Quatrièmes Rencontres nationales
de la Recherche sur les sites et sols pollués

26 et 27 novembre 2019, Le Beffroi de Montrouge
(Portes de Paris)

Candidature pour : ☒ Communication orale ☐Communication poster ☐Communication poster avec présentation d'outil ☐ Vidéo de 180s

Biodégradation des HAPs dans les sols, assistée par lavage au biosurfactant

Florian CAZALS[1, 2, 3*], David HUGUENOT[1], Stéfan COLOMBANO[3], Stéphanie BETELU[3], Marc CRAMPON[3], Nathalie GALOPIN[2], Arnault PERRAULT[2], Marie-Odile SIMONNOT[4], Ioannis IGNATIADIS[3], Stéphanie ROSSANO[1]

[1] Laboratoire Géomatériaux et Environnement, Université Paris-Est Marne-la-Vallée, France, florian.cazals@cer.colas.fr, david.huguenot@u-pem.fr, stephanie.rossano@u-pem.fr
[2] Colas Environnement, France, nathalie.galopin@cer.colas.fr, perrault@cer.colas.fr
[3] Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM), France, s.colombano@brgm.fr, s.betelu@brgm.fr,m.crampon@brgm.fr, i.ignatiadis@brgm.fr
[4] Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Université de Lorraine, CNRS, France, marie-odile.simonnot@univ-lorraine.fr

*contact : Florian CAZALS **:** florian.cazals@cer.colas.fr

Résumé

Ce travail présente les résultats principaux de deux premières années d'une thèse, dont les objectifs de recherche s'articulent autour de deux axes : la production de biosurfactants et la mise au point de traitements des pollutions par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) par une combinaison de lavage aux biosurfactants et de biodégradation des HAPs contenus dans des sols impactés.
Pour atteindre les objectifs fixés, tout d'abord des bactéries capables de produire des biosurfactants ont été isolées et sélectionnées à partir d'échantillons extraits d'un sol pollué. La production de biosurfactant par ces souches bactériennes a été optimisée en sélectionnant la source de carbone la plus adaptée et en expérimentant divers rapports de concentrations entre les nutriments présents dans le milieu de culture. La purification du biosurfactant produit a permis son analyse et son identification par Chromatographie Liquide couplée à un Spectromètre de Masse.
Par ailleurs, la capacité des souches bactériennes étudiées à dégrader les HAPs a ensuite été testée en batchs.
Les résultats encourageants de ces essais de biodégradation ont permis de changer d'échelle et de tester la désorption des HAPs dans des colonnes de sable et de sol par injection de biosurfactant. La combinaison du lavage par biosurfactant et de la biodégradation a pu être testée en colonnes pluri décimétriques, ce qui permettra de dimensionner un pilote expérimental de démonstration, qui sera réalisé à l'échelle plurimétrique, éventuellement sur site.

Introduction

Les sols pollués par des HAPs représentent 10% des sols pollués en France. Les HAP, du fait de leur forte toxicité, du caractère cancérogène et mutagène de la plupart de ces molécules et de leur persistance dans l'environnement, sont considérés par les agences environnementales Européennes et des Etats-Unis, comme des polluants prioritaires à traiter. Les sols pollués par HAP sont souvent sur d'anciens sites de traitements de charbons ou liés à l'activité sidérurgique. Ce sont des sites historiquement proches de zones urbaines ou d'habitation, qui présentent donc un enjeu fort quant à leur réhabilitation.

