

Sites et eaux souterraines pollués

Des traitements économiques par bio-atténuation naturelle surveillée

La pollution des eaux souterraines par des produits organiques peut constituer un enjeu économique de premier ordre, surtout si elle conduit à une dépollution par pompage et traitement des eaux. Ce scénario peut facilement rendre insolvable l'exploitant d'une installation classée responsable ou le propriétaire du site pollué. L'alternative économiquement acceptable est l'application de méthodes douces comme l'utilisation contrôlée et renforcée des capacités naturelles de dépollution du milieu ou bio-atténuation naturelle surveillée (Bans)⁽¹⁾. Elles s'appliquent aujourd'hui sur des sites pollués par des BTEX, HAP, solvants chlorés, etc... comme le montre l'exemple décrit dans cet article.

FRANK KARG
HPC ENVIROTEC
EXPERT JUDICIAIRE

Dans chaque aquifère (c'est à dire l'espace géologique d'une nappe phréatique) une pollution par des produits organiques suscitera quasiment toujours la mise en place d'un « bioréacteur » naturel de dégradation microbologique des polluants. Les seules questions à poser pour bien le connaître et l'utiliser sont :

- Quelle est la vitesse de dégradation microbologique naturelle (par ex. en µg/l/jour) ?
- Quelle est la durée de dégradation naturelle nécessaire pour atteindre des concentrations en polluants pouvant être considérées comme sans risque inacceptable ?
- Quelle est la dimension du bioréacteur naturel à surveiller ?
- Faut-il activer et/ou dynamiser le bioréacteur naturel par bio-atténuation naturelle dynamisée - Band ?
- Quels sont les facteurs éventuels qui limitent le développement du bioréacteur naturel ?

Si l'on peut répondre de façon favorable à ces questions, l'application d'un bioréacteur naturel comme option de dépollution en terme de bioatténuation naturelle surveillée (Bans) est possible. Le fractionnement des isotopes (Forensik) et la biotechnologie génétique (réaction en chaîne de polymérase - PCR) sont des outils modernes qui permettent maintenant de mieux comprendre et utiliser un bioréacteur naturel comme alternative de dépollution des eaux souterraines.

Des critères d'acceptation de la *Bans* comme option de dépollution ont déjà été publiés par certaines administrations aux USA, en Allemagne et dans autres pays^(2,3).

Études de faisabilité technico-économique du traitement par BANS à l'aide de la Forensik et de la bio-technologie génétique

À priori la capacité de dégradation micro-

biologique par un bioréacteur naturel devrait toujours être utilisée de façon ciblée dans le cadre d'un scénario de réhabilitation ou de dépollution d'un site et des eaux souterraines afin de ne pas gaspiller ce potentiel. Ceci peut se faire en complément d'autres traitements actifs ou par une utilisation seule de la *Bans*.

Pour une application de la *Bans* comme option de dépollution, les critères d'application^(2,3) demandent une clarification des points suivants :

- prouver l'existence d'une dégradation microbologique naturelle,
- quantifier la vitesse de dégradation microbologique du bioréacteur naturel,
- déterminer le milieu physico-chimique et microbiologique du bioréacteur naturel,
- déterminer l'extension du bioréacteur naturel,
- déterminer si une dynamisation de la bio-Atténuation naturelle est nécessaire, par exemple au cas où une étude détaillée des risques (EDR) aurait imposé un délai (durée d'exposition maximale, etc...).

La preuve de la présence d'un bioréacteur naturel et de la dégradation microbiologique des polluants

À priori, plusieurs démarches sont à appliquer pour prouver la dégradation des polluants par un bioréacteur naturel. Il s'agit :

- d'investigations des paramètres bio-géochimiques,
- de l'application de la PCR comme méthode bio-chimique génétique,
- du fractionnement des isotopes = (Forensik)
- de l'identification des métabolites des polluants.

