Traitement biologique in situ au sein d'un aquifère de polluants de type ETBE et MTBE

Yves Benoit, Laure Chancerelle, Alain Dumestre, Joanna Falcao Salles, Françoise Fayolle-Guichard, Geneviève Grundmann, Martina Kyselkova, Jeanne Moriniere

▶ **To cite this version:**

Yves Benoit, Laure Chancerelle, Alain Dumestre, Joanna Falcao Salles, Françoise Fayolle-Guichard, et al.. Traitement biologique in situ au sein d'un aquifère de polluants de type ETBE et MTBE. 2. Rencontres nationales de la recherche sur les sites et sols pollués, Oct 2009, Paris, France. pp.NC. ineris-00973363

HAL Id: ineris-00973363
https://ineris.hal.science/ineris-00973363

Submitted on 4 Apr 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Traitement biologique *in situ* au sein d'un aquifère de polluants de type ETBE et MTBE

Yves Benoit [(1)], Laure Chancerelle [(2)], Alain Dumestre [(3)], Joanna Falcao Salles [(4,5,6)], Françoise Fayolle-Guichard [(1)], Geneviève Grundmann [(4,5,6)], Martina Kyselková [(4,5,6)], Jeanne Morinière [(3)]

(1) IFP, Département Biotechnologie, 1-4, avenue Bois-Préau - 92852 Rueil-Malmaison Cedex
francoise.fayolle@ifp.fr

(2) INERIS, Parc Technologique Alata - BP2 - 60550 Verneuil-en –Halatte

(3) SERPOL SA, 2 Chemin du Génie - BP 80 - 69633 Vénissieux Cedex

(4) Université de Lyon - 69622, Lyon

(5) Université Lyon 1 - 69100 Villeurbanne

(6) CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne – 69100 Villeurbanne

Résumé

Le MtBE et l' EtBE sont des composés chimiques utilisés dans les essences reformulées sans plomb. Leurs propriétés physico-chimiques, forte solubilité dans l'eau et faible biodégradabilité naturelle, se traduisent par une accumulation importante dans les eaux souterraines, entraînant des risques de contamination et des problèmes d'utilisation de la ressource. Ces composés sont persistants dans l'environnement et leur toxicité est, par ailleurs, débattue. De ce fait la connaissance de leur devenir dans l'environnement dans les cas de pollutions accidentelles ou chroniques par des essences reformulées, nécessite la mise en place d'études spécifiques.

Le marché de la dépollution des sols et nappes contaminés par ce type de molécules s'appuie aujourd'hui sur des techniques lourdes et coûteuses de traitement hors site. Ces procédés de traitement des eaux sont applicables à des sites à fortes valeurs ajoutées, à zones source bien identifiées, ou à nappe peu profonde, mais pas pour les sites impactés par des pollutions diffuses chroniques, ou encore peu valorisables. Sur tous ces sites en attente de solutions viables, **le développement de procédés biologiques *in situ*** peut représenter une alternative, souvent complémentaire aux traitements classiques.

Les résultats présentés ont été obtenus dans le cadre du projet TISATIE ("*Traitements in situ alternatifs : Traçabilité, Innocuité, Efficacité: Application aux polluants pétroliers type MTBE, ETBE),* financé par le pôle de compétitivité AXELERA au sein d'un groupe d'actions regroupées sous l'entité "VALORSITES". Ce projet vise à proposer et évaluer un procédé biologique de traitement in-situ des pollutions au MtBE et EtBe permettant de générer des produits de (bio)dégradation conformes aux critères d'acceptabilité environnementale. L'originalité de l'approche consiste à intégrer les paramètres chimiques, microbiologiques, écotoxicologiques et hydrologiques. Cela permettra en outre d'améliorer les connaissances sur ces composés, de proposer des outils de suivi de l'état microbiologique des nappes et du sol, et d'intégrer les résultats dans un contexte environnemental quantifié pour permettre ensuite des applications dans d'autres situations.

Le site pilote retenu est un aquifère impacté par une station-service en activité. Il est équipé de 34 ouvrages piézométriques, couvrant, entre autres, les zones situées entre l'amont et l'aval hydraulique, et permettant ainsi des bilans précis et réguliers.

Une première étape a consisté en la caractérisation de la phase en zone source (hydrocarbures en C_{10}/C_{40}), l'hydrogéologie du site et la caractérisation physico-chimique de la nappe aquifère fortement impactée par des éthers, alcools et BTEX dissous, ainsi que la caractérisation microbiologique des différentes zones. Cette première étape a nécessité la mise au point de méthodes appropriées de prélèvements, de dosages et de préparations des échantillons qui seront présentées. Parallèlement, les phénomènes d'atténuation naturelle (dégradation par les flores locales) en cours au sein de l'aquifère ont été évalués par des bilans de masse en polluants et un bilan en accepteurs d'électrons (O_2, NO_3, SO_4, Fe, Mn) entre l'amont et l'aval hydraulique.

Dans la perspective d'essais de bioaugmentation, les capacités des microorganismes autochtones à biodégrader les éthers et les BTEX ont été étudiées par cultures sur des prélèvements réalisés en amont et au coeur du panache contaminée.