Dans ce contexte, le projet AMI BIOXYVAL a pour but de proposer un ensemble complémentaire de techniques de dépollution des sites impactés par les HAPs. Pour cela, un site atelier, une ancienne cokerie située dans l'Est de la France, est mis à disposition pour la réalisation de pilotes d'essai pour trois techniques de dépollution : le pompage avec soutien thermique, l'oxydation chimique *in-situ*, et la biodégradation assistée par lavage au biosurfactant.
Les travaux de recherche décrits ci-dessous concernent le dernier point. Dans ce but, des bactéries capables de produire du biosurfactant ont été extraites du sol contaminé, puis isolées et sélectionnées. Le biosurfactant produit est ensuite utilisé pour désorber les HAPs à leur concentration résiduelle dans le sol, et ainsi augmenter leur bioaccessibilité, ce qui augmentera *in fine* leur biodégradation et donc les taux de dépollution du site.
Ces travaux font l'objet d'une thèse CIFRE adossée au projet BIOXYVAL, en partenariat avec Colas Environnement, une entreprise de dépollution des sols, le laboratoire LGE de l'Université Paris-Est Marne-La-Vallée, le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés de l'Université de Lorraine et le BRGM. Le projet MULTISCALEXPER (PSO3) du BRGM a été le promoteur du changement d'échelle opéré dans cette thèse.

Matériel et méthodes

Ces travaux ont nécessité l'utilisation et la mise au point de plusieurs protocoles expérimentaux :

Extraction des bactéries :
L'extraction et l'isolation des bactéries provenant du site pollué ont été réalisés par mises en culture successives dans des milieux minimaux en mélangeant 10 g de sol dans 50 mL de milieu de composition suivante : 0,0017 mol/L de $MgSO_4.7H_2O$, 0,0002 mol/L de $CaCl_2.2H_2O$ et 0,0074 mol/L de KH_2PO_4. Ce milieu a été mis à l'agitation à 20 °C pendant 48 h. Puis, un volume de 4 mL de la suspension résultante ont été réinjectés dans 71 mL d'un milieu de même composition et mis à l'agitation à 20 °C durant 7 jours [1]. La suspension obtenue a ensuite été déposée sur boite de pétri, d'un milieu de culture similaire, et les colonies obtenues ont été testées pour la production de biosurfactant.
Production de biosurfactant :
Les premiers essais de production de biosurfactant ont été réalisés en erlenmeyers de 500 mL et la mise en évidence de biosurfactant dans les milieux de culture a été accomplie par le test d'effondrement de la goutte [2]. En déposant une goutte du milieu testé sur une couche d'huile végétale, on peut attester de la présence ou non de biosurfactant si cette goutte s'étale sur l'huile, du fait de la diminution de la tension interfaciale entre les deux liquides, due à la présence de biosurfactant.
L'utilisation d'un goniomètre (DSA-100, Krüss), a permis de : i) suivre la diminution de la tension de surface dans les différents milieux, ce qui a pu être rapporté à des concentrations en biosurfactants par dosage spectrophotométriques, et ii) calculer la Concentration Micellaire Critique (CMC) du biosurfactant produit en mesurant la tension de surface entre une goutte de milieu de culture et l'air.
Lavage et biodégradation des HAPs :
Les premiers essais de dégradation ont été réalisés en batchs en erlenmeyer de 500 mL contenant 20 g de sol pollué et 100 mL d'eau polluée en testant différents surfactants et biosurfactants injectés en solution à la teneur de leur CMC. Les erlenmeyers ont été maintenus en agitation constante à une température de 20°C pendant 2 semaines. Les échantillons ont ensuite été analysés par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM). Les échantillons d'eau ont été extraits directement à l'aide d'une méthode SPME associée à la CPG/SM. Les échantillons de sol ont subi une double extraction Méthanol-Hexane assistée par sonication avant analyse.
Des essais dynamiques en colonnes ont ensuite été réalisés, les teneurs en biosurfactant en entrée et sortie de colonnes ont été mesurées par spectrophotométrie à l'aide de tests en tube pour tensio-actifs anioniques (MBAS Spectroquant, Merck Millipore). Pour les concentrations en HAPs, une extraction des échantillons d'eau à l'aide de cartouches SPE (SupelClean ENVI Chrom P SPE Tubes 3 mL, Supelco), en utilisant du dichlorométhane comme solvant d'élution, a été réalisée pour chaque échantillon avant analyse par CPG/SM.
Tous les essais ont été réalisés en triplicats.

