

SYNTHESE / EXTENDED ABSTRACT
FRANÇAIS / ENGLISH

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

**STATE OF THE ART ON THE POTENTIAL OF
BIOAUGMENTATION TECHNIQUES IN THE TREATMENT OF
WASTES, SEDIMENTS AND CONTAMINATED SOILS**

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 – 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.

- ✓ En Bibliographie, le document dont est issue cette synthèse sera cité 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

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 among which 100 000 requiring remediation. The technique of bioaugmentation is a possible tool for depollution of these contaminated matrices either directly or at the end of a treatment process.

The objective of this bibliographic review is to examine the real " potentialities " of bioremediation the 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 of bioaugmentation and of its potential risks to human health through contamination by these matrices, by other compartments of the ecosystem (air, groundwater, rivers) and by wild and domestic animals.

The first part describes the national and international legislation on the use of microorganisms (either allochthonous or genetically modified) in the treatment of polluted matrices.

A review of the strategies developed by the micro-organisms to degrade pollutants is then proposed for the two main kinds of molecules encountered in contaminated matrices (organic and metal). Examples of applications in situ and ex situ are also specified.

A critical assessment of the consortia commercialized is developed in a third part in order to reach an advisory opinion on the effectiveness of such kits.

Eventually, the application of genetic engineering in the research of modified strains with capacities of in situ degradation and a synthesis on the molecular techniques used are presented.

KEY WORDS

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

Plus de 2 millions de sites potentiellement pollués existent à travers l'Europe dont 100 000 nécessitant une remédiation. Le recours aux procédés biologiques apparaît comme un outil intéressant pouvant remplacer et/ou seconder les techniques physico-chimiques plus contraignantes et coûteuses. Il existe deux principales approches biologiques : la biostimulation et la bioaugmentation qui inclut l'ingénierie génétique des micro-organismes.

La biostimulation a largement été étudiée et c'est une technique qui a maintenant fait ses preuves. Le principal avantage provient de l'origine indigène des micro-organismes, qui sont donc déjà présents et bien adaptés au milieu. La bioaugmentation consiste quand à elle en l'inoculation de micro-organismes spécifiques soit directement soit après traitement physique ou chimique. Néanmoins, cette technique a ses limites liées à certaines conditions géochimiques, ou la présence de certains co-contaminants qui peuvent empêcher l'action des micro-organismes. Elle peut également s'appuyer sur l'utilisation des organismes génétiquement modifiés. Bien que des expérimentations soient actuellement en cours dans de nombreux laboratoires afin d'isoler les souches qui pourraient être utilisées *in situ*, cette option reste encore très controversée. De plus, peu de documents sont disponibles sur les risques environnementaux et humains dans le cadre de l'application de la technique de bioaugmentation limitant les connaissances sur le sujet. Dans le but d'apporter des réponses claires et détaillées, et afin d'aboutir à un examen critique de l'existant, cette synthèse bibliographique a été réalisée.

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

Concernant l'apport de micro-organismes allochtones, au niveau national, un seul article a été tiré du code de la Santé Publique (article L5139-1) et traite des micro-organismes et des 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. Au contraire de Santé Canada, qui depuis 1999, interdit l'utilisation, la fabrication ou l'importation d'un organisme vivant en vue d'une nouvelle activité lorsque le dit organisme figure sur la Liste Intérieure des Substances (LIS).

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). Pour l'Europe, 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. Deux directives européennes existent pour réglementer les OGM. La directive 90/219/EEC 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.

Une seconde directive 90/220/EEC (abrogée) 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. La majorité des pays membres de l'UE ont introduit ces deux directives dans leur législation.

Etat de l'art sur les techniques de bioaugmentation

La bioaugmentation est une technique de dépollution attractive. 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 (par des contaminants par exemple ou des conditions extrêmes). 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. L'origine des micro-organismes impliquée dans ce procédé peut donc être triple :

1. L'utilisation de micro-organismes isolés et/ou cultivés
2. L'enrichissement direct par des micro-organismes issus d'une matrice contaminée
3. L'utilisation de micro-organismes génétiquement modifiés

Néanmoins, de nombreuses études indiquent que les microorganismes introduits souvent périssent après quelques jours et donc ne permettent pas une décontamination effective bien que des résultats probants ont été montrés en laboratoire. En effet, plusieurs facteurs environnementaux, structuraux et physiologiques vont conditionner d'une part la disponibilité des polluants pour les microorganismes et d'autre part, la capacité de dégradation des populations microbiennes.

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. Si les conditions ne sont pas optimales pour les microorganismes, la biodégradation ne sera pas complète et nécessitera des délais importants.