L'étude de cas suivante montre bien l'utilité de ces différentes démarches. Il s'agit d'un site d'industrie chimique et de transformation d'hydrocarbures et autres produits carbocimiques (BTEX, HAP, phénols et cré-

sols). Une pollution des eaux souterraines sous forme de BTEX, HAP et phénols principalement, était le motif d'une demande de l'administration de dépolluer (cf. figure 1 et 2). L'EDR a montré qu'il faudrait 17 ans pour que l'évaporation et le transfert des polluants via l'air du sol vers l'air ambiant ramènent les expositions et les risques sanitaires pour les riverains vis-à-vis des eaux souterraines polluées à un niveau acceptable (sans pour autant les rendre exploitables). Une solution plus douce que la méthode Pump & Treat est donc possible pendant un tel « budget espace-temps maximal de 17 ans ».

Les paramètres bio-géochimiques

Les paramètres bio-géochimiques peuvent nous renseigner sur l'utilisation éventuelle par des microorganismes d'accepteurs d'électrons. Entre le milieu aérobie et anaérobie d'une dégradation microbologique des polluants, les accepteurs d'électrons sont épuisés dans l'ordre suivant :

- l'oxygène,
- le nitrate
- le sulfate.

Tableau 1 : Dégradation microbologique du benzène par l'utilisation des accepteurs d'électrons différents

Accepteurs d'électrons	Réaction	Bilan [mg Ox./mg Benzol]
Oxygène	$7,5 \text{ O}_2 + \text{C}_6\text{H}_6 \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 3 \text{ H}_2\text{O}$	3,08
Nitrate	$6 \text{ NO}_3^- + 6 \text{ H}^+ + \text{C}_6\text{H}_6 \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + 3 \text{ N}_2$	4,77
Nitrate	$3,75 \text{ NO}_3^- + 0,75 \text{ H}_2\text{O} + 7,5 \text{ H}^+ + \text{C}_6\text{H}_6 \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 3,75 \text{ NH}_4^+$	2,99
Sulfate	$3,75 \text{ SO}_4^{2-} + \text{C}_6\text{H}_6 \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 3 \text{ H}_2\text{O} + 3,75 \text{ S}^{2-}$	4,62
Fer(III)	$30 \text{ Fe(OH)}_3 + 60 \text{ H}^+ + \text{C}_6\text{H}_6 \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 78 \text{ H}_2\text{O} + 30 \text{ Fe}^{2+}$	21,5
Manganèse(IV)	$15 \text{ MnO}_2 + 30 \text{ H}^+ + \text{C}_6\text{H}_6 \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 18 \text{ H}_2\text{O} + 15 \text{ Mn}^{2+}$	10,6
Méthanogénèse	$4,5 \text{ H}_2\text{O} + \text{C}_6\text{H}_6 \rightarrow 2,25 \text{ CO}_2 + 3,75 \text{ CH}_4$	-

Le fer et le manganèse pourront aussi agir comme accepteurs d'électrons.

Simultanément, des produits de bio-transformation sont créés comme l'azote ou l'ammonium (produits de réduction du nitrate), le sulfure (produit de réduction du sulfate) ou le méthane en milieu strictement anaérobie. Dans tous les cas, du CO_2 est produit et se manifeste sous forme d'hydrogène-carbonate (HCO_3^-).

Le tableau 1 montre les réactions de dégradation à partir de l'exemple « benzène » en milieu microbologique et à partir d'accepteurs d'électrons différents.

Evidemment, si la disparition d'un accepteur d'électrons et l'apparition de produits de

bio-transformation montrent des similitudes avec la distribution de polluants, des premiers indices d'un bioréacteur naturel de dégradation microbologique existent (cf. figures 3 à 6).

Dans le cadre du site carbochimique cité en exemple, une disparition du nitrate et du sulfate est constatée dans la zone polluée (cf. figures 3 et 4). Simultanément, l'hydrogène-carbonate et le méthane sont produits dans la plume (panache) de pollution des eaux souterraines (cf. figures 5 et 6). Etant donné les distributions des iso-concentrations des paramètres bio-géochimiques, il pourrait déjà être constaté qu'une dégradation microbologique de polluants est très probable en



