

Bioremédiation des sols et des eaux : application aux pollutions chimique et nucléaire

Bioremediation of soil and water: application to chemical and nuclear pollutions

Alain VAVASSEUR¹

Directeur de recherche à l'Institut de Biologie Environnementale et de Biotechnologies au CEA de Cadarache

Résumé

La bioremédiation est une branche des biotechnologies qui utilise des mécanismes biologiques naturels ou détournés pour traiter des problèmes environnementaux. Les agents biologiques utilisés peuvent être de simples molécules organiques, comme de l'ADN ou des anticorps, ou bien des organismes vivants ou morts (bactéries, microalgues, champignons, algues et plantes supérieures). La phytoremédiation consiste plus spécifiquement à utiliser des plantes pour décontaminer des sols, des eaux ou de l'air pollués.

Contrairement aux polluants organiques tels que les PCB², TNT³, TCE⁴, qui peuvent être métabolisés par les micro-organismes du sol ou les racines des plantes, les radionucléides — comme la plupart des métaux lourds — ne peuvent être dégradés, mais leur spéciation peut être modifiée et, par ce fait, leur biodisponibilité et leurs effets sur l'environnement. Ainsi, les stratégies de bioremédiation concernant les radionucléides vont consister en :

- leur stabilisation/minéralisation afin de diminuer leur biodisponibilité grâce à un changement de leur état redox ;
- pour les sols, leur extraction, en utilisant les mécanismes nutritifs des plantes ;
- pour les solutions polluées, leur extraction, en utilisant les propriétés de « piège à cations » des parois végétales.

En comparaison des méthodes physico-chimiques utilisées classiquement pour décontaminer les sols, mais qui conduisent à leur déstructuration et à une forte diminution de leur fertilité et de leur productivité, la bioremédiation est considérée comme une technique respectueuse de l'environnement. Un atout important de cette technique est également son coût, bien inférieur à celui des techniques traditionnelles de décontamination. Par contre, la bioremédiation ne peut être appliquée dans l'urgence, car les durées de traitement s'étalent sur plusieurs années — voire décennies — en fonction du degré de pollution. Les recherches actuelles portent donc essentiellement sur l'optimisation de ce temps de traitement.

Nous présentons dans cet article différents exemples de bioremédiation *in situ* des métaux lourds et des radionucléides, et nous débattons en conclusion les aspects négatifs et positifs de cette technique.

Mots-clés

Décontamination des sols, bioremédiation, phyto-extraction, phytostabilisation, rhyzofiltration.

Abstract

Bioremediation is a branch of biotechnology that uses natural or diverted biological mechanisms to address environmental problems. The biological agents can be simple organic molecules, such as DNA or antibodies, or live or dead organisms (bacteria, microalgae, fungi, higher algae and plants). Phytoremediation refers more specifically to using plants to decontaminate polluted soil, water, or air.

Unlike organic pollutants such as PCBs¹, TNT², TCE³, which can be metabolized by soil microorganisms and plant roots, radionuclides — like most heavy metals — cannot be degraded. Thus, bioremediation strategies for radionuclides will consist into:

- stabilization/mineralization to reduce their bioavailability through a change in their redox state;
- for soil, their extraction using the plant nutrition mechanisms;
- for polluted solutions, their extraction using the “cation traps” properties of plant cell walls.

Compared to physicochemical methods conventionally used to decontaminate soils but which lead to a sharp decline in fertility and productivity, bioremediation is considered a friendly environmental technology. An important advantage of this technique is its cost, much lower than traditional remediation techniques. By cons, bioremediation cannot be applied in an emergency, because processing times are spread over several years — even decades — depending on the degree of pollution. Therefore current research focuses on optimizing the processing time.

We present in this paper several examples of in situ bioremediation of heavy metals and radionuclides, and we discuss in conclusion the negative and positive aspects of this technique.

Keywords

Soil decontamination, bioremediation, phyto-extraction, phytostabilization, rhizofiltration.

Dans les relations entre la production d'énergie nucléaire et la santé, les plantes jouent un rôle essentiel. Leurs affinités avec les radioéléments peuvent avoir des répercussions sur la chaîne alimentaire, mais les plantes ont aussi d'autres propriétés tout à fait intéressantes. C'est pourquoi nous avons voulu donner la parole à Alain VAVASSEUR pour montrer pourquoi le CEA est impliqué dans ce domaine. Bioremédiation, phytoextraction, rhizofiltration, phytovolatilisation, phytostabilisation : autant de termes dont il a accepté de nous donner les définitions, non sans esquisser quelles pourront être leurs applications actuelles et futures :

La phytostabilisation (cf. § 4) vise à maintenir un couvert végétal pour empêcher l'érosion et la dispersion par le vent, ainsi que le lessivage des sols.

