



Les tests de biotraitabilité en laboratoire et leurs transpositions sur le terrain, des perspectives du plan de gestion à la réalité de la dépollution

***Journée Technique***  
***« Du plan de gestion à l'achèvement des travaux de dépollution »***

***Organisée par le Brgm en concertation avec le MEDDE***



# Plan

- > Intégration des différents tests dans la démarche de gestion**
- > Les tests en laboratoire pour quels objectifs**
- > La métagénomique pour comprendre la biodégradation d'un polluant**
- > Les différents tests et leurs limites**
- > De l'expertise du laboratoire au terrain**
- > Recommandations - Perspectives**

## Du Plan de Gestion à l'Achèvement des Travaux de Dépollution

### > Intégration des tests dans la démarche de gestion

- Quel est le contexte du projet (réaménagement urbain / pression immobilière, remise en état de site industriel, traitement de pollution accidentelle sans arrêt de l'activité...)
- Quel est le contexte du site (historique de l'activité, géologie, hydrodynamique, voisinage etc ...)?
- Quelle est la nature du polluant ?
- Quelles sont les concentrations initiales ? Quels sont les objectifs de dépollution ?
- Quelle stratégie est envisagée (traitement *On-Site* ou *In-Situ*)?
- Connaissance scientifique sur la biodégradabilité de ce produit ?
- Quels sont les délais disponibles, quelle durée de traitement est envisageable ?
- Quelle place est disponible sur le site ?
- Quelle est l'enveloppe budgétaire du projet ?
- ...

### Démarche de gestion

1. **Analyse des enjeux**
2. **Maîtrise des sources de pollution**
3. **Maîtrise des impacts**
4. **Définition des scénarii de gestion et bilan coûts / avantages**
5. **Performance intrinsèque des techniques de dépollution**
6. Mesures constructives
7. **Gestion des déblais/remblais – gestion des terres excavées**
8. **Analyses des Risques résiduels**
9. Conservation de la mémoire et mise en place des restrictions d'usage
10. **Contrôle de l'efficacité des mesures de gestion**
11. **Plan de surveillance des milieux (bilan quadriennal)**

## Les tests en laboratoire pour quels objectifs ?

> **Une fois le contexte déterminé, quel est l'objectif de la mission ?**

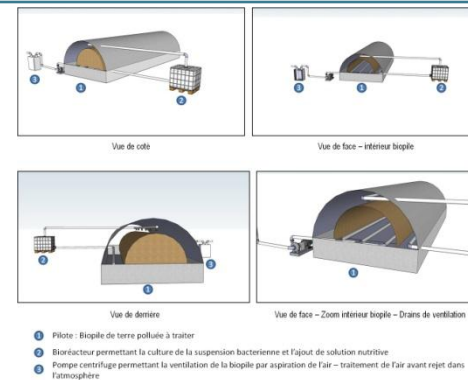


- Le test de traitabilité : Estimation du potentiel de biodégradation :
  - Il s'agit de savoir si les bactéries indigènes capables de dégrader le(s) polluant(s) sont présentes dans la matrice et avoir une idée de leur activité de biodégradation
  - Déterminer si les conditions du milieu sont propices à la biodégradation
- Exemple :
  - Un BE souhaite savoir si un traitement biologique In-Situ est envisageable. La surface polluée est importante. Il est possible de faire une cartographie de l'activité microbologique afin d'estimer le potentiel microbien du milieu à réagir à un traitement par biostimulation.

**Cette approche peut être proposée idéalement en amont du Plan de gestion, au stade du diagnostic approfondi, ou durant des investigations complémentaires permettant de compléter le Plan de Gestion.**

### > Une fois le contexte déterminé, quel est l'objectif de la mission ?

- Réalisation d'un test de faisabilité :
  - La stratégie de dépollution s'oriente vers un traitement par biodégradation. Le test doit permettre de mettre en évidence une faisabilité de la solution retenue, définir des conditions permettant l'optimisation de cette biodégradation, estimer des cinétiques de traitement, mettre en évidence des points de blocages (toxicité), vérifier si les objectifs de dépollution sont réalisables dans un **temps donné**.
- Exemple :
  - Un site avec une pollution au HC majoritairement la fraction C16-C25, théoriquement facilement biodégradable. Le test de biodégradation met en évidence la difficulté (vitesse lente) des bactéries à dégrader le polluant, la durée de traitement prévue n'est pas compatible avec les impératifs du projet. La bio n'est pas envisageable dans ce contexte.



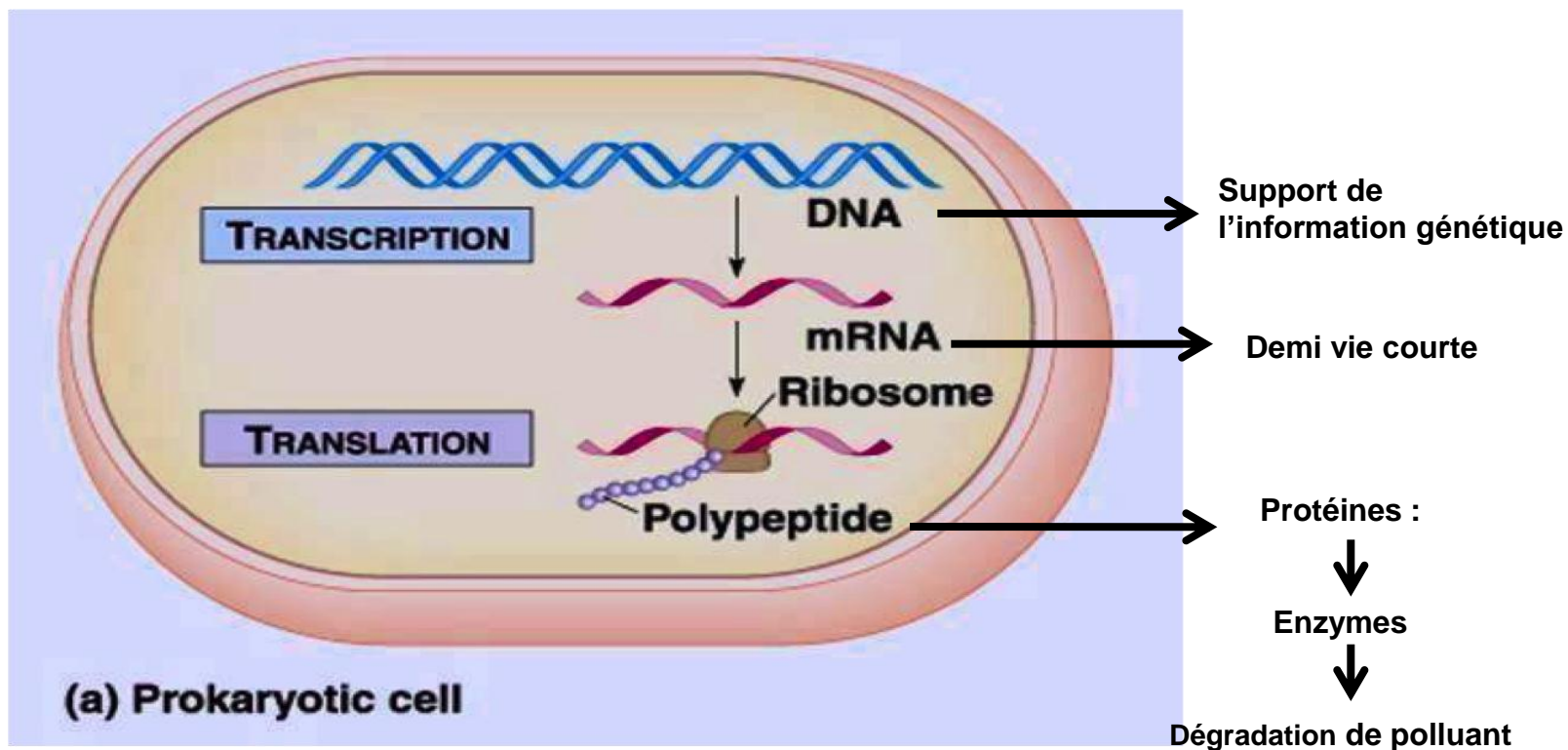
## > Une fois le contexte déterminé, quel est l'objectif de la mission ?

