

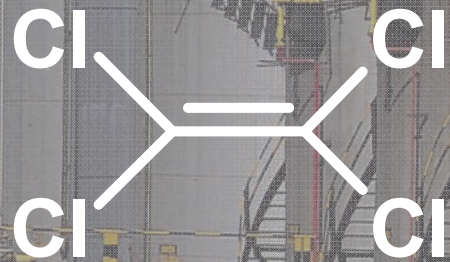
Etude microbiologique du potentiel de bioremédiation de sites contaminés par des hydrocarbures chlorés

Sonia Tarnawski, Pierre Rossi et
Christof Holliger

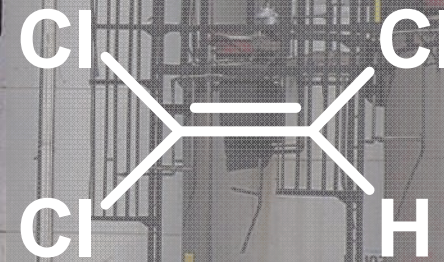
EPFL ENAC IIE LBE & CEL

Les solvants chlorés Per- et Trichloroéthène

Des solvants sûrs pour l'industrie



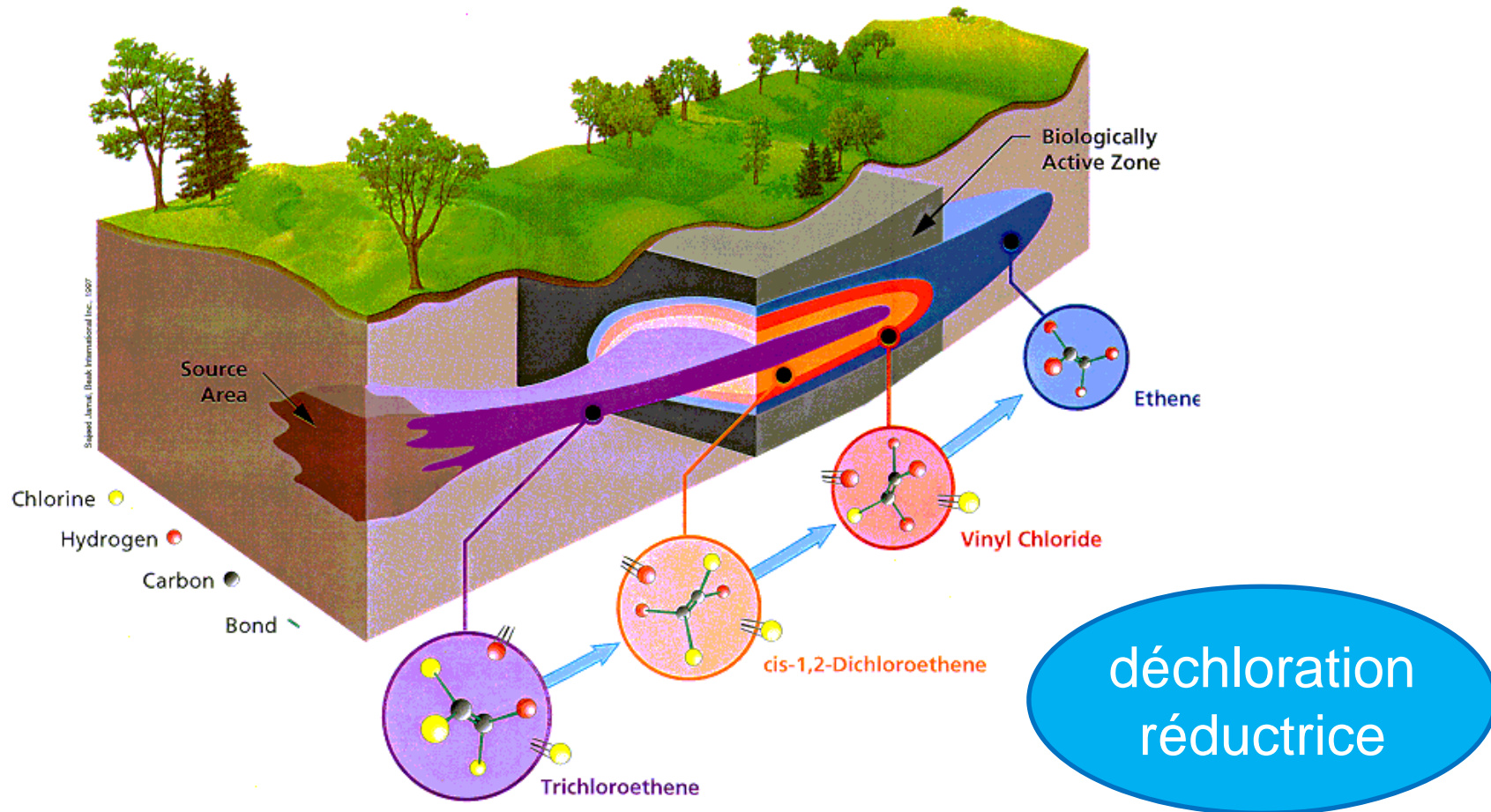
PCE
perchloroéthène



TCE
trichloroéthène

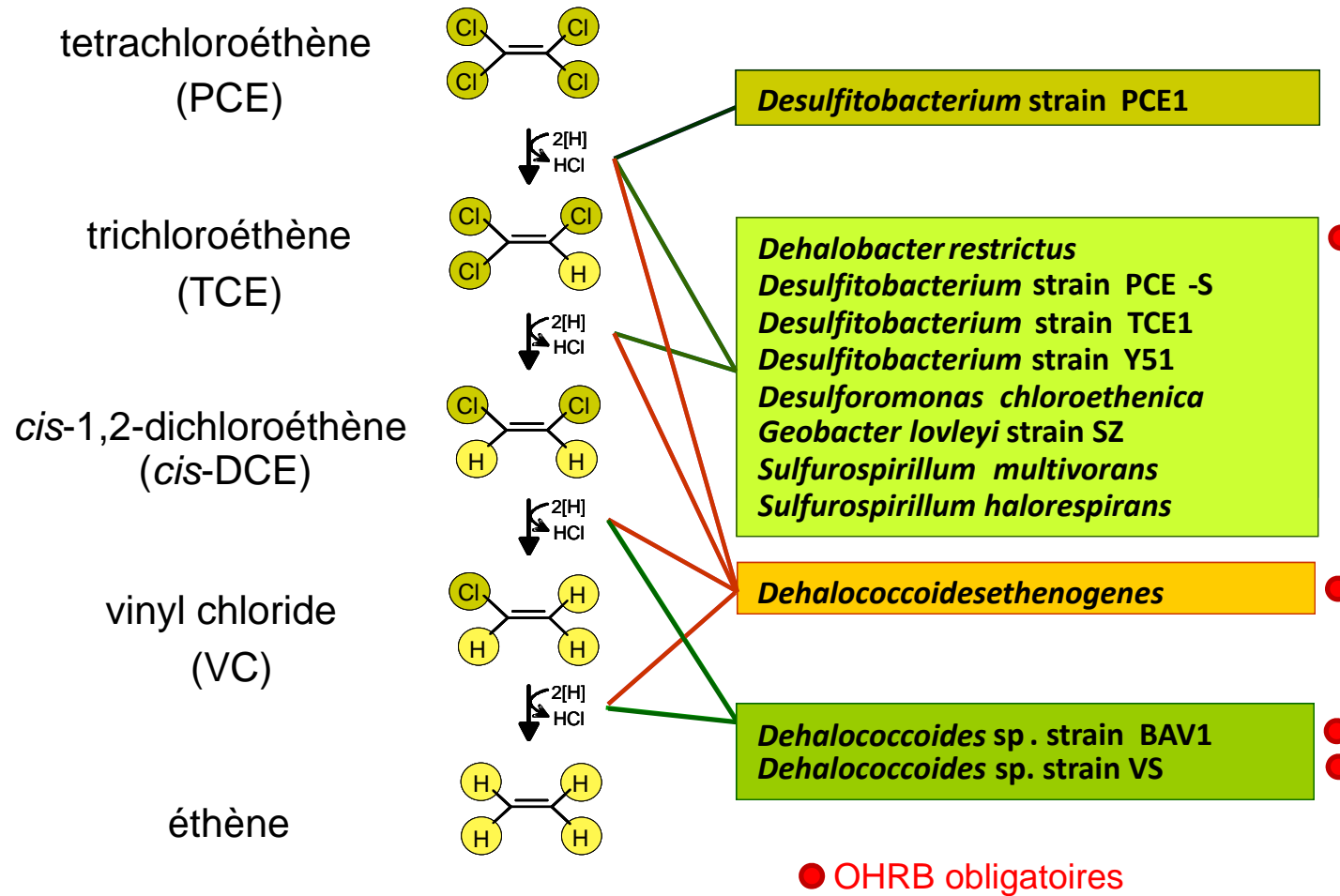
mais récalcitrant aux attaques oxydatives