Figure 1 : Site carbochimique et pollutions des eaux souterraines par le benzène

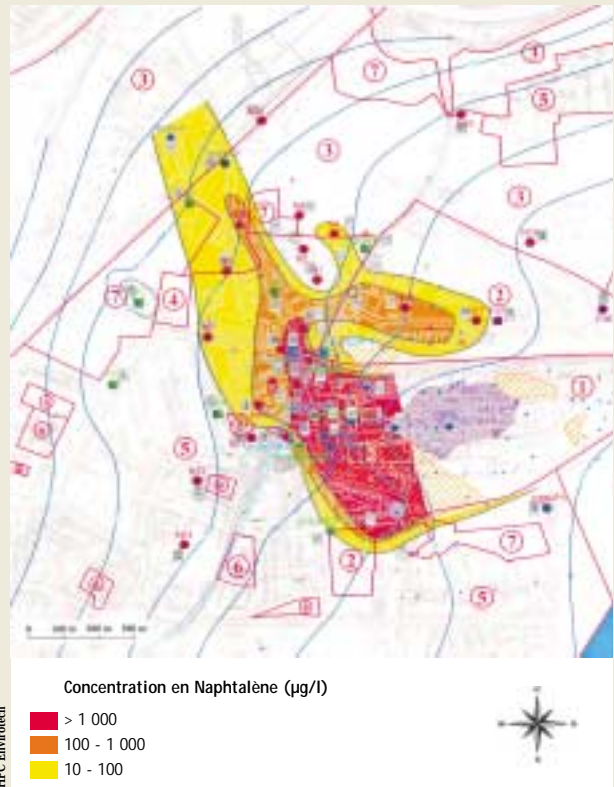


Figure 2 : Site carbochimique et pollutions des eaux souterraines par le naphtalène

milieu :

- de réduction de nitrate,
- de réduction de sulfate et
- de production de méthane et de CO₂.

Analyses biochimiques génétiques

Aujourd'hui, il est reconnu que les anciennes applications de traitements microbiologiques des sites pollués ont souvent été des aventures hasardeuses dont l'efficacité s'est révélée trop limitée (ou absente). La raison en est que souvent seules une ou quelques souches de microorganismes ont été utilisées car seulement 10 à 15 % des bactéries du sous-sol sont cultivables en laboratoire. Pour utiliser les autres 85 à 90 % de microorganismes du sous-sol, la biotechnologie génétique moderne peut aujourd'hui être utilisée, de façon à identifier les microorganismes capables de dégrader les polluants en question sans être obligé de les cultiver en laboratoire.

Le principe est le suivant : on installe dans les piézomètres d'une nappe phréatique polluée, des préleveurs passifs spécifiques (Frogs) dans lesquels la biomasse des eaux souterraines en question peut se former pendant 3 à 4 semaines. Cette biomasse sera constituée des microorganismes de la nappe phréatique polluée quasiment sans perte d'espèces.

Des tests biochimiques génétiques sont ensuite effectués. En fait, ce ne sont pas des espèces de bactéries particulières qui sont recherchées, mais les séquences d'ADN de l'ensemble des microorganismes responsables de la production d'enzymes de destruction des polluants en question.

Cette technique dite PCR a été créée il y

Tableau 2

Nombre de cycles PCR	Nombre d'amplifications du Gène recherché
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1 024
11	2 048
12	4 096
13	8 192
14	16 384
15.....38	
39	549 755 813 888

a une vingtaine d'années par la biotechnologie médicale pour l'identification des virus, bactéries pathogènes ou cellules cancérogènes. Depuis 4 ans, son utilisation commerciale a débuté pour le traitement des sites pollués et pour déterminer le potentiel génétique de dégradation des polluants de la biomasse.

