

Potentialités des techniques de bioaugmentation dans le traitement des déchets, sédiments et sols pollués

Etat de l'Art



**ÉTAT DE L'ART SUR LES POTENTIALITES
DES TECHNIQUES DE BIOAUGMENTATION
DANS LE TRAITEMENT DES DECHETS,
SEDIMENTS ET SOLS POLLUES**

RAPPORT FINAL

mars 2009

**A.-M. CHARISSOU - IPL SEDE
Ph. LEJEUNE - INSA de LYON**

Créée en 1989 à l'initiative du Ministère en charge de l'Environnement, l'association RECORD – REseau COopératif de Recherche sur les Déchets et l'Environnement – est le fruit d'une triple coopération entre industriels, pouvoirs publics et chercheurs. L'objectif principal de RECORD est le financement et la réalisation d'études et de recherches dans le domaine des déchets et des pollutions industrielles.

Les membres de ce réseau (groupes industriels et organismes publics) définissent collégalement des programmes d'études et de recherche adaptés à leurs besoins. Ces programmes sont ensuite confiés à des laboratoires publics ou privés.

Avertissement :

Les rapports ont été établis au vu des données scientifiques et techniques et d'un cadre réglementaire et normatif en vigueur à la date de l'édition des documents.

Ces documents comprennent des propositions ou des recommandations qui n'engagent que leurs auteurs. Sauf mention contraire, ils n'ont pas vocation à représenter l'avis des membres de RECORD.

- ✓ Pour toute reprise d'informations contenues dans ce document, l'utilisateur aura l'obligation de citer le rapport sous la référence :
RECORD, Etat de l'art sur les potentialités des techniques de bioaugmentation dans le traitement des déchets, sédiments et sols pollués, 2009, 100 p, n°07-0417/1A.

- ✓ Ces travaux ont reçu le soutien de l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie)
www.ademe.fr

© RECORD, 2009

RESUME

Plus de 2 millions de sites potentiellement pollués existent à travers l'Europe dont 100 000 nécessitant une remédiation. La technique de bioaugmentation est une voie possible de dépollution de ces matrices contaminées soit directement soit en fin de traitement.

L'objectif de cette étude bibliographique est d'examiner les « potentialités » réelles des techniques de biotraitement impliquant l'apport de flores exogènes (naturelles, composées de souches caractérisées et/ou génétiquement modifiées) dans des matrices contaminées telles que les déchets (solides et liquides), sols et sédiments. L'étude inclut un examen critique des conditions d'utilisation et des risques potentiels pour la santé humaine par contamination par ces matrices, d'autres compartiments de l'écosystème (atmosphère, nappes phréatiques, cours d'eau) et des êtres vivants sauvages et domestiques.

La première étape décrit la situation réglementaire concernant l'apport de micro-organismes (soit allochtones soit génétiquement modifiés) dans le traitement des matrices polluées au niveau national et international.

Une analyse bibliographique des stratégies développées par les micro-organismes pour dégrader les polluants est ensuite proposée pour les deux principaux types de composés rencontrés dans les matrices contaminées (organiques et métalliques). Les exemples d'applications *in situ* et *ex situ* issus de la littérature sont également précisés.

Une évaluation critique des consortiums commercialisés est développée dans une troisième partie afin d'aboutir à un avis d'experts sur l'efficacité de tels kits.

Enfin, l'application du génie génétique à la recherche de souches modifiées ayant des capacités de dégradation intéressantes *in situ* et le point sur les techniques moléculaires utilisées sont présentés.

MOTS CLES

Bioaugmentation, biotraitement, flores exogènes, génie génétique, bioremédiation, consortiums microbiens, kits commerciaux

SUMMARY

More than 2 millions of potentially contaminated sites exist across Europe whose 100 000 requiring remediation. The technique of bioaugmentation is a possible remediation of these contaminated matrices either directly or at the end of treatment.

The objective of this literature study is to examine the real " potentialities " of bioremediation techniques involving the addition of exogenous flora (natural, composed by characterized strains and / or genetically modified) in matrices such as contaminated wastes (solid and liquid), soils and sediments. The study includes a review of the conditions of use and potential risks to human health through contamination by these matrices, other compartments of the ecosystem (air, groundwater, rivers) and wild and domestic animals.

The first step describes the regulatory situation on the use of microorganisms (either allochthonous or genetically modified) in treating polluted matrices nationally and internationally.

A literature review of the strategies developed by microorganisms to degrade pollutants is then proposed for the two main types of molecules encountered in contaminated matrices (organic and metal). Examples of applications *in situ* and *ex situ* from the literature are also specified.

A critical assessment of the consortia market is developed in a third party in order to reach an expert opinion on the effectiveness of such kits.

Finally, the application of genetic engineering in the search for modified strains with capacities of degradation *in situ* and interesting point on molecular techniques used are presented.

KEY WORDS

Bioaugmentation, biotreatment, exogenous flora, genetic engineering, bioremediation, microbial consortia, commercial kits

SOMMAIRE

SOMMAIRE	4
1/ Introduction.....	5
2/ Contexte réglementaire sur l'apport de micro-organismes dans le traitement des matrices polluées 8	
2.1/ Définitions.....	9
2.2/ Apport de micro-organismes génétiquement modifiés	9
2.2.1/ au niveau national.....	9
2.2.2/ au niveau international.....	9
2.3/ Apport de micro-organismes allochtones.....	11
2.3.1/ Au niveau national	11
2.3.2/ au niveau international.....	11
3/ Etat de l'art sur les techniques de bioaugmentation	14
3.1/ Notions de bioremédiation	15
3.2/ Origine des micro-organismes impliqués dans les procédés de bioaugmentation.....	17
3.3/ Facteurs affectant l'efficacité de la bioaugmentation.....	19
3.4/ Bioremédiation des matrices liquides	19
3.4.1/ Principe	20
3.4.2/ Exemples de bioaugmentation appliqués à des matrices liquides.....	21
3.5/ Bioaugmentation et traitement des matrices liquides : points à retenir	31
3.6/ Bioremédiation des matrices solides	33
3.7/ Bioaugmentation et matrices solides : points à retenir	36
4/ Les consortiums commercialisés	38
4.1/ Généralités.....	39
4.2/ Le traitement des solvants chlorés	39
4.3/ Le traitement des dérivés pétroliers.....	40
4.4/ Le point sur les fournisseurs de consortiums au niveau français et européen.....	42
4.4.1/ Interrogation au moyen de mots clé sur Internet.....	42
4.4.2/ La base de données de brevets nationaux de l'INPI	43
5/ Bioaugmentation et génie génétique.....	51
5.1/ Définition de "Organisme Génétiquement Modifié" (OGM).	52
5.2/ Cas réels de bioaugmentation par des souches d'OGM.	52
5.3/ Stratégies de confinement des micro-organismes génétiquement modifiés.	53
5.4/ Utilisation de cellules microbiennes tuées.	54
5.5/ Le génie génétique in vivo.	55
6/ Pistes pour la mise au point de nouvelles méthodes d'ensemencement des matrices polluées	56
6.1/ Bioaugmentation par des plantes à rhizosphère contrôlée.....	57
6.2/ Utilisation de consortiums microbiens artificiels organisés dans l'espace.....	57
6.3/ Quelques pistes pour la construction de consortiums microbiens artificiels.....	58
7/ Outils moléculaires et diagnostic et de suivi.....	59
7.1/ Méthodes quantitatives de recherche d'ARN et d'ADN cibles.	60
7.2/ Méthodes d'évaluation des populations basées sur le polymorphisme des ARN ribosomiques.	62
7.3/ Méthodes d'évaluation des populations basées sur le polymorphisme des phospho-lipides. ..	63
7.4/ Conclusions.....	64
8/ Conclusion générale.....	65
9/ Références bibliographiques.....	68
10/ Annexes.....	95

1/ Introduction

Ce rapport présente le bilan des travaux effectués dans le cadre de la convention de recherche n°07-0417/1A établie entre l'Association RECORD, IPL santé, environnement durables Est et INSAVALOR SA, notifiée le 14 novembre 2007 et, ayant pour objet la réalisation d'un état de l'art sur les potentialités des techniques de bioaugmentation dans le traitement des déchets, sédiments et sols pollués.

Le traitement biologique des matrices contaminées repose sur la dégradation des molécules polluantes par des bactéries ou des champignons. De nombreux micro-organismes ont été de ce fait isolés et/ou génétiquement modifiés en laboratoire afin d'accroître leurs capacités de dégradation.

Plus de 2 millions de sites potentiellement pollués existent à travers l'Europe dont 100 000 nécessitant une remédiation (données Agence Européenne Environnementale). La majorité des polluants identifiés sur ces sites sont des hydrocarbures et des métaux lourds. Actuellement, les techniques de traitement des sols pollués sont classées en quatre grandes catégories :

- les procédés physico-chimiques,
- les procédés thermiques,
- les procédés biologiques (ou bioremédiation),
- le confinement.

Les techniques de traitement se distinguent également par leur mise en œuvre : techniques *ex situ* (hors site) ou techniques *in situ* (sur site). La bioremédiation est aujourd'hui reconnue comme une action complémentaire des voies chimiques et physiques pour la dégradation ultime des polluants dans l'environnement. Il existe deux principales approches dans la biorestauration : la biostimulation et la bioaugmentation qui inclut l'ingénierie génétique des micro-organismes.

La plus étudiée des approches est la biostimulation qui permet d'augmenter la biodégradation en stimulant l'activité de populations microbiennes indigènes par apport de nutriments et par ajustement des conditions de milieu (potentiel d'oxydoréduction, humidité...). Le principal avantage vient de ce que la biorestauration est réalisée par des micro-organismes indigènes, qui sont déjà présents et bien répartis spatialement dans la subsurface et qui sont donc bien adaptés à ce milieu. Son principal inconvénient vient de ce que l'ajout d'additifs est tributaire de la géologie locale du milieu en subsurface.

La bioaugmentation consiste en l'inoculation de micro-organismes spécifiques (soit directement soit après traitement physique ou chimique). Cette technique offre plusieurs avantages comme par exemple l'assainissement des contaminants *in situ* réalisé avec un minimum d'impact sur l'écosystème en surface, un minimum de production de déchets après traitement, et un coût moindre par rapport à d'autres options *ex situ* telles que le pompage et le traitement primaire. Néanmoins, des limites existent comme celles liées à certaines conditions géochimiques qui peuvent être inhibitrices de la biodégradation, ou la présence de certains co-contaminants qui peuvent empêcher l'action des micro-organismes.

Le recours aux techniques de modification du code génétique des micro-organismes reste encore très controversé. Ces techniques sont basées sur des modifications génétiques dans une tentative d'insérer de nouvelles fonctions métaboliques pour dégrader les contaminants présents dans l'environnement. Des expérimentations sont actuellement en cours dans de nombreux laboratoires afin d'isoler les souches qui pourraient être utilisées *in situ*.

Dans le cas de la bioaugmentation, les risques environnementaux et humains restent encore méconnus (et peu documentés) et méritent donc une attention particulière.

Les objectifs spécifiques de l'étude sont donc :

- o de réaliser une recherche aussi exhaustive que possible des informations disponibles concernant les consortiums microbiens exogènes existants (molécules ciblées par ces micro-organismes – nature et concentration, type de pollution, typologie, voies métaboliques, obtention des organismes, associations possibles avec d'autres techniques ou traitements, mode d'introduction et composition des flores exogènes) et sur les limites d'utilisation particulièrement pour les risques sanitaires possibles dans le cadre d'une dissémination ;

- de comparer les méthodes d'obtention et d'application des souches exogènes (naturelles ou génétiquement modifiées) et de les hiérarchiser en fonction de leurs efficacités et limites (transfert laboratoire → terrain) ;
- de réaliser à partir des données obtenues une synthèse des connaissances permettant de statuer quant aux potentialités et à la réelle efficacité d'utilisation des consortiums exogènes et de leurs associations (possible ou nécessaire) avec d'autres traitements de bioremédiation ;
- d'étudier les possibilités de traitements en amont de l'application au terrain ;
- de traiter du devenir des micro-organismes introduits dans l'environnement et de répertorier les moyens de confinement et de destruction des micro-organismes afin de prévenir leur dispersion dans le milieu ;
- d'aboutir à un examen critique de l'existant (au moyen de retours d'expérience et d'analyses des kits commerciaux disponibles).

2/ Contexte réglementaire sur l'apport de micro-organismes dans le traitement des matrices polluées

2.1/ Définitions

Est Organisme Génétiquement Modifié (OGM), au sens réglementaire, tout organisme obtenu par des techniques de recombinaison de l'acide nucléique impliquant la formation de nouvelles combinaisons de matériel génétique, par des techniques impliquant l'incorporation directe dans un organisme de matériaux héréditaires préparés à l'extérieur de l'organisme et enfin par des techniques de fusion cellulaire ou d'hybridation (article L. 531-1 du code de l'environnement).

La définition de l'OGM mentionnée par la loi 92-654 du 13 juillet 1992 sera précisée par un décret 93-744 du 27 mars 1993 arrêtant la liste des techniques mises en oeuvre pour son obtention, conformément à la liste figurant dans la directive 98/81/CE (annexe I partie A) et dans la directive 2001/18/CE (annexe I A, première partie).

Il est à souligner que l'exclusion des êtres humains de la définition, telle que prévue par la directive 2001/18/CE (article 2 point 2) n'exige pas, dans notre ordre juridique national, de disposition expresse. En effet, le principe selon lequel la personne est sujet de droit s'oppose à toute possibilité de la considérer comme un organisme génétiquement modifié.

La définition au sens scientifique du terme OGM répond au même descriptif.

2.2/ Apport de micro-organismes génétiquement modifiés

2.2.1/ AU NIVEAU NATIONAL

En France, l'utilisation en milieu confiné (laboratoire, serre, bio-industrie) des OGM ne peut se faire sans l'autorisation de la Commission du génie Génétique (CGG). La CGG est une commission consultative sous tutelle du Ministère de la Recherche, qui examine les dossiers déposés par les laboratoires et les industriels, propose les conditions d'expérimentations sur les OGM en milieu confiné après une évaluation de la classe de risque et du niveau de confinement souhaitable (étude des techniques, procédés, organismes, sécurité). Le Ministère de la Recherche prend la décision finale et doit ensuite mettre à la disposition des autres membres de l'Union européenne les dossiers constitués.

La directive fondatrice européenne 90/219/CEE transposée en droit français par la *Loi n°92-654* du 13 juillet 1992) établit des mesures communes pour l'utilisation confinée des micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) en vue de la protection de la santé humaine et de l'environnement. Elle concerne les plantes et leurs cellules à deux titres : d'une part, car elles peuvent être hôtes ou cibles des micro-organismes, et, d'autre part, car leur transformation peut nécessiter le recours à des micro-organismes génétiquement modifiés.

La Commission du Génie Biomoléculaire (CGB) examine, au cas par cas, les demandes de dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement à des fins de recherche et de développement (dites partie B) ou de mise sur le marché (dites partie C) pour en évaluer les risques pour la santé publique et pour l'environnement. La CGB est une commission consultative sous tutelle du Ministère de l'Agriculture et de l'Environnement. Les demandes d'autorisation de dissémination à des fins de recherche et de développement sont traitées au niveau national. Il incombe toutefois à l'Etat de tenir informés les autres Etats membres et la Commission des activités de recherche conduites sur le territoire national.

2.2.2/ AU NIVEAU INTERNATIONAL

- L'exemple européen

Une réglementation est indispensable pour garantir la sécurité de l'utilisation, dans l'environnement, d'organismes nouveaux ou modifiés, et – objectif qui n'est pas des moindres – pour maintenir la confiance du public. **L'Union européenne a émis deux directives** concernant l'usage de micro-

organismes génétiquement modifiés en milieu confiné et la dissémination délibérée de micro-organismes génétiquement modifiés dans l'environnement :

- *Council Directive on the Contained Use of Genetically Modified Micro-organisms. 1990, 90/219/EEC*

Les États membres ont été obligés de réglementer l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés, afin de limiter au maximum les effets négatifs qu'ils peuvent avoir sur la santé humaine et l'environnement, car les micro-organismes libérés dans l'environnement d'un État membre, au cours de leur utilisation confinée, peuvent se répandre dans d'autres États membres. La directive classe les micro-organismes génétiquement modifiés en deux catégories d'après le risque qu'ils représentent :

- o *groupe I: micro-organismes répondant aux critères de l'annexe II;*
- o *groupe II: micro-organismes autres que ceux du groupe I.*

Afin de limiter au maximum les risques pour la santé humaine ou l'environnement, l'utilisateur doit suivre certains principes de sécurité et d'hygiène. De plus, lors de la première utilisation de micro-organismes génétiquement modifiés dans une installation particulière, l'utilisateur doit présenter aux autorités une notification leur permettant de s'assurer que l'installation proposée se prête à cette activité sans danger.

- *Council Directive on the Deliberate Release into the Environment of Genetically Modified Organisms. 1990, 90/220/EEC (abrogée)*

Cette directive a principalement pour but de rendre la procédure d'autorisation de dissémination volontaire et de mise sur le marché des organismes génétiquement modifiés (OGM) plus efficace et plus transparente, de limiter cette autorisation à une durée de 10 ans renouvelables et d'introduire un contrôle obligatoire après la mise sur le marché des OGM. Elle prévoit également une méthode commune d'évaluation des risques associés à la dissémination des OGM (les principes applicables à l'évaluation des risques pour l'environnement se trouvent à l'annexe II de la directive) et un mécanisme permettant la modification, la suspension ou la cessation de la dissémination des OGM lorsque l'on dispose de nouvelles informations sur les risques associés à cette dissémination.

NB : Toutes les procédures d'autorisation de dissémination d'OGM dans l'environnement sont strictement réglementées par la directive européenne 2001/18/CEE. Cette directive remplace, depuis 2001, la 90/220/CEE (transposée en droit français par la loi n° 92-654 du 13 juillet 1992), directive générale fixant des lignes générales d'évaluation applicables à tous les types d'OGM (plantes, animaux, micro-organismes) et à toutes les utilisations, qu'elles soient médicales, industrielles ou alimentaires.

La majorité des pays membres de l'UE ont introduit ces deux directives dans leur législation. Ces directives exigent qu'un projet détaillé de l'expérience, qui doit contenir l'évaluation des risques potentiels, reçoive l'approbation des autorités compétentes, avant la dissémination de tout organisme génétiquement modifié dans l'environnement.

Dans certains pays, la nature, et parfois même le site de dissémination, doivent être publiés dans la presse locale. Après plusieurs années d'expérience dans l'utilisation de cette réglementation, les procédures concernées sont actuellement en train d'être révisées. Des amendements destinés à clarifier et à réviser la Directive 90/220/EEC ont été publiés en décembre 1998.

- **L'exemple américain**

Le décret de Contrôle des Substances Toxiques (TSCA) oblige l'EPA à réglementer certains micro-organismes. En vertu de la politique antérieure, l'industrie est tenue de déposer auprès de l'EPA un avis de pré-manufacture (PMN) dans le cadre de tout « nouveau » micro-organisme avant qu'il ne soit fabriqué, importé ou transformé et destiné à un usage commercial, où un « nouveau » micro-organisme est défini comme tout micro-organisme inter générique non répertorié dans l'Inventaire des Substances Chimiques du TSCA. Plus précisément, en vertu de cette législation, de nouveaux micro-organismes sont définis comme des micro-organismes créés par la combinaison délibérée de matériel génétique provenant d'organismes de différents genres. » (p. 1-3).

Concernant les applications de la bioaugmentation, aux Etats Unis, seules 11 demandes d'applications environnementales microbiennes ont été déposées auprès de l'EPA de 1998 à 2004, avec pour la plupart recours à la souche *Bradyrhizobium japonicum*. En fait, seule une réelle libération d'OGM pour la biorestauration de sites pollués a été réalisée aux Etats Unis. La principale préoccupation des autorités compétentes concerne le potentiel des OGM a persisté sur un site, après biorestauration et/ou par transfert des modifications géniques des OGM aux populations autochtones résultant en d'imprévisibles conséquences pour la santé des populations avoisinantes et pour l'environnement.

- Une démarche à l'échelle mondiale : le protocole de Cartagena

Le 29 janvier 2000, à Montréal (Canada), plus de 130 pays ont adopté le **protocole de Cartagena** sur la prévention des risques biotechnologiques relatif à la Convention sur la diversité biologique. Ce premier protocole a pour objet de contribuer à assurer un degré adéquat de protection pour le transfert, la manipulation et l'utilisation sans danger des organismes vivants modifiés (végétaux, animaux et micro-organismes génétiquement modifiés, par exemple) dans le cadre des mouvements trans-frontières.

En outre, ce protocole vise à éviter les effets défavorables sur la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité biologique sans perturber inutilement le commerce mondial des produits alimentaires. Ce protocole est entré en vigueur le 11 septembre 2003.

Il crée une procédure d'accord préalable en connaissance de cause qui a pour effet d'obliger les exportateurs à **obtenir le consentement d'un pays importateur** avant le premier mouvement trans-frontière d'organismes vivants modifiés destinés à être introduits intentionnellement dans l'environnement, qu'il s'agisse par exemple de semences, de poissons destinés à être lâchés ou de micro-organismes libérés **dans le cadre d'actions de biorestauration**.

2.3/ Apport de micro-organismes allochtones

2.3.1/ AU NIVEAU NATIONAL

L'intérêt du recours à des traitements biologiques réside essentiellement dans le fait qu'elles ne nécessitent ni excavation (pour certaines), ni transport, ce qui rend leur mise en œuvre moins coûteuse.

Les techniques qui impliquent l'injection des micro-organismes dans les sols, *in situ*, nécessitent de contrôler de nombreux paramètres et de prendre d'importantes précautions pour éviter la diffusion des micro-organismes dans l'environnement proche. Ces techniques sont généralement moins bien acceptées du fait des risques de transfert des bactéries et des pollutions dans les sols environnants et les nappes phréatiques.

Le point sur l'aspect réglementaire pour l'utilisation des micro-organismes allochtones dans le traitement des matrices contaminées n'est pas clairement stipulée dans la législation française. En effet, la consultation du site de Légifrance (www.legifrance.gouv.fr) au moyen de divers mots clés tels que « bioaugmentation », « bioremédiation », « biotaïement », ne permet pas de sélectionner des textes réglementaires sur cette thématique.

Un article seul a été tiré du code de la Santé Publique (**article L5139-1**) sur le Régime juridique des micro-organismes pouvant présenter un risque pour la santé publique. Relèvent du présent chapitre **les micro-organismes et les toxines dont l'emploi serait de nature à présenter un risque pour la santé publique** ainsi que les produits qui en contiennent. Cependant, aucun texte ou décret ne stipule vraiment quelles sont les espèces autorisées et leurs usages.

2.3.2/ AU NIVEAU INTERNATIONAL

La recherche de textes réglementaires au niveau du site de l'Union européenne (<http://eur-lex.europa.eu/fr/index.htm>) a abouti à des résultats concernant les organismes génétiquement modifiés (développés ci-après).

Par contre, aucun document ne stipule clairement les précautions à prendre dans le cas de l'introduction de micro-organismes pour le traitement des matrices contaminées.

- **L'exemple canadien**

Dans le but d'améliorer et de protéger la santé et la sécurité des populations ainsi que l'environnement, Santé Canada, en collaboration avec Environnement Canada, dans le cadre de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement, de 1999 (LCPE de 1999) régit les produits nouveaux issus de la biotechnologie et s'occupe de la gestion des substances susceptibles d'affecter la santé humaine ou l'environnement : à titre de substances nouvelles, sont compris les micro-organismes, les autres organismes vivants, les produits biochimiques et les biopolymères. Ces substances biotechnologiques peuvent faire l'objet d'évaluations des risques et de contrôles dans le cadre du nouveau Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles, de la LCPE de 1999.

Évaluation du risque (rôle de Santé Canada) :

Selon LCPE 1999, **autant les organismes d'origine naturelle que les organismes génétiquement modifiés doivent être évalués**. Les évaluateurs de la Section de biotechnologie du Bureau de l'évaluation et du contrôle des substances nouvelles évaluent les renseignements fournis par les déclarants, conformément aux Règlements sur les renseignements concernant les substances nouvelles et les Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles s'appliquant aux micro-organismes et décident si une substance est « toxique » ou non selon LCPE 1999.

Si les compagnies comptent fabriquer ou importer de nouveaux produits biotechnologiques, elles doivent aviser le gouvernement et présenter des renseignements scientifiques détaillés au sujet des substances contenues dans le produit. Les scientifiques de Santé Canada ont examiné ces renseignements et procédé à des enquêtes supplémentaires afin de savoir si un produit pose un risque pour la santé humaine. Pour évaluer les risques, les scientifiques évaluent le danger que représente un produit et l'exposition potentielle des Canadiens à ce produit.

Suivent les renseignements nécessaires à l'évaluation des dangers potentiels :

- l'identité du ou des micro-organismes ou organismes, y compris toute manipulation génétique;
- la propension d'un micro-organisme ou d'un organisme à causer des maladies ou d'autres effets sur la santé des gens et l'existence d'un lien avec les autres micro-organismes connus pour être à l'origine de problèmes de santé; et
- la possibilité de contrôler le micro-organisme ou l'organisme (par exemple, au moyen des antibiotiques) ou sa « résistance » aux efforts pour contrôler son mode de multiplication et de propagation.

Pour évaluer le potentiel d'exposition des humains, les scientifiques de Santé Canada tiennent compte de nombreux facteurs, dont :

- la quantité de personnes susceptibles de se servir du produit ou d'y être exposées;
- la quantité de micro-organismes ou d'organismes dans le produit; et
- la rapidité de multiplication des micro-organismes et des organismes ainsi que la durée de leur présence dans l'environnement une fois qu'ils sont libérés.

Les scientifiques de Santé Canada essaient aussi de savoir si certaines utilisations d'un produit pourraient conduire à des voies ou à des niveaux d'exposition inhabituels, comme l'inhalation de grandes quantités de micro-organismes.

Le paragraphe 106(3) de la LCPE 1999 interdit l'utilisation, la fabrication ou l'importation d'un organisme vivant en vue d'une nouvelle activité (NA), lorsque l'organisme figure sur la LIS (cf annexe), avec une indication à l'effet que les dispositions de la NA s'appliquent.

Parallèlement, le paragraphe 106(4) de la LCPE 1999 interdit l'utilisation, la fabrication ou l'importation en vue d'une nouvelle activité d'un organisme vivant qui ne figure pas sur la LIS, mais pour lequel un avis a été publié dans la Gazette du Canada, indiquant que les dispositions de la NA s'appliquent. Une nouvelle activité est définie à l'article 104 de la LCPE 1999 comme étant toute activité qui donne ou peut donner lieu :

- soit à la pénétration ou au rejet d'un organisme vivant dans l'environnement en une quantité ou concentration qui, de l'avis des ministres, est sensiblement plus grande qu'antérieurement;
- soit à la pénétration ou au rejet d'un organisme vivant dans l'environnement ou à l'exposition réelle ou potentielle de celui-ci à un tel organisme, dans des circonstances et d'une manière qui, de l'avis des ministres, sont sensiblement différentes.

D'autres textes régissent l'entrée sur le territoire canadien de substances nouvelles : les règlements de notification des Nouvelles Substances du décret sur la Protection de l'Environnement Canadien (1999)¹ régulent les nouvelles substances telles que les substances chimiques, polymères et produits biotechnologiques s'ils sont fabriqués ou importés au Canada. Les micro-organismes utilisés dans les activités suivantes sont soumis à ces textes :

- Bioremédiation par bioaugmentation (application de micro-organismes ; soient des souches pures, des mélanges définis et des consortiums naturels)
- Des études de terrain expérimentales, applications spécifiques sur site et les applications/opérations entièrement commercialisées
- L'inoculation microbienne d'effluents industriels.

¹ D'autres informations sont disponibles à l'adresse suivante : www.ec.gc.ca/substances

3/ Etat de l'art sur les techniques de bioaugmentation

3.1/ Notions de bioremédiation

De manière générale, les biotechnologies classiques mettant en œuvre des micro-organismes sont applicables pour le traitement des déchets organiques dits « biodégradables ». De nouvelles biotechnologies peuvent s'appliquer au traitement de certaines pollutions minérales (biolixiviation ou bio-immobilisation des métaux,...), bien que des études complémentaires restent encore nécessaires pour en démontrer la faisabilité industrielle.

Dans le cas des sites et sols pollués, les biotechnologies peuvent apporter des solutions intéressantes mais souvent en association avec d'autres techniques. Même si les traitements biologiques ne permettent pas d'éliminer complètement la charge polluante, ils permettent de réduire les impacts environnementaux souvent de manière efficiente, avec des moyens relativement réduits. Dans l'ensemble des cas, le facteur temps est primordial. Il est à mettre en balance notamment avec les coûts des traitements, généralement moins élevés pour les biotechnologies que pour les techniques thermiques ou physico-chimiques.

Deux groupes de polluants sont communément rencontrés dans les matrices contaminées :

- **les molécules organiques** avec par exemple :
 - o les biopolymères et autres produits naturels ;
 - o les hydrocarbures aliphatiques ;
 - o les hydrocarbures aromatiques ;
 - o les organo-halogénés ;
 - o les organométalliques ;
 - o autres : Pesticides, composés organiques oxygénés (solvants polaires).

- **les molécules inorganiques** avec par exemple :
 - o les métaux lourds ;
 - o autres : Cyanures, nitrates, métalloïdes (As), ...

