

Devenir des micropolluants organiques dans les sols des ouvrages de gestion à la source des eaux pluviales : interactions diversité microbienne et biodégradabilité des micropolluants

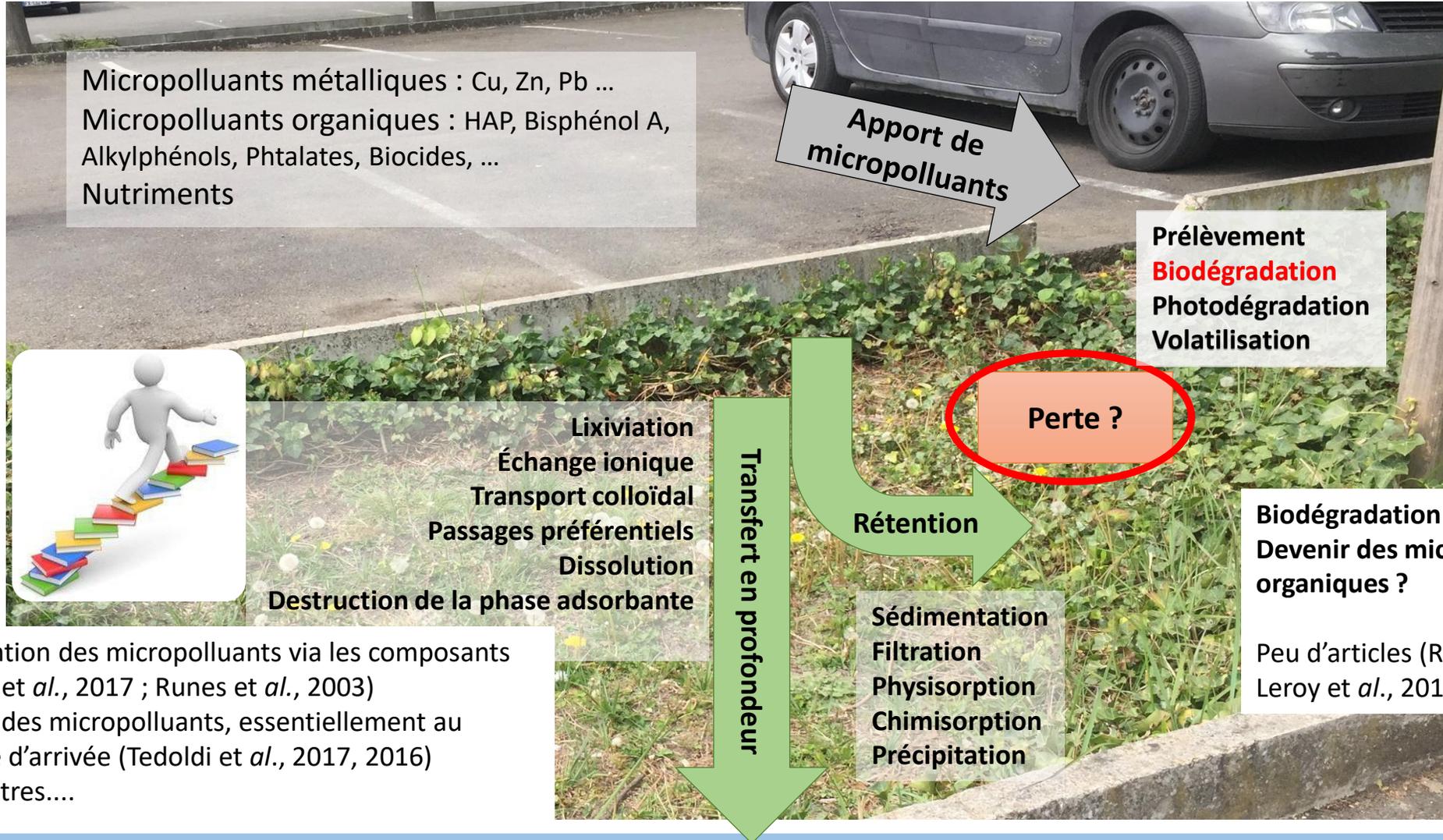
Andréa Oudot

Directeurs de thèse : Noureddine Bousserhine, Marie-Christine Gromaire
Séminaire scientifique d'OPUR – 27 janvier 2023



Ouvrages de gestion des eaux pluviales à la source

Processus en jeux dans les ouvrages d'infiltration



Filtration et rétention des micropolluants via les composants du sol (Flanagan et *al.*, 2017 ; Runes et *al.*, 2003)
 Bioaccumulation des micropolluants, essentiellement au niveau de la zone d'arrivée (Tedoldi et *al.*, 2017, 2016)
 Et beaucoup d'autres....



Objectifs

Devenir des micropolluants organiques dans les sols des ouvrages de gestion à la source des eaux pluviales : interactions diversité microbienne et biodégradabilité des micropolluants

1^{er} objectif

Caractérisation des communautés microbiennes dans le sol des ouvrages

⇒ afin de pouvoir expliquer les capacités de biodégradation microbiennes en fonction du contexte

- Sollicitation hydrologique
- Niveau de contamination en micropolluant
 - Propriétés du sol
 - Végétation
 - Âge de l'ouvrage

2^{ème} objectif

Étude des processus de biodégradation microbienne

⇒ pour déterminer l'implication de la partie biotique dans l'efficacité des ouvrages

- Mécanismes de biodégradation
- Communautés microbiennes impliquées
 - Cinétiques de biodégradation

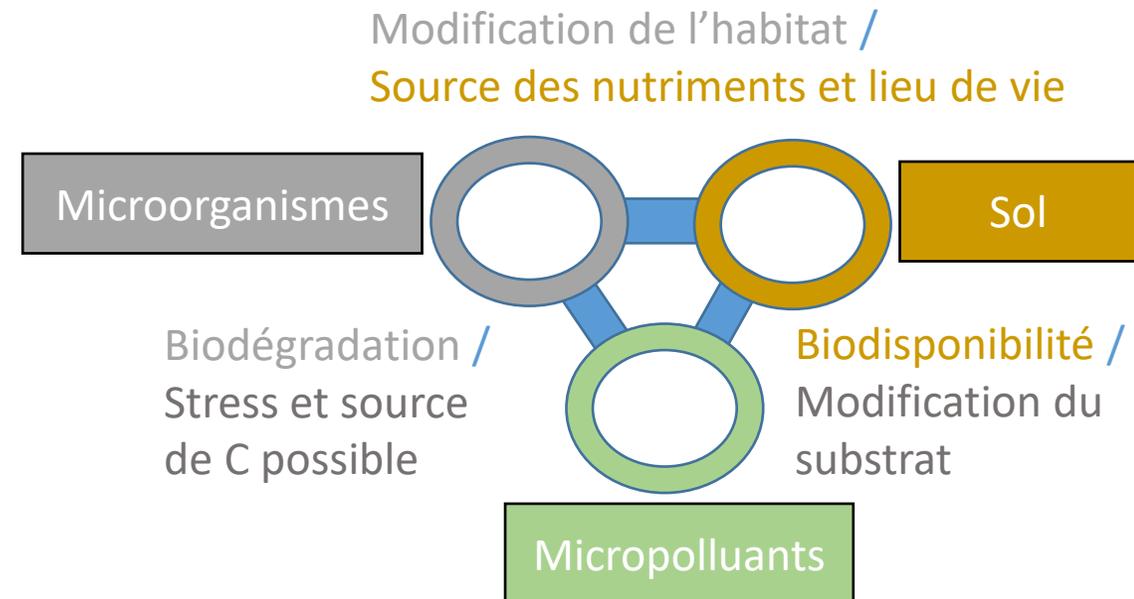


Caractérisation des communautés microbiennes

- Pourquoi étudier les communautés microbiennes de chaque ouvrage?
 - Communautés différentes en fonction des paramètres du sol (Cébron et al., 2015)
 - Biodisponibilité des micropolluants différente en fonction des paramètres du sol (de Weert et al., 2008)

⇒ Activité microbienne différente donc activité de biodégradation possiblement différente

 **Etudier les caractéristiques physico-chimiques et biologiques pour chacun des sols des ouvrages**





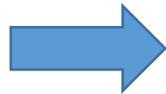
Choix des ouvrages

Quel paramètre peut impacter le fonctionnement d'un ouvrage?

La biodégradation microbienne est-elle la même entre les ouvrages?

Quelles sont les différences et ressemblances au sein de ces ouvrages?

3 sites sélectionnés
Contamination en pollution de
voirie élevée



Les paramètres ciblés à étudier :

- Âge ouvrage
- Composition du sol

Etude au sein d'un site :

- Hétérogénéité au sein d'un même ouvrage : amont / aval
- Influence environnementale : végétation, saison



Ouvrages sélectionnés

Dérasement juin 2020
(1 an avant échantillonnage)

Sites	Pollution	Type ouvrage	Texture du sol	Âge
Compans	Forte pollution de voirie	2 bandes enherbées / 1 noue filtrante	Limon fin (B1)/Limon sableux (avec substrat filtrant : B2 et N)	1 an / 5 ans
Dourdan	Forte pollution de voirie	Bassin d'infiltration	Limon sableux	25 ans
Vitry	Pollution de voirie moyenne	Noue filtrante	Limon	15 ans

Compans
Bandes enherbées 1/2



Compans
Noue





Campagnes de prélèvement des échantillons





Ouvrages – Compans (5 sols)