- Détermination de l'atténuation naturelle surveillée d'un polluant
  - Il s'agit de vérifier si une atténuation naturelle des(du) polluant(s) s'est mise en place. Différents outils analytiques peuvent répondre à ces questions (métagénomique, isotopie, chimie etc..). Cela nécessite de connaître parfaitement les paramètres du site (Ex: modélisation hydrodynamique).
  - Permet également d'envisager une biostimulation
- Exemple :
  - Un industriel souhaite vérifier l'atténuation naturelle des solvants chlorés dans le panache de son site. Au travers d'analyses métagénomiques, il est possible de mettre précisément en évidence les phénomènes microbiens responsables des étapes de déchloration successives des éthylènes chlorés ⇒ Prises de décisions sur la stratégie de réhabilitation du site

## **La métagénomique pour comprendre la biodégradation d'un polluant**



## Outils de biologie moléculaire



**Principe** : Amplification et quantification d'une séquence cible (biomarqueur) d'ADN ou d'ARN :

- D'une espèce bactérienne
- D'un gène impliqué spécifiquement dans une voie de biodégradation

## Du Plan de Gestion à l'Achèvement des Travaux de Dépollution



DNA	RNA
+	+
+	-
-	-

→ Biomarqueur présent et actif

→ Gène présent mais non actif = dégradation antérieure / inhibition

→ Absence du biomarqueur = Pas de biodégradation

**Cette technologie permet de conclure quant à la présence, la quantité et l'activité d'un gène ou d'un genre bactérien impliqué dans un processus de biodégradation.**

## Les différents tests en laboratoire

## Le test de traitabilité

### > Consiste à estimer le potentiel de biodégradation

- Le client envisage une dépollution In-Situ. Faire un pilote laboratoire pour une dépollution In-Situ est très complexe (représentativité).
- Le test de traitabilité consiste à rechercher les biomarqueurs codant pour la dégradation du polluant directement sur des échantillons prélevés sur site.
- A l'instar des analyses chimiques, la recherche de biomarqueurs génétiques dans le sol (ou dans la nappe phréatique) va permettre de définir une cartographie de l'activité microbologique du site
- Avec ce potentiel de biodégradation, il est possible de valider la traitabilité d'une pollution.
- Il est également possible d'adapter le traitement en fonction des différentes zones
- C'est également un moyen d'estimer les phénomènes d'atténuation naturelle

# Du Plan de Gestion à l'Achèvement des Travaux de Dépollution

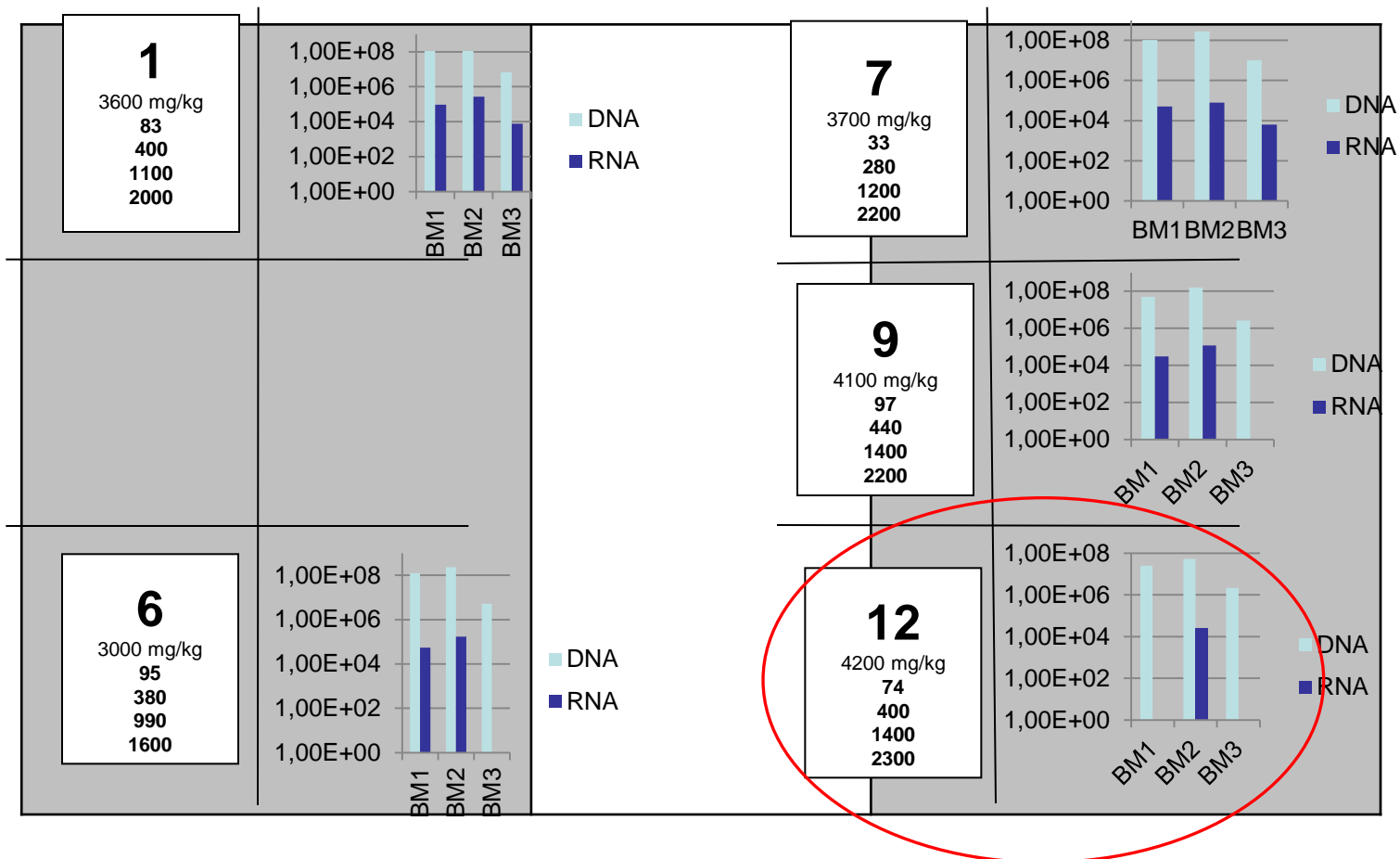
## PLAN

<p><b>1</b></p> <p>3600 mg/kg 83 400 1100 2000</p>	<p><b>2</b></p> <p>2700 mg/kg 39 240 840 1500</p>		<p><b>7</b></p> <p>3700 mg/kg 33 280 1200 2200</p>	<p><b>8</b></p> <p>2300 mg/kg 65 280 690 1300</p>
<p><b>3</b></p> <p>3000 mg/kg 17 200 1000 1800</p>	<p><b>4</b></p> <p>3100 mg/kg 87 370 1000 1600</p>		<p><b>9</b></p> <p>4100 mg/kg 97 440 1400 2200</p>	<p><b>10</b></p> <p>3000 mg/kg 87 360 930 1600</p>
<p><b>5</b></p> <p>3100 mg/kg 34 250 970 1800</p>	<p><b>6</b></p> <p>3000 mg/kg 95 380 990 1600</p>		<p><b>11</b></p> <p>2300 mg/kg 47 230 710 1300</p>	<p><b>12</b></p> <p>4200 mg/kg 74 400 1400 2300</p>