L'étude de la biodiversité et de la structure des communautés bactériennes des eaux, réalisée avant traitement grâce à des outils de biologie moléculaire (Puces à ADN 16S) démontre l'impact des polluants (éthers et mono aromatiques) sur les microflores présentes en différents points du panache. Cette approche sera reconduite pendant et après le traitement biologique pour évaluer son impact qualitatif et quantitatif sur la biodiversité et la structure des communautés bactériennes. L'objectif est d'une part de définir des sondes (puce ADN) ciblant plus particulièrement les microorganismes ayant montré des capacités de biodégradation et d'autre part d'évaluer la qualité microbiologique de la nappe comme outil intégrateur après le traitement de dépollution et de définir ainsi des indicateurs bactériens de qualité de la nappe.

En complément des approches physicochimiques et microbiologiques, un suivi écotoxicologique des eaux a été engagé sur un piézomètre fortement impacté. Ce travail a nécessité la mise au point de méthodes appropriées de dosage des COV et de conditionnement des échantillons pour les différents modèles biologiques utilisés (daphnies, cériodaphnies, algues, microtox).

Ces premiers essais font apparaître des effets toxiques significatifs et permettent de proposer l'utilisation des tests d'écotoxicologie comme outils biologiques intégrateurs dans la démarche d'évaluation du procédé de remédiation. Ils vont permettre de juger de l'efficacité de la dégradation, du point de vue environnemental, au cours du processus et à l'issue de celui ci.

Les interactions sol-eau (impact, transfert) seront prises en compte. Les résultats d'analyse de lixiviation des carottes de sols prélevés seront présentés et corrélés par analyse ACP aux résultats des analyses microbiologiques afin d'étudier les éventuels relations entre les polluants (nature, concentration) et les consortia bactériens dans le sol et dans l'eau.

Les résultats présentés intégreront les stratégies développées concernant la caractérisation des impacts environnementaux des matrices contaminées avant, pendant et après traitement : identification et validation des scénarios d'exposition pertinents, sélection d'outils biologiques de monitoring type puce à ADN afin de valider l'innocuité des processus mis en œuvre. La dernière partie de la présentation concernera les résultats des études de remédiation réalisées à l'échelle pilote et préalables au traitement in situ envisagé en fin de projet.

Contexte du projet TISATIE

Afin de respecter les spécifications concernant l'indice d'octane des essences, des additifs tels que les alkyles de plomb étaient ajoutés aux essences par les raffineurs. Or, l'installation de pots catalytiques a conduit à remplacer ces alkyles de plombs, devenus incompatibles par des éthers ; le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE) et l'éthyl *tert*-butyl éther (ETBE) étant les plus employés. L'ETBE est principalement utilisé en Europe (France, Espagne , Allemagne, Belgique, Pays-Bas, ...). Il est ajouté aux essences à raison de 8 à 15% v/v. Outre leur rôle de maintien de l'indice d'octane requis, l'utilisation de ces composés permet de réduire le taux de monoxyde de carbone et d'hydrocarbures imbrûlés à l'échappement. Néanmoins, ces composés se caractérisent par une forte solubilité dans l'eau (MTBE : 40 $g.l^{-1}$ et ETBE : 10 $g.l^{-1}$) ainsi que par une faible biodégradabilité induisant alors des panaches de pollution très importants et persistants lors de contaminations des aquifères par des essences additivées. De plus, leur innocuité est très discutée et leur présence rend de toute façon l'eau imbuvable du fait du goût et de l'odeur forts qu'ils lui confèrent (pour une revue, Fayolle et Monot, 2005).

Le présent projet est financé par le pôle de compétitivité AXELERA (thématique VALORSITES). Il vise, en premier lieu, à améliorer les connaissances sur les composés de type MTBE et/ou ETBE, ceux-ci présentant des caractéristiques potentielles de persistance et/ou de toxicité. Si des données écotoxicologiques et de comportement dans l'environnement sont disponibles pour le MTBE, celles ci sont partielles pour l'ETBE.

Ce projet vise également à proposer des procédés de traitement permettant de dégrader la molécule de façon totale en éliminant les voies métaboliques incomplètes. En effet, le suivi de la disparition de la molécule « mère », suite à un traitement chimique ou biologique, ne présage en rien de la disparition des propriétés préoccupantes pour l'environnement ; les produits de dégradation pouvant être aussi préjudiciables que le composé initial (Ducrocq et al. 1999). L'utilisation d'outils biologiques intégrateurs (tests d'écotoxicité, détermination des capacités de biodégradation et détermination de la diversité microbienne) dans la démarche d'évaluation des procédés de remédiation va permettre de mesurer les effets résiduels et ainsi de s'assurer de l'efficacité des procédés mis en œuvre.

