

La bioremédiation – application à la décontamination des sols et des eaux polluées par des éléments métalliques toxiques ou radioactifs¹

Patrick MICHAILLE

1. INTRODUCTION

La bioremédiation est une branche des biotechnologies qui utilise des mécanismes biologiques naturels ou détournés pour traiter des problèmes environnementaux. Dans les cas de pollution qui nous concernent, par les métaux toxiques et les radionucléides, les agents biologiques utilisés sont des organismes microscopiques (bactéries, microalgues) ou développés (champignons, algues et plantes supérieures).

Dans le cas des plantes, on parle de phytoremédiation, pour décontaminer des sols, des eaux (ou de l'air) pollués. Les stratégies de bioremédiation, vis-à-vis des métaux toxiques et des radionucléides, visent à :

- modifier la biodisponibilité des espèces polluantes grâce à un changement de leur état redox, puis
- les extraire des sols, en utilisant les mécanismes nutritifs des plantes,
- les extraire des solutions polluées, en utilisant les propriétés de "piège à cations" des parois végétales.

Contrairement aux méthodes physico-chimiques qui conduisent à la déstructuration des sols et à une forte diminution de leur fertilité et de leur productivité, la bioremédiation vise à respecter l'environnement, et à baisser les coûts. Par contre, les durées de traitement s'étalent sur plusieurs années – voire des décennies, en fonction du degré de pollution, et la bioremédiation ne peut donc être appliquée dans l'urgence.

Cet article présente différents exemples de bioremédiation *in situ* des métaux toxiques et des radionucléides.

2. MÉTHODES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES : La problématique de décontamination après la catastrophe de Fukushima

Le césium est le principal radiocontaminant, mais il pénètre peu dans le sol (cf. § 4), donc les premières mesures agricoles vont être d'araser une couche de terre de 5 à 10 cm à la pelle mécanique, puis de labourer profondément pour enfouir la contamination restante, et enfin procéder à un amendement potassique important pour créer une compétition entre le césium et le potassium.

Si on considère que la surface impactée est de l'ordre de 1.800 km² et qu'on veut éliminer 5 cm de sol pour limiter le débit de dose à 6 mSv/an (un niveau au-dessus des normes européennes actuelles), cela conduit à évacuer quelque 100 millions de m³ de terre contaminée en radiocésiums 137 et 134, que l'on devra ensuite stocker : on voit les limites d'une telle approche quand il s'agit de grandes étendues.

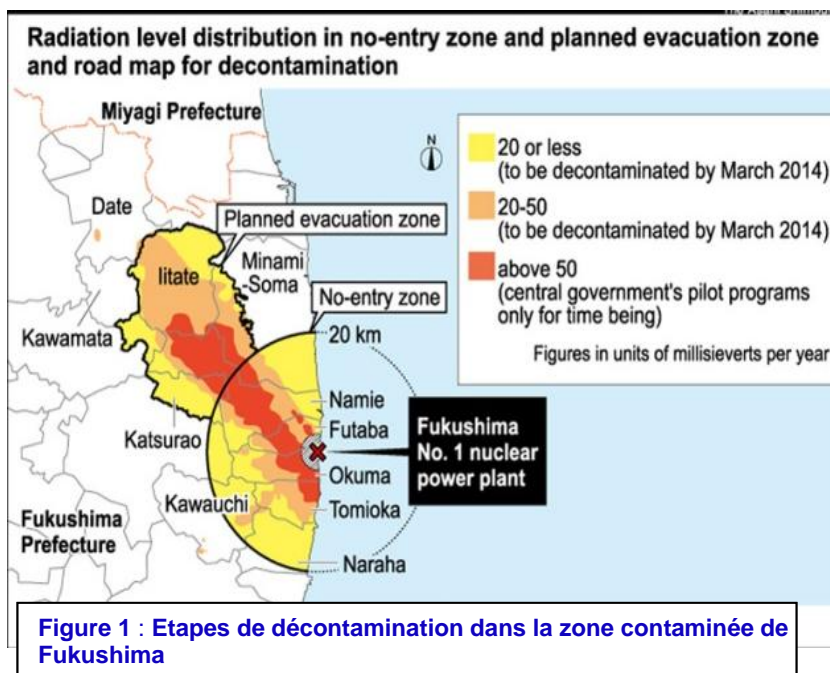


Figure 1 : Etapes de décontamination dans la zone contaminée de Fukushima

¹ Article tiré de la présentation de Alain VAVASSEUR, Université d'été de Sauvons le Climat, Aix en Provence, sept. 2013, <http://www.sauvonsleclimat.org/>

D'où la nécessité de rechercher des techniques biologiques compatibles avec le milieu naturel.

