HAL
open science

Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux

Anne Rondeau

To cite this version:

Anne Rondeau. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. Ecologie, Environnement. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10012 . tel-01266052

HAL Id: tel-01266052

https://theses.hal.science/tel-01266052

Submitted on 2 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 12 - 2013 Année 2013

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

pour l'obtention du

DIPLÔME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

École Doctorale : Évolution Écosystème Microbiologie Modélisation
Discipline : Biologie

soutenue publiquement le 1er février 2013

par :

Mlle Anne RONDEAU

COMPREHENSION DU FONCTIONNEMENT BIOLOGIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE D'UN BIOFILTRE VEGETALISE POUR LE TRAITEMENT DE POLLUANTS ATMOSPHERIQUES URBAINS GAZEUX

Directeur de thèse :
Mme Agnès RICHAUME–JOLION,
Professeur à l'Université de Lyon 1

JURY :

Mme Corinne FERRONATO	Maitre de Conférence, Université de Lyon 1	Examinatrice
M. Christian KENNES	Professeur, Université de la Corogne	Examinateur
M. Thierry LEBEAU	Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
M. Luc MALHAUTIER	Maitre de Conférence, Ecole des Mines d'Alès	Examinateur
Mme Agnès MANDON	Canevaflor®	Invitée
M. Vincent PLATEL	Maitre de Conférence, Université de Pau	Rapporteur
M. Franck POLY	Chargé de Recherche, Université de Lyon 1	Examinateur
Mme Agnès RICHAUME–JOLION	Professeur, Université de Lyon 1	Directrice de thèse
M. René ROHR	Professeur émérite, Université de Lyon 1	Président

Travaux menés dans le cadre d'une convention CIFRE : Canevaflor®, Tarare.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Secrétaire Général	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. PARROT
Département GEP	Directeur : M. N. SIAUVE
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : Mme S. FLECK
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. COLLIGNON Directeur : M. B. GUIDERDONI
Observatoire de Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Polytech Lyon	Directeur : M. G. PIGNAULT
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. C. VITON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. R. BERNARD
Institut Universitaire de Formation des Maîtres Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

© Tous droits réservés. Ce document, dans son contenu et dans sa forme, est strictement confidentiel. Il est la propriété de Canevaflor® pendant 3 ans à compter de la soutenance de la thèse. Toute utilisation, reproduction, modification, communication à un tiers ou représentation intégrale ou partielle du présent document, qui n'a pas été préalablement expressément autorisée par Canevaflor® est formellement interdite. Une telle utilisation, reproduction, modification, communication à un tiers ou représentation non autorisée, par quelque moyen que ce soit, constituerait une atteinte aux droits de Canevaflor® et une contrefaçon sanctionnée par la loi tant pénale que civile.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat*.

J'entends et j'oublie,
Je vois et je me souviens,
Je fais et je comprends.

Confucius.

REMERCIEMENTS

C'est avec un grand plaisir, et non sans une certaine émotion, que je rédige enfin ces quelques pages de remerciements ! Ils marquent un point final à cette expérience unique qu'est une thèse (et je pense sincèrement qu'il faut être passé par là pour comprendre tout le sens du mot « unique » dans cette phrase).

J'ai toujours préféré exprimer mes émotions sur le papier que par la parole mais, pour la première fois, cette feuille blanche me fait l'impression désagréable que mon vocabulaire ne sera jamais assez riche pour exprimer tout ce que cette incroyable aventure m'a apporté. Ces presque 4 ans ont certainement été les plus intenses de ma jeune (!!) existence !

Durant ces 47 mois de thèse, j'ai eu la chance de travailler dans 3 structures différentes ; une entreprise et 2 laboratoires de recherche (dont un ayant des objectifs de recherches très fondamentaux et le second plus appliqués). Cela m'a permis d'approcher leur fonctionnement, d'apprécier leurs différences et de rencontrer nombre de personnalités fantastiques, extravagantes, parfois insupportables ou simplement ordinaires mais qui ont toutes contribué à rendre cette thèse possible.