Leur transformation dans les nappes phréatiques

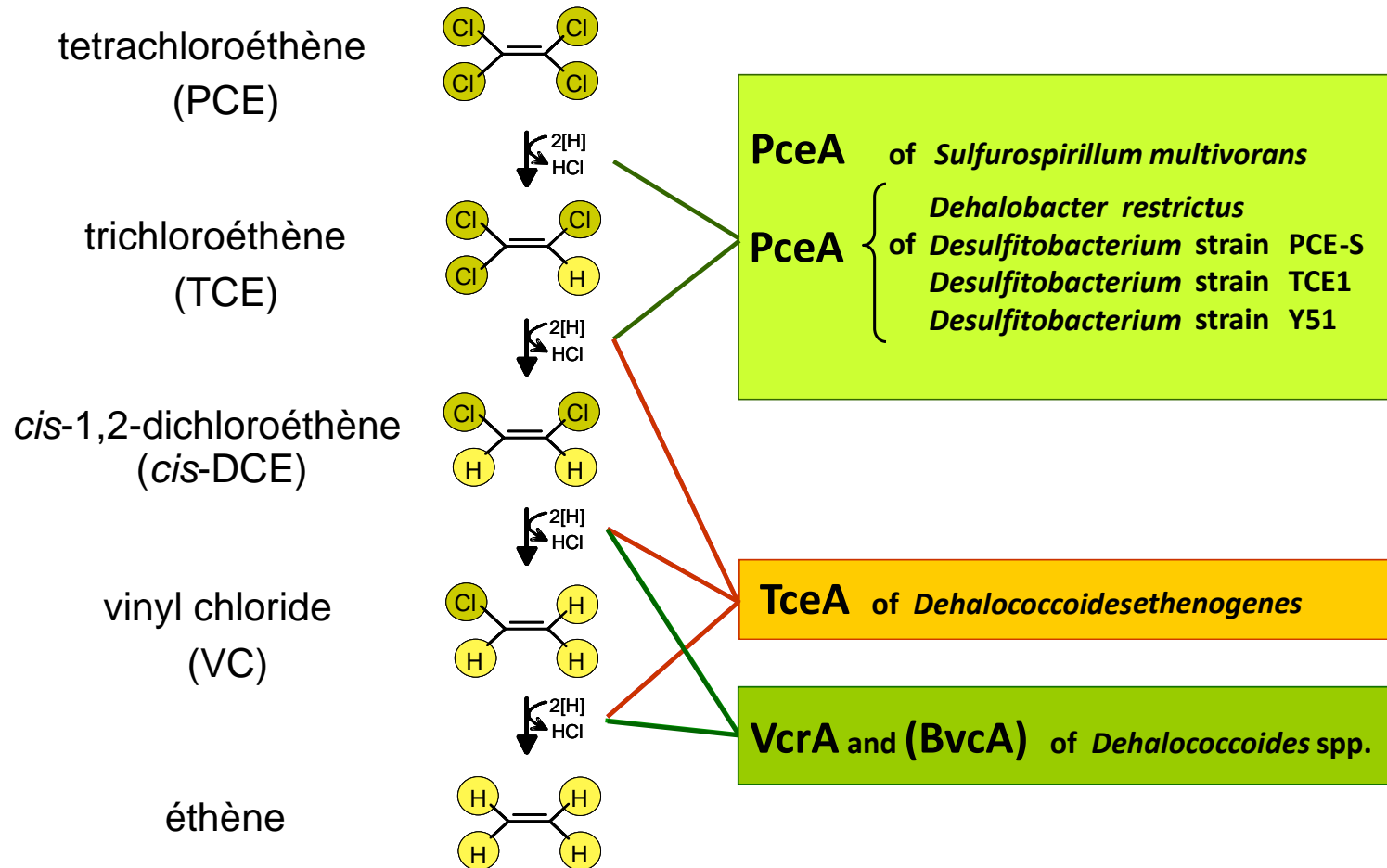


Bactéries anaérobies respirant les chloroéthènes

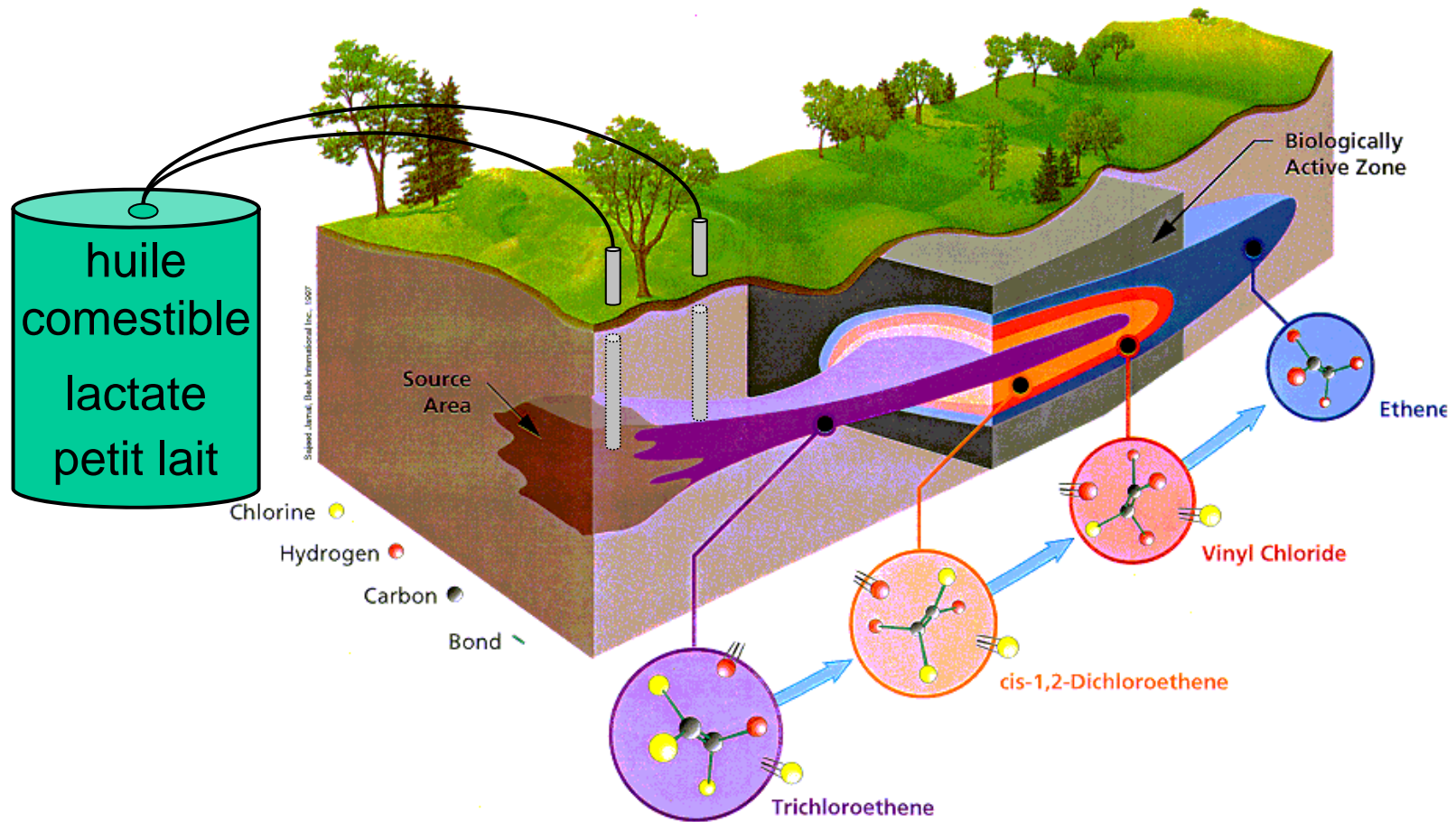
(OHRB)



