

UTILISATION DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX POUR LA DÉPOLLUTION DE SOLS POLLUÉS PAR DES POLLUANTS ORGANIQUES

Christian Mougin, Véronique Chaplain*, Rachel Rama-Mercier, Laurent Sohier**, Jean-Claude Sigoillot et Marcel Asther***
Unité de phytopharmacie et médiateurs chimiques de l'Inra, Krebs, Laboratoire de biotechnologie des champignons filamenteux

Les champignons filamenteux font preuve de potentialités intéressantes pour la dépollution des sols pollués par des polluants organiques. Cet article présente tout d'abord les principales propriétés fongiques avantageuses en dépollution, puis les domaines de recherche à développer, et enfin les premiers résultats obtenus par les auteurs.

Filamentous fungi exhibit interesting abilities to remediate soils polluted by organic chemicals. This paper presents firstly the main fungal properties useful in remediation, then the research areas to develop, and finally the first results obtained by the authors.

Parmi les techniques de dépollution des sols, le traitement biologique apparaît comme une alternative prometteuse, efficace, économique et écologique¹. En effet, tous les types de sols peuvent être *a priori* dépollués par voie biologique. De même, tous les xénobiotiques sont biodégradables à plus ou moins long terme. Le traitement biologique utilise des micro-organismes autochtones (déjà en place dans le sol) ou allochtones (ajoutés) pour dégrader les polluants organiques. Les capacités dégradantes des bactéries ont été largement démontrées *in vitro*, en milieu liquide et en bioréacteur. Elles ne sont cependant pas reproductibles dans les sols à traiter où l'implantation des micro-organismes allochtones s'avère souvent difficile. De ce fait, l'utilisation de bactéries se limite souvent à la stimulation des populations autochtones pour le traitement de sols *in situ* ou celui de terres excavées, par des procédés de bio-venting par exemple, ou par apport d'éléments nutritifs.

L'approche technologique concernant les champignons filamenteux est différente. Elle est fondée sur l'utilisation de ces organismes présentant des potentialités intéressantes, et que l'on trouve en faible quantité dans les sols. Des champignons allochtones sélectionnés pour leurs capacités dégradantes sont alors utilisés pour un traitement sur terres excavées. Cette technologie récente est actuellement en développement.

LES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

Les champignons filamenteux comprennent les champignons imparfaits, les ascomycètes et les basidiomycètes, dont les

pourritures molles, brunes ou blanches. Les champignons de la pourriture blanche sont actuellement les plus étudiés. Ils assurent dans la nature la dépolymérisation et la minéralisation de la lignine (ligninolyse), et permettent ainsi la destruction des fibres du bois. Parmi les 40 espèces de pourritures blanches faisant l'objet de recherches importantes, 2 servent le plus souvent de modèles : *Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor*, en raison de leur forte production d'enzymes ligninolytiques.

Des propriétés spécifiques justifient l'intérêt qui leur est porté.

Dégradation d'une large gamme de composés organiques

Les champignons de la pourriture blanche sont d'une grande richesse enzymatique car ils produisent un grand nombre de systèmes exo-et intra-cellulaires. Les premiers, peu spécifiques et à fort pouvoir oxydant, comprennent en particulier les peroxydases du système ligninolytique (lignine et manganèse peroxydases) et des phénoloxydases (laccases). Les seconds sont classiquement impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques chez les eucaryotes (par exemple les monooxygénases à cytochrome P-450). Cette richesse enzymatique permet à ces champignons d'assurer un grand nombre de réactions chimiques (oxydation, réduction, hydrolyse, conjugaison et oligomérisation) sur des xénobiotiques polluants de structures chimiques diverses (tableau I), et présentant des propriétés physicochimiques (polarité, lipophilie...) variées^{2,3}. Les enzymes agissent principalement sur les polluants dissous dans l'eau du sol, mais les systèmes exocellulaires pourraient également dégrader les polluants adsorbés sur la fraction solide du sol. Le mycélium fongique consti-

