

Centre de Pédologie Biologique du C.N.R.S.  
17 rue Notre-Dame-des-Pauvres  
B.P. 5  
54501 Vandoeuvre-Les-Nancy cedex



**ETUDE DE FAISABILITE DE TRAITEMENT BIOLOGIQUE DE SOLS  
POLLUES PAR DES HYDROCARBURES POLYAROMATIQUES.**

**Rapport Intermédiaire du Contrat de Collaboration de Recherche  
Bail Industrie et CPB-CNRS**

**Février 1994 - Septembre 1994**

**Florence NIBART**

Centre de Pédologie Biologique :

Corinne LEYVAL  
Jacques BERTHELIN

# SOMMAIRE

## CHAPITRE 1 : DENOMBREMENT DE LA MICROFLORE BACTERIENNE TOTALE ET RECHERCHE DE SON APTITUDE A DEGRADER DES COMPOSES POLYAROMATIQUES

### 1- MATERIEL ET METHODES

7

#### 1.1. Echantillons

1.1.1. Echantillonnage des sols

1.1.2. Préparation des échantillons utilisés pour les dénombrements

#### 1.2. Composés polyaromatiques utilisés lors du dénombrement de la microflore dégradante

#### 1.3. Milieux de culture

#### 1.4. Mise au point du protocole expérimental

1.4.1. Etude de la solubilisation des hydrocarbures polyaromatiques

1.4.1.1. Etude de la solubilisation des trois hydrocarbures à l'aide de surfactants

1.4.1.2. Etude de la solubilisation des trois hydrocarbures dans de l'éthanol ou du méthanol

1.4.1.3. Essai de dénombrement de la microflore totale et de la microflore dégradante des échantillons 94S1 et 94S4

1.4.2. Etude de la tolérance de bactéries et de champignons à l'éthanol et aux HPA

1.4.3. Essai de mise au point d'un milieu solide à base de gel de silice

1.4.4. Conclusions

### 2 - RESULTATS ET DISCUSSION

14

2.1. Dénombrement des microflores bactériennes totales

2.2. Dénombrement des microflores bactériennes dégradant les HPA

2.3. Conclusions

**CHAPITRE II :**  
**ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS POLLUES PAR DES**  
**HYDROCARBURES POLYAROMATIQUES**

<b><u>- MATERIELS ET METHODES</u></b>	19
1.1. Préparation des échantillons de sols	
1.2. Protocole de lixiviation	
1.3. Protocoles d'analyse des échantillons de sols bruts et des lixiviats	
<b><u>2 - RESULTATS ET DISCUSSION</u></b>	20
2.1. Mesure du pH des sols	
2.2. Analyse des éléments majeurs	
2.2.1. Eléments majeurs dans les sols	
2.2.2. Eléments majeurs dans les lixiviats	
2.3. Analyse des éléments traces	
2.3.1. Eléments traces dans les sols	
2.3.2. Eléments traces dans les lixiviats	
2.4. Analyse des 10 HPA	
2.4.1. Teneurs en HPA des sols	
2.4.2. Teneurs en HPA des lixiviats	
2.5. Conclusions et perspectives	

**CHAPITRE III :**  
**ETUDE DE LA BIODEGRADATION DES HPA EN FLACONS**

<b><u>1 - MATERIEL ET METHODES</u></b>	27
1.1. Protocole	
1.2. Echantillons	
1.3. Tests effectués	
1.3.1. Essai n°1	
1.3.2. Essai n°2	
<b><u>2 - RESULTATS ET DISCUSSION</u></b>	28
2.1. Mesure du CO <sub>2</sub> dégagé dans les incubations de l'essai n°1	
2.2. Mesure du CO <sub>2</sub> dégagé dans les incubations de l'essai n°2	
2.3. Libération de N <sub>2</sub> O dans l'atmosphère de culture	
2.4. Discussion	
2.5. Conclusions et perspectives	

# RESUME

Le traitement par voie biologique ou biodégradation accélérée est pratiqué depuis plusieurs décennies, Le principe de cette technique consiste à utiliser des micro-organismes capables de dégrader des composés organiques polluants pour l'environnement.

La bioréhabilitation nécessite des études préalables, en particulier une étude microbiologique, L'objectif de cette étude est d'étudier la faisabilité d'un traitement biologique des sols contaminés de trois friches industrielles.

Pour cela nous avons évalué la microflore totale des six échantillons de sol et la microflore capable de biodégrader des hydrocarbures polyaromatiques en utilisant comme hydrocarbures "modeles" un mélange d'anthracène, de fluoranthène et de benzo[a]pyrène.