Ce projet, pour atteindre son objectif, a nécessité le regroupement de compétences diverses suivantes:

- Mise en place de méthodologies d'analyse des molécules (MTBE, ETBE) et des sous-produits (alcool *tertio*-butylique ou TBA) : développement de méthodes analytiques de dosage ou vérification de l'adéquation des méthodes existantes par rapport aux concentrations environnementales,
- Mise au point de techniques spécifiques de traitement *in situ*, en mettant en avant les procédés biologiques, peu coûteux, s'appuyant sur les capacités de biodégradation des microorganismes autochtones,
- Développement de stratégies de caractérisation des impacts environnementaux des polluants et de leur(s) produit(s) de dégradation incluant une batterie d'essais écotoxicologiques et la détermination de l'impact écologique (création d'un outil biologique spécifique de type puce à ADN), avant, pendant et après traitement des matrices contaminées
- Expérimentation sur un site industriel pollué prenant en compte les résultats obtenus lors des études décrites ci-dessus, précédée d'une phase pilote qui permettra de faire le choix au laboratoire de la méthode de restauration (biostimulation et/ou bioaugmentation). Le suivi de la dépollution du site sera attesté par la réduction de la masse des polluants et par le suivi de l'impact écotoxicologique et écologique du traitement.

Les partenaires du projet sont SERPOL (coordinateur du projet), IFP (Département Biotechnologie), Université Lyon1 (Laboratoire d'Écologie Microbienne, LEM). L'ensemble du volet "Ecotoxicologie" est effectué par l'INERIS.

Description des méthodes analytiques

- Choix et Caractérisation du site

Le choix du site pilote (station-service en activité) a débuté par une étude de vulnérabilité, la présence d'une pollution par des essences, par du MTBE et de l'ETBE étant le critère fondamental.

Cette étape initiale a nécessité la mise en œuvre de méthodes d'analyses de l'aquifère et/ou du sol. Ces méthodes ont permis de quantifier en différents points du site :

- la charge organique polluante (COT, COD)
- les concentrations en éthers (MTBE, ETBE) et en alcool associé (TBA)
- les hydrocarbures (HC totaux et BTEXs)
- le bilan en accepteurs d'électrons
- les concentrations en métaux, pesticides et organochlorés.

Ces méthodes font appel à plusieurs techniques de chromatographie liquide et gazeuse.

Par ailleurs, le potentiel de transfert à l'eau des polluants étudiés a été évalué par la réalisation de tests de lixiviation effectués sur des carottes de sol.

- Caractérisation physico-chimique de la nappe

Le site a été également caractérisé d'un point de vue hydrogéologique (piézométrie) et, physico-chimique : pH, température, potentiel Redox, teneur en oxygène dissous.

L'ensemble de ces mesures a permis la caractérisation initiale du site, le suivi des tests de biodégradation en fioles et des tests d'écotoxicologie.

- Caractérisation de l'écotoxicité de l'aquifère et des composés résiduels.

Les tests choisis pour l'évaluation du caractère toxique de l'ETBE, du TBA (sous produit de dégradation) et des eaux souterraines contaminées, vis à vis du compartiment aquatique sont les suivants :

-Inhibition de la mobilité d'un microcrustacé : *Daphnia magna*

-Inhibition de la croissance d'une algue verte unicellulaire :*Pseudokirchnierella subcapitata*

-Inhibition de la luminescence d'une bactérie :*Vibrio Fisheri*

Ces essais ont été réalisés selon les normes ISO, suivant des modes opératoires adaptés à des échantillons volatiles (essais en flacons fermés), avec la mise au point d'une méthode de préparation permettant la réoxygénation des échantillons présentant un taux d'oxygène dissous faible pouvant aller jusqu'à l'anoxie.

- Évaluation de la biodégradabilité

L'évaluation de la capacité de dégradation des différents composés, MTBE, ETBE ou TBA ou mélange de BTEXs, est réalisée en inoculant un milieu minéral (MM) avec l'échantillon filtré correspondant à un ensemencement à 10% (v/v) et en ajoutant le substrat (MTBE ou ETBE ou TBA ou mélange de BTEXs) à une concentration de 100 $mg.L^{-1}$. Les cultures sont effectuées dans des flacons fermés avec un bouchon téflonné étanche. La quantité d'oxygène disponible est non limitante (calcul effectué par rapport à la D.Th.O. des substrats introduits). La biodégradation est suivie par prélèvement d'échantillons à la seringue à travers le septum. Ce système évite des pertes par évaporation dues aux ouvertures répétées des flacons pendant des longues périodes d'incubation. Chaque incubation est effectuée en triplicate.

Dans les cas où la biodégradation est observée, un repiquage de la culture obtenue est effectué pour confirmer l'obtention d'un consortium avec des capacités de dégradation pérennes.

- Détermination de la diversité microbienne

*Clonage et séquençage du gène *rrs* : le gène *rrs* est amplifié à partir d'ADN extrait de l'eau prélevée dans les piézomètres, du sol, ou d'une culture d'enrichissement (voir au-delà), par une méthode PCR utilisant des amorces universelles de toutes les bactéries. Cet amplifiat est ensuite cloné dans un vecteur pGEM T-Easy et introduit dans les cellules *E. coli* JM109 Promega (Charbonnières, France). Les gènes *rrs* sont séquencés à partir des clones bactériens chez Agowa (Berlin, Allemagne). La comparaison des séquences obtenues avec

