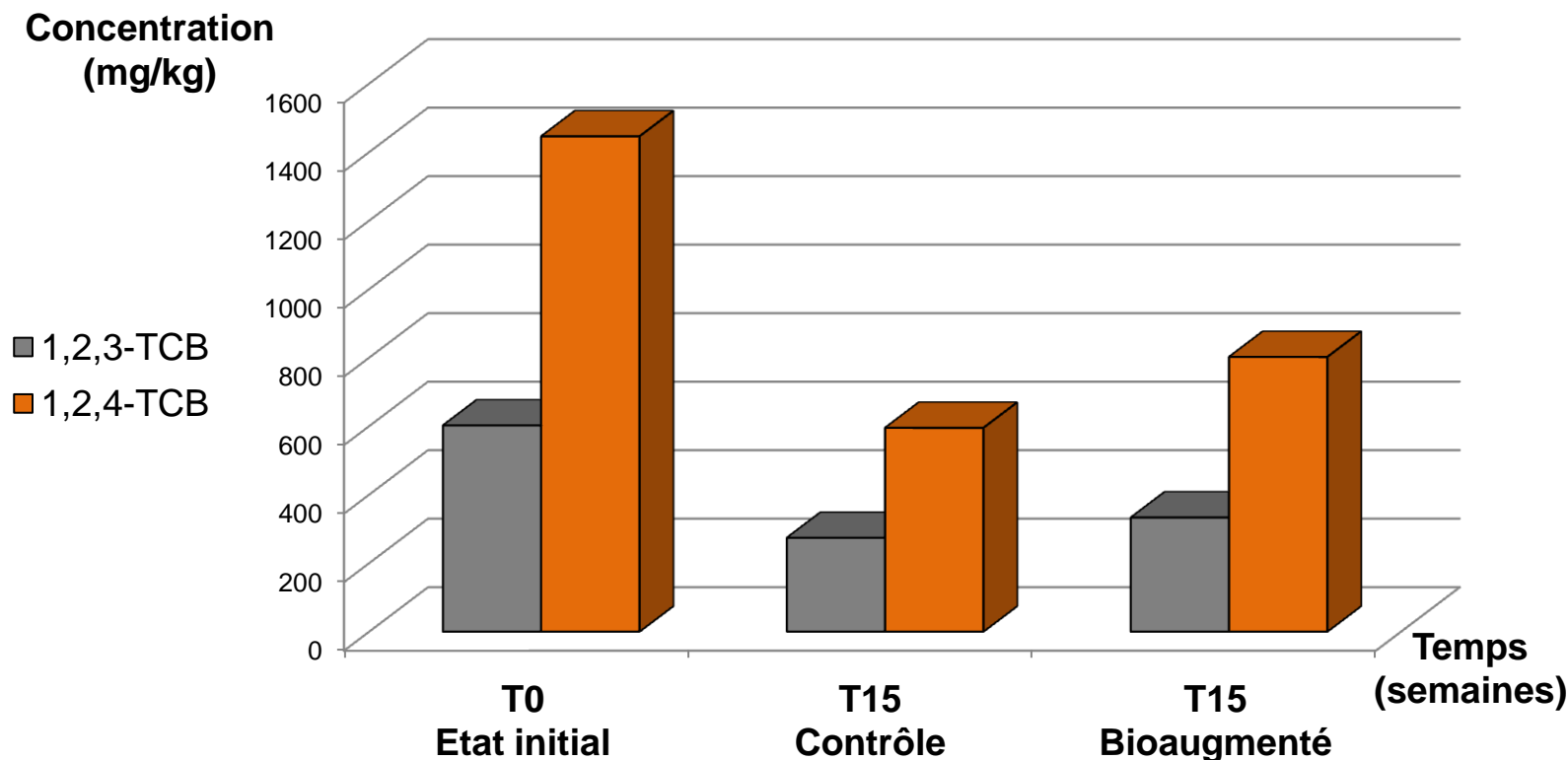


→ Diminution des concentrations en Lindane, quelques soient les conditions





**Evolution des concentrations des intermédiaires métaboliques et du TCB  
dans un sol historiquement pollué *après ajout de Lindane***