La rhizofiltration (cf. § 5) utilise l'affinité des racines pour concentrer les microéléments, comme l'uranium.

La phytoextraction (cf. § 3) met en œuvre l'accumulation par les plantes des éléments toxiques, tandis que la phytovolatilisation (cf. § 6) permet de disperser les éléments volatils dans l'air par évapotranspiration par les feuilles.

Bioremédiation des sols et des eaux : application aux pollutions chimique et nucléaire

Avant-propos : la problématique de Fukushima

Un congrès s'est tenu à Koriyama, dans la province de Fukushima, en mars 2012, pour exposer les premiers retours d'expérience de décontamination et programmer les mesures à prendre désormais.

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

Si l'on considère que la surface impactée est de l'ordre de 1 800 km² et qu'on veut éliminer 5 cm de sol pour limiter le débit de dose à 6 mSv/an (un niveau au-dessus des normes européennes actuelles), cela conduit à évacuer quelque 100 millions de m³ de terre contaminée en radiocésiums 137 et 134, que l'on devra ensuite stocker : on voit les limites de cette approche quand il s'agit de grandes surfaces.

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

1. La bioremédiation : présentation des technologies existantes

En complément de l'approche mécanique et physico-chimique, il est possible de faire intervenir des êtres vivants, des bactéries ou des plantes : c'est ce qu'on appelle la bioremédiation.

Certaines bactéries précipitent et fixent l'uranium en leur périphérie. C'est le cas de *Geobacter metallireducens* dont la répartition de l'uranium à la valence IV en périphérie de la cellule est révélée aux rayons X (Cologgi *et al.*, 2011). En concentrant le métal ou en le précipitant par réduction chimique, ce qui réduit sa biodisponibilité, les bactéries servent à dépolluer les liquides (voir § 2).

Comme les atomes radioactifs ne sont pas

dégradables, on peut se servir des plantes soit pour les extraire du sol, quand il s'agit d'atomes à longues périodes radioactives, soit pour les y fixer en attendant leur décroissance radioactive.

Par rapport aux techniques physico-chimiques, les techniques de remédiation biologique sont mises en œuvre *in situ* avec un impact moindre sur l'environnement. Elles peuvent ainsi traiter de larges espaces faiblement contaminés, elles diminuent l'érosion par le vent et le ruissellement, elles préservent la fertilité des sols, ainsi que le paysage. Leur coût est modéré, généralement de 10 à 100 fois inférieur aux techniques classiques ; néanmoins celui-ci demanderait à être évalué en intégrant le coût de l'immobilisation du site qui, pendant la durée (parfois longue) du traitement ne peut généralement pas être utilisé (sauf pour des cultures particulières, voire des champs d'installations solaires) ; elles sont généralement bien acceptées par le public en tant que « technologie verte », et peuvent être étalées dans le temps. Enfin, le recyclage de la biomasse, en matériaux ou combustible, contribue à diminuer le coût de la réhabilitation des sols et à recréer de l'emploi dans les zones où l'agriculture est impactée par la pollution. (Dans le cas d'une combustion, il faut bien sûr prendre soin de traiter les fumées, qui concentrent alors la contamination).

2. La bioremédiation par les bactéries

Dans le cas de métaux lourds toxiques, les phénomènes de biotransformation mis en jeu incluent : chimisorption renforcée par les microbes, biosorption, bioaccumulation, biominéralisation. Les bactéries couramment utilisées sont : *Geobacter metallireducens*, *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis*, *Desulfotomaculum reducens* ou *Thermoterrabacterium ferrireducens*.

Les bactéries peuvent être utilisées pour adsorber l'uranium soluble dans l'eau à la valence VI, mais on peut aussi utiliser des bactéries capables de réduire l'uranium (VI) à la valence IV, provoquant une précipitation de l'uranium qui n'est alors plus biodisponible. Ce transfert d'électrons mettant en jeu un autre élément métallique (soufre ou fer, par exemple) constitue un phénomène métabolique dont la bactérie tire de l'énergie.

On peut précipiter par des bactéries l'uranium, le plutonium, le technétium, le palladium et d'autres éléments. On voit dans le cytoplasme de la bactérie *Pseudomonas CRB5*, des granules d'uranium associées à des polyphosphates, dont l'uranium est très affiné. Pour une eau contaminée avec de l'uranium à 200 mg/L, la décontamination est quasi terminée au bout d'une centaine d'heures, notamment en conditions aérobies, avec des systèmes simples ne requérant pas d'énergie (McLean et Beveridge, 2001).