des séquences publiées dans les bases des données par BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) permet d'identifier les bactéries présentes sur le site, ainsi que les populations bactériennes dans les cultures d'enrichissement sur MTBE, ETBE ou TBA.
*Puces à ADN 16S : basé sur une puce prototype déjà disponible (Kyselková 2008 ; Kyselková *et al*., 2008 ; Sanguin *et al*., 2006), cet outil a été enrichi par des sondes ciblant des bactéries connues pour leur capacité de dégradation des composés comme le MTBE, l'ETBE et les BTEX et par des sondes ciblant des bactéries présentes sur le site même (identifiées par clonage/séquençage). Les sondes ont été définies à l'aide du logiciel ARB (Ludwig *et al*., 2004). Les gènes *rrs* amplifiés par PCR, sont marqués en fluorescence au cours d'une transcription *in vitro* (Stralis-Pavese *et al*., 2004), et ensuite hybridés (57˚C, 16h) avec des sondes (oligonucléotides courts) fixées sur une lame aldéhydique (Schott Nexterion AG, Mainz, Germany). Après un lavage, la lame est lue avec un scanner GeneTac LS IV (GenomicSolutions, Huntingdon, UK) à une résolution de 10µm et les images sont traitées et numérisées avec GenePix 4.01 software (Axon, Union City, CA).

Résultats et discussion

Les résultats présentés correspondent au travail effectué pendant les deux premières années du projet (3 ans).

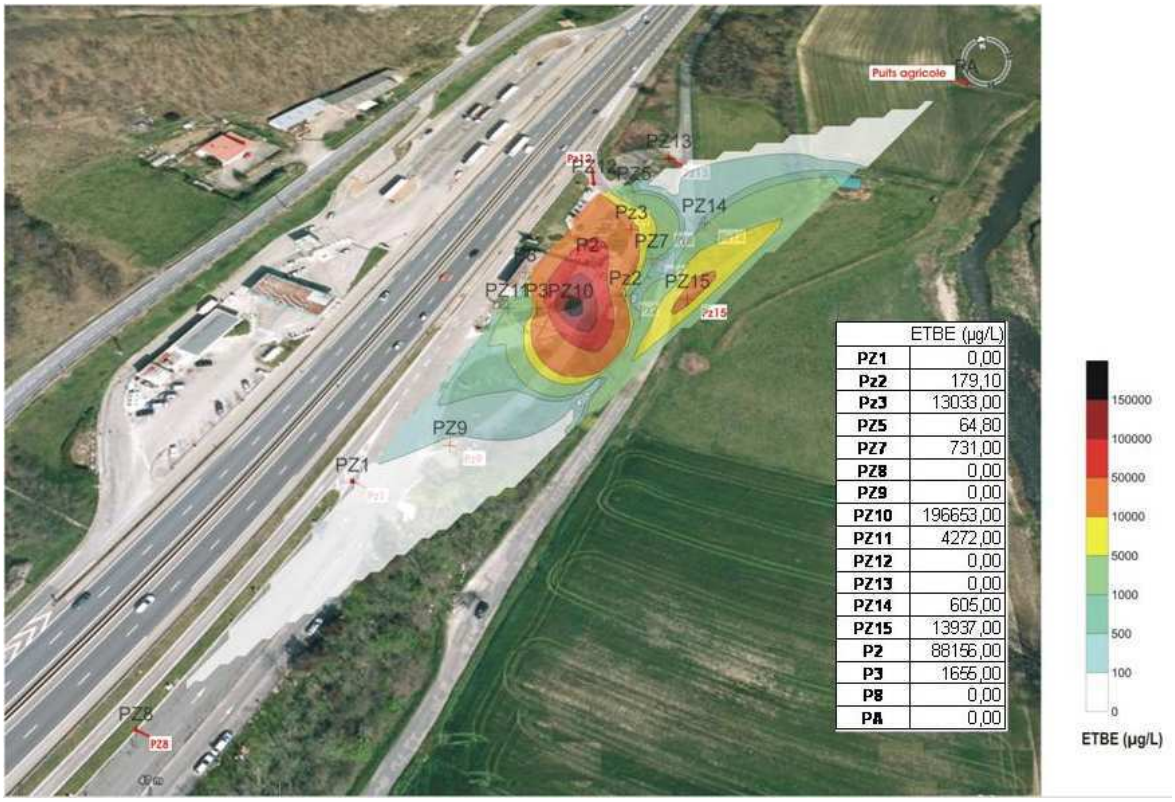
- Description du site choisi et de l'étendue de la contamination

Le site retenu comme pilote a été choisi parmi trois sites proposés en région Rhône-Alpes.
Le site est implanté dans la vallée d'une rivière, affluent du Rhône, sur des alluvions fluviatiles modernes sablo-caillouteuses. Les terrains alluvionnaires reposent sur un substratum rocheux de type gneiss à deux micas. La nappe recoupée au droit du site vers 5 m de profondeur correspond à des eaux circulant dans les terrains limoneux plus perméables juste au dessus du substratum rocheux. La nappe souterraine retrouvée au droit du site correspond donc à la nappe alluviale ou à une nappe en relation avec la nappe alluviale de la rivière. La rivière sera considérée comme vulnérable de par sa proximité et de par la vulnérabilité de sa nappe alluviale.

Les nappes potentiellement vulnérables au droit du site sont donc utilisées pour des usages sensibles (puits agricole n°1) et non sensibles (pu its industriel n°3).

L'identification des sources a mis en évidence une source de pollution par des hydrocarbures, des remblais imbibés d'essence et une source de pollution par des hydrocarbures volatils dans l'air interstitiel des sols.

