

# Biodégradation des polluants organiques par des champignons saprotrophes

Etudes en milieu liquide et  
en sols historiquement contaminés

Catherine RAFIN

[rafin@univ-littoral.fr](mailto:rafin@univ-littoral.fr)

(en collaboration avec Etienne VEIGNIE)



Colloque Les champignons  
3-4 juin 2015



# Présentation: Catherine RAFIN rafin@univ-littoral.fr



65 membres: 27 enseignants-chercheurs, 10 IATOSS, 30 doctorants & post docs  
4 équipes :

- Chimie et Toxicologie des Emissions Atmosphériques (CTEA)
- **Interactions Plantes-Champignons et Remédiation (IPCR)**
  - Chimie Supramoléculaire (CS)
- Traitement Catalytique et Energie Propre (TCEP)

## **Maître de Conférences - HDR Hors classe (section CNU 68)**

**Diplômes:** Ingénieur ENITHP Angers; DEA Ecologie Microbienne, option sols et eaux, UCB Lyon; Doctorat en Phytopathologie UBO Brest; HDR « Exploration de la diversité fongique dans des écosystèmes terrestres » ULCO Dunkerque ; First and Advanced English Certificate de Cambridge

**Enseignements (ULCO):** Ecologie, Environnement, Biologie Végétale, Microbiologie de l'Environnement (Licence SVN) ; Ecotoxicologie et Remédiation des sols pollués (Master Expertise et Traitement en Environnement), responsable Master ETE (M2)





-  Introduction
-  Démarche scientifique
-  Échantillonnage de sols historiquement contaminés
-  Isolement de champignons saprotrophes
-  Dégradation du polluant en milieu minéral
-  Etude des mécanismes impliqués dans la dégradation du polluant chez *Fusarium solani*
-  Dégradation des HAP en sols historiquement contaminés
-  Désorption des POP: Rôle de l'amidon
-  Perspectives R & D



Introduction



Démarche scientifique



Échantillonnage de sols historiquement contaminés



Isolement de champignons saprotrophes



Dégradation du polluant en milieu minéral



Etude des mécanismes impliqués dans la dégradation du polluant chez *Fusarium solani*



Dégradation des HAP en sols historiquement contaminés



Désorption des POP: Rôle de l'amidon

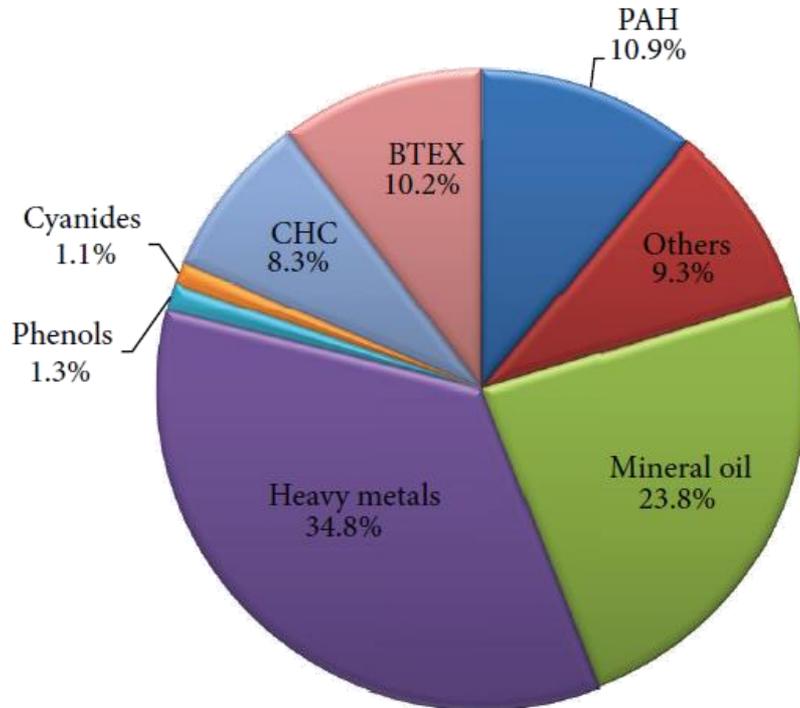


Perspectives R & D

# Contexte: Remédiation des sites & sols pollués

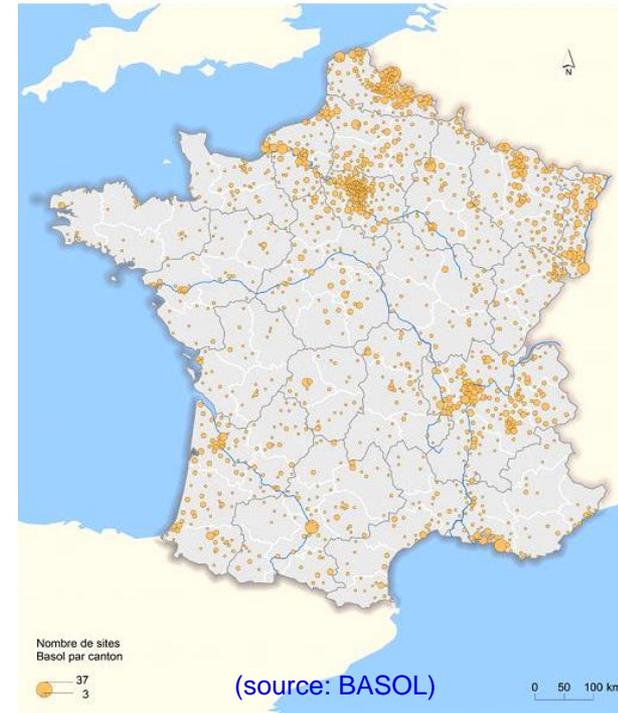


En Europe:



Sites contaminés: 342 000  
Sites potentiellement contaminés:  
2,5 millions sur 38 pays européens (Panagos *et al.*, 2013)

En France:

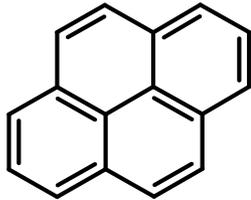


Source : Meddtl, DGPR (Basol au 16 novembre 2011), 2011.

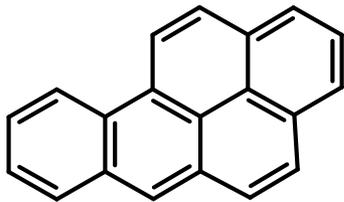
Région Nord-Pas de Calais: 581 sites pollués répertoriés:  
13% des sites recensés en France.  
1<sup>ère</sup> place avec la Région Rhône-Alpes qui recense 613 sites  
(13,7 % des sites français).



## Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

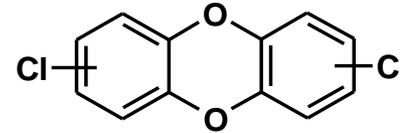


Pyrène

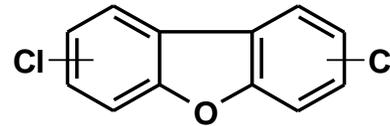


Benzo[a]pyrène

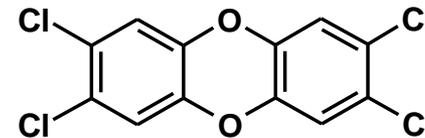
## Dioxines



Polychlorodibenzo-para-dioxines (PCDD)



Polychlorodibenzofurananes (PCDF)

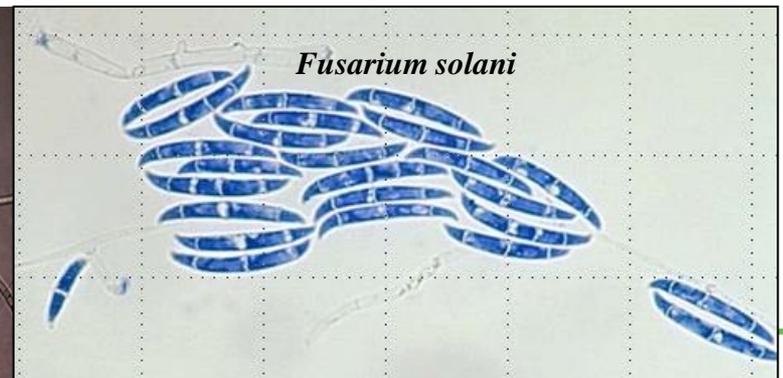
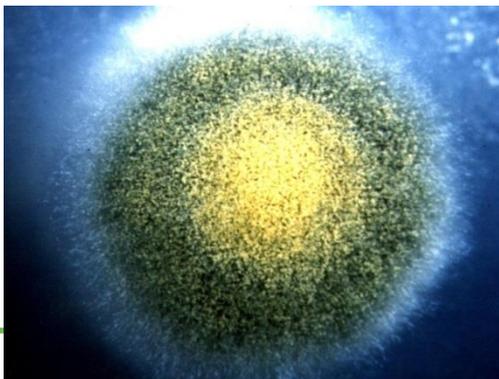
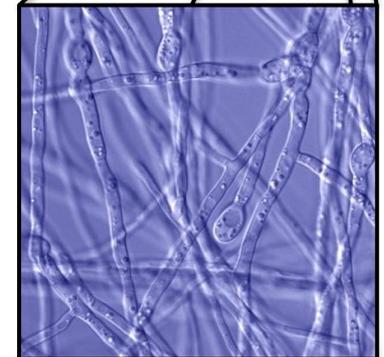
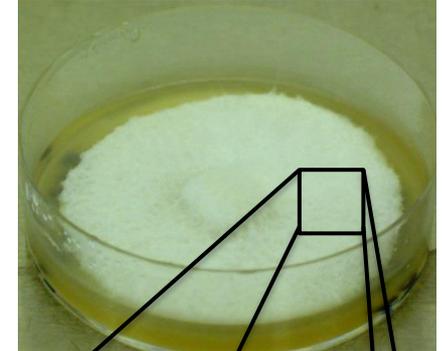


2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin  
(2,3,7,8-TCDD)  
Dioxine SEVESO

# Champignons saprotrophes



- ✓ Eucaryotes
- ✓ Ubiquistes dans les écosystèmes terrestres
- ✓ Mycélium constitué d'hyphes: permet la prospection d'un grand volume de sol avec un ratio surface/volume important
- ✓ Réseau filamenteux tridimensionnel
- ✓ Reproduction: sexuée et asexuée (spores)
- ✓ Métabolisme chimiohétérotrophe et diversité métabolique