→ Pas d'accumulation de 1,2,3 et 1,2,4-Trichlorobenzène

→ **NB : Autres Intermédiaires métaboliques (2,5-Dichlorophénol et 2,5-Dichlorohydroquinone)**

**=> Concentrations inférieures aux seuils de quantification analytiques**



## *Série de Microcosmes B*

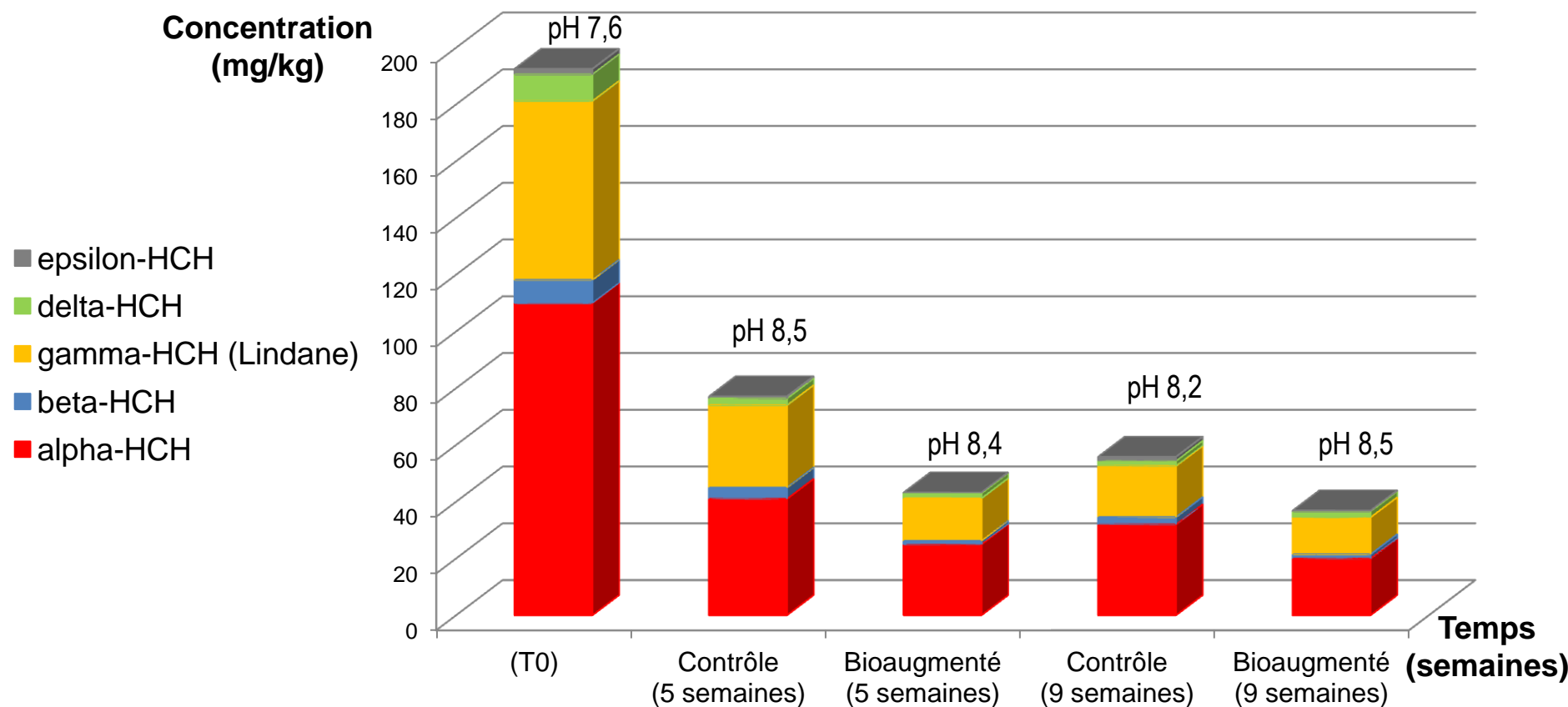
→ Echantillons de sol historiquement pollué sans ajout de Lindane