Résultats et discussion

Le travail de recherche s'articule autour de deux axes principaux : la production de biosurfactant et un traitement de la pollution par une combinaison de lavage au surfactant et de biodégradation.
La première phase s'est attachée à la sélection de bactéries, issues d'un sol pollué, capables de produire des biosurfactants. La phase d'extraction des bactéries et de sélection d'un milieu de culture optimal a permis de produire de manière reproductible du biosurfactant. Ces expériences ont mis en évidence la forte influence de quatre paramètres dans la réussite ou l'échec de la production : le maintien d'un pH supérieur à

7, le maintien d'une oxygénation constante du milieu de culture, le choix de la source de carbone et sa solubilité, ainsi que l'ajustement du rapport C/N.
Des essais en batchs de désorption et de biodégradation ont été réalisés, en i) présence de sable artificiellement contaminé par 4 HAPs de référence : le naphtalène, le phénanthrène, le pyrène et le benzo[a]pyrène, ii) présence de biosurfactant et iii) en présence et en absence des bactéries productrices de biosurfactant.
Ces essais ont clairement montré une augmentation de la solubilisation des HAPs ciblés (solubilité réelle ou apparente), à l'exception du naphtalène, par la présence du biosurfactant (figure 1). Le naphtalène étant l'HAP le plus soluble et le plus volatil, il est possible qu'il soit le moins impacté par la présence du biosurfactant.

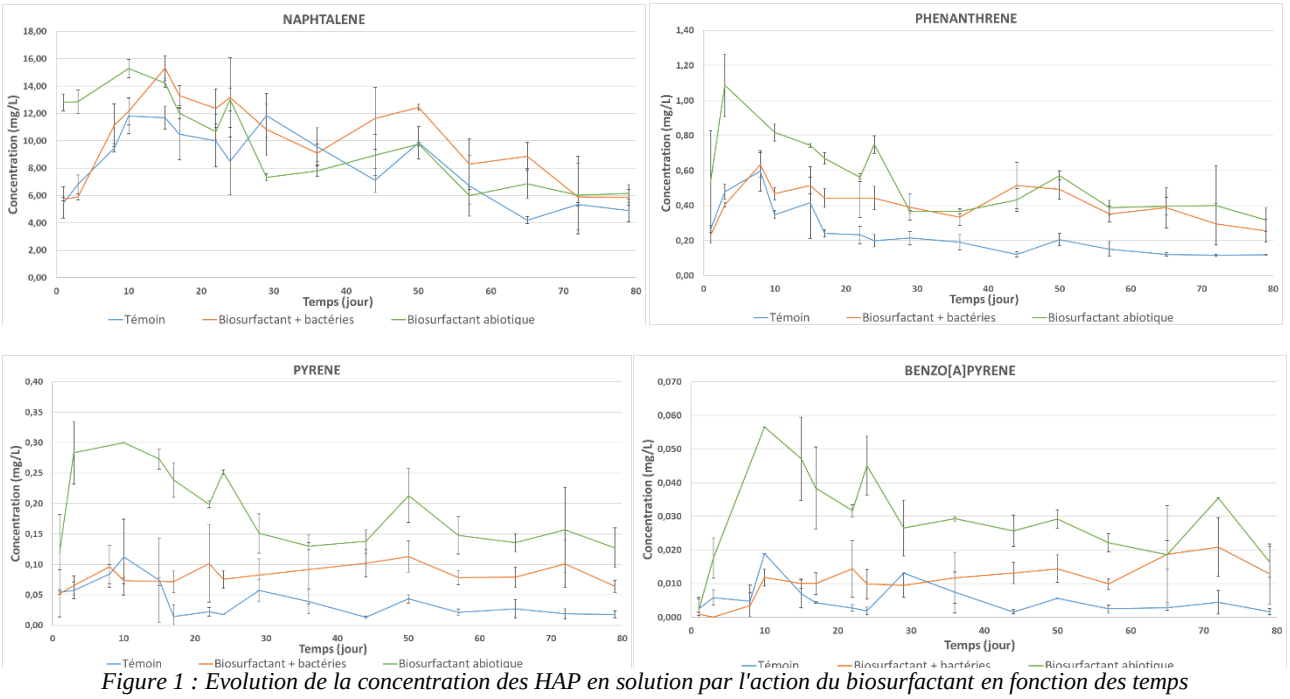

Figure 1 : Evolution de la concentration des HAP en solution par l'action du biosurfactant en fonction des temps