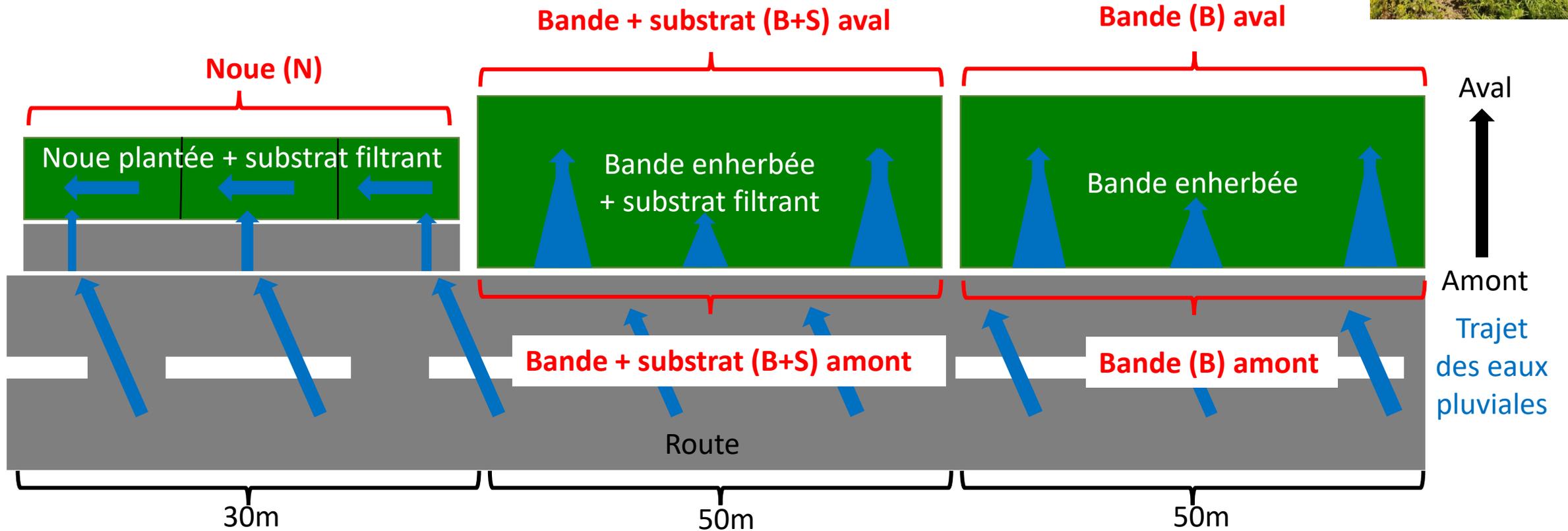
Noüe

Bandes enherbées 1/2

Carex gracilis



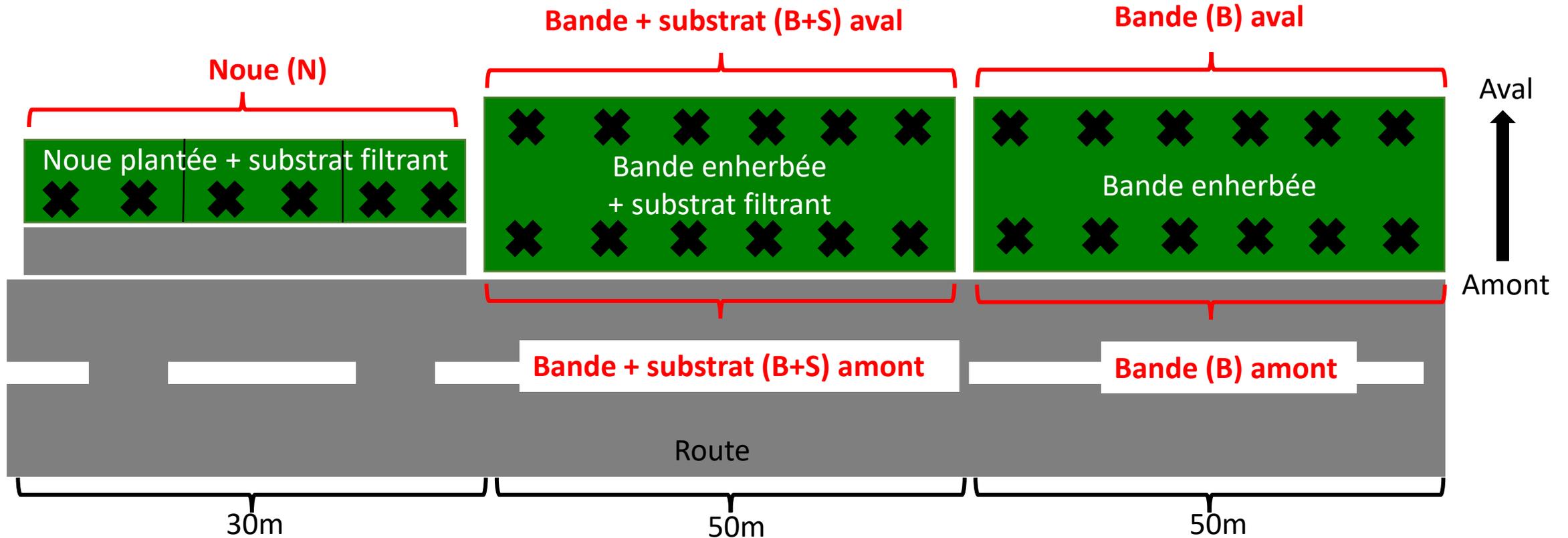
Schéma des lieux de prélèvement des sols composites – Compans :



Ouvrages – Compans (5 sols)

Schéma des lieux de prélèvement des sols composites – Compans :

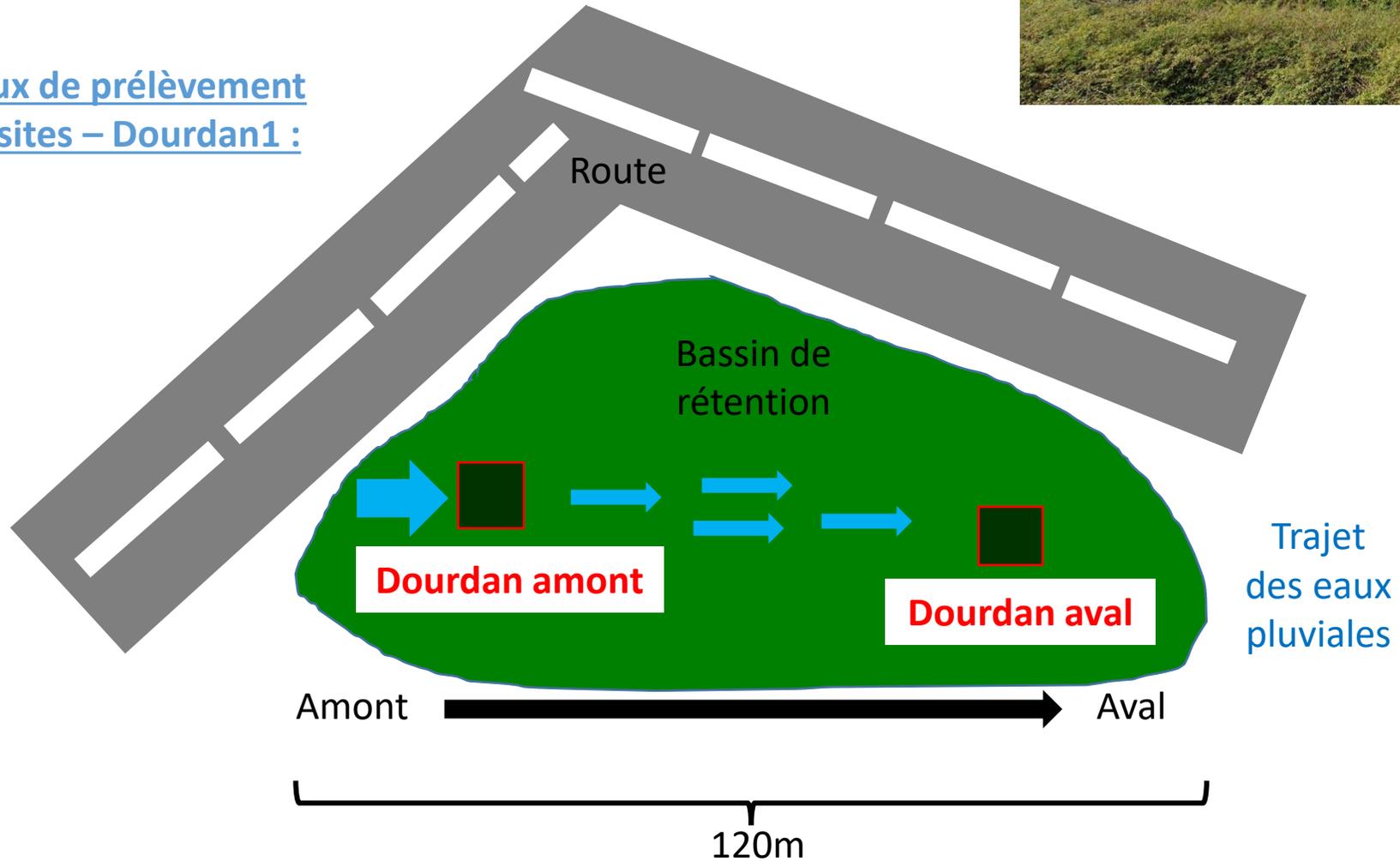
✘ Point d'échantillonnage
(10 cm de profondeur)



Ouvrages – Dourdan (2 sols)



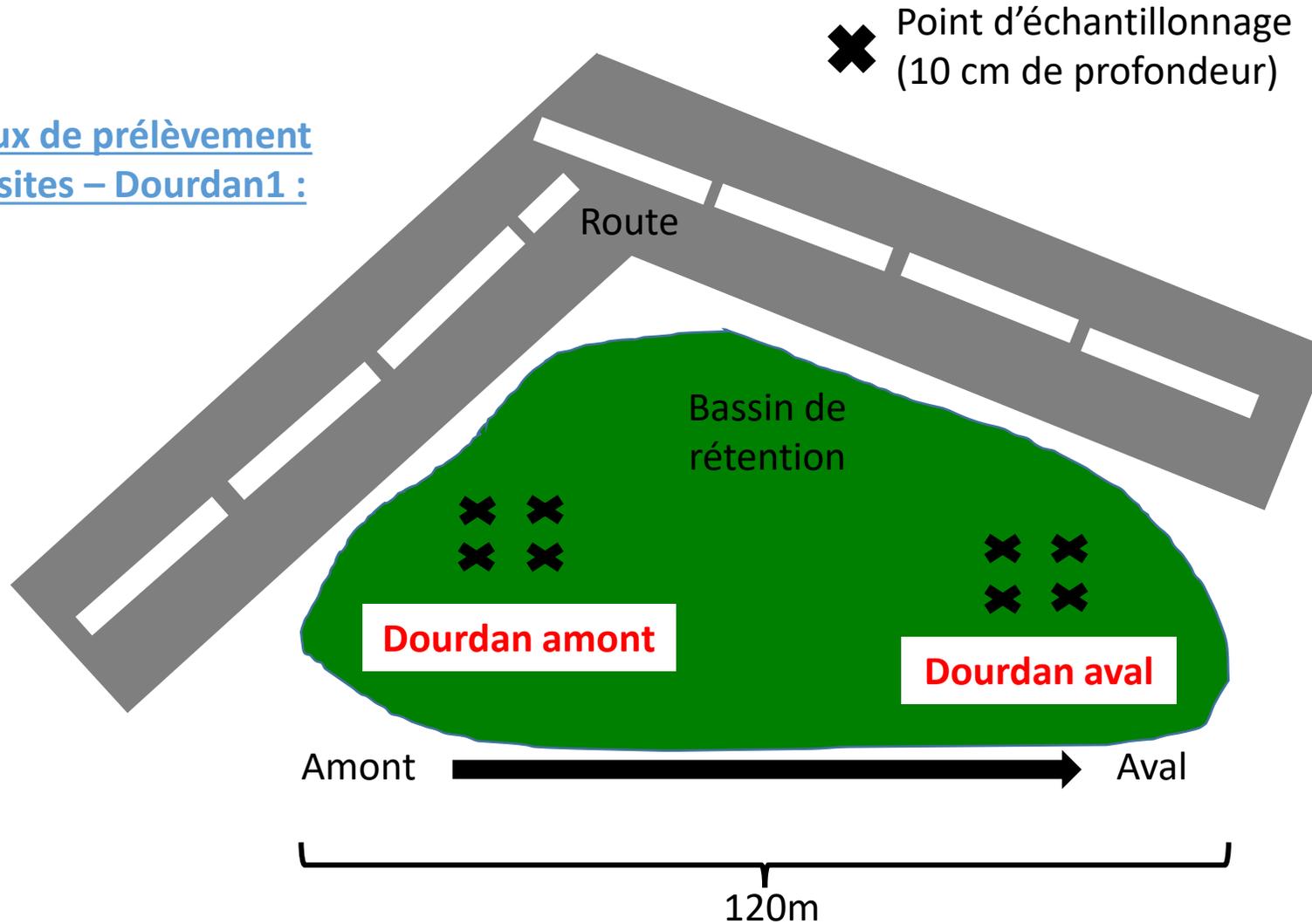
Schéma des lieux de prélèvement des sols composites – Dourdan1 :





Ouvrages – Dourdan (2 sols)

Schéma des lieux de prélèvement des sols composites – Dourdan1 :



Dourdan amont

Dourdan aval

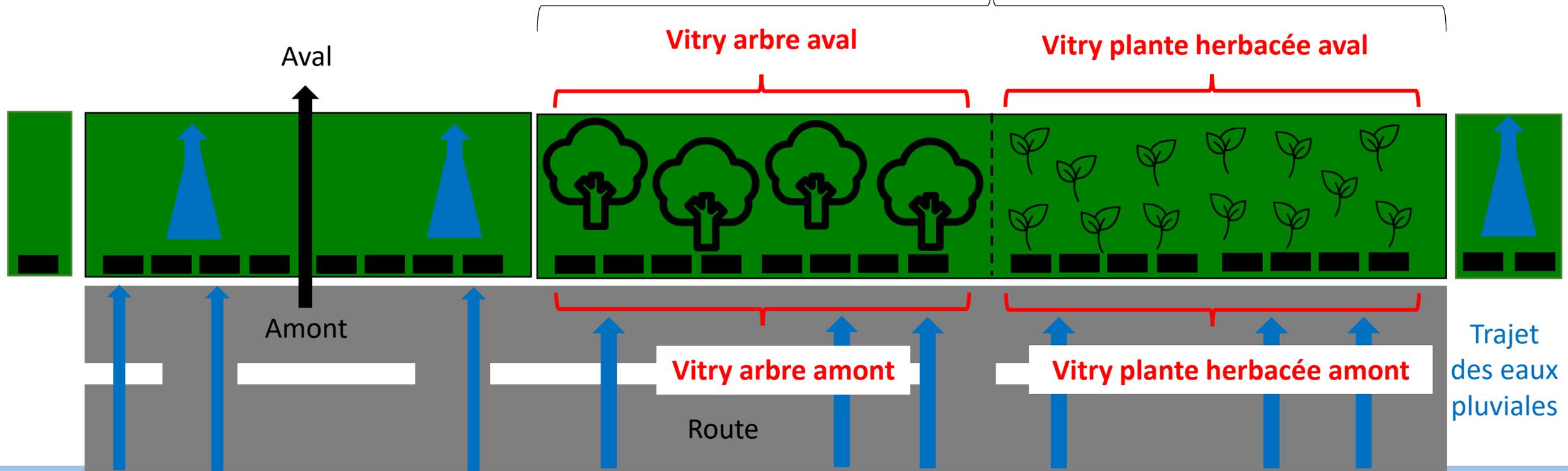
Ouvrages – Vitry (4 sols)