# Diversité de communautés fongiques



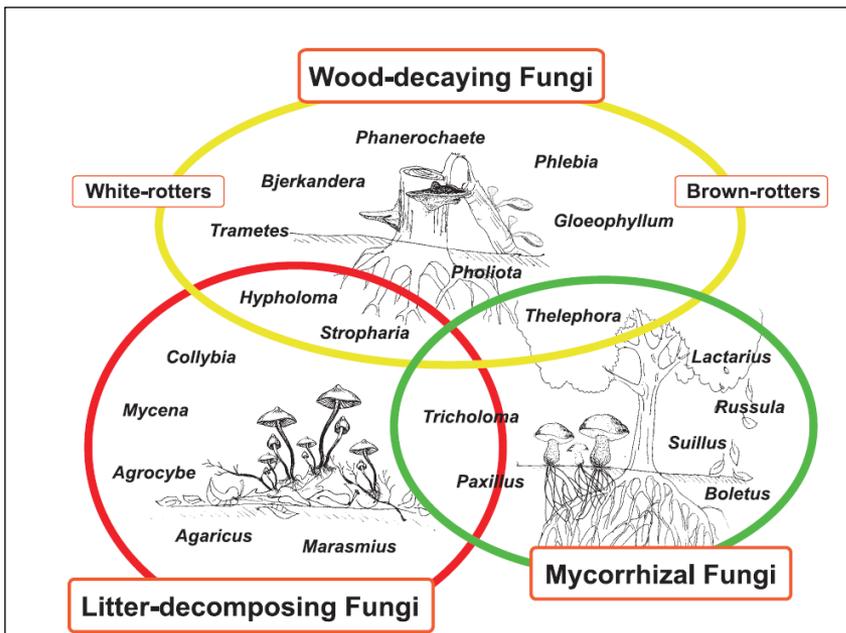
## Champignons lignolytiques, agents de la pourriture blanche

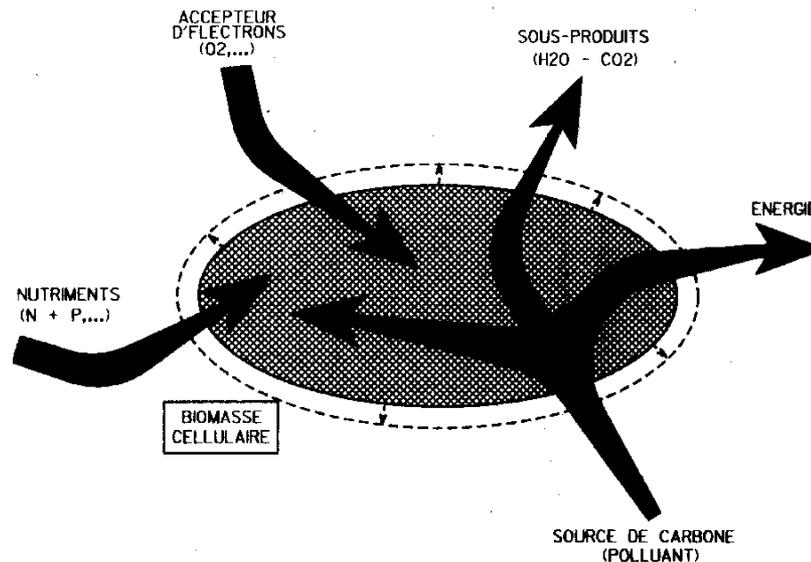
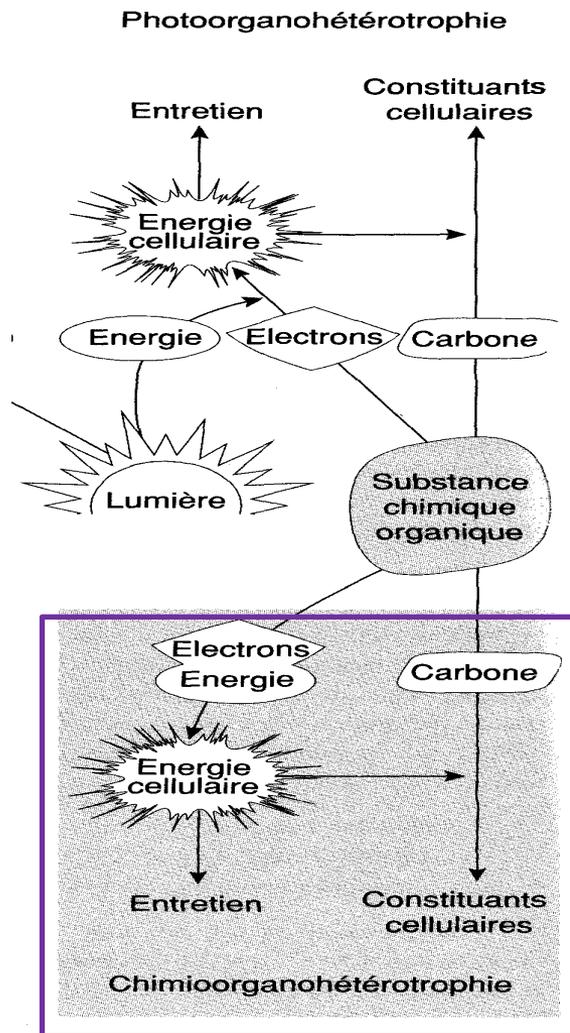


*Bjerkandera* sp.  
Basidiomycota - Aphyllophoromycetideae –  
Polyporales - Hapalopilaceae



*Trametes* sp.  
Basidiomycota - Aphyllophoromycetideae -  
Polyporales - Polyporaceae





## BIODEGRADATION

Phénomène naturel basé sur les capacités des micro-organismes à transformer partiellement ou totalement des molécules organiques complexes en métabolites, allant parfois jusqu'à la production de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>O (Minéralisation)



Introduction



Démarche scientifique



Échantillonnage de sols historiquement contaminés



Isolement de champignons saprotrophes



Dégradation du polluant en milieu minéral



Etude des mécanismes impliqués dans la dégradation du polluant chez *Fusarium solani*



Dégradation des HAP en sols historiquement contaminés



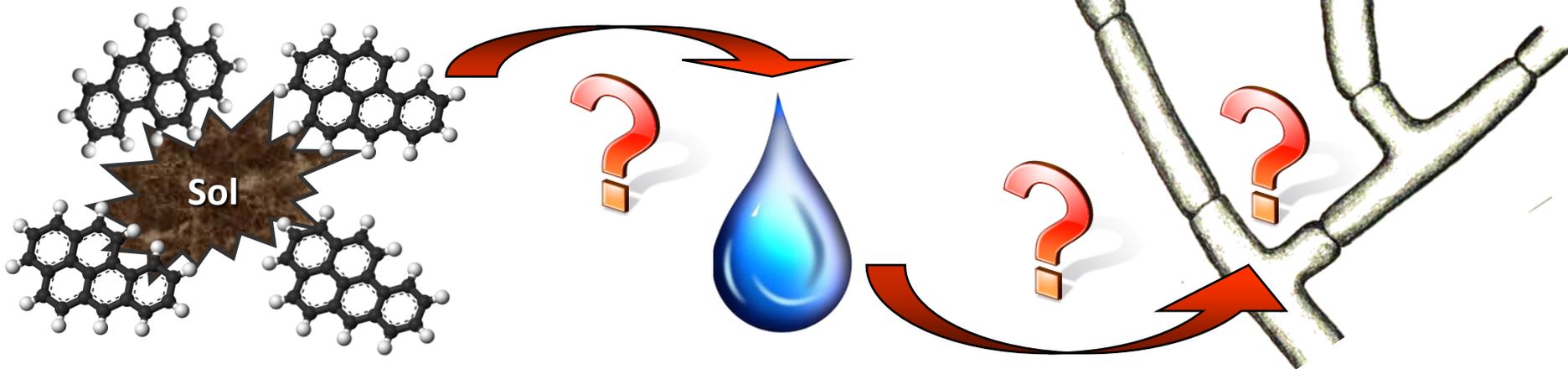
Désorption des POP: Rôle de l'amidon



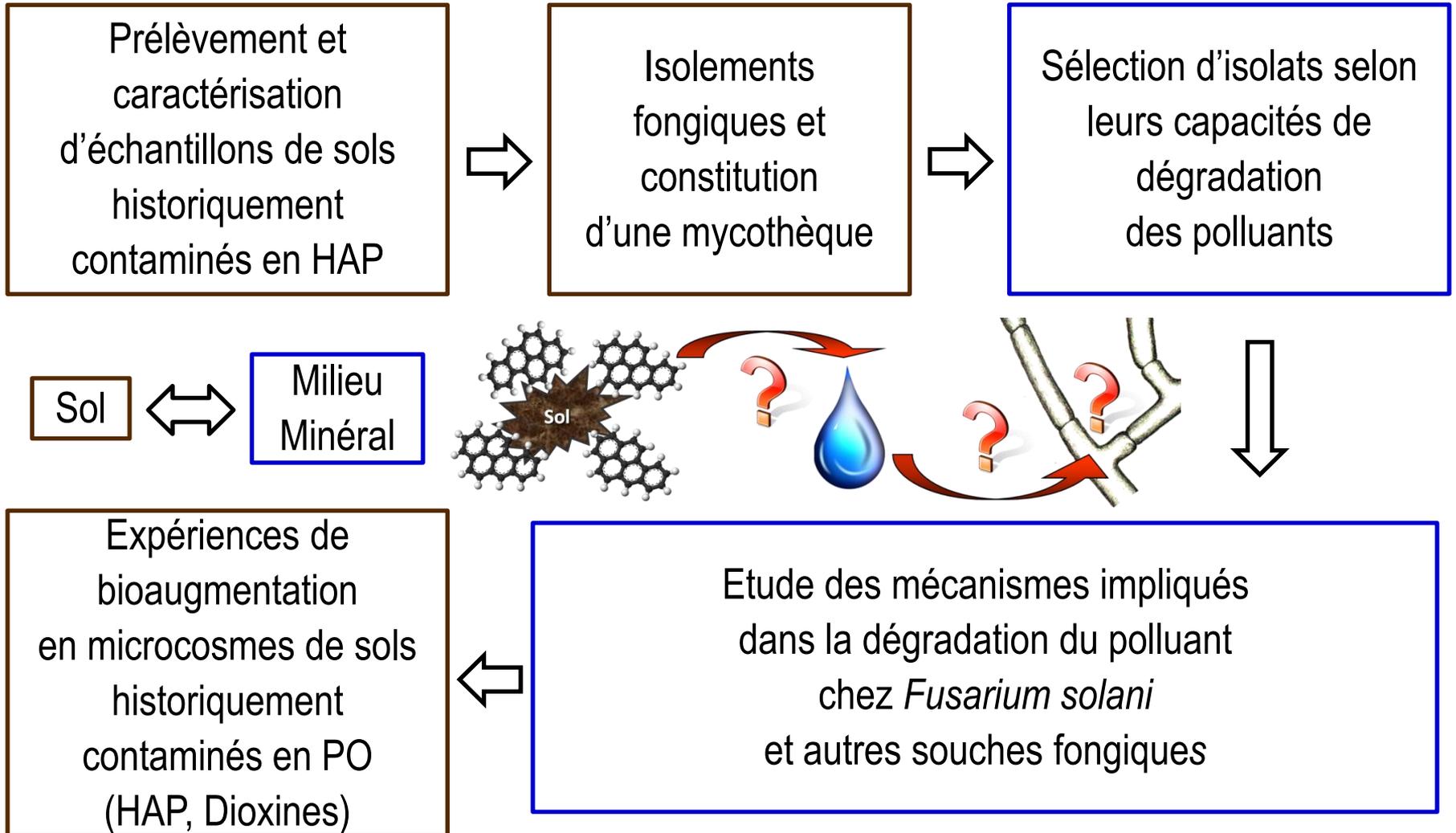
Perspectives R & D



- ✓ Paramètres limitant la bioremédiation fongique des polluants organiques:
  - › Biodisponibilité
  - › Amorçage de l'oxydation
- ✓ Etapes liées à la biodégradation des PO en sol:
  - › Augmentation de la solubilité des HAP en phase aqueuse
  - › Incorporation des HAP à l'intérieur des cellules
  - › Mécanismes impliqués dans la dégradation des polluants