Tout d'abord, je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté de juger ce travail, notamment Monsieur le Professeur Christian Kennes, venu d'Espagne, et Monsieur le Professeur Émérite René Rohr, Président de jury. Je remercie particulièrement Monsieur Vincent Platel et Monsieur le Professeur Thierry Lebeau d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Ces travaux de thèse ont été réalisés grâce au financement de l'entreprise Canevaflor® dans le cadre d'une CIFRE. Je remercie Monsieur Pascal Peleszezak, Président Directeur Général, pour sa foi inébranlable en ce sujet de recherche et pour le soutien financier dont ont bénéficié ces travaux pendant toute la durée de la thèse. Je remercie également toute l'équipe Canevaflor®, notamment Marc Simöens, Directeur Général, pour avoir soutenu mon travail, ainsi que mes collaborateurs de « La Team de Mermoz » :

- L'équipe d'EXE : Brice, Fabien, JP, Rémi… La crise de nerf passée sur un chantier parisien nocturne me laisse finalement un souvenir pas si désagréable ! Même si la bière est beaucoup trop cher dans la capitale !! (j'en profite pour remercier au passage Anaïs Z, mon amie de 20 ans (ou presque !) pour son hospitalité les soirs de chantier parisien et pour ces agréables soirées passées en sa compagnie, elles sont beaucoup trop rares !! Merci aussi pour ton soutien téléphonique un fameux soir de craquage total à Alès, loin de ma 'vraie' vie…).
- Toujours en EXE : Merci à Dum. Mais surtout à mon petit Laurent !! Comment te remercier pour tout le temps passé, ces longues soirées studieuses (ou un peu moins), les pizzas, les bières et les petites réunion CP au Biwiz : inoubliables !! Sans dire que tu as également été là à Alès et après sur Perrache, tu as toujours été d'une grande aide et de très bons conseils : MERCI !
- À « l'administratif » : Les piliers Steph et Sandra, merci pour votre soutien à mes tout débuts chez Canevaflor®, j'en avais vraiment besoin !! Merci également à Sylvie pour sa joie de vivre et ses répliques excellentes. Merci à Monique pour sa bonne humeur permanente, sa patience et son efficacité !!

- L'équipe BE : merci à Christophe pour toutes ses fiches synthétiques et ses blagues de Belges. Un grand merci à Nico et Flo pour leur soutien tant professionnel que personnel !
- L'équipe R&D : Emilien, merci d'avoir essayé, c'était vraiment important pour moi ! Alexis, merci pour ta bonne humeur et ton énergie débordante !!
- Et un IMMENSE MERCI à ma Chef, Mademoiselle Agnès Mandon, Responsable Recherche & Développement, qui a suivi de près ce travail malgré la distance qui nous sépare depuis maintenant plus de deux ans. Tu as été un vrai pilier pour faire face à toutes les difficultés rencontrées, toujours là, toujours avec ce qu'il faut de recul, de conviction et d'humour : MERCI BEAUCOUP !!

Ces travaux de thèse ont été accueillis au sein du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université Claude Bernard Lyon 1 dont je remercie le directeur, Monsieur le Professeur Yvan Moenne-Loccoz.

Je remercie Monsieur Franck Poly, directeur de l'équipe « Groupes Fonctionnels Microbiens et Cycle de l'Azote », pour avoir suivi ces travaux, merci pour tes questions « pièges » toujours intéressantes et intéressées ! Merci à Madame le Professeur Agnès Richaume-Jolion pour avoir dirigé cette thèse en me laissant beaucoup d'autonomie. Merci pour les séjours à Perrache, pour les coups de main à Alès (perçage de bouchon et démontage de pilote) et pour les photos !

Je remercie également tous les membres de l'équipe et notamment Madame Nadine Guillaumaud pour son soutien technique. Merci aussi à Caro pour son aide !

Merci à Maxime pour nos discussions passionnantes et passionnées ! Merci à Amélie pour son soutien moral au cours de la longue dernière année. Merci aussi à Clément et Marie, bonne chance à vous les petits : le pire reste à venir !!

Je remercie Mademoiselle Anaïs Rancon, stagiaire M2, pour son aide, notamment lors de la campagne de prélèvement au CELP durant l'hiver 2010. Merci d'avoir bravé ton vertige sur l'échafaudage ! Merci aussi pour tous les « pump it up » et pour ta bonne humeur : bon courage pour la suite et fin de ta thèse, ce n'est pas le meilleur mais c'est le meilleur ! ;) Merci également à Monsieur Julien Guyonnet, stagiaire M1, pour son aide lors des expérimentations sur le site du CELP en avril 2012. Bon courage à toi aussi petit !! ☺

Parmi les membres du laboratoire, je tiens à remercier Mademoiselle Audrey Chosson, de la plateforme iBio, pour son aide pour l'analyse des données issues du pyroséquençage et Monsieur Thomas Pommier pour ses conseils.