La bioremédiation est une technique de dépollution attractive. L'utilisation d'organismes vivants permet de dégrader ou de transformer une grande variété de polluants grâce principalement à des enzymes de métabolisation. Mais cette approche a des limites. La remédiation par voie biologique est parfois impossible, incomplète, et nécessite souvent des délais importants de manière parfois difficilement prévisible. Si un polluant n'est pas dégradé par une microflore, il peut y avoir deux causes majeures :

1. soit le polluant n'est pas disponible pour les organismes,
2. soit il n'est pas dégradable par les organismes présents.

Plusieurs facteurs conditionnent **la disponibilité** d'une ou plusieurs molécules pour les organismes vivants. Il faut que la microflore soit en contact de la pollution. La probabilité de contact polluant-organisme est réduite si les concentrations en micro-organismes et/ou substrats sont faibles. En effet, si le polluant n'est pas en concentration suffisante, les organismes et leurs enzymes ne pourront pas être en contact avec la molécule d'intérêt qui par conséquent ne pourra pas être transformée. La nature chimique du polluant est déterminante. Elle conditionne le partage de la molécule avec les différentes phases du système : une molécule pourra être très volatile (et donc préférentiellement en phase gazeuse), plus soluble dans des solvants organiques que dans une phase aqueuse ou encore fortement adsorbée sur une matrice solide. La nature et la structure de la matrice (microporosité, ...) peut encore accentuer les phénomènes d'adsorption. Les conditions physico-chimiques telles que la température et le pH vont également modifier la disponibilité d'une molécule.

D'autres facteurs vont influencer **la dégradation** des polluants par les micro-organismes. Les conditions environnementales doivent être optimales pour obtenir une croissance et une activité microbienne garantissant l'efficacité du procédé de bioremédiation. Les nutriments doivent être présents en quantité suffisante : les valeurs optimales du rapport C:N:P doivent être égales à 100 :5 :1 et la présence d'oligo-éléments est requise pour assurer leur croissance.

Les conditions optimales de dégradation dans les sols sont rapportées dans le tableau 1 (d'après Vidali, 2001). L'efficacité du traitement par bioremédiation peut être ainsi limitée par la perméabilité des sols, la teneur en silt et argile ne devant pas dépasser un certain seuil. Les sols à traiter ne peuvent contenir de substances toxiques susceptibles d'empêcher le développement bactérien.

Paramètres	Conditions nécessaires pour l'activité microbienne	Valeur optimale de dégradation d'hydrocarbures
Humidité	25-28 % de la capacité de rétention en eau de la matrice	30 – 90%
pH	5,5 – 8,8	6,5 – 8
Contenu en oxygène	Aérobie, espace pore minimum de 10%	10 – 40%
Contenu en nutriments	C, N et P pour la croissance microbienne	C :N :P = 100 :5 :1
Oligo-éléments	Fonction de l'espèce	Fonction de l'espèce
Température (°C)	15 – 45	20 – 30
Contaminants organiques	pas trop toxique	Hydrocarbures 5 – 10% PS de sol
Métaux lourds	Contenu total 2000 ppm (quantité maximum tolérable)	700 ppm
Type de sol	Contenu en argile faible	-

Tableau 1. Conditions environnementales affectant la biodégradation (adapté de Vidali, 2001)

Outre les facteurs environnementaux, plusieurs facteurs de nature physiologique peuvent influencer la dégradation microbienne des polluants. Au cours de la chaîne de réactions, la présence d'accepteur final d'électrons va influencer la biodégradation :

- Lorsque l'accepteur final d'électrons est l'oxygène moléculaire, il est nécessaire d'utiliser le terme respiration aérobie et les micro-organismes de ce type sont aérobies. Lorsque l'accepteur est une substance inorganique, un sulfate ou un carbonate et en absence d'oxygène, le terme de respiration anaérobie est utilisé, les organismes de ce type sont alors définis comme anaérobies.
- Lorsque l'accepteur final d'électrons est une molécule organique, le terme fermentation est employé et les bactéries sont dites anaérobies ou aéro-anaérobies.

Il est possible de diviser les micro-organismes en plusieurs groupes distincts :

o **Les aérobies** : plusieurs bactéries aérobies sont connues pour leur capacité de dégradation de pesticides et hydrocarbures, des alcanes aux composés poly-aromatiques telles que les genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* et *Mycobacterium*.

o **Les anaérobies** : moins étudiés que les précédents, concernent la bioremédiation des Polychlorobiphényles dans les sédiments contaminés, la déchloruration du trichloréthylène, et du chloroforme.

o **Les méthylotrophes** : actifs contre une liste importante de composés, incluant les composés aliphatiques chlorés comme le trichloréthylène et le 1,2-dichloroéthane.

Plusieurs limites influencent la réussite de la bio ingénierie pour le traitement des matrices contaminées :

- Les plasmides sont instables ou les gènes ne sont pas exprimés dans le nouvel environnement.
- Les souches inoculées n'ont pas survécu, ou, si elles ont survécu, l'activité métabolique a été trop faible pour une compétition réussie avec les souches autochtones.
- Les souches inoculées, agissant comme donneuses de gènes, ont survécu, mais d'autres souches ne sont pas compétentes pour recevoir ces gènes.

3.2/ Origine des micro-organismes impliqués dans les procédés de bioaugmentation

L'addition d'un inoculum supplémentaire consistant en des microorganismes indigènes ou non doit stimuler la diversité de la population indigène mais aussi la concentration en microorganismes actifs (densité cellulaire) afin d'augmenter le niveau de dégradation des composés cibles. L'application de la bioaugmentation est essentielle dans le cas où aucun micro-organisme capable de dégrader les composés cibles n'est présent dans la communauté naturelle ou si l'activité de la communauté naturelle est inhibée. La sélection de souche est fondée sur le principe que certains micro-organismes sont mieux adaptés à certaines activités (cataboliques) et certains environnements que d'autres.

D'autre part, dans les milieux pollués comme dans les environnements naturels, les micro-organismes vivent en consortiums. Il s'agit d'une forme de pluricellularité « opportuniste », c'est-à-dire qu'elle génère une infinité de plans possibles en fonction des paramètres du milieu, de leurs fluctuations ainsi que des potentialités et des facultés d'adaptation des espèces qui le peuplent. La dégradation des polluants est souvent une entreprise collective menée par des individus appartenant à différentes espèces et où chacun dispose d'enzymes capables de dégrader seulement un certain nombre de molécules d'une famille donnée (PCB, PAH, ...), la capacité à dégrader tous les types de molécules, lorsqu'elle existe, étant une propriété de l'ensemble du consortium. Cette dimension de « consortiumisation » pourrait aussi être exploitée en bioaugmentation et les souches nécessaires pourraient être construites par génie génétique *in vivo*. Mais il s'agit là d'un objectif à long terme : il implique une compréhension préalable des mécanismes à l'oeuvre lors de la mise en place et du fonctionnement de ces associations de cellules.

La bioaugmentation traditionnelle ayant donné les résultats les plus probants est celle basée sur l'application répétée de bactéries dégradantes très compétentes (van Veen *et al.*, 1997). La fréquence élevée des événements pour ce procédé est nécessaire en raison de la faible survie et de l'activité de l'inoculum. Par ailleurs, ce mode d'application favorise la sélection de la (des) souche(s) les plus adaptées. Lors de la conception d'un procédé de bioaugmentation, la sélection est limitée aux espèces qui ne sont pas des agents pathogènes pour l'homme, mais il est fréquent de rencontrer des microorganismes résistants et étroitement liés à une pathogénicité humaine, excluant leur application sur le terrain. Ceci est illustré avec *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie Gram négative polyvalente qui se développe dans le sol, les marais côtiers et les habitats marins et a été utilisée comme rhizobactérie promotrice de la croissance végétale. Toutefois, une gamme de différentes souches de *P. aeruginosa* est également connue pour générer des infections pulmonaires avec inflammation et s'accompagnant de problèmes respiratoires qui peuvent être potentiellement mortels. Par conséquent, la sélection de la souche ne doit pas être fondée sur ses performances seulement.

L'origine des micro-organismes entrant dans le procédé de bioremédiation peut donc être triple :

L'UTILISATION DE MICRO-ORGANISMES ISOLES ET/OU CULTIVES

Traditionnellement, les études portant sur la biodégradation ont été initiées par la sélection de un ou plusieurs micro-organismes capable de dégrader des polluants cibles. Cependant, les méthodes conventionnelles ont permises l'isolement que d'une fraction limitée des micro-organismes dégradeurs présents dans l'environnement. De plus, beaucoup d'organismes isolés ont montré des cinétiques de dégradation qui diffèrent de celles observées dans leurs habitats naturels (Watanabe, 2001). Par exemple, les méthanotrophes cultivées en laboratoire montrent des constantes de saturation pour l'oxydation du méthane qui sont de 1 à 3 fois plus élevées que celles observées dans les sols.

L'introduction de microorganismes isolés et/ou cultivés en laboratoire dans un écosystème pollué est utilisée dans un premier lieu pour accélérer la consommation du ou des polluants présents par la microflore. Par exemple, une consommation rapide de 2,4,6-trichlorophénol (2,4,6-TCP) a été observée dans des sols contaminés et inoculés avec *Alcaligenes eutrophus* TCP (Andreoni *et al.*, 1998). En effet, les auteurs ont montré une métabolisation du polluant 48 h après l'incubation. Le sol utilisé a été traité durant 20 ans avec des pesticides et il contenait $1-9.10^7$ UFC/g sol sec ayant servi pour la préparation des isolats. La souche *A. eutrophus* TCP a été isolée en présence de 200 mg/l de 2,4,6-TCP.

Il est également important de souligner la capacité d'adaptation des micro-organismes en fonction des conditions externes pouvant influencer la biodégradation. Meyer *et al.* (2004) ont montré que des isolats, prélevés dans une communauté de sol alpin et constitués en grande majorité par le genre *Pseudomonas*, formaient un embranchement unique adapté à des conditions extrêmes, représentatif de ceux rencontrés dans la toundra suédoise et l'antarctique.

Il faut également préciser que l'efficacité de dégradation sera fonction de l'espèce présente. Topp *et al.* (2000a, 2000b) ont montré des différences d'efficacité entre les bactéries dégradant l'atrazine dans la bioremédiation de sols contaminés. Bien que les 3 genres, *Pseudaminobacter*, *Norcardioides* et *Pseudomonas* soient capables de minéraliser l'atrazine, seules *Pseudaminobacter* et *Norcardioides*, avec une densité dans l'inoculum de 10^5 cellules/g sol, accélèrent significativement la disparition de l'atrazine. Les auteurs suggèrent que la capacité à utiliser l'atrazine comme source de carbone est importante pour mettre en place « une amélioration de la dégradation » écologiquement significative dans la densité des inoculums présents.

L'une des difficultés apparente lors de l'introduction d'organismes **exogènes** réside dans la présence au sein de l'environnement naturel de nombreux organismes non caractérisés et entrant en compétition avec les populations introduites. Ainsi, de nombreux micro-organismes isolés et caractérisés en laboratoire ne sont pas encore valides *in situ*. L'autre difficulté réside dans le fait que deux scénarios environnementaux ne vont pas se produire dans des conditions complètement identiques ; les variations rencontrées résident au niveau des types et quantités de polluants présents, des conditions climatiques et hydrogodynamiques.

L'ENRICHISSEMENT DIRECT PAR DES MICRO-ORGANISMES

L'enrichissement direct des matrices solides polluées peut être établi par stimulation des micro-organismes **indigènes** dégradeurs d'un composé spécifique. L'activation du sol est un exemple d'enrichissement direct pour lequel un consortium acclimaté est produit et peut dégrader un composé spécifique : Otte *et al.* (1994) ont testé ce concept en bioréacteurs pendant 35 jours pour la biodégradation du pentachlorophénol (PCP) et d'HAP dans des sols contaminés. En effet, la biodégradation aérobie et anaérobie des HAP et PCP a été démontrée à partir de cultures pures en laboratoire ou *in situ* (Topp et Hanson, 1990 ; Kanaly et Harayama, 2000).

Néanmoins, l'activité des cultures pures est souvent restreinte à un nombre limité de contaminants et est moins applicable à une mixture de polluants. Le concept d'activation du sol est basé sur la culture d'une biomasse à partir d'une fraction de sol contaminé et permet un usage ultérieur de cet isolat comme un inoculum pour la bioaugmentation de ce même sol.

Les particules du sol agissent comme des micro-niches pour les micro-organismes les protégeant contre les prédateurs (Kim, 2003). Le sol peut ainsi fournir des nutriments aussi bien qu'un support physique pour la croissance microbienne. Durant l'enrichissement direct, beaucoup d'espèces, qui ne sont pas cultivables mais peuvent avoir un rôle prépondérant dans la dégradation des composés chimiques présents dans le milieu naturel, peuvent être enrichies.

Bien que l'utilisation de cultures pures de souches isolées puisse être associée à l'accumulation de produits de dégradation qui seraient plus toxiques que les produits parents, les mélanges de consortiums sont plus susceptibles de dégrader totalement les composés cibles. Ces mélanges de micro-organismes sont également connus pour avoir l'avantage d'être plus résistants aux conditions environnementales naturelles et à la prédation en comparaison avec les cultures pures qui souvent ne parviennent pas à générer les activités désirées quand elles sont libérées dans l'environnement (Kim, 2003).

L'UTILISATION DE MICRO-ORGANISMES GENETIQUEMENT MODIFIES

Cette partie sera développée de manière plus explicite dans le chapitre 5. Néanmoins, il est important de préciser qu'un certain nombre de travaux présentent le recours à des organismes génétiquement modifiés pour augmenter la biodégradation et leur application en bioremédiation. Quelques exemples peuvent ainsi être cités. Shao *et al.* (1995) ont rapporté que la souche recombinée *Rhodococcus* TE1, portant le gène encodant la s-triazine hydrolase issu de la souche *Rhodococcus corallinus*, était

capable de dégrader l'atrazine en acide cyanurique. Le trichloréthylène pourrait être dégradé par une souche recombinante de *Pseudomonas fluorescens* avec le gène issu de *Burkholderia* PR1 encodant la toluène *o*-monooxygénase (Yee *et al.*, 1998).

Cependant, il y a deux limites majeures à l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés en remédiation :

- La première est écologique. Une souche développée en laboratoire doit être conçue pour s'intégrer à la communauté naturelle existante. La capacité des OGM à survivre dans l'environnement est très controversée avec certaines études qui rapportent que la survie des OGM est de nature imprévisible (Giddings, 1998).
- La seconde limite provient des contrôles réglementaires. Le relargage d'organismes génétiquement modifiés est soumis à une réglementation stricte (cf. chapitre 2). Obtenir une approbation réglementaire est souvent difficile et long, c'est pourquoi certains chercheurs se sont concentrés sur l'optimisation et le développement commercial de micro-organismes naturels.

3.3/ Facteurs affectant l'efficacité de la bioaugmentation

Bien que plusieurs exemples de relargage de micro-organismes dans le sol soient disponibles dans la bibliographie, beaucoup d'échecs ou d'incohérences dans leur réalisation ont été relevés (van Veen *et al.*, 1997 ; Tappeser *et al.*, 1998). Les facteurs qui déterminent l'efficacité et le coût de la bioaugmentation incluent :

- la nature des micro-organismes,
- la nature du (des) xénobiotique(s),
- les conditions physico-chimiques
- et la matrice à dépolluer.

Un facteur clé impliqué dans le manque d'efficacité de la bioaugmentation est le déclin rapide de la densité de prolifération des inoculum (Ramos-Gonzales *et al.*, 1991 ; Thiem *et al.*, 1994).

L'introduction de souche(s) dans le milieu naturel doit pouvoir faire face à une compétition intense inter-espèces et à la prédation ou le parasitisme. Les souches de laboratoire, spécialement les micro-organismes génétiquement modifiés, sont difficilement compétitives par rapport aux communautés microbiennes établies. En effet, d'après Kim (2003), l'accumulation d'intermédiaires toxiques ou de produits finaux, à partir des polluants présents dégradés par les bactéries indigènes, peut avoir des effets négatifs sur la survie des micro-organismes introduits.

La compétition peut être contrôlée par ajout de nutriments spécifiques que l'inoculum va utiliser (biostimulation) ou en modifiant les paramètres de fonctionnement. De plus, il a été rapporté que la survie des bactéries ajoutées à un sol contaminé est dépendante de la pré-adaptation des souches à un milieu minimal contenant un extrait du sol à traiter (Maraha, 2007). Cependant, la survie et la capacité à croître des souches incorporées n'assurent pas toujours la dégradation du xénobiotique.

Le contact direct ou indirect entre les micro-organismes et les contaminants est un pré-requis nécessaire pour la biodégradation. Cependant, l'une des limites est l'incapacité des micro-organismes à se déplacer dans le milieu contaminé. Ainsi, plusieurs auteurs ont considéré cette option et, plusieurs techniques ont été étudiées pour améliorer le transport et la distribution. De telles techniques incluent l'application de surfactants, la réduction de la taille des cellules par privation de nutriments et, le développement de souches avec une modification de l'adhésion des cellules (Kim, 2003).

Gannon *et al.* (1991) ont démontré que les propriétés de surface cellulaire et le transport des bactéries *via* le sol sont liés. La rétention des 19 souches testées dans du terreau type Kendaia était statistiquement liée à la taille des cellules, alors que le transport ou la rétention de ces souches n'était pas corrélé avec l'hydrophobicité, les charges de surface des cellules, ou la présence de capsule. La présence de flagelles n'était pas liée avec le transport des organismes.

3.4/ Bioremédiation des matrices liquides

3.4.1/ PRINCIPE

Les technologies de traitements dans le domaine des eaux usées (station d'épuration) au cours des deux dernières décennies ont contribué à la préservation de l'environnement. Le traitement biologique, la filtration et la désinfection des effluents sont quelques-uns des exemples qui ont réduit les impacts de la pollution chimique et ont protégé les écosystèmes aquatiques.

Les traitements biologiques des eaux usées ont été longuement pratiqués en utilisant des populations complexes de micro-organismes dans l'environnement aquatique pour métaboliser la matière organique carbonée. En effet, les micro-organismes consomment les composés organiques et les convertissent en dioxyde de carbone, eau et énergie pour produire de nouvelles cellules.

En fin de processus, les polluants solubles sont convertis en biomasse insoluble, qui peut être retirée mécaniquement du flux de déchets et envoyée à disposition. Divers paramètres vont influencer la dégradation : parmi eux, les niveaux d'oxygène dissous, pH et d'éléments nutritifs (phosphore et ammoniac) sont les plus critiques.

Plusieurs polluants peuvent être présents dans un effluent liquide industriel comme par exemple :

- Matières flottantes (graisses, hydrocarbures aliphatiques, goudrons, huiles organiques, résines,...) ;
- Matières en suspension (sables, oxydes, hydroxydes, pigments, soufre colloïdal, latex, fibres, adjuvants de filtration,...) ;
- Colorants, détergents, composés macromoléculaires divers, composés phénolés, dérivés nitrés, dérivés chlorés ;
- Métaux lourds, Fe, Cu, Zn, Ni, Al, Hg, Pb, Cr, Cd, Ti ;
- PO_4^{2-} , NH_4 , SO_2 , phénols, hydrocarbures légers ou aromatiques, dérivés chlorés ;
- CN^- , Cr^{6+} , Cl_2 , NO_2 ;
- Acides minéraux et bases: acide chlorhydrique, nitrique, sulfurique et fluorhydrique, bases diverses;
- Radionucléides tels que I^* , Mo^* , Cs^* ;
- Sels d'acides et de bases fortes, composés organiques ionisés (échange d'ions) ou non (osmose inverse) ;
- Eléments biodégradables tels que sucres, protéines, phénols.

Ces polluants sont, pour la plupart, caractéristiques et donc représentatifs d'une activité industrielle particulière. Les effluents, contenant certains de ces polluants en grande quantité, pourraient être difficilement traités par voie biologique. C'est principalement le cas des industries des métaux, de traitement de surface et des activités de chimie minérale. Pour la majorité des autres industries, la voie biologique, après une préparation adaptée, se prête tout à fait au besoin d'épurer l'effluent liquide provenant de leur activité.

La mise en œuvre des cultures bactériennes peut revêtir de très nombreuses formes. Il est classique de distinguer les procédés dits à culture libres et les procédés dits à cultures fixées.

Dans les procédés à **cultures libres**, utilisés uniquement en traitement des effluents liquides, est favorisé le développement d'une culture bactérienne dispersée au sein du liquide à traiter. Un bassin brassé est utilisé pour conserver en suspension la culture, et dans lequel est maintenu :

- soit, une certaine concentration en oxygène : ce sont les procédés aérobies tels que les boues activées, le lagunage aéré ou naturel ;
- soit, au contraire, l'absence d'oxygène : ce sont les procédés anaérobies tels que les procédés à lit de boue ou le lagunage anaérobie.

Les cultures libres ont comme avantage essentiel une relative simplicité de mise en œuvre. Elles sont limitées cependant par les concentrations en micro-organismes accessibles et conduisent ainsi à des volumes d'ouvrages importants.

Dans les techniques à **cultures fixées**, la capacité qu'ont la plupart des micro-organismes à produire des exo-polymères est utilisée pour former un biofilm. Ces cultures permettent d'obtenir dans les réacteurs des concentrations en biomasse plus importantes, ce qui permet de réduire leur taille.

Les cultures fixées comme celles libres peuvent s'utiliser en traitements aérobie et anaérobie.

3.4.2/ EXEMPLES DE BIOAUGMENTATION APPLIQUES A DES MATRICES LIQUIDES

CAS DES COMPOSES CHLORES

Certains composés aliphatiques chlorés de part leur utilisation importante comme solvants, dégraissants, désinfectants se retrouvent dans plusieurs compartiments de l'écosystème dont les réserves en eau potable. Un traitement communément employé pour épurer les eaux souterraines contaminées consiste en l'utilisation d'une série de puits pour pomper les eaux souterraines contaminées vers la surface. Outre, l'élimination du contaminant, ces systèmes de traitements hydrauliques sont également nécessaires pour la maîtrise des panaches de contaminants, c'est-à-dire pour empêcher l'expansion de la zone contaminée vers d'autres compartiments. Cependant, ces systèmes sont coûteux et nécessitent la mise en place de systèmes complexes sur site. C'est pourquoi le recours à la technique de bioaugmentation est une alternative intéressante.

Le traitement des solvants chlorés par ajout de micro-organismes a été étudié dans de nombreux travaux en laboratoire et dans des expérimentations sur pilote dans des aquifères contaminés (Lorah *et al.*, 2007 ; Tani *et al.*, 2002 ; Hage, 2004). L'intérêt de la bioaugmentation dans la remédiation anaérobie a été initié par l'identification de bactéries capables de croître par la réduction d'éthènes chlorés comme le tétrachloroéthylène (PCE), le trichloroéthylène (TCE) et le 1,2-dichloroéthylène (1,2-DCE) (Maymo-Gatell *et al.*, 1995).

Plus récemment, des espèces tirant leur énergie à partir de la réduction du 1,2-DCE et du chlorure de vinyle en éthène ont été identifiées, incluant les souches *Dehalococcoides* VS (Müller *et al.*, 2004) et BAV1 (Lu *et al.*, 2006). Des consortiums microbiens ont été utilisés dans des applications concernant les composés organiques volatils pour atteindre une déchloruration complète en éthène, éthane et autres composés non chlorés.

Une culture mixte contenant *Dehalococcoides ethenogenes* a été isolée à partir d'un site contaminé au TCE en Ontario (Canada) et désigné KB-1. Ce consortium microbien anaérobie KB-1 a été breveté par la société SIREM, Guelph (Canada). Cet enrichissement contient des bactéries qui peuvent utiliser le chlorure de vinyle comme accepteur d'électrons. Ce consortium a été utilisé avec succès dans de nombreuses études de bioaugmentation sur le terrain (Duhamel *et al.*, 2004 ; Voci *et al.*, 2004 ; Grostern et Edwards, 2006).

Un autre essai de bioaugmentation sur pilote pour la remédiation *in situ* du tétrachlorure de carbone dans des eaux souterraines en conditions dénitrifiantes a été réalisée en utilisant *Pseudomonas stutzeri* KC à partir d'une culture aérobie isolée sur site (Dybas *et al.*, 1995). Les concentrations en CT (mesure du ¹⁴C) diminuent de 65% dans les eaux souterraines en fin de traitement.

Avec une meilleure compréhension de la microbiologie de la biodégradation des solvants chlorés et l'achèvement de plusieurs grands programmes de suivi sur le terrain, plusieurs inoculum microbiens ont été isolés et commercialisés pour traiter les composés chlorés (cf. chapitre suivant). Plusieurs facteurs vont influencer l'efficacité des souches introduites dans les eaux souterraines pour la bioaugmentation. Il s'agit notamment de : l'exposition à l'oxygène, la compétition pour les donneurs d'électrons, le type et la concentration du donneur d'électrons utilisé, la température et le pH, la concentration en solvants chlorés, et la présence d'autres solvants chlorés (ESTCP, 2005).

CAS D'UN PESTICIDE : L'ATRAZINE

Les matières organiques comme les pesticides peuvent être éliminés par voie biologique : ils sont utilisés comme source d'azote ou de carbone selon le pesticide et les micro-organismes.

De nombreux micro-organismes (bactéries et moisissures), utilisés en cultures pures ou en consortium, ont été isolés à partir de milieux pollués, et testés pour leur capacité à métaboliser l'atrazine. Pour certains d'entre eux, l'atrazine est métabolisée en tant que seule source de carbone (Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994) ; pour d'autres, l'atrazine est une source d'azote (Mandelbaum *et al.*, 1995).

Plusieurs études ont été conduites dans le but de comprendre le mécanisme de dégradation de l'atrazine, d'isoler des souches bactériennes ayant un potentiel de dégradation/minéralisation de l'atrazine et de trouver les conditions optimales de dégradation de ce pesticide (tableau 2). Peu d'études, par contre, se sont intéressées à l'effet de ce produit dans les systèmes existants de bio-traitement des effluents.

L'exemple de la dégradation de l'atrazine montre que les mécanismes de dégradation par les micro-organismes peuvent être variés (Hartmann, 2004). La dégradation peut être réalisée par voie oxydative ou par hydrolyse, par des bactéries ou des champignons. Les métabolites finaux peuvent être très différents. Dans l'environnement, il est probable que seuls des consortiums microbiens soient capables de réaliser la dégradation complète de la molécule. Parmi les bactéries dégradant l'atrazine, une diversité taxonomique importante existe. Les gènes de dégradation par hydrolyse (atz ABCDEF) sont cependant très conservés en terme de séquence nucléotidique.

Tableau 2. Travaux portant sur la biodégradation de l'atrazine

Conditions opératoires/ micro-organisme	Résultats			Remarques	Références
	[atrazine] _{initiale}	[atrazine] _{finale} ou % dégradation	Temps		
Culture mixte/anaérobie	1 mg/l	40%	5 jours	Mode séquentiel des opérations/ dextrose comme source de C externe	Ghosh P.K., <i>et al.</i> , 2001
	1 mg/l	61,8%	34 jours		
	1 mg/l	42%	150 jours		
Aérobic/culture pure/ <i>Pseudomonas</i>	Large gamme	+ de 99,9%	3 semaines	Combinaison variée de la conc initiale d'atrazine dans plusieurs milieux de culture et divers modes opératoires	Yanze-Kontchou C. et Gschwind N., 1994
Bactéries anaérobies	75 mg/l	40 mg/l	1 semaine	Expérimentation en tube	Jessee J.A., <i>et al.</i> , 1983
Aérobic/culture pure/ <i>Nocardia</i>	30 mg/l	60%	6 jours	-	Giardina M.C. <i>et al.</i> , 1982
Aérobic/souche <i>Pseudomonas</i> <i>Yaya6</i> sp.	6 mg/kg sol	Elimination complète	1 jour	0,3 g poids sec biomasse inoculante/kg sol	Wenk M. <i>et al.</i> , 1998
	6 mg/kg sol	Elimination complète	5 jours	0,003 g poids sec biomasse inoculante/kg sol	
Aérobic/ <i>agrobacterium</i> <i>radiobactor J14a</i>	50 mg/l	94%	72 heures		Struthers J.K. <i>et al.</i> , 1998

Les concentrations en atrazine utilisées dans la plupart des cas cités dans le tableau 2 sont beaucoup plus importantes que celles actuelles observées dans les eaux de surface et de sub-surface (0,1 à 50 µg/l) à proximité de sites de manipulation de pesticides et de sites de distribution (Ghosh et Philip, 2006).

Certaines de ces études ont été réalisées dans des réacteurs en batch en condition aérobie (Mandelbaum *et al.*, 1993 ; Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994 ; Behki *et al.*, 1993 ; Struthers *et al.*, 1998).

Toutefois, pour dégrader l'atrazine présente dans l'eau potable par process aérobie, Feakin *et al.* (1995) ont utilisé un réacteur hybride avec des cultures pures bactériennes (*Rhodococcus rhodochrous* SL1 et *Acinetobacter junii* WT1) et du charbon actif granulaire sur lit fixe. Yanze-Kontchou et Gschwind (1994) ont utilisé un autre type de réacteur (batch séquentiel) pour traiter une eau polluée par de l'atrazine, en utilisant la bactérie *Pseudomonas* YAYA6, isolée à partir d'une communauté microbienne.

L'inoculation de micro-organismes (ou bioaugmentation) pour dégrader l'atrazine dans les eaux est intéressante mais peu utilisée. L'utilisation d'enzymes produites à partir de souches recombinantes a également été testée pour décontaminer dans des expérimentations *ex situ*. L'utilisation d'éléments cataboliques mobiles pour réaliser une bioaugmentation est une idée intéressante. Le principe est de disséminer les gènes cataboliques dans les populations microbiennes indigènes à partir d'une souche donneuse introduite dans le sol (Top *et al.*, 2003). Mais des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer l'efficacité et l'innocuité pour l'environnement de ces techniques.