# Démarche scientifique





Introduction



Démarche scientifique



**Échantillonnage de sols historiquement contaminés**



Isolement de champignons saprotrophes



Dégradation du polluant en milieu minéral



Etude des mécanismes impliqués dans la dégradation du polluant  
chez *Fusarium solani*



Dégradation des HAP en sols historiquement contaminés



Désorption des POP: Rôle de l'amidon



Perspectives R & D

# Échantillonnage de sols historiquement contaminés

Sites Ateliers Français pour  
l'Innovation et la Recherche



ADEME



Agence de l'Environnement  
et de la Maîtrise de l'Energie

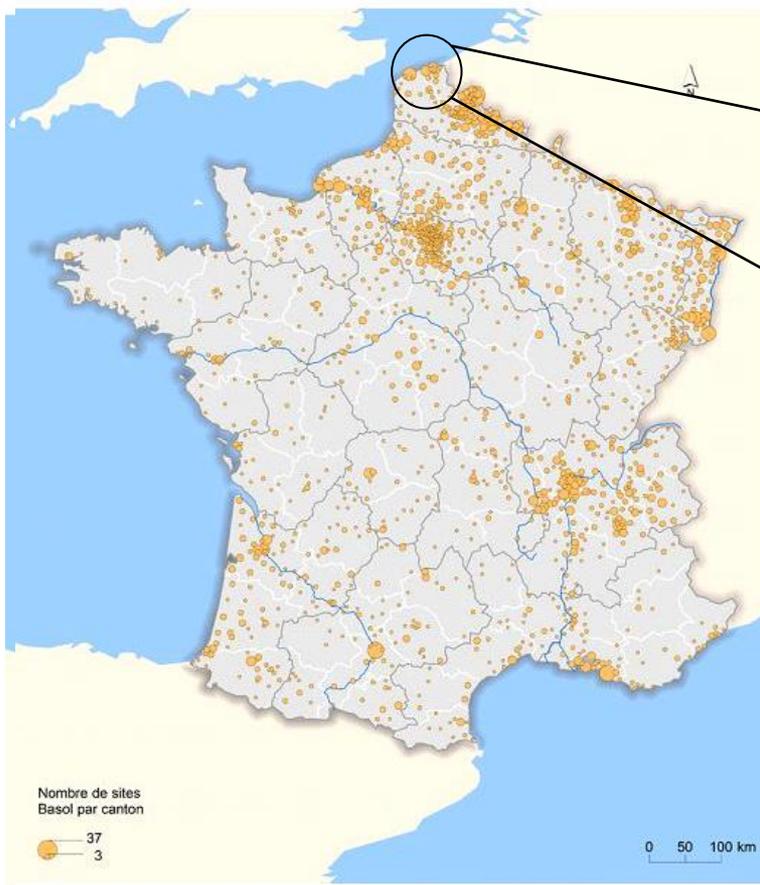
**Ensemble de sites français** constituant un **dispositif venant en support de la R&D en matière de gestion des sols**, tant vis-à-vis de la politique nationale en la matière, que pour les initiatives individuelles de porteurs de projets.

Chaque site, représentatif d'une **problématique en lien avec le territoire et les attentes des parties prenantes**, accueille des projets R&D qui participent à la recherche de solutions, en lien avec les questions de recherches posées dans le cadre d'un cahier des charges.

# Échantillonnage de sols historiquement contaminés



Pollution sols: HAP  
Parcelle Dépôt de bus 1930-2006  
Parcelle Usine à Gaz 1878-1958



Source : Meddtl, DGPR (Basol au 16 novembre 2011), 2011.



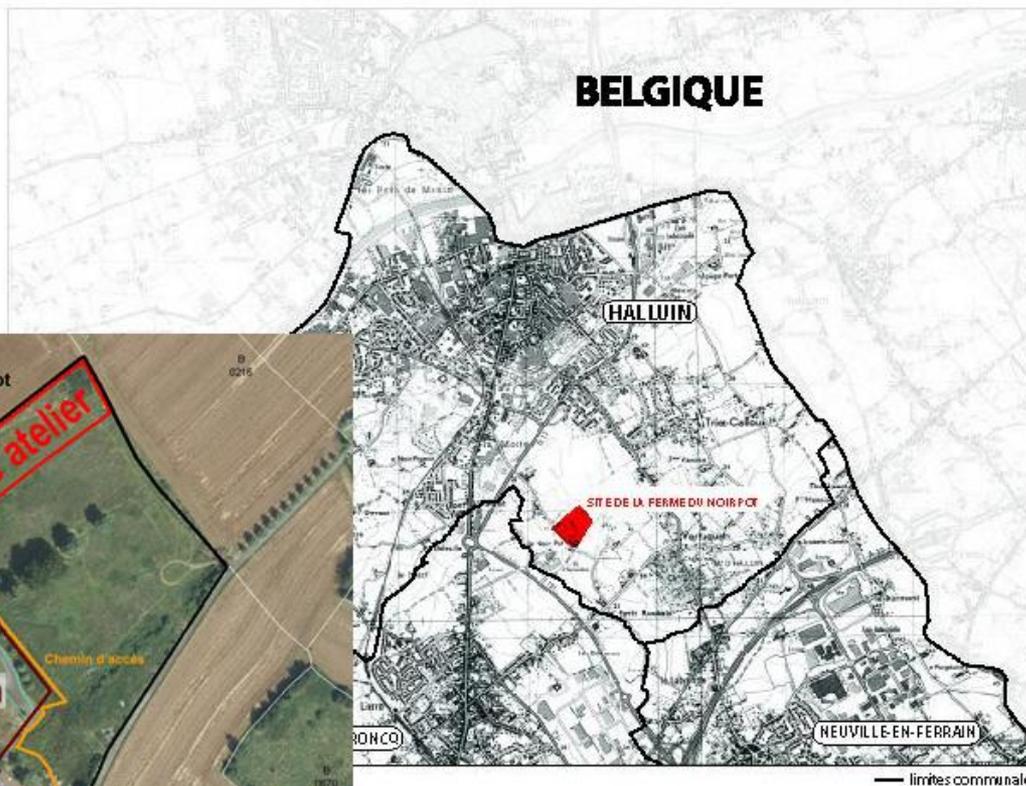
# Échantillonnage de sols historiquement contaminés



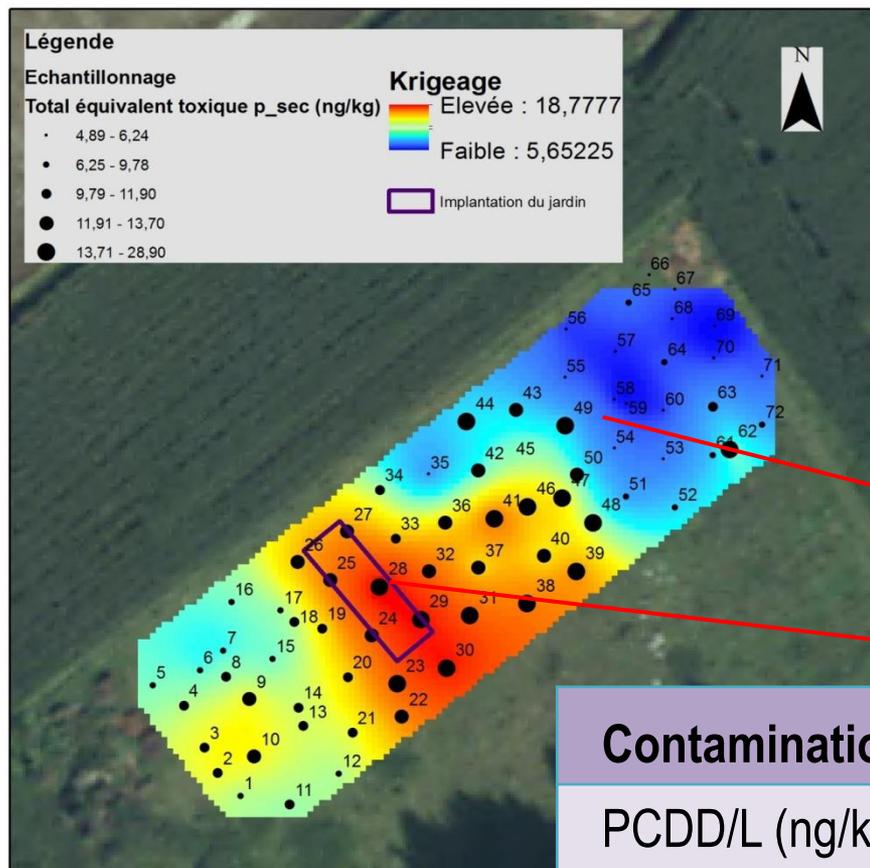
# Échantillonnage de sols historiquement contaminés



Pollution sols Dioxines  
UIOM 1968-1998



# Échantillonnage de sols historiquement contaminés



Infosol (Orléans)  
LAS Arras

Contamination	1	2
PCDD/L (ng/kg)	266.8 ± 37,1	67,6 ± 3,2
PCDD/L (I-TEQ ng/kg)	24,3 ± 4,2	5,1 ± 0,04



Introduction



Démarche scientifique



Échantillonnage de sols historiquement contaminés



**Isolement de champignons saprotrophes**



Dégradation du polluant en milieu minéral



Etude des mécanismes impliqués dans la dégradation du polluant  
chez *Fusarium solani*