2 microcosmes :

- Contrôle
- Bioaugmenté



## Répartition des isomères de HCHs dans un sol *historiquement pollué*

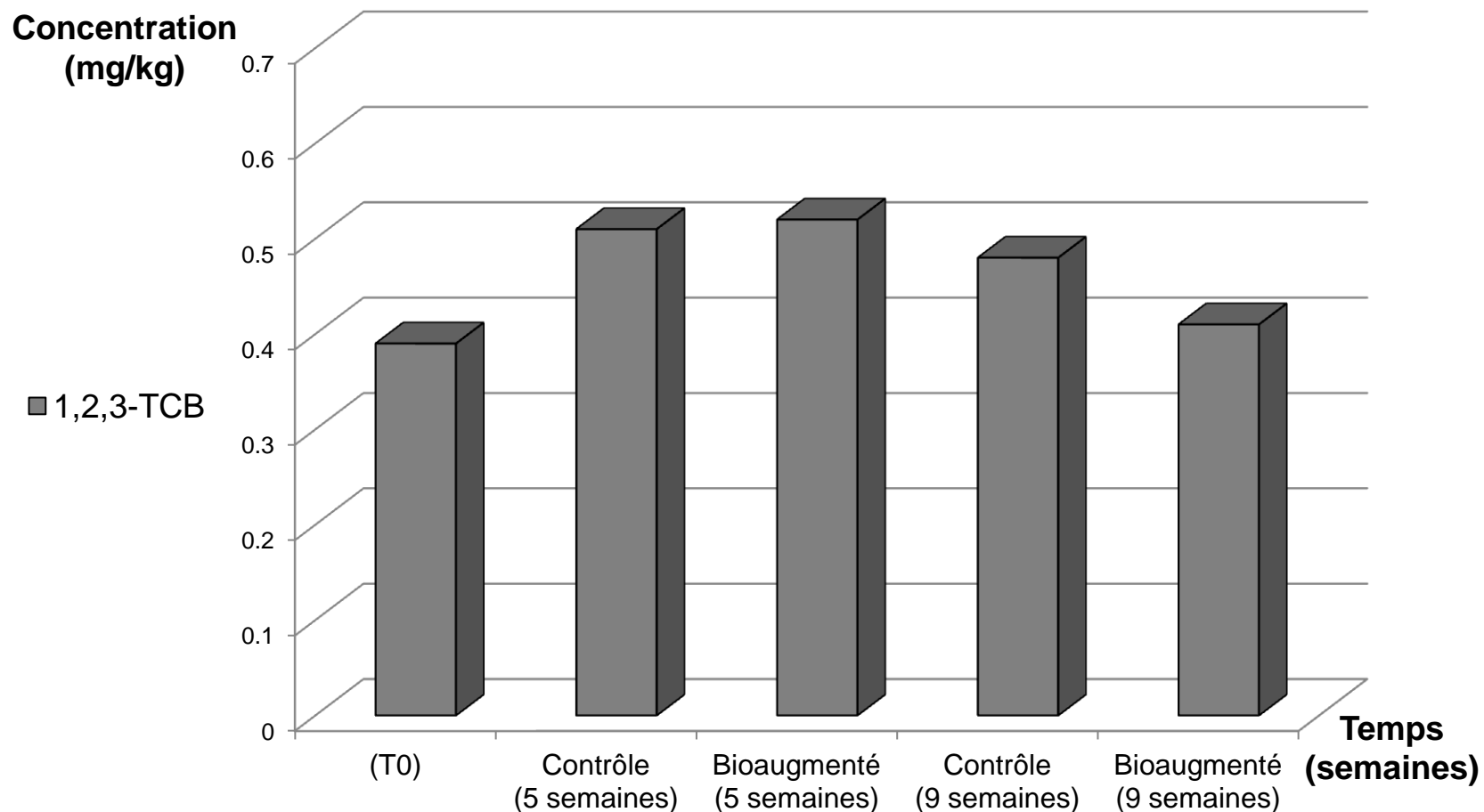


→ Diminution des concentrations en Lindane, quelles soient les conditions

→ *Diminution également des concentrations des autres isomères*



## Evolution des concentrations en TCBs dans un sol *historiquement pollué*



→ Pas d'accumulation du 1,2,3-Trichlorobenzène



## Conclusions du suivi en chimie

- Qu'il s'agisse d'une forte pollution « récente » ou d'une plus faible pollution « ancienne », nous constatons une **diminution des concentrations en Lindane et de certains de ces isomères**.