3. LA BIOREMÉDIATION PAR LES BACTÉRIES

Il existe de nombreuses bactéries réagissant avec les métaux : citons *Geobacter metallireducens*, *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis*, *Desulfotomaculum reducens* ou *Thermoterrabacterium ferrireducens*.

Vis-à-vis des métaux lourds toxiques, les phénomènes de biotransformation mis en jeu peuvent être : la chimisorption renforcée par les microbes, la biosorption, la bioaccumulation, la biominéralisation.

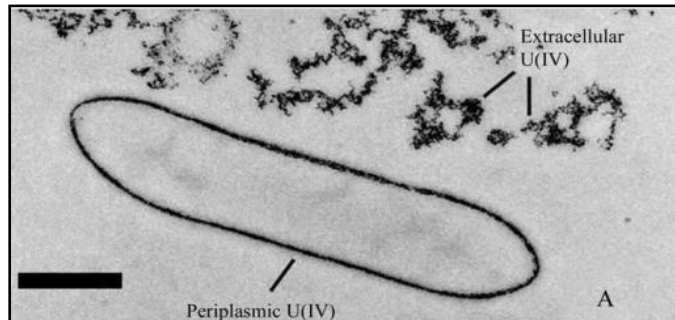
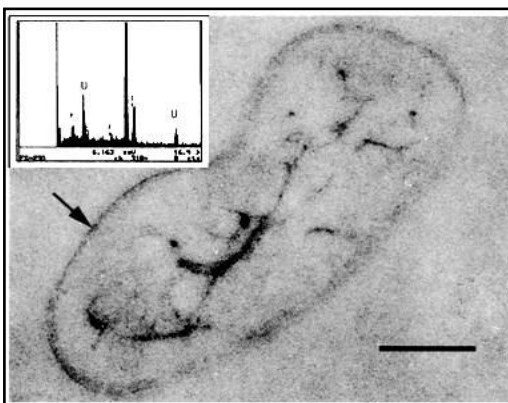


Figure 2 : MICROGRAPHIE DE *Geobacter metallireducens* révélant l'accumulation de U (IV) à la paroi [1] d'Ashtabula



On peut précipiter par des bactéries l'uranium, le plutonium, le technétium, le palladium, et d'autres éléments. La spectrométrie aux rayons X révèle, dans le cytoplasme de la bactérie *Pseudomonas CRB5*, des granules d'uranium associées à des polyphosphates, dont l'uranium est très affiné.

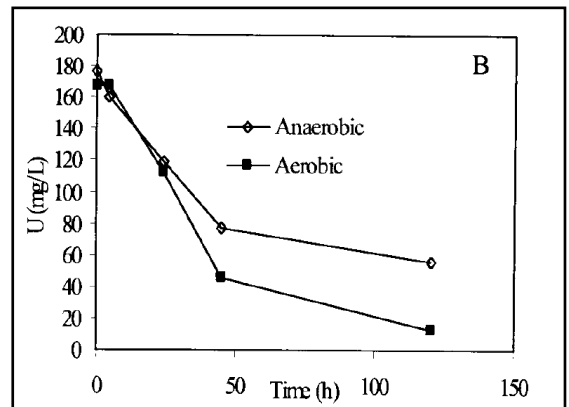
Pour une eau contaminée avec de l'uranium à 180 mg/L, la décontamination est quasi terminée au bout d'une centaine d'heures, notamment en conditions aérobies, avec des systèmes simples ne requérant pas d'énergie.

**Figure 3 : *Pseudomonas CRB5* [2]
(A) granules d'uranium associés à des polyphosphates
(B) cinétiques de décontamination de l'uranium**

Comment utiliser industriellement ces propriétés ?

On sait de mieux en mieux confiner les bactéries ou les microalgues dans des supports divers : mousses, verres frittés, porcelaines, de façon à les intégrer dans un procédé industriel. C'est ainsi par exemple qu'en Afrique du Sud, on extrait de l'or par filtration à partir d'arsénopyrite.