Pour le traitement des eaux usées, les micro-organismes utilisent les matières organiques solubles dans le flux de déchets comme source de carbone. Toutefois, la bioaugmentation 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. 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. 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. Une autre possibilité serait d'ajouter des organismes contenant des plasmides à larges spectres 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.

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.

Concernant les sols, le succès de la bioaugmentation 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. 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.

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. 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.

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.

Les consortiums commercialisés

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 est composée 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 au niveau européen n'a abouti qu'à un nombre limité d'entreprises spécialisées dans le traitement par bioaugmentation. L'identification de sociétés françaises ou européennes proposant des services de biotraitement est difficile contrairement aux entreprises internationales (US et Canada). D'autre part, l'ensemble des sites officiels des entreprises européennes identifiées ne fournit aucune donnée sur les consortiums utilisés.

Bioaugmentation et génie génétique

Les méthodes de la génétique et de la biologie moléculaire permettent aujourd'hui de construire des souches de micro-organismes utilisables à des fins de bioaugmentation. Il convient cependant de distinguer les souches « OGM » (Organismes Génétiquement Modifiés : leur matériel génétique a été modifié par des processus qui ne se produisent pas dans la nature) et les souches obtenues par génie génétique *in vivo* construites par des techniques naturelles faisant appel à des processus de recombinaison, de transposition et de transferts de plasmides. Ces deux types de méthodes ont permis la construction d'une multitude de souches qui ont donné des résultats positifs en conditions de laboratoire mais qui n'ont pas encore été utilisées en situations réelles. Ainsi, la construction de souches de bioaugmentation par génie génétique *in vivo* semble plus prometteuse que le recours aux méthodes basées sur les manipulations *in vitro* de l'ADN.

Des stratégies de confinement des microorganismes obtenus par génie génétique ont également été développées, mais elles n'ont pas non plus franchi la porte des laboratoires. Elles sont basées sur des constructions génétiques qui déclenchent des fonctions de « suicide » des organismes dès qu'ils quittent l'environnement pour lequel ils ont été programmés. La dissémination de ce type de fonction dans la nature pourrait cependant être considérée comme plus dangereuse que l'utilisation de souches non confinées.

Plusieurs équipes ont recours à des micro-organismes obtenus par génie génétique mais qui, après culture en laboratoire, sont tués avant d'être mis en contact avec la matrice polluée. Des enzymes ou des structures d'adsorption exprimées à la surface des cellules permettent alors un traitement efficace de pollutions spécifiques. Des études *in situ* sont en cours aux Etats-Unis et en Inde et semblent indiquer que cette technique peut être une voie possible dans le traitement des sites contaminés.

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

Dans le cas du traitement de sols pollués, les inoculums microbiens sont le plus souvent 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.

Une première piste intéressante est l'exploitation de la rhizosphère des plantes. Ces dernières, par des interactions encore assez mal comprises, exercent une action structurante et stabilisante sur les populations microbiennes qui vivent au contact de leurs racines. La plantation de végétaux dont la rhizosphère aurait été construite au préalable avec des souches caractérisées pourrait s'avérer efficace dans la mesure où les 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.

D'autre part, 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.

Une autre approche serait celle de l'ensemencement des matrices avec des consortiums microbiens prédéfinis. Dans la nature, les microorganismes vivent le plus souvent dans des communautés hautement structurées et organisées qualifiées de « biofilms » lorsqu'elles sont associées à des surfaces ou de « consortiums » dans le cas d'architectures tridimensionnelles. Ces communautés composées d'organismes appartenant à de nombreuses 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'y organisent spontanément de manière à assumer une véritable répartition des tâches, ce qui augmente les potentialités de l'ensemble.

La conception de consortiums microbiens structurés et composés de souches caractérisées à des fins de traitement de matrices polluées nous 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 à 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.

Outils moléculaires de 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 microorganismes dans l'environnement à traiter. En préambule, 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. 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 microorganismes, qu'à l'étude de l'expression de leur génome pour vérifier la présence d'activités métaboliques utiles à la dépollution.

Deux d'entre elles semblent particulièrement adaptées au suivi de chantiers de bioaugmentation. Il s'agit de :

- La PCR quantitative, une méthode très sensible qui permet 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),
- La méthode PLFA (Phospho-Lipid Fatty Acids), très utilisée actuellement pour des applications de terrain. 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.

Conclusion

Au terme de cette étude bibliographique, plusieurs remarques peuvent être soulignées sur le traitement par bioaugmentation des 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.