- La bioaugmentation ne semble pas indispensable à la biodégradation mais semble permettre une **mise en place plus rapide** de celle-ci dans le cas d'une pollution ancienne et donc faiblement bioaccessible.
- Dans le cas d'une pollution récente et donc plus aisément bioaccessible, la bioaugmentation présente un risque d'**inhibition** de l'activité des Communautés Microbiennes Indigènes, mieux adaptées à l'environnement que les populations bactériennes inoculées.



→ Mise en évidence par la chimie d'une diminution des concentrations entre deux instants  $t$  et  $t+1$  ...

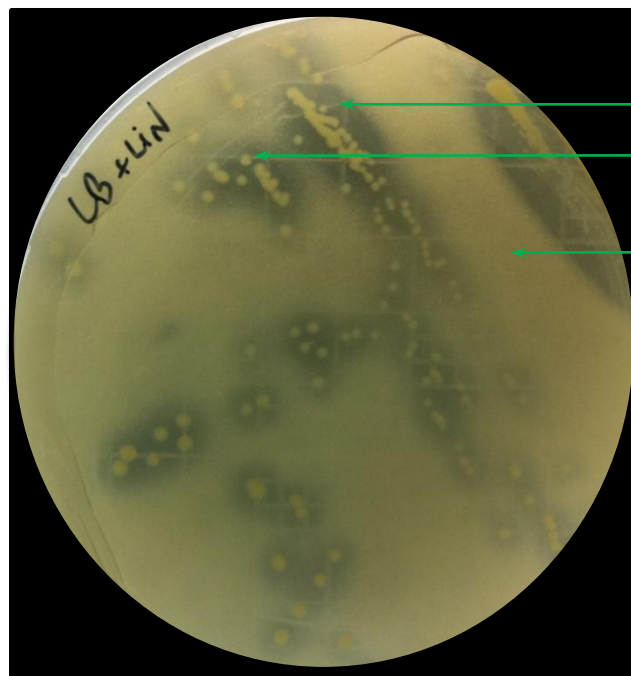
... la biologie moléculaire apporte les outils nécessaires à la maîtrise des processus de biodégradation.