Dégradation des HAP en sols historiquement contaminés



Désorption des POP: Rôle de l'amidon

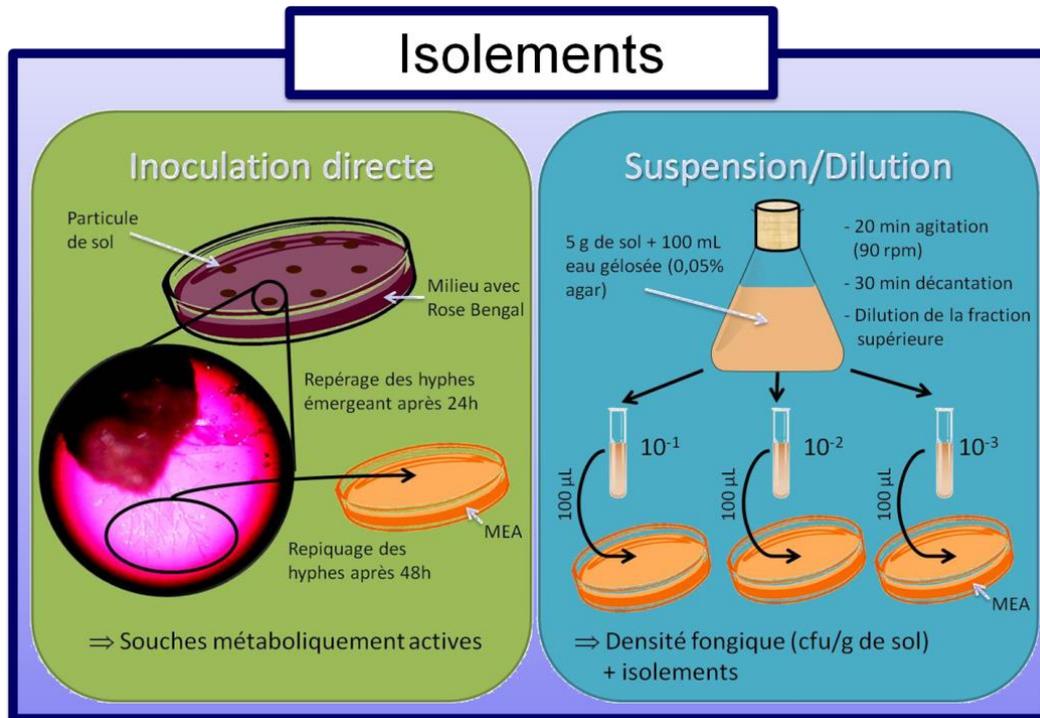


Perspectives R & D

# Isolement de champignons saprotrophes



- Sols historiquement contaminés (en HAP ou Dioxines) du Nord de la France
- 4 origines industrielles : usine à gaz, dépôt de bus, site de traitement du bois, UIOM
- Caractérisation pédologique des sols
- Caractérisation de la contamination : 16 HAP de la liste de l'US EPA, Dioxines



Identification des isolats:

- par microscopie optique
- par biologie moléculaire

# Isolement de champignons saprotrophes



Mycothèque ULCO UCEIV Dunkerque

# Isolement de champignons saprotrophes

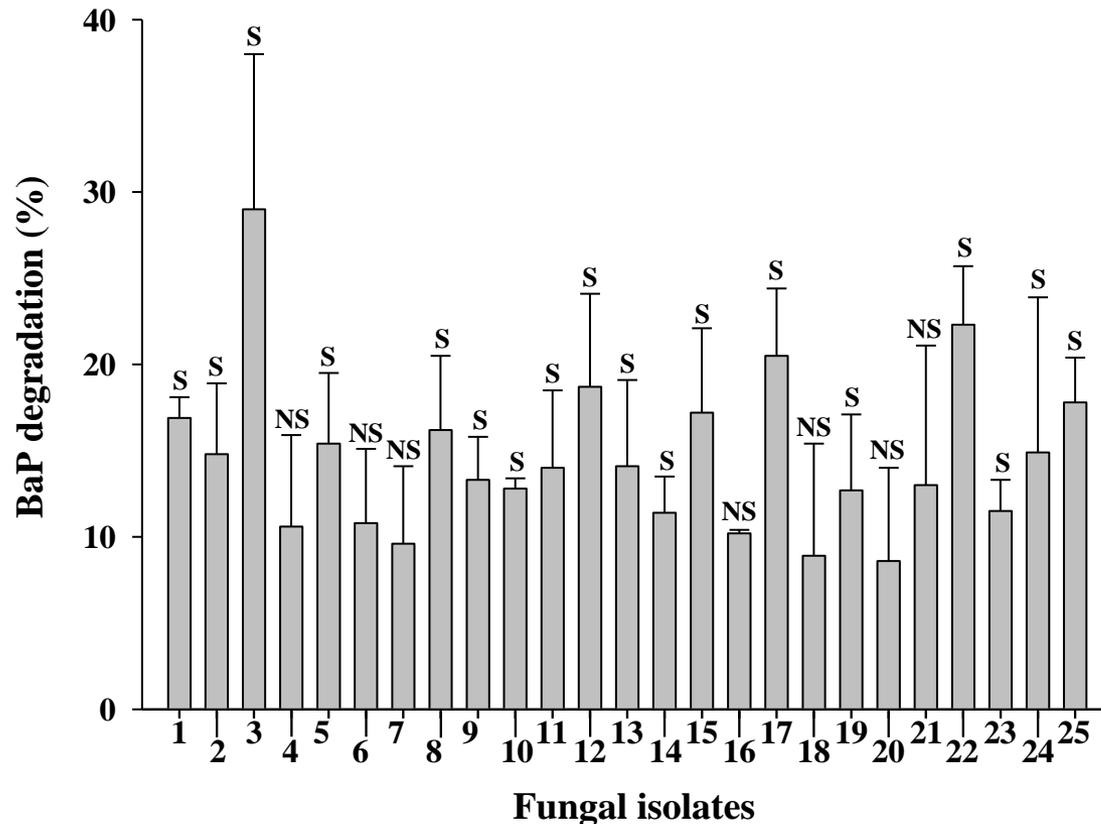


Genre espèce (quelques exemples)	Classification (source MycoBank 2015)
<i>Mortierella alpina</i>	<a href="#">Zygomycota</a> <a href="#">Mucoromycotina</a> , <a href="#">Mortierellales</a> , <a href="#">Mortierellaceae</a>
<i>Penicillium canescens</i>	<a href="#">Ascomycota</a> <a href="#">Pezizomycotina</a> , <a href="#">Eurotiomycetes</a> , <a href="#">Eurotiomycetidae</a> , <a href="#">Eurotiales</a> , <a href="#">Trichocomaceae</a>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<a href="#">Ascomycota</a> <a href="#">Pezizomycotina</a> , <a href="#">Dothideomycetes</a> , <a href="#">Dothideomycetidae</a> , <a href="#">Capnodiales</a> , <a href="#">Davidiellaceae</a>
<i>Haematonectria haematococca</i>	<a href="#">Ascomycota</a> <a href="#">Pezizomycotina</a> , <a href="#">Sordariomycetes</a> , <a href="#">Hypocreomycetidae</a> , <a href="#">Hypocreales</a> , <a href="#">Nectriaceae</a> , <a href="#">Haematonectria</a>
<i>Pseudallescheria</i> sp.	<a href="#">Ascomycota</a> <a href="#">Pezizomycotina</a> , <a href="#">Sordariomycetes</a> , <a href="#">Hypocreomycetidae</a> , <a href="#">Microascales</a> , <a href="#">Microascaceae</a>
<b><i>Fusarium solani</i></b>	<a href="#">Ascomycota</a> <a href="#">Pezizomycotina</a> , <a href="#">Sordariomycetes</a> , <a href="#">Hypocreomycetidae</a> , <a href="#">Hypocreales</a> , <a href="#">Nectriaceae</a>
<i>Davidiella allicina</i>	<a href="#">Ascomycota</a> <a href="#">Pezizomycotina</a> , <a href="#">Dothideomycetes</a> , <a href="#">Dothideomycetidae</a> , <a href="#">Capnodiales</a> , <a href="#">Mycosphaerellaceae</a>



-  Introduction
-  Démarche scientifique
-  Échantillonnage de sols historiquement contaminés
-  Isolement de champignons saprotrophes
-  **Dégradation du polluant en milieu minéral**
-  Etude des mécanismes impliqués dans la dégradation du polluant chez *Fusarium solani*
-  Dégradation des HAP en sols historiquement contaminés
-  Désorption des POP: Rôle de l'amidon
-  Perspectives R & D

# Dégradation du polluant en milieu minéral



Pourcentage de dégradation du benzo[a]pyrène après 7 jours d'incubation en milieu minéral par les différents isolats fongiques



Introduction



Démarche scientifique



Échantillonnage de sols historiquement contaminés



Isolement de champignons saprotrophes



Dégradation du polluant en milieu minéral



Etude des mécanismes impliqués dans la dégradation du polluant  
chez *Fusarium solani*