De même, la radiographie montre l'accumulation de technétium (après réduction) dans la paroi de la bactérie *Shewanella oneidensis*. Avec d'autres bactéries, on obtient des formations pariétales d'uranium complexé par des phosphatases, ou de palladium réduit à la paroi d'une cellule sulfato-réductrice (Lloyd *et al.*, 1999).

On arrive même ainsi à former des structures cristallines d'uranium.

Comment utiliser ces propriétés ?

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

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

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

3. La phytoextraction

Puisque les radionucléides et les métaux ne sont pas dégradables, la rhyzodégradation est exclue, et la phytoextraction des radionucléides et des métaux se limite à accumuler l'élément toxique dans la plante. Le rendement de la dépollution dépend étroitement de la quantité de

biomasse produite, multipliée par le coefficient de transfert (rapport entre la concentration du polluant dans le végétal et celle dans le sol).

Des plantes dites métalophages extraient de façon remarquable le cadmium ou le zinc, mais elles sont généralement de petite taille et de cycle lent, et ne conviennent donc pas à une exploitation industrielle.

Dans le cas du projet européen PhyLeS (pilot phytoremediation for environmental cleanup of lead polluted soils), qui consistait à traiter, en Italie, des terrains d'une ancienne fonderie fortement pollués au plomb (300 à 1 200 mg/kg), on a appliqué un traitement de chélation à l'EDTA au moment de la floraison. Le coefficient de phytoextraction par rapport au tournesol non traité a été multiplié par 90 en utilisant K2EDTA pour traiter *Brassica Juncea* cv. 426308 (le simple choix de *Brassica Juncea* – moutarde indienne – cv. 426308 fait gagner un facteur 6, et l'ajout de K2EDTA à 5 mmol/kg de terre sèche, encore un facteur 15). Dans ce cas, il faut tout de même une vingtaine d'années pour effectuer une phyto-rémediation complète.

Des essais pour dépolluer des sols contaminés en uranium ont été menés avec de la moutarde indienne (*Brassica juncea*) et de l'ivraie « ryegrass » (*Lolium perenne*). Utilisés seuls, ils ne dépolluent pas, mais en ajoutant de l'acide citrique avec la moutarde indienne ou un mélange acide citrique + bicarbonate avec l'ivraie, on atteint des facteurs de transfert de 8 et 5 respectivement. Il faut donc rechercher des plantes, comme le lupin, qui exsude par lui-même le citrate dans le sol. Pareillement, pour dépolluer du plutonium, il est possible d'ajouter du nitrate, meilleur que le citrate, mais l'ajout de DPTA (acide diéthylène triamine penta acétique, un décorporant humain) augmente encore les résultats d'un facteur 30 à 100. Il faut donc ajouter au sol les agents qui rendent biodisponibles pour la plante les éléments dont on veut dépolluer le sol.

En ce qui concerne le césium, qui est le polluant radiologique majoritairement répandu après un accident nucléaire, comme l'ont montré les catastrophes de Tchernobyl et de Fukushima, les mesures faites sur les territoires contaminés à la suite de l'accident de Tchernobyl ont montré que celui-ci ne migrait que lentement dans les sols, et que les végétaux le recyclaient, en l'incorporant par les racines et en le restituant au sol lors de la chute des feuilles.

Dans l'humus, le césium reste échangeable, tandis que dans l'argile (piège à cations), il est très fortement fixé, comme analogue du potassium. Le quinoa et la betterave à sucre présentent les meilleurs coefficients de transfert pour le césium, devant l'Atriplex sp. et l'ivraie (*Lolium perenne*). La culture doit donc être adaptée en fonction du sol pour maximiser le produit (biomasse x coefficient de transfert).

Dans le cas de Brookhaven (réacteur des États-Unis qui a présenté une fuite notamment de strontium et de césium), ont été testées l'amaranthe (*Amaranthus retroflexus*), la moutarde (*Brassica juncea*), le haricot (*Phaseolus acutifolius*). L'amaranthe permet d'obtenir les meilleurs coefficients de transfert pour le césium, avec une diminution de moitié en 15 ans, et elle offre une demi-décroissance du strontium en 6 ans (Fuhrmann *et al.*, 2002) (NB : la période radioactive du Sr-90 est de 29 ans, celle du Cs-137 est de 30 ans).