Nous avons aussi cherché à caractériser les sols contaminés (teneurs en HPA, métaux lourds mais aussi en carbone, azote, phosphore, potassium, ...) pour mettre au point les paramètres de traitement.

la biodégradation globale a été effectuée en flacons. Ces essais portent dans un premier temps sur deux sols, les paramètres étudiés étant l'influence de l'agitation et l'influence de l'apport de différents nutriments ou d'un substrat inducteur de co-métabolisme.

La microflore totale des échantillons a été évaluée sur un milieu de culture complet (NB) et sur un milieu constitué uniquement de sels minéraux (milieu de Stucki), auquel les hydrocarbures sont ajoutés comme unique source de carbone.

Ce dernier milieu a fait l'objet d'une mise au point pour définir la concentration d'HPA et la forme solide ou solubilisée sous laquelle ceux-ci devaient être apportés. Après avoir testé la solubilisation des HPA par des surfactants, du méthanol et de l'éthanol, puis testé l'utilisation d'un gel de silice pour remplacer l'agar du milieu de culture représentant une source (faible) de carbone pour les micro-organismes, il a été décidé que le milieu sélectif serait constitué du milieu minéral de Stucki auquel on ajouterait les HPA sous forme solide.

Les sols pollués par des hydrocarbures polyaromatiques contiennent de l'ordre de  $10^5$  à  $10^6$  CFU aérobies par gramme de sol sec, soit environ 10 à 100 fois moins que les valeurs observées dans les sols.

Par ailleurs, la population bactérienne ayant les potentialités biochimiques pour dégrader l'un des trois hydrocarbures choisis pour cette étude (anthracène, fluoranthène et benzo[a]pyrène) est présente puisqu'elle est de l'ordre de  $10^4$  à  $10^5$  CFU/g de sol sec, ce qui représente entre 0,8 et 7,5 % de la population bactérienne totale. L'ancienneté de la pollution des six friches industrielles explique la présence d'une microflore adaptée.

On peut donc considérer dans un premier temps que l'activité de la population autochtone est suffisante pour mener une première étude de biodégradation en flacon. Toutefois, cette population restant numériquement assez faible, il est intéressant d'essayer d'augmenter la microflore dégradante en modifiant certaines caractéristiques environnementales (addition de nutriments, d'inducteur de co-métabolisme, agitation...).

Les analyses réalisées sur les échantillons de sols bruts et sur des lixiviats effectués pour évaluer la biodisponibilité des éléments montrent :

- des teneurs élevées en **HPA** peu biodégradables (en particulier fluoranthène, **benzo[a]anthracène** et **benzo[a]pyrène**) se situant au dessus du niveau C dans tous les sols,
- une présence importante de métaux lourds , notamment en cadmium dans tous les sols, ce qui augmente la toxicité générale du milieu,
- des teneurs en plomb, cadmium et molybdène importantes dans les eaux de lixiviation,
- et surtout des teneurs parfois très élevées des eaux de lixiviation en hydrocarbures particulièrement dangereux (**benzo[a]pyrène, benzo[a]anthracène...**) ce qui implique la prise de précautions lors d'un traitement biologique.

Ces analyses ont aussi permis d'estimer le rapport C:N:P des sols et des lixiviats, afin d'optimiser le milieu minéral à ajouter dans les essais de biodégradation (proche de 100:10:1), et de vérifier que le pH était à un niveau acceptable (pH de 7 à 8) pour la biodégradation.

Deux essais de biodégradation ont été effectués sur une période de deux mois.

La biodégradation est estimée par des mesures de CO<sub>2</sub> dégagé. D'autres paramètres sont également mesurés comme le pH des teneurs en carbone, azote, phosphore et potassium. Les teneurs des solutions d'incubation en HPA, catéchol, et métaux lourds solubilisés et les teneurs finales en HPA des échantillons traités sont également mesurées.

Des incubations ont été réalisées dans des flacons d'un litre contenant 100 g de sol sec et 500 ml de milieu liquide. Deux sols ont été choisis en raison de leur forte concentration en HPA (94S1) ou de la présence d'une population bactérienne élevée (94S5). Deux paramètres ont été étudiés : l'effet de l'agitation et celui de la composition du milieu (eau, solution minérale, solution minérale enrichie en un composé organique, intermédiaire de la biodégradation des HPA).

Ces essais constituent une première approche de l'étude de la biodégradation des HPA et devraient en particulier permettre d'optimiser les conditions générales de croissance de la microflore dégradante.