Après une différence initiale de solubilisation entre les batchs contenant du biosurfactant sans bactéries (courbes vertes) et les batchs contenant les bactéries et le milieu permettant la production de biosurfactant (courbes oranges), la concentration en HAP augmente en fonction du temps de contact dans ces derniers batchs, montrant que la production de biosurfactant entraîne une solubilisation des HAPs.
En fin d'expérimentation (80 jours), l'analyse des teneurs en HAPs restants dans le sable a été effectuée. Le rapport C/C_0 dans les échantillons témoins est supérieur aux autres. La présence de bactéries dans les batchs a entrainé une diminution de la masse de HAPs dans les batchs en fin d'expérimentation comparée aux batchs témoins et aux témoins abiotiques contenant du biosurfactant (figure 2). Plus l'HAP contient de cycles aromatiques, plus sa teneur finale est proche de la teneur initiale, ce qui indique une plus faible biodégradation. Ce phénomène est notamment observable pour le benzo[a]pyrène, où la teneur finale est proche de la valeur initiale, du fait de la très faible solubilité et biodégradabilité du composé. La présence de biosurfactant et de bactéries améliore néanmoins significativement sa dégradation.

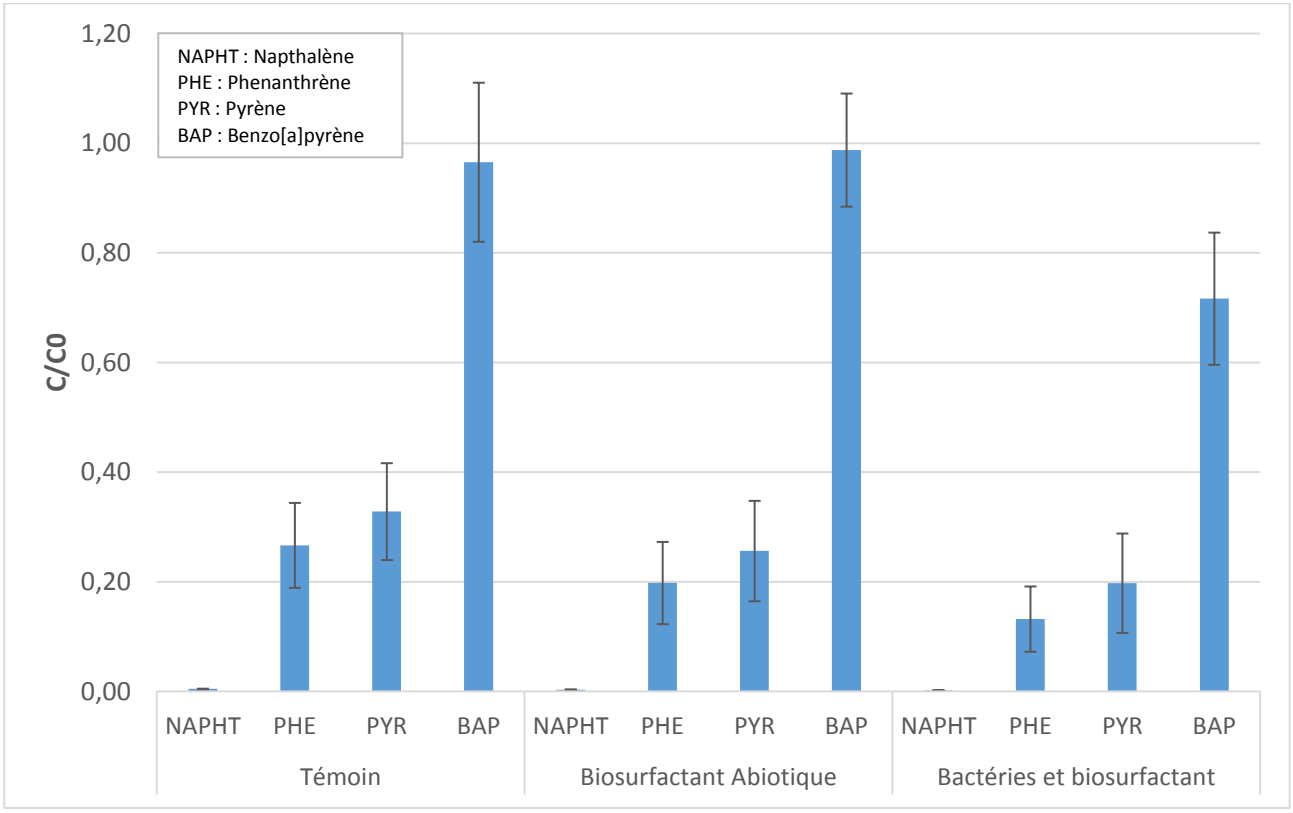

Figure 2 : Rapport des teneurs en HAPs dans les batchs en fin d'expérience (80 jours), comparativement aux teneurs initiales.

Les biosurfactants produits ont ensuite été comparés à des tensioactifs commerciaux, d'origine biologique ou chimique, pour des essais de biodégradation et de solubilisation.
Des essais préliminaires en colonnes de sable non polluées ont permis de déterminer les courbes de diminution de la concentration par sorption des différents surfactants et donc de sélectionner une concentration initiale suffisante pour que la concentration en sortie de colonne soit égale à la CMC. Cette valeur, appelée CMC efficace, a été ensuite utilisée pour des essais de désorption des HAPs dans des colonnes de sable artificiellement contaminées (figure 3).
Ces essais ont montré une capacité de désorption du biosurfactant utilisé proche de celle du SDS et supérieure à celle des Rhamnolipides.