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

Notre laboratoire travaille en physiologie cellulaire et en biologie moléculaire pour essayer de comprendre les mécanismes qui interviennent dans le transfert vers la plante de métaux lourds ou radionucléides comme le cadmium ou le césium, le cobalt et l'uranium. Dans le cas du césium, nous étudions les transporteurs — de potassium essentiellement — qui normalement permettent la nutrition de la plante et participent à l'entrée de césium. Cette démarche permet d'obtenir des critères quantitatifs qui seront utilisés par la suite pour sélectionner et éventuellement transformer des plantes optimisées pour la phytoremédiation. La démarche commence par des études de génétique inverse : on sélectionne des plantes qui sont invalidées pour des gènes codant pour des transporteurs potassiques, et on observe si elles assimilent moins le césium.

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

la translocation du césium.

Le laboratoire collabore également avec les équipes japonaises du Pr Tomoko Nakanishi (Univ. de Tokyo) qui font de l'imagerie isotopique, afin de suivre en temps réel le transfert de césium à partir des racines, en utilisant du potassium comme compétiteur : on voit qu'en présence de potassium, le transfert de césium est ralenti, alors que le césium est rapidement absorbé quand il n'y a pas de potassium. Le potassium est donc une contre-mesure efficace en cas de pollution par le césium.

La démarche suivie est donc : à partir d'études génétiques, identifier les marqueurs importants pour le transport de césium, et ensuite rechercher dans la biodiversité si certaines plantes expriment beaucoup ces transporteurs. S'offrent alors deux possibilités : soit la *safe food*, qui consiste à cultiver des plantes sur lesquelles on a réussi à supprimer les transporteurs impliqués dans la prise de césium, et permettre par exemple de faire pousser, sur des sols contaminés, du riz dont le grain est peu contaminé ; soit la phytoremédiation, dont le but est inverse, c'est-à-dire augmenter l'absorption de la contamination par les plantes.

4. La phytostabilisation

Le cas de la Combe du Saut, ancienne mine d'or fortement polluée à l'arsenic (11 millions de tonnes de stériles pollués), représente un exemple français qui n'est pas dans le domaine des radionucléides. Le site de cette mine, avec un flux d'arsenic de 1 300 kg/an qui s'écoulait vers la nappe phréatique, et un flux de 300 kg/an qui percolait vers la rivière, a été traité à la grenaille de fer qui retient l'arsenic, puis en plantant des espèces résistantes à l'arsenic, de façon à empêcher le ruissellement (programme DifPol-Mine de l'ADEME).

5. La rhyzofiltration

Une autre façon d'utiliser les plantes est la rhyzofiltration. Les racines des plantes constituent de véritables pièges à cations. Dans une expérience déjà ancienne, l'eau contaminée avec de l'uranium à 2 MBq/L est filtrée à travers des bassins successifs ; le premier bassin retient

déjà 97,7 % de l'uranium entrant, et il sort du 3^e bassin de l'eau épurée à 99,3 % (Timofeeva-Resovskaia, 1963).

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

La rhizodégradation utilise l'activité microbienne au niveau racinaire produisant des enzymes qui peuvent dégrader chimiquement les produits toxiques organiques, mais cela ne s'applique évidemment pas aux radioéléments.

6. La phytovolatilisation

La technique de phytovolatilisation s'applique à des éléments non dangereux une fois dilués, comme le sélénium qui est toxique à haute dose mais qui est ajouté comme oligoélément dans l'alimentation du bétail. Pour les éléments comme le sélénium ou le mercure qui deviennent volatils une fois méthylés, il est possible de transformer une plante et lui faire exprimer une méthylase, qui permettra la dispersion de la pollution par volatilisation.

Sur le site du laboratoire d'Argonne près de Chicago (ANL-East), ont été stockés de nombreux déchets nucléaires dont ceux provenant de la pile CP-1 construite par Enrico Fermi sous le stade de l'université de Chicago. Ce stockage a occasionné la pollution de la nappe phréatique par de l'eau tritiée. Des tubages ont été réalisés dirigeant les racines de peupliers en 1999, et 2 ans après, les peupliers poussent en volatilisant progressivement l'eau tritiée, tout en restant à des niveaux de concentration atmosphérique très en dessous des normes en vigueur.