HCT
C10-C12
C12-C16
C16-C21
C21-C40

# Du Plan de Gestion à l'Achèvement des Travaux de Dépollution

## PLAN



## Le test de traitabilité

### > Conclusion :

- Il s'agit d'une donnée ponctuelle sur un échantillon
- Donne une orientation sur la faisabilité
- Permet de déterminer des « zones à risques » en terme de biotraitabilité
- Permet une anticipation dans la fabrication des biotertres ou dans le dimensionnement du procédé *In-Situ*.
- Ne permet pas de déterminer une cinétique de dégradation



## Le test de respirométrie

> **Le test de respirométrie permet de suivre la consommation d'oxygène par les bactéries (Norme ISO 16072).**

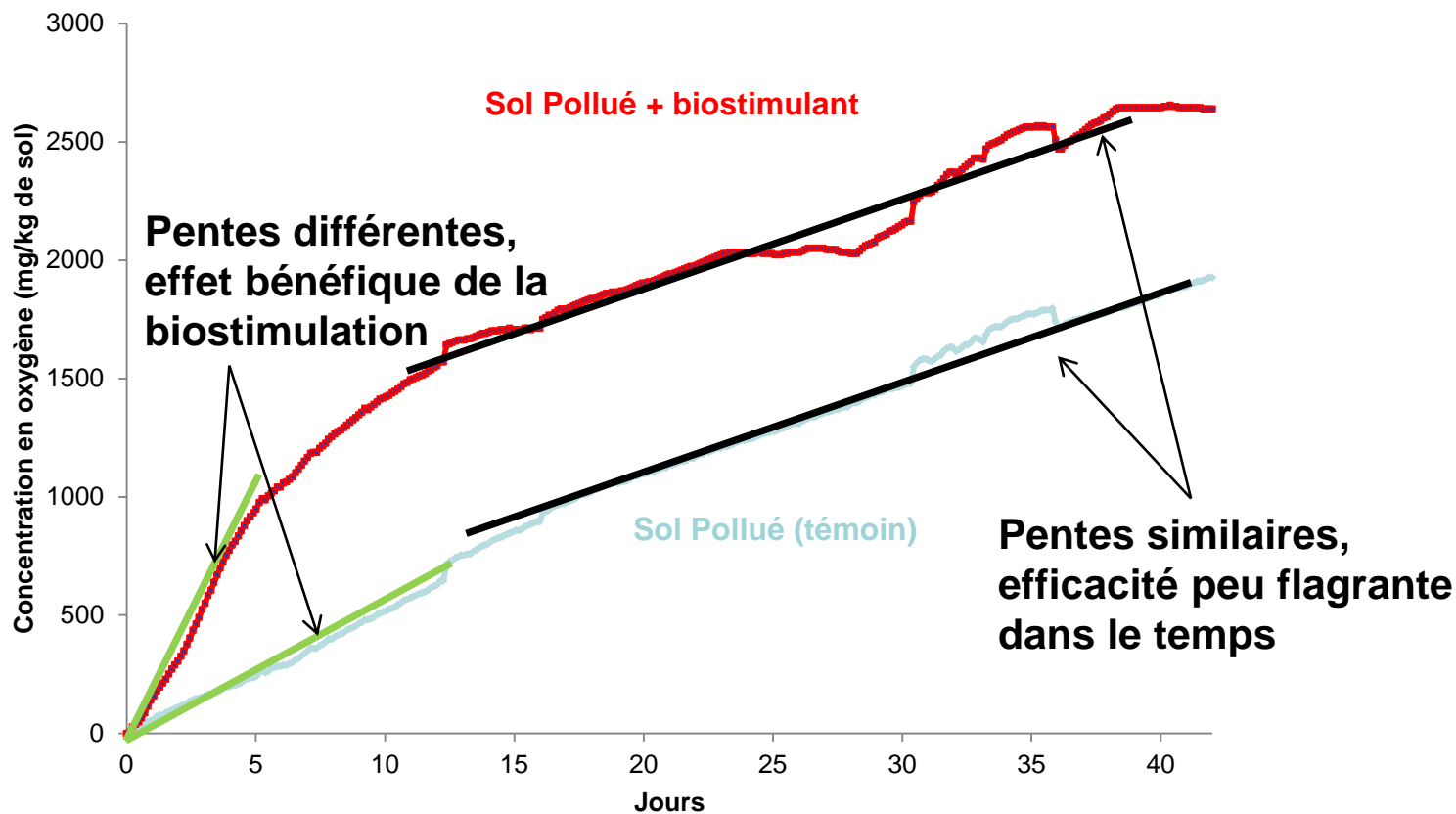
- En condition aérobie, les micro-organismes consomment de l'O<sub>2</sub> et rejette du CO<sub>2</sub>. Il est possible de suivre la formation de CO<sub>2</sub> par le système Oxytop®.
- En suivant la respiration des bactéries d'un sol, il est possible de mettre en évidence l'effet d'une biostimulation des communautés microbiennes indigènes.  
Plus la consommation en O<sub>2</sub> est importante, plus l'activité microbienne est importante.

**Il s'agit cependant d'une biodégradation de la matière organique totale du sol, pas d'une spécificité liée à la dégradation un polluant**



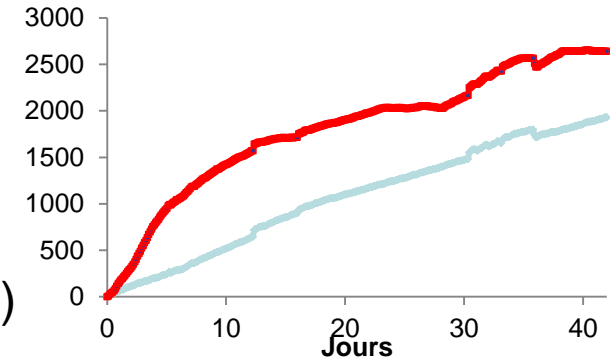
# Ex. de résultat d'un test de respirométrie N°1

## Sol : Pollution HCT (C10-C40) = 6 000 mg/kg



## > Compléments :

- HCT à T0 = 6000 mg/kg-MS
- HCT à T+35 jours = 5000 mg/kg-MS
- Incertitudes sur une analyse HCT (+/- 20%)