Tableau I : Polluants organiques transformés par les champignons filamenteux

| Classes de polluants | Exemples |
|---|--------------------------------------|
| Hydrocarbures polycycliques aromatiques | Anthracene, Benzo [a] pyrene |
| Composés aromatiques chlorés | Chlorophénols, PCBs, dioxine |
| Munitions et explosifs | TNT et dérivés |
| Pesticides | Atrazine, lindane, DDT |
| Colorants | |
| Divers | BTEX, cyanures, CCl ₄ ... |

tue en outre un piège dans lequel les polluants (pour la plupart des composés lipophiles) s'accumulent. Cette propriété permet de transformer des polluants volatils présents dans la phase gazeuse du sol. Ils deviennent alors des substrats potentiels pour les enzymes intracellulaires.

Mécanismes de régulation différents selon les activités enzymatiques

Le système exo-cellulaire ligninolytique est contrôlé par l'apport en éléments nutritifs, et n'est pas régulé par la quantité de polluant présente au voisinage du champignon. Ainsi, la production des enzymes est stimulée lorsque le champignon se trouve en carence nutritionnelle vis-à-vis de la source de carbone ou de la source d'azote. En complément, une augmentation de la durée de la phase de croissance des champignons, obtenue par exemple en modulant sa température de croissance, conduit une forte dégradation de polluant par les enzymes intra-cellulaires. La synthèse de ceux-ci est quant-à-elle inductible par certains xénobiotiques, ou des stress...

Forte tolérance aux composés toxiques

Certains polluants sont toxiques pour les êtres vivants. Par exemple, les cyanures sont des inhibiteurs puissants de la respiration, et le pentachlorophénol est un découplant des phosphorylations oxydatives. De ce fait, ils sont potentiellement inhibiteurs de la croissance de nombreux micro-organismes. Si ces composés sont toxiques pour les spores de champignon dont ils inhibent la germination, des cultures fongiques âgées de quelques jours détoxifient et dégradent des concentrations élevées de ces composés.

Possibilité d'utiliser des souches hyperproductrices d'un système enzymatique particulier

De nombreuses recherches ont d'abord visé à améliorer la production et l'activité des peroxydases. Par exemple, plusieurs souches mutantes hyperproductrices d'enzymes ont été obtenues par mutagenèse UV et amplification génique. Les gènes des peroxydases ligninolytiques sont désormais clonés et séquencés. Une telle démarche peut s'appliquer à d'autres systèmes enzymatiques. On peut donc disposer de souches surexprimant un (des) système(s) enzymatique(s) plus spécifique(s) d'une famille de polluants.

Utilisation de substrats de croissance économiques

Classiquement, les champignons nécessitent, avant leur inoculation dans le sol, une phase de production de biomasse par culture sur des substrats organiques (raffes de maïs, copeaux de bois) peu coûteux car sous-produits de l'agriculture ou de l'industrie. On peut alors ensemercer les sols à traiter avec des quantités massives d'inoculum, ce qui permet au champignon d'être un compétiteur efficace de la microflore autochtone, du moins pendant le temps nécessaire à la mise en place du processus de biotransformation.

LES DOMAINES DE RECHERCHE

Depuis quelques années, un programme de recherche est développé à l'Inra par l'Unité de phytopharmacie et médiateurs chimiques (Versailles) et le Laboratoire de biotechnologie des champignons filamenteux (Marseille-Luminy). Il a pour objectif d'apporter des connaissances fondamentales sur la biochimie et la physiologie des champignons filamenteux, et de proposer des procédés de biodépollution des sols et effluents liquides contaminés par des polluants organiques. Ce programme a reçu les soutiens financiers de l'Inra (AIP pesticides) et de l'Ademe (marché d'étude). Les études réalisées jusqu'à aujourd'hui ont porté sur des molécules à usage agro-pharmaceutique (triazines, lindane) ou générées par l'industrie papetière (pentachlorophénol, acides résiniques). Pour évaluer les capacités réelles des champignons en dépollution de sites industriels, une collaboration a été récemment engagée entre l'Inra et la division Réhabilitation de sites de la société Krebs (réseau Eurisys). Cette société spécialisée en ingénierie et services dans le secteur de la chimie, intervient également dans le domaine du traitement des déchets, des pollutions et des nuisances d'origine industrielle. Le programme de recherche financé par Krebs s'intéresse au traitement par champignons de polluants persistants (HAPs, PCBs et aromatiques nitrés) dans les sols pollués. Les domaines de recherche considérés sont :