Schéma des lieux de prélèvement des sols composites – Vitry :

■ Ouvertures latérales de la noue

Portion sélectionnée de la noue : 20m



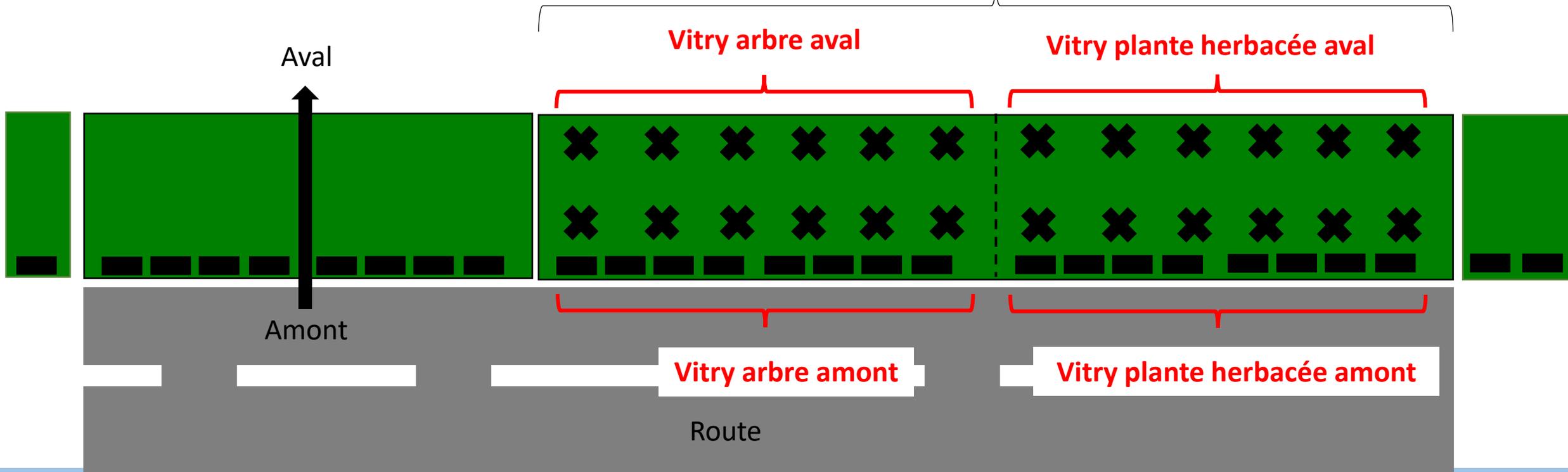
Ouvrages – Vitry (4 sols)

Schéma des lieux de prélèvement des sols composites – Vitry :

✖ Point d'échantillonnage
(5 cm de profondeur)

■ Ouvertures latérales de la noue

Portion sélectionnée de la noue : 20m





Bilan des campagnes & Conditionnement du sol

Conditionnement des sols:

- Séchage
- Tamisage 2mm
- Broyage
- Faire les sols composites



Conservation -20°C pour biologie moléculaire



Conservation à température ambiante pour :

- **Analyses physico-chimiques**
- **Analyses biologiques**
- **Cinétique de biodégradation**





Matériels et méthodes

Analyses physico-chimiques

⇒ Paramètres du sol pouvant influencer les microorganismes et la biodisponibilité des micropolluants

- pH (norme ISO 10390)
- Matière organique (MO)
- Capacité aux champs (CC)
- Capacité d'échange cationique et composition en éléments (CEC et ICP) (norme NF X31-130, mai 1993)
- Granulométrie (été 2021) (norme NF X 31-107, juillet 1993)

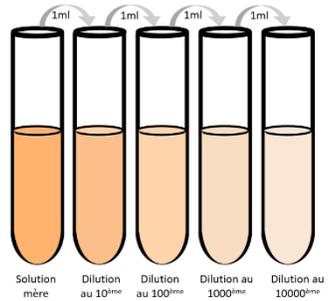
Analyses biologiques

⇒ Étude de l'abondance, de l'activité et de la diversité microbienne pouvant influencer la biodégradation des micropolluants

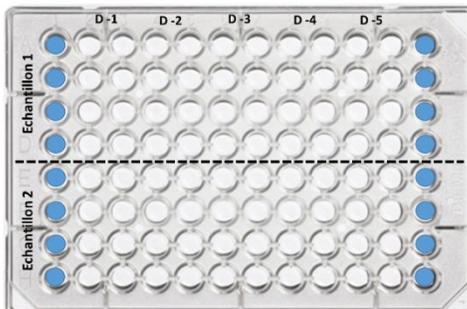
- Biomasse microbienne
 - NPP : *Nombre le plus probable*
- Activité enzymatique :
FDA, uréase et déshydrogénase
- Diversité fonctionnelle : Biolog
- Diversité génétique : séquençage Illumina
 - 16S V3-V4 : bactéries
 - ITS2 : champignons

Matériels et méthodes

Biomasse microbienne : NPP obtenue par des cascades de dilution et croissance sur multiplaque

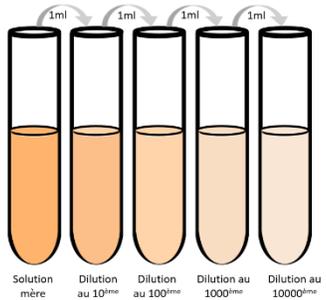


- Témoïn: 200 μ L de milieu LB
- Echantillon: 20 μ L d'éch dilué + 180 μ L de milieu LB

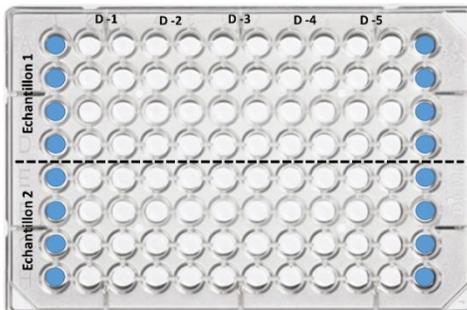


Matériels et méthodes

**Biomasse microbienne : NPP
obtenue par des cascades de
dilution et croissance sur
multiplaque**



- Témoïn: 200 μ L de milieu LB
- Echantillon: 20 μ L d'éch dilué + 180 μ L de milieu LB



Enzymes : FDA et uréase

FDA : fluorescéine diacétate clivée
(hydrolyse) par un ensemble d'enzymes
pour donner de la fluorescéine
=> mesure de la concentration en
fluorescéine (abs 490nm)

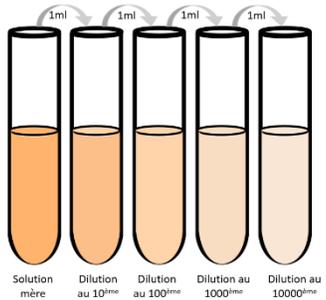


Uréase : décomposer l'urée en dioxyde
de carbone + ammonium
=> mesure de la concentration en
ammonium (abs 665nm après
formation d'un complexe coloré)

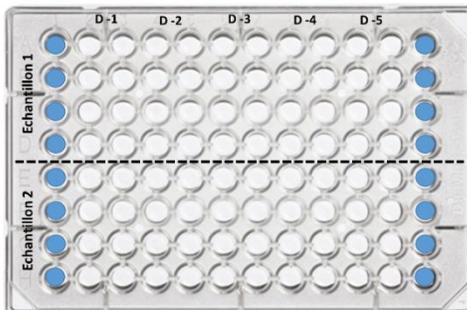


Matériels et méthodes

Biomasse microbienne : NPP obtenue par des cascades de dilution et croissance sur multiplaque



- Témoins: 200 μ L de milieu LB
- Echantillon: 20 μ L d'éch dilué + 180 μ L de milieu LB



Enzymes : FDA et uréase

FDA : fluorescéine diacétate clivée (hydrolyse) par un ensemble d'enzymes pour donner de la fluorescéine
=> mesure de la concentration en fluorescéine (abs 490nm)



Uréase : décomposer l'urée en dioxyde de carbone + ammonium
=> mesure de la concentration en ammonium (abs 665nm après formation d'un complexe coloré)



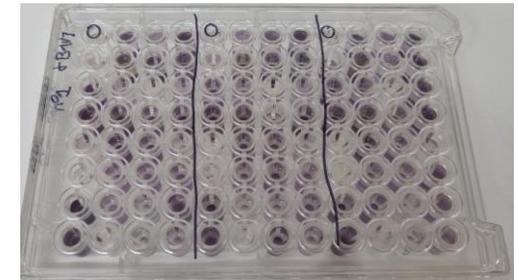
Biolog Ecoplate

31 substrats carbonés (en triplicat) avec du chlorure de tétrazolium

⇒ Métabolisation d'un substrat

⇒ Réduction du chlorure de tétrazolium en formazan

⇒ Lecture au spectrophotomètre à une absorbance de 570nm





Résultats physico-chimiques – été 2021

	Dourdan	Vitry	Compans
pH	7,26 +/- 0,34	8,20 +/- 0,12	8,53 +/- 0,07
Matière Organique (%)	15 +/- 7,95	16 +/- 1,86	7 +/- 1,73
Capacité au Champ (%)	66 +/- 14,5	53 +/- 3,2	42 +/- 5,6
CEC (cmol+/kg)	17 +/- 7,2	21 +/- 0,8	12 +/- 3,7
Cations échangeables (rapportés à 100%)			
Ca ²⁺ (%)	94 +/- 4,8	84 +/- 3,0	93 +/- 1,0
Mg ²⁺ (%)	5 +/- 2,7	7 +/- 0,8	4 +/- 0,6
Na ⁺ (%)	0,4 +/- 0,2	1 +/- 0,2	2 +/- 1,6
K ⁺ (%)	1 +/- 1,9	8 +/- 2,4	1 +/- 0,7



Résultats physico-chimiques – été 2021

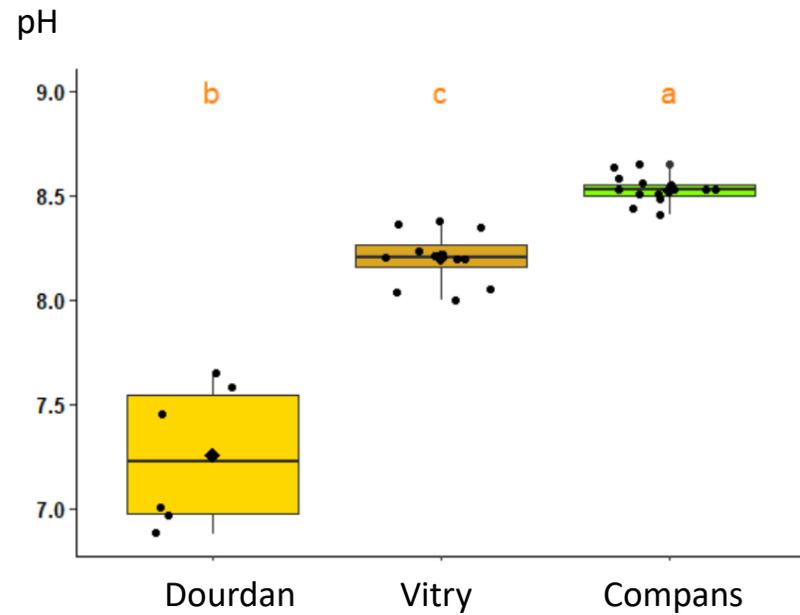
	Dourdan	Vitry	Compans
pH	7,26 +/- 0,34	8,20 +/- 0,12	8,53 +/- 0,07
Matière Organique (%)	15 +/- 7,95	16 +/- 1,86	7 +/- 1,73
Capacité au Champ (%)	66 +/- 14,5	53 +/- 3,2	42 +/- 5,6
CEC (cmol+/kg)	17 +/- 7,2	21 +/- 0,8	12 +/- 3,7
Cations échangeables (rapportés à 100%)			
Ca ²⁺ (%)	94 +/- 4,8	84 +/- 3,0	93 +/- 1,0
Mg ²⁺ (%)	5 +/- 2,7	7 +/- 0,8	4 +/- 0,6
Na ⁺ (%)	0,4 +/- 0,2	1 +/- 0,2	2 +/- 1,6
K ⁺ (%)	1 +/- 1,9	8 +/- 2,4	1 +/- 0,7