CAS DES HYDROCARBURES

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés dont les plus lourds restent relativement réfractaires à la dégradation biologique. Au cours des trente dernières années, les recherches sur la dégradation des HAP ont permis l'isolement de nombreuses espèces de bactéries, de champignons et d'algues capables de dégrader les HAP de petit poids moléculaire (2 à 3 cycles benzéniques). Les HAP les plus lourds sont généralement récalcitrants à l'attaque microbienne, quelques champignons et algues sont capables de les transformer. A l'heure actuelle, quelques bactéries ont été isolées ayant la capacité à dégrader les HAP de 4 cycles comme unique source de carbone et d'énergie.

Les dégradeurs d'hydrocarbures représentent environ 1% de la population microbienne totale dans l'environnement mais, les influx d'hydrocarbures provoquent une croissance de cette catégorie d'environ 10% (Ranjan Basu, 2005). Fritsche et Hofrichter (2000) ont listé les bactéries prédominantes appartenant à un large spectre de genres et d'espèces (tableau 3).

Bactéries gram \ominus	Bactéries gram \oplus
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Nocardia sp.</i>
<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>
<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>
<i>Flavobacterium / groupe Cytophage</i>	<i>Arthrobacter sp.</i>
<i>Xanthomonas sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>

Tableau 3. Principales genres bactériens aérobies participant à la dégradation des HAP

Des bactéries indigènes utilisant les hydrocarbures ont été testées avec succès dans la bioremédiation des rivages en Alaska après la contamination pétrolière lors de l'accident de l'Exxon Valdez en 1989 avec ajout au préalable d'azote et de phosphore. L'introduction de nutriments et d'oxygène dans les aquifères de surface contaminés est une procédure fréquente dans les traitements de bioremédiation *in situ* (Okoh et Trejo-Hernandez, 2006). En effet, les trois facteurs requis pour l'activité optimale des micro-organismes sont l'azote, le phosphore et l'oxygène, qui peuvent limiter les activités de la microflore indigène.

La bioaugmentation est dépendante de la complexité de structure des hydrocarbures et de la capacité (e.g. activité enzymatique extracellulaire) des micro-organismes à les dégrader. Beaucoup de souches de dégradeurs d'hydrocarbures sont disponibles notamment celles appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, Flavobactéries (Ilori *et al.*, 2006). Ces souches peuvent s'adapter à des environnements naturels et artificiels à condition qu'il y ait une concentration adéquate en substrat, nutriments et oxygène pour leur métabolisme. Cependant, il a été montré que les souches seules sont souvent insuffisantes pour dégrader certains polluants ; la catabolisme complet nécessite un consortium composé d'au moins 2 taxons (Hubert *et al.*, 1999 ; Zhuang *et al.*, 2003).

Compte tenu des informations citées précédemment, l'addition de bactéries capables de recycler les polymères organiques par production d'enzymes extracellulaires est possible. Vasileva-Tonkova et Galabova (2003) ont proposé une approche alternative de biotraitement d'effluents issus d'une centrale électrique par bioaugmentation des eaux usées contaminées par des hydrocarbures et des polymères organiques conducteurs en utilisant une culture mixte de bactéries indigènes combinant des producteurs de glycolipides et des enzymes hydrolytiques.

L'industrie pétrolière utilise des bactéries pour pallier le problème de la pollution créée par les déversements et les fuites souterraines et pour traiter les déchets occasionnés par la production pétrolière. Les eaux usées renfermant des hydrocarbures dissous constituent la majeure partie des déchets rejetés par l'industrie pétrolière et gazière. Le traitement de ces eaux usées peut être réalisé dans des lagunes de biorestoration (des bassins fermés renfermant des bactéries de décomposition de produits pétroliers) avant rejet dans l'environnement. Cependant, ce processus est très lent.

Pour restaurer les eaux usées plus rapidement et efficacement, des chercheurs de l'université de Saskatchewan ont inventé un réacteur qui fonctionne à l'aide de bactéries biodégradant les produits pétroliers. Ce réacteur, qui utilise des bactéries de l'espèce *Pseudomonas putida*, consiste en une structure tubulaire renfermant un film bactérien qui filtre les eaux usées (Riess, 2006).

Les champignons filamenteux sont également connus pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures. Dos santos *et al.* (2008) ont évalué les taux de croissance de diverses espèces en utilisant divers dérivés pétroliers comme seule source de carbone, dans le but de sélectionner les souches adaptées à une utilisation future dans des procédés de bioaugmentation. Quatre souches ont été isolées de sites contaminés au Brésil et appartenant toutes au genre *Aspergillus* (nommés *Aspergillus* sp. LEBM1, LEBM2, LEBM3 et LEBM4). Déjà, en 2004, Chaillan *et al.* avaient montré que les genres *Aspergillus* et *Penicillium* étaient les plus fréquents sur des sites tropicaux contaminés par des hydrocarbures.

CAS DES METAUX LOURDS

Bien que les micro-organismes ne puissent dégrader les métaux, ils vont en modifier les propriétés chimiques *via* divers mécanismes d'interactions (figure 1) tels que la biosorption, la biolixiviation, les systèmes enzymatiques microbiens et la biominéralisation. Dans de nombreux cas, ces procédés impliquent des voies biochimiques spécifiques qui peuvent évoluer pour protéger la cellule microbienne des métaux toxiques. Ainsi, les micro-organismes vont affecter la réactivité et la mobilité des métaux : ces micro-organismes peuvent être utilisés dans le traitement de dépollution de certains métaux et empêcher la propagation de certaines contaminations.

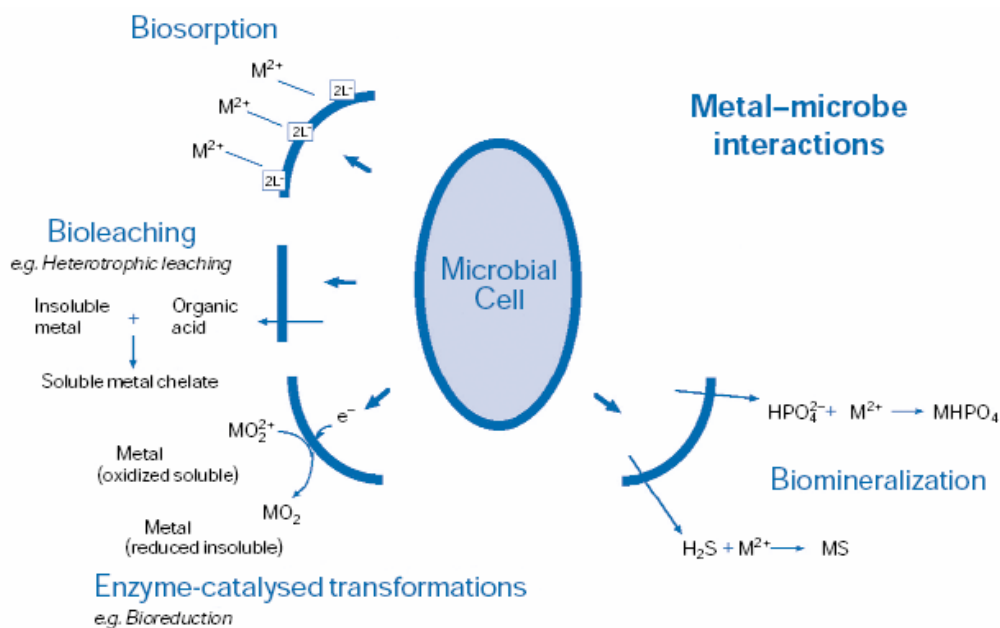


Figure 1. Mécanismes des interactions micro-organisme-métal pouvant être utilisés dans les applications de bioremédiation (adapté de Lloyd, 2002)

Les objectifs des stratégies de bioremédiation des composés métalliques sont basés sur l'utilisation de bactéries pour en modifier les propriétés physiques et chimiques (WS Atkins, 2002).

1. Transformation du métal en une forme non toxique (en réduisant la solubilité du polluant par biotransformation, sa biodisponibilité est réduite de même que le niveau d'exposition à ce composé)
 - o soit par voie enzymatique. L'un des exemples les plus connus est la réduction du mercure par la mercure réductase.
 - o soit par l'action d'un produit du métabolisme énergétique de la cellule (la réduction du sélénium par les produits soufrés tel que le thiosulfate ou les sulfites);

Les stratégies de *biotransformation* incluent par exemple l'utilisation de bactéries sulfato-réductrices pour précipiter les espèces métalliques solubles de la solution. Dans ce processus respiratoire anaérobie, le sulfate est utilisé comme accepteur terminal d'électrons lors de l'oxydation de l'hydrogène ou de composés organiques réduits tels que l'acétate et le propionate pour aboutir à la précipitation d'ions métalliques en sulfures métalliques, afin de dépolluer des effluents tels que des effluents miniers ou des eaux usées. Des bactéries autotrophes telles que les genres *Thiobacillus* sont capables de générer des quantités significatives d'acide sulfurique lixiviant le métal à partir de l'oxydation de l'élément soufre. Bang *et al.* (2000) ont utilisé ce procédé en modifiant génétiquement *E. coli* DH5a afin d'exprimer le gène encodant l'enzyme thiosulfate réductase pour produire de l'acide sulfurique à partir de thiosulfate.

2. Précipitation des ions métalliques à la surface de la cellule (*bioprécipitation*) et séquestration des ions métalliques et/ou la bioaccumulation du métal à l'intérieur du micro-organisme (*biosorption*). La stratégie utilisée dépend des caractéristiques du polluant et du niveau et lieu de contamination du site cible.

Quand les métaux sont en solution, la voie la plus simple pour les éliminer est la *biosorption*, qui peut être définie comme l'association des métaux sous forme soluble à la surface de la bactérie (par interaction avec des molécules sécrétées par le micro-organisme). La surface cellulaire est chargée négativement à pH neutre du fait de la présence de groupements carboxyle, amine, hydroxyle, phosphate, et sulfhydrique, et peuvent adsorber des quantités appréciables de métaux cationiques chargés positivement. Les avantages de ce type d'interaction micro-organisme-métal incluent de faibles coûts et des cinétiques très rapides couplées avec des capacités hautes d'adsorption.

Les stratégies basées sur la *biosorption* et la *bioprécipitation* sont les plus susceptibles d'être appliquées dans les procédés *ex situ*. Bien que les micro-organismes capables d'accumuler ou précipiter les composés métalliques puissent être ajoutés au site contaminé pour localiser le polluant *in situ*, le polluant restera sur le site, et des mesures seront encore nécessaires pour supprimer le complexe polluant/micro-organisme (WS Atkins, 2002).

En plus de la réduction hautement spécifique (= voie de détoxification du métal), certaines bactéries sont capables d'utiliser les métaux à valence importante comme accepteurs d'électrons pour la croissance anaérobie (Lowe *et al.*, 2003 ; Francis et Dodge, 1988). Les métaux pouvant être réduits de cette manière incluent Fe(III), Mn(IV), U(VI), Cr(VI), Se(VI), Hg(II) et l'As(V) (Silver et Phung, 2005 ; Robinson et Tuovinen, 1984 ; Suzuki *et al.*, 1992)

• BIOSORPTION

Divers travaux précisent que la biosorption semble être adaptée au traitement des métaux lourds présents dans les eaux contaminées. En effet, c'est une méthode biologique pouvant servir d'alternative aux procédés conventionnels de traitement des eaux polluées. Les étapes les plus importantes dans ce procédé sont le choix de la biomasse pour la biosorption du métal et celle de la matrice d'immobilisation. La biomasse peut provenir (Vieira et Volesky, 2000) :

- (a) de déchets industriels (e.g. industrie agro-alimentaire)
- (b) d'organismes facilement disponibles dans l'environnement en quantité importante
- (c) d'organismes à croissance rapide, cultivés spécialement ou propagés à des fins de biosorption.

Alluri *et al.* (2007) ont listé des exemples de métaux adsorbés par les micro-organismes ainsi que les matrices servant à immobiliser la biomasse avant application (tableau 4).

Matrice d'immobilisation de la biomasse	Types de biomasse	Métal adsorbé
Alginate de calcium	<i>Chryseomonas luteola</i> <i>Bacillus cereus</i>	Cu, Ni Pb
Polyuréthane	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Aspergillus terreus</i>	Ur Cu Pb, Cu, Cd Fe, Cr, Ni
Silice	<i>Aspergillus niger</i>	Cr, Cu, Zn, Cd
Polyacrylamide	<i>Citrobacter</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i>	Ur, Cd, Pb Au

Tableau 4. Diverses matrices d'immobilisation utilisées dans l'adsorption des métaux par les micro-organismes

L'absorption de métaux lourds par la biomasse appropriée peut, dans certains cas, atteindre jusqu'à 50% de la biomasse en masse sèche (Vieira et Volesky, 2000).

La biosorption du plomb par *Pseudomonas aeruginosa* PU21 a été investiguée par Chang *et al.* (1997). Les résultats montrent qu'à pH 5,5 les cellules sont capables d'adsorber le plomb (110 mg/g poids sec) avec des concentrations initiales en plomb comprises entre 1 à 2 g Pb/l. L'adsorption est optimale au début de la phase stationnaire. En ajustant le pH à 2,0, la biomasse microbienne supprime 98% du plomb présent. De même, Niu *et al.* (1993) ont étudié l'élimination du plomb dans une solution aqueuse (5 à 1000 mg/l) par adsorption de *Penicillium chrysogenum* et ont montré que la biosorption était affectée par le pH. Dans des pH oscillant entre 4 et 5, la saturation de la sorption atteint 116 mg/g de biomasse sèche. Cette souche a été appliquée pour le traitement d'eaux usées industrielles dans lesquelles la concentration en plomb a été réduite à des concentrations inférieures à 1 mg/L, après traitement.

De même, Merroun *et al.* (1998) ont estimé la biosorption du plomb par *Myxococcus xanthus* qui peut accumuler plus de 1,28 mmol de Pb / g en poids sec. La gamme de concentration testée est comprise entre 0,05 et 2 mM, à pH 5.5. En utilisant, le citrate de sodium comme agent désorbant, 92,17 % du plomb biosorbé qui peut être récupéré.

Mihova et Godjevargova (2001) ont étudié la sorption des ions Cu^{2+} par 4 souches microbiennes : *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Saccharomycopsis lypolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*. Les capacités d'adsorption les plus importantes ont été observées pour la levure *S. lypolytica* (3,5 mg/g) et le champignon *P. chrysosporium* (2,5 mg/g). L'effet du type de métal sur le procédé de sorption a également été étudié et l'ordre suivant de sorption a été observé pour les deux types de cellules : $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$.

Des études ont été réalisées en réacteurs incluant l'utilisation de fibres creuses en microfiltration et utilisant *Pseudomonas aeruginosa* pour la biosorption du Pb, Cu, et Cd en système unique ou ternaire. Les résultats montrent que les rendements d'élimination sont plus importants pour le Pb et plus faible pour le Cd avec une concentration de métaux influents de 200 μM et un débit de 350 ml / h (Chang et Chen, 1999).

D'un point de vue pratique, le développement commercial de la biosorption semble avoir largement ralenti ces dernières années et il n'y a pas d'adoption de cette technique en tant que traitement viable à ce jour au niveau industriel. Le manque de spécificité et la faible robustesse des systèmes basés sur la biomasse sont les limites de cette technique par rapport à d'autres procédés physico-chimiques comme les résines échangeuses d'ions. Le constat, à l'heure actuelle, tend à montrer que les faiblesses méthodologiques de ce bioprocédé ainsi que la réticence des industriels à adopter et à développer cette technologie est un frein à la poursuite des activités de recherche dans ce domaine. Ceci contraste peut-être avec une perspective biogéochimique où la sorption des métaux par les micro-organismes contribue à une compréhension du cycle des métaux dans l'environnement.

• BIOPRECIPITATION REDUCTRICE

Environ 45% des sites contaminés sont traités pour des problèmes de pollutions métalliques (Diels *et al.*, 2005). La réduction du métal à un état redox plus bas peut influencer sa mobilité et sa toxicité, ce qui permet des applications potentielles en bioremédiation. De tels processus peuvent accompagner d'autres mécanismes indirects de précipitation réductrice, par exemple, les systèmes bactériens sulfato-réducteurs où la réduction du Cr(VI) peut être un résultat de la réduction indirecte par le Fe^{2+} et par la production de sulfure. La réduction aérobie ou anaérobie du Cr(VI) en Cr(III) est connue chez les micro-organismes et a été largement documentée pour les systèmes *ex situ* en réacteurs et dans les approches *in situ*.

En conditions aérobies, l'enzyme ChrR (codée par le gène *chrR*) de *Pseudomonas putida* MK1 catalyse la combinaison du transfert de un ou deux électrons vers Cr^{6+} avec la formation d'un intermédiaire Cr(V). L'opéron YieF de *E. coli* qui possède une forte homologie avec l'enzyme ChrR médiate le transfert de 4 électrons pour la réduction directe du Cr^{6+} en Cr^{3+} .

En conditions anaérobies, les enzymes impliquées dans la réduction du Cr^{6+} sont présentées dans la figure 2, SR et MR indiquent les réductases solubles et associées à la membrane cellulaire, respectivement.

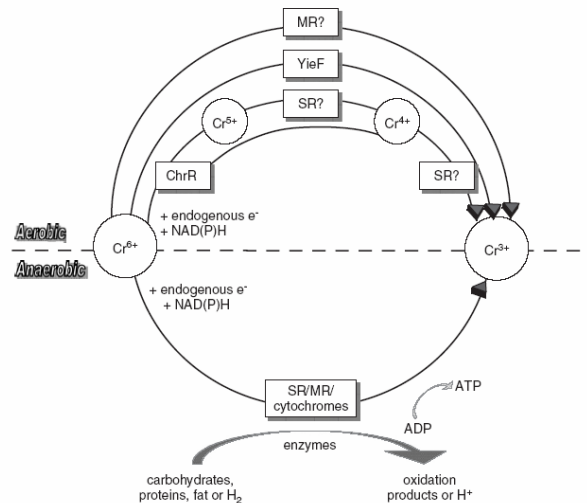


Figure 2. Mécanismes de réduction enzymatique du Cr⁶⁺ en conditions aérobie et anaérobie (d'après Cheung et Gu, 2006)

Le programme européen "Metalbioréduction" (<http://metalbio-reduction.brgm.fr/>) a montré que la souche *Desulfomicrobium norvegicum* est particulièrement efficace pour réduire le Cr(VI). La réduction directe de métaux et métalloïdes a été testée à partir de bio-réacteurs pour des eaux souterraines. Les expérimentations ont portées sur le Cr(VI) et l'U(VI). La réduction enzymatique a été observée en évaluant l'élimination du SO₄²⁻ et H₂S dans le milieu. En absence de SO₄²⁻, les bactéries sont inhibées et le procédé de réduction décline. Les expériences ont été réalisées dans des réacteurs de 2 litres pour des effluents contenant plus de 100 mg/L Cr(VI) en apportant 250 mg/l SO₄²⁻. Le gène encodant le cytochrome *c7* de *Desulfuromonas acetooxidans* a été cloné et exprimé chez *Desulfovibrio desulfuricans*, l'organisme recombinant montre l'induction de l'expression des activités métal réductase. Une telle surproduction de cytochrome *c7* actif pourrait être importante dans des réacteurs enzymatique fixes ou dans la production d'organismes avec des activités réductases induites dans le cadre de bioremédiation (Aubert *et al.*, 1998).

L'immobilisation des micro-organismes dans les systèmes de traitement peut augmenter la biomasse et, par conséquent, le taux de transformation des métaux. Par exemple, l'immobilisation de cellules dans un film en agarose-alginate renforce la réduction du Cr⁶⁺ par *Ps. aeruginosa* A2Chr (Ganguli et Tripathi, 2002).

Des problèmes peuvent subvenir avec la toxicité du Cr(VI) ainsi que la maintenance des systèmes anaérobies pour les réducteurs anaérobies de Cr(VI). Cependant, plusieurs réducteurs de Cr(VI) aérobie et anaérobies sont connus pour pouvoir utiliser des contaminants organiques comme donneurs d'électrons, soulignant le potentiel de traitement *in situ* des mélanges de déchets (Gadd, 2000).

- **BIOPRECIPITATION INDIRECTE**

Un autre mode de précipitation inclut comme ligand le phosphate inorganique généré par les micro-organismes présents. Le métal est alors précipité en phosphate de métal hautement insoluble (Seetharam *et al.*, 2005).

Les polyphosphates dans les vacuoles de levure, de champignons et d'algues, et dans les granules de bactéries sont souvent associés avec des composés à charge positive, de faible poids moléculaire (acides aminés et cations divalents). Les cations les plus souvent associés sont Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺... Toutefois, les métaux lourds peuvent également se retrouver dans les granules de certaines bactéries (Keasling *et al.*, 1999), ou dans les vacuoles de *Saccharomyces cerevisiae* contenant les polyphosphates.

Citrobacter sp. a été utilisé dans le traitement de déchets industriels chargés en métaux (Jeong *et al.*, 1997) : l'absorption du métal est médiée via une phosphatase cellulaire qui libère du phosphate inorganique se liant aux métaux et aboutissant à une précipitation. Une autre étude a permis d'isoler

une souche d'*Acinetobacter* (*A. johnsonii* M45) à partir d'une station d'épuration d'eaux usées utilisant un process biologique de suppression du phosphate. Les polyphosphates sont dégradés en conditions anaérobies en présence de cadmium ou UO_2^{2+} , en produisant des ions phosphate libres. Le cadmium pénètre la bactérie et va alors s'associer avec les granules intracellulaires contenant les phosphates (Boswell *et al.*, 1999).

Une autre voie est mise en avant dans les travaux tirés de la littérature :

3. La mobilisation du metal par lixiviation

Le lessivage des minerais par les bactéries sulfato-oxydantes acidophiles est un procédé créé par la bioindustrie et découlant d'une perspective hydrométallurgique.

En fait, le biolessivage utilisant l'élément soufre comme substrat peut être plus performant que le traitement à l'acide sulfurique pour la solubilisation des métaux issus de sédiments aquatiques pollués (Bijmans, 2008). Par exemple, les bactéries sulfato et ferro oxydantes, *Thiobacillus thiooxidans* et *ferrooxidans*, respectivement, sont capables de lessiver plus de 50% des métaux comme As, Cd, Co, Cu, Ni, V, Zn, B et Be (Gadd, 2000) à des concentrations allant du mg au g / kg sol.

Les micro-organismes jouent un rôle important dans le traitement des métaux et métalloïdes en effectuant des transformations entre les phases solubles et insolubles. Bien que le potentiel biotechnologique de la plupart des process microbiens n'a été étudié qu'en conditions contrôlées de laboratoire, certains mécanismes notamment la biolixiviation, la biosorption et précipitation, ont été utilisés *in situ* et *ex situ* et, ont été commercialisés dans le cadre de procédure de réhabilitation et de biotraitement. La technique de biosorption, notamment dans le cadre du traitement des eaux contaminées, a donné lieu à plusieurs tentatives de commercialisation mais son succès a été limité principalement par la concurrence avec les procédés d'échange ionique (adsorbant par affinité les divers métaux présents) utilisés pour le traitement de l'eau. La précipitation des métaux *via* la formation de sulfures par les bactéries sulfato-réductrices (Jang *et al.*, 2008 ; Geets *et al.*, 2005) reste la technique biologique la plus appliquée à grande échelle pour le traitement des matrices liquides contaminées (par bioréacteurs, barrières réactives, zones humides construites) et, offre plusieurs perspectives de développement commercial.

3.5/ Bioaugmentation et traitement des matrices liquides : points à retenir

Dans le domaine des biotechnologies et de la pharmacologie, les bactéries ou champignons génétiquement modifiés ou non sont largement utilisés dans la production d'acide citrique, d'acide gluconique, d'ascorbate, et des produits pharmaceutiques tels que la pénicilline, l'insuline, et les facteurs de coagulation du sang. Les bactéries et les champignons ont également été adaptés ou génétiquement transformés pour l'assainissement des sols (que nous traiterons dans le chapitre suivant).

Les micro-organismes peuvent également être utilisés par les industries de ressources naturelles telles que l'industrie forestière, les mines et l'énergie. L'industrie pétrolière utilise des bactéries pour traiter la pollution créée par les déversements et les fuites souterraines et pour nettoyer les déchets occasionnés par la production pétrolière. Les eaux usées renfermant des hydrocarbures dissous constituent la majeure partie des déchets rejetés par l'industrie pétrolière et gazière. Certains composants des hydrocarbures sont très toxiques et ne se dégradent pas naturellement. Parfois ces eaux usées sont traitées dans des lagunes de biorestauration avant rejet dans l'environnement. Cependant, ce processus est très lent. Pour restaurer les eaux usées plus rapidement et efficacement, des réacteurs fonctionnant à l'aide de bactéries de décomposition de produits pétroliers peuvent être utilisés. Par exemple les bactéries du genre *Pseudomonas*, sont utilisées dans des bioréacteurs consistant en une structure tubulaire renfermant un film bactérien qui filtre les eaux usées (cf. paragraphe sur les hydrocarbures).

Pour les eaux usées, toutefois, la bioaugmentation réussie à partir de micro-organismes génétiquement modifiés ou de bactéries qui peuvent servir de donneurs de plasmides codant pour les enzymes de dégradation a été peu étudiée (van Limbergen et al., 1998). Habituellement, la sélection naturelle des micro-organismes les plus appropriés à partir d'une microflore complexe est utilisée, simplement par adaptation des paramètres du procédé.

Les eaux usées contiennent normalement un éventail complexe de sources de carbone plus facilement assimilables que les xénobiotiques conduisant ainsi à une non expression des gènes de dégradation des xénobiotiques.

Pour augmenter le potentiel de survie des bactéries inoculées dans les eaux usées, une flore sélectionnée doit avoir la capacité de dégradation souhaitée, une certaine tolérance vis à vis des co-contaminants, et une abondance spatiale et temporelle naturelle (van der Gast *et al.*, 2003).

Une autre possibilité serait d'ajouter des organismes contenant des plasmides provenant d'une large gamme d'hôtes, permettant la conjugaison et l'échange d'ADN avec les différentes espèces ou les genres de bactéries présentes dans la matrice à traiter.

Pour renforcer la dégradation des composés organiques et inorganiques, les bactéries spécialisées sélectionnées, les bactéries génétiquement modifiées, ou les bactéries utilisées comme donneurs de plasmide pour les voies de dégradation peuvent être ajoutées. Les échanges de plasmides des cellules donneuses vers les cellules receveuses permettraient à la bactérie receveuse, d'exprimer des gènes impliqués dans les voies de dégradation des xénobiotiques, élargissant ainsi la gamme de substrats des bénéficiaires.

La dégradation de nombreux xénobiotiques en condition aérobie ou anaérobie par des cultures pures ou dans des écosystèmes complexes a été démontrée. Pour « l'assainissement intrinsèque » des sols pollués, le facteur temps n'est pas limitant, tant que les polluants restent adsorbés à la matrice sol. En revanche, la dégradation des xénobiotiques dans les eaux usées doit être achevée durant le temps de résidence dans le système de traitement. Ainsi, le simple fait de la présence d'une dégradation potentielle au sein d'un système d'eaux usées n'est pas suffisante. L'ajout de micro-organismes comme un outil potentiel pour augmenter la vitesse de dégradation ou accroître le potentiel de dégradation dans les eaux usées ne peut être encore considéré comme une procédure agréée.

Diverses remarques relatives à l'utilisation de la bioaugmentation dans le traitement des matrices liquides peuvent être formulées : Elle est généralement utilisée avec succès sur des polluants retirés de leur site d'origine, comme par exemple dans des installations municipales de traitement des eaux usées. Malgré ces succès, l'inoculation et la propagation de micro-organismes introduits dans les eaux souterraines ou de surface contaminées, est mal perçue. Jusqu'à présent, cette méthode a été freinée, en raison de la difficulté de contrôler les conditions pour optimiser la croissance des micro-organismes introduits.

Ainsi, comme tous les mécanismes de la biorestauration ne peuvent être maîtrisés, les organismes introduits dans un environnement étranger ont parfois de la difficulté à persister en raison des multiples conditions externes qui vont influencer leur survie.

Les micro-organismes peuvent dégrader de nombreux polluants en raison de la diversité de leur métabolisme et de leur capacité à s'adapter à des environnements inhospitaliers. De ce fait, ce sont des acteurs importants dans l'assainissement des écosystèmes. Toutefois, leur efficacité dépend de nombreux facteurs, dont la nature chimique et la concentration des polluants, leur disponibilité pour les micro-organismes, et les caractéristiques physico-chimiques dans l'environnement. La capacité d'une population microbienne à dégrader les polluants environnementaux dans le cadre d'une matrice (par exemple, les sols, les sédiments, boues ou les eaux usées) peut être renforcée soit par la stimulation des micro-organismes autochtones par l'ajout de nutriments ou d'accepteurs d'électrons (biostimulation) ou par l'introduction de certains micro-organismes à la population autochtone (bioaugmentation). Bien qu'elle ait été utilisée dans l'agriculture et dans le traitement des eaux usées depuis des années, la bioaugmentation reste encore en phase expérimentale. En effet, de nombreux facteurs (par exemple, la prédation, la concurrence ou la sorption) peuvent jouer en sa défaveur. Toutefois, plusieurs stratégies sont actuellement explorées pour favoriser la bioaugmentation dans des sites où les populations de micro-organismes participant à la biodégradation sont absentes. Malheureusement, la plupart des cas réussis de bioaugmentation se produisent dans des systèmes contrôlés dont les conditions peuvent être suivies et modifiées pour favoriser la survie et prolonger l'activité de la population microbienne exogène.