L'avantage des techniques biologiques de traitement dont la bioaugmentation est 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 inoculums 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, de ce fait les études rapportées mettent en avant des inoculums 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.

More than 2 million of potentially polluted sites exist through Europe among which 100 000 requiring a remediation. The use of the biological processes seems an interesting tool to replace and/or assist the binding and expensive physico-chemical techniques. Two main biological approaches are used : biostimulation and bioaugmentation which includes the genetic engineering of micro-organisms.

Biostimulation was widely studied and is now a well-recognized technique. The main advantage results from the native origin of micro-organisms, which are thus already present and adapted to the ecosystem. The bioaugmentation consists in the inoculation of specific micro-organisms directly or after physical or chemical treatment of matrix. However, this technique can't be used in some geochemical conditions, or in the presence of some co-contaminants who can prevent the action of the micro-organisms. It can also rely on the use of genetically modified organisms. Although experiments are currently in progress in numerous laboratories to isolate the strains which could be used *in situ*, the use of bioaugmentation is still controversial. Furthermore, few documents are available on the environmental and human risks connected to the application of this technique which limits the knowledge on the subject. In order to bring clear and detailed answers, and to build a critical examination of the current knowledge, this bibliographical synthesis was realized.

Statutory context on the addition of micro-organisms in the treatment of polluted matrices

Concerning the addition of allocthonous micro-organisms in polluted matrices, at the national level, a single article of the public health code (L5139-1 article) deals with the use of micro-organisms and toxin which could present a risk for the public health as well as the products which contain it. However, no text or decree really stipulates the authorized micro-organisms and their way of use. Unlike Health Canada, which since 1999, forbidden the use, the manufacturing or the import of living organisms with the aim of a new activity when the micro-organisms appear on the Internal List of Substances (ILS).

In France, the use in confined environment (laboratory, greenhouse, bio-industry) of genetically modified organisms cannot be made without the authorization of the Committee of the Genetic Engineering. In Europe, member states were obliged to regulate the use of genetically modified micro-organisms, to limit as much as possible the negative effects they can have on human health and on the environment. Two European directives exist to regulate GMO. The directive 90 / 219 / EEC classifies the genetically modified micro-organisms in two categories according to the risk they represent:

- group I: micro-organisms answering the criteria of the appendix II;
- group II: micro-organisms others than those of the group I.

The second directive 90 / 220 / EEC mainly aims at clarifying and making more effective the procedure of voluntary dispersal of authorization and of genetically modified organisms marketing more effective, at limiting this authorization to a duration of 10 renewable years and at introducing a compulsory control after the marketing of GMO. The majority of the member countries of the EU introduced these two directives into their legislation.

State of the art on the techniques of bioaugmentation

The bioaugmentation is an attractive technique of cleanup. Its application is essential in the case where no micro-organism capable of degrading the target compounds is present in the natural community or if the activity of the natural community is inhibited (for instance by contaminants or by extreme conditions). The selection of strains is based on the principle that some micro-organisms are better adapted to specific catabolic activities and environments than others. The origin of the micro-organisms involved in this process can thus be triple:

1. The use of isolated and/or cultivated micro-organisms
2. The direct enrichment by micro-organisms obtained from a contaminated matrix
3. The use of genetically modified micro-organisms

Nevertheless, numerous studies indicate that the micro-organisms introduced often die after some days and thus do not allow an actual decontamination although convincing results were shown in laboratory. Indeed, several environmental, structural and physiological factors affect on the one hand

the availability of pollutants for the micro-organisms and on the other hand, the capacity of degradation of the microbial populations.

In order to be effective, an inoculum or every other shape involved in the technique of bioaugmentation (genetically modified or not), have to reach the contaminant. This objective can be reached during excavation by mixture with the inoculum, but also by the distribution, for example, during the root colonization of the plants present on the site. If the conditions are not optimal for the micro-organisms, the biodegradation will not be complete and will last longer.

For the waste water treatment, micro-organisms use soluble organic matters in the stream of waste as source of carbon. However, the bioaugmentation from genetically modified micro-organisms or from bacteria which can serve as donors of plasmids coding for the enzymes of degradation was little studied. Usually, the natural selection of the micro-organisms the most suited from a complex microflora is used, simply by adaptation of the parameters of the process. To increase the potential of survival of bacteria inoculated in waste water, a selected flora needs the appropriate capacity of degradation, a good tolerance to the co-contaminants, and a natural spatial and temporal abundance. Another possibility would be to add organisms containing plasmids with allowing the conjugation and the exchange of DNA with the various species and genus of bacteria present in the matrix to treat.