⇒ Variation de résultats entre les sites

⇒ Fort écart-type : variation intra-site



Résultats physico-chimiques – été 2021 – pH



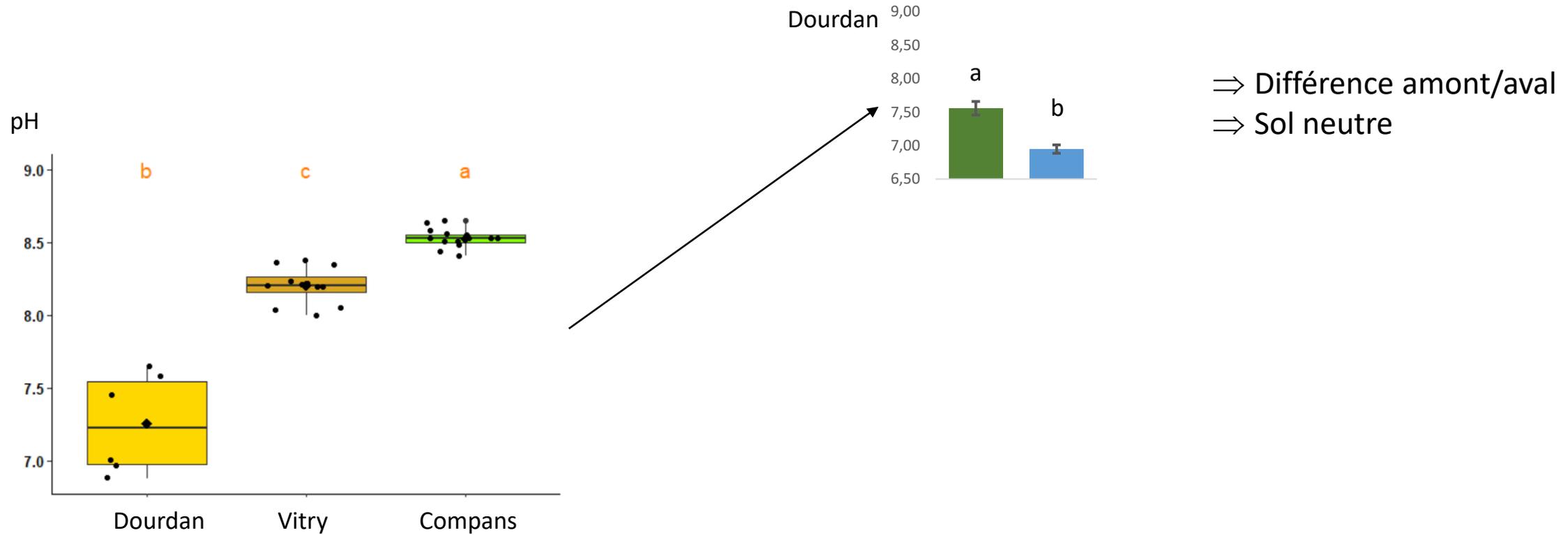
⇒ pH significativement différent entre les 3 sites

(p-value = 1.152e-06 : kruskal wallis)



Résultats physico-chimiques – été 2021 – pH

amont aval



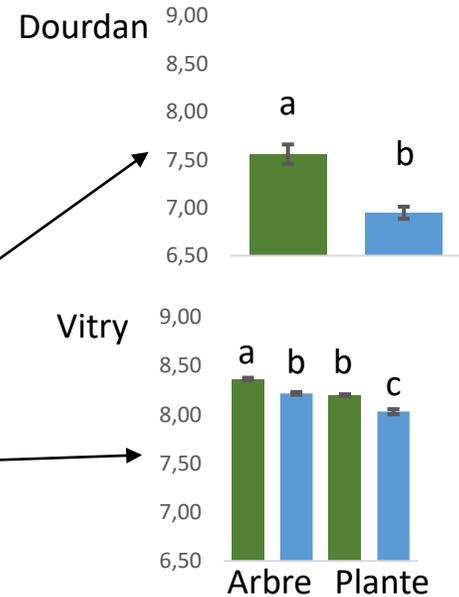
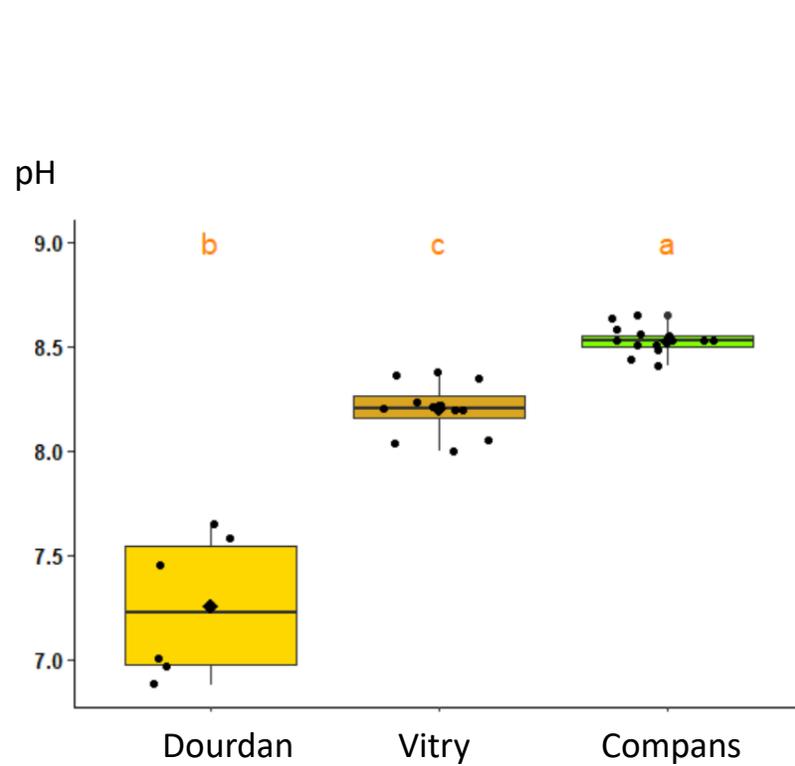
⇒ pH significativement différent entre les 3 sites

(p-value = 1.152e-06 : kruskal wallis)



Résultats physico-chimiques – été 2021 – pH

amont aval



⇒ Différence amont/aval
⇒ Sol neutre

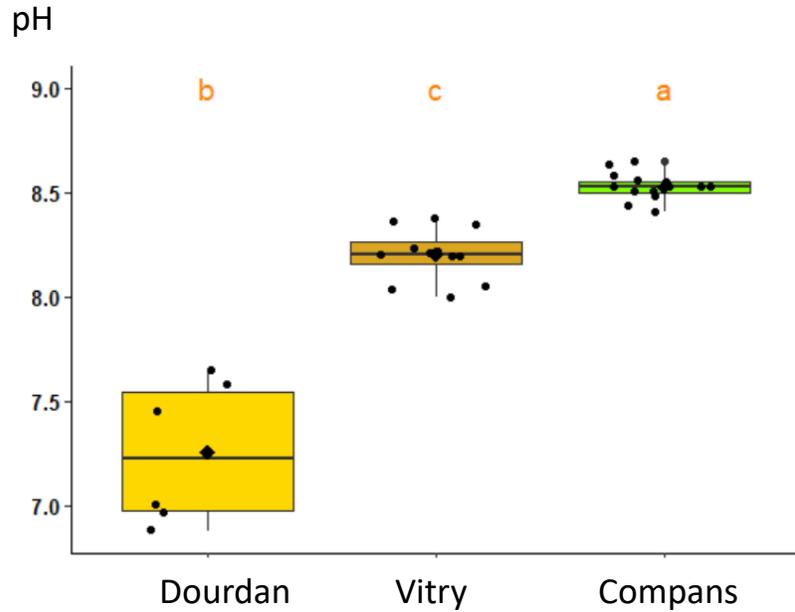
⇒ Différence amont/aval
⇒ Différence végétation
⇒ Sol basique

⇒ pH significativement différent entre les 3 sites
(p-value = 1.152e-06 : kruskal wallis)

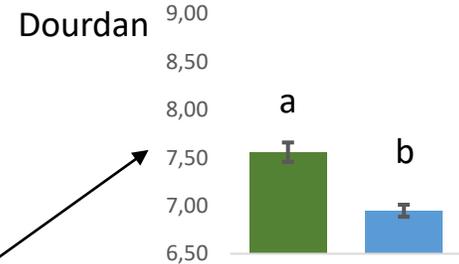


Résultats physico-chimiques – été 2021 – pH

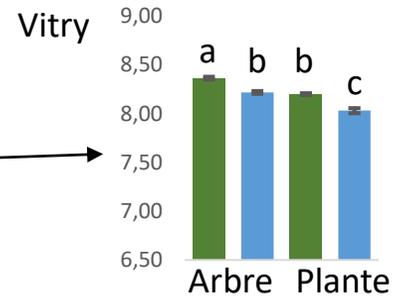
amont aval



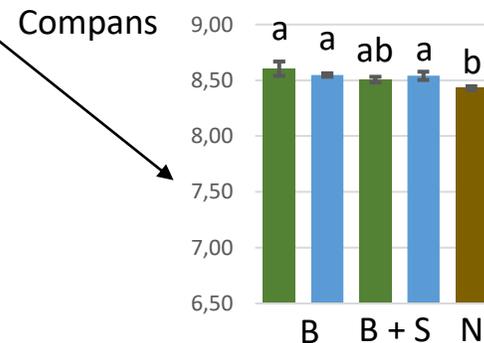
⇒ pH significativement différent entre les 3 sites
 (p-value = 1.152e-06 : kruskal wallis)



⇒ Différence amont/aval
 ⇒ Sol neutre



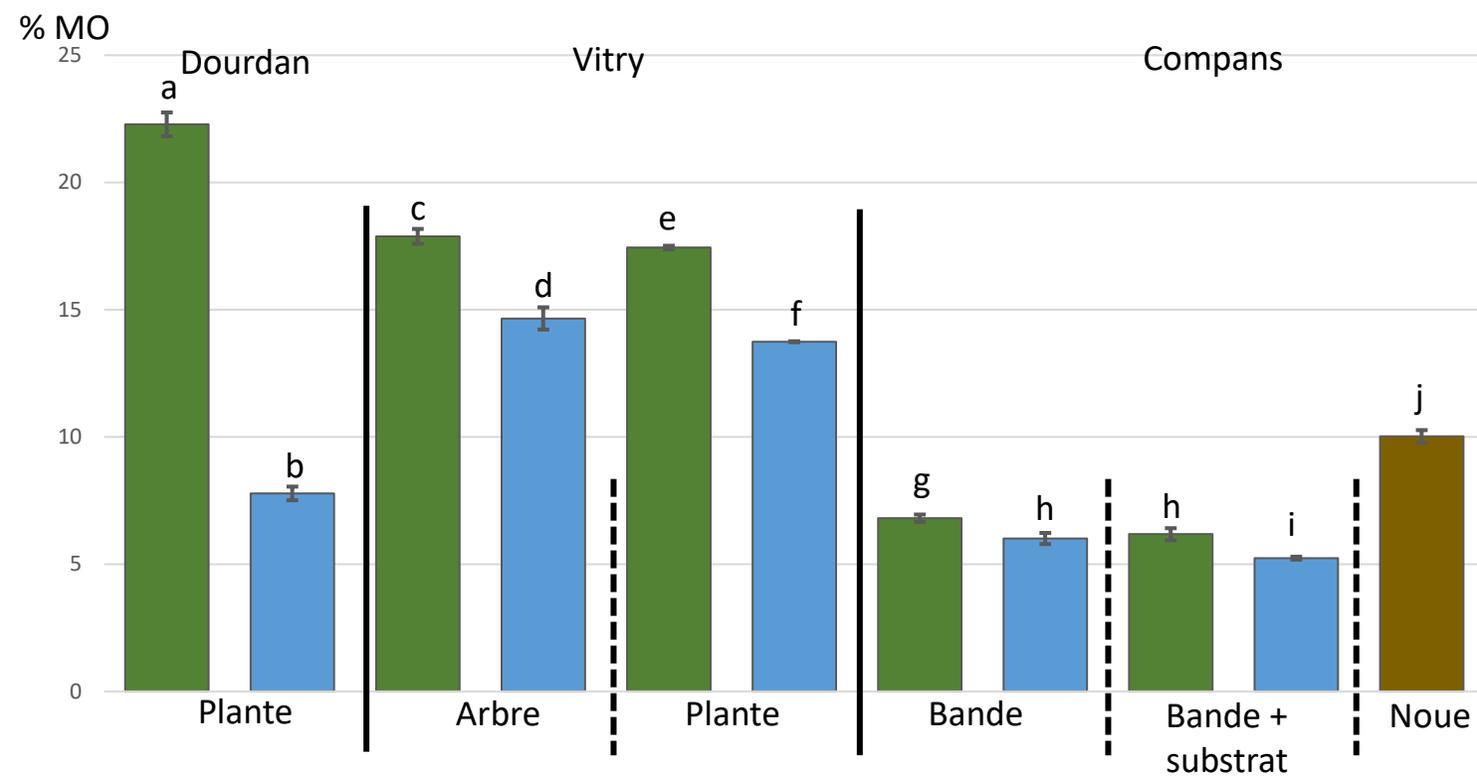
⇒ Différence amont/aval
 ⇒ Différence végétation
 ⇒ Sol basique