3.6/ Bioremédiation des matrices solides

REMEDICATION DES DECHETS CONTENANT DES HYDROCARBURES

L'un des problèmes majeurs face aux raffineries pétrolières est l'élimination sûre des boues pétrolières générées durant le traitement du pétrole brut. Des dispositions non préventives des boues souillées ont amené une pollution des sols et des eaux souterraines après percolation. Selon Mishra *et al.* (2001), les propriétés chimiques et physiques d'un sol sont significativement améliorées par addition d'un inoculum qui stimule *in situ* la bioremédiation des sols contaminés par les boues pétrolières.

Beaucoup de souches microbiennes, dont celles capables de dégrader un composé spécifique sont disponibles commercialement pour la bioremédiation (cf. chapitre suivant). Cependant, les boues pétrolières sont un mélange complexe d'alcane, d'aromatiques, composés contenant de l'azote, du soufre et de l'oxygène (NSO), et des fractions d'asphaltènes, c'est pourquoi une seule espèce bactérienne aura des capacités limitées à dégrader toutes les fractions des hydrocarbures présents (Mishra *et al.*, 2001).

Les bactéries indigènes du sol peuvent dégrader une partie des constituants des boues pétrolières mais, ces populations et leur efficacité sont affectées lorsqu'un polluant toxique est présent à de fortes concentrations. Comme cité dans le paragraphe 3.2.1, la réintroduction après enrichissement de micro-organismes indigènes isolés à partir de sites contaminés aide à surmonter ce problème, comme les micro-organismes peuvent dégrader les constituants et avoir une bonne tolérance à la toxicité de ces composés (MacNaughton *et al.*, 1999). Les bactéries indigènes sélectionnées sont choisies afin d'aider la bioremédiation et ont l'avantage d'être résistantes aux variations du milieu naturel.

La comparaison de performance de la technique de bioaugmentation avec d'autres techniques plus conventionnelles comme le compostage a été réalisée par Ouyang *et al.* (2005) sur des boues contaminées (concentration en hydrocarbures totaux = 327,7-371,2 g/kg ms). Les auteurs ont montré une meilleure dégradation des polluants organiques totaux par bioaugmentation après 56 jours (diminution de 46-53%) en comparaison du compostage (diminution de 31%).

D'autres auteurs (Ayotamuno *et al.*, 2007) ont comparé le traitement de boues contaminées (69,37 mg/kg hydrocarbures totaux) par bioaugmentation à partir de deux souches bactériennes, *Bacillus sp.* et *Pseudomonas*, à des taux de $1,2-3.10^{12}$ UFC/g boues. La différence de performance montre que la bioaugmentation améliore significativement la réduction d'hydrocarbures dans les boues traitées par rapport au témoin.

REMEDICATION DES SOLS CONTAMINES PAR DES COMPOSES CHLORES

- Cas du Trichloréthylène (TCE)

Les éthanes et éthènes chlorés sont communément utilisés comme des solvants de nettoyage et dans les opérations de nettoyage à sec. Parmi les agents chimiques appartenant à ces catégories, le trichloréthylène (TCE) a reçu le plus d'attention à cause de sa toxicité et de sa fréquence d'occurrence élevée. Les méthodes habituelles de remédiation du TCE sont :

- l'air stripping ;
- l'adsorption-désorption sur charbon actif ;
- les systèmes de grilles d'aération du sol (*soil venting*) ;
- les bioréacteurs de surface et ;
- la bioremédiation *in situ*.

L'air stripping, l'adsorption sur charbon actif et les bioréacteurs de surface sont utilisés spécifiquement pour les eaux contaminées. Les systèmes d'aération du sol sont utilisés pour la contamination dans des zones *vadose* (la zone non saturée dans un sol où les processus chimiques sont les plus actifs), alors que la bioremédiation *in situ* peut être utilisée pour les zones *vadose* et dans la nappe phréatique.

L'une des techniques de remédiation *in situ* pour dégrader le TCE consiste à augmenter les populations méthanotrophiques indigènes du sol (biostimulation). En effet, certains micro-organismes peuvent dégrader le TCE par cométabolisme. Dans ce cas, la métabolisation se fait au moyen d'enzymes synthétisées pour dégrader la substance primaire (Hyman *et al.*, 1995). Parmi ces micro-organismes capables de cométaboliser le TCE se trouvent les méthanotrophes, groupe de bactéries capables d'utiliser le méthane comme source de carbone et d'énergie.

Les méthanotrophes ne sont pas les seules bactéries à dégrader le TCE, les bactéries oxydant le toluène et celles oxydant le phénol peuvent également dégrader le TCE. Ces bactéries nécessitent la présence de substrats organiques tels que le toluène, le phénol et le méthane pour induire les activités de dégradation. Le méthane est moins toxique pour la santé humaine que les autres composés aromatiques. C'est pourquoi, les méthanotrophes ont reçu autant d'attention pour leur application possible dans la bioaugmentation des sols pollués et des eaux souterraines. Iwasaki *et al.* (2002) ont isolé une bactérie méthanotrophe *Methylocystis sp. M* dont l'efficacité a été testée avec succès au cours de diverses expérimentations en laboratoire et sur le terrain (Kikuchi *et al.*, 2001 ; Little *et al.*, 1988).

Les méthanotrophes sont importantes dans la bioremédiation du TCE et les techniques de traitement emploient souvent des injections de méthane pour stimuler l'activité de dégradation des méthanotrophes indigènes (Tlusty, 1999).

- Cas des Polychlorobiphényles (PCB)

L'incinération et la mise en décharge sont les deux méthodes traditionnelles pour la remédiation des sols et des sédiments contaminés par les PCB. L'incinération par haute température (1200°C) est très couramment usitée pour la destruction complète des PCB (Mikszewski, 2004). La séquestration des liquides et sols contaminés dans une décharge pour les déchets dangereux est une voie possible (US EPA, 1997). Le principal danger associé est lié à la volatilisation des PCB et la contamination par voie aérienne.

La réduction des PCB se produit par cométabolisme et est issue de la déhalorespiration ou voie anaérobie (Mikszewski, 2004). L'identification d'organismes utilisant les PCB comme accepteur terminal d'électron serait précieuse pour les avancées de la bioremédiation de ces composés. Un tel organisme pourrait utiliser les PCB pour sa croissance, ce qui serait intéressant dans le cas par exemple de sédiments contaminés. Kim et Rhee (1997) ont démontré que de tels organismes existaient dans les sédiments et indépendamment des sulfato-réducteurs et des méthanogènes. L'étude montre que les composants du consortium anaérobie qui nécessitaient la présence d'Arochlor 1248 pour croître, disparaissaient en dessous d'un seuil de concentration (< 3 molécules Cl / bi phényle) alors que les populations de sulfato-réducteurs et de méthanogènes se maintenaient en l'absence d'Arochlor.

Durant ces dernières années, deux souches ont été identifiées qui catalysent la déchloration réductrice des PCB. La première est une bactérie similaire à l'espèce *Dehalococcoides ethanogenes* nommée o-17 (Watts *et al.*, 2005), dépendant de la présence de 2,3,5,6-tetrachlorobiphényle pour croître. La seconde bactérie DF-1 est similaire à o-17 (89% séquences DNAr similaires) et a été isolée à partir d'une culture contenant principalement des sulfato-réducteurs (Mikszewski, 2004).

Bien que les PCB soient relativement résistants à la biodégradation aérobie, certains micro-organismes sont capables d'utiliser les PCB les moins chlorés comme source de carbone. Ainsi, *Acinetobacter sp. P6*, *Achromobacter sp. B 218*, *Bacillus brevis* et 257 B peuvent croître sur 4-biphényles chlorés comme seule source de carbone (Fiedler, 1997). En général, la formation d'acides benzoïques chlorés est la principale voie de dégradation des PCB. D'autres micro-organismes capables de la biodégradation des PCB appartiennent au genres *Acetobacter*, *Alcaligenes*, et *Pseudomonas*.

Les études *in situ* notamment issu du laboratoire d'Oak Ridge (USA) ont montré qu'une combinaison associant une biodégradation anaérobie suivie par une biodégradation aérobie étaient efficaces afin de maximiser la consommation de ces composés récalcitrants (Klasson *et al.*, 1994). Parce que les bactéries aérobies sont seulement capables de dégrader les PCB les moins chlorés (1-4 chlore par biphényle), il est important que les micro-organismes anaérobies présentent un taux de croissance élevé, en transformant les PCB les plus chlorés en produits avec des radicaux chlore moindre.

Les auteurs ont ainsi montré une disparition de 70% des PCB présents (40 ppm PCB sur sol sec en début d'étude, rassemblant les deux Arochlor 1248 et 1254).

Plusieurs facteurs vont cependant influencer la croissance de ces bactéries comme la structure chimique et la composition des déchets contenant des PCB, la concentration initiale, la solubilité des PCB dans les matrices, et les conditions environnementales (température, pH, salinité, potentiel d'oxydoréduction, la disponibilité du carbone, la présence de co-contaminants).

3.7/ Bioaugmentation et matrices solides : points à retenir

Le débat sur l'efficacité de la technique de bioaugmentation reste d'actualité : le succès de cette technique pour la remédiation des sols reste difficile à prédire. La diversité des micro-organismes utilisés, l'hétérogénéité de l'environnement et les variations du milieu vont influencer les paramètres critiques comme l'humidité, la prédation microbienne et la biodisponibilité. Il est cependant important de souligner la capacité d'adaptation des micro-organismes en fonction des conditions externes et qui vont influencer la biodégradation.

Le type de sol à traiter est à considérer lorsqu'il s'agit de déterminer l'approche la plus adaptée à une situation particulière. La texture du sol, qui détermine la perméabilité à l'air et l'eau, affecte directement la capacité à dégrader des micro-organismes. Des textures fines comme les sols argileux ont une faible perméabilité, ce qui empêche l'oxygène et les nutriments de se disperser à travers le sol. Les sols à texture fine sont lents à drainer, ce qui empêche l'oxygène d'atteindre les micro-organismes du sol dans l'ensemble de la zone contaminée.

La flore naturelle des sols n'a pas forcément la capacité métabolique à dégrader les composés ou certaines classes de composés ou à émulsionner les composés insolubles dans l'eau. D'autre part, les micro-organismes présents peuvent avoir la capacité mais pas la densité nécessaire pour dégrader les composés assez rapidement pour répondre aux critères de traitement. Quand un site contaminé nécessite un traitement immédiat ou quand les bactéries indigènes sur le site sont insuffisantes en nombre ou que leur capacité à dégrader les polluants concernés est inexistante, il peut être nécessaire d'ajouter des micro-organismes de manière à pallier à ces problèmes.

Beaucoup de progrès ont eu lieu au cours des dernières années se traduisant par l'amélioration de l'assainissement des polluants présents dans des sites contaminés. La bioaugmentation reste une technique de plus en plus utilisée, mais d'autres méthodes comme le recours à des micro-organismes immobilisés ou l'enrichissement direct pourraient augmenter le taux de succès de cette approche. En outre, plusieurs autres approches de bioaugmentation, y compris la bioaugmentation par transfert de gène (plasmide), la bioaugmentation rhizosphérique, et la phytoaugmentation, sont actuellement au stade de développement, et pourraient élargir considérablement l'éventail d'applications de cette technique.

Pour qu'un inoculum ou toute autre forme impliquée dans la technique de bioaugmentation soient efficaces les organismes, qu'ils soient génétiquement modifiés ou non, doivent parvenir au contaminant. Cet objectif peut être atteint lors de travaux d'excavation et de mélange avec l'inoculum, mais aussi par la propagation par exemple lors de la colonisation racinaire des plantes présentes sur le site.

La biodégradation des polluants dans la rhizosphère, zone de sol influencée par la présence des racines, serait liée à une augmentation du nombre des microorganismes et de leur activité, stimulée par les exsudats racinaires, qui favorise la dégradation directe des polluants organiques comme les HAPs ou indirecte par co-métabolisme. La rhizosphère favoriserait aussi la biodégradation en sélectionnant des communautés spécifiques impliquées dans la biodégradation, en libérant des exsudats pouvant favoriser le co-métabolisme (dégradation d'un polluant qui n'est pas utilisé comme source de carbone), en adsorbant des polluants sur les racines augmentant ainsi leur biodisponibilité. Pour d'autres polluants organiques, une éventuelle absorption par les racines et translocation peut se produire, toutefois ce n'est pas le cas des HAP. La modification de la structure physique et chimique du sol dans la rhizosphère pourrait aussi modifier la disponibilité des polluants présents.

Les microorganismes de la rhizosphère impliqués dans la biodégradation peuvent être des bactéries, des champignons libres, mais aussi des microorganismes associés en symbiose étroite avec les racines, qui stimulent la croissance des plantes en améliorant leur nutrition minérale (mycorhizes). Ainsi, l'association des racines des plantes avec des champignons mycorhiziens conduit à augmenter la biodégradation des polluants dans la rhizosphère, ce qui serait lié à une modification des communautés microbiennes en présence de mycorhizes.

Les micro-organismes qui ont été génétiquement modifiés pour stimuler leur potentiel de remédiation peuvent également être applicables en bioaugmentation. Globalement, ces nouvelles approches semblent avoir un grand potentiel, mais la continuité des travaux de recherche est nécessaire, en

particulier à l'échelle du terrain, afin de tester et d'affiner le développement de technologies avant une application généralisée sur une base commerciale.

En outre, certains auteurs comme Gentry *et al.* (2004) restent réticents au recours aux OGM compte tenu des risques encore inconnus résultant de l'inévitable transfert de gènes des micro-organismes génétiquement modifiés vers les organismes de l'environnement. Ainsi, ils préconisent d'utiliser une méthode approuvée de bioaugmentation sans souche génétiquement modifiée, à condition qu'elle soit adaptée à l'objectif spécifique du site.

L'avantage des techniques biologiques de traitement dont la bioaugmentation reste le maintien des propriétés physicochimiques, voire biologiques des sols. Ces techniques se sont largement développées ces dernières années, car elles sont efficaces, peu coûteuses, et s'adressent à un grand nombre de polluants organiques ou non, même si le traitement est souvent plus long que par les techniques conventionnelles, et ne peut s'appliquer qu'à des concentrations modérées en polluants.

4/ Les consortiums commercialisés

4.1/ Généralités

Depuis les années 1980, l'acceptation croissante de la bioremédiation pour traiter les hydrocarbures pétroliers et les déchets industriels a conduit à une augmentation des inoculums microbiens commercialisés pour la bioremédiation des eaux souterraines et des sols contaminés. Bien que certains soient brevetés et d'autres non caractérisés, la grande majorité de ces consortiums sont composés de micro-organismes communs des sols (par exemple plusieurs genres comme *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Phanaerochaetes*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Thiobacillus*, *Arthrobacter* et *Flavobacterium*) s'étant développés en conditions aérobies.

La recherche de documentation a permis d'identifier deux publications pertinentes listant des sociétés commercialisant des produits de bioaugmentation :

- Du fait de la mise en œuvre plus fréquentes des techniques ayant recours aux micro-organismes pour traiter les polluants présents, l'ESTCP (Environmental Security Technology Certification Program) s'est intéressé et a listé une partie des inoculums commercialisés dans la technique de bioaugmentation, les sociétés étant implantées surtout aux Etats Unis (cf. tableau 5).
- Le recours à des agents de bioremédiation commercialisés pour le traitement des écosystèmes estuariens contaminés par des dérivés pétroliers a été documenté par l'US EPA dans un rapport de juillet 2004 (cf. tableau 6).

4.2/ Le traitement des solvants chlorés

Grâce à une meilleure compréhension de la biodégradation des solvants chlorés et l'aboutissement de plusieurs grands travaux *in situ* de l'applicabilité de la bioaugmentation, plusieurs sociétés de biotraitement ont vu le jour pour soutenir la pratique croissante de la bioaugmentation dans le traitement des éthènes chlorés.

À ce jour, les projets à l'échelle du terrain sur la remédiation des solvants chlorés par bioaugmentation ont nécessité l'emploi de cultures définies capables de déchloration aérobie par cométabolisme du TCE et d'autres COV chlorés. Parmi ceux-ci, l'utilisation de cultures anaérobies déhalorespirantes est l'application la plus rapide et a le plus grand potentiel sur des sites appartenant au Département de la Défense US.

Pour obtenir des données sur ces cultures de bioaugmentation, l'ESTCP a envoyé un questionnaire aux fournisseurs commerciaux et a établi un suivi avec des contacts directs. Le questionnaire a sollicité des informations relatives à plusieurs domaines clés, y compris la culture d'origine, la production de la culture et le rapport assurance qualité (QA)/ contrôle qualité (QC) ; et l'application de la culture sur le terrain (tableau 5).

- KB-1TM est une culture enrichie développée par le Dr. Elizabeth Edwards de l'Université de Toronto. Elle est actuellement commercialisée par SiREM Laboratories (www.siremlab.com). Selon SiREM, KB-1TM a été injectée en subsurface dans plus de 23 sites dans 12 états des EU (et un site au Danemark). Duhamel *et al.*, 2002, 2004 ont démontré l'efficacité d'utilisation de KB-1TM.
- La culture anaérobie nommée Pinellas est issue de travaux émanant du Département de l'Energie à Pinellas (Floride). Elle a été développée par le Dr Mark Harkness (Compagnie Générale Electrique – Centre de Développement et Recherche) et a été utilisée dans des études de bioaugmentation *in situ* à la base d'Air Force à Dover dans le Delaware (Ellis *et al.*, 2000). Terra Systems (www.terrasystems.net) a obtenu une licence pour la culture de Pinellas et l'a développé pour des applications commerciales.
- L'inoculum Bio-DechlorTM (BDI) est un consortium de détoxification des éthènes chlorés qui inclut de multiples souches *Dehalococcoides*, dont la souche BAV1, développé par le Dr Franck Löffler et commercialisé par la société Regenesys (www.regenesys.com). Regenesys a rapporté que cette culture a été utilisée dans 27 sites de 14 états.

- SDC-9 est une culture contenant *Dehalococcoides sp.* issue des travaux du laboratoire du Groupe d'Application Technologique appartenant à la société Shaw Environmental Inc. (www.shawgrp.com). Une autre culture, ENV-TCA20, a été isolée pour sa capacité à dégrader les éthanes chlorés. Cette culture apparaît comme contenant une souche *Dehalobacter* similaire à la souche TCA1 basée sur l'analyse des ARN 16s, mais il n'y a pas encore eu d'application dans le domaine (communication avec R. Steffan, Shaw).
- BC2, est un consortium commercialisé par BioAug LLC (www.bioaug.com). Des essais indépendants sur l'inoculum ont déterminé qu'il contient de fortes densités (10^{10} cellules/L) de *Dehalococcoides*. BioAug est sous contrat pour effectuer des démonstrations sur le terrain de bioaugmentation et a mis en place des cultures enrichies spécifiques à chaque traitement *in situ* des sites contenant des mélanges de COV chlorés en plus des éthènes chlorés.
- BCI (www.bcilabs.com) commercialise des consortiums (dont la souche *Dehalococcoides ethenogenes*) de bioaugmentation acclimatés dans des conditions spécifiques qui ne sont pas décrites dans la littérature. La culture a été testée par un laboratoire indépendant, et les résultats ont montré de fortes densités de *Dehalococcoides* et la présence de chlorure de vinyle réductase.

Il y a une connaissance limitée de la diversité des micro-organismes dans chacune de ces cultures. Par exemple, les études de composition de la communauté de KB-1™ indiquent que deux souches de *Dehalococcoides*, en plus d'*Acetobacteria*, *Sulfurospirillum*, *Hippea*, et une bactérie d'un sol non cultivé PBS-111-32a sont les principales espèces microbiennes (Duhamel *et al.*, 2002), bien que des espèces méthanogènes soient également présentes mais non indiquées (communication personnelle d'ESCTP avec E. Edwards, Université de Toronto). De même, BCI et Regensis rapportent que leurs cultures sont des cultures mixtes, contenant des réducteurs de sulfate et des méthanogènes ainsi que *Dehalococcoides*.

Malgré l'existence d'un certain nombre d'essais probants et d'applications à des fins commerciales, le domaine nécessite la vigilance au-delà de la simple assurance de l'efficacité du procédé. La culture à grande échelle doit :

- maintenir une densité microbienne, des performances et une composition compatibles entre elles ;
- garantir l'absence de pathogènes ou micro-organismes opportunistes ;
- utiliser des modes de livraison et des protocoles susceptibles d'empêcher l'exposition à l'oxygène ;
- et, de fournir une certaine compréhension des performances du consortium dans le cadre de l'existence d'un large éventail de conditions *in situ*.

4.3/ Le traitement des dérivés pétroliers

Pour mieux comprendre la portée et le potentiel d'utilisation des produits de bioremédiation commercialisés pour le traitement des dérivés pétroliers, des informations ont été recueillies par l'US-EPA auprès de fournisseurs. Un résumé des résultats de cette collecte d'informations avec le nom du fournisseur, du produit et des cibles est proposé dans le tableau 6.

En février 2002, 70 fournisseurs d'agents de biotraitement ont été contactés par e-mails ou courriers pour participer à l'étude de cas organisé par l'US EPA. Un total de huit vendeurs de produits de bioremédiation (bioaugmentation et biostimulation) ont finalement participé à cette enquête dont :

- Société ENVIRO-Zyme : BR (anciennement ENVIRO-Zyme BR) est le principal produit de biotraitement ciblant les dérivés pétroliers fabriqué par Enviro-Zyme, Inc. Selon la compagnie, "BR" contient suffisamment d'espèces de micro-organismes dégradant l'huile, les dérivés aliphatiques, aromatiques et chimiques dans les sols et les milieux aqueux. BR contient également des éléments nutritifs et additifs, et un surfactant. Il est livré sous forme solide avec

une durée de péremption de 1 an. BR doit être mélangé avec de l'eau avant son application *in situ*. La visite du site n'a pas permis d'avoir des informations sur les consortiums utilisés.

- Société Garner Environmental Services, Inc. : Petro-Clean, selon le catalogue, contient des surfactants, des éléments nutritifs, et des bactéries dégradant les hydrocarbures. Les principales espèces microbiennes sont des spores de *Bacillus*. Petro-Clean est normalement appliqué en solution diluée. La visite du site ne permet pas de préciser les concentrations en micro-organismes et la présence d'autres espèces impliquées dans la biodégradation des composés organiques.
- Industrial Wastewater Solutions Corp. (ISW) est une entreprise internationale à l'origine d'un produit microbien, appelé IOS-500 (brevet US # 5.531.898, Wickham, 1995). Selon les documents fournis par ISW, IOS-500 est un mélange d'espèces bactériennes qui utilisent les composés organiques comme une source de carbone et est efficace dans les milieux aérobie et anaérobie. Sur la base de la description du brevet, IOS-500 contient également un mélange d'enzymes et une source de nutriments organiques. Ce produit a été utilisé pour le traitement de sols contaminés, la réhabilitation de masses d'eau, et dans les exploitations agricoles, industrielles, les eaux usées domestiques et leurs systèmes de traitement. Le produit est normalement mélangé avec de l'eau puis laissé environ 6 à 48 heures à température ambiante pour produire un mélange acclimaté, qui est ensuite appliqué à l'environnement contaminé.
- Les produits de bioremédiation Medina comprennent l'Activateur microbien Medina (Medina Microbial Activator) ou l'Activateur pour sol, ce sont plusieurs formulations d'éléments nutritifs et de mélanges microbiens. Medina Microbial Activator est un liquide de formulation dérivée d'un processus de fermentation contrôlée et contenant des composés pour stimuler les activités microbiennes. Les produits incluent NP-1000 et plus-MS100-NP pour le biotraitement des phases aqueuses et Bio-D pour l'assainissement des sols. Bio-D est un produit liquide contenant des substances humiques organiques, ainsi que de l'azote inorganique, du phosphore et du potassium. Les produits microbiens comprennent une formulation granulaire (hydrocarbures D-Grader) et une formulation liquide (HCD). Les descriptifs restent sommaire sur le site et aucune indication n'est ajoutée sur le type de micro-organismes utilisés (figure 3).

Hydrocarbon Degrading Microbial Seed

Concentrated microbial seed specifically formulated for treatment of oil field and refinery wastes, oil sludge, land farming and spill clean-up.

APPLICATION RATES

For best results, pre-hydrate seed immediately prior to usage. Soak seed in lukewarm water, one gallon per one pound of seed for at least 5 minutes. Apply one pound of Hydrocarbon Degrading Microbial Seed for each 1000 square feet of surface area to be treated.

Area in Surface Sq Ft	50	100	150	200
HG Degrading Bacteria	4 tbbsp	8 tbbsp	12 tbbsp	16 tbbsp

LIQUID:
Add 1/2 pound of Microbial Seed for every 200 gallons of liquid.

Figure 3. Exemple de descriptif de consortiums commercialisés trouvé sur le site <http://www.medinaaq.com>

- Verde Environmental, Inc, est le fabricant de Micro-Blaze®, un produit de remédiation des dérivés pétroliers. Micro-Blaze est une formulation liquide de plusieurs souches microbiennes (spores de *Bacillus*), d'agents de surface et d'éléments nutritifs visant à métaboliser les matières organiques et les hydrocarbures dans le sol et l'eau (<http://www.epa.gov/oilspill>). Avant utilisation, Micro-Blaze doit être dilué avec de l'eau à un certain pourcentage déterminé par le type de contamination et appliqué par pulvérisation.

- WMI International commercialise le WMI-2000. Ce produit est affiché comme un additif microbien. WMI-2000 est une poudre sèche contenant des cultures microbiennes sélectionnées spécifiquement pour l'assainissement des produits pétroliers et d'autres contaminants organiques. Le produit peut être appliqué sous forme de poudre sèche ou activé dans l'eau pendant 2 heures et appliqué à la surface de déversements d'hydrocarbures dans l'eau, des puits ou des étangs. Il est également recommandé par le fabricant d'appliquer des éléments nutritifs avec WMI-2000 et de maintenir des concentrations d'azote et de phosphore dans l'eau traitée de l'ordre de 5-20 mg / L et 1-5 mg / L, respectivement.

La limite principale des études basées sur les « fournisseurs » provient de la confusion des différents effets. Il est en effet impossible de déterminer si le « prétendu » renforcement de la biodégradation du pétrole (ou tout autre produit pétrolier) résulte principalement de l'addition de cultures microbiennes, d'éléments nutritifs, d'enzymes, d'oxygène ou toute combinaison des éléments précédents. Parmi les huit produits de biorestauration décrits dans le rapport de l'US-EPA, six sont des agents de bioaugmentation qui contiennent des dégradeurs d'hydrocarbures (c'est-à-dire, BR, Petro-Clean, IOS-500, Medina hydrocarbures D-Grader, Micro-Blaze, et WMI-2000) et quatre des agents de biostimulation contenant soit des enzymes soit des éléments nutritifs, mais pas de micro-organisme (pour, BioCATalyst, Medina Microbial Activator, Bio-D éléments nutritifs et PRP). Tous ces produits contiennent des éléments nutritifs, des agents de surface ou nécessitent une application avec apport d'éléments nutritifs. Par conséquent, aucune conclusion ne peut être avancée en se basant sur ces réponses concernant la détermination de facteurs limitant (micro-organismes, substances nutritives ou enzymes) pour la biodégradation des produits pétroliers, ou le choix d'une méthode de traitement par rapport à l'autre (bioaugmentation ou biostimulation).

4.4/ Le point sur les fournisseurs de consortiums au niveau français et européen

La plupart des travaux publiés, dont font partie les deux articles cités précédemment, mentionnent des sociétés internationales à l'origine de produits pour la bioremédiation de sols ou d'effluents contaminés. Il est cependant nécessaire de préciser que des sociétés nationales et européennes existent et commercialisent des consortiums microbiens. La recherche de ces sociétés peut être effectuée soit directement par le biais d'une recherche sur Internet (www.google.fr) au moyen de mots clé génériques soit en passant par des sites spécialisés comme l'interrogation de bases de brevets qui rend compte de l'innovation dans un domaine particulier.

4.4.1/ INTERROGATION AU MOYEN DE MOTS CLE SUR INTERNET

Plusieurs syntagmes peuvent être utilisés pour définir les sociétés à l'origine de prestations en bioremédiation de manière à différencier les consortiums

pouvant être utilisé sur des matrices solides telles que des sites contaminés et des matrices liquides comme des effluents industriels ou domestiques. Différentes interrogations ont été réalisées à partir de la liste de mots clé suivantes (liste utilisée dans son intégralité ou pas) : *produits, bioremédiation, dérivés pétroliers, bioaugmentation* :

- La société **BioRem**, est une compagnie belge spécialisée dans le traitement *in situ* des sols et des couches aquifères souillées par diverses gammes d'hydrocarbures. Sur le site de la société n'apparaît pas clairement le terme bioaugmentation mais dans le cadre de l'explication des méthodes mises en oeuvre par la société est écrit « Injection de micro-organismes spécifiques, nutriments ou co-substrats » pour la bioremédiation des hydrocarbures. Par contre aucune explication sur le consortium défini n'est donnée.
- La société **Biobasic Environnement**, compagnie située à Clermont Ferrand, propose une approche dans le domaine de la dépollution et de la réhabilitation de sites contaminés. La société effectue une « sélection de souches bactériennes à haut pouvoir épurateur, culture et acclimatation de micro-organismes, déterminations des cinétiques de dégradation et de croissance des micro-organismes, suivi et contrôle des conditions physico-chimiques liées à la biodégradation, étude métabolique des bioconversions et biodégradations, conception de

procédés spécifiques de bioremédiation exploités *in situ* ou *ex situ* ». Aucune donnée sur les souches exploitées ou sur les types de contaminants ciblés n'est indiquée.