Merci également à Monsieur Patrick Mavingui pour son aide concernant la qPCR 16S, ainsi que ses thésards : Vincent Raquin et Guillaume Minard.

Merci à Madame Geneviève Grundmann pour toutes nos discussions animées, nos pléiades de ralage bien méritées mais également pour son soutien et ses bons conseils !

Merci à Laëtitia mais également à Benjamin pour ses bons délires nécessaires à la pause café pour bien décocher avant de repartir pour un tour !

Je remercie également Madame Corinne Ferronato et Monsieur Ludovic Fine de l'IRCE Lyon pour les analyses des tubes adsorbants réalisées au CELP en avril 2012.

Les travaux sur l'unité pilote de biofiltration ont été accueillis au sein du Laboratoire Génie de l'Environnement et des risques Industriels de l'Ecole des Mines d'Alès, dont je

remercie le directeur, Monsieur le Professeur Miguel Lopez Ferber. Je le remercie également pour ses conseils et pour le regard extérieur mais vif qu'il a pu porter sur mon travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Louis Fanlo de m'avoir accueillie dans son équipe « Odeurs et COV ». Merci pour vos conseils tant pratiques que théoriques et pour votre analyse très appliquée des mes travaux. Je remercie Monsieur Luc Malhautier d'avoir encadré et suivi avec attention ces travaux. Merci surtout pour ton aide lors de la rédaction et de ta réactivité !

Je remercie également tous les membres de l'équipe, spécialement Jo pour son agréable compagnie lors de mes (très) nombreux passages par la machine à café disposée dans son bureau. Merci aussi à Janick pour sa patience malgré le bruit infernal provenant (très) souvent de « mon » bureau et pour son super plan « abricot » !! ☺ Merci également à Aurélie, Alexandre ainsi qu'à l'Esclave ! Merci à Véro pour la formation « champ des odeurs », ce fût un apprentissage intéressant et des moments de détente très agréables !

Merci à Monsieur Stéphane pour ses conseils et les heures passées sur mes « essais masse » sur le pilote mais également sur Perrache. Merci aussi pour tous les bons moments durant notre cohabitation dans notre grand bureau (et après !), ainsi que pour ton humour percutant, ne perdant jamais une occasion de relever une de mes actions de blonde !

Je tiens à remercier particulièrement Mademoiselle Marion Fages pour son soutien technique sur le pilote lors de mes absences à Alès. Merci aussi pour tous les points à la volée vers 13h36 et surtout pour ta bonne humeur et ton sourire permanent !!

Merci à Monsieur Paul Legrand pour son aide et ses conseils, spécialement lors de la mise au point du pilote.

Un GRAND et IMMENSE MERCI à Mademoiselle Sandrine Bayle qui a tant fait pour moi et pour ce travail ! Merci d'abord de m'avoir fait une petite place dans ton grand bureau avant de me le laisser pour moi toute seule ! ☺ Merci pour tous les points sur le pilote jusqu'à 20h le vendredi soir, quand je rentrais sur Lyon, et dès 7h30 le lundi matin, alors que je n'étais pas encore revenue. Merci aussi pour ton soutien moral, les mains dans les poches, pour toutes tes bonnes vannes de 42 et surtout pour ton aide et ta disponibilité ! Merci également pour toute la suite de mon départ d'Alès, lorsqu'a réellement commencé la période difficile : la rédaction. Tu as été un coatch extraordinaire qui ne m'a jamais lâchée. Même si tu ne pouvais pas ramer à coté de moi dans cette immense galère (quoique tu as bien donné quelques coups de rame sur la fin !!) tu as tenu le tamtam et imposé le rythme à suivre avec d'innombrable très bons conseils, un soutien sans faille et une disponibilité illimité : MERCI, MILLE FOIS MERCI !

Au niveau du laboratoire, je remercie également chaleureusement toute l'équipe du LGEI et de l'ISR pour leur accueil et leur si agréable accent chantant. Merci spécialement à Roro et Sylvie, Cathy et Dédé, et à Razvan !!