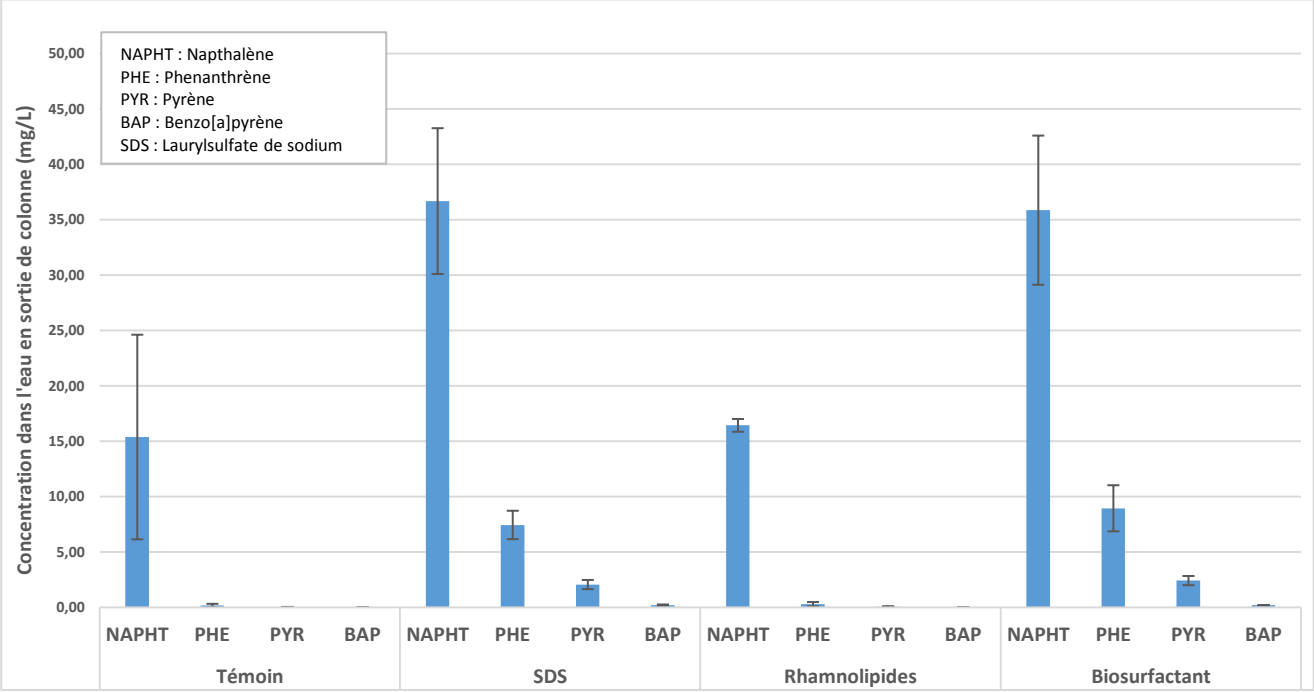

Figure 3 : Augmentation de la désorption des HAPs dans des colonnes de sable par action d'un surfactant chimique (SDS) et deux biologiques (Rhamnolipides et le biosurfactant suivi).

Ces résultats prometteurs ont permis de changer d'échelle et de lancer de nouveaux essais de désorption des HAPs et biodégradation avec recirculation, en colonnes de sable à plus grande échelle (pluri centimétrique). Actuellement en cours, ils permettront de mettre au point un procédé de traitement qui pourra être appliqué à une plus grande échelle, par la mise en place d'un pilote expérimental de démonstration avec un sol pollué réel, qui sera réalisé à l'échelle plurimétrique, éventuellement sur site.

Conclusions et perspectives

Les essais réalisés ont permis de mettre en évidence la capacité de bactéries provenant de sites pollués à produire des biosurfactants. Ces biosurfactants peuvent être utilisés pour désorber et solubiliser les HAPs présents sous forme résiduelle dans le sol et augmenter leur biodisponibilité, améliorant ainsi leur biodégradation. Ainsi la combinaison de ces deux traitements permet une amélioration des rendements de dépollution pour les sols impactés par des HAPs à leur concentration résiduelle.