- La société **Aquaprox**, située à Levallois Perret (www.aquaprox.com), développe depuis plusieurs mois une gamme de produits d'origine biologique, qui permettent de diminuer le volume des boues de stations d'épurations industrielles (- 30% en moyenne), de diminuer la DCO finale, et de limiter les mauvaises odeurs. Dans la fiche technique disponible, il est question de bioaugmentation mais aucun détail technique n'est indiqué sur le site sur les consortiums utilisés.
- Une annexe publiée par le Ministère de l'Ecologie et du Développement durables (www.ecologie.gouv.fr/IMG/doc/Avis_Traiteffluentsphyto_ann2_0808_ann2.doc) a permis d'identifier d'autres entreprises traitant par bioaugmentation les effluents et/ou les sols pollués :
 - o **ADERBIO DEVELOPPEMENT** (localisée à Toussieu, www.aderbio.com) est spécialiste en traitement des eaux usées et des effluents par procédé de bioaugmentation. Plusieurs consortiums sont présentés comme disponibles pour le traitement biologique :

Souches bactéries

	BIOBACT 50 FS	Traitement Biologique des fosses septiques
	BIOBACT 250	Traitement Biologique des graisses Restauration/Collectivités
	BIOBACT 500	Traitement Biologique de graisses Industrie Agro Alimentaire - Station d'épuration
	BIOBACT 600	Traitement Biologique des lisiers
	BIOBACT 500 HC	Traitement Biologique des hydrocarbures
	BIOBACT 500 VINI	Traitement Biologique des effluents vinicoles
	BIOBACT 500 VITI	Traitement Biologique des effluents viticoles

La recherche réalisée par cette méthodologie n'a permis d'identifier qu'un nombre limité d'entreprises spécialisées dans le traitement par bioaugmentation. Deux remarques peuvent être avancées : soit le nombre d'entreprises est effectivement restreint soit le terme « bioaugmentation » n'est pas mis en avant par la société dans son descriptif technique. Il est important de préciser alors que le lien entre l'outil Internet et les sociétés françaises ou européennes proposant des services de biotraitement est difficile contrairement aux entreprises internationales (US et Canada) où l'utilisation de mots clé spécifiques comme le terme *bioaugmentation* permet un accès direct. D'autre part, l'ensemble des sites officiels des entreprises identifiées ne fournit aucune donnée sur les consortiums utilisés, il est indispensable de passer par une demande écrite ou par téléphone.

4.4.2/ LA BASE DE DONNEES DE BREVETS NATIONAUX DE L'INPI

L'interrogation de la base de brevets de l'INPI (FR Esp@cenet) a produit diverses réponses concernant le biotraitement de matrices contaminées par exemple :

- La société **Rhône Poulenc Chimie** (avant son rachat) avait déposé 5 brevets pour divers micro-organismes impliqués dans la biodégradation de composés organiques :
 - o 3 brevets concernant les souches de champignons telluriques *Cladosporium sphaerospermum* I-2255, *Fusarium oxysporum* I-2256 et *Fusarium solani* I-2257, ou de l'un de leurs dérivés, capables de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) comprenant au moins cinq cycles, ainsi que leurs utilisations pour le traitement des matériels contaminés par des composés polluants récalcitrants.

- 1 brevet concernant une souche de champignon *Coriolus versicolor* déposée à la CNCM sous la référence I-1657, ou de l'un de ses dérivés, capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) comprenant au moins cinq cycles, ainsi que son utilisation pour le traitement des matériels contaminés par des composés polluants récalcitrants.
- 1 brevet concernant un procédé de traitement d'un matériel contaminé comprenant un support organique traité et inoculé avec une souche de champignons de l'ordre des Polyporales. L'inoculum de champignons obtenu est incubé dans des conditions appropriées à sa croissance et est introduit dans le matériel contaminé pour traitement.

Cultures/ Consortium	Développeur Chercheur	Source	Cibles	Vendeurs	Espèces clé	Conditions croissance	Pathogénicité	Références
KB-1	E. Edwards (Univ. de Toronto) et Geosyntec	Aquifère contaminé par TCE, Ontario	Chloro éthènes	SiREM	<i>Dehalococcoides</i> , <i>Acetobacterium</i> , <i>Geobacter sp.</i> , <i>Methanospirillum</i> , <i>Methanosaeta</i>	Milieu minéral anaérobie avec TCE/méthanol à 23°C et pH = 7.0	Résultats négatifs disponibles sur www.siremlab.com	Duhamel <i>et al.</i> , 2002, 2004 ; Major <i>et al.</i> , 2002
Pinellas	Forum de Développement des techniques de remédiation	Aquifère contaminé par TCE, Pinellas, Floride	Chloro éthènes	Terra Systems	Dehalococcoides ethenogenes et autres par T- RFLP	lons chlorures Milieu minimum contenant extrait levure/lactate/TCE à 24°C et pH = 7.0	Non présenté	Ellis <i>et al.</i> , 2000
BC2, Biodechlor	F. Löffler (Institut de Technologie de Georgia)	Aquifère contaminé par PCE, Oscoda, Michigan	Chloro éthènes	Regenesis Biaug-LLC	<i>Dehalococcoides</i> <i>sp.</i> , <i>Desulfuromonas</i> <i>michiganensis</i> <i>BRS1</i> , <i>Desulfuromonas</i> <i>chloroethenica</i>	Inoculum croissant sur milieu minéral anoxique avec lactate = donneur d'e- et PCE = accepteur d'e-	Non présenté	Löffler <i>et al.</i> , 2000 ; He <i>et</i> <i>al.</i> , 2002, 2003 ; Lendvay <i>et al.</i> , 2003
Cultures Mixtes BCI	Bioremediation Consulting Inc. (BCI)	Sites contaminés COV	Chloro éthènes Chloro éthanes	Bioremediation Consulting Inc. (BCI)	Cultures de BCI contenant <i>Dehalococcoides</i> <i>sp.</i>	Non connu	Résultats négatifs disponibles sur www.bcilabs.com/s.bioaug.html	Communication personnelle de M. Findlay, BCI

Tableau 5. Consortiums utilisés pour le traitement des matrices liquides contaminées par les solvants chlorés (d'après ESTCP, 2005)

Fournisseur	Identité de l'inoculum	Produits traités	Source de l'inoculum
Alko Ltd., Biotechnology, Finlande	Culture mixte	Solides contaminés par des hydrocarbures	Culture enrichie à partir de sol contaminé
Alpine Remediation Products (distributeur de Biochemical Corporation)	Culture mixte non identifiée (RBC 212)	Essence, diesel, benzène, toluène, xylènes, éthyle benzène et HAP	Brevetée
	Culture mixte non identifiée (RBC 216)	Huiles et graisse pétrolières, graisses et huiles animales, triglycérides et HAP	Brevetée
	Culture mixte non identifiée (RBC 218)	HAP lourds, phénol, créosote, déchets pentachlorophénol	Brevetée
Argonne National Laboratory (http://www.anl.gov/)	Culture mixte	Carburant Diesel	Isolée à partir d'un site contaminé
Bioscience, Inc. (http://www.bioscienceinc.com/)	Culture mixte de <i>Pseudomonas</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> ... vendu sous le nom Microcat	HAP, solvants, monomères, pesticides	Fournisseur dans les locaux de la compagnie
BioTrol, Inc. (http://www.biotrol.com/)	<i>Flavobacterium spp.</i>	Pentachlorophénol, HAP	Collections de cultures disponibles dans les locaux de la compagnie, ATCC (American Type Culture Collection)
	<i>Methylosinus trichosporum</i> OB3b	Solvants chlorés (trichloroéthène)	
EMCON Associates 15055 SW Sequoia Pkwy, Suite 140 Portland, OR 97224	Culture mixte	HAP	Isolats de sols
	<i>Bacillus spp.</i>	HAP	Fournisseur commercial
Enviroflow, Inc. (321 Fortune Blvd, Milford, MA 01757-1750, United States)	<i>Bacillus subtilis spp.</i>	HAP, graisses animales et végétales, protéines, glucides, créosote, phénols, effluents municipaux	Brevetée
ESE Biosciences, Inc. (3208 Spring Forest Road, 27604 Raleigh, NC, USA)	Culture mixte composée majoritairement de <i>Pseudomonas</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> et Actinomycètes	Alcool, aromatiques, glucides, détergents, cétones, HAP, phénols, phtalates, solvants, déchets municipaux	Isolats de sites contaminés
Heritage Remediation Engineering 1175 Western Drive Indianapolis, Indiana United States	Culture mixte (mélanges déposés de micro-organismes déposés)	Méthyle éthyle cétone, méthyle iso butyle cétone, toluène	Usine de traitement d'effluents municipaux
	Culture mixte (mélanges déposés de micro-organismes déposés)	Acide acrylique	Usine de traitement biologique
	Culture mixte (mélanges déposés de micro-organismes déposés)	Essence et diesel	Usine de traitement d'effluents municipaux
Kiseki, Inc.	Culture mixte non identifiée (KBC 101, 102, 107, 109)	PCBs, pentachlorophénols, sulfure d'H, phénols, mousses, détergents, huiles et graisses, crésol	Isolée à partir d'aires contaminées par des hydrocarbures – déversements pétroliers
	Culture non identifiée (KBC 100)	Hydrocarbures	

Merkert Laboratories Inc. 500 Turnpike Street, Canton, Massachusetts 02021	Souche non identifiée ML-21	Hydrocarbures, diesel, pentachlorophénols, carburant pour avion, toluène, éthylène glycol, tout composé organique sauf PCBs	
	Souche non identifiée bio-dégraissante	Huiles et graisses	
Osprey Biotechnics (http://www.ospreybiotechnics.com/) Culture fournie par CL-Solutions (http://www.cl-solutions.com/)	PSEUDOMONAS FLUORESCENS	Anthracène, benzène, o-chlorotoluène, p-chlorotoluène, crésols, dinitrooctyl phtalate, dichlorobenzène, 1,1- dichloroéthane, 1,2-dichloroéthane, dichloropropane, dichlorotoluène, éthylène glycol, pentachlorophénol, phénanthrène, phénol, 1,1,2- trichloroéthane	Brevetée
	PSEUDOMONAS PUTIDA	m-chlorotoluène, pétrole brut, 2- éthoxyéthanol, éthylène glycol, éthylbenzène, isoprénoides, méthyle éthyle cétones, chlorure de méthylène, naphtalène, terpène, 1,1,2,2- tétrachloroéthane, toluène, déchets boues/huiles, xylène	Brevetée
Polybac Corporation acquise par InterBio (http://www.interbio.com)	Produits inclus : <i>Acinetobacter calcoaceticus, Aspergillus oryzae, Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Bacillus thuringiensis, Micrococcus sp., Myxobacter, Nitrobacter sp., Nitrosomonas sp., Saccharomyces cerevisiae, Thiobacillus</i>	Déchets, cellulose, lignine, déchets papeterie, ammoniac, hydrocarbures dans environnements salés, HAP, phénols, glycols, formaldéhyde, cires, cyanures, protéines, glucides	Brevetée
ReTeC (http://www.retec.com/index.html), Remediation Technologies Inc. (http://www.remediationtech.com/)	PHANEROCHAETE CHRYSOSPORINA	HAP	Université de l'Utah
	<i>Pseudomonas spp.</i>	Pentachlorophénol	Collection disponible dans les locaux du site de traitement
	Culture mixte anaérobie	DDT	
	<i>Pseudomonas spp.</i>	HAP	
	<i>Alcaligenes spp.</i>	2,4-D, 2,4,5-T	Collection disp à l'Université
	<i>Pseudomonas spp.</i>	2,4-D, 2,4,5-T	Collection disponible dans les locaux du site de traitement
Culture mixte	Cycloalcanes, huiles		
SBP Technologies Inc. New Haven CT	PSEUDOMONAS PUTIDA	Créosote, HAP	Échantillons de boues et sols issus de sites pollués
	PSEUDOMONAS PAUCIMOBILIS	Fluoranthène, HAP	
	<i>Pseudomonas spp.</i>	Pentachlorophénol	

	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Trichloroéthène	Sites contaminés par TCE
Technical Resources, Inc. (www.techresources.com)	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Trichloroéthène, dichloroéthène, toluène, phénol, o-, m-, p-crésol, o-, m-, p-xylène, styrène, naphtalène, cumène, indole, acide anthranilique	Culture en labo isolée à partir d'un lagon de traitement de déchets industriels
Waste Stream Technology, Inc. (http://www.wastestream.com/)	PSEUDOMONAS PUTIDA	HAP, aromatiques halogènes, fuel, carburant pour avion	Isolée à partir d'un site
	ALCALIGENES FAECALIS	BTEX, essence, composés organiques volatils, phénols	Isolée à partir d'un site
	<i>Pseudomonas spp.</i> (fluorescent)	Carburant pour avion, diesel, dérivés pétroliers, ester phtalique, huile de coupe, HAP	Isolée à partir d'un site
	<i>Arthrobacter spp.</i>	Pentachlorophénol	Isolée à partir d'un site
	<i>Acinetobacter johnsonii</i> <i>genospecies 7</i>	Pétrole brut	Isolat marin
	<i>Psychrobacter spp.</i>	Pétrole brut, diesel	Isolée à partir d'un site

Tableau 6. Caractéristiques des inoculum commercialisés pour la bioaugmentation (ESTCP², 2005)

² Environmental Security Technology Certification Program

Fournisseur	Nom commercial	Descriptif du produit	Produits traités
Enviro-Zyme, Inc (http://www.envirozyme.com/07/home/index.php)	BR, anciennement ENVIROZYME BR	Additif biologique composé de micro-organismes (billions organismes viables /g) enrichis avec des nutriments et un surfactant, vendu sous forme d'un produit solide sec avec une durée de vie de 1 an = à utiliser mélanger à de l'eau et à pulvériser	Dérivés pétroliers, composés aliphatiques et aromatiques dans sols et milieux aqueux
Forrester Environmental Technologies Corp. (FET Group) POB 2053 Windermere,, Florida 34786 UNITED STATES	BioCATalyst OS-500	Extrait d'algue modifiée (agent actif = extrait cytokine = hormone stimulant la croissance) contenant un agent de surface actif et un émulsifiant, agent dispersant et biostimulant les pop indigènes	Déversement de pétrole (dérivés pétroliers)
Garner Environmental Services, Inc. (http://www.garner-es.com/)	Petro-Clean	Agent de surface contenant 1 surfactant, des nutriments et des bactéries dégradant les hydrocarbures (spores de <i>Bacillus</i> , 50 billions / gallon ou 3,79 litres)	Déversement de pétrole (dérivés pétroliers)
INDUSTRIAL WASTEWATER SOLUTIONS IN ASSOCIATION WITH INTERNATIONAL ORGANIC SOLUTIONS	IOS-500 Facultative Bacteria	Mélange de bactéries efficace en con,ditions aérobie et anaérobie, contenant un mélange d'enzymes et une source organique de nutriments = s'utilise mélangé à de l'eau et maintenu 6-48 h à T° ambiante avant utilisation	Sols contaminés par déversement polluants organiques, remédiation de sites contaminés par des eaux usées, usine de traitement des effluents agricoles, industriels et domestiques
P.O. Box 157 Sebastopol, California 95473 UNITED STATES			
Medina Agriculture Products Co., Inc. (http://www.medinaag.com/)	Medina Microbial Activator	Formulation liquide dérivée d'un process de fermentation contrôlée et contenant des composés stimulant les act microbiennes	Hydrocarbures, sols contaminés par des carburants type diesel
	Bio-D	Produit liquide contenant des subst humiques organiques, de l'N inorganique, du P et K	
	Hydrocarbon D-Grader	Formulation granulaire de micro-organismes dégradant les hydrocarbures	
Petrol rem, Inc. 2275 Swallow Hill Road, Building 2500 Pittsburgh, PA, 15220 United States	PRP (<i>Petroleum Remediation Product</i>)	Petites sphères de cire traitées contenant des nutriments, les micro-organismes se trouvent à l'int. des sphères (ex : <i>Bacillus sp.</i>),	Déversement de pétrole (dérivés pétroliers)
Verde Environmental, Inc.	Micro-Blaze http://www.micro-blaze.com/introduction.htm	Contient des agents de surface, des nutriments et plusieurs souches non pathogènes de bactéries <i>Bacillus</i> ; le surfactant commence par émulsionner (ventiler) les contaminants pour la dégradation par les micro-organismes en sous-produits inoffensifs comme le dioxyde de carbone et l'eau.	appliquée à une base d'hydrocarbures ou un déversement accidentel pétrolier ou de contaminants organiques

<p>WMI International, Inc. http://www.wmiinternational.com/</p>	<p>WMI-2000</p>	<p>Vendu comme additif biologique (dispo sur site EPA), poudre sèche contenant diverses souches microbiennes, activée dans l'eau pour 2 heures et appliquer en surface dans le cas de déversements pétroliers</p>	<p>Produits pétroliers et autres contaminants organiques</p>
---	------------------------	---	--

Tableau 7. Liste des agents de bioremédiation commercialisés pour le traitement des environnements estuariens (US EPA, 2004)

5/ Bioaugmentation et génie génétique

5.1/ Définition de "Organisme Génétiquement Modifié" (OGM).

La directive 2001/18/EC des Communautés Européennes relative à la dissémination délibérée d'organismes génétiquement modifiés donne les définitions suivantes :

- « organisme » : toute entité biologique capable de répliquer ou de transférer du matériel génétique,
- « organisme génétiquement modifié » : un organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été altéré par un processus qui ne se produit pas naturellement par croisement et/ou recombinaison naturelle.

A partir de cette définition, il est à considérer qu'un organisme est un OGM si son patrimoine génétique a été modifié par génie génétique pour lui conférer une caractéristique ou une propriété nouvelle. Suivant la législation, les moyens permettant ces modifications vont de la sélection *in vitro* aux méthodes de génie génétique. Ces dernières méthodes permettent de modifier des organismes par transgénèse, c'est-à-dire l'insertion dans le génome d'un ou de plusieurs nouveaux gènes. Un « organisme transgénétique », terme qui désigne les organismes qui contiennent dans leur génome des gènes « étrangers », est donc toujours un organisme génétiquement modifié.

Les organismes construits par transferts naturels de gènes (portés par exemple par des plasmides conjugatifs), par recombinaison naturelle (par exemple par des processus faisant appel à des transposons, des croisements de souches ou à la fusion *in vivo* de plasmides) ou par des méthodes de sélection sans modification génique et d'évolution basées sur la génération spontanée de mutations, n'entrent pas dans la catégorie des OGM.

5.2/ Cas réels de bioaugmentation par des souches d'OGM.

Selon la littérature, des souches de micro-organismes génétiquement modifiés n'ont jusqu'à présent jamais été utilisées en situations réelles de bioaugmentation. Un très grand nombre de souches ont été construites et des études très prometteuses ont été réalisées mais elles n'ont jamais dépassé l'échelle du récipient de laboratoire, du microcosme, du lysimètre ou du fermenteur pilote. Plusieurs revues récentes leur ont été consacrées (voir par exemple Saylor and Ripp, 2000 ; Watanabe, 2001 ; Ang *et al.*, 2005 ; Urgun-Demirtas *et al.*, 2006) et le cabinet anglais de consultants WS Atkins Environment a publié en 2002 un rapport intitulé "Genetically modified organisms for the bioremediation of organic and inorganic pollutants" (WS Atkins Environment, 2002).

La seule étude faisant appel à une souche rentrant dans la définition des OGM proche des conditions réelles est celle du groupe de Gary Saylor de l'Université du Tennessee à Knoxville (Ripp *et al.*, 2000). Pour la première fois, l'« U. S. Environmental Protection Agency » a autorisé l'utilisation d'une souche OGM pour une étude de terrain d'une durée de deux ans. Elle a été conduite en lysimètres, des cylindres d'acier galvanisé recouvert d'une résine époxydique (de 4 m de haut et d'un diamètre de 2,5 m) enterrés verticalement et fermés par un couvercle d'acier inoxydable. Ces lysimètres ont été remplis de terre artificiellement contaminée par du naphthalène (1 g/kg), de l'anthracène (100 mg/kg) et du phénanthrène (100 mg/kg) et inoculés avec la souche HK44 de *Pseudomonas fluorescens*. A noter que ces conditions sont loin d'apporter un confinement total, ce qui a dû être pris en compte et assumé lors de l'autorisation de l'étude.

La souche HK44 contient un plasmide porteur de gènes codant pour les enzymes d'une voie de dégradation du naphthalène. Un gène *lux* codant pour une luciférase est fusionné à ces gènes cataboliques. Leur expression peut donc être suivie en mesurant la bioluminescence des bactéries. Le résultat le plus marquant de cette étude a été le constat de la survie et de l'activité des bactéries pendant au moins 660 jours. Néanmoins, la mesure de la remédiation des contaminants organiques a été perturbée par des problèmes d'hétérogénéité de concentration de ces substances dans les lysimètres, ne permettant pas d'aboutir à des données conclusives

Ce travail, qui a été publié en 2000, ne semble pas avoir été suivi d'autres études du même type, en conditions réelles. La revue de Kulkarni et Chaudhari publiée en 2007 ne donne pas d'autres exemples que celui-là au sujet de l'utilisation de souches OGM pour la bioremédiation de composés aromatiques. Outre les difficultés techniques d'utilisation des OGM en bioremédiation, le contexte réglementaire basé sur le principe de précaution explique l'absence de données expérimentales.

5.3/ Stratégies de confinement des micro-organismes génétiquement modifiés.

Le recours à des souches OGM serait peut-être facilité si celles-ci étaient construites de manière à les confiner drastiquement dans le site traité et à empêcher ainsi toute dissémination dans l'environnement. Des procédures destinées à rendre impossible le transfert des gènes recombinants vers d'autres micro-organismes pourraient aussi être envisagées. Les stratégies de base pour atteindre ces objectifs ont été décrites en 1993 par Soren Molin et ses collaborateurs dans un article nommé « *Suicidal genetic elements and their use in biological containment of bacteria* ».

Le principe est, en théorie, très simple : il consiste à déclencher l'expression d'un gène qualifié de « suicide », parce que son produit tue la cellule qui le contient, lorsque celle-ci n'est plus en présence des composés à dégrader ou lorsqu'un plasmide porteur de gènes étrangers a été transféré par une autre bactérie.

Contreras *et al.* (1991) avaient été les premiers à appliquer ce principe pour construire une souche confinable capable de digérer des substances polluantes. Pour cela, ils avaient utilisé le circuit de régulation de l'expression des gènes de dégradation portés par le plasmide TOL pWW0 de *Pseudomonas putida*. La présence de nombreux types de benzoates (alkyl- et halo-substitués) dans l'environnement des bactéries provoque l'expression du gène régulateur *xyIS* dont le produit active les gènes codant pour les enzymes de la voie de dégradation de ces benzoates. Les auteurs ont fusionné le gène *lacI* d'*E. coli* (qui code pour le répresseur de l'opéron lactose) à un promoteur activé par le produit de *xyIS*. A côté de cette construction, ils avaient introduit le promoteur de l'opéron lactose fusionné au gène *gef* d'*E. coli*. Ce dernier code pour un peptide qui tue les cellules en provoquant des lésions membranaires irréversibles.

Lorsque les bactéries qui contiennent cette construction sont en présence de composés qui activent, *via* le produit de *xyIS*, les gènes de dégradation, le répresseur de l'opéron lactose est synthétisé et il inhibe l'expression du gène *gef*. Dans ce cas, pas de problème pour la bactérie qui peut dégrader les polluants. En revanche, lorsque la quantité de ces composés diminue, ou lorsque la bactérie est déplacée vers un environnement qui ne les contient pas, l'expression du répresseur de l'opéron lactose diminue. Ce qui active le gène suicide *gef* puisque son promoteur n'est plus réprimé.

Ce système de confinement a été utilisé chez *E. coli* (Contreras *et al.*, 1991) et *P. putida* (Jensen *et al.*, 1993 ; Ronchel *et al.*, 1995) mais, parce que le gène *xyIS* était porté par un plasmide relativement instable, un nombre important de bactéries recombinantes échappaient au suicide lorsque les polluants étaient éliminés du milieu.

Molina *et al.* (1998) ont fortement stabilisé le système en clonant la totalité des composants dans le chromosome de *P. putida*. En condition de laboratoire, une bactérie sur 10^8 parvenait à échapper au suicide en absence de polluant. Les auteurs ont également utilisé la souche en essais extérieurs (avec l'autorisation du Ministère de l'Environnement espagnol). Ils ont constaté que les bactéries confinables étaient capables de coloniser la rhizosphère de plantes dans des sols contaminés par du 3-méthylbenzoate mais en étaient incapables en absence du composé. Ils n'ont pas observé de dissémination de la souche hors de la zone d'expérimentation.

La vitesse d'élimination des bactéries recombinantes était cependant bien plus lente en conditions naturelles qu'en laboratoire. De plus, le taux de survie de 10^{-8} est encore trop élevé. Ronchel et Ramos (2001) ont donc cherché à améliorer le système suicide en utilisant non plus une mais deux fonctions capables de tuer les cellules en absence de polluants. Ils ont introduit la totalité du système *gef* décrit précédemment dans un mutant de *P. putida* dont le gène chromosomique *asd* avait été délété. L'absence de ce gène a pour résultat l'incapacité à synthétiser certains acides aminés et une substance absente des milieux naturels mais absolument nécessaire aux bactéries, l'acide diaminopimélique. Une construction composée du gène *asd* (débarassé de son propre promoteur) et d'un promoteur activé en présence des polluants de type benzoates, encore une fois par l'intermédiaire du produit de *xyIS*, a également été introduite dans le chromosome de la souche. En absence de polluants, le suicide des bactéries se produit à la fois par la synthèse du produit du gène *gef* et par l'absence d'acide diaminopimélique. Cette fois, le nombre de survivants en l'absence du polluant est tombé sous la limite de détection (moins de un survivant pour 10^9 bactéries) et la disparition des bactéries des sols non pollués s'est produite en 20 à 25 jours (contre 100 avec le système précédent).

Un système basé sur le même principe a été développé par Torres *et al.* (2003) pour limiter le transfert horizontal de plasmides conjugatifs porteurs d'informations clonées. Comme dans le cas précédent, et pour les mêmes raisons, il comporte deux fonctions suicide. Celles-ci sont cependant induites non plus en absence de polluants mais lorsque le plasmide qui porte les gènes suicide entre par conjugaison dans une bactérie n'appartenant pas à la souche construite. Les auteurs ont introduit dans un plasmide conjugatif de la souche HB101 d'*E. coli* le gène *colE3* codant pour la colicine E3, capable de tuer un grand nombre de bactéries en détruisant leur ARN ribosomique 16S. Dans le chromosome de cette souche, ils ont introduit le gène *immE3*

qui produit constitutivement un antidote à la colicine E3. La souche est donc protégée des effets de la colicine mais lorsque le plasmide pénètre dans une bactérie réceptrice dépourvue du gène *imm3*, la colicine E3 exerce son effet et tue cette bactérie. De plus, le plasmide porte un gène codant pour l'enzyme de restriction EcoRI. Cette enzyme coupe tout ADN lorsqu'elle y reconnaît une séquence particulière de 6 paires de bases. La souche d'*E. coli* porte dans son chromosome le gène codant pour l'enzyme de modification correspondante, la méthylase qui protège les séquences d'ADN spécifiquement reconnues par EcoRI en les méthylant. L'ADN de la souche d'*E. coli* n'est donc pas clivé par EcoRI. En revanche, lorsque le plasmide est introduit dans une bactérie dépourvue de la méthylase, EcoRI détruit quasi instantanément son ADN. La fréquence de transfert du plasmide portant cette construction est réduite d'un facteur 10^8 par rapport au transfert du même plasmide dépourvu du système suicide.

Cette dernière étude décrit la construction et l'évaluation d'une souche de laboratoire. L'utilisation de ce type de construction en conditions naturelles soulève cependant deux questions. La première concerne l'expression des gènes suicides dans des bactéries appartenant à d'autres espèces qu'*E. coli*. Les promoteurs des deux gènes sont des promoteurs d'*E. coli* : leur expression dans d'autres contextes génétiques n'est pas une certitude. Les bactéries réceptrices qui ne les expriment pas échappent ainsi au suicide. La deuxième question est relative à la dissémination de gènes suicides par des plasmides conjugatifs. Certains d'entre eux ont des fréquences de transfert très élevées (voisine de 100 % dans le cas de RP4 par exemple). Le confinement de l'information génétique clonée serait drastique mais il s'effectuerait par l'élimination physique de toutes les bactéries capables de recevoir ces plasmides. La diversité du milieu concerné pourrait en être gravement affectée.

5.4/ Utilisation de cellules microbiennes tuées.

Une autre méthode est l'utilisation de cellules de bactéries OGM tuées avant leur mise en contact avec la matrice polluée. L'ADN étant stable dans l'environnement, ces cellules mêmes mortes peuvent transférer des plasmides à d'autres organismes. De plus, mêmes si de telles cellules ne peuvent évidemment se multiplier dans l'environnement, elles pourraient y libérer des enzymes ou porter à leur surface des molécules capables de dégrader ou d'absorber des polluants. Leur utilisation demanderait la mise au point de méthodes efficaces de mise en contact avec le polluant au sein de la matrice contaminée et de répéter à plusieurs reprises ces procédures tout au long du traitement.