Connaissance du milieu pollué

Les sols industriels ont une structure complexe et hétérogène, ce qui pose avant tout le problème de la méthodologie analytique et de la représentativité des analyses. D'abord, il n'existe pas de méthodes d'analyses normalisées. De plus l'échantillonnage d'un sol pollué pose problème. Il faut donc développer des méthodes d'analyse et d'interprétation des résultats fiables pour évaluer correctement les caractéristiques des sols pollués avant traitement, et adapter le traitement à chaque degré de pollution.

Connaissance des champignons filamenteux et de leurs capacités de dégradation

Le but de cette étape est d'évaluer les capacités dégradantes de souches fongiques par des screening rapides sur milieu solide contaminé. Elle aboutira à la création d'une collection de souches performantes adaptée une classe particulière de polluant.

Connaissances sur l'ensemencement et les paramètres de culture

Cette étape vise à définir les techniques de mise en œuvre des champignons sur sols pollués. Au cours des expérimentations, un suivi de la croissance fongique et de l'activité des champignons sera effectué en fonction de paramètres de cultures facilement et économiquement maîtrisables, comme l'humidité ou la température. Cette étape devra permettre la mise au point de supports facilitant l'ensemencement, la croissance, l'activité et éventuellement la disponibilité du

polluant. Elle aboutira à l'élaboration d'un « guide technique » pour la culture des champignons sur sols pollués.

Connaissance des rendements et des cinétiques de dégradation

Les procédés biologiques de dépollution permettent de dégrader le polluant jusqu'à une concentration seuil fixée par la biodisponibilité de la molécule aux micro-organismes. En effet, le polluant doit être solubilisé dans la phase aqueuse du sol pour subir les réactions de biotransformation. Le principal inconvénient des procédés biologiques de dépollution réside dans la détermination préalable de ce seuil ainsi que de son délai d'obtention. Les techniques d'évaluation rapide de cette valeur seuil prenant en compte l'ensemble des paramètres chimiques et biologiques du sol pourraient permettre de valider un modèle.

Connaissance des produits de dégradation du polluant

Lors d'une action de dépollution, il convient de s'assurer de la transformation effective du polluant en composés non toxiques, et de vérifier qu'il ne génère pas de produits susceptibles de s'accumuler. Ces études permettent aussi de déterminer le schéma de dégradation du polluant et de suivre l'accumulation du carbone dans les compartiments gazeux, liquide et solide du sol.

LES PREMIERS RÉSULTATS

Les résultats obtenus de 1992 à 1995 concernent principalement la transformation de molécules à usage agro-pharmaceutique par *P. chrysosporium*.

– Tous les composés ont été transformés par les cultures fongiques maintenues en milieu liquide. Les études ont conduit à identifier un certain nombre de métabolites, dont certains ont une structure originale. Les polluants sont ainsi détoxifiés et en partie minéralisés^{4,5,6}.

– En milieu liquide, le système ligninolytique ne semble pas systématiquement impliqué dans la transformation directe des polluants. En revanche, les résultats suggèrent pour certains composés la participation de systèmes enzymatiques plus conventionnels, comme les monooxygénases à cytochrome P-450^{5,6}.

– Les recherches sur les conditions de culture ainsi que l'obtention de souches hyperproductrices en peroxydases extracellulaires (composantes majeures du système ligninolytique) ont permis d'optimiser la production de ces enzymes⁷.