Dégradation des HAP en sols historiquement contaminés

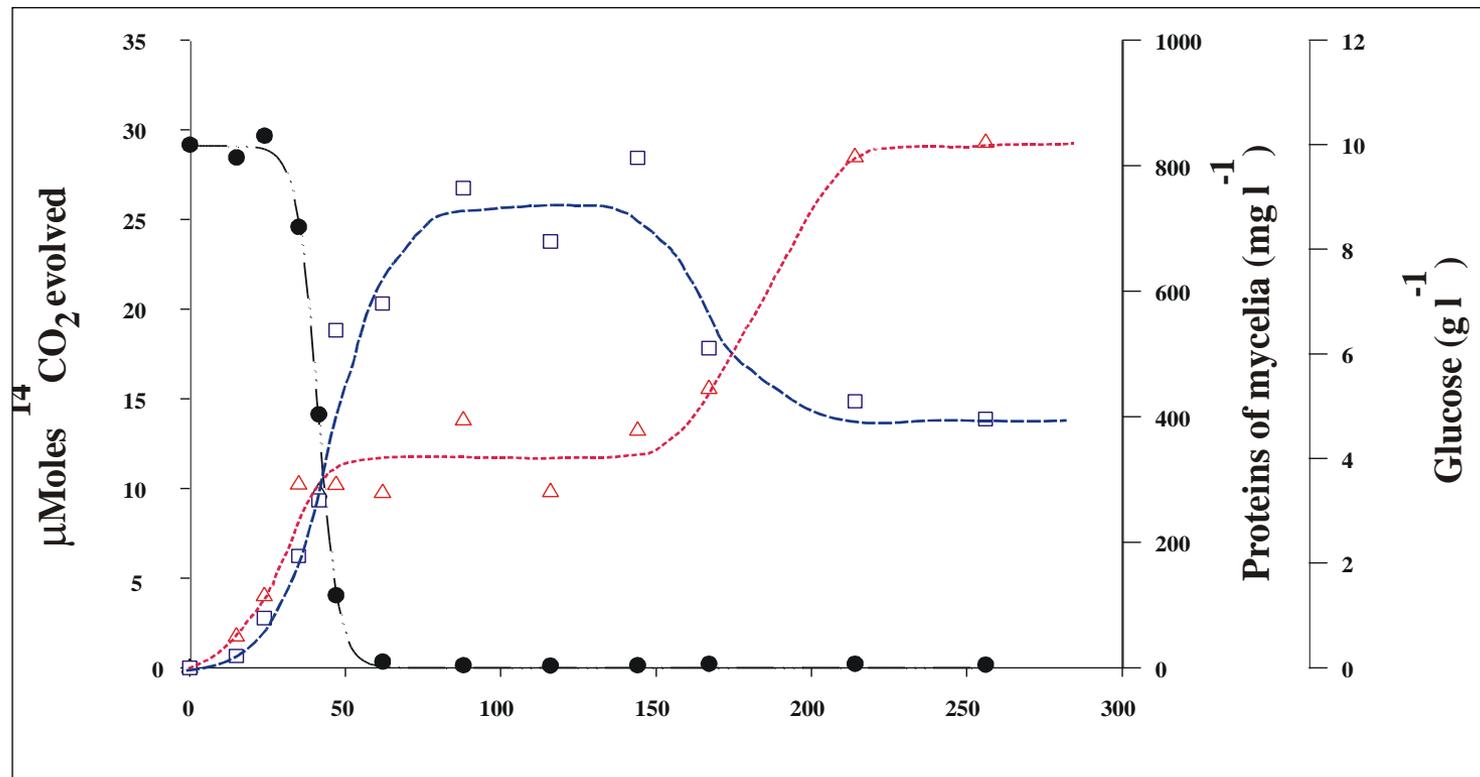


Désorption des POP: Rôle de l'amidon



Perspectives R & D

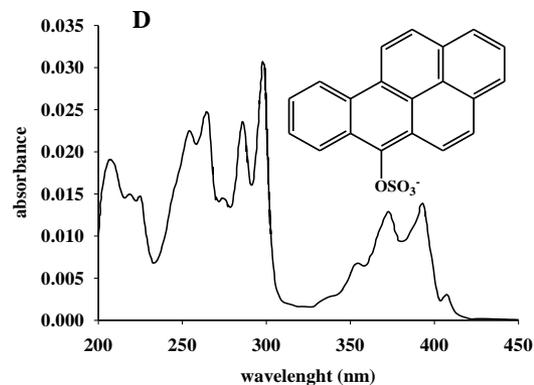
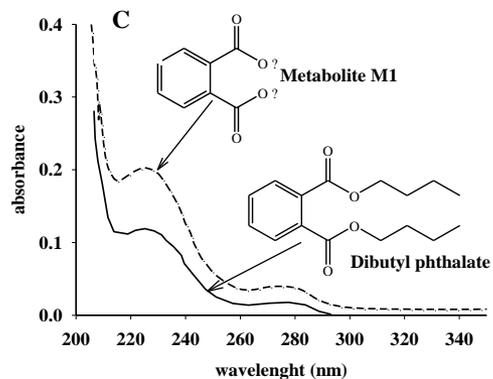
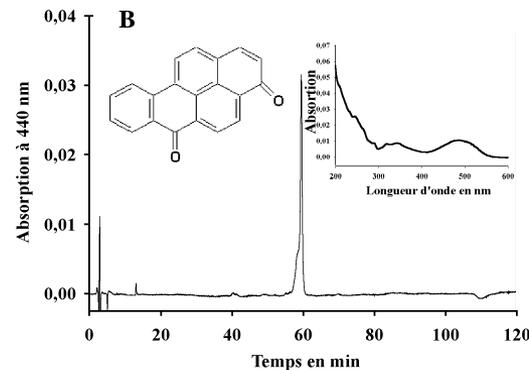
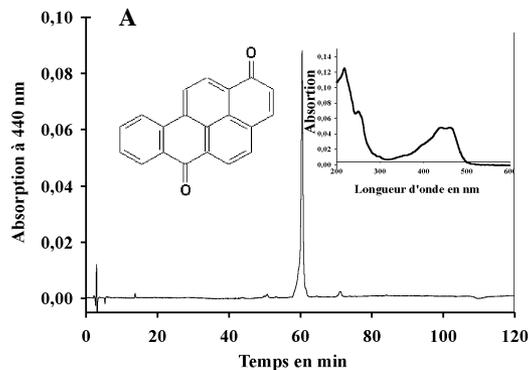
# Minéralisation du BaP par *Fusarium solani*



Cinétique de croissance de *F. solani* en batch réacteur en Milieu Minéral (MM)  
302 mg de [7,10-<sup>14</sup>C]benzo[a]pyrene

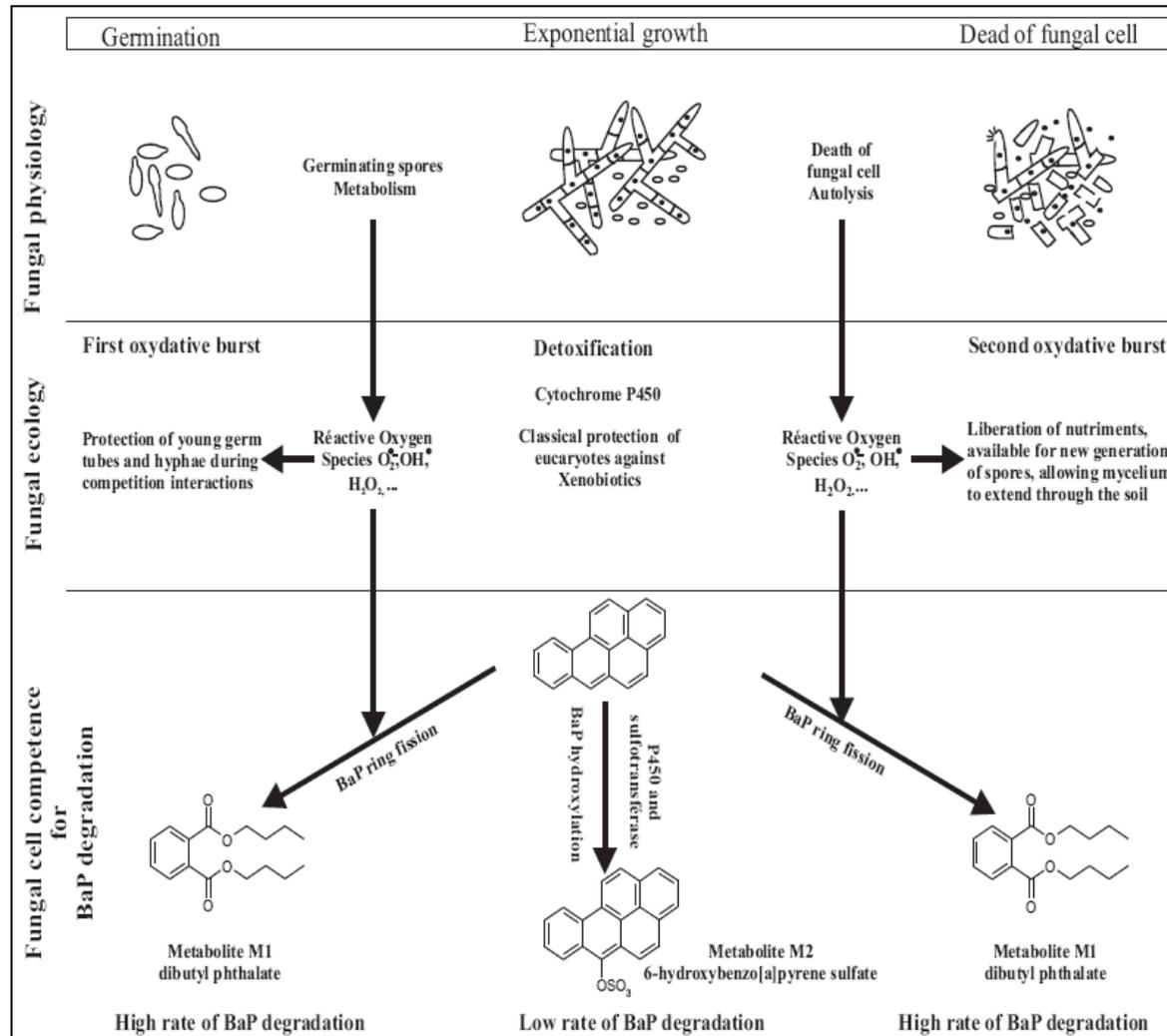
△ <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> dégagé □ protéines du mycélium ● concentration en glucose

# Identification des métabolites de dégradation du BaP par *Fusarium solani*



- A : 1,6-benzo[a]pyrene quinone, B : 3,6-benzo[a]pyrene quinone  
C : metabolite with UV spectrum similar with dibutylphthalate  
D : 6-hydroxybenzo[a]pyrene sulfate

# Relations: physiologie de *Fusarium solani*, écologie et compétences pour la dégradation du BaP



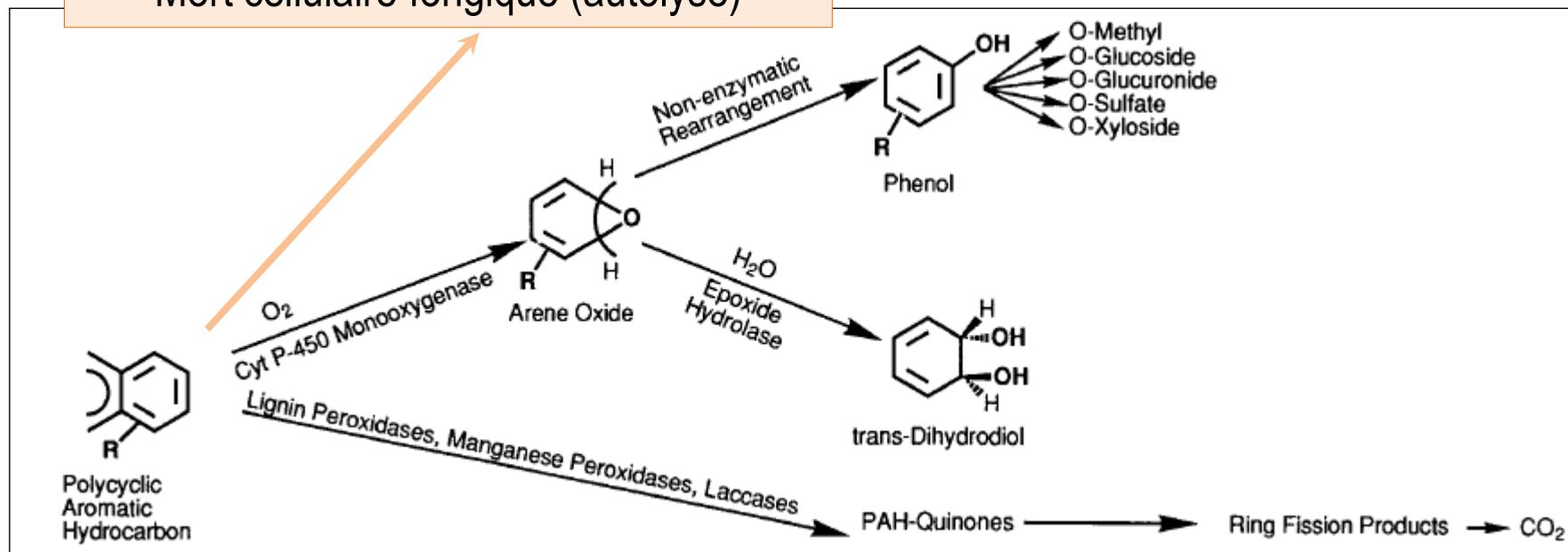
# Nouvelles voies métaboliques de dégradation du BaP par *Fusarium solani*