Pour la première fois aux Etats-Unis, une équipe de l'Université du Minnesota à St Paul a utilisé une souche recombinante d'*E. coli* manipulée de manière à surexprimer une atrazine chlorohydrolase pour décontaminer un sol pollué par de l'atrazine, un herbicide largement utilisé en agriculture (Strong *et al.*, 2000). Avant leur application sur les surfaces à traiter, les bactéries avaient été tuées par un agent chimique, le glutaraldéhyde. En huit semaines, les auteurs ont constaté une réduction de la concentration d'atrazine de 77 %. Ils considèrent qu'il s'agit là de l'efficacité minimale de leur technique car elle a été appliquée à la fin de l'automne, quand les températures sont déjà assez basses.

Ces auteurs ont également constaté que l'activité enzymatique est conservée pendant plusieurs mois après le traitement des bactéries au glutaraldéhyde. Cette stabilité est très certainement une des clés de l'efficacité du traitement. Une autre clé est la localisation de l'enzyme : intracellulaire, périsplasmique, exposée à la surface des cellules, extracellulaire ? L'article n'apporte pas de réponse à cette question.

Certaines enzymes cataboliques présentent une efficacité de dépollution élevée lorsqu'elles sont exprimées à la surface des cellules. C'est le cas, par exemple, d'une carboxylestérase dont le gène a été isolé d'un moustique résistant à certains insecticides. L'enzyme a été exprimée de manière à être fixée et exposée à la surface externe de cellules d'*E. coli*. Ces cellules sont capables de dégrader 90 % de malathion en 4 h (étude non disponible citée par Wu *et al.*, 2008). La même enzyme exprimée à l'intérieur des cellules n'a pratiquement pas d'activité de détoxification. L'étude a été menée avec des cellules vivantes mais il est parfaitement concevable que l'enzyme, et beaucoup d'autres exprimées de la même manière, conserve son activité catalytique après inactivation des cellules. La revue de Wu *et al.* (2008) fait le point sur l'expression de fonctions de bioremédiation à la surface de cellules bactériennes.

L'utilisation de cellules tuées est une stratégie qui pourrait également s'avérer intéressante pour la bioremédiation d'effluents liquides peu volumineux par passage sur des filtres contenant ces cellules microbiennes. Ce type d'application mettrait en oeuvre des cellules porteuses à leur surface soit d'enzymes qui restent actives après la mort cellulaire, soit de déterminants capables d'adsorber à haute affinité des métaux toxiques, radioactifs ou non, ou d'autres polluants.

Un groupe de chercheur indiens a rapporté l'utilisation de mycélium de certaines souches de champignons pour fixer le ^{60}Co à partir d'effluents contaminés (Rashmi *et al.*, 2004). Une discussion avec un des membres de cette équipe (P. Maruthi Mohan, Université d'Hyderabad) nous a appris que lors de ces traitements, les cellules étaient tuées par la radioactivité de l'effluent mais conservaient leur capacité de sorption et désorption de toute une série de métaux.

Ce groupe met au point des filtres contenant soit uniquement des cellules mortes, soit un mélange de cellules mortes et vivantes, dans le but de capter différents ions métalliques. Ils disposent notamment de mycéliums capables de traiter le mercure de l'eau destinée à la consommation humaine. De plus, leur connaissance des processus de sorption et de désorption des métaux lourds à la surface de cellules microbiennes leur permet de développer des procédés de concentration et de récupération de ces métaux.

5.5/ Le génie génétique *in vivo*.

Dès le début des années 2000, des chercheurs avaient utilisés les propriétés de plasmides conjugatifs pour disséminer des gènes d'intérêt dans un environnement pollué (Dejonghe *et al.*, 2000 ; Newby *et al.*, 2000). Ces études, menées en microcosmes sans contact avec l'extérieur, ont permis de constater le transfert spontané de plasmides porteurs des gènes de dégradation du 2,4-dichlorophenoxyacétate (2,4-D) vers des bactéries réceptrices présentes dans le milieu et de constater l'efficacité du système dans la dégradation de ce polluant.

Le but de ces travaux n'est donc plus de disséminer des organismes contenant des gènes étrangers mais de répandre ces gènes par une voie naturelle de transfert d'informations génétiques. Les bactéries recevant ces plasmides conjugatifs dans lesquels les gènes étrangers ont été clonés deviennent à leur tour des OGM puisque ces plasmides ont été construits *in vitro* avant transfert dans la souche. Les mêmes réserves techniques et réglementaires que celles précédemment citées doivent être précisées.

Ces études attirent l'attention sur le fait que dès qu'une pression de sélection s'exerce sur une population bactérienne, c'est-à-dire dès qu'un paramètre ou une substance extérieurs mettent en péril la survie de cette population, les individus pourvus des gènes de résistance à ce facteur ou à cette substance survivent et prolifèrent. Ce qui amplifie les gènes de résistance. Dans de telles situations, des processus naturels de recombinaison conduisent presque toujours ces gènes à se retrouver sur des plasmides conjugatifs, transférables à haute fréquence vers d'autres individus. Ces processus de recombinaison et de transfert ont été largement étudiés au cours des années 1970 et 1980 et expliquent notamment la génération des transposons et des plasmides porteurs de multiples résistances aux antibiotiques.

A cette époque, la connaissance et l'utilisation de ces processus à l'oeuvre spontanément dans la nature (génération de transposons, fusions de réplicons, transferts de plasmides par conjugaison, ...) a conduit au développement de méthodes de génie génétique ne faisant pas appel au traitement *in vitro* de l'ADN. Un des auteurs de la présente étude a ainsi pu cloner un très grand nombre de gènes de *Pseudomonas fluorescens*, *Alcaligenes eutrophus*, *Salmonella typhimurium*, *Erwinia carotovora* et *E. coli* dans des souches d'*A. eutrophus* et de *P. fluorescens* sans utiliser d'enzymes de restriction ni sortir l'ADN des cellules (Lejeune *et al.*, 1983).

Ces méthodes ont été relativement peu utilisées, elles sont néanmoins encore disponibles.

Bien que ces différentes méthodes semblent très prometteuses et font aujourd'hui l'objet de recherches intensives, outre les questions relatives aux autorisations d'utilisation réglementaires, l'état actuel des connaissances ne nous paraît pas suffisant pour envisager leur application *in situ* à court terme.

6/ Pistes pour la mise au point de nouvelles méthodes d'ensemencement des matrices polluées

Comme nous l'avons vu au chapitre 4, plusieurs sociétés commercialisent des consortiums microbiens utilisables à des fins de bioremédiation. Bien que des informations sur la composition précise de ces consortiums ainsi que sur la manière dont ils doivent être inoculés soient difficiles à obtenir, il semble qu'ils résultent le plus souvent de la mise en culture d'échantillons prélevés dans des sites pollués auxquels ont été ajoutés, au mieux, une ou quelques souches caractérisées. Dans le cas de traitements de sols, ces consortiums sont répandus par aspersion ou saupoudrage, à partir de suspensions ou de lyophilisats, avec ou sans labourage préalable.

L'efficacité des traitements de bioaugmentation pourrait être améliorée soit en favorisant la pénétration des microbes dans les matrices solides soit en conditionnant les inoculums sous forme de consortiums multi-espèces structurés. Dans le présent chapitre, nous nous intéresserons d'une part aux possibilités d'utilisation de la colonisation de la rhizosphère pour faciliter la diffusion des bactéries dans les sols et, d'autre part, à la formulation, la construction et l'utilisation de ces consortiums structurés.

6.1/ Bioaugmentation par des plantes à rhizosphère contrôlée

Selon le Dr Claire Prigent-Combaret du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université Lyon 1 (*communication personnelle*), la composition des exsudats racinaires a une forte influence sur la structure et la stabilité des populations microbiennes de la rhizosphère. La survie et la multiplication de souches particulières y seraient nettement plus élevées qu'après ensemencement de bactéries « nues ».

Il semble donc qu'une piste intéressante pour le traitement de sols pollués serait d'y planter des végétaux dont la rhizosphère aurait été construite au préalable avec des souches caractérisées. Ces plantes pourraient elles-mêmes exercer un rôle de phyto-remédiation et les bactéries associées à leurs racines se trouver dans une certaine mesure protégées des agressions du milieu. La croissance des plantes, et donc de leurs racines, augmenterait le volume de sol accessible aux bactéries et leur permettrait d'atteindre des zones imperméables (Kuiper et al., 2004).

Il semble aussi que l'inoculation et la colonisation de la rhizosphère de plantes déjà présentes sur le sol à traiter pourraient constituer une voie d'entrée efficace pour des microbes destinés à la bioaugmentation.

6.2/ Utilisation de consortiums microbiens artificiels organisés dans l'espace

Dans la nature, les microorganismes vivent le plus souvent dans des communautés hautement structurées et organisées (Stoodley *et al.*, 2002), qualifiées de « biofilms » lorsqu'elles sont associées à des surfaces biotiques ou abiotiques ou de « consortiums » dans le cas d'architectures tridimensionnelles. Ces communautés composées d'organismes appartenant à plusieurs dizaines d'espèces constituent une forme de pluricellularité qui, à l'inverse de celle rencontrée chez les plantes ou les animaux, autorise des réorganisations rapides et importantes en fonction des variations des paramètres extérieurs. Les cellules s'organisent spontanément de manière à assumer une véritable répartition des tâches. La surface d'un biofilm en contact avec le milieu extérieur peut, par exemple, être composée d'organismes qui respirent et consomment l'oxygène, permettant ainsi à d'autres cellules, situées à quelques dizaines de microns des précédentes et en contact avec le matériau abiotique, d'être en anaérobiose et de développer les fonctions nécessaires à la corrosion de celui-ci. Par des mécanismes encore inconnus, la structuration des biofilms met en place un véritable réseau interne de circulation des nutriments et des déchets (Costerton *et al.*, 1994).

S'il peut sembler réaliste de construire un jour des consortiums définis et stables en conditions de laboratoire, il nous paraît infiniment plus problématique de les introduire et de les maintenir intacts dans des environnements hétérogènes ou soumis à de fortes fluctuations. A l'inverse des communautés autochtones, structurées en fonction des paramètres locaux et capables d'en assumer une certaine variation, les consortiums artificiels y seraient soumis à des conditions qu'il est difficile de prédire et qui devraient rapidement conduire à leur déstructuration, voire très probablement à leur élimination.

En revanche, confrontés à des matrices polluées homogènes et dépourvues de fluctuations, des consortiums formulés et conçus au cas par cas pourraient peut-être constituer des agents de bioremédiation plus efficaces que des souches isolées ou des mélanges non caractérisés, en raison de leur caractère multispécifique et de leur organisation tridimensionnelle.

Les effluents liquides issus de processus industriels reproductibles et constants nous semblent être ceux dont le traitement pourrait le plus bénéficier de technologies basées sur les consortiums microbiens.

6.3/ Quelques pistes pour la construction de consortiums microbiens artificiels

Même en conditions de laboratoire, peu d'études ont jusqu'à présent été consacrées à la construction de consortiums à structuration définie. Une publication de deux groupes anglais (Andrews et al., 2005) rapporte la construction de biofilms structurés à l'aide de techniques électrophorétiques très sophistiquées. Les résultats semblent prometteurs mais les biofilms obtenus ne contiennent que deux souches (*Pseudomonas putida* et *Acinetobacter sp.*). La construction de biofilms multi-espèces et stables face à un effluent industriel donné n'est donc certainement pas envisageable avant plusieurs années. Néanmoins, certaines approches et même quelques réalisations peuvent être mises en avant dans cette perspective.

Une première approche qui apparaît importante est de ne pas limiter les souches à introduire dans le consortium à celles qui sont capables de détruire le polluant. Des microorganismes, restant à identifier et qu'il faudrait rechercher dans les consortiums naturels, pourraient très certainement renforcer les communautés par des fonctions comme l'adsorption de nutriments, l'effet de barrière vis-à-vis d'autres microbes ou encore l'atténuation des fluctuations de paramètres comme l'activité de l'eau. Toute cette activité reste à développer mais elle pourrait s'inspirer directement de ce qui se fait dans le domaine des flores intestinales et cutanées.

Un deuxième aspect est celui de la fixation des microbes sur des surfaces abiotiques. On sait que dans ces conditions, les niveaux de résistances aux agents anti-microbiens et aux prédateurs sont renforcés. Associer les souches à des structures comme des grains de sable ou des particules d'argile permettrait probablement d'obtenir ces résistances plus élevées et ces structures pourraient servir de plateforme d'assemblage pour les consortiums à construire. Cette approche a déjà été suivie pour le développement de biofilms capables de dégrader des hydrocarbures (Al-Awadhi et al., 2003).

Une troisième approche, plus ancienne, est celle de l'encapsulation des microbes par des matériaux polymériques, ce qui assure une certaine pérennité au consortium, même dans un environnement fluctuant. Cassidy et al. (1996) ont consacré un article de revue à cette question. Ils y voient plusieurs avantages parmi lesquels le confinement des microorganismes, la protection contre les perturbations biotiques et abiotiques et la stabilisation des plasmides. Nous pouvons y ajouter la possibilité d'y inclure des molécules fluorescentes qui permettraient de suivre les particules à la trace. Parmi les travaux qui font appel aux techniques d'encapsulation, nous pouvons citer la publication de Moslemy et al. (2002) qui décrit la production et l'utilisation de micro-capsules contenant des bactéries capables de dégrader des hydrocarbures.

En conclusion, la conception de consortiums microbiens structurés et composés de souches caractérisées à des fins de traitement de matrices polluées semble envisageable à long terme. Elle ne sera possible que si les fonctions responsables de la stabilité et de la plasticité de ces structures sont étudiées, comprises et exploitées. Ces consortiums pourront être construits sous forme de biofilms associés à des grains de sable ou des billes de matériaux divers. La compréhension des processus d'auto-structuration qui génèrent par exemple les « granules d'anaérobiose » dans certaines méthodes de traitement des eaux usées pourront aussi fournir des pistes intéressantes pour la construction de communautés microbiennes organisées. Ces technologies semblent envisageables pour le traitement d'effluents de composition constante. En revanche, l'utilisation de consortiums définis pour le traitement de matrices hétérogènes n'est concevable que si la communauté est fortement stabilisée, par exemple par des processus d'encapsulation.

7/ Outils moléculaires et diagnostic et de suivi

Une dimension essentielle des opérations de bioaugmentation est la capacité à pouvoir détecter et quantifier la présence de gènes, de souches, d'espèces, de genres voire de familles de micro-organismes dans l'environnement à traiter. Avant de commencer quoi que ce soit, il importe de réaliser un diagnostic des fonctions et des micro-organismes présents afin de caractériser la flore microbienne initiale du système et de déterminer ce qu'il convient d'ajouter ou de stimuler. Ensuite, tout au long du traitement, il est évidemment fondamental de pouvoir suivre spécifiquement la présence et le développement des micro-organismes que l'on a introduits afin de vérifier leur persistance et/ou l'expression de voies métaboliques impliquées dans la dépollution du sol. Pendant le traitement, un suivi dédié de l'espèce microbienne ajoutée, permet également si nécessaire de mettre en oeuvre des actions favorables au développement du micro-organisme d'intérêt comme le réensemencement ou l'addition de substrats. En parallèle, afin de mesurer l'impact de la bioaugmentation sur le sol, il est nécessaire d'avoir une vision globale des populations microbiennes présentes dans la matrice traitée et de pouvoir suivre leur évolution au cours du traitement. Enfin, au terme du chantier, et même au-delà, il est également important de pouvoir dresser un état microbiologique de la matrice traitée. Diverses techniques de biologie moléculaire permettent aujourd'hui de répondre aussi bien aux besoins de quantification des micro-organismes, qu'à l'étude de l'expression de leur génome pour vérifier la présence d'activités métaboliques utiles à la dépollution.

7.1/ Méthodes quantitatives de recherche d'ARN et d'ADN cibles.

Les méthodes décrites dans ce paragraphe sont des méthodes de PCR ou des méthodes qui font directement appel à cette méthodologie. Pour rappel, la PCR (Polymerase Chain Reaction) est une réaction enzymatique qui permet l'amplification d'une séquence nucléotidique (tronçon d'ADN ou d'ARN) généralement choisie pour sa spécificité envers un genre bactérien, une espèce, ou encore une activité enzymatique. La séquence nucléotidique amplifiée est généralement de l'ADN mais peut aussi être de l'ARN, dans ce dernier cas une étape préliminaire de rétro-transcription est nécessaire, c'est pourquoi on parle alors de RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR). Il existe différents types d'ARN, mais les ARN les plus étudiés sont les ARNm messagers (ARNm), car ils permettent d'identifier les activités métaboliques exprimées par une cellule (activité potentiellement utiles pour la dépollution par exemple). Les ARN ribosomiques (ARNr) sont également beaucoup étudiés pour l'identification des micro-organismes, en particulier les ARNr 16S. Les étapes de PCR nécessitent un pré-traitement de l'échantillon qui consiste à extraire, purifier et concentrer les acides nucléiques présents dans un échantillon (de sol par exemple). Le terme d'extrait est utilisé pour définir la solution d'acides nucléiques purifiés obtenue au terme de ce prétraitement.

Dans le mécanisme de PCR, à partir de l'extrait issu d'un échantillon, chaque copie de la séquence nucléotidique cible est reproduite au cours d'une polymérisation en chaîne. De plus, chaque reproduction de la séquence génétique ciblée peut à son tour être copiée de sorte que le nombre de copies augmente de façon exponentielle. La reproduction des séquences nucléotidiques est basée sur un mécanisme enzymatique contrôlé par une succession de cycles de température. Les thermocycleurs sont des appareils qui permettent d'automatiser le processus. Les méthodes de PCR sont utiles pour quantifier le nombre de séquences nucléotidiques cibles initialement présentes dans un échantillon, pour apporter des informations sur la diversité de populations bactériennes, ou encore pour vérifier l'expression d'une activité métabolique précise (laquelle correspond à l'expression d'un gène c'est à dire à l'expression d'une séquence nucléotidique).

Depuis plusieurs années, des méthodes précises et éprouvées de quantification d'acides nucléiques (ARN et d'ADN), essentiellement basées sur la PCR, sont disponibles pour l'analyse des populations biologiques et l'analyse des activités métaboliques qui s'expriment via l'étude de l'expression des gènes. La publication de Ding et Cantor (2004) passe en revue cinq d'entre elles. En conservant la terminologie anglaise, il s'agit de 2 méthodes de PCR quantitatives (Real-time PCR, Real competitive PCR) et de 3 autres méthodes qui découlent également de la méthode de PCR (Microarrays, différentiel display, SAGE) et qui permettent d'obtenir une représentation de la diversité microbienne d'un échantillon.

- Real-time PCR (ou qPCR) : Cette méthodologie PCR est une méthode quantitative qui permet de visualiser en temps réel, l'amplification d'un ADN cible caractéristique d'une espèce microbienne ou d'une activité métabolique éventuellement présentes dans un échantillon (un morceau d'un gène d'intérêt par exemple). Différents procédés peuvent être utilisés pour associer un signal fluorescent dont l'intensité augmente proportionnellement à l'accroissement du nombre de copies de la séquence cible. En parallèle, afin de constituer une gamme d'étalonnage des quantités connues et croissantes d'ADN cibles sont également amplifiées. Sur la base de l'interprétation de la cinétique de la fluorescence et notamment à partir d'un paramètre discriminant nommée Ct, la gamme étalon ainsi obtenue est utilisée pour quantifier le nombre de séquences cibles initialement présentes dans l'extrait et donc dans l'échantillon.

- Real competitive PCR : Dans le cadre de la PCR compétitive, la quantification est tout comme dans le cas de la PCR en temps réel, assurée par un étalon. Cependant, cet ADN étalon n'est pas utilisé pour réaliser une gamme, il est au contraire directement ajouté en quantité connue (ajout dosé) dans le mélange réactionnel dans lequel sera également ajouté l'extrait d'acides nucléiques issus de l'échantillon. L'ADN étalon amplifié en parallèle est le même que celui qui est recherché mais il porte une modification (addition ou perte d'un site de restriction, délétion d'une partie de la molécule) qui permet de le distinguer au terme de la réaction PCR. Ce type de PCR est qualifié de PCR compétitive car pendant leur amplification respective, l'ADN étalon et l'ADN cible de l'échantillon, utilisent les mêmes réactifs, c'est pourquoi l'ADN étalon est également nommé ADN compétitif. En fin de réaction PCR, les quantités d'ADN étalon et d'ADN cible sont mesurées ; la quantité d'ADN étalon introduite en début de PCR étant parfaitement connue, il est ainsi possible de déduire la quantité d'ADN cible initialement présente dans l'extrait et donc dans l'échantillon.
- Microarrays (puces à ADN) : Il s'agit de supports de petites tailles (quelques cm² au maximum) compartimentés en différentes zones accueillant chacune une grande quantité d'une séquence cible spécifique et immobilisée en surface. Le nombre de zones différentes est très important de sorte que pour chaque puce un grand nombre de séquences cibles sont disponibles. Les séquences cibles immobilisées dans chaque zone, sont capables de s'hybrider avec les produits amplifiés, correspondant à des gènes ou à des ARN messagers présents dans l'échantillon. De plus, dans cette méthode, l'amplification des acides nucléiques libérés par l'échantillon conduit à l'incorporation de nucléotides fluorescents. Après amplification, les produits amplifiés ainsi rendus fluorescents, sont mis en contact avec les différentes zones de la puce à la surface desquels ils resteront fixer (par hybridation) s'ils rencontrent une séquence cible complémentaire préalablement immobilisée sur la puce. Au terme de la manipulation, la fluorescence des produits amplifiés piégés sur la puce permet de mettre en évidence les séquences cibles effectivement présentes dans l'échantillon analysé, ceci permettant par exemple de mettre en évidence différentes espèces microbiennes ou bien l'expression de différentes activités métaboliques.
- Differential display : il s'agit d'une technique qui s'applique aux ARN messagers (ARNm) et qui cible donc l'expression des gènes. Afin d'obtenir des produits amplifiés de nature différente selon les ARNm initialement présents, la méthode s'appuie d'une part sur une caractéristique spécifique aux ARNm (polyadénilation de l'une de leur extrémité) et d'autre part sur la PCR. Le differential display utilise à la fois une étape de transcription reverse et une étape de PCR, et permet ainsi de comparer l'expression de gènes dans deux situations différentes.
- SAGE (serial analysis of gene expression) : c'est également une méthode de quantification des ARN messagers, donc de l'expression des gènes. Elle a pour avantage de ne pas nécessiter la sélection de séquences cibles préalablement identifiées.

L'examen de l'applicabilité de ces méthodes à des situations de bioaugmentation demande un commentaire préalable. Il concerne la stabilité de l'ADN et des ARN messagers dans les environnements réels. La plupart des ARN messagers sont des molécules à demi-vie très courte. Elles sont rapidement dégradées dans des cellules mortes ou lorsqu'elles se trouvent à l'extérieur de cellules. En revanche, les molécules d'ADN sont souvent très stables, elles pourraient dans des conditions favorables se maintenir très longtemps dans l'environnement après la mort ou la lyse des cellules. L'utilisation *in situ* de méthodes de quantification d'acides nucléiques sera donc fonction de ce qui est recherché : la simple présence de tel gène ou groupe taxonomique ou bien l'activité de ce gène (sa transcription) ou de ce groupe taxonomique (l'expression de ses gènes). Dans le premier cas, l'analyse du « métagénome » (l'ensemble des gènes présents à l'intérieur et à l'extérieur des cellules) peut être réalisée par des PCR dirigées contre l'ADN. La seconde alternative implique de rechercher des ARN messagers, ce qui n'est possible qu'en isolant les cellules vivantes présentes au moment du prélèvement et en extrayant leurs ARN, ce qui est nettement plus délicat à mettre en oeuvre.

Dans les deux situations, le recours aux technologies de puces à ADN est envisageable. Mais il implique soit de disposer de puces commercialisées porteuses des gènes recherchés, soit de les construire soi-même. A notre connaissance, il n'y a pas encore eu d'utilisation de ces technologies dans des situations réelles de bioaugmentation. Si des fonctions ou des organismes précis devaient être systématiquement recherchés dans un grand nombre de chantiers de bioremédiation, il est probable que l'émergence d'un tel marché justifie le développement de puces appropriées.

En revanche, les méthodes de PCR quantitatives (qPCR), qui regroupent la « real-time PCR » et la « real competitive PCR », sont déjà largement utilisées dans le domaine de l'écologie microbienne. Leur application à la bioaugmentation est donc effective. Ce sont des méthodes très sensibles qui permettent la détection d'une espèce donnée (grâce aux "signatures" présentes dans les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S)

ou de gènes particuliers (gènes portés par des plasmides conjugatifs, gènes codant pour des enzymes d'intérêt).

De nombreuses études ont été consacrées aux populations de *Dehalococcoides* capables de déhalogéner de nombreux contaminants. Des méthodes de qPCR ont été utilisées pour mettre en évidence et pour quantifier ce type de bactéries (voir la revue de Cupples, 2008) en ciblant les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S. Afin d'éviter les problèmes de faux-positifs qui pourraient résulter de la présence de bactéries possédant la même signature au niveau de l'ARN 16S, certaines études ont également porté sur la présence et l'expression des gènes codant pour trois « reductive dehalogenases » (RDases) de ces bactéries.

Lee *et al.* (2008), dans le cadre d'une étude de bioaugmentation, ont utilisé des méthodes de qPCR dirigées à la fois contre les ARN ribosomiques 16 S et contre les ARN messagers des trois gènes de RDases pour suivre l'évolution et l'activité des populations de *Dehalococcoides* pendant un an dans une nappe phréatique contaminée.

Les méthodes de qPCR ont également été utilisées pour détecter et quantifier des bactéries de l'espèce *Geobacter lovleyi* proches de la souche SZ connue pour ses propriétés de bioremédiation dans des nappes contaminées par du tétrachloroéthène ou de l'uranium hexavalent (Amos *et al.*, 2007). Les auteurs de cette étude ont ainsi pu estimer le nombre de ces bactéries dans toute une série de prélèvements, depuis des niveaux inférieurs au seuil de détection jusqu'à des valeurs de l'ordre de 10^7 par litre d'eau.

Ces exemples nous paraissent démontrer et valider la pertinence de l'utilisation des techniques de PCR quantitative pour le diagnostic et le suivi des chantiers de bioaugmentation. Concernant les méthodologies de « Microarrays », de « différentiel display », ou « SAGE » qui permettent d'obtenir une représentation de la diversité microbienne d'un échantillon, l'applicabilité de ces méthodes au domaine de la bioremédiation reste encore à montrer. Ces méthodes devront notamment permettre de faire la différence entre des variations normales des populations susceptibles d'intervenir spontanément et des variations réellement significatives entraînées par l'action menée.

7.2/ Méthodes d'évaluation des populations basées sur le polymorphisme des ARN ribosomiques.

Les ADNr codent pour les ARN ribosomiques. Contrairement à d'autres séquences d'ADN, au fil du temps la séquence des ADNr n'est affectée que par très peu de mutations stables, de sorte qu'au sein de micro-organismes proches (entre deux espèces d'un même genre bactérien par exemple), les séquences de ces ADNr ne diffèrent que par quelques nucléotides. Ainsi, au sein des molécules d'ADN ribosomiques de toutes les espèces de bactéries et d'eucaryotes, il existe des régions variables qui constituent de véritables signatures des différents niveaux taxonomiques. Cette caractéristique est utilisée en biologie moléculaire, ainsi des PCR sont réalisées sur des séquences d'ADNr potentiellement variables mais délimitées de part et d'autre par des régions particulièrement constantes. Il est ainsi possible à partir de PCR « standardisées » de mettre en évidence le polymorphisme de l'ADNr 16S lequel permet d'identifier par exemple les différents groupes taxonomiques de bactéries présents dans un échantillon. Nous avons retenu deux méthodes de biologie moléculaire qui permettent d'exploiter ce polymorphisme pour visualiser la diversité des organismes présents dans un prélèvement. La méthode DGGE et T-RFLP constituent deux outils majeurs pour l'étude de la biodiversité microbienne.

- La méthode DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

Après extraction de l'ADN total d'un prélèvement, l'amplification par PCR de certains segments des gènes codant pour les ARN ribosomiques est réalisée. Les amplifiats, dont les séquences varient plus ou moins en fonction de la diversité des espèces microbiennes présentes, sont alors soumis à électrophorèse sur gels dénaturants caractérisés par un gradient de la concentration d'un agent chimique (DGGE) ou de température (TGGE). Dans un premier temps, pendant l'électrophorèse, les produits amplifiés migrent plus ou moins rapidement sous l'action du champ électrique appliqué entre les deux extrémités du gel. Dans cette première phase leur vitesse de migration est essentiellement fonction de leur taille, mais au fur et à mesure de leur progression l'augmentation de la température ou de la concentration en agent dénaturant entraîne une ouverture progressive des molécules d'ADN dont la migration dans le gel est alors ralentie ou stoppée. La DGGE permet donc de discriminer des produits amplifiés de tailles différentes comme des produits amplifiés de tailles identiques mais de séquences nucléotidiques différentes. Après coloration des ADN emprisonnés dans le gel, ces d'électrophorèses fournissent un véritable code-barre caractéristique de la population microbienne présente dans le prélèvement.

Ces méthodes ont été très largement utilisées en écologie microbienne. A titre d'exemple, Haack *et al.* (2004) ont utilisé la méthode DGGE pour suivre les variations spatiales et temporelles des micro-organismes d'une nappe phréatique contaminée à la suite de recharges. Ils ont ainsi pu observer des effets différents des recharges en fonction de la localisation des communautés microbiennes au sein des zones contaminées. Même si elles ne sont pas quantitatives, ces méthodes permettent donc de suivre l'évolution globale des populations et leur utilité pour le suivi de processus de bioaugmentation est manifeste.