⇒ Pas de différence amont/aval
 ⇒ Différence avec Noue
 ⇒ Sol très basique



Résultats physico-chimiques – été 2021 – MO



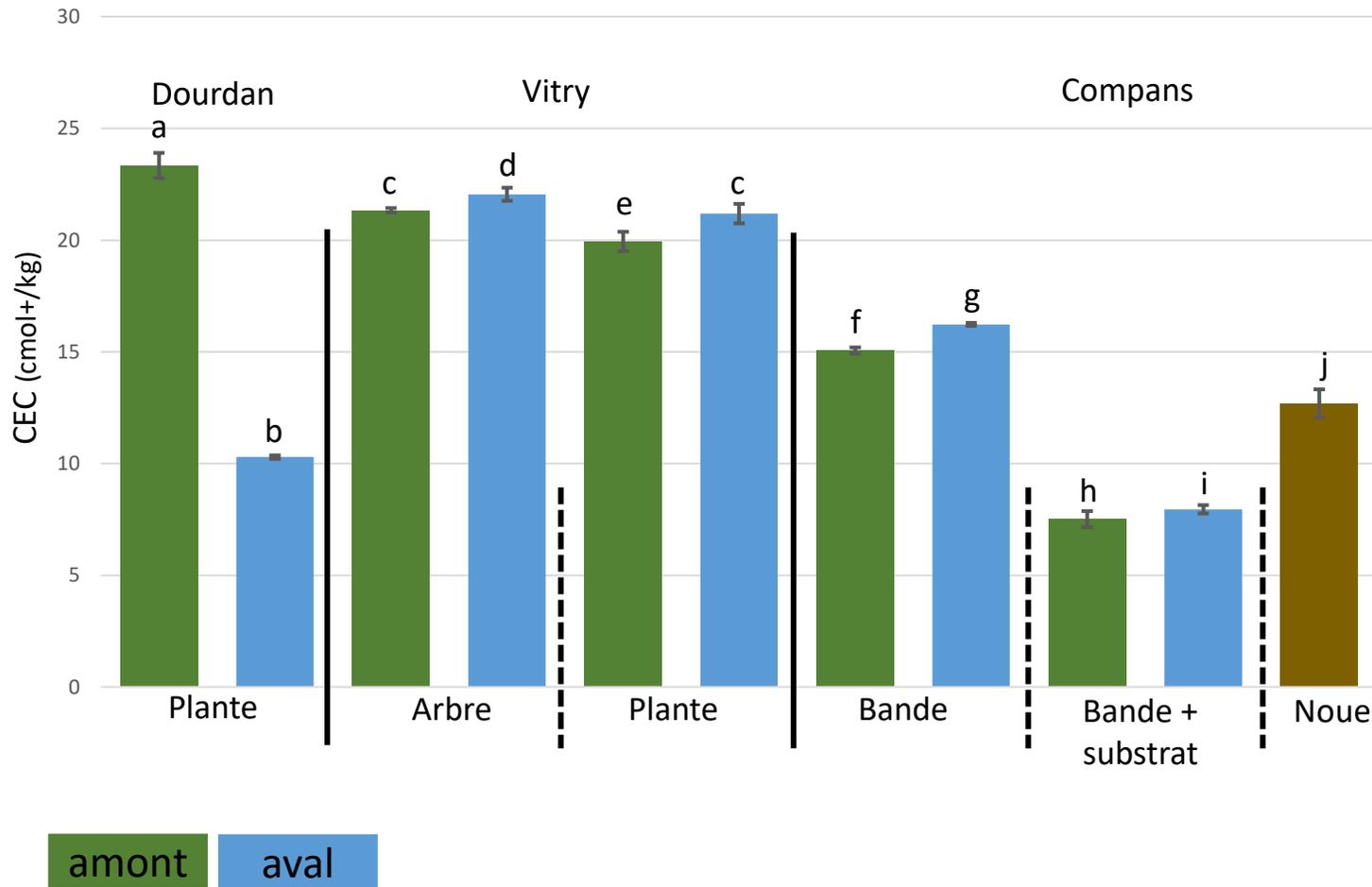
amont aval

- ⇒ Différence amont/aval
- ⇒ Sol riche en MO pour Dourdan amont et Vitry
- ⇒ Bandes de Compans peu riche en MO
- ⇒ Différences entre les bandes et la Noue

Apport hydrologique plus important en amont?
Biomasse microbienne?



Résultats physico-chimiques – été 2021 – CEC



⇒ Différence amont/aval

⇒ CEC forte pour Dourdan amont, Vitry et 1^{ère} bande Compans

⇒ CEC intermédiaire pour Dourdan aval et Noue

⇒ CEC faible pour 2^{ème} bande Compans

CEC lié à la MO et aux argiles

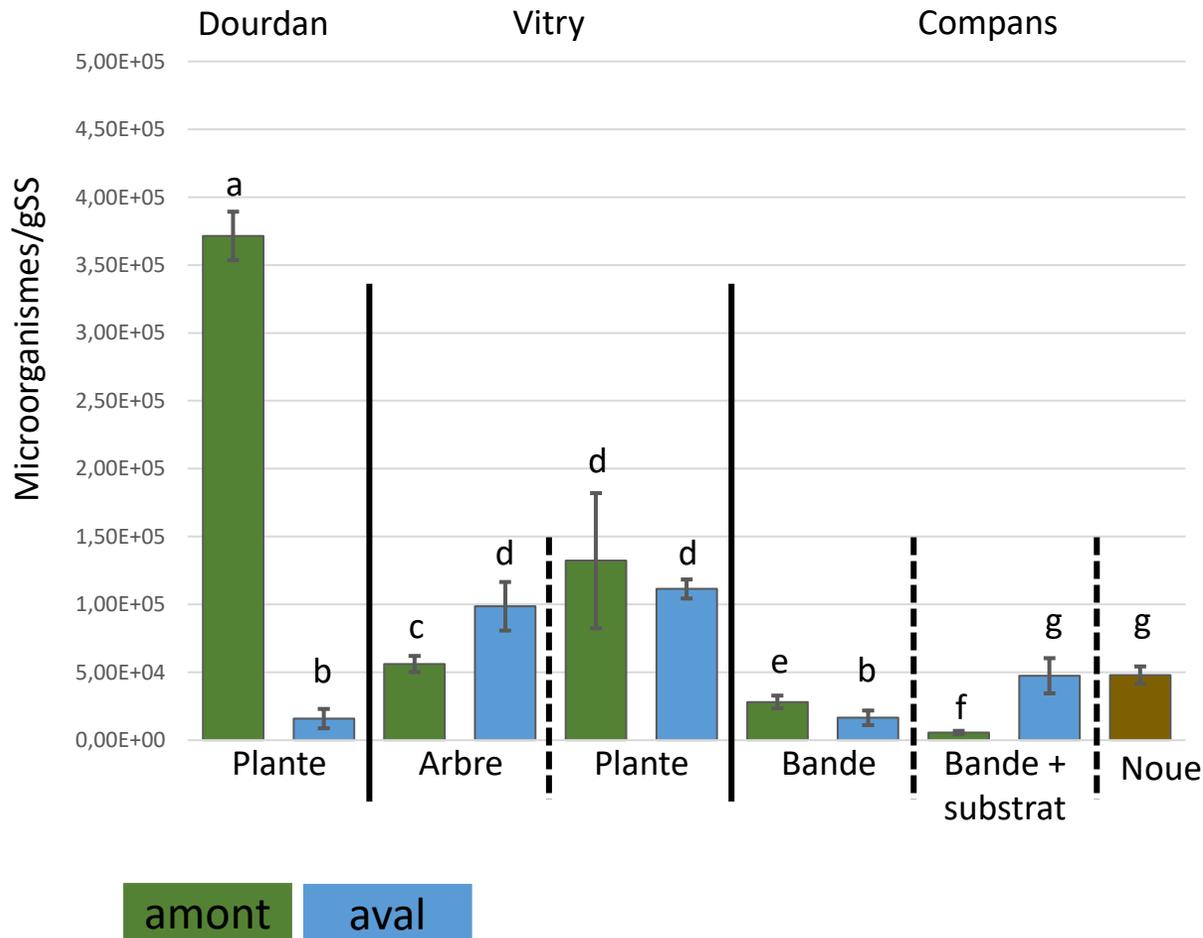


Bilan résultats physico-chimiques

- Dourdan amont et les sols de Vitry avec le plus de disponibilité de nutriment avec un meilleur potentiel de développement et d'activité microbien
 - Dourdan aval et Compans : potentiel du sol qui semble moins propice au développement et aux activités microbiennes
 - Différences amont/aval observées
- ⇒ Comment cela va se traduire d'un point de vue biologique?



Résultats biologiques – été 2021 – Biomasse microbienne (NPP)



⇒ Le sol de Dourdan amont le plus riche en biomasse

⇒ Vitry richesse moyenne

⇒ Compans pauvre en microorganismes

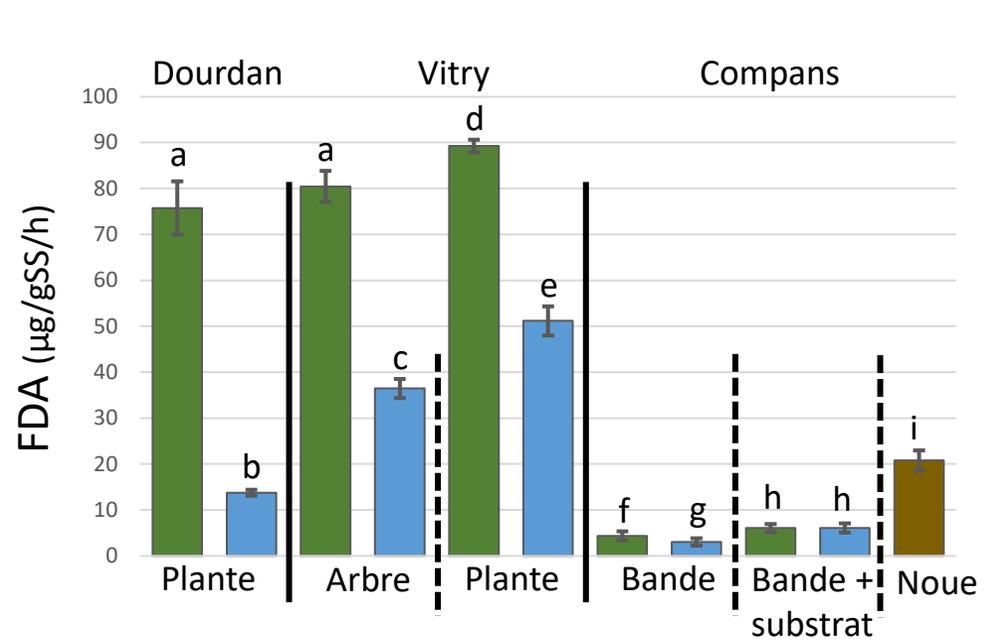
⇒ Différence amont/aval spécifique par site,
⇒ Compans 2 tendances

Influence MO?

Même activité? Diversité microbienne?