Déhalogénases réductrices des chloroéthènes



Atténuation naturelle contrôlée ou dynamisée



Méthodologie pour l'estimation du potentiel de bioremédiation

Deux étapes:

1) Présence du potentiel biochimique

- Analyses moléculaires pour la présence/absence des bactéries et enzymes impliquées dans la déchloration réductrice
- Enrichissement de l'activité microbienne de déchloration en microcosme

2) Analyse de l'écologie microbienne de la nappe phréatique

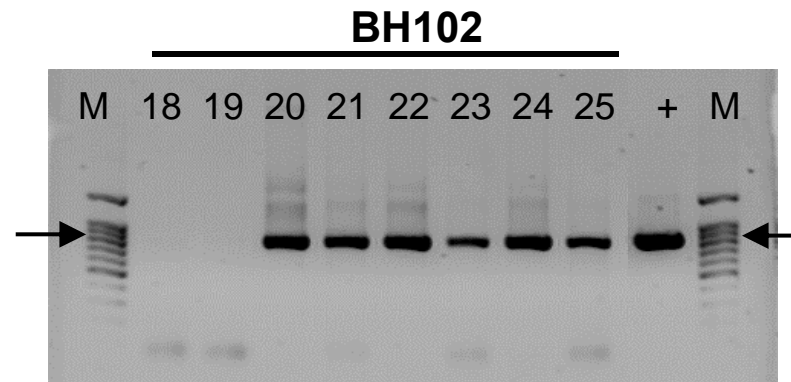
- Analyses moléculaires des communautés microbiennes
- Analyses physico-chimiques de l'eau souterraine
- Développement d'un modèle conceptuel de l'écosystème basé sur une analyse statistique multivariée

Analyses moléculaires du potentiel de bioremédiation

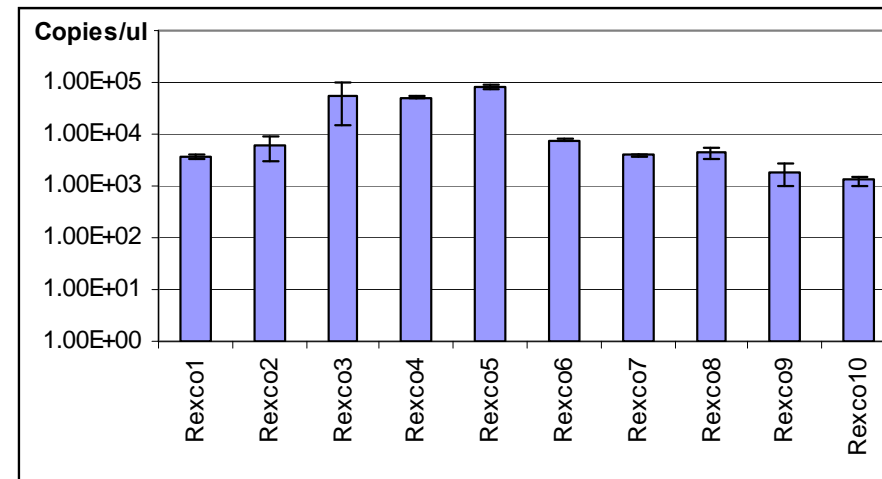
- PCR qualitative et quantitative (qPCR) spécifique pour
 - Les gènes de l'ARN ribosomique 16S des OHRB respirant les chloroéthènes
 - Les gènes des déhalogénases réductrices comme les PceA, TceA, VcrA et BvcA
- Etapes des analyses moléculaires
 - Extraction de l'ADN d'un échantillon d'eau ou de sol (carottage)
 - Amplification des gènes cibles par PCR
 - Visualisation des produits PCR ou calcul du nombre de copies présent dans l'échantillon

Résultats des analyses par PCR

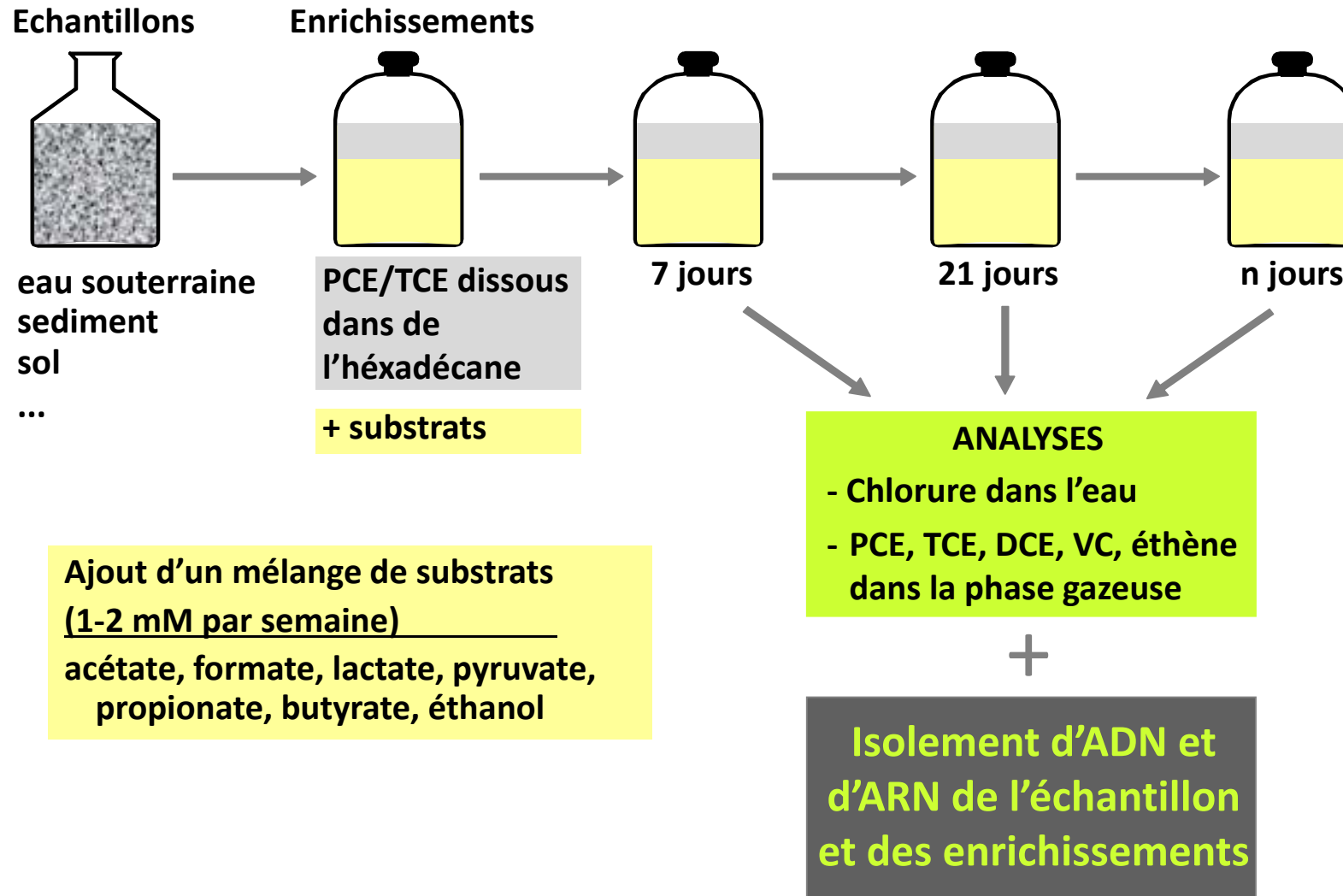
Détection qualitative de
la présence / absence
($<$ limite de détection)