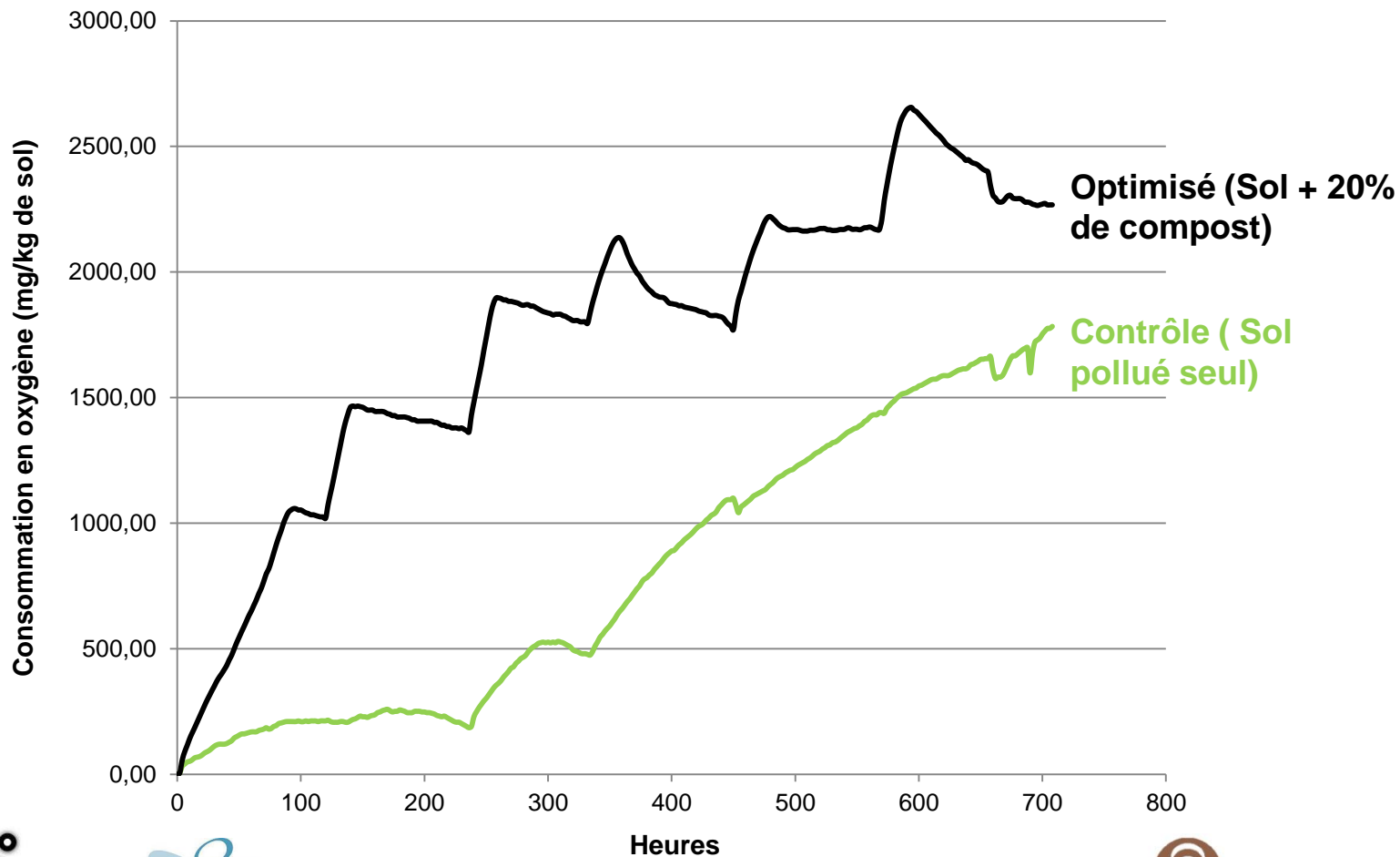


## > Discussion :

- Soit la biostimulation a un effet positif sur la biodégradation de la matière organique
- Soit la biostimulation a un effet positif sur la biodégradation des HC
- Soit la charge en nutriments est limitante
- Dans les deux cas cette stimulation n'est pas effective dans le temps.
- Impossible de conclure sur la faisabilité de la bio comme solution de réhabilitation

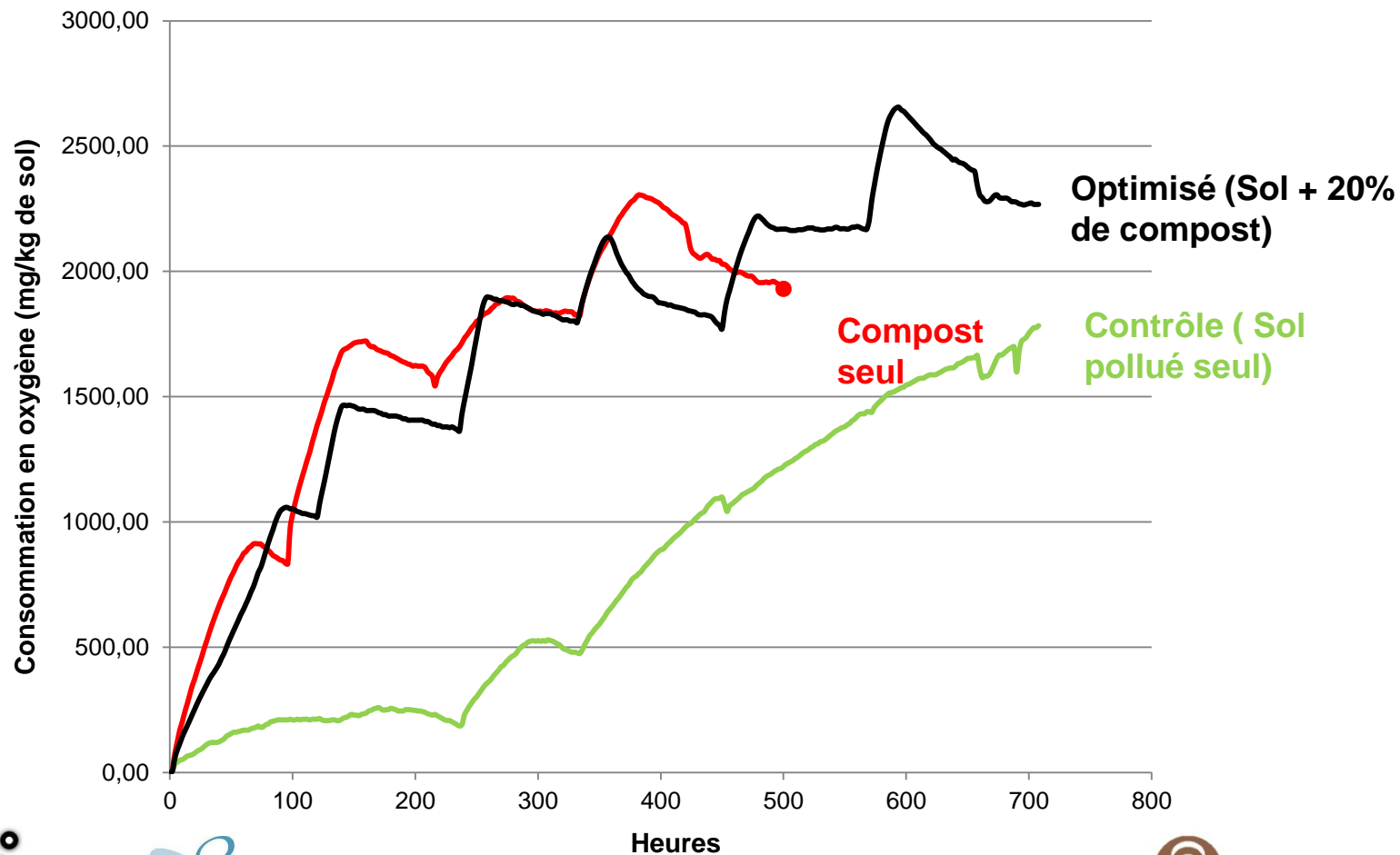
# Ex. de résultat de test de respirométrie N°2

## Sol : Pollution HCT (C10-C40) = 12 000 mg/kg



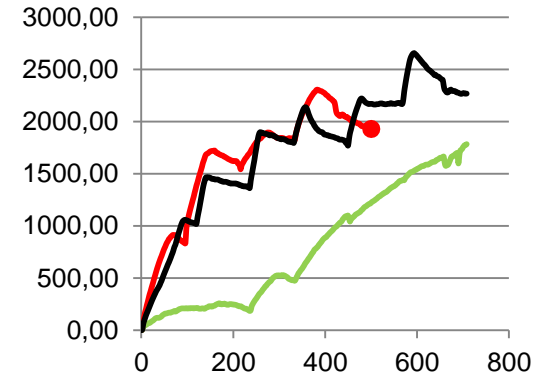
# Ex. de résultat de test de respirométrie N°2