En définitive, au delà d'être une formation diplômante et une réelle expérience professionnelle, cette thèse a surtout été une grande aventure humaine. De nombreuses personnes ont contribué à rendre cette épreuve (car il s'agit bien d'une épreuve !) possible et supportable, voir même carrément agréable !

Parmi les bons souvenirs, je peux citer mon coloc Vince avec qui j'ai beaucoup appris sur les bières Belges et Ch'ti entre deux séances chez Moving ! Les nombreuses soirées « Blues Heures » entre bière et fous rires devant un billard pas très éclairé. Les quelques

soirées passées chez Razvan, au bord de la piscine où je fûs jetée toute habillée par surprise (après avoir été discrètement dépouillée de mes portables…). Les innombrables et excellentes soirées passées chez El Doc, encore simple Paul, et sa chérie Anaële avec ma chère coloc préférée Sandrine : rappelez vous juste d'un grand fou rire pris à cause d'un délire parti d'un string violet : tout est là ! Bon ok, j'ai aussi laissé quelques superbes répliques qu'il faudra taire à jamais maintenant que je suis Doc ! Je salue Plouch au passage !

Merci pour tout petite Poule, les mots me manquent mais je sais que tu sais ! Et comment tu dis déjà ? « Bonne continuation ! » :*

Merci également à ma Maman qui m'a (très) souvent offert le gîte et le couvert durant ma période de rédaction, merci pour les jus d'oranges pressées et les cafés partagés devant la cafetière à 3h du matin !

Enfin, un très tendre merci à mes 3A, mes trois Amours : ma femme Aurélie et nos deux adorables filles Aimy et Abygaelle. Merci d'avoir tout supporté de moi au cours de ces 4 années, et surtout mes absences et mon indisponibilité durant les 2 dernières. Merci pour vos venues à Alès, à St Privat puis à Clavière, lors des vacances scolaires ou des week-ends prolongés. Même si c'était pénible parfois (et même souvent), je crois que nous avons toutes les quatre de jolis souvenirs de cette période.

Titre

Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux

Mots clefs

Biofiltration, pollution atmosphérique, BTEX, NOx, biofiltre végétalisé, activité microbienne, diversité bactérienne

Résumé

En ville, les parcs de stationnement couverts représentent un milieu confiné dans lequel s'accumule une pollution importante et complexe. Ils constituent également une source de pollution pour leurs abords puisqu'aucune obligation de traitement n'est imposée sur la qualité de l'air rejeté dans l'atmosphère par les systèmes de ventilation.

Dans le cadre du traitement de l'air, l'utilisation d'un biofiltre végétalisé, faisant intervenir des bactéries et des plantes en association, constitue une solution innovante contribuant à l'amélioration de la qualité de l'air en ville en réduisant la dispersion de polluants gazeux dans l'atmosphère.

Dans un contexte de « recherche et développement », l'objectif est de comprendre le fonctionnement biologique et physico-chimique du biofiltre dans le but d'en améliorer la maitrise opérationnelle. Le caractère innovant de l'étude porte sur le traitement d'importants volumes d'air viciés contenant de faibles concentrations de polluants, tels que les NOx et les COV (de l'ordre de 100 à 200 µg/m^3), par un biofiltre planté d'épaisseur modeste.

L'utilisation d'une unité pilote de biofiltration a permis d'évaluer l'influence de la présence de plante, ainsi que la nécessité d'un apport d'engrais, sur les capacités d'épuration d'un tel système. Afin d'optimiser les volumes d'air traités tout en limitant l'empreinte au sol des biofiltres végétalisés, la vitesse de passage de l'air a été augmentée et l'épaisseur de garnissage réduite. Le rôle des bactéries indigènes a été caractérisé par une étude fonctionnelle des communautés bactériennes impliquées dans la dégradation des NOx et des TEX d'une part, et par une étude quantitative et qualitative de la communauté bactérienne totale, en utilisant des approches de biologie moléculaire, telles que l'amplification par PCR en temps réel et le pyroséquençage à partir de l'ADN métagénomique.