ENOVEO

Bioengineering *Environmental Solutions*

## Visualisation du phénomène de Biodégradation du Lindane

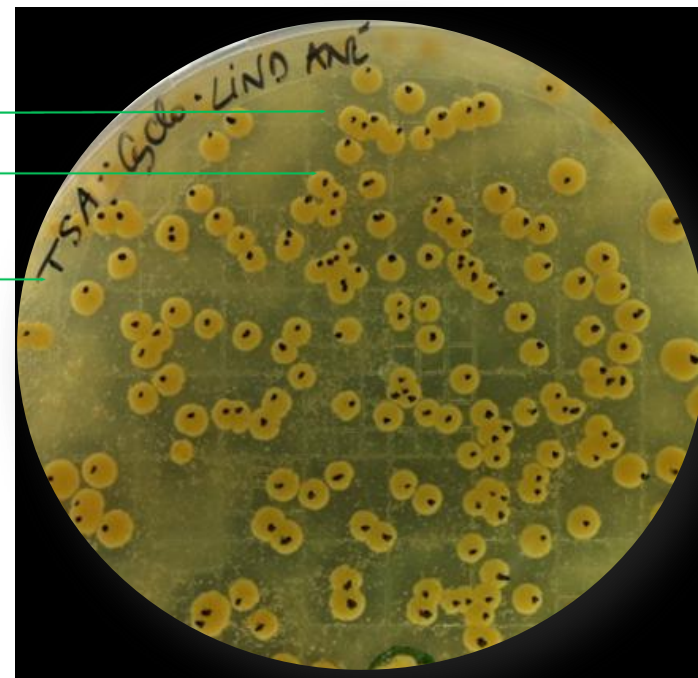


*Isolement Souche Pure Sphingomonas francense*

Halo de dégradation

Colonie bactérienne

Milieu de culture + Lindane



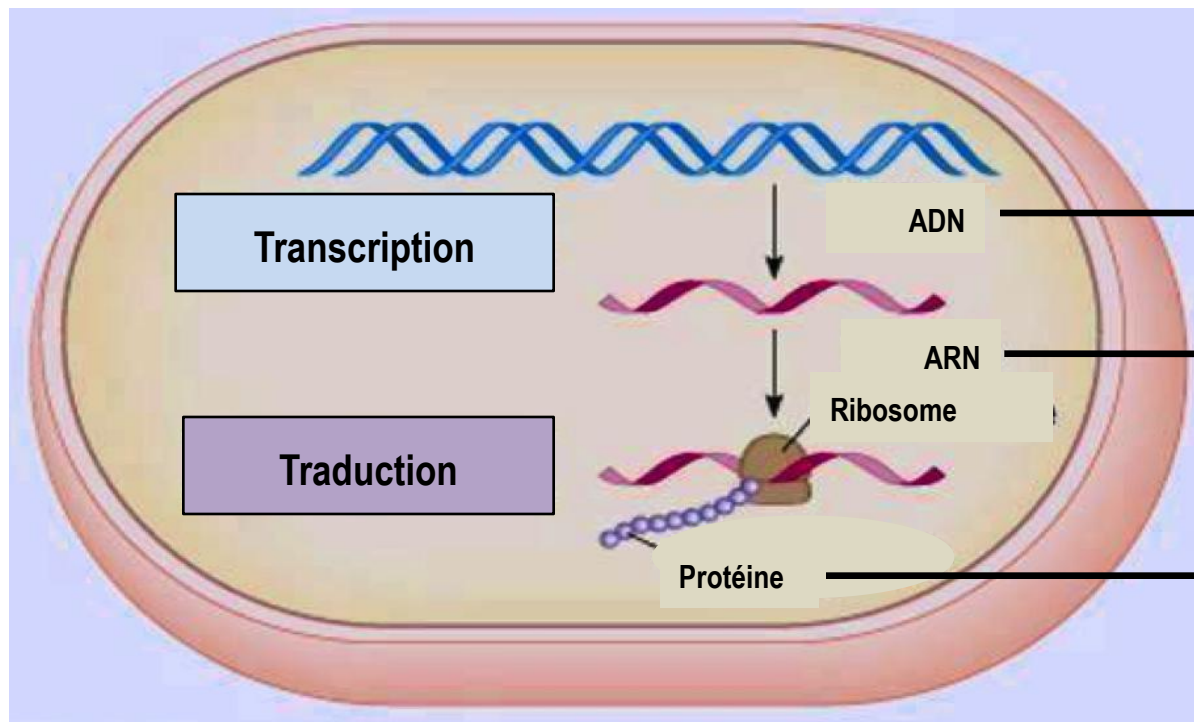
*Culture sur boîte Echantillon Environnemental*

- Capacité de biodégradation de lindane pur.
- Eventuel facteur limitant : la bioaccessibilité

Mise en évidence par microbiologie culturale du **potentiel de bioremédiation du Lindane** des sols étudiés



## Concepts de Base – Expression de l'activité bactérienne



Support de  
l'information génétique

Copie de l'ADN  
↳ *Demi-vie courte*

Enzymes



Activité de dégradation  
vis-à-vis d'un polluant

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique





## qPCR et RTqPCR - Réactions de Polymérisation en Chaîne Quantitatives

La q-PCR (sur une matrice ADN) est utilisée afin de quantifier la **présence** des gènes ciblés.