Concernant les eaux souterraines, la présence de flottant de type gazole/fioul faiblement dégradé et d'essence (hydrocarbures et BTEX dissous) a été observée dans les nappes perchées des remblais et dans la nappe profonde. Les polluants majoritaires dans l'aquifère sont l'ETBE et les BTEXs. Le panache ETBE est présenté (Fig.1) avant traitement du site. Le panache BTEXs est nettement moins étendu et les concentrations mesurées plus faibles.



	ETBE (µg/L)
PZ1	0,00
Pz2	179,10
Pz3	13033,00
PZ5	64,80
PZ7	731,00
PZ8	0,00
PZ9	0,00
PZ10	196653,00
PZ11	4272,00
PZ12	0,00
PZ13	0,00
PZ14	605,00
PZ15	13937,00
P2	88156,00
P3	1655,00
P8	0,00
PA	0,00

Figure 1: Courbes iso-concentrations de l'ETBE sur le site

L'impact en aval hydraulique est visible en direction de la cible identifiée (puits agricole). Les courbes iso concentrations montrent une mobilité différente des éthers (Figure 1) et des BTEX (résultats non présentés).
L'analyse des eaux prélevées au cœur du site (P2) fait apparaître les teneurs suivantes:

- Charge en carbone organique dissous inférieure à 200 $mg.L^{-1}$
- ETBE: 88,1 $mg.L^{-1}$
- MTBE: 0,9 $mg.L^{-1}$
- TBA: 4.2 $mg.L^{-1}$
- BTEX: 3,2 $mg.L^{-1}$
- Hydrocarbures totaux: 11 $mg.L^{-1}$

Par ailleurs, l'analyse en P2 a montré la présence de métaux et notamment d'arsenic (50 µg/l), le seuil admissible de potabilité étant de 10 $\mu g.L^{-1}$ (directive 98/83/CE - Novembre 1998).

A cet endroit, l'aquifère est anoxique, avec un épuisement des accepteurs d'électrons (nitrates et sulfates), anoxie liée à l'activité biologique de microorganismes aérobies autochtones relayée par des microorganismes anaérobies (consommation des nitrates et sulfates.)

Les BTEX sont à la fois des composés solubles et généralement bien dégradés en aérobiose. Il est probable que leur consommation ait abouti à l'anoxie mesurée. Le polluant majoritaire est l'ETBE à une concentration très élevée; on note également la présence de MTBE à une concentration nettement plus faible. Ceci pourrait être la conséquence de l'abandon progressif du MTBE par les raffineurs au profit de l'ETBE. On note également la présence de TBA qui peut être soit un additif lui-même, soit un produit de la dégradation de l'ETBE et/ou du MTBE. Si des capacités de dégradation de l'ETBE sont mises en évidence dans les microcosmes du site, la teneur élevée en ETBE pourrait donc être la conséquence (i) d'une limitation en oxygène de ces microorganismes et (ii) de la forte solubilité de ce composé.

- Comparaison de la toxicité des eaux souterraines prélevées à divers endroits du site :
Les essais d'écotoxicité conduits sur plusieurs points du site mettent aussi en évidence une plus grande toxicité des eaux en cœur de site (P2 et PZ15) par rapport à celles prélevées en amont (PZ1 et PZ9). (Fig. 2)

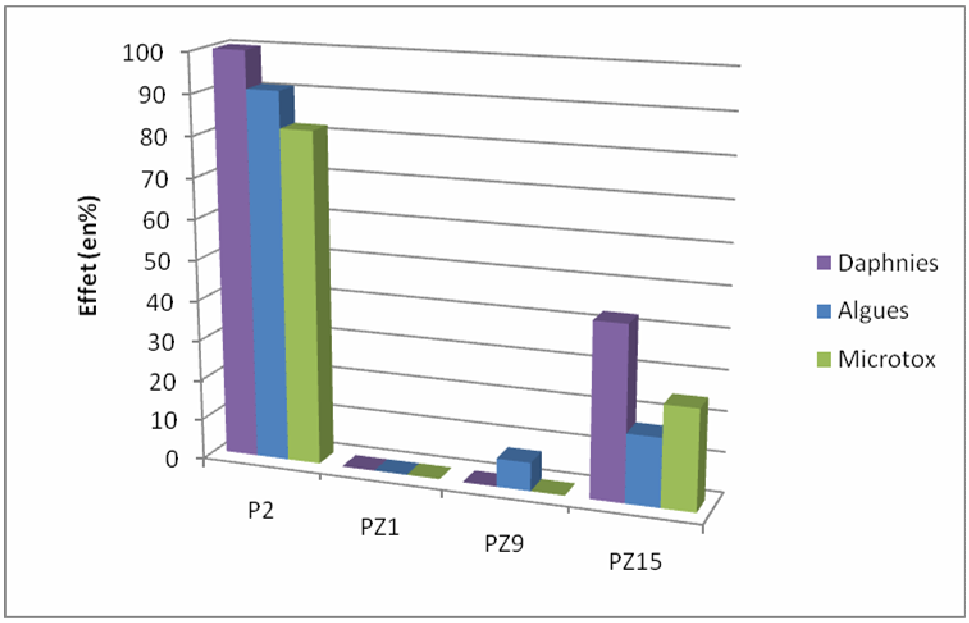


Figure 2 : Niveaux d'effet inhibiteur vis à vis des organismes aquatiques, présentés par les échantillons prélevés au cœur et en amont du site

Il est cependant difficile de corréler de façon directe la toxicité des eaux révélée par ces essais et les concentrations en MTBE et ETBE, du fait notamment de la présence d'autres composés écotoxiques (BTEX, métaux.)