– Dans les sols pollués par des pesticides à des doses agronomiques, un inoculum liquide de *P. chrysosporium* est capable de se développer même en présence de la microflore endogène⁸. Dans les mêmes conditions, les effets sur la transformation des polluants sont variables et dépendent de la nature des composés. Ainsi, en ce qui concerne l'atrazine, l'addition du champignon semble sans effet : il ne modifie ni le taux de minéralisation de l'herbicide, ni sa transformation en métabolites polaires extractibles, ni la quantité de résidus non extractibles obtenus lors des études de dégradation en présence de la microflore endogène du sol. A l'opposé, *P. chry-*

sosporium synergise la minéralisation du lindane par la microflore endogène du sol. Dans ce cas, le champignon permettrait la minéralisation d'intermédiaires de transformation volatils.

CONCLUSIONS

Depuis plusieurs années, lors d'expériences conduites en milieu liquide, les champignons filamenteux montrent une grande capacité à transformer les polluants organiques. Ils doivent cependant faire la preuve de leurs potentialités intéressantes pour la dépollution des sols, et en particulier des sols industriels. Une expérience concluante a déjà été tentée aux USA dans le cas de sites pollués par du pentachlorophénol^{9,10}. Cependant, de nombreuses recherches sont encore nécessaires pour comprendre la nature des interactions sols/micro-organismes/polluants ainsi que des mécanismes de dégradation mis en œuvre. Ces connaissances devraient permettre de modéliser et d'optimiser les expériences préliminaires à toute action biologique, pour améliorer des procédés encore trop souvent conduits de manière empirique. Pour cela, les études doivent s'effectuer en synergie entre les laboratoires de recherche publique et les industriels de la dépollution.

* Christian Mougín, Véronique Chaplain

INRA, Unité de phytopharmacie et médiateurs chimiques, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles cedex

** Rachel Rama-Mercier, Laurent Sohier,

Krebs réseau Eurisys, Division réhabilitation de sites, 8 Rue Jean-Pierre Timbaud, BP 67, 78184 Saint Quentin en Yvelines

*** Jean-Claude Sigoillot, Marcel Asther

INRA, Laboratoire de biotechnologie des champignons filamenteux, Faculté des sciences de Luminy, Centre d'enseignement supérieur en biotechnologies/ESIL, Parc scientifique et technologique, CP 925, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 09

Bibliographie

- Sohier L., 1996. *Traitement biologique de sols pollués par des composés organiques*. Environnement et Techniques, 156, 46-52.
- Barr D.P., Aust S.D., 1994. *Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants*. Environ. Sci. Technol., 28, 78A-86A.
- Higson F.K., 1991. *Degradation of xenobiotics by white rot fungi*. Rev. Environ. Contamin. Toxicol., 122, 111-152.
- Mougín C., Laugero C., Asther M., Dubroca J., Frasse P., Asther M., 1994. *Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., 60, 705-708.
- Mougín C., Pericaud C., Malosse C., Laugero C., Asther M., 1996. *Biotransformation of the insecticide lindane by the white rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. Pestic. Sci., 47, 51-59.
- Mougín C., Laugero C., Asther M., Chaplain V., 1997. *Biotransformation of s-triazine herbicides and related degradation products in liquid cultures by the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium*. Pestic. Sci. (sous presse).
- Laugero C., Sigoillot J.-C., Moukha S., Frasse P., Bellon-Fontaine M.-N., Bonnarme P., Mougín C., Asther M., 1996. *Selective hyperproduction of manganese peroxidases by Phanerochaete chrysosporium I-1512 immobilized on nylon net in a bubble-column reactor*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 717-723.
- Mougín C., Dubroca J., Asther M., 1996. *Biotransformation of pesticides in soils inoculated with the white rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. Dans Pesticides, Soil Microbiology and soil quality. Proceedings of the 2nd International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology, Beaune, pp. 174-175.
- Lamar R.T. and Dietrich D.M., 1990. *In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by Phanerochaete spp.* Appl. Environ. Microbiol., 56, 3093-3100.
- Lamar R.T., Evans J.W. and Glaser J.A., 1993. *Solid-phase treatment of a pentachlorophenol-contaminated soil using lignin-degrading fungi*. Environ. Sci. Technol., 27, 2566-2571.