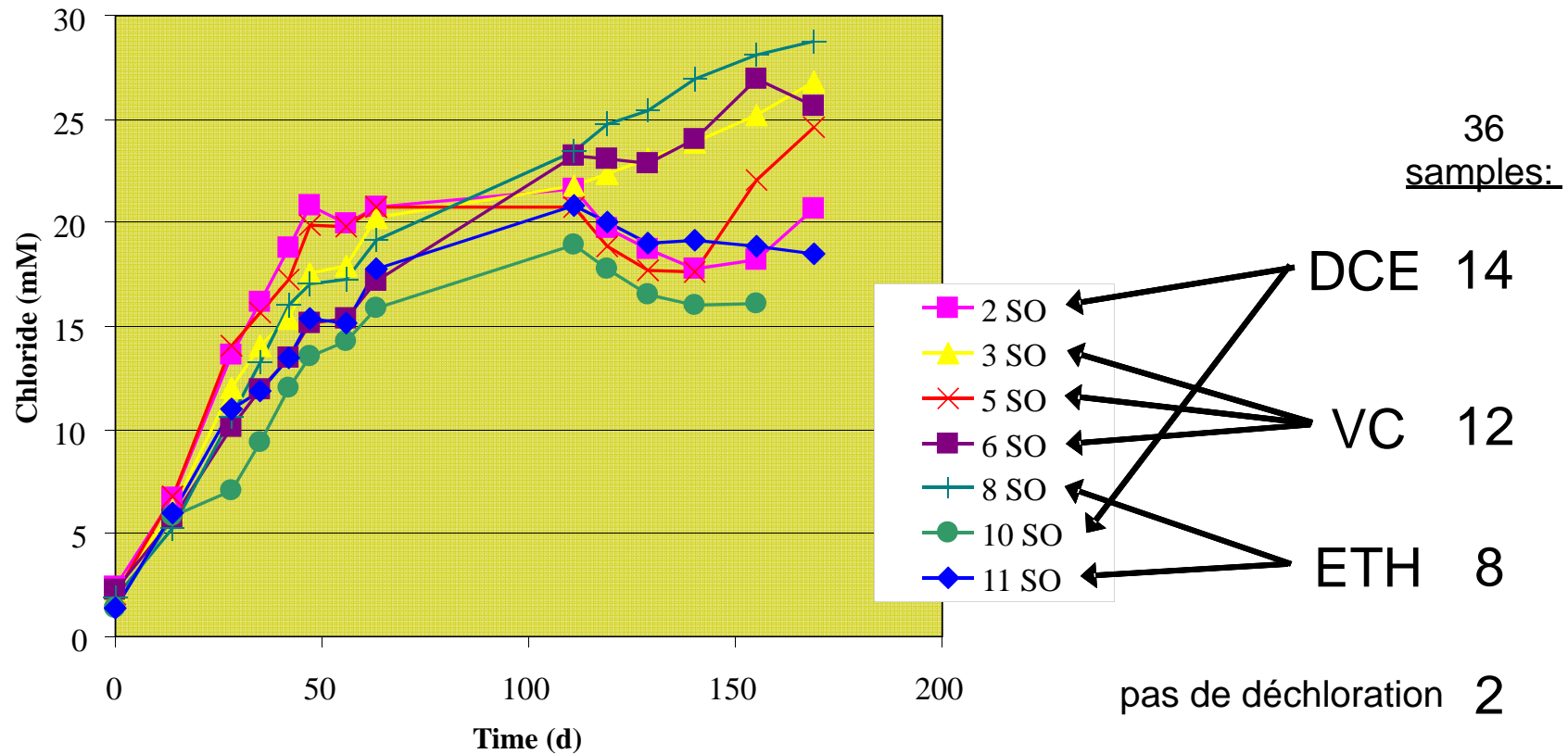
Quantification du
nombre de copies d'un
gène spécifique