Analyse génétique par la PCR

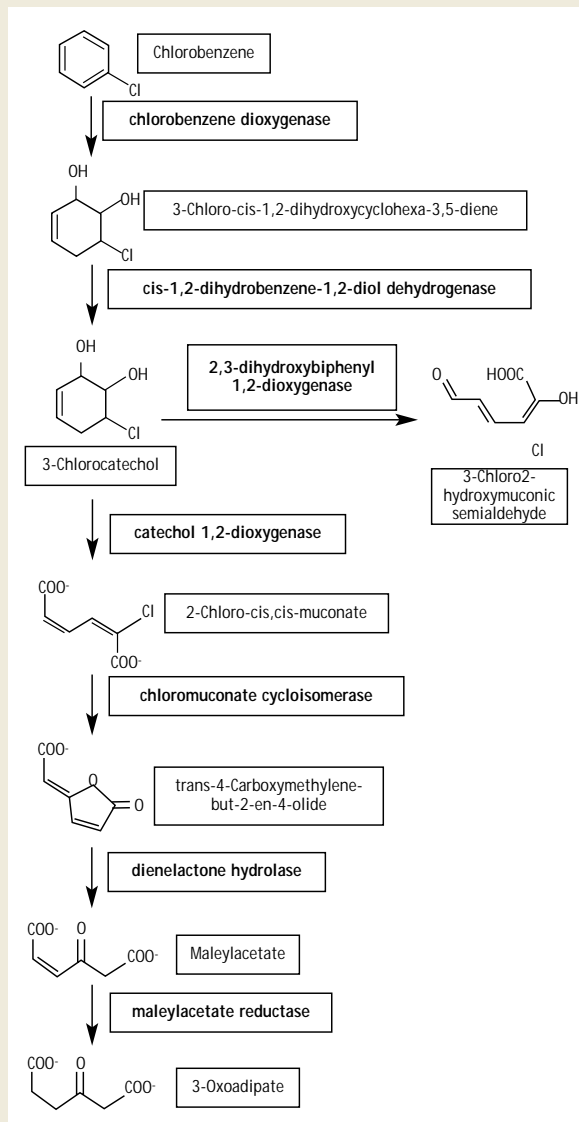
La méthode PCR permet d'évaluer si la dégradation microbiologique peut s'opérer en déterminant la présence de microorganismes génétiquement adaptés à sa mise en œuvre.

Le potentiel génétique est déterminé par l'examen de l'ADN des microorganismes endogènes du site. On évalue en effet la présence de gènes codant pour les enzymes nécessaires à la dégradation du polluant.

Le test est exécuté sur plusieurs cycles (en règle générale 39) pour amplifier le gène des milliards de fois, tel qu'indiqué dans le tableau 2.

En utilisant un gel d'électrophorèse, le matériel génétique peut être séparé en bandes discontinues en fonction du poids moléculaire et les produits de l'amplification peuvent être visualisés sous lumière UV.

La figure 7 montre la zone du site (de l'étude de cas) dans laquelle les tests PCR ont



Exemple de la dégradation biologique du chlorobenzène et des enzymes nécessaires⁽⁴⁾

pu déterminer des potentiels génétiques microbiologiques de dégradation des polluants, constituant le noyau du bioréacteur naturel.

Tableau 3

Élément	Forme principale		Autres formes stables	
	Isotope	%	Isotope	%
Hydrogène (H)	¹ H	99,985	² H	0,015
Carbone (C)	¹² C	98,89	¹³ C	1,11
Azote (N)	¹⁴ N	99,63	¹⁵ N	0,37
Oxygène (O)	¹⁶ O	99,759	¹⁷ O	0,037
			¹⁸ O	0,204

Sites pollués



Isoconcentration en Nitrate ($\mu\text{g/l}$)

- > 1
- < 0,5

HPC Environtech



Figure 3 : Réduction de nitrate dans la zone polluée



Isoconcentration en Sulfate (mg/l)

- > 300
- 150 - 300
- 100 - 150
- 50 - 100
- 10 - 50
- < 10

HPC Environtech



Figure 4 : Réduction de sulfate dans la zone polluée



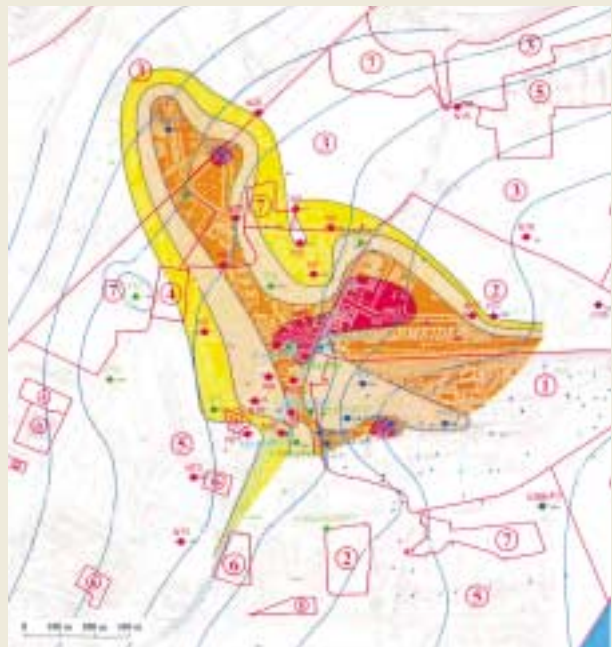
Isoconcentration en Hydrogèncarbonate (mg/l)