Les résultats ont montré des capacités d'abattement supérieures à 97% quelles que soient les conditions environnementales testées. Il paraît donc possible de traiter d'importants volumes d'air pollué par de faibles concentrations de TEX à travers un biofiltre végétalisé de faible épaisseur. La présence de plantes ne semble pas avoir d'impact à court terme sur les capacités d'épuration dès lors qu'un apport d'engrais favorise la disponibilité de l'azote dans le garnissage. L'évaluation du fonctionnement microbiologique global a permis de rendre compte du potentiel des communautés microbiennes impliquées dans la biodégradation des NOx et des TEX au sein du biofiltre végétalisé. Les communautés bactériennes indigènes du garnissage et de la motte sont capables de s'acclimater rapidement aux conditions de fonctionnement d'un tel système.

Laboratoire d'accueil :

Université Lyon, F-69622, Lyon, France ; Université Lyon 1, Villeurbanne ; CNRS, UMR5557, USC 1193 INRA, Laboratoire d'Ecologie Microbienne

Title

Understanding of biological and physico-chemical operation of planted biofilter for the treatment of urban gaseous pollutants

Keywords

Biofiltration, urban pollution, BTEX, NOx, planted biofilter, microbial activity, bacterial diversity

Abstract

In town, underground car parks are confined spaces in witch large and complex pollution are accumulated. They are also a source of contamination of the external environment since the treatment of the air pumped out by ventilation system sis not regulated.

In the framework of air treatment, using planted biofilter, combining bacteria and plants, is an innovative solution contributing to the improvement of urban air quality by reducing the dispersion of gaseous pollutants in the atmosphere.

In a « research and development » context, the objective is to understand the biological and physico-chemical operation for improving operational control. This innovative study focuses on the treatment of high volumes of air containing a low concentrations of pollutants, such as NOx, VOCs (about 100 à 200 $\mu g.m^{-3}$) through a thin planted biofilter.

The use of a pilot-scale unit of biofiltration allowed to evaluate the influence of the plant, as well as the necessity of a fertilization, on the removal efficiency of such a system. In order to maximize the volumes of treated air while limiting the footprint of the planted biofilters, the superficial gas velocity has been increased and the thickness of the packing material decreased. The indigenous bacteria have been characterized by a functional study of the bacterial communities involved in the degradation of NOx and TEX on one part, and by a quantitative and qualitative study of the total bacterial community on the other part, by using molecular biology approaches, such a real-time PCR amplification, and pyrosequencing from metagenomic DNA.

Results on pilot-scale unit have shown a removal efficiency greater than 97%, in all environmental conditions tested. Consequently, it seems possible to treat high volumes of air containing low concentrations of TEX through a thin planted biofilter. The presence of plants does not seem to have short-term impacts on the removal efficiency when a fertilizer promotes the nitrogen availability in the packing material. The evaluation of the global microbiological functioning showed the potential of microbial communities in the biodegradation of NOx and TEX in planted biofilters. The indigenous bacterial communities of the packing material and the mound of soil are rapidly able to adapt to the functioning conditions of such a system.

Lab

Université Lyon, F-69622, Lyon, France ; Université Lyon 1, Villeurbanne ; CNRS, UMR5557, USC 1193 INRA, Laboratoire d'Ecologie Microbienne

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES 5

LISTE DES TABLEAUX 9

LISTE DES ABREVIATIONS 11

INTRODUCTION GENERALE 15

CHAPITRE I. LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE URBAINE ET SON TRAITEMENT : UNE APPROCHE PLURIDISCIPLINAIRE 25

INTRODUCTION 28

1. LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE URBAINE 29

1.1. CARACTERISTIQUES DE LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE URBAINE 29

1.2. SOURCES 33

1.3. EFFETS DES COV ET NOX SUR L'ENVIRONNEMENT ET LA SANTE 36

1.4. REGLEMENTATION ET SURVEILLANCE 38

1.5. PROBLEMATIQUE DES PARCS DE STATIONNEMENT COUVERTS (PSC) 41

2. TRAITEMENT DE L'AIR 48

2.1. PROCEDES PHYSICO-CHIMIQUES 48

2.2. LES BIOPROCEDES DE TRAITEMENT DE L'AIR 53

2.3. PARAMETRES OPERATOIRES DE LA BIOFILTRATION 59

2.4. BIOFILTRE VEGETALISE 68

3. ACTEURS ET MECANISMES IMPLIQUES DANS LA BIODEGRADATION DES POLLUANTS CIBLES 73

3.1. BIODEGRADATION DES BTEX 73

3.2. BIODEGRADATION DES NOX : LA DENITRIFICATION 82

CONCLUSION 87

CHAPITRE II. TRAITEMENT DE L'AIR CONTENANT DE TRES FAIBLES CONCENTRATIONS DE TEX : INFLUENCE DE LA PRESENCE DE LA PLANTE ET DE L'APPORT D'ENGRAIS 89