Set-up expérimental des microcosmes



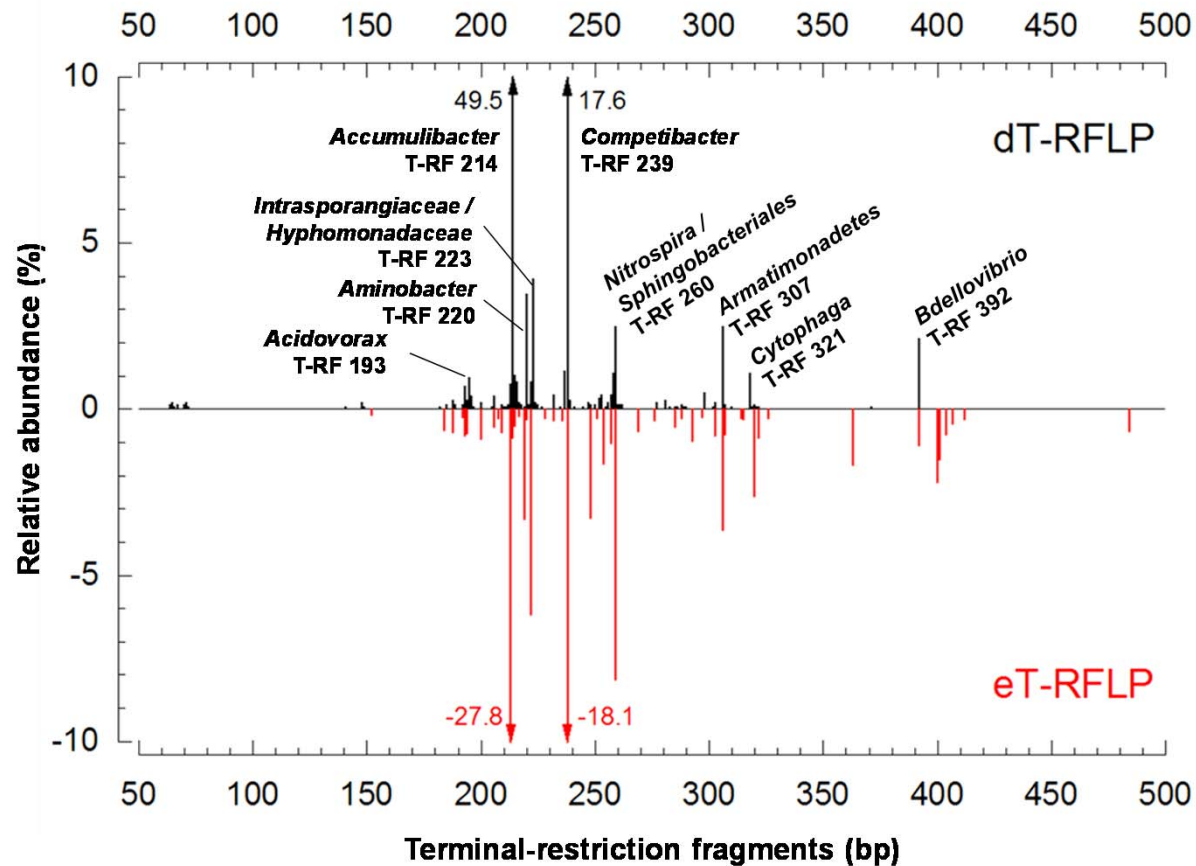
Déchloration dans des microcosmes



Analyse de l'écologie microbienne de la nappe phréatique

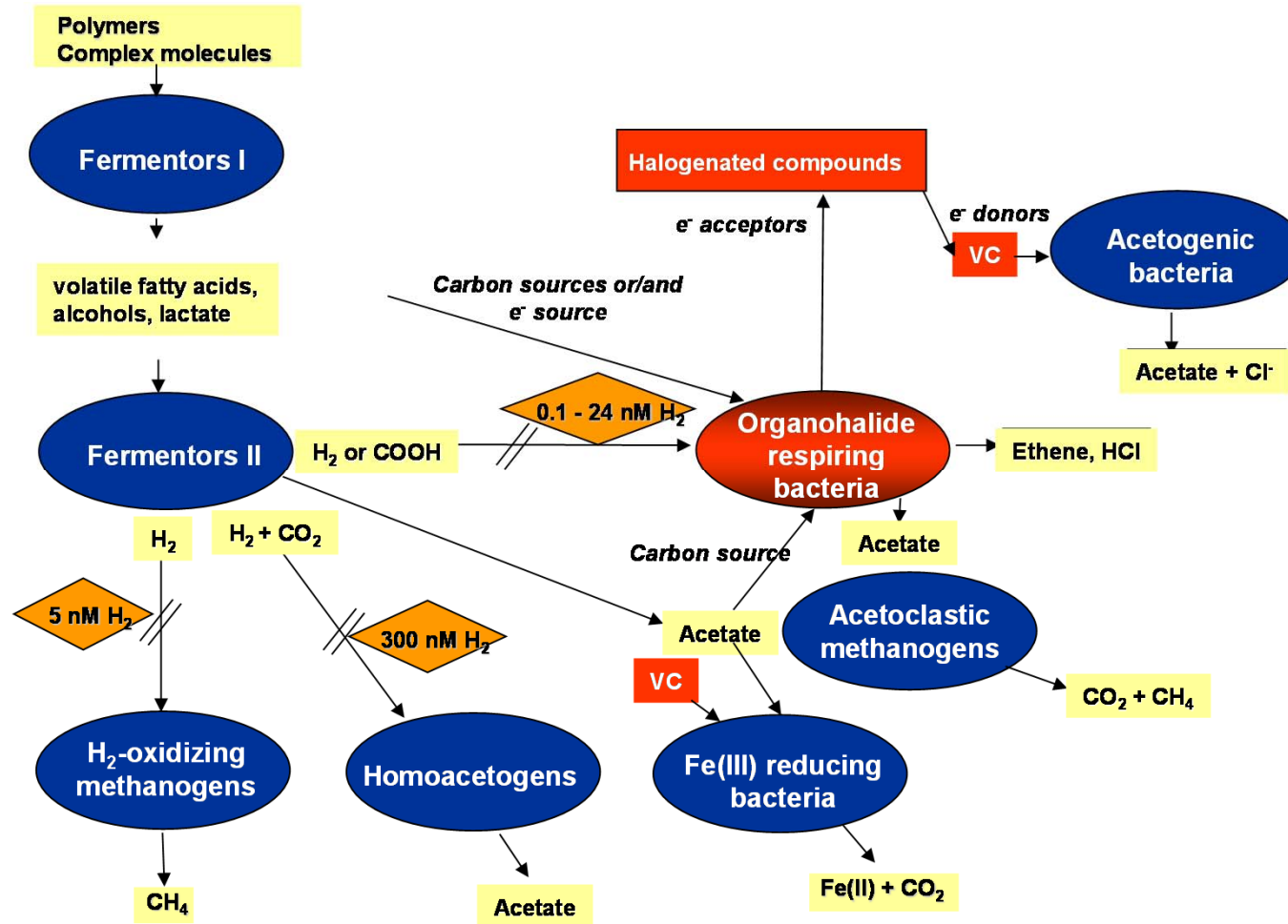
- Analyses moléculaires des communautés microbiennes (CMs) dans l'eau souterraine
 - ❑ Combinaison de T-RFLP (empreinte de la CM) et séquençage massif en utilisant PyroTRF-ID
- Analyses physico-chimiques de l'eau souterraine
 - ❑ Les polluants et possibles produits de dégradation
 - ❑ Les cations et anions classiques et moins classiques
 - Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , S^{2-}
- Analyse statistique multivariée
- Développement d'un modèle conceptuel de l'écosystème

Combinaison de T-RFLP et séquençage massif en utilisant PyroTRF-ID

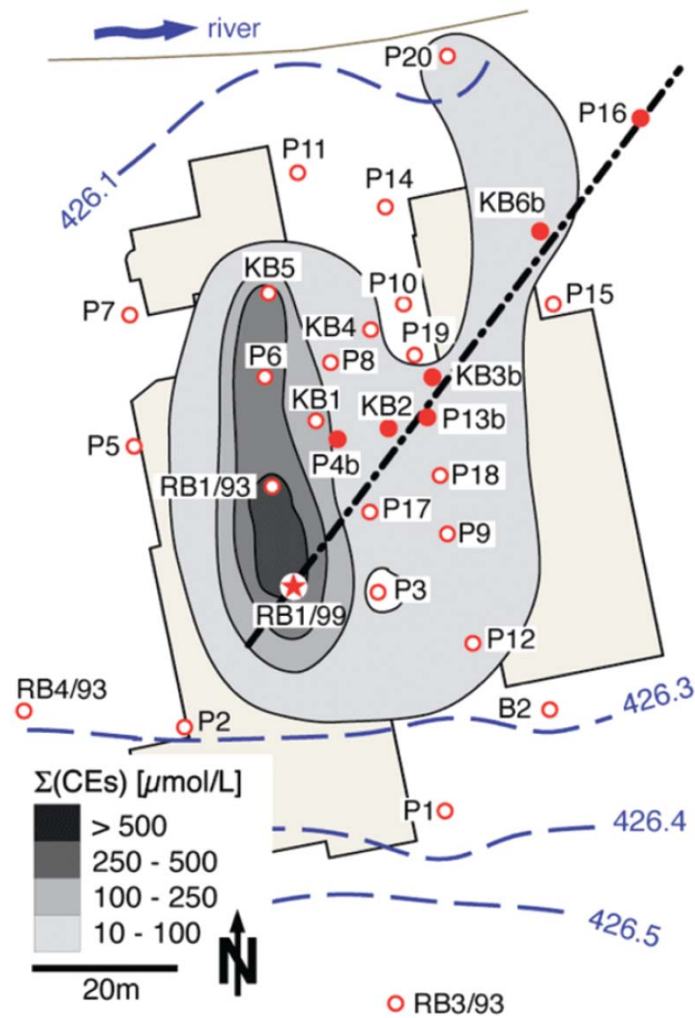


Weissbrodt and Shani, et al. (2012) *BMC Microbiol.* 12:306

Les guildes bactériennes impliquées dans la déchloration des chloroéthènes



Étude de cas no.1: Zuchwil (SO)



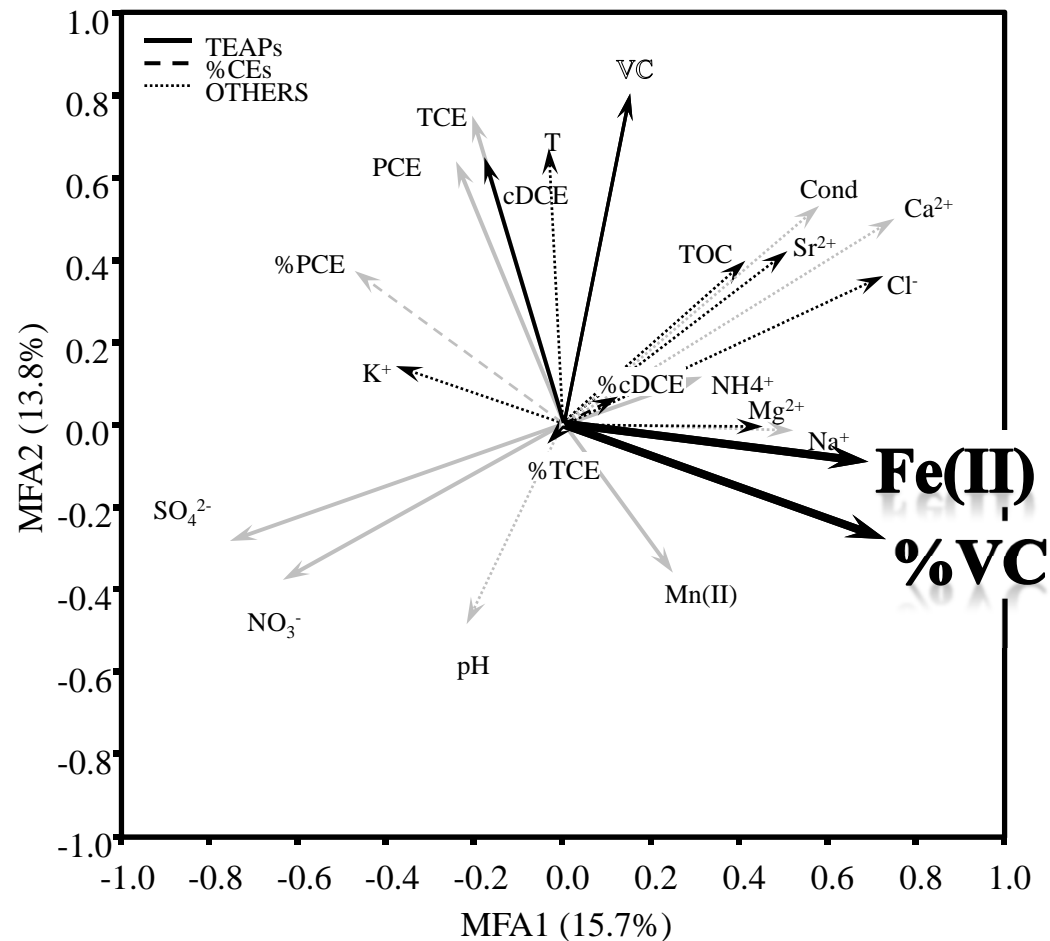
Noam Shani sur le terrain

Zuchwil: Le potentiel biochimique est présent

	B2	P20	KB1	KB2	KB3a	KB3b	KB4a	KB4b	KB5a	KB5b	KB6a	KB6b	KB7a	KB7b	RB1/93	RB1/99	RB3/93
<i>Dehalococcoides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>Dehalobacter</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Sulfurospirillum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Desulfuromonas</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>Desulfitobacterium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>vcrA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
<i>bvcA</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-