## Sol : Pollution HCT (C10-C40) = 12 000 mg/kg



## > Compléments :

- HCT à T0 = 12 000 mg/kg-MS
- HCT à T+25 jours = 9 000 mg/kg-MS
- Incertitudes sur une analyse HCT (+/- 20%)



## > Discussion :

- Le compost seul a une respiration importante
- Soit la biostimulation a un effet positif sur la biodégradation de la matière organique
- Soit la biostimulation a un effet positif sur la biodégradation des HC
- Soit l'ajout de compost entraîne la dilution des concentrations en HC
- Impossible de conclure sur la faisabilité de la bio comme solution de réhabilitation

## Le test de respirométrie

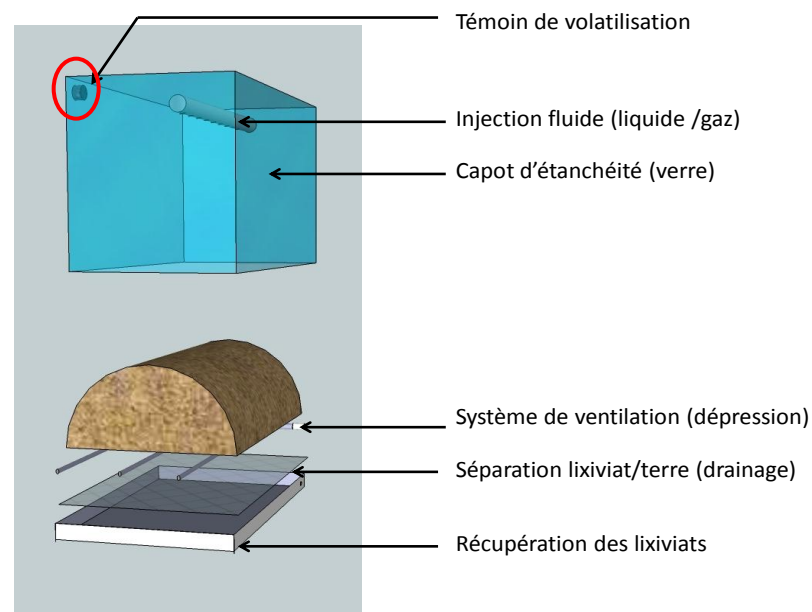
### > En résumé :

- De nombreux paramètres influent sur l'interprétation des résultats (matière organique du sol, incertitudes analytiques, taux de compost, volatilisation).
- Ce test se réalise en condition aérobie (présence d'O<sub>2</sub>). Or de nombreux polluants (ex: chlorés) se dégradent en absence d'O<sub>2</sub>.
- Ne prend pas en compte les pertes par volatilisation (BTEX, HC C<sub>5</sub>-C<sub>16</sub>, Naphtalène etc ...)
- **Le test de respirométrie seul ne permet pas de conclure sur la notion d'activité de biodégradation spécifique d'un polluant**

## Les tests de faisabilité en laboratoire

### > Le test de faisabilité vise à estimer la biodégradation du polluant en reconstituant au mieux les contraintes du site.

- Les pilotes sont réalisés sur des masses de terres importantes (3, 5, 10 kg)
- La stratégie de biodégradation (aérobie ou anaérobie) doit être discutée avec le client
- La température doit être comparable aux variations climatiques du site
- La durée du pilote doit être adaptée pour pouvoir établir des conclusions fiables.
- Les outils de monitoring de la dépollution doivent être précis.
- La biostimulation doit être adaptée en fonction des contraintes connues.
- La volatilité (ou l'adsorption) du polluant doit être estimée



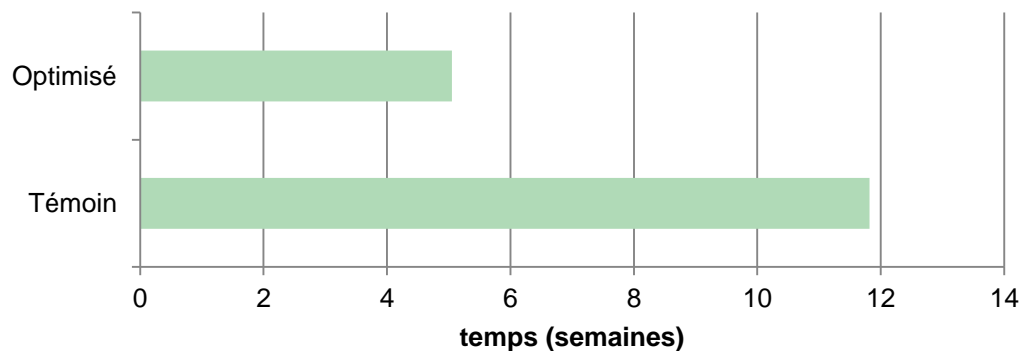
## Problématique HC : Exemple de résultats N°1

→ Mise en place de 2 Pilotes laboratoires

- Pilote témoin
- Pilote optimisé : Ajout d'un structurant + biostimulant inorganique

	HCT C10-C40 (en mg/kg)
Témoin To	4500
Témoin Tf	3560
Optimisé T0	4500
Optimisé Tf	2540

Temps de 1/2vie, HCT (C10-C40)



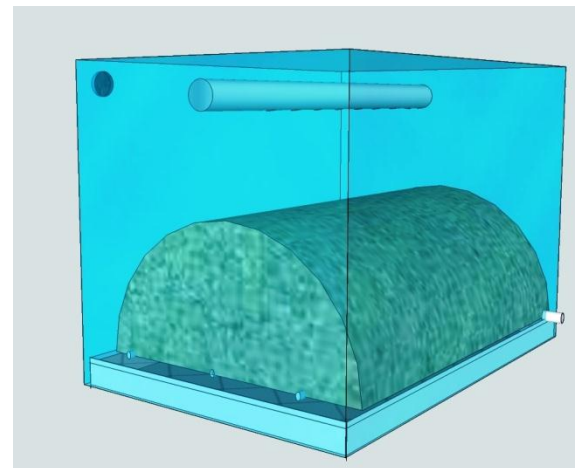
L'abattement observé est-il dû à la biodégradation, l'hétérogénéité spatiale du polluant ou à la volatilisation ?



## Du Plan de Gestion à l'Achèvement des Travaux de Dépollution

→ Biomarqueurs sélectionnés:

- G+3 : Hydroxylase de type *alkB*
- P1-1 : Hydroxylase de type *alkB*
- Monooxygénase de type *CYP153*



		P1-1
ADN (nb de copie/kg)	T0	1,54 <sup>E+03</sup>
	Témoin Tf	4,85 <sup>E+03</sup>
	Optimisé Tf	6,40 <sup>E+05</sup>
ARN (nb de copie/kg)	T0	2,42 <sup>E+05</sup>
	Témoin Tf	3,12 <sup>E+05</sup>
	Optimisé Tf	9,19 <sup>E+06</sup>



La biostimulation des communautés microbiennes indigènes est efficace.



Augmentation des cinétiques de biodégradation des HCT.

## Problématique COHV : Exemple de résultats N°2

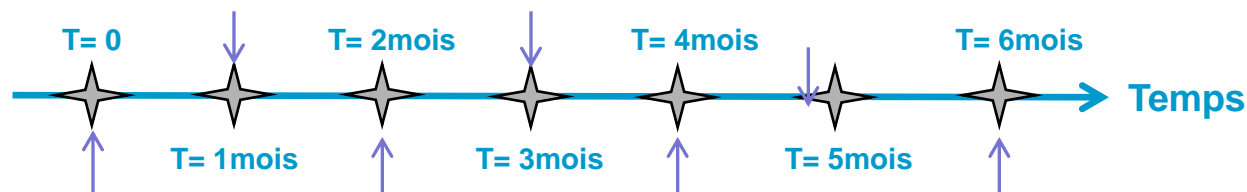
→ **Contexte du site** : Site industriel dont la nappe phréatique est historiquement polluée par des solvants chlorés, dont les éthylènes chlorés (PCE/TCE/DCE/CV)

→ **Objectif de l'industriel** : Le client souhaite vérifier si l'atténuation naturelle est effective sur son site. Dans le cas contraire, envisager une biostimulation visant à réduire la présence des éthylènes chlorés.