Résultats biologiques – été 2021 – FDA/uréase



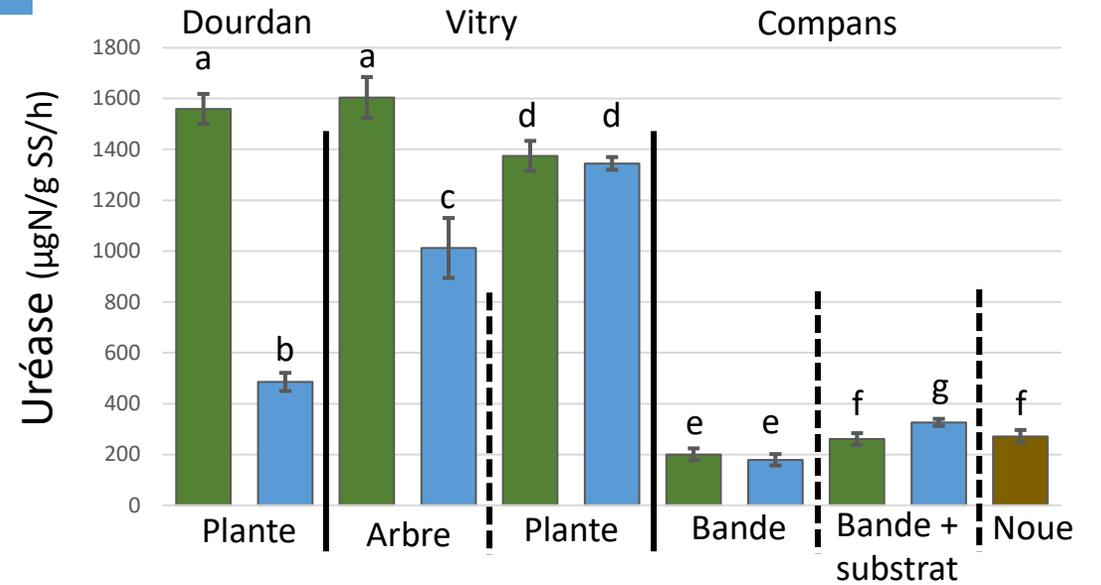
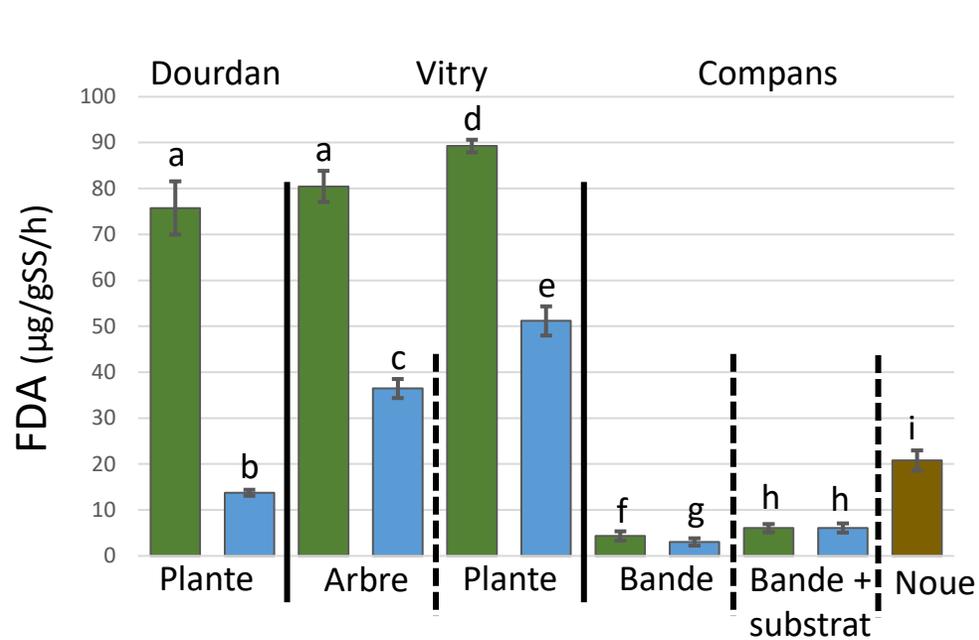
⇒ Dourdan et Vitry amont : forte activité de la FDA

⇒ Dourdan et Vitry aval : activité FDA variable

⇒ Compans : faible activité sauf pour Noue



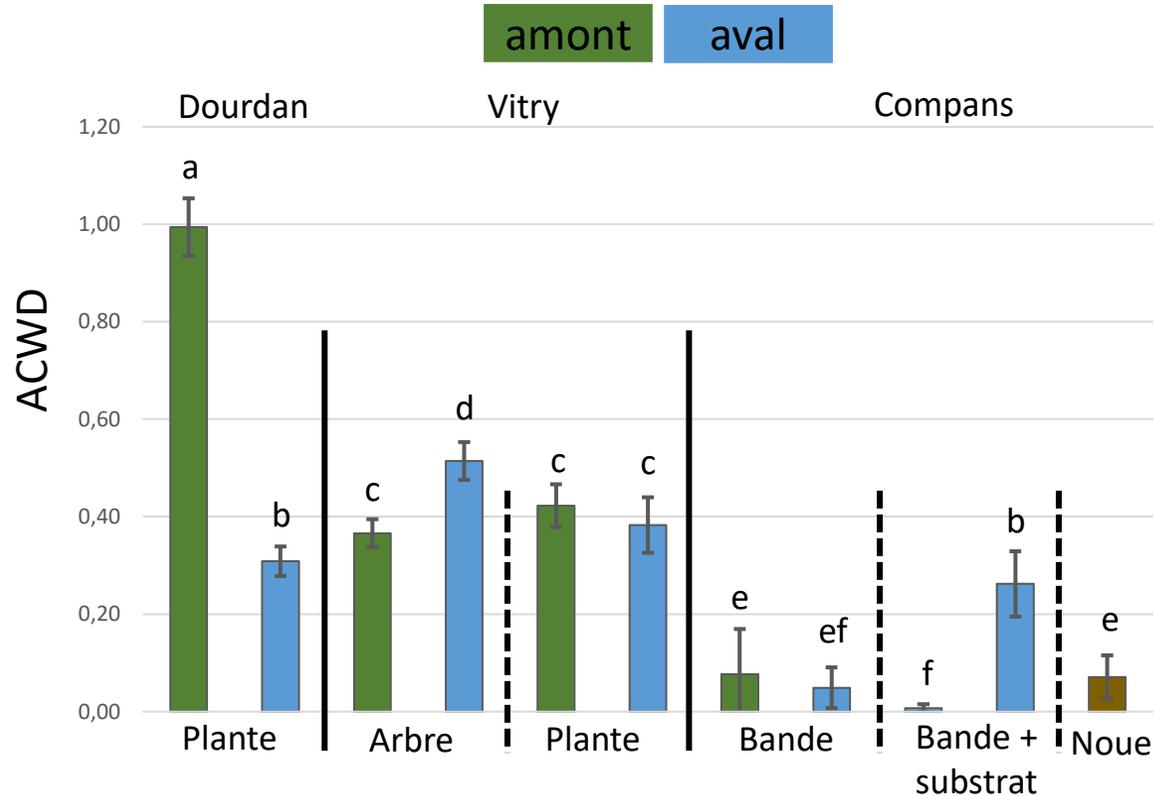
Résultats biologiques – été 2021 – FDA/uréase



- ⇒ Dourdan et Vitry amont : forte activité de la FDA
- ⇒ Dourdan et Vitry aval : activité FDA variable
- ⇒ Compans : faible activité sauf pour Noue

- ⇒ Comme pour la FDA, forte activité de l'uréase en amont et moins forte en aval
- ⇒ Sauf Vitry avec plante : pas de différence amont/aval
- ⇒ Activité faible pour tous les sols de Compans

Résultats biologiques – été 2021 – Biolog



ACWD (average well color development)

Niveau de l'activité métabolique

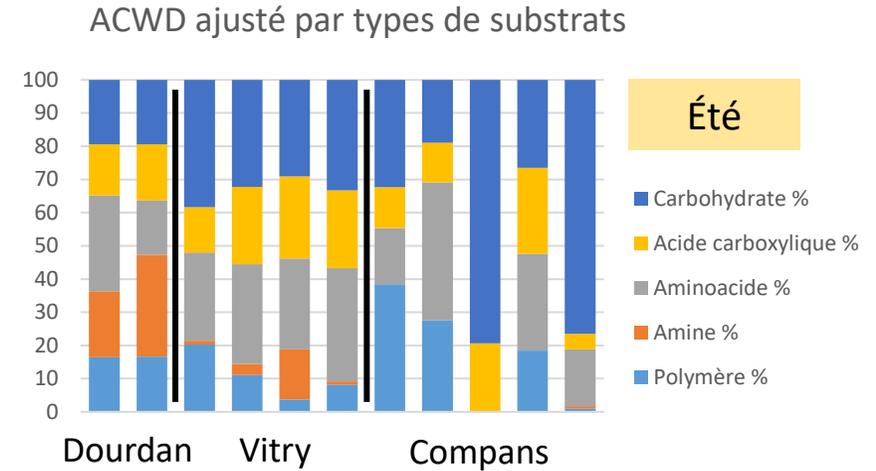
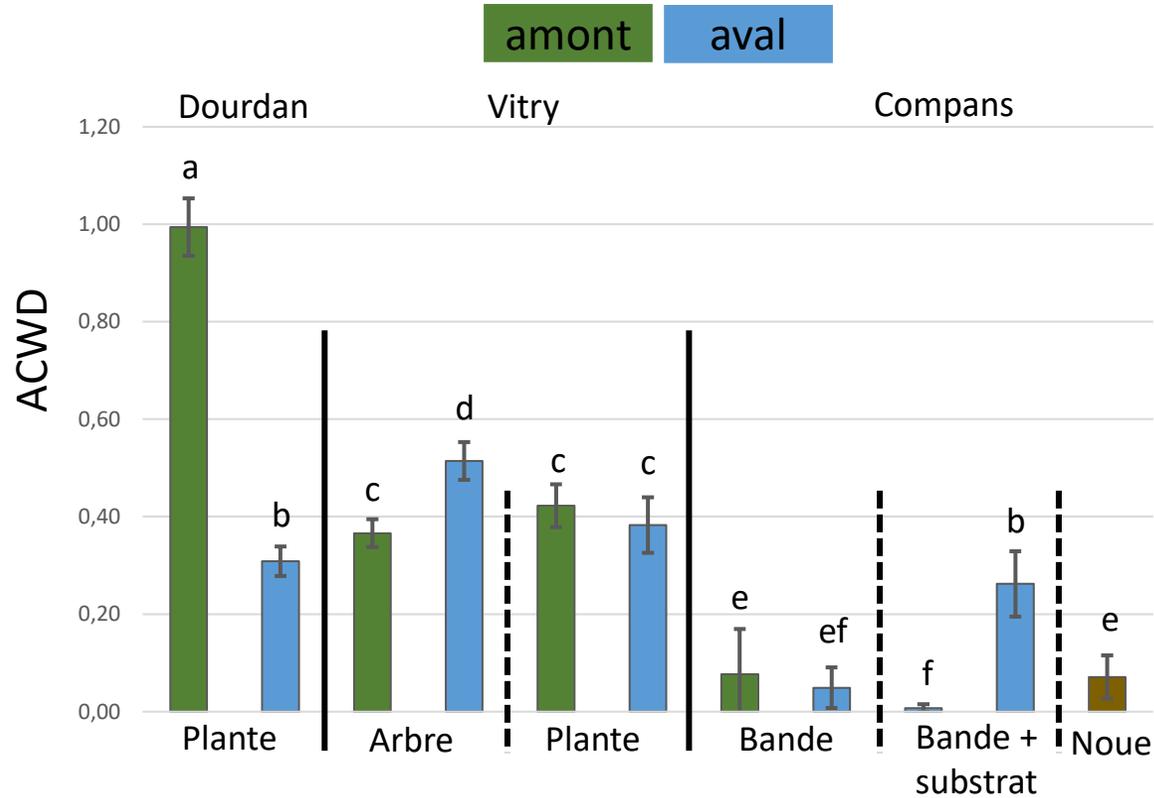
Valeur moyenne d'efficacité de
métabolisation sur 31 substrats carbonés

Dourdan amont avec le plus d'activité

Vitry et Dourdan aval intermédiaire

Compans : le moins actif mais avec un pic d'activité pour la 2^{ème} bande aval

Résultats biologiques – été 2021 – Biolog



Différence de profils entre les sites :

- Amine : chez Dourdan : potentiel plus grand
- Vitry : les sols amont plus variables par rapport aux sols aval
- Compans : activité moins diverse

Dourdan amont avec le plus d'activité
 Vitry et Dourdan aval intermédiaire
 Compans : le moins actif mais avec un pic d'activité pour la 2^{ème} bande aval



Bilan caractérisation physico-chimique et biologiques des sols des ouvrages

- 3 sites avec 3 tendances bien différentes
- Dourdan :
 - Amont : le plus riche, le plus actif
 - Aval : valeurs moyennes à faibles
- Vitry : valeurs moyennes avec une différence amont/aval bien marquée et une différence en fonction de la végétation
- Compans : valeurs faibles résultant du dérasement du sol bien observé
⇒ Intérêt de voir l'évolution des sols avec campagne été 2022

Voir comment se traduisent ses observations dans la biodégradation des micropolluants !