- Capacité de biodégradation des microflores indigènes :
Les capacités de dégradation de l'ETBE, du MTBE et du TBA ont été évaluées à partir de l'eau prélevée en amont du site et au cœur du site. Lorsqu'une activité a été mesurée, un deuxième repiquage est effectué afin de confirmer ce résultat. Nous avons ainsi mesuré une activité de dégradation de l'ETBE par les microcosmes à ces deux localisations (Fig. 3 et 4).
Dans les deux cas, les microcosmes obtenus permettent la dégradation de trois additions successives d'ETBE.

La production transitoire de TBA est observée. Celui-ci est re-consommé totalement dans le cas de la microflore de l'amont du site. Dans le cas de la microflore enrichie provenant du cœur du site, le TBA s'accumule finalement dans le milieu de culture. La raison de cette accumulation du TBA reste à élucider mais c'est un élément important à prendre en compte dans la bioremédiation du site. En effet, la biostimulation des microorganismes indigènes pourrait se traduire par une diminution des concentrations en ETBE au dépend d'une accumulation du TBA. Ce point montre combien il est important de mesurer également le TBA sur les sites pollués.

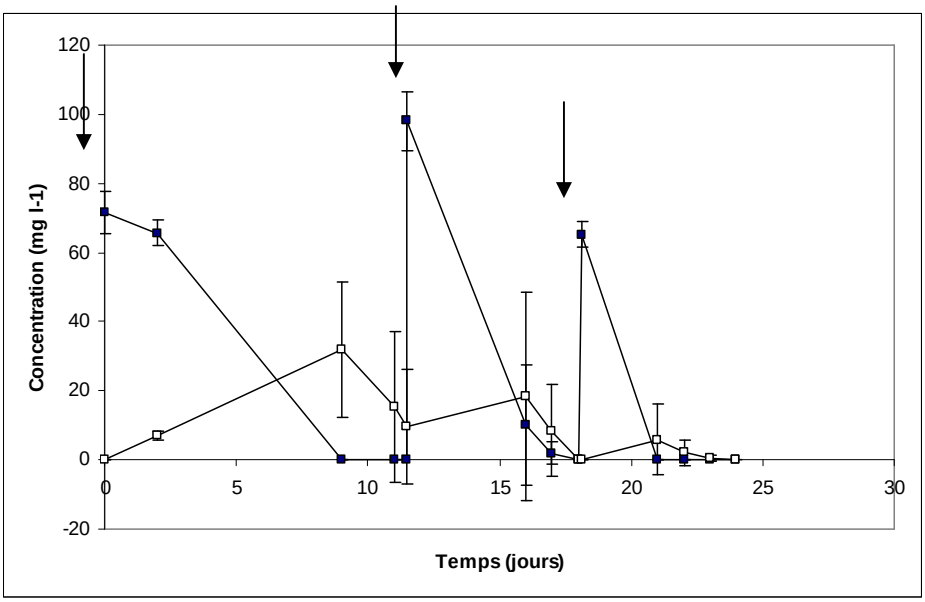


Figure 3. Dégradation de l'ETBE par les microflores des eaux en amont du site
Légende : ETBE (□-□), TBA (■-■). Les additions successives d'ETBE sont indiquées par les flèches.

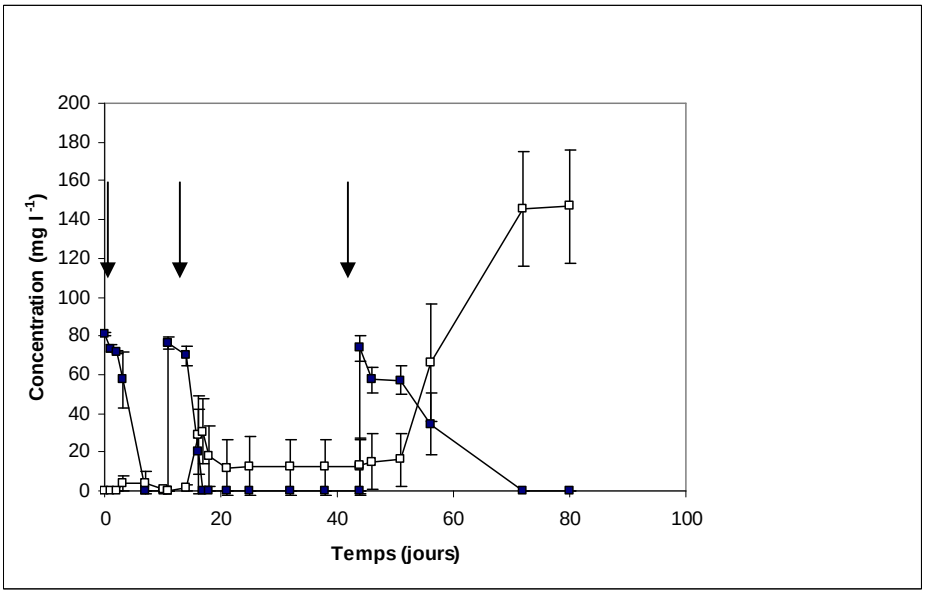


Figure 4. Dégradation de l'ETBE par les microflores des eaux au cœur du site
Légende : ETBE (□-□), TBA (■-■). Les additions successives d'ETBE sont indiquées par les flèches.