### → **Objectifs ENOVEO** :

Pilote de biostimulation des Communautés Microbiennes Indigènes impliquées dans la dégradation des éthylènes chlorés :

- Contrôle : Evaluation de l'atténuation naturelle
- Biostimulé : (Ajout d'un substrat organique)



Echantillons Contrôle et biostimulé

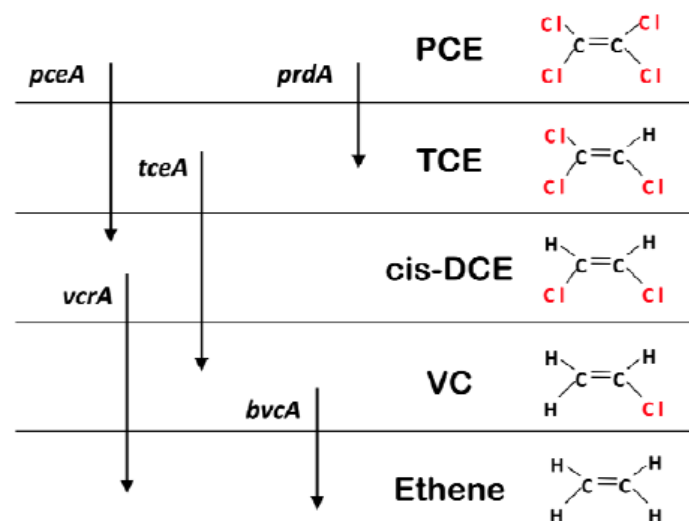
- Suivi microbiologique
- Suivi chimique



= sacrifices de microcosmes pour analyses biologiques et chimiques

→ Biomarqueurs sélectionnés pour la dégradation des éthylènes chlorés :

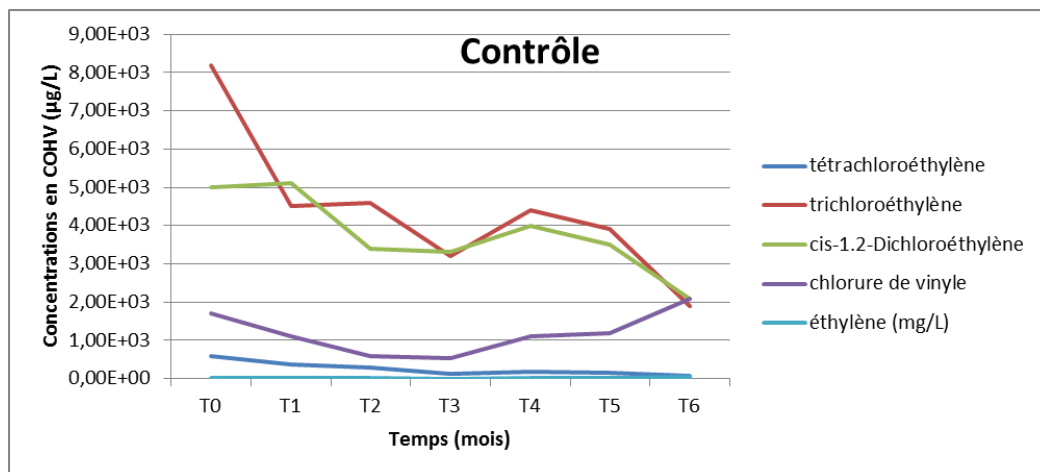
- *rrs* du genre *Dehalococcoides*
- Déhalogénase réductive *prdA*
- Déhalogénase réductive *pceA*
- Déhalogénase réductive *tceA*
- Déhalogénase réductive *vcrA*
- Déhalogénase réductive *bvcA*



Voie de biodégradation anaérobie des éthylènes chlorés

## Du Plan de Gestion à l'Achèvement des Travaux de Dépollution

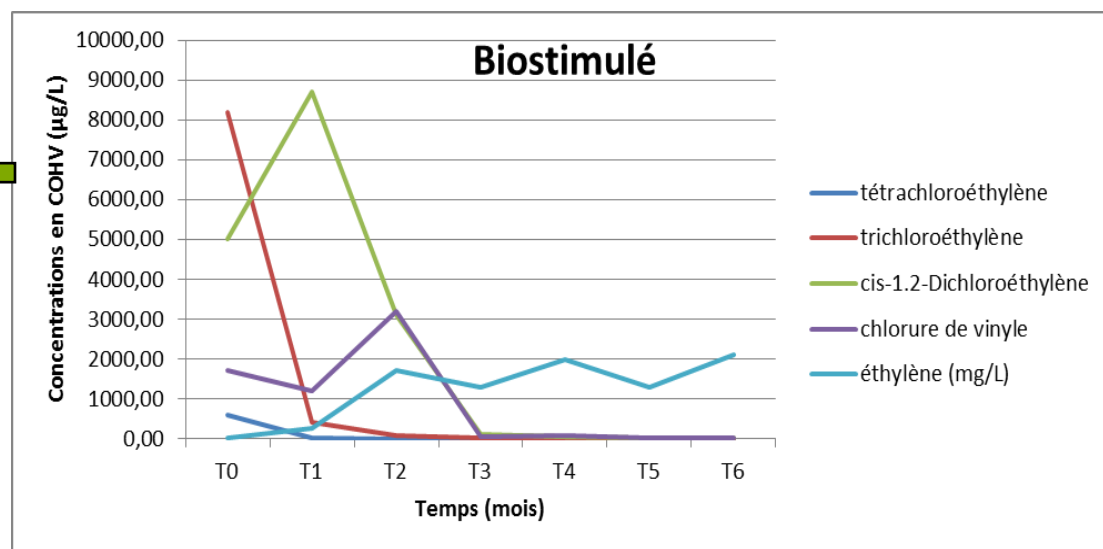
→ Résultats chimiques :