INTRODUCTION 92

PARTIE 1. ARTICLE : "BIOPURIFICATION OF AIR CONTAINING A LOW CONCENTRATION OF TEX : COMPARISON OF REMOVAL EFFICIENCY USING PLANTED AND NON-PLANTED BIOFILTERS" 95

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

COMPLEMENTS DE DISCUSSION **101**

FAIBLES CONCENTRATIONS : PHENOMENES PHYSICO-CHIMIQUES VS BIODEGRADATION 101

SPATIALISATION DE LA DEGRADATION AU SEIN DU BIOFILTRE 105

PARTIE 2 : INFLUENCE DE L'APPORT D'ENGRAIS SUR LE FONCTIONNEMENT DU BIOFILTRE VEGETALISE **109**

1. INTRODUCTION **110**

2. MATERIEL ET METHODES **112**

2.1. SYSTEME EXPERIMENTAL PILOTE 112

2.2. PARAMETRES OPERATOIRES MESURES 114

2.3. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES 114

2.4. ANALYSES STATISTIQUES 115

3. RESULTATS **116**

3.1. PARAMETRES OPERATOIRES MESURES 116

3.2. FONCTIONNEMENT GLOBAL DES BIOREACTEURS 118

3.3. PERFORMANCES EPURATOIRES DETAILLEES 119

3.4. STRATIFICATION DES ACTIVITES MICROBIENNES 121

3.5. DEVELOPPEMENT DES PLANTES DANS LES BIOFILTRES VEGETALISES 125

4. DISCUSSION **126**

4.1. INFLUENCE DE L'HUMIDITE DU GARNISSAGE SUR LES PERFORMANCES EPURATOIRES 126

4.2. IRRIGATION ET PERTES DE CHARGE 128

4.3. INFLUENCE DE L'APPORT D'ENGRAIS SUR LES PERFORMANCES DES BIOFILTRES 130

4.4. INFLUENCE DE LA PRESENCE DE PLANTES SUR LES PERFORMANCES EPURATOIRES 131

CONCLUSION **133**

CHAPITRE III. INFLUENCE DU TEMPS DE RESIDENCE SUR LES PERFORMANCES DU BIOFILTRE VEGETALISE ET CARACTERISATION DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE INDIGENE **135**

1. INTRODUCTION **138**

2. MATERIELS ET METHODES **141**

2.1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL 141

2.2. PARAMETRES OPERATOIRES MESURES 142

2.3. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES : ETUDE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE TOTALE 143

3. RESULTATS 152

3.1. FONCTIONNEMENT DES REACTEURS ET CAPACITE D'ELIMINATION 152

3.2. PERFORMANCES EPURATOIRES DETAILLEES 153

3.3. STRATIFICATION DE L'ACTIVITE MICROBIENNE DE DEGRADATION DES TEX 156

3.4. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES : ETUDE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE TOTALE 158

4. DISCUSSION 172

4.1. PERFORMANCES EPURATOIRES ET CAPACITE D'ELIMINATION 172

4.2. INFLUENCE DE L'EBRT SUR LES PERFORMANCES EPURATOIRES 174

4.3. ETUDE DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE TOTALE 176

5. CONCLUSION 186

CHAPITRE IV. FONCTIONNEMENT DU BIOFILTRE VÉGÉTALISÉ EN CONDITIONS RÉELLES : ÉTUDE DU MUR VÉGÉTALISÉ BIOFILTRANT DU CELP 187

1. INTRODUCTION 190

2. MATERIELS ET METHODES 192

2.1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL *IN SITU* 192

2.2. PARAMETRES OPERATOIRES MESURES 195

2.3. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES 197

2.4. ANALYSES STATISTIQUES 201

3. RESULTATS 202

3.1. ETUDE DE LA MICROFLORE DU MUR VEGETALISE AVANT LA MISE EN ROUTE DE LA BIOFILTRATION ... 202

3.2. FONCTIONNEMENT DU MUR VEGETALISE BIOFILTRANT DU CELP 208

4. DISCUSSION 214

4.1. INFLUENCE DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES SUR LE FONCTIONNEMENT DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DU MUR VEGETALISE AVANT LA MISE EN ROUTE DE LA BIOFILTRATION 214