- Suivi de la diversité bactérienne sur le site

Le suivi de la diversité bactérienne sur une zone polluée avant, pendant et après le traitement nécessitait l'utilisation d'une méthode haut débit, permettant d'identifier un grand nombre des taxons bactériens en parallèle, sur des larges séries des échantillons. La méthode des puces taxonomiques a été retenue. Le prototype de puce à ADN 16S disponible au laboratoire d'Ecologie Microbienne cible une grande partie de la diversité bactérienne connue jusqu'ici (environ 800 genres bactériens dans 19 phylum couvert par plus de 1000 sondes ; Kyselková 2008 ; Kyselková *et al*., 2008 ; Sanguin *et al*., 2006), cependant, pour le but du projet, elle nécessitait d'être enrichie en sondes ciblant les bactéries déjà connues dégradant les composés xénobiotiques de l'étude, et également des bactéries présentes sur le site même (détectés par clonage/séquençage). Au final environ 40 sondes spécifiques ont été ajoutées dans ce projet.

Dans une première étape, l'échantillonnage de l'eau a été mis au point pour obtenir la quantité d'ADN nécessaire à l'hybridation. Trois types d'approches ont été suivies : la filtration de plusieurs volumes d'échantillons d'eau (0.5L, 1L, 2L), l'amplification du métagénome avec une polymérase genomhiphi, le pooling de plusieurs PCR. Il s'est avéré que la filtration d'un litre d'eau permettait l'amplification de l'ADN des témoins les plus faibles en concentration d'ADN. Cela évitait le léger biais qu'introduisait l'amplification genomhiphi. Cette méthode a donc été adoptée malgré le temps de filtration important qu'elle nécessite.

Pour une utilisation fiable de la méthode des puces à ADN sur des échantillons environnementaux, la reproductibilité des mesures doit être bonne (elle est liée à l'échantillonnage ainsi qu'au traitement des échantillons) et la méthode doit permettre de détecter des différences de diversité suffisamment fines pour cibler des populations non majoritaires mais dont l'activité est éventuellement importante. Nous avons testé la reproductibilité de l'échantillonnage et de toute la chaîne de préparation des échantillons. L'analyse en composante principale (ACP, Fig. 5) montre que les réplicats d'échantillonnage (à partir d'un litre de l'eau échantillonné plusieurs fois dans le même piézomètre, après purge, et traité séparément) sont bien groupés sur le plan des échantillons de l'ACP (diversité bactérienne similaire). L'échantillonnage d'un litre de l'eau semble donc fiable et représentatif de l'eau de la nappe.

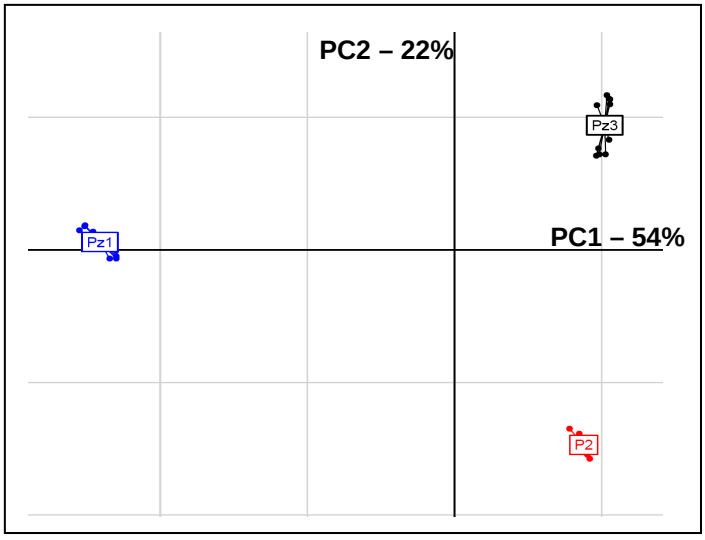


Figure 5. ACP des résultats d'hybridation des échantillons provenant des piézomètres P2, Pz1 et Pz3 sur la puce à ADN.

Chaque point représente un réplicat d'hybridation (4 par litre de l'eau).