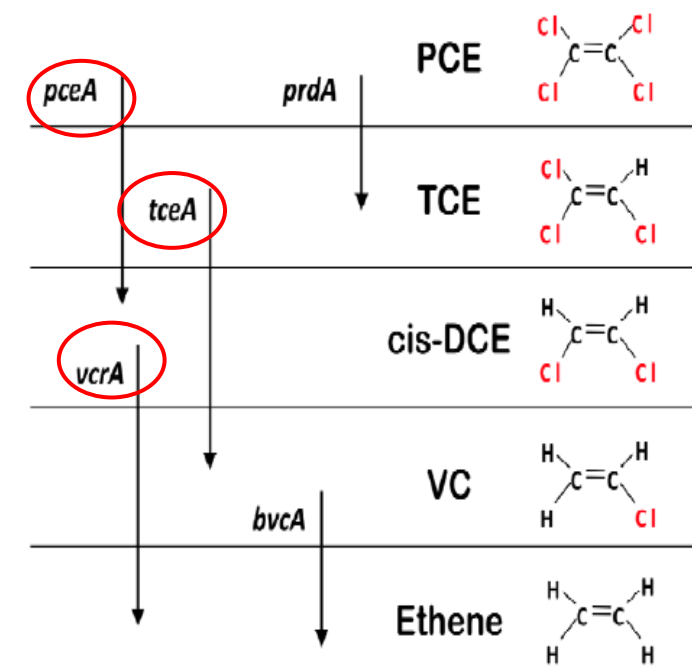
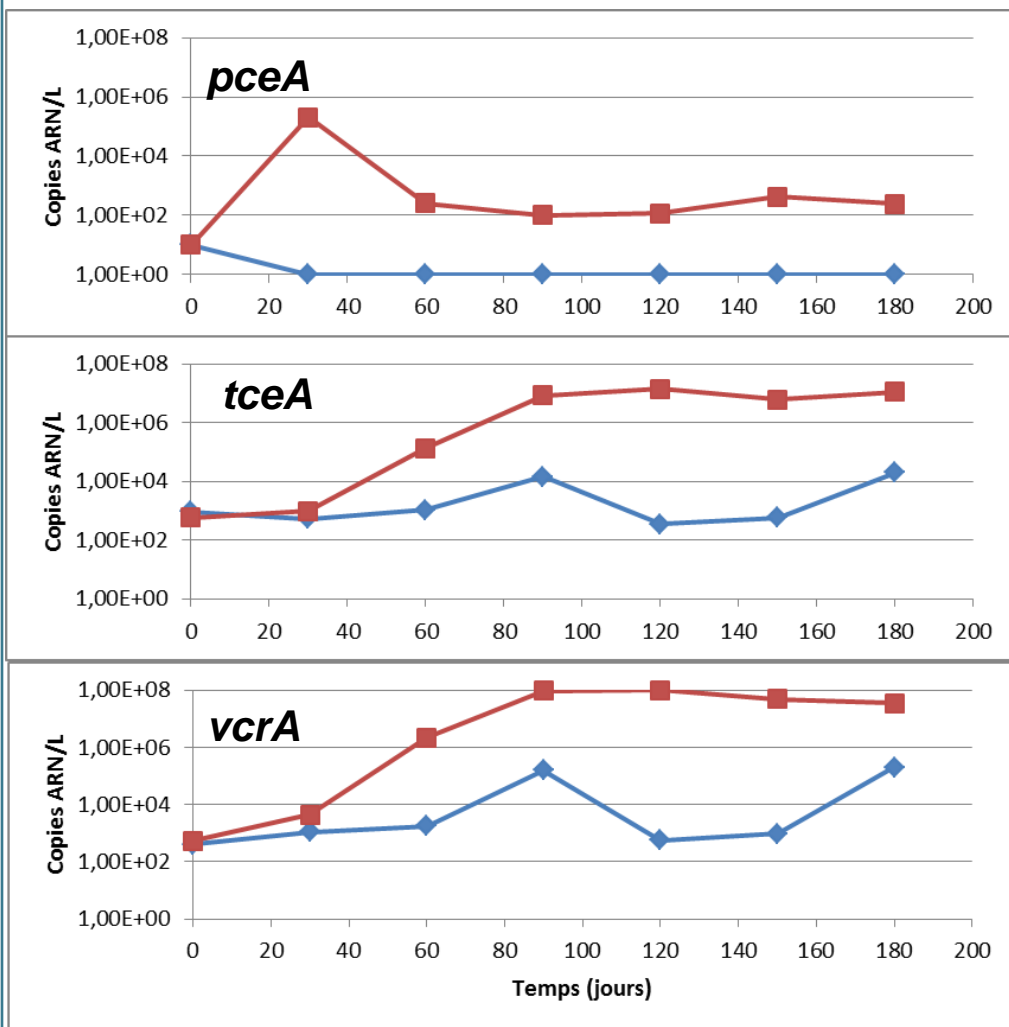
-Diminution du PCE, TCE et cis-DCE

-Légère accumulation de CV  
-A la fin du pilote (6 mois), les eaux sont encore polluées (~2 mg/l) en TCE, cis-DCE et CV.

-Diminution de l'intégralité des éthylènes chlorés  
-Augmentation d'éthylène  
-Pas d'accumulation de CV



# Du Plan de Gestion à l'Achèvement des Travaux de Dépollution



Contrôle    Biostimulé



## Les tests de faisabilité en laboratoire

### > Conclusion :

- **Prendre en compte la spécificité de chaque site.**
- Le test de faisabilité doit donner la vision la plus précise des mécanismes de biodégradation des polluants.
- Dans certains cas, il est possible de déterminer des cinétiques de biodégradation (laboratoire).
- Attention dans l'estimation des cinétiques entre laboratoire et terrain
- Le monitoring analytique est important. La dégradation du polluant mais également ses métabolites doivent être suivis sur une durée appropriée
- Il est important de faire des pilotes laboratoire qui soient applicables (techniquement ou économiquement) sur site.

## **Durées et ordre de grandeur de prix des tests**

### **> Le test de traitabilité :**

- Respirométrie : Durée conseillée 28 jours
  - Environ : < 800 €/éch./test
- Potentiel de biodégradation : Délai : 2 à 3 semaines
  - Dépend de la stratégie, du polluant ciblé, du nbre d'éch. : 1 000 € / >3 000 €

### **> Le test de faisabilité**

- Durée dépendante du polluant :
  - Ex : HCT 5 à 6 semaines, COHV ou PCB plusieurs mois (4-6 mois)
- Prix en fonction du polluant et de la stratégie : 4 K€ à plusieurs dizaines K€

### **> Détermination de l'atténuation naturelle**

- Durée liée au déroulement de l'analyse et l'interprétation des résultats dans le contexte du site : 3 à 4 semaines
- Prix dépend du contexte : 3 K€ à > 10 K€

**Le prix du test dépend du polluant, du nombre d'échantillons, du monitoring, de la durée, de la spécificité du site etc...**

## De l'expertise du laboratoire au terrain ...



## > Premier cas: Aménagement Urbain: Sécuriser le choix du scénario de gestion

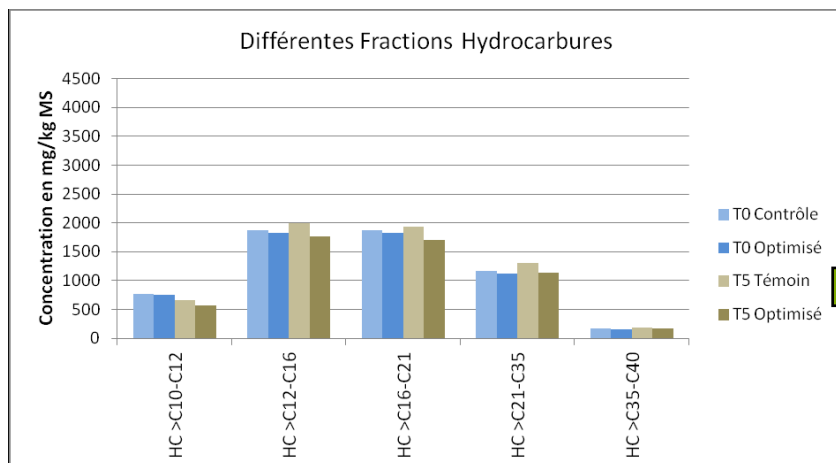
- Exemple :
  - Un site avec une pollution aux HC majoritairement la fraction C12-C25, théoriquement facilement biodégradable
  - Besoin de l'Aménageur en terre pour constitution d'un merlon phonique paysager (sur zone non constructible/ le long voie ferrée)
  - Surface disponible et planning compatible (12-15 mois)
  - Estimation budget par biotraitement avant test : 350 k€

⇒ **Conditions idéales pour envisager un traitement SUR SITE**

⇒ **Réalisation d'un test de biodégradation**

## Du Plan de Gestion à l'Achèvement des Travaux de Dépollution

- La stratégie de dépollution s'oriente vers un traitement par biodégradation = Réalisation d'un test de biodégradation. Le test doit permettre de mettre en évidence la faisabilité de la solution retenue.