4.2. FONCTIONNEMENT DU MUR VEGETALISE BIOFILTRANT DU CELP 217

5. CONCLUSION 220

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 221

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 228

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE

Figure i.1. Evolution de l'indice de la pollution de l'air par polluant pour les stations de fond urbain en France métropolitaine entre 2000 et 2010 18

Figure i.2. Structuration de l'étude 21

CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE. LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE URBAINE ET SON TRAITEMENT : UNE APPROCHE PLURIDISCIPLINAIRE

Figure I.1. Structure chimique des BTEX 33

Figure I.2. Principales sources de pollution urbaine 33

Figure I.3. Evolution des émissions atmosphériques annuelles de NOx par secteur en France métropolitaine de 1960 à 2010 34

Figure I.4. Evolution des émissions atmosphériques annuelles de COVNM par secteur en France métropolitaine de 1988 à 2010 35

Figure I.5. Schéma de principe de l'effet de serre 36

Figure I.6. Concentrations de benzène et de toluène mesurées entre le 1er et le 8 mars 2011 dans le parking du Gros Cailloux à Lyon 4ème 46

Figure I.7. Faisabilité technico-économique des principaux procédés de traitement de l'air en fonction de la concentration et du débit de l'effluent à traiter 48

Figure I.8. Schéma de principe d'une tour de lavage 49

Figure I.9. Schéma de principe d'une tour d'adsorption 50

Figure I.10. Schéma de principe de la photocatalyse oxydative 52

Figure I.11. Schéma de principe des transferts de polluants et de métabolites de biodégradation entre les phases aqueuse et gazeuse dans les bioprocédés de traitement de l'air 54

Figure I.12. Schéma de principe d'un biolaveur 56

Figure I.13. Schéma de principe d'un filtre percolateur 57

Figure I.14. Schéma de principe d'un biofiltre 58

Figure I.15. Principaux mécanismes impliqués dans la phytoremédiation de l'air 69

Figure I.16. Principe de fonctionnement de trois types de biofiltres hydroponiques plantés utilisés pour le traitement de l'air intérieur d'habitat 70

Figure I.17. Principe de fonctionnement du biofiltre planté utilisé au cours de l'étude 71

Figure I.18. Schéma de principe des deux étapes de biodégradation des composés aromatiques par les microorganismes 73

Figure I.19. Principales voies aérobies de biodégradation des BTEX 75

Figure I.20. Principales voies anaérobies de biodégradation des BTEX 76

Figure I.21. Cinq voies périphériques de dégradation du toluène 78

Figure I.22. Les différentes étapes du processus de dénitrification 83

CHAPITRE II. TRAITEMENT DE L'AIR CONTENANT DE TRES FAIBLES CONCENTRATIONS DE TEX : INFLUENCE DE LA PRESENCE DE LA PLANTE ET DE L'APPORT D'ENGRAIS

Figue 1. Experimental setup of the laboratory-scale biofiltration system 97

Figure 2. Evolution of removal efficiency of the biofilters vs. time 98

Figure II.1. Description de l'installation pilote utilisée comportant six biofiltres avec engrais retard alimentés simultanément en TEX 112

Figure II.2. Evolution des pertes de charge en fonction du temps (jours). Et quantité d'eau apportée quotidiennement par biofiltre 116

Figure II.3. Efficacité d'élimination des TEX au cours du temps 118

Figure II.4. Efficacité d'élimination de chacun des TEX au cours du temps 120

Figure II.5. Profils longitudinaux d'élimination de TEX dans chaque biofiltre en fin d'expérimentation (jour 68) 121

Figure II.6. Activité potentielle de respiration exprimée en µg de carbone équivalent CO_2 par g de garnissage sec et par heure en fonction de la hauteur de biofiltre 122

Figure II.7. Activité potentielle de dénitrification exprimée en µg d'azote équivalent N_2O par g de garnissage sec et par heure en fonction de la hauteur de biofiltre 123

Figure II.8. Ratios de la DEA sur la SIR en fonction de la hauteur de biofiltre 124

CHAPITRE III. INFLUENCE DU TEMPS DE RESIDENCE SUR LES PERFORMANCES DU BIOFILTRE VEGETALISE ET CARACTERISATION DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE INDIGENE