- T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism).

Cette méthode est basée sur l'amplification par PCR d'un fragment particulier des gènes codant pour les ARN ribosomiques 16S suivie de la digestion des molécules obtenues par une enzyme de restriction et de l'observation du polymorphisme de taille des fragments de restriction terminaux après migration sur gel d'électrophorèse. La taille des fragments terminaux est fonction du nombre de nucléotide entre l'extrémité et le premier site de reconnaissance de l'enzyme de restriction utilisée. La taille de ces fragments varie notamment d'une espèce à l'autre. La révélation permet de mettre en évidence uniquement les fragments terminaux des produits amplifiés qui sont du fait du principe de la méthode les seuls à être marqué en fluorescence ; elle permet d'obtenir un profil qualitatif des organismes présents dans les prélèvements.

Reid *et al.* (2008) ont utilisé cette méthode pour suivre pendant 201 jours les populations microbiennes présentes dans un fermenteur pilote de 1 m³ traitant efficacement des effluents d'industries papetières en supportant des variations de leur composition et oxygénation. Pour chaque prélèvement, l'ADN total de la communauté microbienne a été préparé puis soumis à une analyse de T-RFLP. Pour cela, des oligonucléotides dirigés contre des régions constantes des gènes d'ARN ribosomique 16S flanquant des régions variables ont été utilisés pour amplifier ces régions variables par PCR. L'oligonucléotide constituant l'extrémité 5' des molécules amplifiées était marqué par un colorant fluorescent. Après digestion par l'enzyme HhaI, les fragments ont été déposés sur gels et soumis à électrophorèse. La taille (à la paire de base près) et l'intensité de chaque fragment 5' terminaux ont ensuite été déterminés. L'analyse des résultats a permis d'identifier 38 "terminal restriction fragments" (TRFs) importants, c'est-à-dire présent dans au moins deux prélèvements avec une abondance relative supérieure à 0,4 %. Le caractère présence/absence et l'intensité de chacun de ces fragments dans les différents prélèvements a permis de générer pour chacun d'eux un véritable code-barre. Malgré d'importants changements dans la composition et l'oxygénation de l'effluent, ces code-barres ont subi assez peu de modifications au cours du temps, ce qui a permis de conclure à la stabilité globale de la population microbienne.

Dans un deuxième temps, les auteurs ont cloné et séquencé les régions variables des gènes d'ARN 16S présents dans deux de leurs prélèvements. Ils appartiennent à des espèces non cultivables proches d'espèces déjà détectées dans des eaux usées, des sols ou des écosystèmes aquatiques. Trois « operational taxonomic units » (OTUs), c'est-à-dire des fragments dont on ne sait pas s'ils sont une signature de l'espèce, du genre ou de la famille, ont été détectés au cours de cette partie de l'étude parce que largement représentés dans certains prélèvements. Ils ont ensuite fait l'objet d'une analyse par qPCR. Pour cela, des fragments de gènes d'ARN 16S qui leur sont spécifiques ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADN total de chaque prélèvement. Après électrophorèse et coloration, les fragments d'ADN correspondant à chaque OTU ont pu être quantifiés par référence à un ADN de concentration connue. Cette analyse a ainsi permis de suivre de manière très fine l'évolution de la quantité de chacun de ces trois OTU tout au long des 201 jours de l'étude. Le premier OTU est caractérisé par une fluctuation assez importante mais est toujours présent, alors que les deux autres ne sont présents que pendant une durée limitée (pics de 30 à 50 jours).

On constate donc dans cette étude que lorsque l'analyse porte sur espèces (ou des genres ou des familles) précises, par qPCR, des fluctuations relativement importantes peuvent être mises en évidence à l'intérieur d'une stabilité globale mesurée par T-RFLP.

7.3/ Méthodes d'évaluation des populations basées sur le polymorphisme des phospho-lipides.

La méthode PLFA (Phospho-Lipid Fatty Acids) a été très utilisée pour des applications de terrain. A l'inverse de l'ADN, les phospho-lipides sont rapidement dégradés dans l'environnement. Leur analyse par chromatographie en phase gazeuse, après extraction par des solvants appropriés, permet donc de dresser un état de la biomasse active (à l'exception notable des Archaeobactéries). Il s'agit d'une technique qui est surtout

utilisée pour obtenir un profil, à la fois qualitatif et quantitatif, des populations en présence. Elle pourrait aussi permettre de détecter des espèces ou des souches particulières.

Ringelberg *et al.* (2008), par exemple, l'ont utilisée dans deux situations de bioremédiation concernant des sites militaires pollués soit par des hydrocarbures soit par du hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX). Dans le premier cas, ils ont pu corréliser la biomasse microbienne viable et l'abondance relative des bactéries Gram-négatives à la concentration en hydrocarbures. Dans le second, ils ont appliqué des conditions d'humidité différentes à des zones contaminées. Ils ont constaté que la saturation en eau augmentait la biodégradation du RDX, diminuait le nombre des espèces détectées et augmentait la proportion de Protéobactéries et de Firmicutes.

7.4/ Conclusions

En 2005, dans le cadre du "Strategic Environmental Research and Development Program" et du "Environmental Security Technology Certification Program", le Département de la Défense des Etats-Unis avait publié un rapport intitulé "Research and development needs for the environmental remediation application of molecular biological tools" (DoD, 2005). Il passait en revue les techniques qui viennent d'être décrites. Deux d'entre elles - qPCR et PLFA - étaient créditées d'une mention "High" en termes de fréquence d'utilisation lors de travaux de bioremédiation. De nombreux laboratoires d'analyses environnementales les proposent déjà en routine. En revanche, les techniques DGGE et T-RFLP étaient gratifiées d'une mention "Low", notamment pour leur manque de possibilités de quantification. La même mention était attribuée à la technique FISH (Fluorescent *In-Situ* Hybridization) qui a été assez peu appliquée à des situations de terrain. Elle a pourtant l'avantage de permettre la détection et la quantification d'organismes d'intérêt. Il est cependant nécessaire de disposer d'une sonde spécifique (dirigée contre une région particulière de l'ARN ribosomique 16S) pour chaque type de micro-organismes recherché, ce qui est encore limitant aujourd'hui. De plus, cette méthode ne permet pas de détecter les organismes de petites taille (moins de 0,4 microns) qui sont très communs dans des milieux pauvres en nutriments.

8/ Conclusion générale

Au terme de cette étude bibliographique, nous pouvons dégager quelques conclusions à partir des travaux de traitement par bioaugmentation de diverses matrices contaminées. La dégradation des xénobiotiques dans les eaux usées doit être achevée durant le temps de résidence dans le système de traitement. Ainsi, le simple fait de la présence d'une dégradation potentielle au sein d'un système d'eaux usées n'est pas suffisant. L'ajout de micro-organismes comme un outil potentiel pour augmenter la vitesse de dégradation ou accroître le potentiel de dégradation dans les eaux usées ne peut être encore considéré comme une procédure agréée.

Pour le traitement des matrices liquides, la technique de bioaugmentation est généralement utilisée avec succès sur des polluants retirés de leur site d'origine, comme par exemple dans des installations municipales de traitement des eaux usées. Malgré son succès, l'inoculation et la propagation de micro-organismes introduits dans les eaux souterraines ou de surface contaminées, est mal perçue. Jusqu'à présent, cette méthode a été freinée, en raison de la difficulté de contrôler les conditions pour optimiser la croissance des micro-organismes introduits.

Pour les sites contaminés, beaucoup de progrès ont eu lieu au cours des dernières années se traduisant par l'amélioration de l'assainissement des polluants présents. La bioaugmentation est une technique de plus en plus utilisée, mais d'autres méthodes comme le recours à des micro-organismes immobilisés ou l'enrichissement direct pourraient augmenter le taux de succès de cette approche. En outre, plusieurs autres approches de bioaugmentation, y compris la bioaugmentation par transfert de gène (plasmide), la bioaugmentation rhizosphérique, et la phytoaugmentation, sont actuellement au stade de développement, et pourraient élargir considérablement l'éventail d'applications de cette technique. L'avantage des techniques biologiques de traitement dont la bioaugmentation reste le maintien des propriétés physicochimiques, voire biologiques des sols. Ces techniques se sont largement développées ces dernières années, car elles sont efficaces, peu coûteuses, et s'adressent à un grand nombre de polluants organiques ou non, même si le traitement est souvent plus long que par les techniques conventionnelles, et ne peut s'appliquer qu'à des concentrations modérées en polluants.

Ainsi, les travaux relatifs à la bioaugmentation peuvent être classés en deux catégories. La première est celle que nous qualifierons de travaux de laboratoire. Réalisés à petite échelle, le plus souvent dans des enceintes fermées, avec des inoculum caractérisés ou non, ils font presque toujours état de résultats positifs en matière de détoxification. Ces travaux sont menés par des chercheurs, avec des méthodes scientifiques, mais sont souvent loin des considérations de terrain.

La deuxième catégorie est celle des études en situations réelles. Les méthodes y sont moins « scientifiquement » paramétrées. Par ailleurs, ces travaux sont souvent réalisés par des petites sociétés possédant des moyens limités, ce qui peut conduire parfois à avoir des inoculum peu caractérisés, une prise en compte du devenir des micro-organismes négligeable, pas de témoins négatifs et pas d'optimisation des méthodes.

Cette dichotomie est évidemment un peu schématique mais il y a un réel besoin à considérer ces deux extrêmes. Seuls des moyens très importants pourraient permettre la mise en place de structures capables de s'engager dans des chantiers d'envergure en se basant à la fois sur la caractérisation du matériel biologique issu des laboratoires et sur les compétences et connaissances des acteurs de terrain. Des associations temporaires pourraient être considérées. Elles seraient dédiées à la mise en place d'un chantier spécifique, à son étude préalable et à son suivi pendant plusieurs années.

Avant d'envisager de tels chantiers, il faudra s'interroger sur la pertinence du recours aux techniques de bioaugmentation, en général et en examinant chaque cas particulier envisagé. L'hétérogénéité des environnements concernés et les variations pouvant influencer des paramètres critiques comme l'humidité, la prédation microbienne et la disponibilité de nutriments pèsent *a priori* sur l'efficacité attendue de tels traitements. Au terme de cette étude, il semble que si des souches données peuvent se maintenir et se multiplier dans un milieu pollué et si elles sont capables d'accéder au polluant et de le dégrader, leur introduction devrait aboutir à une décontamination effective du milieu.

Le type de souches à utiliser nous paraît plus problématique. Nous avons vu que des inoculum composés de souches naturelles ont été disséminés dans diverses études de bioremédiation avec des résultats variables. Le recours à des souches d'OGM ou l'utilisation de souches améliorées par génie génétique *in vivo* nous semble difficile à envisager dans l'immédiat au vu des contraintes techniques existantes et du contexte réglementaire actuel. L'introduction de ces « nouvelles » bactéries dans l'environnement comporte un risque de modification d'un certain équilibre au sein des écosystèmes.

Le scénario suivant pour la conduite d'un chantier de bioaugmentation pourrait être envisagé :

Chaque cas étant particulier, la première étape consisterait en un état des lieux à la fois en terme de géographie, de nature de la matrice, de polluants et de populations microbiennes. Cet état des lieux devrait permettre de déterminer comment et où collecter les échantillons permettant de mesurer l'efficacité du traitement et comment et où inoculer les micro-organismes. L'ensemencement doit-il être continu, intermittent ou unique ?

Il conviendrait de relever en divers points la « signature » des populations microbiennes autochtones (voir chapitre 7) et de chercher à isoler et identifier un certain nombre de souches cultivables présentes dans la matrice polluée. Des souches résistantes au polluant, voire même capables de le dégrader, pourraient alors être rapidement obtenues. Les méthodes moléculaires permettent aujourd'hui d'en quantifier la présence dans le milieu. Il serait donc possible de suivre le devenir de ces souches qui représenteraient les outils potentiels *a priori* les plus adaptés pour la bioaugmentation.

Une première étude de terrain pourrait alors être entreprise. Elle consisterait à inoculer ponctuellement des petites parcelles soit avec des souches et consortiums disponibles avant l'étude (à partir des laboratoires et du commerce), soit avec les souches isolées de la matrice contaminée et marquées de manière à pouvoir en quantifier la présence. L'évolution des concentrations en polluant, de la présence des micro-organismes introduits et des populations microbiennes totales seraient alors suivies pendant une année sur le site de l'inoculation et dans son voisinage. Cette première étude préalable permettrait ainsi de définir plus précisément la composition des inoculums et la manière de les introduire dans la matrice. Des témoins négatifs seraient évidemment réalisés et l'addition de nutriments pourrait être envisagée. Les conditions les plus favorables seraient alors testées dans une deuxième étude préalable, elle aussi d'une durée d'un an.

Pour qu'un inoculum ou toute autre forme impliquée dans la technique de bioaugmentation soient efficaces, les organismes doivent atteindre le contaminant. Cet objectif peut être obtenu lors de travaux d'excavation et de mélange avec l'inoculum, mais aussi par la propagation par exemple lors de la colonisation racinaire des plantes présentes sur le site.

Ces deux phases permettraient de définir les conditions réelles à l'échelle du chantier et de favoriser sa mise en route. Tout au long de son déroulement, les points et périodicités d'inoculations et de collectes d'échantillons seraient optimisés. Au terme de cette période active, les paramètres décisifs (concentrations en polluant, micro-organismes introduits et populations microbiennes totales) continueraient à être suivis pendant plusieurs années avant de pouvoir dresser un bilan définitif de l'étude.

9/ Références bibliographiques

A

- Ackerley D. F., Barak Y., Lynch S. V., Curtin J. and Matin A. 2004. Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 188, 3371-3381.
- Al-Awadhi H., Al-Hasan R. H. Sorkhoh N. A., Salamah S. and Radwan S. S. 2003. Establishing oil-degrading biofilms on gravel particles and glass plates. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51, 181-185.
- Alluri H.K., Ronda S.R., Settalluri V. S., Bondili J. S., Suryanarayana V. and Venkateshwar P. 2007. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. *African Journal of Biotechnology* 6, 2924-2931.
- Andrews J. S., Mason V. P., Thompson I. P., Stephens G. M. and Markx G. H. 2005. Construction of artificially structured microbial consortia (ASMC) using dielectrophoresis: examining bacterial interactions within environmental biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 64, 96-106.
- Amos B. K., Sung Y., Fletcher K. E., Gentry T. J., Wu W. M., Criddle C. S., Zhou J. and Löffler F. E. 2007. Detection and quantification of *Geobacter lovleyi* strain SZ: implications for bioremediation at tetrachloroethene- and uranium-impacted sites. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6898-6904.
- Andreoni V., Baggi G., Colombo M., Cavalca L., Zangrossi M. and Bernasconi S. 1998. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by a specialized organism and by indigenous soil microflora: bioaugmentation and self-remediability for soil restoration. *Letters in Applied Microbiology* 27. 86-92.
- Ang E. L., Zhao H. and Obbard J. P. 2005. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. *Enzyme and Microbial Technology* 37, 487-496.
- Aubert C., Lojou E., Bianco P., Rousset M., Durand M-C., Bruschi M., and Dolla A. 1998. The *Desulfuromonas acetoxidans* triheme cytochrome c7 produced in *Desulfovibrio desulfuricans* retains its metal reductase activity. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1308-1312
- Ayotamunoa M. J., Okparanmaa R. N., Nwenekaa E. K., Ogajib S. O. T. and Probertb S. D. 2007. Bio-remediation of a sludge containing hydrocarbons. *Applied Energy* 84, 936-943.

B

- Bang S. W., Clark D. S., and Keasling J. D. 2000, Engineering hydrogen sulfide production and cadmium removal by expression of the thiosulfate reductase gene (*phsABC*) from *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3939-3944.
- Behki R., Topp E., Dick W. and Germon P. 1993. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1955-1959.
- Bijmans M. F.M. 2008. Sulfate Reduction under Acidic Conditions for Selective Metals Recovery. Thèse de Doctorat. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Bradley P. M. 2000. Microbial degradation of chloroethenes in groundwater systems. *Hydrogeology Journal* 8, 104-111.
- Boon N., Goris J., De Vos P., Verstraete W., and Top E. M. 2000. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2906-2913.
- Boon N., Top E. M., Verstraete W. and Siciliano S. D. 2003. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1511-1520.
- Boswell C. D., Dick R. E., Macaskie L. E. 1999. The effect of heavy metals and other environmental conditions on the anaerobic phosphate metabolism of *Acinetobacter johnsonii*. *Microbiology* 145, 1711-20.

C

- Canstein H. von, Li Y., Timmis K. N., Deckwer W. D. and Wagner-Döbler I. 1999. Removal of mercury from chloralkali electrolysis wastewater by a mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5279-84.
- Cassidy M. B., Lee H. and Trevors J. T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology* 16, 79-101.
- Cavalca L., Colombo M., Larcher S., Gigliotti C., Collina E., Andreoni V. 2002. Survival and naphthalene-degrading activity of *Rhodococcus sp.* strain 1BN in soil microcosms. *Journal of Applied Microbiology* 92, 1058-1065.
- Chaillan F, Flèche A.L., Bury E., Phantavong Y., Grimont P., Saliot A. and Oudot J. 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology* 155, 587-595.
- Chang J.S. and Chen C.C. 1999. Biosorption of lead, copper, and cadmium with continuous hollow-fiber microfiltration processes. *Separation Science and Technology* 34, 1607-1627
- Chang J.-S., Law R., and Chang C.-C. 1997. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water research* 31, 1651-1658.
- Chen, S. and Wilson. D. 1997. Construction and characterization of *Escherichia coli* genetically engineered for bioremediation of Hg²⁺ contaminated environments. *Applied Environmental Microbiology* 63, 2442–2445.
- Choi H. Y., Ryder M. H., Gillings M. R., Stokes H. W., Ophel-Keller K. M. and Veal D. A. 2003. Survival of a lacZY-marked strain of *Pseudomonas corrugata* following a field release. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 367-374.
- Cheung K.H. and Gu Ji-Dong. 2006. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59, 8-15.
- Contreras A., Molin S., Ramos J. L. 1991. Conditional-suicide containment system for bacteria which mineralize aromatics. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1504-1508.
- Costerton J. W., Lewandowski Z., De Beer D., Caldwell D., Korber D. and James G. 1994. Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology* 176, 2137-2142.
- Cupples A. M. 2008. Real-time PCR quantification of *Dehalococcoides* populations: methods and applications. *Journal of Microbiological Methods* 72, 1-11.

D

- Daar A. S., Thorsteindottir H., Martin D. K., Smith A. C., Nast S. and Singer P. A. 2002. Top ten biotechnologies for improving health in developing countries. *Nature Genetics* 32, 229-232.
- Da Silva M. L. B. and Alvarez P. J. J. 2004. Enhanced anaerobic biodegradation of btex-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8), 4720-4726.
- Davison J. 2005. Risk mitigation of genetically modified bacteria and plant designed for bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32, 639-650.
- Dejonghe W., Goris J., El Fantroussi S., Höfte M., De Vos P., Verstraete W. and Tops E. M. 2000. Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3297-3304.
- Domde P., Kapley A. and Purohit H. J. 2007. Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater-containing hydrocarbons. *Environmental Science and Pollution Research* 14, 7-11.
- Dechesne A., Pallud C., Bertolla F. and Grundmann G. L. 2005. Impact of the microscale distribution of a *Pseudomonas* strain introduced into soil on potential contacts with indigenous bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8123-8131.
- Desjardin V, 2002, Reduction du Cr(VI) par la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50, thèse de Doctorat, Ecole doctorale de Chimie de Lyon, 236 p.
- Di Toro S., Zanaroli G. and Fava F.. 2006, Intensification of the aerobic bioremediation of an actual site soil historically contaminated by polychlorinated biphenyls (PCBs) through bioaugmentation with a non acclimated, complex source of microorganisms. *Microbial Cell Factories* 2006, 5-11.
- Diels, L., Dong, Q., Van der Lelie, D., Baeyens, W. and Mergeay, M. 1995. The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *Journal of Industrial Microbiology* 14. 142-153.
- Ding C. and Cantor C. R. 2004. Quantitative analysis of nucleic acids - the last few years of progress. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37, 1-10
- Domde Pravin, Kapley Atya, Purohit Hemant J. 2007. Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater-containing hydrocarbons, *Environmental Science and Pollution Research Int.* 14, 7-11.
- Dos Santos E. O. Centeno da Rosa C. F. Tavares dos Passos C., Ladeira Sanzo A. V. de Medeiros Burkert J. F. Kalil S. J. and Veiga Burkert C. A. 2008. Pre-screening of filamentous fungi isolated from a contaminated site in Southern Brazil for bioaugmentation purposes. *African Journal of Biotechnology* 7, 1314-1317.
- Duhamel M. Mo K. and Edwards E A. 2004. Characterization of a highly enriched *Dehalococcoides*-containing culture that grows on vinyl chloride and trichloroethene. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5538-5545.
- Duran, M., Tepe, N., Yurtsever, D., Punzi, V.L., Bruno, C. and Mehta, R.J. 2006. Bioaugmenting Anaerobic Digestion of Biosolids with Selected Strains of *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Actinomyces* Species for Increased Methanogenesis and Odor Control. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 960-966.
- Dybas M. J., Tataro G. M. and Criddle C. S. 1995. Localization and characterization of the carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp. strain KC. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 758-762.

E

El Fantroussi S. and Agathos S. N. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation. *Current Opinion in Microbiology* 8, 268-275.

ESTCP (Environmental Security Technology Certification Program), 2005, Bioaugmentation for remediation of chlorinated solvents: Technology, Development, Status and Research needs, GeoSyntec Consultants, 88 p.

F

Favre D. and Viret J. F. 2006. Biosafety evaluation of recombinant live oral bacterial vaccines in the context of the European regulation. *Vaccine* 24, 3856-3864.

Feakin, S.J., E. Blackburn, and R.G. Burns. 1995. Inoculation of granular activated carbon in a fixed bed with s-triazine-degrading bacteria as a water treatment process. *Water Research* 29. 819-825.

Fiedler H. 1997. Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Uses and Environmental Releases. http://www.chem.unep.ch/pops/POPs_Inc/proceedings/cartagena/FIEDLER1.html

Francis A. J. and Dodge C. J. 1988. Anaerobic Microbial Dissolution of Transition and Heavy Metal Oxides. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1009–1014.

Fritsche W. and Hofrichter M. 2000. Aerobic degradation by microorganisms. *Bio/Technology* 11b, 145-167.

G

- Gadd G.M. 2000. Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 271-279.
- Ganguli, A., Tripathi, A.K., 2002. Bioremediation of toxic chromium from electroplating effluent by chromate-reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2Chr in two bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 416-420.
- Gannon J. T. Manilal V. B. and Alexander M. 1991. Relationship between Cell Surface Properties and Transport of Bacteria through Soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 190-193.
- Gentry, T. J., Rensing C., and Pepper. I. L. 2004. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34, 447-494.
- Ghosh P. K., Philip L. and Bandyopadhyay M. 2001. Anaerobic treatment of atrazine bearing wastewater. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 36, 301-16.
- Giardina M. C. Giardi M. T. and Filacchioni G. 1982. Atrazine Metabolism by *Nocardia*: Elucidation of Initial Pathway and Synthesis of Potential Metabolites. *Agricultural and Biological Chemistry* 46, 1439-1445.
- Giddings G. 1998. Tansley review no. 99. The release of genetically engineered micro-organisms and viruses into the environment. *New Phytologist* 140, 173-184
- Goldberg M., Pribyl T., Juhnke S. and Nioes D. H. 1999. Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *Journal of Biological Chemistry* 274, 26065-26070
- Groster A. and Edwards E. A. 2006. Growth of *Dehalobacter* and *Dehalococcoides* spp. during degradation of chlorinated ethanes. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 428-436.

H

Haack S. K., Fogarty L. R., West T. G., Alm E. W., McGuire J. T., Long D. T., Hyndman D. W. and Forney L. J. 2004. Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge-influenced chemical gradients in a contaminated aquifer. *Environmental Microbiology* 6, 438-448.

Hage J.C. 2004. Application of *Pseudomonas* sp. strain DCA1 for the removal of chlorinated hydrocarbons. Thesis Wageningen University, 2004, Wageningen, The Netherlands.

Hartmann A. 2004. Populations microbiennes impliquées dans la dégradation accélérée de quelques molécules modèles : apports de l'écologie moléculaire et perspectives en biorémediation. XXXVe congrès du Groupe Français des Pesticides. Session 3 : Des produits dégradables.

Hebting Y., Schaeffer P., Behrens A., Adam P., Schmitt G., Schneckenburger P., Bernasconi S. M. and Albrecht P. 2006. Biomarker evidence for a major preservation pathway of sedimentary organic carbon. *Science* 312, 1627-1631.

Hirsch P. R. 2004. Release of transgenic bacteria - Rhizobia as a case study. *Plant and Soil* 266, 1-10.

Hubert C., Shen Y. and Voordouw G. 1999. Composition of toluene-degrading microbial communities from soil at different concentrations of toluene. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3064-3070.

Hyman M. R. Russell S. A. Ely R. L. Williamson K. J. and Arp D. J. 1995. Inhibition, inactivation, and recovery of ammonia-oxidizing activity in cometabolism of trichloroethylene by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1480-1487.

I

Idris A. and Ahmed M. 2004. Treatment of polluted soil using bioremediation – A review. *Malaysian Journal of Science* 23, 193-201.

Ilori M. O., Amund O. O., Ezeani C. J., Omoijahina S. and Adebusoye S. A. 2006. Occurrence and growth potentials of hydrocarbon degrading bacteria on the phylloplane of some tropical plants. *African Journal of Biotechnology* 5, 542-545.

Iqbal J., Metosh-Dickey C. and Portier R. J. 2007. Temperature effects on bioremediation of PAHs and PCP contaminated South Louisiana soils: a laboratory mesocosm study. *Journal of Soils and Sediments* 7, 153-158.

J

Jeong B. C., Hawes C., Bonthron K. M. and Macaskie L. E. 1997. Localization of enzymatically enhanced heavy metal accumulation by *Citrobacter* sp. and metal accumulation in vitro by liposomes containing entrapped enzyme. *Microbiology* 143, 2497-2507.

Jensen L. B., Ramos J. L., Kaneva Z. and Molin S. 1993. A substrate-dependent biological containment system for *Pseudomonas putida* based on the *Escherichia coli* *gef* gene. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3713-3717.

Jessee J. A. Benoit R. E. Hendricks A. C. Allen G. C. and Neal J. L. 1983. Anaerobic degradation of cyanuric acid, cysteine, and atrazine by a facultative anaerobic bacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 97-102.

Jiang H-L., Maszenan A. M. and Tay J-H. 2007. Bioaugmentation and coexistence of two functionally similar bacterial strains in aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 1191-1200.

Johnsen A. R. and Karlson U. 2007. Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 533-543.

K

- Kalogerakis N., 2006, Bioaugmentation – Is it really needed for the bioremediation of contaminated sites ? Conference in Protection 2006 – Proceedings of Protection and restoration of the environment, Mykonos, Greece, 1-8.
- Kanally R. A. and Harayama S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology* 182, 2059-67.
- Kane, A, Vidumsky J., Major D. and Bauer N. In-situ Bioremediation of a Chlorinated Solvent Residual Source in Unconsolidated Sediments and Bedrock Using Bioaugmentation, Proceedings of the 19th Annual International Conference on Soils, Sediments, and Water, University of Massachusetts at Amherst, October 2003.
- Keasling J. D., Van Dien S. J., Trelstad P., Renninger N. and McMahon K. 1999. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. *Biochemistry* 65, 324-331.
- Kikuchi T., Iwasaki K., Nishihara H., Takamura Y. and Yagi O. 2001. Quantitative and specific detection of a trichloroethylene-degrading methanotroph, *Methylocystis* sp. strain M, by a most probable number-polymerase chain reaction method. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 65, 2673-2681.
- Kim S-J. 2003. Bioaugmentation for the remediation of pesticide-contaminated soil with microorganisms directly enriched in soil or compost. Thesis. Ohio State University, Environmental Science.
- Kim J. and Rhee G. 1997. Population dynamics of polychlorinated biphenyl-dechlorinating microorganisms in contaminated sediments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 1771-1776.
- Klasson K.T., Reeves M.E., Evans B.S. and Dudley C.A. 1994. Sequential anaerobic-aerobic degradation of indigenous PCBs in a contaminated soil matrix. Seventh International Symposium on Gas, Oil and Environmental Biotechnology. Colorado.
- Kuiper I., Lagendijk E. L., Bloemberg G. V. and Lugtenberg B. J. J. 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 6-15.
- Kulkarni M. and Chaudhari A. 2007. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: an overview. *Journal of Environmental Management* 85, 496-512.