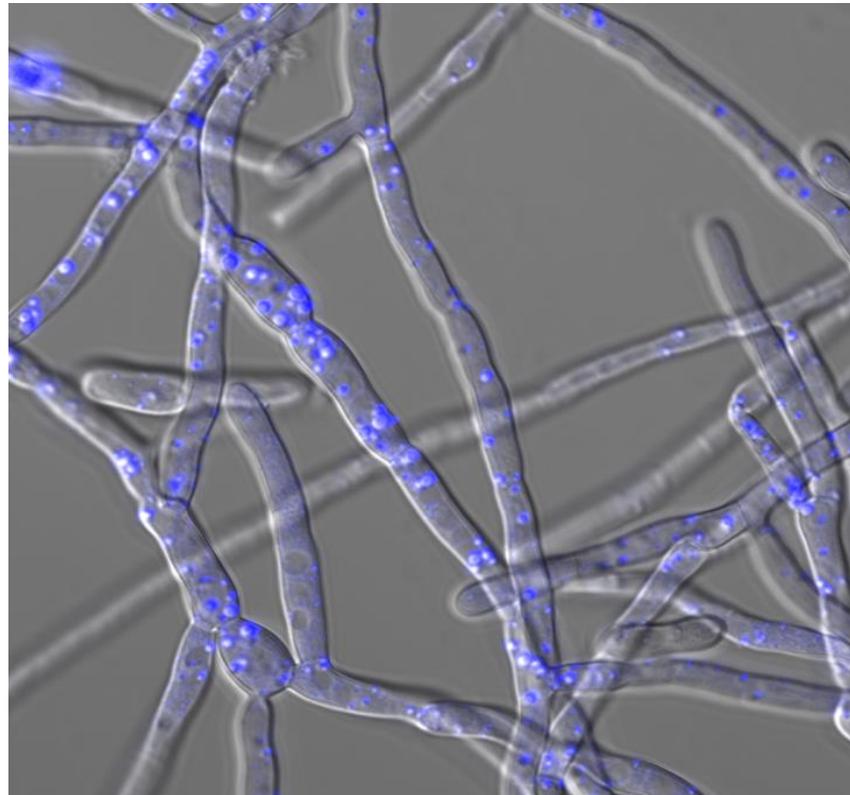
Compétence cellulaire

Enzymes? ROS ?

Production d'ERO  
lors de chocs oxydatifs:  
Germination  
Mort cellulaire fongique (autolyse)



# Incorporation et transport du BaP dans les hyphes



De nombreux champignons saprotrophes telluriques sont capables d'absorber des HAP. Cette photographie de microscopie montre l'incorporation du benzo(a)pyrene (fluorescence bleue), composé de cinq cycles benzéniques, dans les cellules fongiques de *Fusarium solani*.



Introduction



Démarche scientifique



Échantillonnage de sols historiquement contaminés



Isolement de champignons saprotrophes



Dégradation du polluant en milieu minéral



Etude des mécanismes impliqués dans la dégradation du polluant  
chez *Fusarium solani*



**Dégradation des HAP en sols historiquement contaminés**

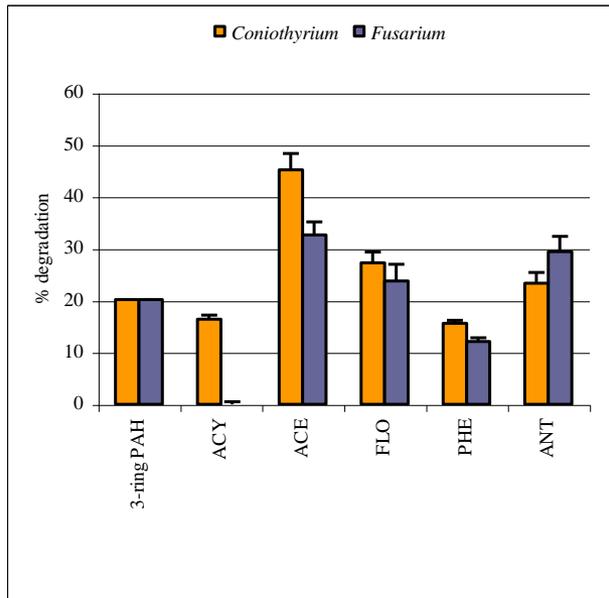


Désorption des POP: Rôle de l'amidon

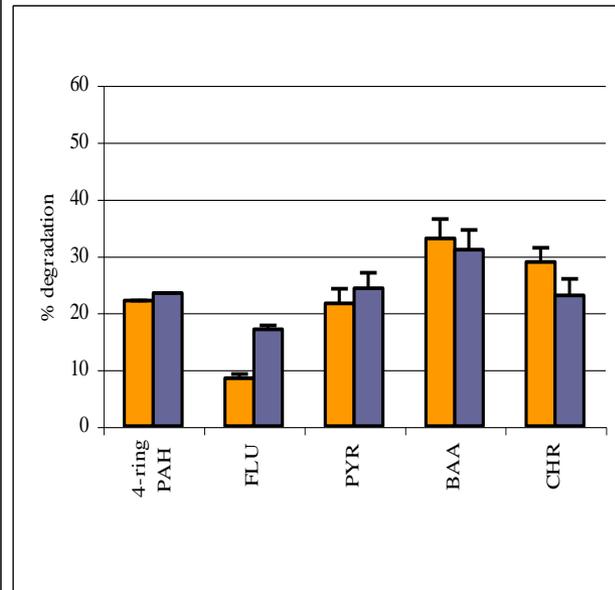


Perspectives R & D

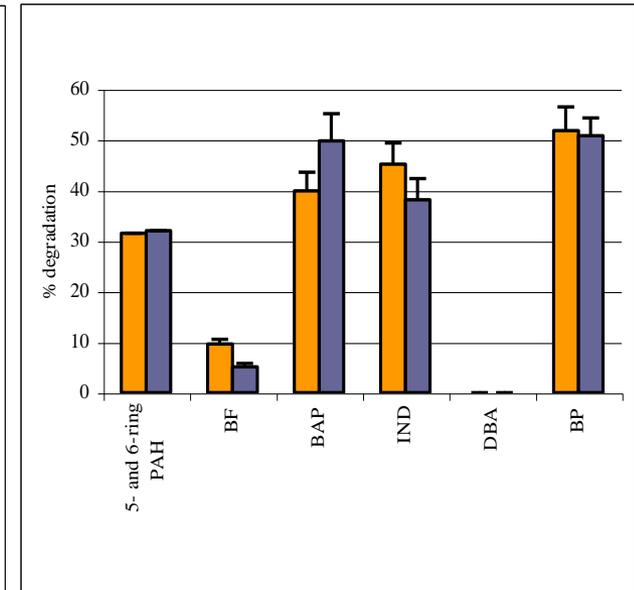
# Dégradation des HAP en sols historiquement contaminés



HAP 3 cycles : CI 49 mg/kg soil



HAP 4 cycles: CI 305 mg/kg soil



HAP 5-6 cycles : CI 438 mg/kg soil

- ✓ Concentration initiale totale CI: 794 mg /kg soil
- ✓ 30 jours d'incubation
- ✓ Inoculation: mycélium de *Coniothyrium* sp. (orange) et *Fusarium* sp. (blue)



Introduction



Démarche scientifique



Échantillonnage de sols historiquement contaminés



Isolement de champignons saprotrophes



Dégradation du polluant en milieu minéral



Etude des mécanismes impliqués dans la dégradation du polluant chez *Fusarium solani*