- > 600
- 450 - 600
- 300 - 450
- < 300

HPC Environtech



Figure 5 : Production d'hydrogèncarbonate dans la zone polluée



Isoconcentration en Méthane (mg/l)

- > 10
- 5 - 10
- 1 - 5
- 0,1 - 1,0

HPC Environtech



Figure 6 : Production de méthane dans la zone polluée

Forensik : Le fractionnement des isotopes

Les isotopes sont des éléments qui possèdent le même numéro atomique mais des nombres de masse différents. Une forme principale existe dans la nature cohabitant avec d'autres formes d'isotopes stables à des niveaux moindres. Le tableau suivant présente une sélection des principaux éléments naturels qui nous intéressent pour l'étude des systèmes biologiques (tableau 3).

Les isotopes apparaissant naturellement présentent des caractéristiques différentes, notamment des affinités de liaison altérées. Les isotopes plus lourds forment des liaisons chimiques plus fortes que les isotopes plus légers.

La séparation microbiologique de liaisons chimiques plus fortes requiert cependant davantage d'énergie d'activation que pour celle des liaisons plus faibles. Dans les systèmes biologiques naturels, les processus privilégiés mis en œuvre sont ceux qui confèrent des possibilités d'énergie minimum. Par conséquent, les molécules qui contiennent les isotopes les plus lourds sont moins vite

dégradées que les autres, ce qui conduit à leur enrichissement dans la fraction résiduelle. En comparaison avec les systèmes géochimiques non biologiques, ce phénomène conduit à des différences minimales mais néanmoins mesurables dans la distribution des isotopes. Pour mesurer cette différence, on utilise la spectrométrie de masse de ratio d'isotopes (IR-MS).

Dans notre cas, on peut identifier dans un piézomètre à l'amont hydrogéologique, le ratio en isotopes $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ pour un polluant (BTEX, HAP, etc...). Si ce ratio dans un polluant mesuré à l'aval hydrogéologique montre une plus forte distribution en isotopes ^{13}C , la dégradation microbiologique du bioréacteur naturel peut être quantifiée en μg de polluant par litre d'eaux souterraines et par jour (5 à 10).

Cette distribution peut être comparée au moyen de la valeur $\delta^{13}\text{C}$, celle-ci représentant le rapport entre les formes isotopes en nombre de parties par milliers, en fonction d'un standard. Par exemple, la formule du carbone est :

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{échantillon}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Standard}}} - 1 \right) \times 1000$$

Si la dégradation microbiologique d'un substrat se produit, le changement de ratio de l'isotope du aux processus biologiques peut être décrit par l'équation de Rayleigh :

$$R / R_0 = (c_t/c_0)^{(1/\alpha-1)}$$

R désigne le ratio isotope actuel et R_0 celui d'origine, (c_t/c_0) désigne le ratio entre la concentration de substrat au début (c_0) et à la fin (c_t), et $(1/\alpha - 1)$ représente le facteur de fractionnement. Grâce à cette équation, le facteur de fractionnement $(1/\alpha - 1)$ peut être déterminé en laboratoire dans des conditions contrôlées. Le facteur de fractionnement permet de déterminer par la suite la fraction de substrat restante :

$$f_t = \frac{R_t}{R_0} \exp\left(\frac{1}{1/\alpha-1}\right)$$

Ce qui conduit au calcul de la biodégradation B :

$$B_t [\%] = (1 - f_t) \times 100$$

La biodégradation naturelle du site Bt [%] peut être calculée (en $\mu\text{g}/\text{l}/\text{jour}$) entre deux piézomètres (en amont et aval hydrogéologique) en utilisant la distance (en m) entre les piézomètres et la vitesse d'écou-