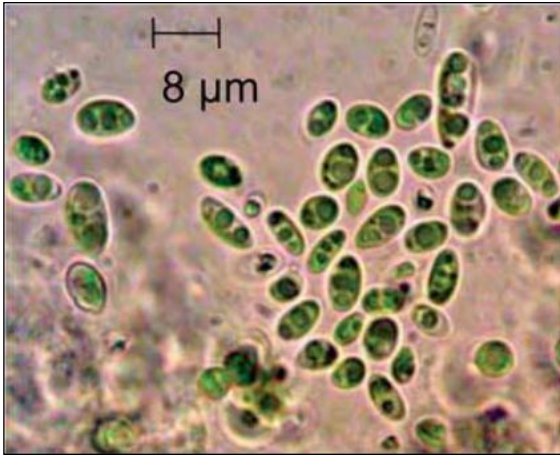
On peut aussi utiliser les bactéries directement sur les sites miniers, soit pour récupérer l'uranium à très faible teneur par biolixiviation en utilisant des bactéries oxydantes qui le rendent soluble à la valence VI, soit pour fixer l'uranium avec des bactéries réductrices.



A Ashtabula (Ohio), pour traiter la nappe phréatique contaminée, des injections d'ester de polylactate ont été faites *in situ* pour augmenter l'activité d'une bactérie *Geobacter*, capable de réduire l'uranium (VI) en uranium (IV) et ensuite de l'immobiliser.

Figure 4 : Site d'Ashtabula (Ohio, USA) contaminé en uranium, technétium, trichloréthylène

4. UNE ALGUE VERTE, CHAMPIONNE DE LA RADIORÉSISTANCE



Les micro-organismes peuvent-ils résister aux radiations ? Pour s'en convaincre, il suffit de se référer à la découverte faite par les chercheurs du CEA Grenoble et de l'Institut Laue Langevin dans une piscine d'entreposage de combustible irradié, d'un eucaryote survivant à des doses extrêmes de rayonnement :

50% de mortalité à 10 kGy, soit 2000 fois supérieures à la dose létale pour l'homme. Cette algue verte unicellulaire a été identifiée comme étant du genre *Coccomyxa* et fut baptisée *actinabiotis* du fait de son biotope [3].

Figure 5 : Micrographie de *Coccomyxa actinabiotis*

Cette algue capte les métaux (par exemple : ^{110m}Ag avec un facteur de concentration Fc de 500 000), les lanthanides et les actinides (Uranium : Fc = 1000), ainsi que le carbone-14.

C'est un organisme photosynthétique, auquel il n'est pas nécessaire de fournir de substrat carboné, et qui se développe simplement à partir de l'éclairage de la piscine. Son efficacité est comparable à celle des résines échangeuses d'ions : en trois semaines, 40 g d'algues peuvent extraire 740 MBq d'une piscine de 360 m³.

5. LA PHYTOEXTRACTION

La phytoextraction des radionucléides et des métaux consiste à favoriser l'accumulation de l'élément toxique dans la plante. Le rendement de dépollution est le produit de la quantité de biomasse produite, multipliée par le coefficient de transfert (rapport entre la concentration du polluant dans le végétal et de celle dans le sol).

Il faut donc trouver une plante qui pousse bien dans le sol à traiter, et ajouter au sol les agents qui rendent biodisponibles pour la plante les éléments dont on veut dépolluer le sol.

5.1. DÉPOLLUTION DE MÉTAUX LOURDS

Le projet européen PhyLeS (*pilot phytoremediation for environmental cleanup of lead polluted soils*), visait à traiter en Italie des terrains d'une ancienne fonderie fortement pollués au plomb (300 à 1200 mg/kg). On a essayé diverses plantes (tournesol – *sunflower* et moutarde indienne - *Brassica Juncea*) et traitements de chélation à l'EDTA² (HEDTA et K₂EDTA) au moment de la floraison.

Par rapport au tournesol, le choix de *Brassica Juncea* cv. 426308 fait gagner un facteur 6, et l'ajout de K₂EDTA à 5 mmol/kg de terre sèche, encore un facteur 15, soit au total un gain de 90 par rapport au traitement de référence.

Il faut néanmoins compter une vingtaine d'années pour obtenir une phytoremédiation complète.