En ce qui concerne la diversité bactérienne, l'ACP montre des différences entre les échantillons provenant des piézomètres P2 (centre de la pollution), Pz3 (pollué) et Pz1 (témoin non pollué) (voir Fig. 1). L'analyse des sondes associées aux piézomètres révèle une prévalence, entre autres, de certaines *Deltaproteobacteria* (*Desulfovibrio* et *Geobacter*), *Epsilonproteobacteria* (*Arcobacter*, *Campylobacter*) et clostridia dans P2. Les *Betaproteobacteria* en général sont abondantes dans les deux piézomètres pollués. La présence de bactéries anaérobies (*Campylobacter*, *Clostridium*) est bien cohérente avec le manque d'oxygène dans la zone de la pollution. Au contraire, les *Alphaproteobacteria* en général, et surtout le genre *Sphingomonas*, sont prévalents dans le piézomètre non pollué Pz1. Le clonage/séquençage à partir de l'eau des piézomètres P2 et Pz1 confirme cette grande différence dans la structure de la communauté bactérienne entre le piézomètre pollué et non pollué. Les résultats de la puce à ADN et séquençage sont cohérents avec le séquençage (par exemple détection des souche proche de *Clostridium* et *Arcobacter* dans P2 et *Sphingomonas* dans Pz1). En conclusion, il semble d'une part que l'outil puce soit bien approprié au suivi de la diversité dans ce projet et que d'autre part des taxons bactériens soient spécifiques des différentes situations et ouvrent la perspective de suivi de la qualité bactérienne de ces environnements.

Conclusions

Les résultats obtenus depuis le début du projet permettent déjà de tirer certaines conclusions.

- Concernant les méthodologies, il faut noter la complémentarité des outils d'évaluation qui ont permis la caractérisation du site: outils physico-chimiques (caractérisation et quantification des polluants), outils microbiologiques (évaluation des capacités de biodégradation), outils de biologie moléculaire (écologie microbienne) et outils d'écotoxicologie (évaluation des impacts).

- Concernant le site, la caractérisation a permis de mettre en évidence le fort potentiel de transfert à l'eau avec de fortes concentrations en ETBE (175 $mg.L^{-1}l$) en aval du site démontrant ainsi la différence de mobilité et la plus longue persistance des éthers dans l'aquifère. Nos études ont montré des capacités de biodégradation en aérobiose des microflores autochtones vis à vis de l'ETBE et du TBA, mais faisant apparaître la possibilité de limitations (accumulation de TBA, fig. 4). La biodégradation aérobie des polluants au coeur du site se traduit par une anoxie locale. Une des conséquences de l'anoxie est le changement de spéciation de certains métaux qui conduit à leur solubilisation d'où une concentration en arsenic au coeur du site élevée (50 $\mu g/L^{-1}$).

La biodiversité montre des différences à l'intérieur du site liées à la présence de la pollution (bactéries anaérobies au coeur du site) et corrélée avec les mesures physico-chimiques (zone anoxique).

Les résultats montrent aussi des effets écotoxicologiques non seulement au coeur du site mais aussi dans le panache où seul l'ETBE reste présent (P2 vs.PZ15, fig.2)

Perspectives

Un essai-pilote de traitement des eaux du site va être effectuée en 2009. Il permettra de comparer différents modes de traitement : aucun traitement, traitement par biostimulation, traitement par bioaugmentation avec le microcosme capable de dégrader l'ETBE enrichi à partir de l'eau du site ou avec un microcosme reconstitué contenant des microorganismes de l'environnement préalablement isolés à l'IFP pour leurs capacités de biodégradation. Au cours de cet essai-pilote, l'effet du traitement sur les teneurs en polluants (ETBE, MTBE et BTEXs) sera évalué ainsi que l'évolution des populations microbiennes en utilisant la puce à ADN décrite et que l'effet du traitement sur l'écotoxicité des eaux. Le mode de traitement de dépollution du site sera déterminé et extrapolé en fonction des résultats à l'échelle pilote.

Références.

Ducrocq V., Pandard P., Hallier Soullier S., Thybaud E.& Truffaut N., 1999, The use of quantitative PCR, plant and earthworm bioassays, plating and chemical analysis to monitor 4-chlorobiphenyl biodegradation in soil microcosms, Applied Soil Ecology, 12, 15-27.

Fayolle F, Monot F (2005) Biodegradation of fuel ethers. *In*: *Petroleum Microbiology* (M. Magot et B. Ollivier, Eds), pp 301-316 . ASM Press, Washington, DC, USA.

Kyselková M., 2008. Caractérisation par puce a ADN taxonomique de la communauté bactérienne rhizosphérique associée aux sols résistant a la maladie de la pourriture noire des racines. PhD Thesis, Université Lyon 1, 268-2008

Kyselková M, KopeckýJ, Felfoldi T, Čermák L, Omelka M, Grundmann GL, Moënne-Loccoz Y., Ságová-Marečková M.. 2008. Development of a 16S rRNA gene-based prototype microarray for the detection of selected actinomycetes genera. Antonie Van Leeuwenhoek 94: 439–453

Sanguin, H., Herrera, A., Oger-Desfeux, C., Dechesne, A., Simonet, P., Navarro, E., Vogel, T.M., Moenne-Loccoz, Y., Nesme, X., Grundmann, G.L., 2006b. Development and validation of a prototype 16S rRNA-based taxonomic microarray for *Alphaproteobacteria*. Environ. Microbiol. 8, 289-307.

Stralis-Pavese, N., Sessitsch, A., Weilharter, A., Reichenauer, T., Riesing, J., Csontos, J., Murrell, J.C., Bodrossy, L., 2004. Optimization of diagnostic microarray for application in analysing landfill methanotroph communities under different plant covers. Environ. Microbiol. 6, 347-363.