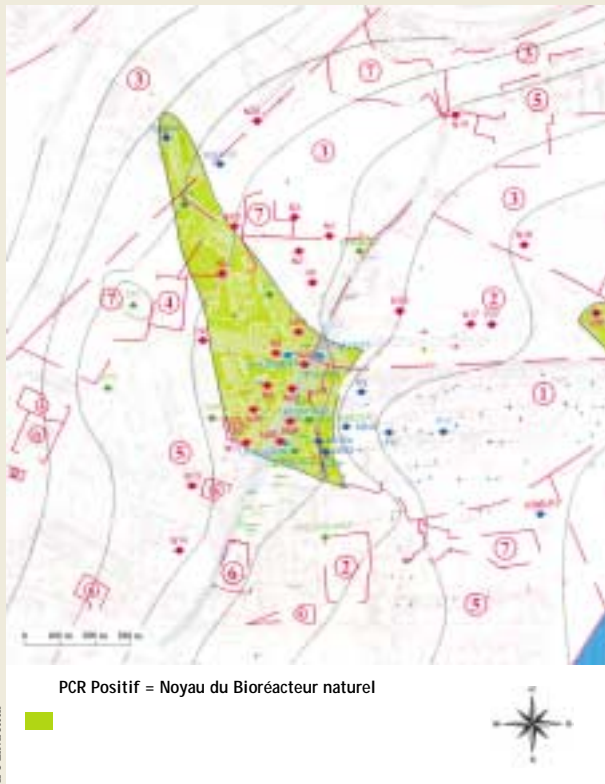


Figure 7 : Tests PCR potentiel génétique microbiologique de dégradation des BTEX et HAP



Figure 8 : Vitesse de bio-dégradation naturelle des équivalents de benzène et de naphthalène

ment des eaux souterraines.

La figure 8 montre la vitesse de biodégradation déterminée pour les polluants du site de l'étude de cas (vitesse de biodégradation naturelle en équivalents de benzène et naphthalène en µg/l par jour). La durée du traitement peut donc être calculée en harmonisation avec la période maximale acceptable d'exposition déterminée par l'EDR.

Conclusion

Les méthodes modernes de biotechnologie génétique (PCR) et de fractionnement des isotopes (Forensik) sont des outils donnant accès à la compréhension de systèmes complexes comme les bioréacteurs naturels dans les eaux souterraines et aquifères des sites pollués. Ils permettent de déterminer exactement :

- la présence d'une biodégradation des polluants,
- l'extension d'un bioréacteur naturel de dégradation des polluants,
- la vitesse de dégradation microbologique des polluants,
- la durée d'un traitement par *Bans*,
- le besoin éventuel d'une dynamisation d'un bioréacteur naturel
- la définition des besoins de surveillance des eaux souterraines pour assurer une dépollution naturelle tout en ramenant les risques à un niveau acceptable.

Dans le cas du site carbochimique présenté, des polluants « difficiles » à dégrader ont été traités (HAP). Il est donc possible de vérifier (et de prouver) que le vecteur physique de migration des polluants dans les eaux souterraines peut être limité par un « contre-vecteur biologique ». Ce dernier, sous forme de bio-atténuation naturelle, peut être quantifié pour vérifier si une plume (panache) de pollution des eaux souterraines est stable, progressive ou régressive.

Pour le site carbochimique étudié, la stabilité, voire la régression de la plume a été prouvée. La possibilité d'une durée de dépollution raisonnable réduisant les risques à un niveau acceptable a été démontrée de sorte que les pouvoirs publics et l'ensemble des intervenants ont été convaincus de l'adé-