	Phytoextraction coefficient (PhC)
+ K ₂ EDTA, <i>B. juncea</i> cv. 426308	2.7
+ HEDTA, <i>B. juncea</i> cv. Chao Chow	1.78
+ K ₂ EDTA, <i>B. juncea</i> cv. Chao Chow	0.82
+ K ₂ EDTA, sunflower	0.34
+ HEDTA, sunflower	0.34
Control, <i>B. juncea</i> cv. 426308	0.18
Control, <i>B. juncea</i> cv. Chao Chow	0.06
Control, sunflower	0.03

↑
x90
↓

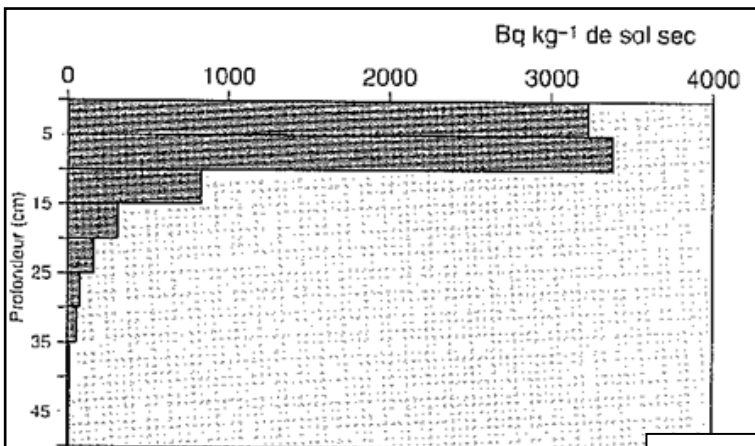
Figure 6 : Projet PhyLeS - Résultats de différents essais de phytoremédiation [4]

² EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, possède un fort pouvoir chélatant (ou complexant) des cations métalliques

Des essais pour dépolluer des sols contaminés en uranium ont été menés avec de la moutarde indienne (*Brassica juncea*) et de l'ivraie « ryegrass » (*Lolium perenne*). Utilisés seuls, ils ne dépolluent pas, mais en irrigant la moutarde indienne avec de l'acide citrique ou l'ivraie avec un mélange acide citrique + bicarbonate, on atteint des facteurs de transfert de 8 et 5 respectivement. Il faut donc ajouter des plantes comme le lupin qui exsude par lui-même le citrate dans le sol.

Pour dépolluer du plutonium, on observe que le nitrate est plus efficace que le citrate, et que l'ajout de DPTA (acide diéthylène triamine penta acétique, un décorporant humain) augmente encore les résultats d'un facteur 30 à 100.

5.2. DÉPOLLUTION DU CÉSIIUM



Le césium est le polluant radiologique majoritairement répandu après un accident très grave de réacteur nucléaire, comme l'ont montré les catastrophes de Tchernobyl et de Fukushima.

Les mesures faites sur les territoires contaminés à la suite de l'accident de Tchernobyl ont montré que le césium ne migrait que lentement dans les sols, et que les végétaux le recyclaient, en l'incorporant par les racines et en le restituant au sol lors de la chute des feuilles.

Figure 7 : Répartition en profondeur du ¹³⁷Cs 30 ans après son apport dans les 10 premiers cm

En effet, dans l'humus de surface, le césium reste échangeable, tandis que dans l'argile sous-jacente qui constitue un piège à cations, il est très fortement fixé, comme analogue du potassium.

Le quinoa et la betterave à sucre présentent les meilleurs coefficients de transfert pour le césium, devant l'*Atriplex* sp. et l'ivraie (*Lolium perenne*).

Dans le cas de Brookhaven (réacteur des Etats-Unis qui a présenté une fuite notamment de strontium et de césium), ont été testées l'amaranthe (*Amaranthus retroflexus*), la moutarde (*Brassica juncea*), le haricot (*Phaseolus acutifolius*). L'amaranthe permet d'obtenir les meilleurs coefficients de transfert pour le césium, avec une diminution de moitié en 15 ans, et elle offre une demi-décroissance du strontium en 6 ans [5].

Nota : la période radioactive du Sr-90 est 29 ans, celle du Cs-137 est 30 ans.

La biomasse ainsi chargée de contamination est ensuite traitée comme un déchet radioactif incinérable.