Ces deux premiers essais de biodégradation montrent qu'il se produit une minéralisation du carbone organique : 0,8 et 0,96 % du carbone des sols 94S1 et 94S5 sont minéralisés en 62 jours. Dans ces conditions, le temps nécessaire pour éliminer la totalité du carbone organique des sols peut-être estimé à 21 et 17 ans respectivement. Cependant, il faut noter que les HPA de ces sols ne représentent qu'une faible part (entre 0,5 et 3,12%) du carbone organique total et que les analyses finales des HPA résiduels après incubation permettront de préciser ces estimations.

Les résultats de ces essais de biodegradation montrent que l'aération est un facteur essentiel qui peut multiplier jusqu'à 4 la quantité de carbone minéralisé. L'apport de sels minéraux favorise aussi l'activité dégradante des micro-organismes, toutefois à un degré moindre (1,5 fois). Cependant, ce milieu pourrait certainement être amélioré.

En revanche, l'apport de catéchol ne semble pas avoir d'influence sur l'activité dégradante.

Les derniers résultats obtenus avec le sol 94S5 semblent indiquer une diminution de la vitesse de minéralisation et montrent l'apparition de N<sub>2</sub>O dans les flacons. Ils suggèrent une situation d'anaérobiose, l'accumulation éventuelle de composés toxiques dans le milieu, ou un appauvrissement du milieu en éléments nutritifs.

C'est pourquoi dans la suite de ce travail, le milieu d'incubation sera renouvelé.

Le traitement avec le catéchol ne montrant pas d'effet sur la biodégradation sera abandonné.

Un troisième essai de biodégradation sera effectué avec les six sols en conditions agitées et en présence de milieu minéral

De nombreux **procédés** ont été mis au point pour traiter les sols et les eaux contaminées par des déchets toxiques tant pour l'homme que pour l'environnement. Parmi ceux-ci, le traitement par voie biologique ou biodégradation accélérée est pratiqué depuis plusieurs décennies. Le principe de cette technique consiste à utiliser des microorganismes capables de dégrader des composés organiques polluants pour l'environnement.

La bioréhabilitation nécessite des études préalables, en particulier une étude microbiologique. Celle-ci consiste dans un premier temps à rechercher la présence de micro-organismes ayant les potentialités biochimiques pour biodégrader des **HPA**.

Plusieurs cas peuvent alors être **observés** :

- lorsque les micro-organismes indigènes **s'avèrent** être *en* nombre insuffisant ou incapables de biodégrader le polluant, l'addition d'une population de bactéries **spécialisées** peut être envisagée. Cette population doit cependant pouvoir s'acclimater tout *en* conservant ses capacités métaboliques.
- la population dégradante est présente sur le site mais reste numériquement très faible. Il est alors possible de procéder à un enrichissement du milieu pollué par isolement et multiplication de ces souches dégradantes.
- enfin, la population dégradante est présente mais son développement reste faible en raison des conditions environnementales limitantes. Il s'agit dans ce cas d'augmenter la population naturelle et son activité en déterminant et optimisant les caractéristiques du milieu pollué (addition de nutriments, aération . ..).

La réhabilitation nécessite également de posséder une bonne connaissance des caractéristiques des sols à traiter (physico-chimie des sols, nature, concentration, localisation et ancienneté de la ou des pollutions...) pour la mise au point des paramètres de traitement et l'optimisation de l'activité microbienne.

L'objectif de cette étude est d'étudier la faisabilité d'un traitement biologique des sols contaminés de trois friches industrielles.

Cette étude comprend trois parties :

L'objectif de la **première** partie est de déterminer laquelle des trois situations précitées est envisageable. Pour cela nous avons évalué la microflore totale des six échantillons de sols et la microflore capable de biodégrader des hydrocarbures polycycliques aromatiques en utilisant comme hydrocarbures "modèles" un mélange d'anthracène, de fluoranthène et de **benzo[a]pyrène**.

Les informations initiales sur les sols nous indiquent leur localisation (remblais, zone des sous-produits d'une cokerie, gazogène, aciérie), une pollution en HPA datant de plusieurs dizaines d'années et une possible pollution en métaux lourds (aciérie, épandage de cendres riches en métaux lourds).

La deuxième partie fournit d'une part des informations sur la nature et l'ampleur de la pollution (en HPA et en métaux lourds), d'autre part des renseignements importants pour la mise au point des paramètres de traitement (teneurs en carbone, azote, phosphore, potassium...).

Dans la **troisième** partie, la biodégradation des composés toxiques a été étudiée dans des conditions environnementales simplifiées et optimisées. Le suivi de cette biodégradation accélérée repose sur le rapport existant entre croissance microbienne et dégagement de dioxyde de carbone dans l'atmosphère de culture. En effet, la biodégradation en milieu aérobie peut aboutir à une minéralisation complète des produits carbonés en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O (ou à une dégradation partielle avec formation de produits intermédiaires).