Dégradation des HAP en sols historiquement contaminés

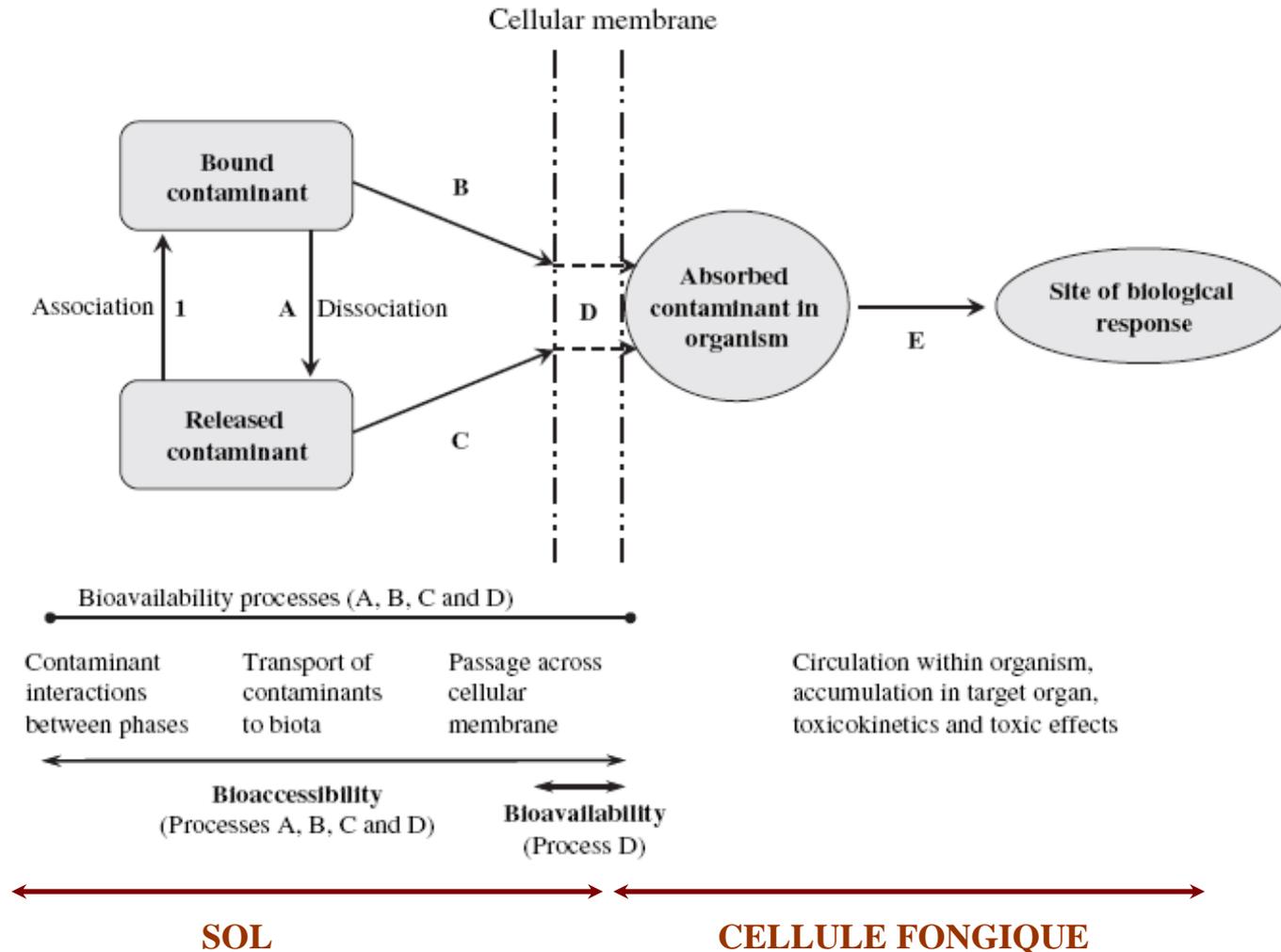


Désorption des POP: Rôle de l'amidon



Perspectives R & D

# Polysaccharides et solubilisation des polluants

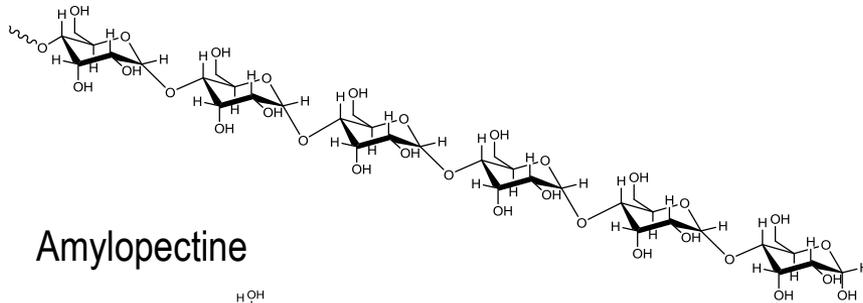


# Désorption des POP: Rôle de l'amidon

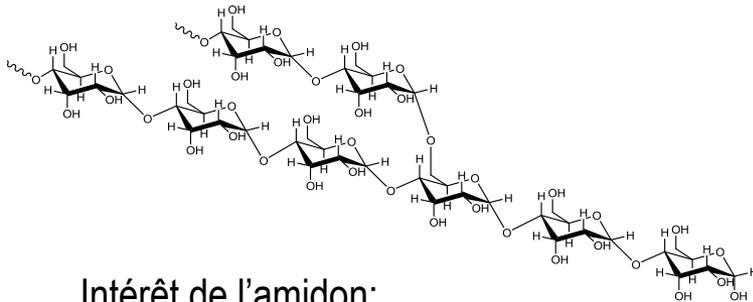


Deux homopolymères de D-glucose :

Amylose

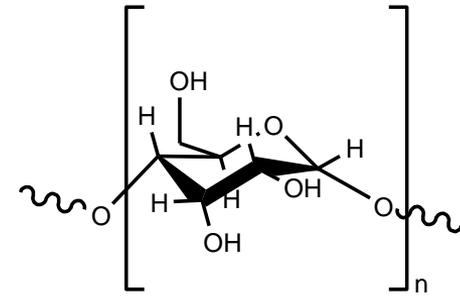


Amylopectine

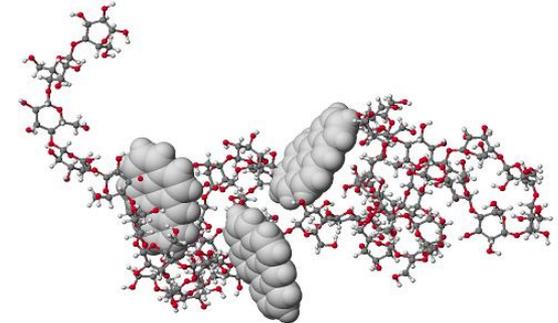
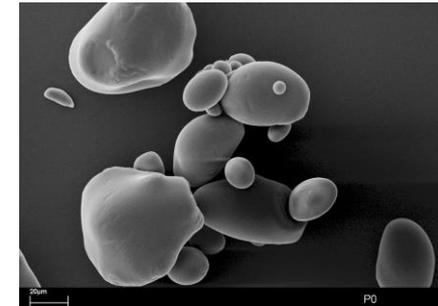


Intérêt de l'amidon:

- ✓ Abondant
- ✓ Issu de bioressources renouvelables
- ✓ Peu onéreux
- ✓ Biodégradable
- ✓ Bonne réactivité chimique



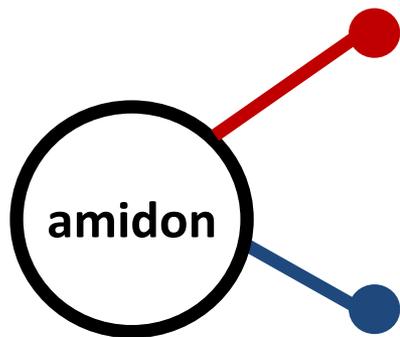
Représentation de l'unité d'anhydroglucose



# Désorption des POP: Rôle de l'amidon



# Synthèses et caractérisation d'amidons modifiés



Groupement alkyl → Stimuler la désorption des POP

Groupement chargé → Augmenter sa solubilité



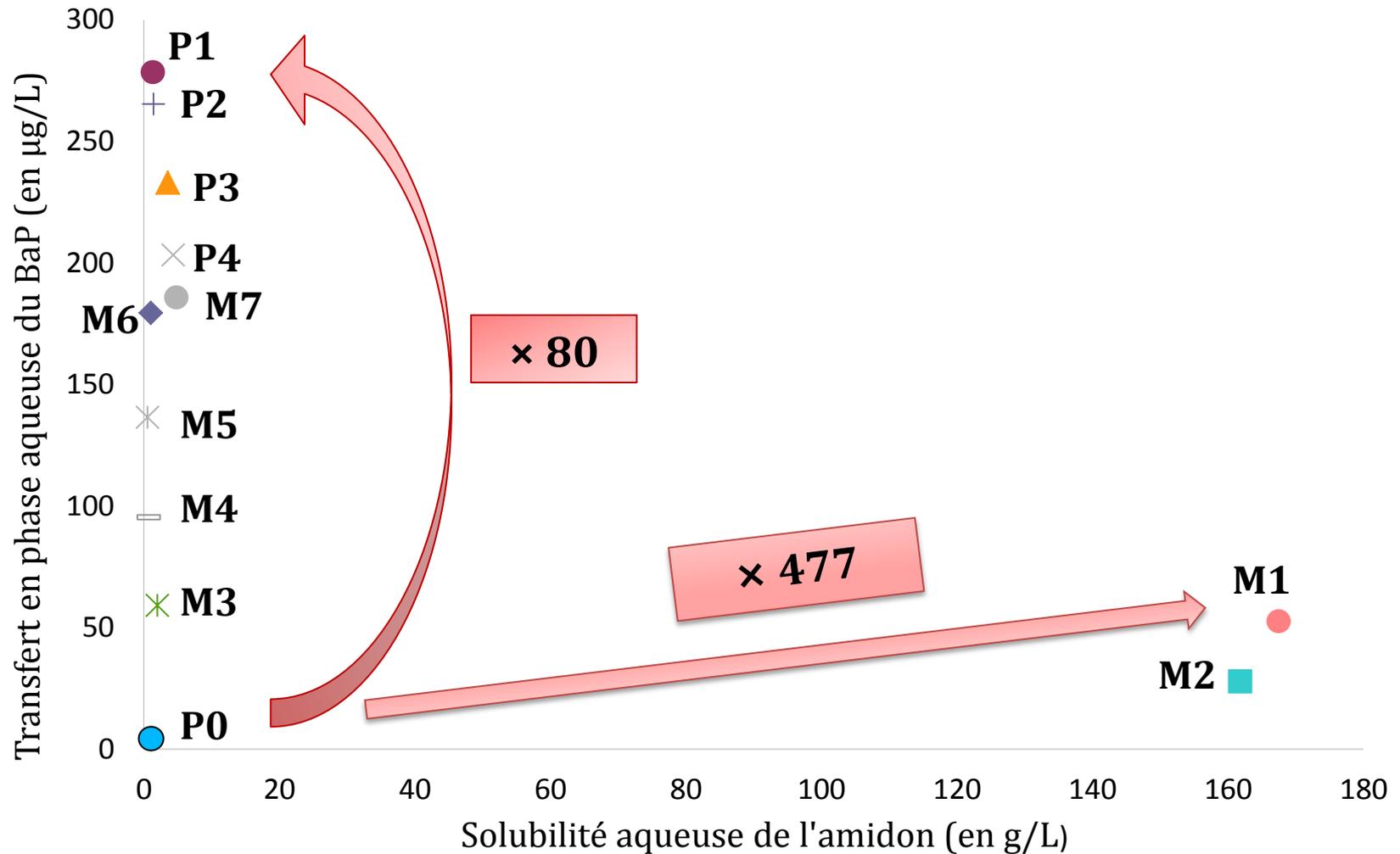
Caractérisation de la structure chimique

- Spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  + FTIR
- Microscopie photonique

Caractérisation des propriétés physico-chimiques

- Solubilité aqueuse
- Désorption du BaP par spectroscopie de fluorescence moléculaire

# Synthèses et caractérisation d'amidons modifiés





Introduction



Démarche scientifique



Échantillonnage de sols historiquement contaminés



Isolement de champignons saprotrophes



Dégradation du polluant en milieu minéral



Etude des mécanismes impliqués dans la dégradation du polluant chez *Fusarium solani*