5.3. MÉTHODOLOGIE DE LA RECHERCHE À L'iBeB

Au laboratoire, le travail en physiologie cellulaire et en biologie moléculaire vise à comprendre les mécanismes qui interviennent dans le transfert vers la plante de métaux lourds ou de radionucléides comme le cadmium ou le césium, le cobalt et l'uranium. Dans le cas du césium, on étudie les transporteurs – de potassium essentiellement – qui permettent la nutrition de la plante et participent à l'entrée de césium, qui est un analogue du potassium. Cette démarche permet d'obtenir des critères quantitatifs qui seront utilisés par la suite pour sélectionner et éventuellement transformer des plantes optimisées pour la phytoremédiation.

La démarche commence par des études de génétique inverse : on sélectionne des plantes qui sont invalidées pour des gènes codant pour des transporteurs potassiques, et on observe si elles assimilent moins le césium.

On en déduit que ces transporteurs interviennent dans le processus, et on peut alors sélectionner les plantes qui expriment plus ce transporteur, ou transformer des plantes pour qu'elles l'expriment plus. Le modèle pour améliorer le facteur de décontamination est *Arabidopsis thaliana*, modèle de biologie moléculaire dont le génome est petit et la séquence d'ADN connue depuis l'an 2000, en effectuant un criblage de gènes impliqués dans l'absorption et la translocation du césium.

La démarche suivie est donc : à partir d'études génétiques, identifier les marqueurs importants pour le transport de césium, et ensuite rechercher dans la biodiversité si certaines plantes expriment beaucoup ces transporteurs.

À noter qu'à partir de la connaissance acquise s'offrent alors deux possibilités : outre la phytoremédiation, qui cherche à augmenter l'absorption de la contamination par les plantes, on acquiert aussi des connaissances sur une agriculture saine, qui consiste à cultiver des plantes sur lesquelles on supprime les transporteurs impliqués dans la prise de césium, permettant par exemple de faire pousser, sur des sols contaminés en césium, du riz dont le grain est peu contaminé.

6. TRAITEMENT DES EAUX : LA RHYZOFILTRATION

Une façon d'utiliser les plantes pour dépolluer les eaux est la rhyzofiltration. Les racines des plantes constituent en effet de véritables pièges à cations.

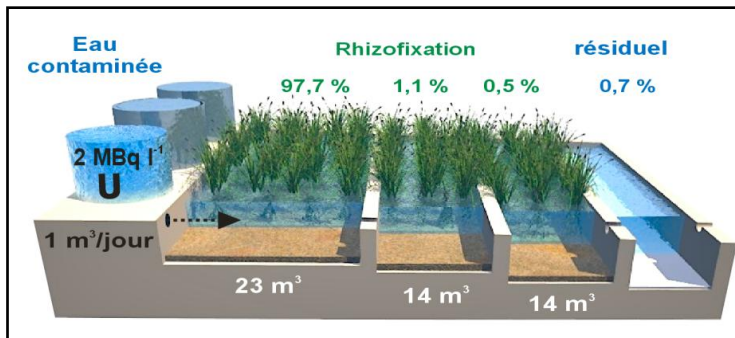


Figure 8 : Schéma d'un traitement *ex situ* d'eau contaminée à l'uranium, par rhyzofiltration [6]

Dans une expérience déjà ancienne, l'eau contaminée avec de l'uranium à 2 MBq/l est filtrée à travers des bassins successifs ; le premier bassin retient déjà 97,7 % de l'uranium entrant, et il sort du 3ème bassin de l'eau épurée à 99,3 %.

Une technique de rhyzofiltration mettant en œuvre des radeaux flottants est utilisée dans la zone de Tchernobyl, permettant d'atteindre une concentration dans les racines d'un facteur 5 000 à 30 000 à pH 5,5.

Figure 9 : Rhyzofiltration *in situ* dans la zone de Tchernobyl



7. AUTRES TECHNIQUES : PHYTOSTABILISATION, PHYTOVOLATILISATION

De façon à empêcher le ruissellement de la pollution vers les cours d'eau et les ressources en aval, on peut vouloir fixer la pollution : c'est le rôle de la **phytostabilisation**. Elle a été mise en œuvre dans le programme DifPolMine de l'ADEME pour traiter en France le site de la Combe du Saut, ancienne mine d'or fortement polluée à l'arsenic (11 millions de tonnes de stériles pollués), avec un flux d'arsenic de 1.300 kg/an qui s'écoulait vers la nappe phréatique, et un flux de 300 kg/an qui percolait vers la rivière. Le site a été traité à la grenaille de fer qui retient l'arsenic, puis en plantant des espèces résistantes à l'arsenic.