Objectif 2 : étude des processus de biodégradation microbienne

- **Quels micropolluants à étudier?**
3 micropolluants organiques : BPA, NP et OP
- **Quelles concentrations?**
Le plus proche des concentrations environnementales en prenant en compte les impératifs de laboratoire
- **Quels dispositifs?**
2 dispositifs : **batch liquide (étape 1)** et colonne (étape 2)
- **Quels sols?**
Les **11 sols en batch** et 2 sols en colonne



Etape 1 : Cinétique en batch liquide

Batch liquide avec consortium du sol en présence de BPA + NP et OP

(Sarma et al, 2019 ; Kang et Kondo, 2007 ; Chang et al, 2008 ; Yang et al 2014, etc)

Milieu de culture pour batch liquide :
BSM = Basal salt medium

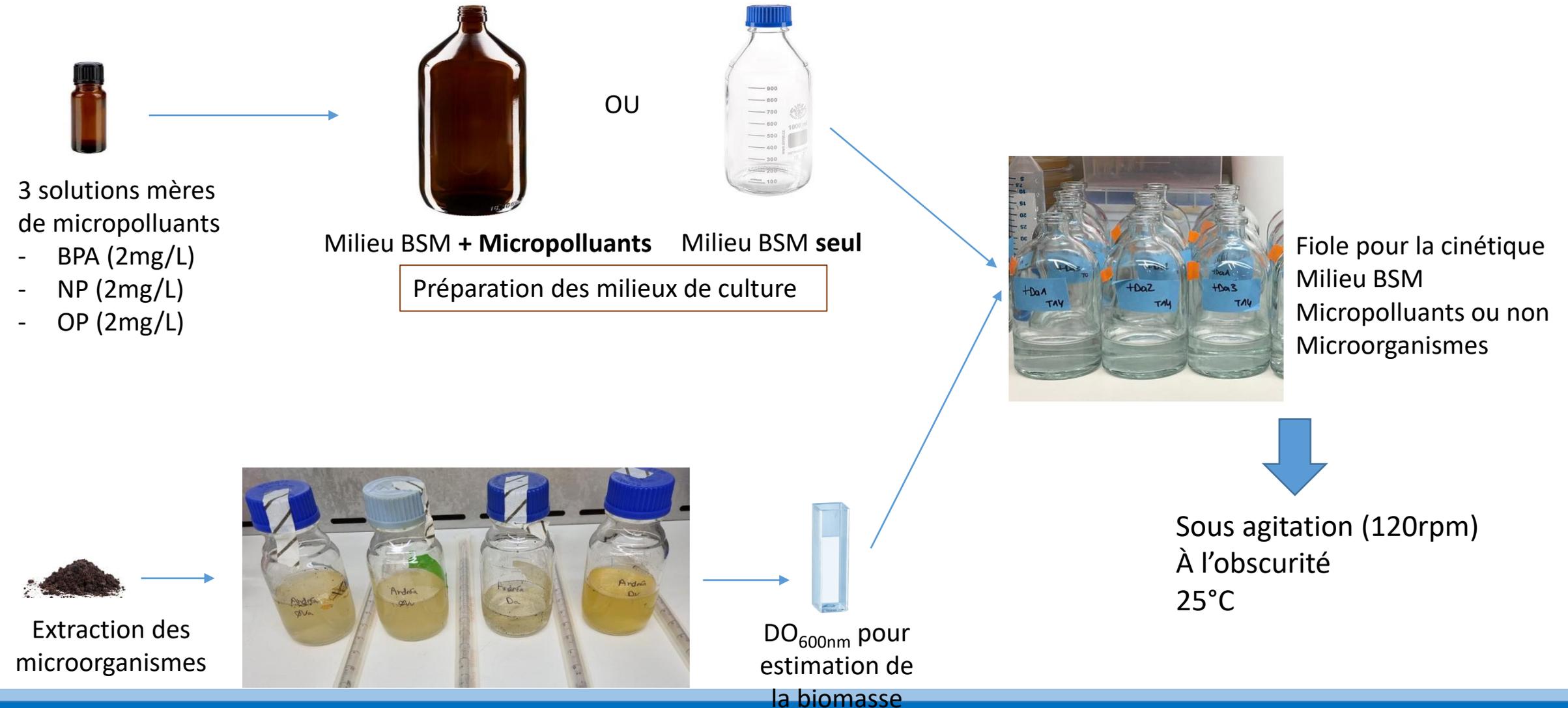
(Peng et al, 2015 ; Toyama et al, 2012)

Choix concentrations :

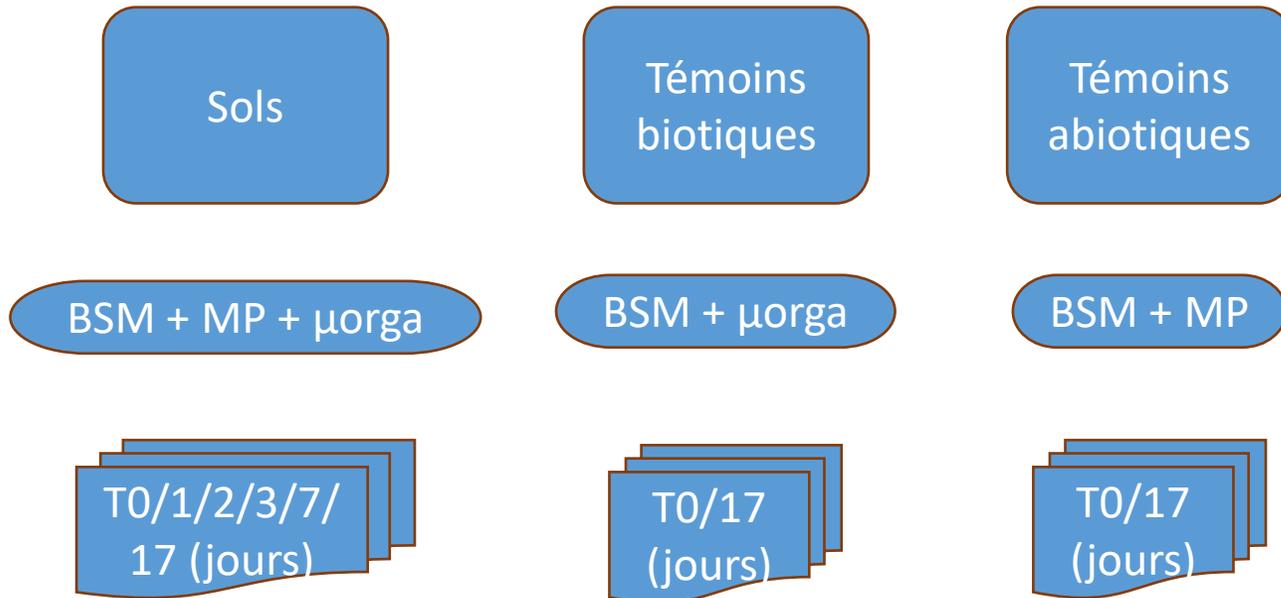
- BPA (250µg/l)
- NP (175µg/l)
- OP (75µg/l)

(Flanagan et al, 2018 : ratios et stage Roux, 2019)

Mise en place cinétique en batch liquide



Mise en place cinétique en batch liquide



Cinétique 1 avec une centaine de fioles

=> 11 sols séparés en 3 cinétiques : 3 mois



Analyses de la cinétique

Analyses physico-chimiques

⇒ Observation des changements dans le milieu et biodégradation des MP

- Dosage des micropolluants ciblés : BPA, 4-NP et OP (efficacité de biodégradation)
- TOC (carbone organique total)
- pH (impact sur le milieu)

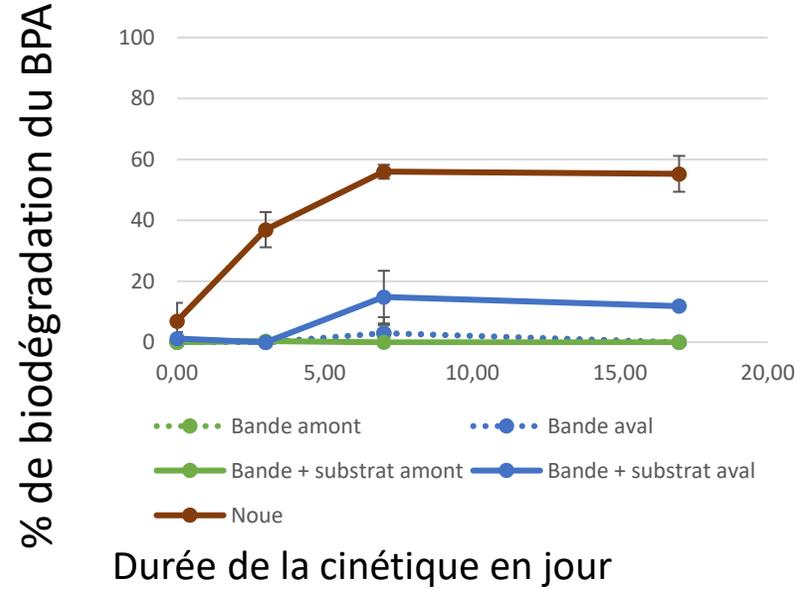
Analyses biologiques

⇒ Étude de l'abondance, de l'activité et de la diversité microbienne pouvant être impactées par la présence des MP

- NPP (biomasse microbienne : *nombre le plus probable*)
- CO₂ (biomasse microbienne)
- Biolog (activité microbienne)
- Séquençage (diversité microbienne)



Résultats de biodégradation du BPA

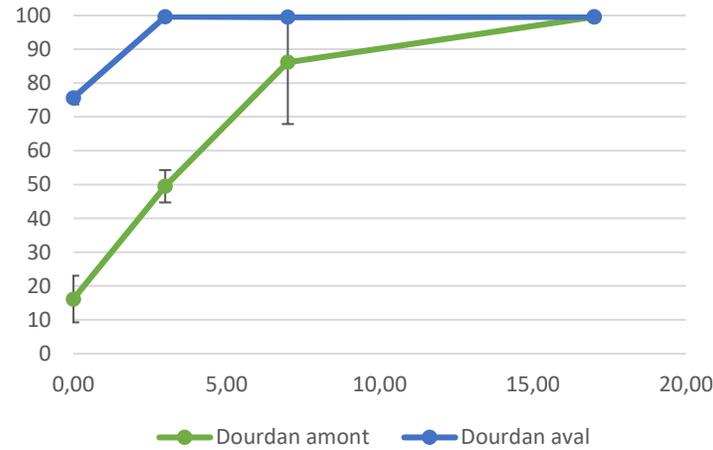
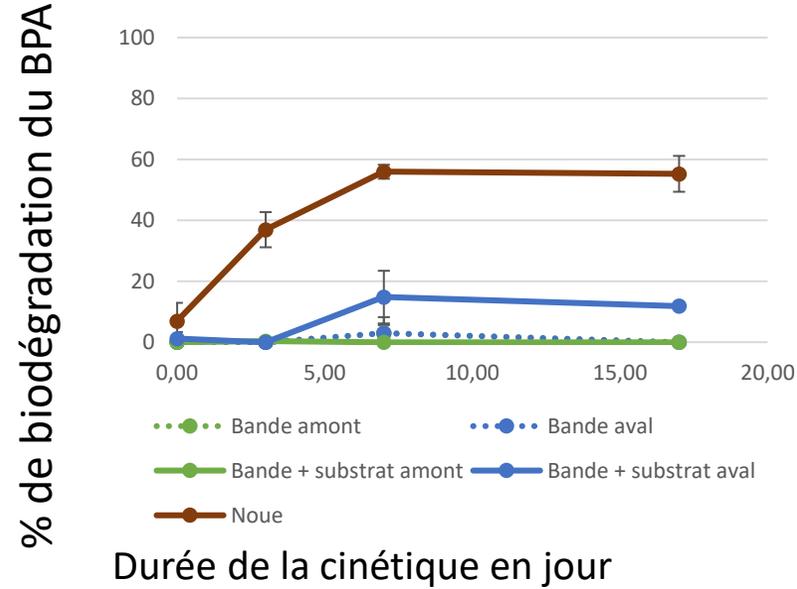