The degradation of xenobiotics in waste water must be finished during the time of residence in the system of treatment. So, the presence of a potential degradation within a system of waste water is not sufficient. The addition of micro-organisms as a tool to increase the speed of degradation in waste water cannot be yet considered as an approved method.

Concerning soils, the success of the bioaugmentation remains difficult to predict. The variety of the micro-organisms used, the heterogeneity and the variations of the environment are going to affect the critical parameters like humidity, microbial predation and bioavailability. It is however important to underline the capacity of adaptation of the micro-organisms to the external conditions and which are going to influence the biodegradation. The bioaugmentation is increasingly used, but other methods like the use of immobilized micro-organisms or the direct enrichment could increase efficiency of this approach. Besides, several other kinds of bioaugmentation, including the bioaugmentation by gene transfer (plasmid), the rhizospheric bioaugmentation, and the phytoaugmentation, are currently being developed, and could widen considerably the range of applications of this technique.

The rhizosphere is also thought to facilitate the biodegradation by selecting specific communities involved in the biodegradation, by releasing exudates which can facilitate the co-metabolism (degradation of a pollutant which is not used as source of carbon), by adsorbing pollutants on roots so increasing their bioavailability. The microorganisms of the rhizosphere involved in the biodegradation can be bacteria, free fungus, but also microorganisms associated in symbiosis with roots, which stimulate the growth of plants by improving their mineral nutrition. So, the association of the plants roots with mycorrhizal fungi leads to an increase of the biodegradation of pollutants in the rhizosphere, which would be due to a modification of the microbial communities in the presence of mycorrhiza.

The advantage of the biological techniques like the bioaugmentation remains the preservation of the physico-chemical, even biological properties of soils. These techniques were widely developed recently, because they are effective, little expensive, and address a large number pollutants of organic or not, even if the treatment is often longer than by the conventional techniques, and can be applied only to moderated concentrations in pollutants.

The marketed consortiums

Since the 1980s, the increasing acceptance of bioremediation to treat petroleum hydrocarbons and the industrial waste lead to an increase of the number of microbial inoculums marketed for the bioremediation of ground waters and the contaminated soils. Although some are patented and others not characterized, the great majority of these consortiums consists of common aerobic micro-organisms of soils (for example several genus as *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Phanaerochaetes*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Thiobacillus*, *Arthrobacter* and *Flavobacterium*).

The research at the European level gave birth only to a limited number by specialized companies in the treatment by bioaugmentation. The identification of French or European companies proposing

biotreatment services is difficult contrarily to what is seen in US and Canada. Moreover, all the official sites of identified European companies supply no data on the consortiums used.

Bioaugmentation and Genetic engineering

Genetic and molecular biology methods allow to build useful micro-organisms strains for bioaugmentation. It is however advisable to distinguish the "GMO" strains (Genetically modified organisms: their genetic material was modified by processes which do not occur in the nature) and strains obtained by *in vivo* genetic engineering built by natural techniques using processes of recombination, transposition and plasmid transfers. These two types of methods allowed the construction of a multitude of strains which gave positive results in laboratory conditions but which were not used in real situations yet. So, the construction of strains for bioaugmentation by *in vivo* genetic engineering seems more promising than the use of methods based on *in vitro* manipulations of the DNA.

Confinement strategies of the micro-organisms obtained by genetic engineering were also developed, but they still have not been used out of the laboratories. They are based on genetic constructions which activate functions of "suicide" of the organisms as soon as they leave the environment for which they were programmed. The dispersal of this type of function in the nature could be however considered as more dangerous than the use of not enclosed strains.

Several teams have appeal to micro-organisms obtained by genetic engineering but which, after culture in laboratory, are killed before contact with the polluted matrix. Enzymes or structures of adsorption expressed on the surface of cells allow then an effective treatment of specific pollutions. *In situ* studies are in progress in the United States and in India and seem to indicate that this technique can be a possible way in the treatment of contaminated sites.

Perspectives for the development of new seeding methods for polluted matrices

In the case of the treatment of polluted soils, the microbial inoculums are generally spread by sprinkling or powdering, starting from suspensions or lyophilizates, with or without preliminary tilling. The effectiveness of the treatments of bioaugmentation could be improved either by supporting the penetration of the micro-organisms in the solid matrices or by conditioning the inoculums in the form of structured consortia multi-species.

A first interesting perspective is the exploitation of the rhizosphere. The plants, by interactions still rather unknown, exert a structuring and stabilizing action on the microbial populations which live in contact with their roots. The plantation whose rhizosphere would have been built preliminary with characterized strains could be effective insofar as the plants could themselves exert a role of phyto-remediation and the bacteria associated with their roots are to a certain extent protected from the aggressions of the medium.