La RT-qPCR (sur une matrice ARN) est utilisée dans le but de quantifier l'**activité** de ces gènes.

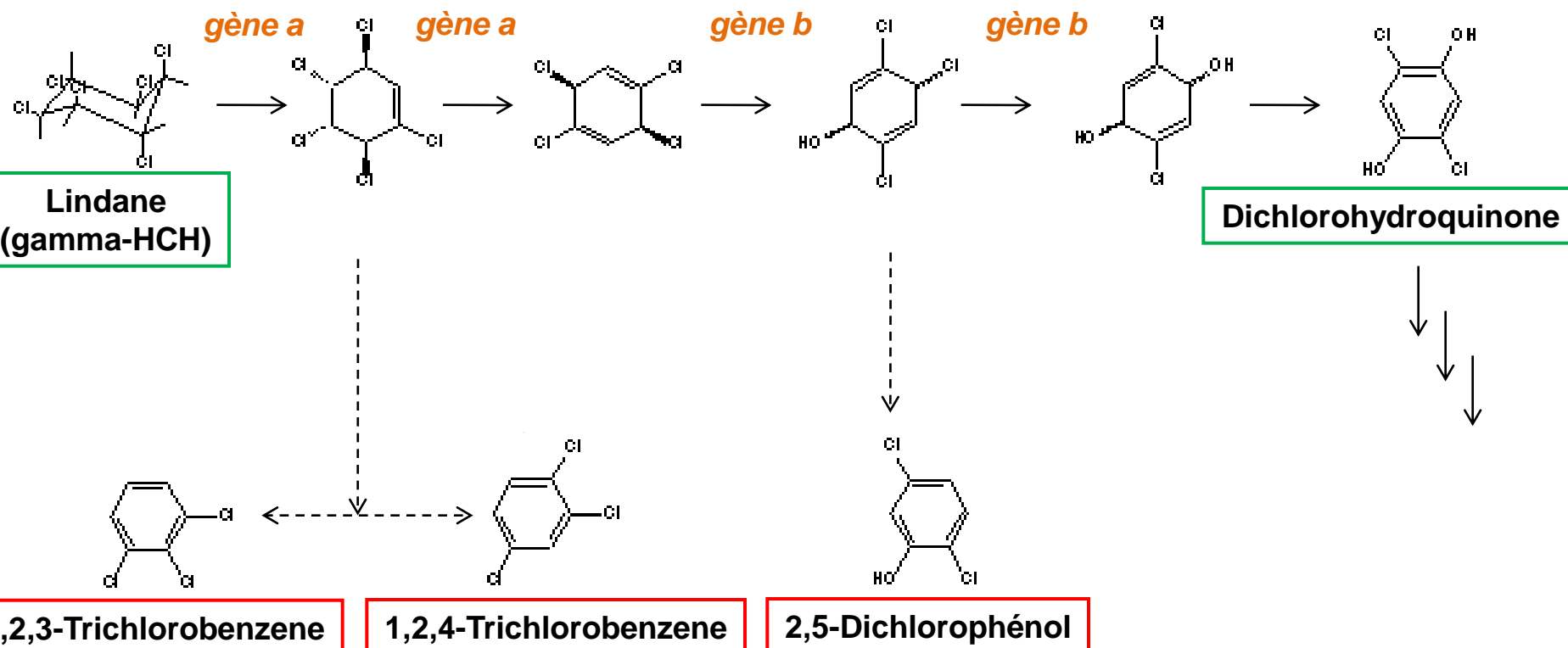
ADN	ARN
+	+
+	-
-	-

→ Gène présent et actif

→ Gène présent mais non actif = dégradation antérieure

→ Absence du gène = pas de biodégradation en place

Cette technologie permet de conclure quant à la **présence, l'activité et la quantité**  
d'un gène ou d'un genre bactérien  
impliqué dans un processus de biodégradation.