7. L'avenir : une technologie mixte

Le laboratoire s'est positionné sur un programme national en soutien à Fukushima en collaboration avec d'autres laboratoires du CEA, l'IRSN, l'INRA, le CIRAD, Véolia, et Aréva. Ce programme DEMETERRES, financé par la France dans le cadre du Programme d'Investissement d'Avenir, a démarré en novembre 2013 pour une durée de 5 ans. Il s'agit d'optimiser

une méthode mixte de remédiation, réalisée après une cartographie très fine : traiter de façon physico-chimique les points très chauds, puis utiliser des techniques de phytoremédiation et de microbiologie, couplées à une valorisation de la biomasse, pour traiter les superficies plus importantes et moins contaminées.

8. Une algue verte, championne de la radiorésistance

Les chercheurs du CEA Grenoble et de l'Institut Laue Langevin ont eu la surprise de découvrir, dans une piscine d'entreposage de combustible irradié, un eucaryote survivant à des doses extrêmes de rayonnement (50 % de mortalité à 10 kGy), soit 2 000 fois supérieures à la dose létale pour l'homme. Cette algue verte unicellulaire a été identifiée comme étant du genre *Coccomyxa* et fut baptisée *actinabiotis* du fait de son biotope (Rivasseau *et al.*, 2013). Cette algue capte les métaux (par exemple : 110mAg avec un facteur de concentration de plus de 100 000), les lanthanides et les actinides, ainsi que le carbone-14.

C'est un organisme photosynthétique, auquel il n'est pas nécessaire de fournir de substrat carboné, et qui se développe simplement à partir de l'éclairage de la piscine. La comparaison avec l'utilisation de résines échangeuses d'ions montre l'efficacité des algues sur des périodes de l'ordre du mois : 40 g d'algues peuvent extraire 740 MBq d'une piscine de 360 m³ en trois semaines. Le développement est en cours avec le CEA pour en faire un procédé industriel.

Conclusion

Les défis à relever pour la bioremédiation sont les suivants :

- Les durées de traitement doivent être améliorées ;
- La contamination doit être modérée et non multiple ;
- Chaque cas est spécifique, avec de nombreux paramètres (climat, sol...) ;
- L'exploitation de la biomasse offre un potentiel intéressant ;
- Une meilleure coordination des recherches est souhaitée (création de bases de données) ;

- Il est nécessaire de développer des espaces de démonstration du potentiel de cette technologie.

Dans le cadre nucléaire : ces techniques sont peu attractives au niveau commercial en raison du caractère aléatoire de la demande ; elles requièrent donc un développement sur fonds publics. Il est vrai qu'en France, en l'état actuel de la législation et de l'état d'esprit de la société concernant la transgénèse, il est peu envisageable d'utiliser des plantes génétiquement modifiées pour dépolluer des sols. D'ores et déjà,

il est possible de faire des modifications génétiques, par des techniques non OGM, afin que certains gènes ne s'expriment plus, notamment ceux participant au transfert de Cs dans la plante. Toutefois, il est possible qu'à moyen terme, les opinions évoluent grâce à une meilleure information sur ce qu'est un OGM, en montrant que les plantes destinées à la phytoremédiation peuvent être conçues stériles et n'entrent pas dans la chaîne alimentaire.

1. vavasseur@cea.fr
2. PCB : polychlorobiphényles (pyralène)/polychlorinated biphenyls (pyralene).
3. TNT : trinitrotoluène/trinitrotoluene.
4. TCE : trichloréthylène/trichlorethylene.

Références

- Cologgi D.L., Lampa-Pastirk S. *et al.* (2011). Extracellular reduction of uranium via *Geobacter* conductive pili as a protective cellular mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, n° 108 (37), p. 15248-52.
- Fuhrmann M., Lasat M.M., Ebbs S.D. *et al.* (2002). Uptake of cesium-137 and strontium-90 from contaminated soil by three plant species; application to phytoremediation. *J. Environ. Qual.*, n° 31, p. 904-9.
- Lloyd J.R., Ridley J., Khizniak T. *et al.* (1999). Reduction of Technetium by *Desulfovibrio desulfuricans*: Biocatalyst Characterization and Use in a Flowthrough Bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, n° 65, p. 2691-96.
- McLean J., Beveridge T.J. (2001). Chromate Reduction by a *Pseudomonad* Isolated from a Site Contaminated with Chromated Copper Arsenate. *Appl. Environ. Microbiol.*, March, n° 67(3), p. 1076-84.
- Rivasseau C. *et al.* (2013). An extremely radioresistant green eukaryote for radionuclide bio-decontamination in the nuclear industry, *Energy Environ. Sci.*, n° 6, p. 1230-39 ; WIPO Patent Application WO/2011/098979.
- Timofeeva-Ressovskaia E.A. (1963). Isotope distribution in major components of fresh water systems. *Proc. Inst. Biol.*, n° 30, p. 3-72.