LE JLMD SYSTEM FAIT TACHE D'HUILE

Le JLMD system permet la récupération rapide de la cargaison contenue dans les navires en cas de naufrage ou d'échouement (Cf *Environnement & Technique* n° 230). Il peut être installé sur tous types de navires citernes et fonctionne quelles que soient les conditions météorologiques. Sa simplicité d'installation le rend incontournable dans la lutte contre la pollution maritime. C'est pourquoi, d'ici à 2005, il sera installé sur 30 navires. Près de 50 pétroliers sont en attente de commandes. L'armateur français Socatra, sensible à la protection de l'environnement et à la préservation de l'univers marin, a décidé d'équiper l'ensemble de sa nouvelle flotte du dispositif. Déjà installé sur le Nizon, affrété par Total, ce système est prévu sur deux autres navires : le Kerlaz, baptisé à Barcelone le 2 novembre et le Kermaria, prévu pour fin décembre 2004. Mais l'action de l'armateur va plus loin puisque l'ensemble de ses navires déjà en exploitation pourraient également bientôt être équipés. Le concepteur du dispositif, JLMD Ecologic Group, s'investit par ailleurs auprès des gouvernements et des organismes publics pour faire de son invention un standard de sécurité imposé par des réglementations au même titre que le procédé double-coque. Plusieurs firmes françaises l'ont aujourd'hui rejoint dans sa lutte contre la pollution maritime. En apportant leur expertise, elles permettent d'instaurer de nouvelles normes tel Groupama Transport, second assureur européen du milieu maritime, qui proposera des avantages aux armateurs désireux d'équiper leur flotte du JLMD system. BM

quation de la *Bans* à la situation. Celle-ci est garantie par une surveillance « sur mesure » du bioréacteur naturel (polluants et paramètres bio-géochimiques) car le milieu réducteur de nitrate et sulfate est dans ce cas à entretenir.

Dans tous les cas de dépollution des eaux souterraines, l'application de la *Bans* (ou éventuellement de la *Band*) devrait toujours être utilisée (au moins en complément) de façon à éviter le gaspillage des capacités naturelles du milieu à dégrader les polluants. ■

Références

1. Karg, F. (2003) : *Dépollution par biotechnologie génétique : la bio-atténuation naturelle dynamisée*, Environnement & Technique n° 231, Novembre 2003.
2. Sinke, A. La Hecho, I (1999) : *Natural Attenuation : Guidelines for acceptance*, TNO Report TNO-MEP-R 99/313A.
3. Hlug (2004) : *Critères d'acceptation de la Monitored Natural Attenuation pour les eaux souterraines polluées*. Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie / Allemagne.
4. Alfreider, A ; Vogt, C and Babel, W. (2003) : *Expression of Chlorocatechol 1,2-Dioxygénase and Chlorocatechol 2,3-Dioxygénase Gènes in Chlorobenzène-Contaminated Subsurface Samples*, Appl. Environ. Microbiol., vol 69, p. 1372-1376.

5. Bloom, Y., Aravena, R., Hunkeler, D., Edward, E., Frapce, S.K. (2000) : *Carbon isotope fractionation during microbial dechlorination of trichloroethene, cis-1,2-dichloroethene and vinyl chloride ; implications for assessment of natural attenuation*. Environ. Sci. Technol. 34, 2768 – 2772.
6. Hoefs, J (1997) : *Stable Isotope Geochemistry, 4th ed. Springer Verlag*, Berlin, Germany.
7. Meckenstock, R.U., Morasch, B., Wartmann, R., Schink, B., Annweiler, E., Michaelis, W., Riechnow, H.H. (1999) : *13C/12C isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation*. Environ. Microbiol. 1, 409 – 414.
8. Riechnow, H.H., Meckenstock, R.U., Reitzel, L.A., Baun, A., Ledin, A., Christensen, T.H. (2002) : *In situ biodegradation determined by carbon isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an anaerobic landfill leachate plume*, J. Cont. Hydrology, 64, 59 – 72.
9. Riechnow, H.H., Vieth, A., Kästner, M., Gehre, M., Meckenstock, R.U. (2002) : *Isotope Fractionation of Toluene : A Perspective to Characterise Microbial in-situ Degradation*, The Scientific World (2002), 2.
10. Riechnow, H.H., Annweiler E., Michaelis, W., Meckenstock, R.U. (2003) : *Microbial in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by carbon isotope fractionation*, J. Cont. Hydrology, 1907, 1 – 20.



Spécialiste des solutions relatives au domaine des sites pollués en Europe et Outre-Mer (72 agences) afin de répondre aux attentes des collectivités, des industriels et des sociétés immobilières.

Nos services incluent :

- Investigations et Évaluation Simplifiée des Risques (ESR)
- Évaluations Détaillées des Risques (EDR),
- Dépollution et toute ingénierie nécessaire.

Contact : Dr Frank Karg
 Tél. : 02 99 13 14 50
 Fax : 02 99 13 14 51
 E-mail : hpc.france@wanadoo.fr