La **phytovolatilisation** vise au contraire à diluer dans l'atmosphère des éléments non dangereux à basse concentration, comme le sélénium qui – toxique à haute dose – est ajouté comme oligoélément dans l'alimentation du bétail. Pour les éléments comme le sélénium ou le mercure qui deviennent volatils une fois méthylés, il est possible de transformer une plante pour lui faire exprimer une méthylase, qui permettra la dispersion de la pollution par volatilisation.

Sur le site du laboratoire d'Argonne près de Chicago (ANL-East) ont été stockés de nombreux déchets nucléaires dont ceux provenant de la pile historique CP-1, construite par Enrico Fermi sous le stade de l'université de Chicago. Ce stockage a occasionné la pollution de la nappe phréatique par de l'eau tritiée.

Des tubages ont été réalisés et des racines de peupliers plantées en 1999. Deux ans après, les peupliers poussent en volatilisant progressivement l'eau tritiée, tout en restant à des niveaux de concentration atmosphérique très en-dessous des normes en vigueur.

8. PERSPECTIVES

L'iBeB s'est positionné sur un programme national en soutien à Fukushima en collaboration avec d'autres laboratoires du CEA, l'IRSN, l'INRA, le CIRAD, Véolia, et Aréva. Ce programme DEMETERRES, financé par la France dans le cadre du Programme d'Investissement d'Avenir, a démarré en novembre 2013 pour une durée de 5 ans. Il s'agit d'optimiser une **méthode mixte de remédiation**, réalisée après une cartographie très fine : traiter de façon physico-chimique les points chauds, puis utiliser des techniques de phytoremédiation et de microbiologie, couplées à une valorisation de la biomasse, pour traiter les superficies plus importantes et moins contaminées.

En France, en l'état actuel de la législation et de l'état d'esprit de la société concernant la transgénèse, il n'est pas envisageable d'utiliser des **plantes génétiquement modifiées** pour dépolluer des sols. Pour produire des plants sains, il reste possible de faire des sélections génétiques, par des techniques non OGM, afin que certains gènes ne s'expriment plus, par exemple ceux participant au transfert de césium dans la plante. Pour la phytoremédiation, l'acceptation de plantes génétiquement modifiées passera par la démonstration que les plants peuvent être conçus stériles et qu'ils n'entrent pas dans la chaîne alimentaire.

Enfin, le **recyclage de la biomasse**, en matériaux ou combustible, contribue à diminuer le coût de la réhabilitation des sols et à recréer de l'emploi dans les zones où l'agriculture est impactée par la pollution. Dans le cas d'une combustion, il faut bien sûr prendre soin de traiter les fumées, qui concentrent alors la contamination.

9. RÉFÉRENCES

- [1] Cologgi D.L., Lampa-Pastirk S. et al. Extracellular reduction of uranium via *Geobacter* conductive pili as a protective cellular mechanism – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108 (37): 15248-52.
- [2] McLean J, Beveridge T.J. Chromate Reduction by a Pseudomonad Isolated from a Site Contaminated with Chromated Copper Arsenate. *Appl. Environ. Microbiol*, 2001, March, 67(3): 1076-84.
- [3] Rivasseau C & al., An extremely radioresistant green eukaryote for radionuclide bio-decontamination in the nuclear industry, *Energy Environ. Sci.*, 2013, 6, 1230-39 ; WIPO Patent Application WO/2011/098979
- [4] PhyLeS Project ; http://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=home.ShowFile&rep=file&fil=LIFE99_ENV_IT_000078_LAYMAN.pdf
- [5] Fuhrmann M., Lasat M.M., Ebbs S.D., Kochian L.V., Cornish J. Uptake of cesium-137 and strontium-90 from contaminated soil by three plant species; application to phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 2002, 31:904-9.
- [6] Timofeeva-Ressovskaia E.A., Isotope distribution in major components of fresh water systems *Proc. Inst. Biol.* 1963,30, 3–72