L'optimisation de la production des biosurfactants est encore une voie d'amélioration possible, notamment l'utilisation de sous-produits de l'industrie comme sources de carbone et de nutriments, afin de diminuer les coûts de production, ce qui devrait permettre de concurrencer les surfactants chimiques classiquement utilisés dans les procédés de lavage des sols, et ainsi d'opter pour l'utilisation de produits plus biodégradables, moins persistants et moins toxiques pour l'environnement.

Références

[1] McGrath, S. P., Shen, Z. G., & Zhao, F. J. (1997). Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of Thiaspicaerulescens and Thlaspiochroleucum grown in contaminated soils. *Plant and Soil*. https://doi.org/10.1023/A:1004248123948

[2]Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H., & Trevors, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. Journal of Microbiological Methods, 13(4), 271–279. https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90064-W

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet BIOXYVAL (nous remercions l'ADEME qui a financé une partie du projet dans le cadre du programme Investissements d'Avenir) et d'une thèse CIFRE (nous remercions l'ANRT pour le soutien financier de Florian Cazals). Nous remercions également la Direction BRGM/D3E et le projet MULTISCALEXPER PSO3, qui ont financé une partie du projet dans les changements successifs d'échelle. Enfin, nous remercions chaleureusement le soutien financier apporté au projet PIVOTS par la Région Centre - Val de Loire (programme ARD 2020 et CPER 2015-2020) et le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (CPER 2015-2020 et la subvention de service public au BRGM).