⇒ Forte efficacité de biodégradation de la Noue : presque 60% du BPA

⇒ Autres sols de Compan non efficace pour faire la biodégradation



Résultats de biodégradation du BPA



⇒ Forte efficacité de biodégradation de la Noue : presque 60% du BPA

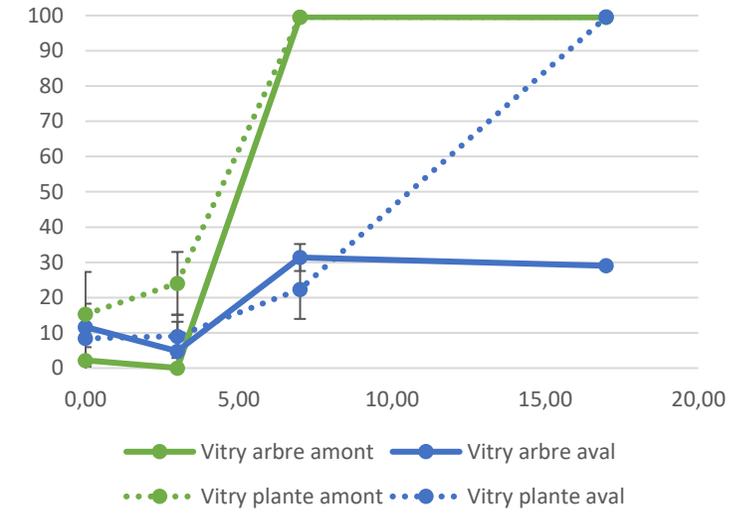
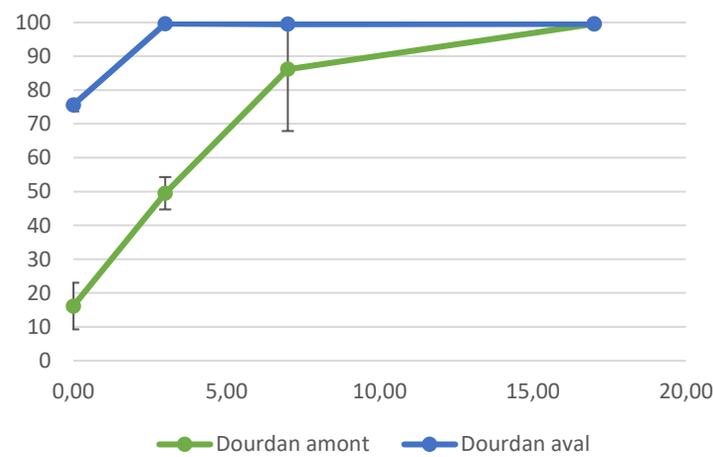
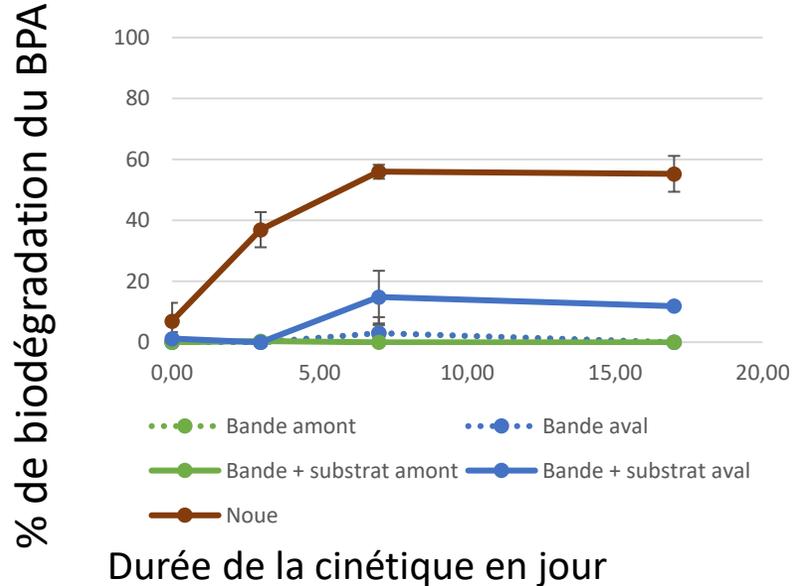
⇒ Très forte efficacité de biodégradation des 2 sols de Dourdan

⇒ 100% de biodégradation du BPA

⇒ Autres sols de Compan non efficace pour faire la biodégradation



Résultats de biodégradation du BPA



⇒ Forte efficacité de biodégradation de la Noue : presque 60% du BPA

⇒ Très forte efficacité de biodégradation des 2 sols de Dourdan
 ⇒ 100% de biodégradation du BPA

⇒ Forte efficacité de biodégradation de Vitry
 ⇒ 100% de biodégradation du BPA
 ⇒ Sauf Vitry plante aval

⇒ Autres sols de Compan non efficace pour faire la biodégradation

⇒ Différentes vitesses de biodégradation
 ⇒ Vitry plante amont 100% : 7 jours
 ⇒ Vitry plante aval 100% : 17 jours



Résultats de biodégradation à la fin de la cinétique

Site	Structure	Localisation	% BPA	% 4-NP	% OP
Compans	Bande 1	Amont	0 +/- 0	8 +/- 1	0 +/- 0
		Aval	0 +/- 0	0 +/- 0	0 +/- 0
	Bande 2 + substrat	Amont	0 +/- 0	0 +/- 0	0 +/- 0
		Aval	12 +/- 0	33 +/- 0	17 +/- 5
	Noue	/	55 +/- 6	100 +/- 0	100 +/- 0
Vitry	Arbre	Amont	100 +/- 0	37 +/- 8	42 +/- 18
		Aval	29 +/- 1	76 +/- 1	55 +/- 8
	Plante	Amont	100 +/- 0	53 +/- 3	42 +/- 7
		Aval	100 +/- 0	49 +/- 1	42 +/- 3
Dourdan	Plante	Amont	100 +/- 0	94 +/- 2	95 +/- 5
		Aval	100 +/- 0	100 +/- 0	100 +/- 0



Résultats de biodégradation à la fin de la cinétique

Site	Structure	Localisation	% BPA	% 4-NP	% OP
Compans	Bande 1	Amont	0 +/- 0	8 +/- 1	0 +/- 0
		Aval	0 +/- 0	0 +/- 0	0 +/- 0
	Bande 2 + substrat	Amont	0 +/- 0	0 +/- 0	0 +/- 0
		Aval	12 +/- 0	33 +/- 0	17 +/- 5
	Noue	/	55 +/- 6	100 +/- 0	100 +/- 0
Vitry	Arbre	Amont	100 +/- 0	37 +/- 8	42 +/- 18
		Aval	29 +/- 1	76 +/- 1	55 +/- 8
	Plante	Amont	100 +/- 0	53 +/- 3	42 +/- 7
		Aval	100 +/- 0	49 +/- 1	42 +/- 3
Dourdan	Plante	Amont	100 +/- 0	94 +/- 2	95 +/- 5
		Aval	100 +/- 0	100 +/- 0	100 +/- 0



Biodégradation complète

⇒ Noue, Vitry et Dourdan :
sols les plus aptes à biodégrader



Bilan biodégradation des micropolluants de la cinétique liquide

- Parmi les 11 sols : 8 sols capable de faire de la biodégradation
 - Efficacité de biodégradation différente entre les sites et au sein d'un même site (20 à 100% pour le BPA)
 - Des vitesses de biodégradation également variable
- ⇒ En combinant les résultats de biodégradation des 3 micropolluants, les sols les plus intéressants sont :
- ⇒ la Noue
 - ⇒ le sol en amont de Dourdan



Bilan caractérisation des sols et cinétique biodégradation

- Le sol de Dourdan amont le plus riche et le plus actif = un des sols les plus efficaces pour faire la biodégradation des micropolluants
- Vitry intermédiaire
- Compans : 2 tendances
 - ⇒ Noue : efficace pour biodégradation malgré une richesse et une activité faible
diversité génétique?
 - ⇒ Bandes enherbées : inefficace pour biodégradation avec une faible richesse et une faible activité : **dérasement en cause ?**

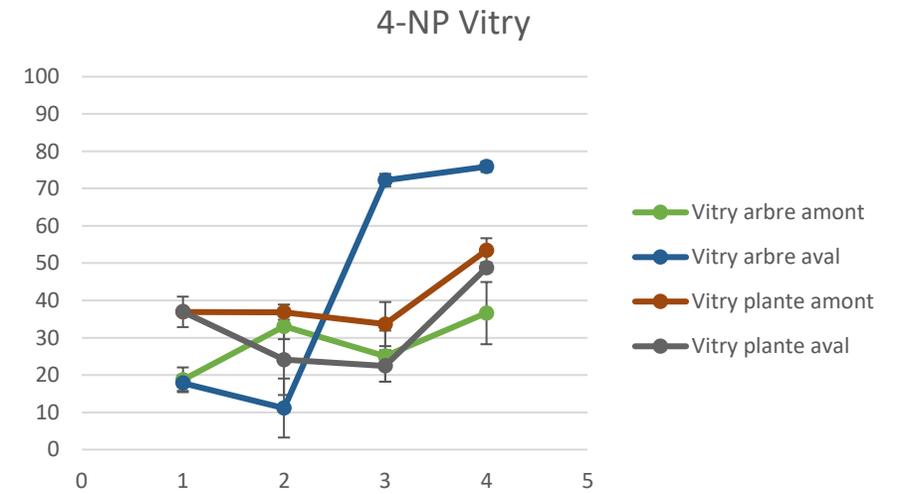
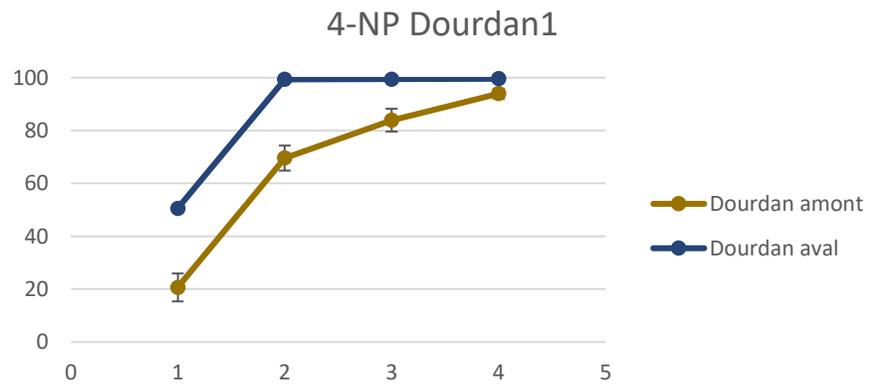
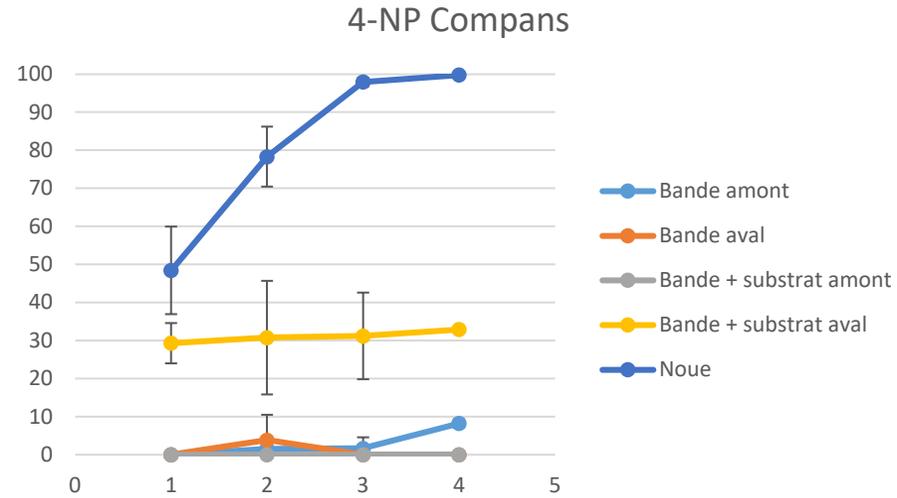


Perspectives

- Analyses des variations saisonnières et temporalité :
 - Campagne hiver 2021 sur les 3 sites
 - Compans été 2022
- Analyses de la diversité génétique :
 - Séquençage des sols des campagnes
 - Séquençage de la cinétique
- Colonnes de biodégradation : choix de la Noue et Dourdan amont

Merci de votre
attention

Annexes



Annexes