Moreover, inoculation and colonization of the plant rhizosphere already present in the soil to be treated could constitute an effective way in for microbes intended for the bioaugmentation.

Another approach is the seeding of the matrix with predefined consortiums. In the nature, the micro organisms live most often in highly structured and organized communities qualified of "biofilms" when associated with surfaces or of "consortiums" in the case of three-dimensional architectures. These communities composed of organisms belonging to many types constitute a form of pluricellularity that, conversely to the one met with plants or animals, authorizes quick and important reorganization according to the variations of the exterior parameters. The cells organize themselves spontaneously so as to achieve an appropriate distribution of the tasks, which increases the potentialities of the whole.

The structured microbial consortium composed of characterized strains adapted to the treatment of polluted matrix seems conceivable on the long range. It will only be possible if the functions responsible of the stability and plasticity of these structures are studied, understood and exploited. These consortiums could be constructed in the form of biofilms associated to grains of sand or to beads of various materials. The comprehension of the processes of auto-structuration that generate for example the "granules of anaerobiose" in some methods of treatment of waste waters also may furnish interesting tracks for the microbial organized community construction. These technologies

seem applicable for the effluent treatment of constant composition. On the other hand, the use of define consortium for the treatment of heterogeneous matrix is conceivable only if the community is strongly stabilized, for example by encapsulation processes.

Molecular tools for diagnosis and monitoring

An essential concern of the operations of bioaugmentation is the capacity to detect and quantify the presence of gene, of strains, of species, of genus and even of families of micro-organisms in the environment to treat. In forewarning, it's important to make a diagnosis of the functions and of the micro-organisms present in order to characterize the initial microbial flora of the system and to determine what needs to be added or stimulated. Next, throughout the treatment, it is fundamental to be able to follow specifically the presence and the development of the organisms that were introduced in order to verify their persistence and/or the metabolic way expression implied in the cleanup of the soil. In parallel, in order to measure the impact of the bioaugmentation, it is necessary to have a global vision of the microbial populations present in the matrix treated and to be able to follow their evolution during the treatment. At last, at the end of the work-site, and even beyond, it is equally important to be able to build a microbiologic state of the treated matrix. Various techniques of molecular biology allow nowadays fulfilling the needs of quantification of the micro-organisms, as well as the study of the expression of their genome to verify the presence of useful metabolic activity to cleanup.

Two of them seem particularly adapted to the monitoring of bioaugmentation work-sites:

- The quantitative PCR, a very sensitive method that allows the detection of a given specie (thanks to the "signatures" present in the genes encoding for the 16Sr RNA) or of special genes (carried genes by conjugate's plasmids, genes encoding for enzymes of interest),
- The method PLFA (phospho-lipid Fatty Acids), commonly used currently for in situ applications. This technique ist especially used to obtain a profile, both qualitative and quantitative of the populations in presence. It could also allow to detect species or special strains.

Conclusion

At the end of this bibliographical study, several remarks can be underlined about the treatment of contaminated matrixes by bioaugmentation. The degradation of xenobiotics in waste waters must be finished during the residence time in the treatment system. Thus, the presence of a potential degradation within a system of polluted waters is not sufficient. The addition of micro-organisms as a potential tool to increase the speed or the potential of degradation in waste waters again cannot be considered as an accepted procedure.

The main advantage of biological techniques of treatment like bioaugmentation is the possibility to maintain the physical-chemical and, in some cases, biological properties of the soils. These techniques have been largely developed recently, for they are effective, not very costly, and address a large number of organic or mineral pollutants. However, the treatment is often longer than by the conventional techniques, and can only applied that to moderate concentrations of pollutant.

Thus, the research related to bioaugmentation can be classified in two categories. The first one we will qualify of laboratory works. Realized to small scale, most often in closed rooms, with inoculums characterized or not, they do almost always state of positive results regarding the *in situ* detoxification. These works are taken by researchers, with scientific methods, but are often far from considerations.

In situ studies constitute the second category. The methods used there are less "scientifically" defined. Besides, these works often are realized by small corporations possessing limited means, therefore these studies are performed with inoculums not which characterized, without taking into account the persistence of the micro-organisms, without control and no optimization of the methods.

This dichotomy is obviously a little schematical but there is a real need to consider these two extreme. Very important means are needed to build a structure able to perform work-sites studies with both characterization of the biological equipment coming from the laboratories and the competences and knowledge of the "in situ" actors. Temporary associations could be considered. They would be

dedicated to the realization of a specific work-site, to its previous study and to its monitoring for several years.