Dégradation des HAP en sols historiquement contaminés



Désorption des POP: Rôle de l'amidon

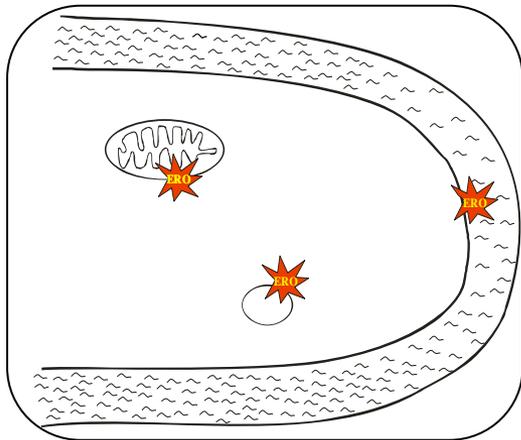


Perspectives R & D



- ✓ Couplage oxydation chimique versus oxydation biologique
- ✓ Augmentation progressive d'échelle et transfert technologique
- ✓ Transferts à d'autres polluants organiques, à d'autres écosystèmes (eaux, sédiments, autres matrices)
- ✓ Potentialités des micro-organismes pour des applications environnementales: meilleure connaissance de la diversité des champignons saprotrophes, de leurs fonctionnements et de leurs interactions avec les autres organismes dans des écosystèmes perturbés
- ✓ Réhabilitation des sites & sols pollués, reconquête des friches industrielles et urbaines dans un souci de diminution des risques pour la santé humaine et les écosystèmes, valorisation de matrices/matériaux/déchets contaminés
- ✓ R &D: Essor des écotechnologies et en particulier des biotechnologies fongiques

# Couplage oxydation biologique et chimique



## OXYDATION BIOLOGIQUE:

Production d'ERO lors de stress oxydatifs dans les cellules fongiques



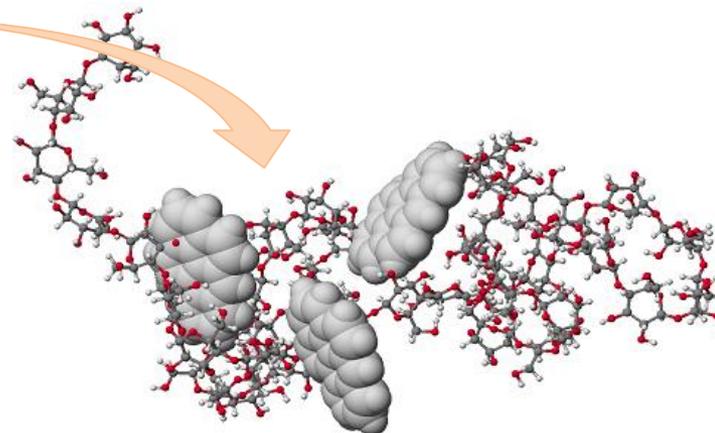
## OXYDATION CHIMIQUE:

Procédés d'oxydation avancée (AOP)

Réaction de Fenton



$\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe} = 1 \text{ à } 10$





## **DE LA BIODEGRADATION**

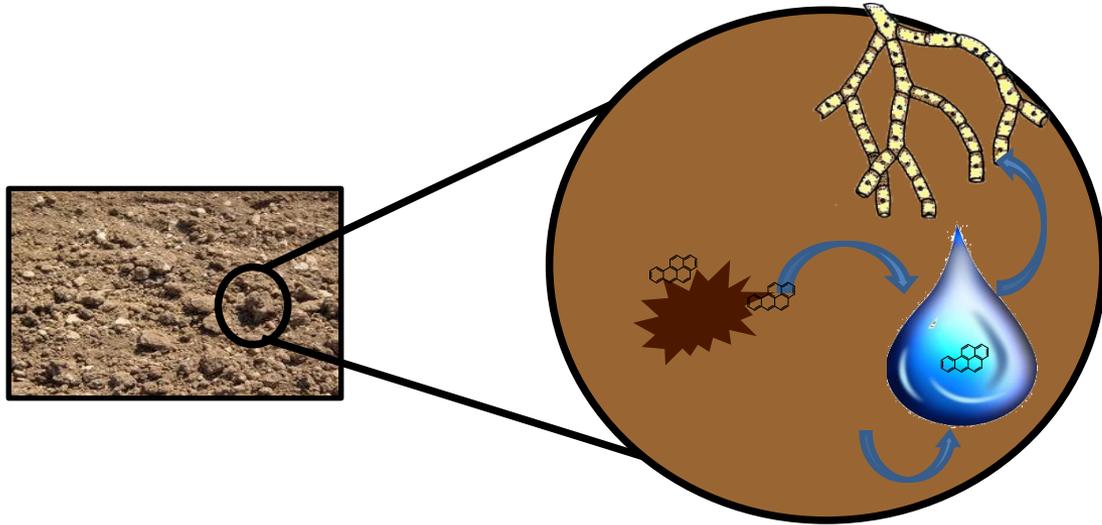
Phénomène naturel basé sur les capacités des micro-organismes à transformer partiellement ou totalement des molécules organiques complexes en métabolites, allant parfois jusqu'à la production de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>O (Minéralisation)

...

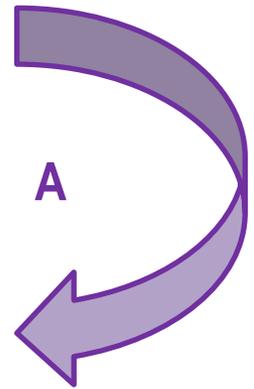
## **A LA BIOREMEDIATION**

Procédé biotechnologique.

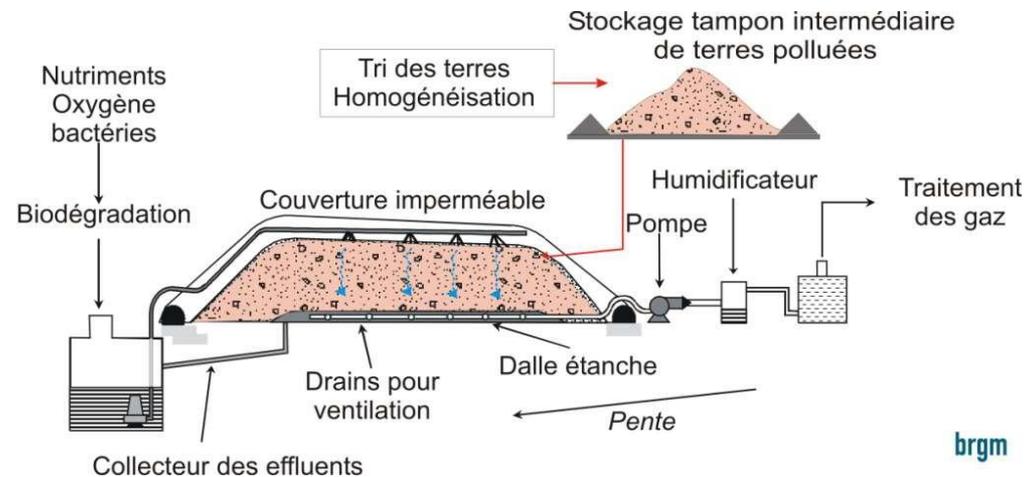
Utilisation intentionnelle de la diversité du métabolisme des microorganismes pour dégrader des substances polluantes



## 1. DU LABORATOIRE (microcosmes de sol)



## 2. L'ECHELLE 1:1 ex situ : biotertre, andains in situ



# Perspectives R & D



Nécessité d'une synergie entre les différents acteurs

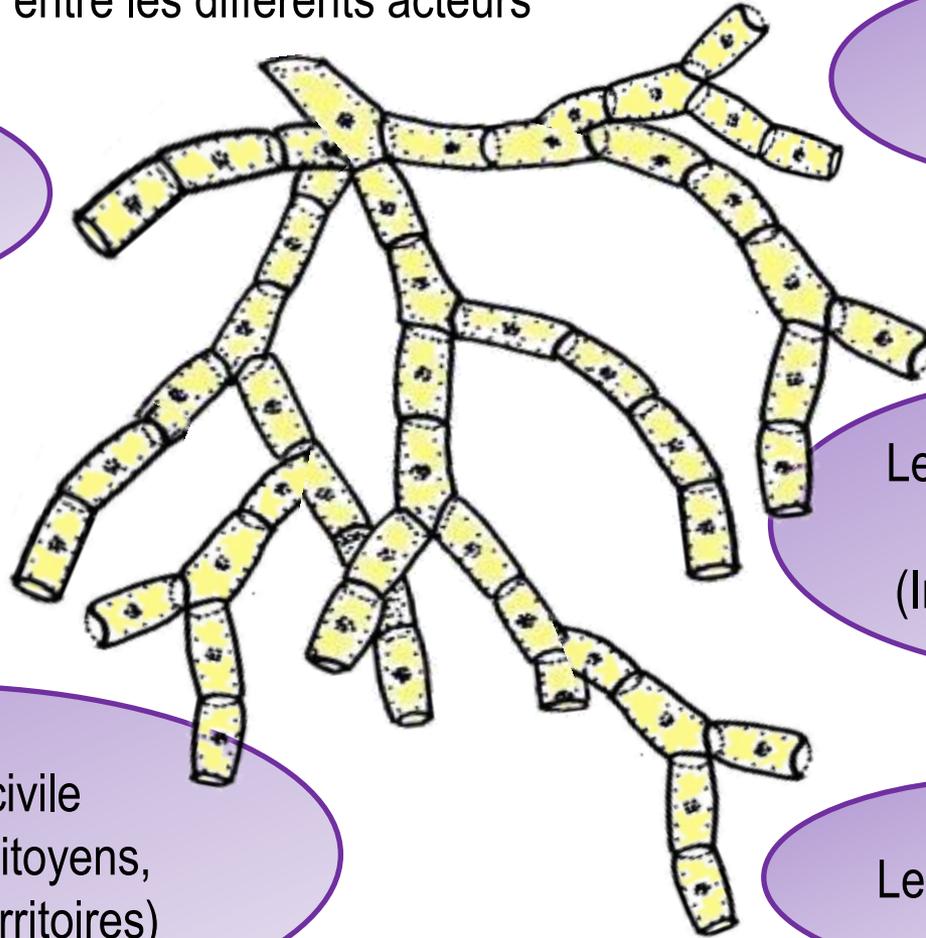
Les acteurs  
réglementaires

Les acteurs  
financiers

Les opérationnels de  
la réhabilitation  
(Ingénierie, travaux)

La société civile  
(Chercheurs, Citoyens,  
Collectivités, Territoires)

Les industriels



# Remerciements



Financiers

DAAD

PHC PROCOPE



Programme Eiffel



ADEME



Agence de l'Environnement  
et de la Maîtrise de l'Énergie



RÉGION  
Nord-Pas de Calais



P Ô L E  
MÉTROPOLITAIN  
DE LA CÔTE  
D'OPALE

Equipe IPCR  
UCEIV Dunkerque  
ULCO

Doctorants: I DELSARTE, A FAYEULLE,  
O POTIN, AM ROSU  
Collègue MCF ULCO: E VEIGNIE

Partenariats  
cotutelle

Pr JC Munch  
Pr G Surpateanu  
Pr G Brabie



HelmholtzZentrum münchen  
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

IBOE Soil Ecology

Accès aux sites  
expérimentaux



# Invitation à venir en région Nord-Pas de Calais ...



# Questions & réponses

QR



Merci aux partenaires premium