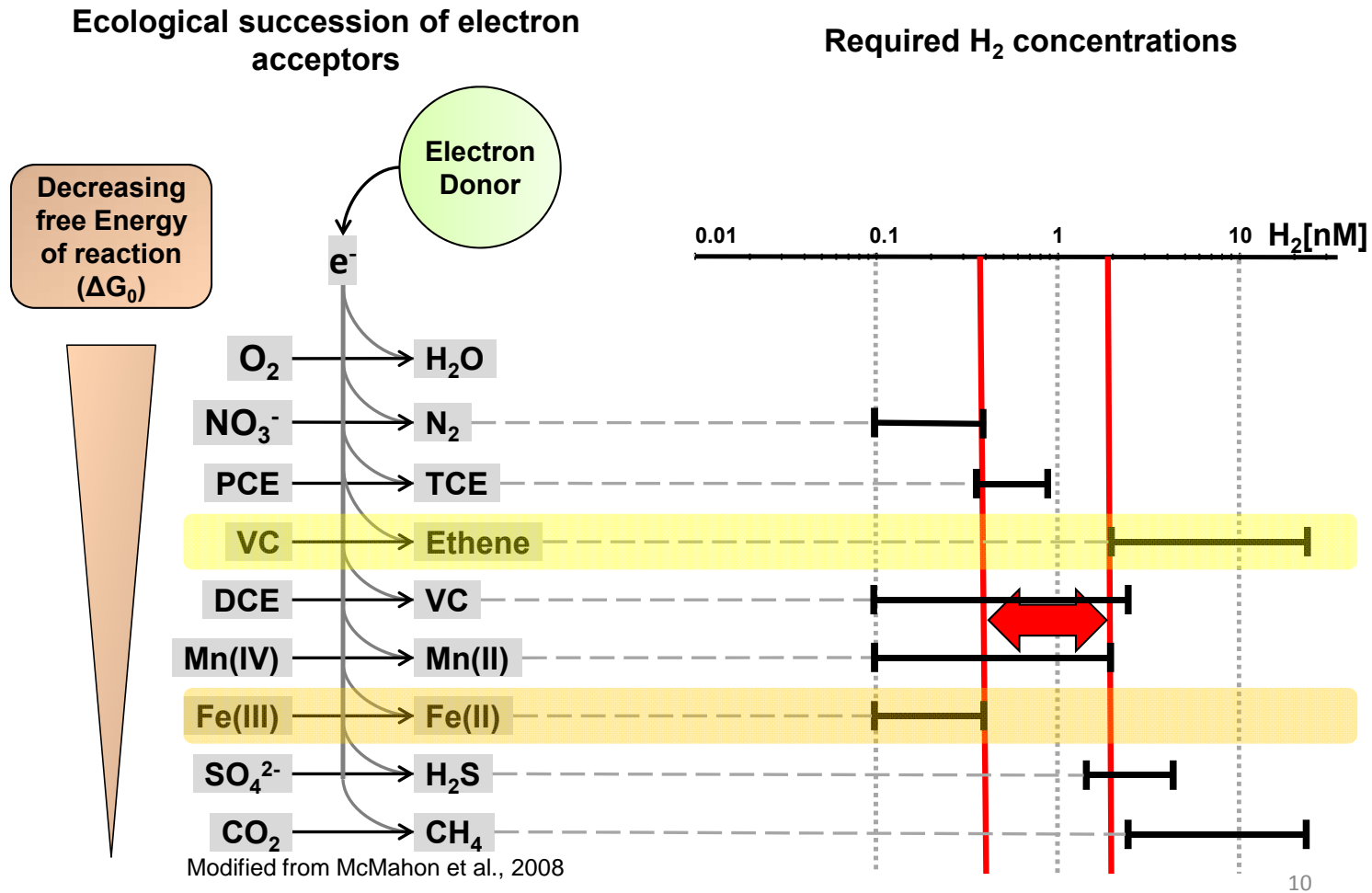
Zuchwil:

Compétition entre les bactéries ferri-réductrices et les OHRB respirant le chlorure de vinyl

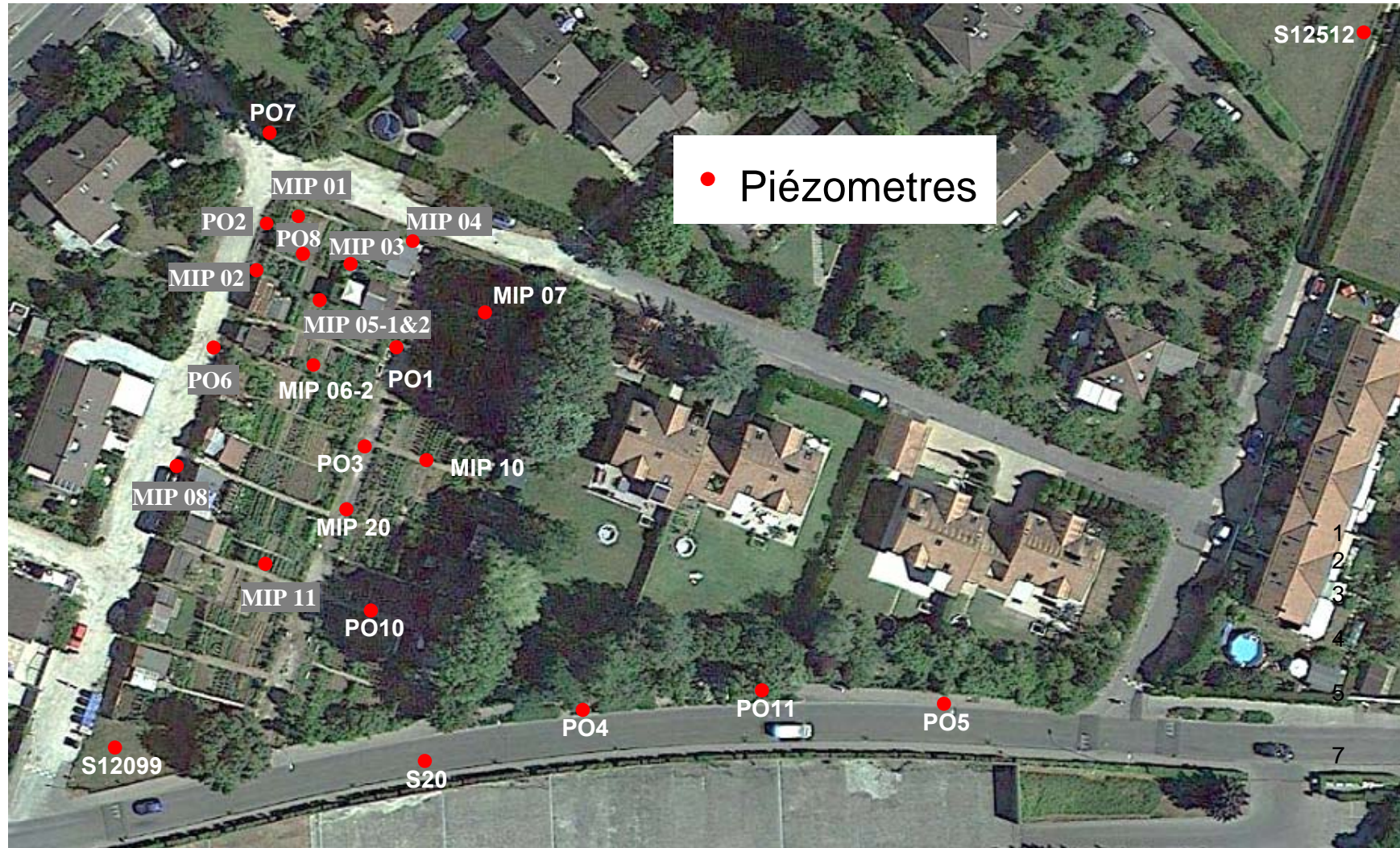


Zuchwil:

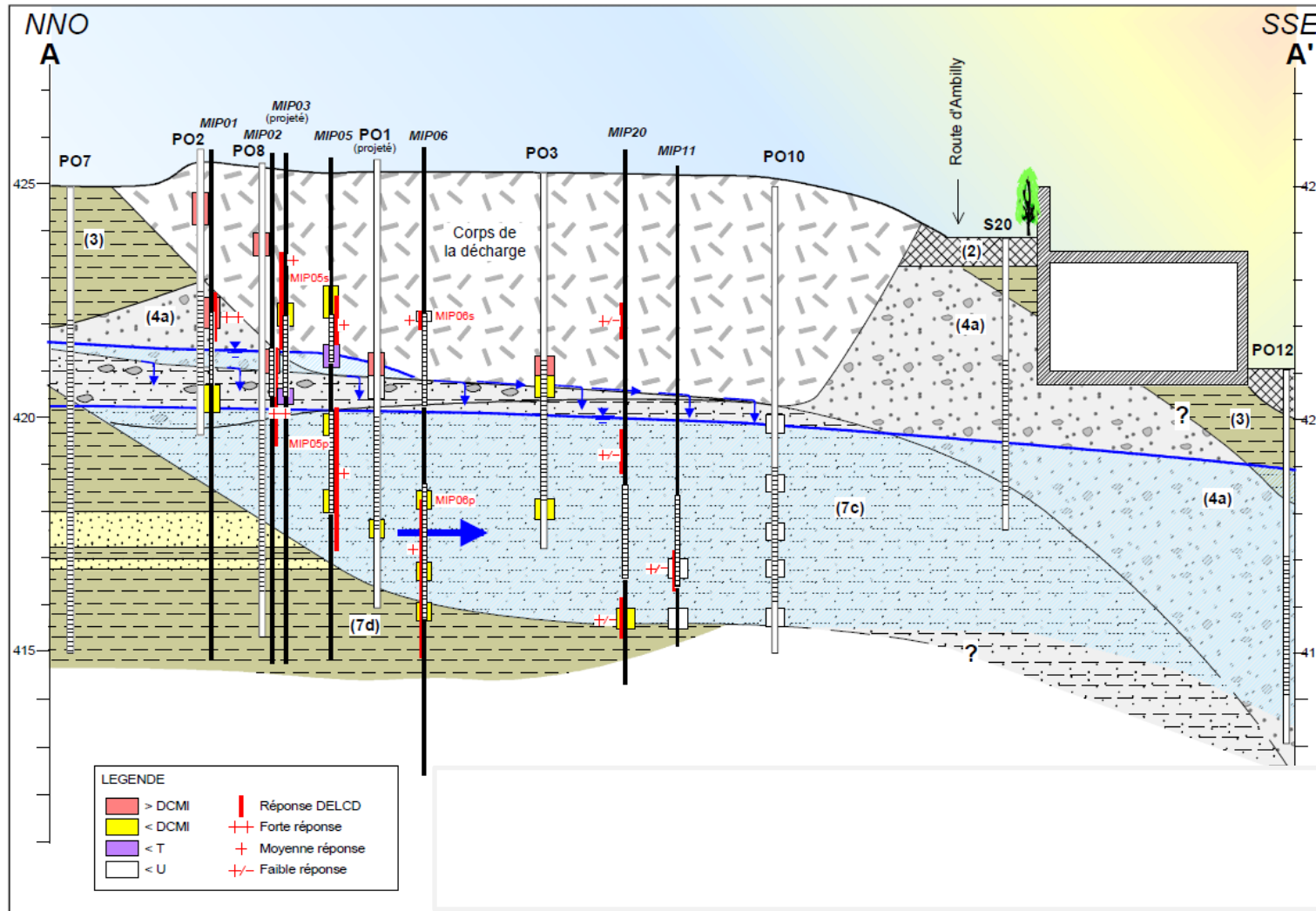
L'affinité pour l'hydrogène explique le mécanisme de la compétition



Étude de cas no.2: Ancienne décharge près de Genève (1)



Étude de cas no.2: Ancienne décharge près de Genève (2)



Étude de cas no.2: Ancienne décharge près de Genève (3)



Décharge près de Genève: Le potentiel biochimique est présent, mais ...

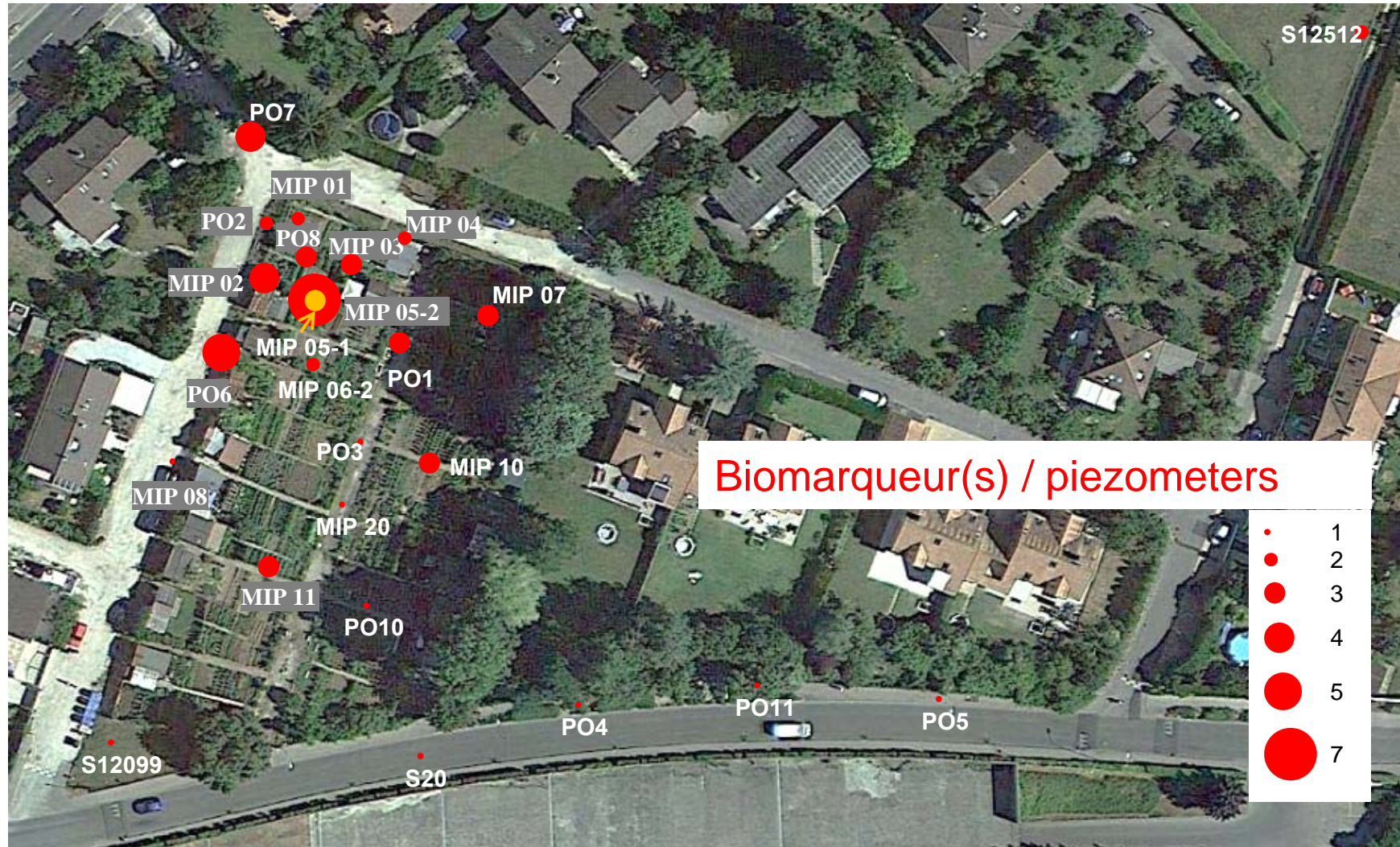
Méthode appliquée:

- Filtration de max. 1 L d'eau/piézomètre
- Extraction de l'ADN
- PCR qualitative spécifique des gènes *rdhA* et ARNr 16S des OHRB (biomarqueurs)

Bacteria/target genes	Primers	Primer sequences (5'-3')
<i>Dehalococcoides</i> sp.	DHC587f	GGACTAGAGTACAGCAGGAGAAAAC
	DHC1212r	GGATTAGCTCCAGTTCACACTG
<i>Dehalobacter</i> sp.	Dre441f	GTTAGGGAAGAACGGCATCTGT
	Dre645r	CCTCTCCTGTCCTCAAGCCATA
<i>Sulfurospirillum</i> sp.	DHSPM576f	GCTCTCGAAACTGGTTACCTA
	DHSPM1210r	GTATCGCGTCTCTTTGTCCTA
<i>Desulfuromonas</i> sp.	Desulfo494f	AGGAAGCACCGGCTAACTCC
	Desulfo1050r	CGATCCAGCCGAACTGACC
<i>Desulfitobacterium</i> sp.	Dsb406f	GTACGACGAAGGCCTTCGGGT
	De2r	CCTAGGTTTTACACCAGACTT
<i>vcrA</i>	vcrA880f	CCCTCCAGATGCTCCCTTTA
	vcrA1018r	ATCCCCTCTCCCGTGTAAAC
<i>bvcA</i>	bvcA227f	TGGGGACCTGTACCTGAAAA
	bvcA523r	CAAGACGCATTGTGGACATC

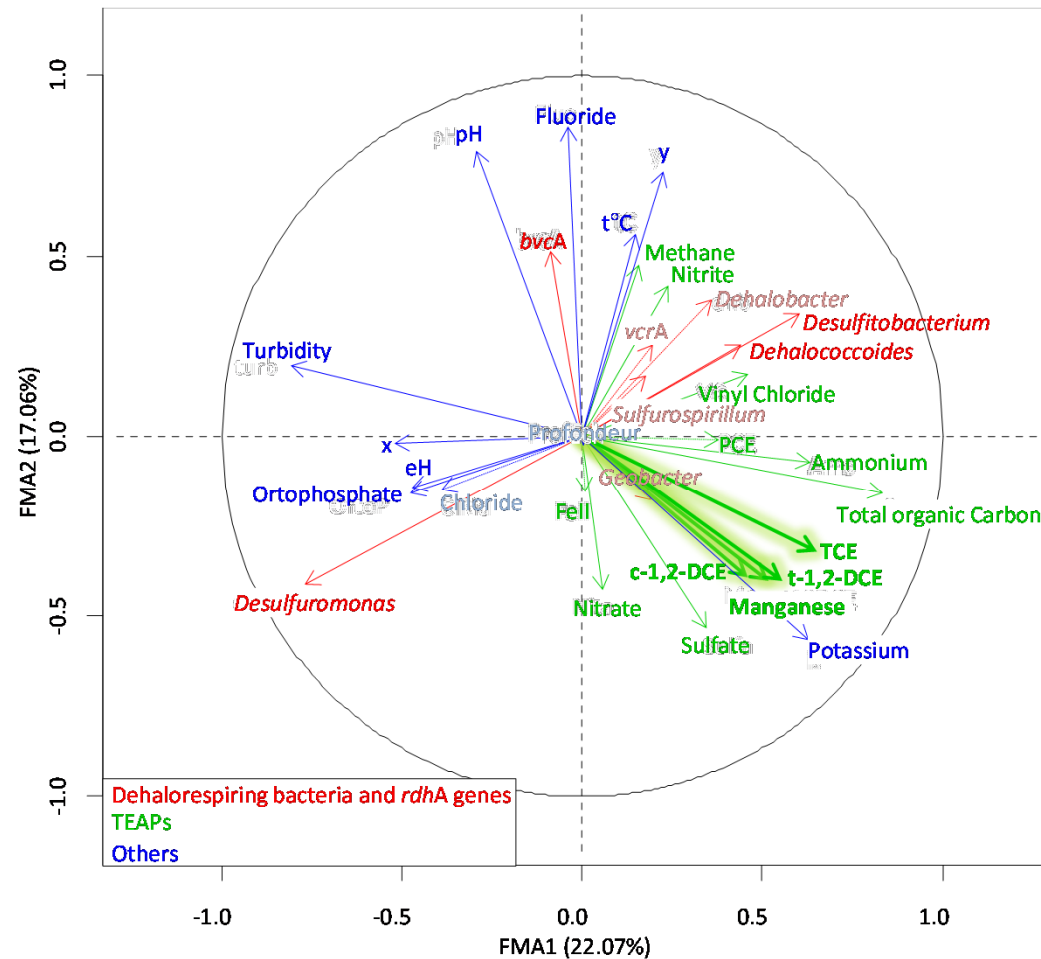
	<i>Dehalococcoides</i>	<i>Dehalobacter</i>	<i>Sulfurospirillum</i>	<i>Desulfuromonas</i>	<i>Desulfitobacterium</i>	<i>Geobacter</i>	<i>bvcA</i>	<i>vcrA</i>
MIP 01	-	-	-	+	+	-	-	-
MIP 02	+	-	+	+	+	-	-	-
MIP 03	-	-	-	+	+	+	-	-
MIP 04	-	-	-	+	-	-	+	-
MIP 05-1 (up)	+	+	-	-	+	-	-	-
MIP 05-2 (low)	+	+	-	+	+	+	+	+
MIP 06-2	-	-	-	+	+	-	-	-
MIP 07	-	-	-	+	+	+	-	-
MIP 08	-	-	-	+	-	-	-	-
MIP 10	-	-	-	+	+	+	-	-
MIP 11	-	-	-	+	+	-	-	+
MIP 20	-	-	-	-	+	-	-	-
PO1	-	-	-	+	+	-	-	+
PO2	-	-	-	+	+	-	-	-
PO3	-	-	-	-	+	-	-	-
PO4	-	-	-	+	-	-	-	-
PO5	-	-	-	+	-	-	-	-
PO6	+	-	+	+	+	-	-	+
PO7	-	-	-	+	+	-	+	+
PO8	-	+	-	+	+	-	-	-
PO10	-	-	-	+	-	-	-	-
PO11	-	-	-	+	-	-	-	-
S12099	-	-	-	+	-	-	-	-
S12512	-	-	-	+	+	-	-	-
S20	-	-	-	+	-	-	-	-

Décharge près de Genève: Fréquence de détection des biomarqueurs



Décharge près de Genève:

Compétition entre les bactéries manganèse-réductrices et les OHRB réduisant le dichloroéthène et le chlorure de vinyl ?



Conclusion

- Les analyses moléculaires et les enrichissements en microcosme permettent de vérifier la présence du potentiel biochimique complet pour la déchloration des chloroéthènes
- L'analyse de l'écologie microbienne de la nappe phréatique permet de comprendre le fonctionnement de l'écosystème et d'identifier les causes probables d'une déchloration incomplète des chloroéthènes
- La méthodologie proposée ici, basée sur une étude microbiologique de la nappe phréatique contaminée, est un outil prometteur dans la formulation de stratégies pour la biorémediation des chloroéthènes

Remerciements

Collaboration:

- Noam Shani, ex-doctorant au LBE
- François Gillet, Université de Franche-Comté
- Simon Pinzelli, BG Consulting Engineers, Lausanne

Financement:

- FNS
- OFEV
- Technology Agency, Czech Republic