Cette étude de la biodégradation globale a été effectuée en flacons. Ces essais portent dans un premier temps sur deux sols, les **paramètres** étudiés étant l'influence de l'agitation et l'influence de l'apport de différents nutriments ou d'un substrat inducteur de co-métabolisme.

Les analyses **réalisées** permettront d'obtenir deux types d'informations :

- des informations concernant les conditions de croissance optimale de la microflore,
- des informations concernant les paramètres de dégradation des HPA.

☞ L'apport du milieu minéral permet aussi d'augmenter la minéralisation.

Les différences obtenues entre milieu eau et milieu minéral sont moins importantes que celles obtenues avec le facteur agitation, mais il est possible que phosphore, potassium ... se trouvent encore en quantités suffisantes dans le milieu ne contenant que de l'eau. Les dosages d'extraits de milieu d'incubation (en cours) et la poursuite des dosages devraient nous permettre de conclure sur ce point. D'autre part, le milieu minéral utilise pourrait être optimisé.

Enfin, le catéchol avait été ajouté aux milieux d'incubation comme source de carbone facilement consommable, dans le but d'augmenter la population microbienne dégradant les HPA et éventuellement de diminuer le temps de latence en début de traitement. D'après les résultats obtenus, l'addition de catéchol reste sans effet, En fait, il semblerait que le catéchol polymérise rapidement à pH neutre et devienne, sous cette nouvelle forme, difficilement accessible.

Ces résultats ne préjugant pas de l'efficacité ou de l'inefficacité d'autres molécules organiques, il serait judicieux de tester l'influence de l'apport d'autres sources carbonées.

☞ Les derniers résultats obtenus avec le sol 94S5 (essais n°1 et n°2) semblent indiquer une diminution de la vitesse de minéralisation. Ceci pourrait par exemple être lié à la présence croissante de composés toxiques dans le milieu de culture, ou à une diminution trop importante du pH.

## 2.5. CONCLUSIONS

- une dégradation du carbone organique des deux sols testés 94S1 et 9485 a été observée.

Pour le sol 94S1 (essai n°1, sous agitation)

- 0,8 % du carbone est minéralisé en 62 jours (vitesse de minéralisation en augmentation).
- 21 ans de traitement seraient nécessaires pour éliminer la totalité du carbone organique dans ces conditions.

Pour le sol 9485 (essai n°1, sous agitation)

- 0,96 % du carbone est minéralisé en 62 jours
- 17 ans de traitement seraient nécessaires pour éliminer la totalité du carbone organique dans ces conditions.

- l'aération constitue un facteur essentiel qui multiplie par 2,5 à 4,3 pour l'essai n°1 et par 1,3 à 1,8 pour l'essai n°2 la quantité de carbone minéralisé.
- l'apport de sels minéraux semble favoriser l'activité dégradante des micro-organismes en multipliant par 1,2 à 1,5 la quantité de carbone minéralisé.
- l'apport de catéchol ne semble pas avoir d'influence sur l'activité dégradante.

## 2.6. PERSPECTIVES

### ☞ Poursuite des essais n°1 et n°2 :

- dosage des **HPA** et **métaux** lourds solubilisés dans les flacons d'incubation,
- dosage de composés en solutions, tels le carbone, le phosphore, le potassium... (suivi des conditions de croissance de la **microflore**),
- dosage du **CO<sub>2</sub>** de la phase gazeuse des incubations,
- dosage des nitrates et de l'ammoniaque dans les solutions d'incubation pour le sol **94S5** (compréhension du **phénomène** de dégagement de **N<sub>2</sub>O** au cours des incubations).

### ☞ Modification des essais n°1 et n°2 :

- le traitement avec le **catéchol** ne montrant pas d'effet sur la biodégradation sera abandonné,
- le milieu d'incubation de certains flacons sera renouvelé.
- pour essayer de rétablir la vitesse de biodegradation, le milieu **nutritif** ou l'eau seront renouvelés (élimination de composés toxiques ou renouvellement de l'apport nutritif ...).

### ☞ Mise en place d'un essai n°3 :

Cet essai comportera les six sols dont la biodégradation des HPA sera effectuée en conditions agitées en présence de milieu minéral. Pour le sol **94S5**, cet essai comportera en plus un traitement abiotique (par addition d'un composé **antibactérien**), et un traitement dans lequel le milieu d'incubation sera renouvelé **régulièrement**.