Le test [**Respirométrie + Biologie moléculaire**]

conclut à l'absence de potentiel de biodégradation au bout de 35 jours

⇒ malgré ces résultats : possibilité donnée aux Entreprises de réaliser leurs propres tests

⇒ Retour de la consultation : pas d'engagement sur le traitement Bio sur site vis-à-vis des objectifs

- **Conclusions:**

- le test a permis d'écartier une solution « non sécurisée » pour le MO au regard des objectifs demandés pour le merlon
- d'éviter un dérive du planning et un surcoût de reprise des terres non conformes
- coût final du chantier : 380 k€ (élimination)
- coût potentiel si biotraitement mis en œuvre mais non efficace :  
>> 380 k€ (double travail)
  
- Cout du pilote ENOVEO : Environ 4-6 K€ (environ 1 % du montant des travaux)

## > Deuxième cas: Réalisation d'un Plan de Gestion sur un ancien site pétrolier

- Présence d'une vieille contamination d'hydrocarbures aliphatiques C21-C35,
- Interrogation au niveau de l'étude technico économique sur la faisabilité technique d'un traitement par voie biologique (fractions lourdes)
- Autres techniques envisagées : désorption thermique on-site ou élimination (coût de l'ordre de 10 M€)

## > Réalisation d'un essai de dégradation en laboratoire

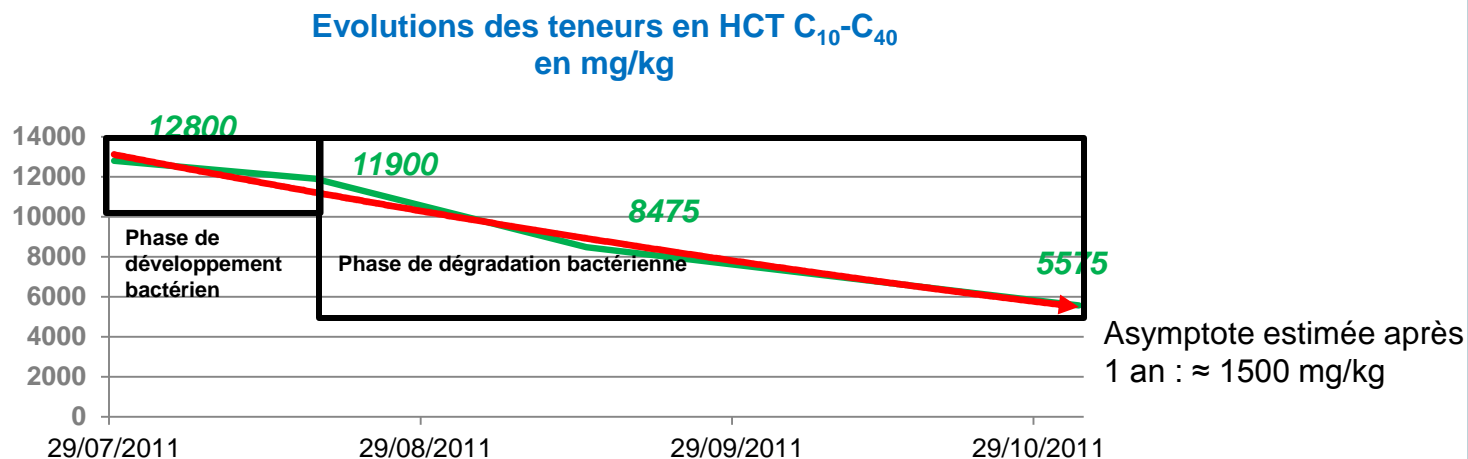
- Test sur échantillon non remanié (témoin)
- Test sur échantillon bio structuré + ajout O<sub>2</sub>, humidité, température

Test en laboratoire

=> Potentiel biologique non caractérisé à T+28 jours

## > Poursuite de la réflexion sur la faisabilité avec un essai pilote on site (bioterre)

- Par **biostructuration** (compost), **bioaugmentation** (sélection de souches exogènes adaptées au profil et aux milieux) et **biostimulation** (aération, contrôle humidité et température) en simultanée



- Coût du pilote labo (4-6 k€) - Coût du pilote sur un an :  $\approx 250$  k€
- Coût estimé de la dépollution par biotraitement : 1-2 M€ (soit 5 à 10 fois moins que la désorption)

# Recommandations - Perspectives

➤ **Conclusions sur les test de traitabilité et de faisabilité**

✓ **Chaque site/projet est spécifique, cette spécificité implique la nécessité de faire des essais.**

✓ Les essais labo apportent des éléments d'aide à la décision sur la base du potentiel biologique et génétique d'un sol ainsi qu'une aide à l'orientation (ou non) vers une solution de biostimulation pour des conditions données (température, oxygène, carbone, humidité, etc.).

✓ En complément des essais labo, les essais pilotes de terrain sont recommandés avant décision sur la filière de traitement biologique,

✓ Monitoring méthodique recommandé des opérations de biotraitement pour suivre l'efficacité et corriger les paramètres, si nécessaire (ADN/ARN, apport oxygène, carbone, etc.)



### ➤ Intégration dans la démarche de gestion

- ✓ Les résultats des tests de traitabilité et/ou de faisabilité permettent :
  - la sélection ou non du traitement biologique pour le bilan coûts / avantages (compatibilité des délais, potentiel de biodégradation...)
  - la précision des modalités de traitement à prendre en compte dans le BCA (structurants, nutriments, aération, ventilation, contrôle de l'humidité → biotertre avec aération mécanique, biotertre couvert et ventilé...)
  - de préciser le dimensionnement du traitement en phase de consultation
  - de préciser les paramètres à suivre pendant le traitement ainsi que pour la réception des travaux
  
- ✓ L'investissement financier pour les tests est minime (qq % du budget global) par rapport aux économies potentielles (traitement biologique : 15 – 40 €/t vs 80 – 130 €/t en élimination)

## *Du Plan de Gestion à l'Achèvement des Travaux de Dépollution*

### ➤ **Intégration dans la démarche de gestion - Application du principe aux autres techniques**

D'une manière générale, des essais complémentaires et des essais pilotes sont utiles pour plusieurs techniques de dépollution:

- Essais complémentaires : caractéristiques physico-chimiques des milieux, conditions géologiques et géotechniques, mesures de perméabilité à l'air, tests de pompage, tests de réalimentation en phase libre, essais de stabilisation ...
- Tests pilotes : essais de venting, essais d'écémage ...

Les résultats de ces essais permettent:

- de mieux comprendre les enjeux propres aux caractéristiques du site et du projet;
- d'établir un bilan coûts / avantages précis et complet en regard des enjeux identifiés;
- de sécuriser le dimensionnement des travaux, pour de nombreuses techniques (venting, pompage & traitement, écémage, oxydation / réduction chimique, thermique...);
- et de sécuriser le suivi et la réception des travaux de dépollution
- à un coût faible en regard des budgets engagés et des économies potentielles réalisées

## Merci de votre attention



**Bioengineering Environmental Solutions**

**Olivier Sibourg**

*Gérant*

+33 (0) 603 678 856

7, Place Antonin Poncet  
69002 Lyon – FRANCE

+33 (0) 427 118 545

[www.enoveo.com](http://www.enoveo.com)

**Cédric GOURVES**

Adjoint au Directeur Métier

Sites et Sols Pollués

Agence Paris-Centre-Normandie

**Antea Group**

Immeuble AXEO

29 avenue Aristide Briand

CS 10006

94117 Arcueil Cédex

France

**T 33 (0)1 57 63 13 72**

**P 33 (0)6 21 28 47 85**

[cedric.gourves@anteagroup.com](mailto:cedric.gourves@anteagroup.com)

[www.anteagroup.fr](http://www.anteagroup.fr)



Membre d'Inogen® | [www.inogenet.com](http://www.inogenet.com)