→ **gène a** : HCH déhydrochlorinase et **gène b** : Haloalkane déhalogénase (enzymes)



## Résultats des Analyses de Biologie Moléculaire (Microcosmes A)

→ Microcosme A : Echantillons de sol historiquement pollués avec ajout de Lindane (1g/kg)

gène a	T0	Contrôle (15 semaines)	Bioaugmenté (15 semaines)
ADN (présence)	++	++	< LQ
ARN (activité)	++	+	< LQ

gène b	T0	Contrôle (15 semaines)	Bioaugmenté (15 semaines)
ADN (présence)	++	++	< LQ
ARN (activité)	++	+	< LQ

Les gènes impliqués dans l'initiation de la biodégradation du Lindane,

✓ sont présents en **quantité importante** dans l'échantillon de sol à **T0** et dans la condition **Contrôle** du microcosme au bout de 15 semaines

✓ n'ont pas pu être mis en évidence ( < limite de quantification) dans la condition **Bioaugmenté** du microcosme au bout de 15 semaines.

Des copies d'**ARN** de ces gènes sont détectés pour l'échantillon de sol à **T0** et pour la condition **Contrôle**.



## **Conclusions de l'étude Préliminaire au Traitement *in situ* d'une pollution aux HCHs et TCB**

- Mise en évidence en condition laboratoire de la **possibilité d'une bioremédiation** du Lindane via les **Communautés Microbiennes Indigènes** du sol.
- La diminution des concentrations en Lindane ne s'accompagne **pas d'accumulation de métabolites intermédiaires** (1,2,3-Trichlorobenzène notamment).
- La **bioaugmentation** n'est pas indispensable à la biodégradation mais semble permettre une **mise en place plus rapide** de celle-ci dans le cas d'une **pollution ancienne** et donc faiblement bioaccessible.
- Mise en évidence d'une biodégradation des **autres isomères de HCHs** (*alpha et delta notamment*).
- La **multiplicité des polluants** et l'**hétérogénéité** des sols illustrent bien la nécessité d'une étude laboratoire complète préliminaire à la mise en place des bioprocédés de dépollution, permettant ainsi le **dimensionnement** d'un pilote sur site (*réalisation courant 2012*).



## **Quelques références ENOVEO ...**

### **✓ Réalisations de pilotes de biodégradation**

- \_ éthylènes chlorés en conditions anaérobies
- \_ éthanes chlorés en conditions anaérobies
- \_ PCB par biostimulation séquentielle anaérobie/aérobie
- \_ lindane et ses isomères (HCH) en conditions aérobies
- \_ hydrocarbures (aliphatiques, aromatiques, polyaromatiques) en conditions aérobies
- \_ MonoChloroBenzène en conditions aérobies dans une nappe phréatique

### **✓ Etudes et Expertises**

- \_ Etude sur l'influence microbienne dans la réduction du Chrome VI en Chrome III
- \_ Mise en évidence de l'atténuation naturelle des solvants chlorés dans une nappe phréatique
- \_ Mise en évidence de l'atténuation naturelle du benzène en condition aérobie dans le sol d'une zone non saturée
  - \_ Recherches d'organismes pathogènes dans des effluents industriels
  - \_ Rapport bibliographique sur le comportement des dioxines dans l'environnement
  - \_ Rapport bibliographique sur la biodégradation de l'Acide MonoChloroAcétique
  - \_ Caractérisation de biofilms microbiens
- \_ Expertise sur l'efficacité d'un traitement de biodégradation anaérobie sur une dépollution In-Situ de solvants chlorés
- \_ Expertise sur l'efficacité d'un traitement de biodégradation aérobie sur une dépollution In-Situ d'hydrocarbures