L

- Lee M. D., Odom J. M. and Buchanan R. J. 1998. New perspectives on microbial dehalogenation of chlorinated solvents: insights from the field. *Annual Review of Microbiology* 52, 423-452.
- Lee P. K. H., Macbeth T. W., Sorenson K. S., Deeb R. A. and Alvarez-Cohen L. 2008. Quantifying genes and transcripts to assess the in situ physiology of "*Dehalococcoides*" spp. in a trichloroethene-contaminated groundwater site. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2728-2739.
- Lejeune P., Mergeay M., Van Gijsegem F., Faelen M., Gerits J. and Toussaint A. 1983. Chromosome transfer and R-prime plasmid formation mediated by plasmid pULB113 (RP4::mini-Mu) in *Alcaligenes eutrophus* CH34 and *Pseudomonas fluorescens* 6.2. *Journal of Bacteriology* 155, 1015-1026.
- Lestan D. and Lamar R. T. 1996. Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2045-2052.
- Little C. D., Palumbo A. V., Herbes S. E., Lidstrom M. E., Tyndall R. L. and Gilmer P. J. 1988. Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 951-956.
- Lloyd, J.R. 2002. Bioremediation of metals; the application of microorganisms that make and break minerals. *Microbiology Today* 29, 67-69.
- Löffler F. E. and Edwards E. A. 2006. Harnessing microbial activities for environmental cleanup. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 274-284.
- Lorah M. M., Majcher E. H., Jones E. J. and Voytek M. A. 2007. Microbial consortia development and microcosm and column Experiments for enhanced bioremediation of chlorinated volatile organic compounds, West Branch Canal Creek Wetland Area, Aberdeen Proving Ground, Maryland.
- Lovley D. R. 2003. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nature Reviews Microbiology* 1, 35-44.
- Lowe K. L., Straube W., Little B. and Jones-Meehan J. 2003. Aerobic and anaerobic reduction of Cr(VI) by *Shewanella oneidensis*: effects of cationic metals, sorbing agents and mixed microbial cultures. *Acta Biotechnologica* 23, 161-178.
- Lu X., Wilson J. T. and Kampbell D. H. 2006. Relationship between *Dehalococcoides* DNA in ground water and rates of reductive dechlorination at field scale. *Water Research* 40, 3131-3140.

M

- MacNaughton S. J., Stephen J. R., Venosa A. D., Davis G. A., Chang Y. J. and White D. C. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 3566-74.
- Mandelbaum R.T., Allan D.L. and Wackett L.P. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 1451-1457.
- Mandelbaum R.T., Wackett L.P. and Allan D.L. 1993. Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 1695–1701.
- Maraha N. 2007. Physiological status of bacteria used for environmental applications. Thesis. Department of Laboratory Medicine. Stockholm. Sweden.
- Mauro J.M. and Pazirandeh M. 2000 Construction and expression of functional multi-domain polypeptides in *Escherichia coli*: expression of the *Neurospora crassa* metallothionein gene *Letters in Applied Microbiology* 30, 161–166.
- Maymo-Gatell X., Tandoi V., Gossett J.M. and Zinder S.H. 1995. Characterization of an H₂-utilizing enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinyl chloride and ethene in the absence of methanogenesis and acetogenesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 3928-3933.
- Merroun M.L., Ben Omar N., Gonzalez-Munoz M.T. and Arias J.M. 1998. *Myxococcus xanthus* biomass as biosorbent for lead. *Journal of Applied Microbiology* 84, 63–67.
- Meyer A. F., Lipson D. A., Martin A. P., Schadt C. W. and Schmidt S. K. 2004. Molecular and metabolic characterization of cold-tolerant alpine soil *Pseudomonas sensu stricto*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 483-489.
- Michon J. 2006. Etude de l'oxydation biologique de l'arsenic As(III) par le consortium bactérien CAsO1 : Mise au point de méthodes de détection et Application à la détoxification d'effluents, Thèse de Doctorat, Université de Limoges, 283 p.
- Mihova S.T. and Godjevargova T. 2001. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions. http://www.ejournalnet.com/Contents/Issue_1/6/6_2001.htm
- Mikszewski A. 2004. Emerging Technologies for the In Situ Remediation of PCB-Contaminated Soils and Sediments: Bioremediation and Nanoscale Zero-Valent Iron. http://www.clu-in.org/download/studentpapers/bio_of_pcbs_paper.pdf
- Mishra S., Jyot J., Kuhad R.C. and Lal B. 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1675-1681.
- Molin S., Boe L., Jensen L. B., Kristensen C. S., Givskov M., Ramos J. L. and Bej A. K. 1993. Suicidal genetic elements and their use in biological containment of bacteria. *Annual Review of Microbiology* 47, 139-166.
- Molina L., Ramos C., Ronchel M. C., Molin S. and Ramos J. L. 1998. Construction of an efficient biologically contained *Pseudomonas putida* strain and its survival in outdoor assays. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2072-2078.
- Moslemy P., Guoit S. R. and Neufeld R. J. 2002. Production of size-controlled gellan microbeads encapsulating gasoline-degrading bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 10-18
- Muller D., Lièvreumont D., Simeonova D.D., Hubert J.C., Lett M.C. 2003. Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant β -Proteobacterium. *Journal of Bacteriology* 185, 135-141.
- Müller J. A., Rosner B. M., von Abendroth G., Meshulam-Simon G., McCarty P. L. and Spormann A. M. 2004. Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4880-4888.
- Muneer Bushra. 2005. Role of microorganisms in remediation of heavy metals in the wastewater of tanneries. PhD thesis, University of the Punjab, Lahore.

N

Naz N., Young H. K., Ahmed N., et Gadd G. M. 2005. Cadmium accumulation and DNA homology with metal resistance genes in sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4610 - 4618.

Newby D. T., Gentry T. J. and Pepper I. L. 2000. Comparison of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in soil resulting from bioaugmentation with two different pJP4 donors. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3399-3407.

Nies, D.H. 1992. CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology* 174, 8102–8110.

Niu H., Xu X. S., Wang J. H. and Volesky B. 1993. Removal of lead from aqueous solutions by penicillium biomass. *Biotechnology and Bioengineering* 42, 785-787.

Noussibotche B. 2004. Systèmes de résistance au nickel et au cobalt chez les bactéries, Mémoire de Master 2, Université Claude Bernard Lyon 1, 28 p.

O

Odokuma L. O. and Dickson A. A. 2003. Bioremediation of a crude oil polluted tropical rain forest soil. *Global Journal of Environmental Sciences* 2, 29-40.

Okoh A. I. and Trejo-Hernandez M. R. 2006. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: exploiting the bioremediation strategies. *African Journal of Biotechnology* 5, 2520-2525.

Otte, M. P., Gagnon J., Comeau Y, Matte N., Greer C. W. and Samson R. 1994. Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/creosote contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40, 926-932.

Ouyang Wei, Liu Hong, Murygina V., Yu Yongyong, Xiu Zengde, Kalyuzhnyi S. 2005. Comparison of bioaugmentation and composting for remediation of oily sludge: A field-scale study in China, *Process Biochemistry* 40, 3763-3768.

P

Park, C. H., Keyhan, M., Wielinga, B., Fendorf, S. and Matin, A. 2000. Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1788-1795.

Pepper I. L., Gentry T. J, Newby D. T, Roane T. M. and Josephson K. L. 2002, The role of cell bioaugmentation and gene bioaugmentation in the remediation of co-contaminated soils. *Environmental Health Perspectives* 110(Suppl 6), 943–946.

Perron K., Caille O., Rossier C., van Delden C., Dumas J. L. and Köhler T. 2004. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*., *Journal of Biological Chemistry* 279, 8761-8768

Pilon-Smits E. A. H. and Freeman J. L. 2006. Environmental clean up using plants: biotechnological advances and ecological considerations. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4, 203-210.

Q

R

- Rajeshwari K. V., Balakrishnan M., Kansal A., Lata K. and Kishore V. V. N. 2000. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Review* 4, 135-156.
- Ramos-Gonzalez M. I., Duque E. and Ramos J. L. 1991. Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3020-3027.
- Ranjan Basu P. 2005. Evaluation of biological treatment for the degradation of petroleum hydrocarbons in a wastewater treatment plant. Thesis. Texas A&M University.
<http://txspace.tamu.edu/bitstream/handle/1969.1/2418/etd-tamu-2005A-CVEN-Basu.pdf?sequence=1>
- Rashmi K., Naga Sowjanya T., Maruthi Mohan P., Balaji V. and Venkateswaran G. 2004. Bioremediation of ⁶⁰Co from simulated spent decontamination solutions. *Science of the Total Environment* 328, 1-14.
- Reid N. M., Bowers T. H. and Lloyd-Jones G. 2008. Bacterial community composition of a wastewater treatment system reliant on N₂ fixation. *Environmental Microbiology* 79, 285-292.
- Rhine E. D., Garcia-Dominguez E., Phelps C. D. and Young L. Y. 2005. Environmental microbes can speciate and cycle arsenic, *Environmental Science and Technology* 39, 9569-9573.
- Riess R. N. 2006. Mass transfer and bioremediation of pahs in a bead mill bioreactor. Thesis. University of Saskatchewan. Saskatoon.
<http://library2.usask.ca/theses/available/etd-03282006-122723/unrestricted/FINAL.pdf>
- Ringelberg D., Richmond M., Foley K. and Reynolds C. 2008. Utility of lipid biomarkers in support of bioremediation efforts at army sites. *Journal of Microbiological Methods* 74, 17-25.
- Ripp S., Nivens D. E., Ahn Y., Werner C., Jarrel J., Easter J. P., Cox C. D., Burlage R. S. and Sayler G. S. 2000. Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control. *Environmental Science & Technology* 34, 846-853.
- Roane T. M., Josephson K. L., and Pepper I. L., 2001, Dual-bioaugmentation strategy to enhance remediation of cocontaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3208-3215.
- Robinson J. B. and Tuovinen O. H. 1984. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiology Reviews* 48, 95-124.
- Ronchel M. C., Ramos L. B., Jensen B., Molin S. and Ramos J. L. 1995. Construction and behaviour of biologically contained bacteria for environmental applications in bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2990-2994.
- Ronchel M. C. and Ramos J. L. 2001. Dual system to reinforce biological containment of recombinant bacteria designed for rhizoremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2649-2656.
- Romanenko, V.I. and Korenkoy, V.N. 1977. A pure culture of bacterial cells assimilating chromates and bichromates as hydrogen acceptors when grown under anaerobic conditions. *Mikrobiologiya* 46, 414-417.

S

- Sayler G. S. and Ripp S. 2000. Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation process. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 286-289.
- Salanitro J. P. 2001. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil. *Advances in Agronomy* 72, 53-105.
- Seetharam C., Suvarna S., Udas A. C., Rao A. S. Sudersenan M. and Apte S. K. 2005. Phosphatase mediated bioremediation of Cadmium. 16th Annual Conference of the Indian Nuclear Society (INSAC-2005). Mumbai November 16-18, 2005.
- Semprini L., Dolan M. E., Mathias M. A., Hopkins G. D. and McCarty P. L. 2007. Laboratory, field and modeling studies of bioaugmentation of butane-utilizing microorganisms for the in situ cometabolic treatment of 1,1-dichloroethene, 1,1-dichloroethane, and 1,1,1-trichloroethane, *Advances in Water Resources* 30, 1528-1546.
- Shao Z. Q. and Behki R. 1995. Cloning of the genes for degradation of the herbicides EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine from *Rhodococcus* sp. strain TE1. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2061-2065.
- Silva M. C. L., Barbosa C. M. B. M., Silva V. L., Pons M. N. and Motta Sobrinho M. A., 2005, Evaluation of Bacterial Biomasses for the Pollution Treatment of the Derby-Tacaruna Canal, 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, Costa Verde, Brazil, 1-9.
- Silver S. and Phung L. T., 2005, Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 599 - 608.
- Simon M. A., Bonner J. S., Page C. A., Townsend R. T., Fuller C. B., Mueller D. C., and Authenrieth R. L., 2004, Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland. *Ecological Engineering* 22, 263-277.
- Smith A., Hristova K., Wood I., D. Mackay, Lory E. and Scow K. M. 2005. Comparison of biostimulation versus bioaugmentation with bacterial strain PM1 for treatment of groundwater contaminated with methyl tertiary butyl ether (MTBE). *Environmental health practitioner* 113, 317-332.
- Stoodley P., Sauer K., Davies D. G. and Costerton J. W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* 56, 187-209.
- Strong L. C., McTavish H., Sadowsky M. J. and Wackett L. P. 2000. Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase. *Environmental Microbiology* 2, 91-98.
- Struthers J. K., Jayachandran K. and Moorman T. B. 1998. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3368-3375.
- Suzuki T., Miyata N., Horitsu H., Kawai K., Takamizawa K., Tai Y. and Okazaki M. 1992. NAD(P)H-dependent chromium (VI) reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1: a Cr(V) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). *Journal of Bacteriology* 174, 5340-5345.

T

Tani K., Muneta M., Nakamura K., Shibuya K. and Nasu M. 2002. Monitoring of *Ralstonia eutropha* KT1 in groundwater in an experimental bioaugmentation field by in situ PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 412-416.

Tappeser B. Jäger M. and Eckelkamp C. 1998. Survival, persistence, and transfer: an update on current knowledge on GMOs and the fate of their recombinant DNA.

<http://www.oeko.de/english/gentech/gmo.html>

Thiem S. M., Krumme M. L., Smith R. L. and Tiedje J. M. 1994. Use of molecular techniques to evaluate the survival of a microorganism injected into an aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1059.

Tlusty B. 1999. In Situ Bioremediation of Trichloroethylene. *Restoration & Reclamation Review*.

<http://horticulture.cfans.umn.edu/vd/h5015/99fpapers/tlusty.htm>

Top E. M. and Springael D. 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 14. 262-269.

Topp E. and Hanson R. S. 1990. Degradation of pentachlorophenol by a *Flavobacterium* species grown in continuous culture under various nutrient limitations. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 541-544.

Topp E., Mulbry W. M., Zhu H., Nour S. M., and Cuppels D. 2000b. Characterization of S-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. Isolated from agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3134-3141

Topp E., Zhu H., Nour S. M., Houot S., Lewis M. and Cuppels D. 2000a. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. Isolated from Canadian and French agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2773-2782

Torres B., Jaenecke S., Timmis K. N., Garcia J. L. and Diaz E. 2003. A dual lethal system to enhance containment of recombinant micro-organisms. *Microbiology* 149, 3595-3601.

Trindade P. V. O., Sobral L. G., Rizzo A. C. L., Leite S. G. F., Lemos J. L. S., Millioli V. S., Soriano A. U., 2002, Evaluation of the Biostimulation and Bioaugmentation Process of Petroleum Hydrocarbons Contaminated Soil, 9th Annual International Petroleum Environmental Conference, Nouveau Mexique.

U

Urgun-Demirtas M., Stark B. and Pagilla K. 2006. Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for the bioremediation of contaminants. *Critical Reviews in Biotechnology* 26, 145-164.

US EPA. 1997. Emerging Technologies for the In Situ Remediation of PCB-Contaminated Soils and Sediments: Bioremediation and Nanoscale Zero-Valent Iron.

http://www.clu-in.org/download/studentpapers/bio_of_pcbs_paper.pdf

US EPA. 2004. Literature Review on the Use of Bioremediation Agents for Cleanup of Oil-Contaminated Estuarine Environments. 61 p. (EPA/600/R-04/075)

<http://www.epa.gov/nrmrl/pubs/600r04075/600r04075.pdf>

- Van der Gast C. J., Whiteley A. S., Starkey M., Knowles C. J. and Thompson I. P. 2003. Bioaugmentation strategies for remediating mixed chemical effluents. *Biotechnology Progress* 19, 1156-61.
- Van Limbergen H., Top E. M. and Verstraete W. 1998. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 16-23.
- Van Veen J. A., Van Overbeek L. S. and Van Elsas J. D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soils. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 121-135.
- Vasileva-Tonkova E. and Galabova D. 2003. Hydrolytic enzymes and surfactants of bacterial isolates from lubricant-contaminated wastewater. *Z. Naturforsch.* 58c, 87-92.
<http://www.znaturforsch.com/ac/v58c/s58c0087.pdf>
- Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* 73, 1163-1172.
- Vieira R. H. S. F. and Volesky B. 2000. Biosorption: a solution to pollution? *International Microbiology* 3, 17–24.
<http://www.im.microbios.org/09march00/05%20Veira.pdf>
- Vinas M., Grifoll M., Sabaté J. and Solanas A. M. 2002. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and capabilities. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28, 252-260.
- Voci, C. J. and Kozar M. S. 2004. Ethanol Biostimulation and Bioaugmentation of a VOC-Impacted Deep Bedrock Aquifer. Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, Battelle Conference, May 2004, Monterey, CA. <http://www.battelle.org/>
- Vogel T. M. 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology* 7, 311-316.

W

- Watanabe K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Microbiology* 12, 237-241.
- Wilson M. and Lindow S. E. 1993. Release of recombinant microorganisms. *Annual Review of Microbiology* 47, 913-944.
- Watts J. E. M., Fagervold S. K., May H. D. and Sowers K. R. 2005. A PCR-based specific assay reveals a population of bacteria within the Chloroflexi associated with the reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *Microbiology* 151, 2039-2046.
- Wenk M., Baumgartner T., Dobovšek J., Fuchs T., Kucsera J., Zopfi J. and Stucki G. 1998. Rapid atrazine mineralisation in soil slurry and moist soil by inoculation of an atrazine-degrading *Pseudomonas* sp. Strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 624-630.
- WS Atkins Environment, 2002, Genetically modified organisms for the bioremediation of organic and inorganic pollutants, Final Report, Centre for Ecology and Hydrology, Oxford, 196 p.
- Wu C. H., Mulchandani A. and Chen W. 2008. Versatile microbial surface-display for environmental remediation and biofuel production. *Trends in Microbiology* 16, 181-188.

X

Y

Yanze-Kontchou C. and Gschwind N. 1994. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 4297-4302.

Yee D. C., Maynard J. A. and Wood T. K. 1998. Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene ortho-monoxygenase constitutively. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 112-118.

Z

Zhu X., Venosa A. D., Suidan Makram T., Venosa A. D. 2004. Literature review on the use of commercial bioremediation agents for cleanup of oil-contaminated estuarine environments, EPA/600/R-04/075, 56 p.

Zhuang W. -Q., Tay J. -H., Maszenan A. M., Krumholz L. R. and Tay S. T.-L. 2003. Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. Letters in Applied Microbiology 36, 251 – 257.

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118879821/PDFSTART>

10/ Annexes

ANNEXE II DE LA DIRECTIVE 90/219/EEC
CRITÈRES DE CLASSIFICATION DES MICRO-ORGANISMES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉS DANS LE
GROUPE I

A. Organisme récepteur ou parental

- non pathogène,
- pas d'agents pathogènes incidents,
- expérience avérée et prolongée d'une utilisation sûre ou barrières biologiques constitutives qui, sans entraver une croissance optimale dans le réacteur ou dans le fermenteur, permettent une survie et une multiplication limitées sans effets négatifs dans l'environnement.

B. Vecteur/Insert

- bien caractérisé et sans séquences nocives connues,
- taille limitée autant que possible aux séquences génétiques nécessaires pour réaliser la fonction voulue,
- ne doit pas augmenter la stabilité de l'organisme résultant dans l'environnement (sauf s'il s'agit d'une exigence de la fonction voulue),
- doit être difficilement mobilisable,
- ne doit pas transférer des marqueurs de résistance à des micro-organismes qui ne sont pas réputés les acquérir naturellement (si une telle acquisition risque de compromettre l'utilisation de médicaments en vue de maîtriser des agents pathogènes).

C. Micro-organismes génétiquement modifiés

- non pathogènes,
- aussi sûrs dans le réacteur ou dans le fermenteur que l'organisme récepteur ou parental, mais avec une survie et/ou multiplication limitées, sans effets négatifs dans l'environnement.

D. Autres micro-organismes génétiquement modifiés qui pourraient être inclus dans le groupe I s'ils remplissent les conditions visées au point C

- ceux construits entièrement à partir d'un seul organisme récepteur procaryote (y compris ses plasmides et virus endogènes) ou à partir d'un seul organisme récepteur eucaryote (y compris ses chloroplastes, ses mitochondries, ses plasmides, mais à l'exclusion des virus),
- ceux constitués entièrement de séquences génétiques provenant de différentes espèces qui échangent ces séquences par des processus physiologiques connus.

ANNEXE II DE LA DIRECTIVE 90/219/EEC
INFORMATIONS REQUISES DANS LA NOTIFICATION

Les notifications de projets de dissémination volontaire visées à l'article 5 et les notifications de projets de mise sur le marché visées à l'article 11 doivent contenir les informations indiquées ci-après.

Tous les points cités ne s'appliquent pas à chaque cas. Chaque notification n'est donc censée répondre qu'au sous-ensemble particulier de considérations correspondant à une situation donnée. Chaque fois qu'il est techniquement impossible ou qu'il n'apparaît pas nécessaire de donner une information, les raisons doivent en être indiquées.

Le degré de précision avec lequel il est demandé de répondre à chaque sous-ensemble de considérations peut également varier selon la nature et l'ampleur de la dissémination envisagée.

La description des méthodes utilisées ou la référence à des méthodes normalisées ou internationalement reconnues devra également figurer dans le dossier, ainsi que le nom du ou des organismes chargés d'effectuer les études.

INFORMATIONS D'ORDRE GÉNÉRAL

A. Nom et adresse du notifiant

B. Informations concernant le personnel et sa formation

1. Nom de la ou des personnes responsables de la planification et de l'exécution de la dissémination, y compris les personnes responsables du contrôle, de la surveillance et de la sécurité, et en particulier nom et qualifications du chercheur responsable.

2. Informations sur la formation et les qualifications du personnel participant à l'exécution de la dissémination.

INFORMATIONS CONCERNANT L'OGM

A. Caractéristiques du ou des organismes a) donneurs b) récepteurs ou c) (le cas échéant) parentaux

1. Nom scientifique.

2. Taxinomie.

3. Autres noms (nom usuel, nom de la souche, nom du cultivar, etc.)

4. Caractéristiques phénotypiques et génétiques.

5. Degré de parenté entre les organismes donneurs et récepteurs ou entre les organismes parentaux.

6. Description des techniques d'identification et de détection.

7. Sensibilité, fiabilité (en termes quantitatifs) et spécificité des techniques de détection et d'identification.

8. Description de la distribution géographique et de l'habitat naturel de l'organisme, y compris des informations sur les prédateurs naturels, les proies, les parasites, les concurrents, les symbiotes et les hôtes.

9. Possibilité de transfert et d'échange génétiques avec d'autres organismes.

10. Vérification de la stabilité génétique des organismes et facteurs affectant cette stabilité.

11. Traits pathologiques, écologiques et physiologiques des organismes:

a) classification du risque selon les règles communautaires en vigueur concernant la protection de la santé humaine et/ou de l'environnement;

b) temps de génération dans les écosystèmes naturels, cycle de reproduction sexuée et asexuée;

c) informations sur la survie, y compris le rythme saisonnier et l'aptitude à former des structures de survie telles que les semences, les spores ou les sclérotés;

d) pathogénicité: infectivité, toxigénicité, virulence, allergénicité, porteurs (vecteurs) d'agents pathogènes, vecteurs possibles, gamme d'hôtes, y compris les organismes non ciblés; activation possible de virus latents (pro-virus); faculté de coloniser d'autres organismes;

e) résistance aux antibiotiques et utilisation potentielle de ces antibiotiques chez les hommes et les organismes domestiques à des fins prophylactiques et thérapeutiques;

f) implication dans les processus biogéochimiques: production primaire, cycle des éléments nutritifs, décomposition de matière organique, respiration, etc.

12. Nature des vecteurs indigènes:

a) séquence;

b) fréquence de mobilisation;

c) spécificité;

d) présence de gènes qui confèrent de la résistance.

13. Historique des modifications génétiques précédentes.

B. Caractéristiques du vecteur

1. Nature et provenance du vecteur.

2. Séquence de transposons, de vecteurs et d'autres segments génétiques non codifiés utilisés pour construire les OGM et y faire fonctionner les vecteurs et inserts introduits.

3. Fréquence de mobilisation du vecteur inséré et/ou capacités de transfert génétique et méthodes de détermination.

4. Informations sur la mesure dans laquelle le vecteur se limite à l'ADN requis pour réaliser la fonction voulue.

C. Caractéristiques de l'organisme modifié

1. Informations concernant la modification génétique:

a) méthodes utilisées pour la modification;

b) méthodes utilisées pour la construction et l'introduction des ondes inserts dans le récepteur ou pour la suppression d'une séquence;

c) description de la construction de l'insert et/ou du vecteur;

d) pureté de l'insert par rapport à toute séquence inconnue et informations sur la mesure dans laquelle la séquence insérée se limite à l'ADN requis pour réaliser la fonction voulue;

e) séquence, identité fonctionnelle et localisation du ou des segments d'acide nucléique modifiés, insérés ou supprimés en question, avec indication, en particulier, de toute séquence nocive connue.

2. Informations sur l'OGM final:

a) description du ou des traits génétiques ou des caractéristiques phénotypiques, et notamment des nouveaux traits et caractéristiques qui peuvent être exprimés ou de ceux qui ne peuvent plus l'être;

b) structure et quantité de l'acide nucléique vecteur et/ou donneur restant dans la construction finale de l'organisme modifié;

c) stabilité de l'organisme en termes de traits génétiques;

- d) taux et niveau d'expression du nouveau matériel génétique. Méthodes et finesse de la mesure;
- e) activité des protéines exprimées;
- f) description des techniques d'identification et de détection, y compris les techniques d'identification et de détection de la séquence et du vecteur insérés;
- g) sensibilité, fiabilité (en termes quantitatifs) et spécificité des techniques de détection et d'identification;
- h) historique des disséminations ou utilisations précédentes de l'OGM;
- i) considérations d'ordre sanitaire:
- iii) effets toxiques ou allergéniques des OGM non viables et/ou de leurs produits métaboliques;
- iii) risques liés au produit;
- iii) comparaison entre la pathogénicité de l'organisme modifié et celle de l'organisme donneur, récepteur ou (le cas échéant) parental;
- iv) capacité de colonisation;
- iv) si l'organisme est pathogène pour les humains ne souffrant pas de déficiences immunitaires:
- maladies provoquées et mécanismes de la pathogénicité, y compris le mode de propagation et la virulence,
 - communicabilité,
 - dose infectieuse,
 - gamme d'hôtes, possibilité d'altération,
 - possibilité de survie à l'extérieur de l'hôte humain,
 - présence de vecteurs ou de moyens de dissémination,
 - stabilité biologique,
 - schémas de résistance aux antibiotiques,
 - allergénicité,
 - existence de thérapies appropriées.

Liste des organismes sur la Liste intérieure des substances (LIS)

Mise à jours : le 29 juin 2006

Arthrobacter globiformis (ATCC 8010) - 30 Avril 1997
Aspergillus awamori (ATCC 22342) - 29 juin 2006
Aspergillus niger (ATCC 9642) - 30 Avril 1997
Aspergillus oryzae (ATCC 11866) - 30 Avril 1997
Bacillus cereus (ATCC 14579) - 30 Avril 1997
Bacillus circulans (ATCC 9500) - 30 Avril 1997
Bacillus licheniformis (ATCC 12713) - 30 Avril 1997
Bacillus licheniformis (ATCC 55406) - 30 Avril 1997
Bacillus megaterium (ATCC 14581) - 30 Avril 1997
Bacillus polymyxa (ATCC 842) - 30 Avril 1997
Bacillus polymyxa (ATCC 55407) - 30 Avril 1997
Bacillus subtilis (ATCC 6051) - 7 Septembre 2005
Bacillus subtilis (ATCC 6051A) - 30 Avril 1997
Bacillus subtilis (ATCC 55405) - 30 Avril 1997
Bacillus thuringiensis (ATCC 13367) - 30 Avril 1997
Candida utilis (ATCC 9950) - 30 Avril 1997
Cellulomonas biazotéa (ATCC 486) - 7 Septembre 2005
Chaetomium globosum (ATCC 6205) - 30 Avril 1997
Enterobacter aérogènes (ATCC 13048) - 7 Septembre 2005
Escherichia hermannii (ATCC 700368) - 18 Mars 1997
Micrococcus luteus (ATCC 4698) - 30 Avril 1997
Nitrobacter winogradskyi (ATCC 25391) - 7 Septembre 2005
Nitrosomonas europaea (ATCC 25978) - 7 Septembre 2005
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 31480) - 30 Avril 1997
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 700370) - 18 Mars 1997
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 700371) - 18 Mars 1997
Pseudomonas dénitrificans (ATCC 13867) - 7 Septembre 2005
Pseudomonas fluorescens (ATCC 13525) - 30 Avril 1997
Pseudomonas fluorescens (ATCC 31483) - 30 Avril 1997
Pseudomonas putida (ATCC 12633) - 30 Avril 1997
Pseudomonas putida (ATCC 31800) - 30 Avril 1997
Pseudomonas putida (ATCC 700369) - 18 Mars 1997
Pseudomonas stutzeri (ATCC 17587) - 7 Septembre 2005
Rhodopseudomonas palustris (ATCC 17001) - 7 Septembre 2005
*Saccharomyces Cerevisiae*1 (Souche F53) - 19 Octobre 2005
Trichoderma reesei (ATCC 74252) - 30 Avril 1997
Souche de *Bacillus amyloliquefaciens* (13563-0) - 24 Juin 1998
Espèce *Bacillus* (16970-5) - 8 Septembre 2004
Souche de *Bacillus subtilis* (11685-3) - 24 Juin 1998
Culture microbienne complexe2 (13637-2) - 24 Juin 1998
Espèce *Nitrobacter* (16969-4) - 8 Septembre 2004
Espèce *Nitrosococcus* (16972-7) - 8 Septembre 2004
Espèce *Nitrosococcus* (16971-6) - 8 Septembre 2004
Espèce *Nitrosomonas* (16968-3) - 8 Septembre 2004
Souche de *Paenibacillus polymyxa* (13540-4) - 24 Juin 1998

1 - Levure sèche active Red Star

2 - Des eaux marines côtières du Gulf du mexique; micro-organismes de forme spirale et en bâtonnet; biotraitement des système de production en champ pétrolifère