Figure III.1. Description de l'installation pilote 141

Figure III.2. Schéma de principe du pyroséquençage 146

Figure III.3. Evolution de l'efficacité moyenne d'élimination globale des TEX pour les biofiltres comportant 40 cm de hauteur de garnissage et les biofiltres de 20 cm de hauteur 152

Figure III.4. Evolution de l'efficacité d'élimination de chaque composé pour les biofiltres comportant 40 cm de hauteur de garnissage 154

Figure III.5. Evolution de l'efficacité d'élimination de chaque composé pour les biofiltres comportant 20 cm de hauteur de garnissage 155

Figure III.6. Profils longitudinaux d'élimination de TEX dans chacun des biofiltres en fin de période stationnaire (jour 49) 157

Figure III.7. Nombre moyen de copies du gène *rrs* par g de garnissage sec (ou motte de terreau sèche) dans les biofiltres de 40 cm de hauteur de garnissage 159

Figure III.8. Nombre moyen de copies du gène *rrs* par g de garnissage sec (ou motte de terreau sèche) dans les biofiltres de 20 cm de hauteur de garnissage 160

Figure III.9. Corrélation entre l'activité de dégradation des TEX et la densité bactérienne 161

Figure III.10. Courbes de raréfaction moyennes basées sur l'indice de richesse estimée S_{chao1} 162

Figure III.11. Richesses observées en OTU des biofiltres de 40 cm de hauteur de garnissage et ceux de 20 cm 163

Figure III.12. Indices de Shannon des biofiltres de 40 cm de hauteur de garnissage et ceux de 20 cm 165

Figure III.13. Fréquences relatives moyennes des OTU affiliés aux 12 phylums les plus représentés pour chaque hauteur de biofiltre et pour les T_0 167

Figure III.14. Fréquences relatives des 4 classes de *Proteobacteria* détectées 168

Figure III.15. Fréquences relatives du phylum *TM7* dans les biofiltres de 40 cm de hauteur de garnissage et ceux de 20 cm 169

Figure III.16. Analyses en Coordonnées Principales de la diversité de la communauté bactérienne totale en termes de richesse et de structure 170

CHAPITRE IV. FONCTIONNEMENT DU BIOFILTRE VEGETALISE EN CONDITIONS REELLES : ETUDE DU MUR VEGETALISE BIOFILTRANT

Figure IV.1. Structure d'un mur végétalisé Canevaflor® combinant végétalisation intensive et extensive 192

Figure IV.2. Plan de plantation initial des 12 colonnes du mur végétalisé biofiltrant du CELP 193

Figure IV.3. Schéma de principe du fonctionnement du mur végétalisé biofiltrant 193

Figure IV.4. Photographies du mur végétalisé biofiltrant du CELP à la plantation en décembre 2007 (A) et après reprise des végétaux en mai 2008 (B) 194

Figure IV.5. Plan de masse du cylindre du CELP équipé du mur végétalisé biofiltrant 195

Figure IV.6. Photographie du cône de prélèvement positionné sur le mur végétalisé 196

Figure IV.7. Activité potentielle de respiration exprimée en µg de carbone équivalent CO_2 par g de garnissage sec et par heure en fonction de l'espèce végétale échantillonnée 202

Figure IV.8. Activité potentielle de dénitrification exprimée en µg d'azote équivalent N_2O par g de garnissage sec et par heure en fonction de l'espèce végétale échantillonnée 203

Figure IV.9. Ratios de la DEA sur la SIR en fonction de l'espèce végétale échantillonnée 204

Figure IV.10. Activité potentielle de respiration moyenne exprimée en µg de carbone équivalent CO_2 par g de garnissage sec et par heure sous les deux espèces végétales échantillonnées en fonction de la saison 205

Figure IV.11. Activité potentielle de dénitrification moyenne exprimée en µg d'azote équivalent N_2O par g de garnissage sec et par heure sous les deux espèces végétales échantillonnées en fonction de la saison 205

Figure IV.12. Ratios de la DEA sur la SIR sous les deux espèces végétales échantillonnées en fonction de la saison 206

Figure IV.13. Densité moyenne des bactéries capables de dégrader le NO_2 quantifiée par qPCR sur le gène *nirK* sous les deux espèces végétales échantillonnées en fonction de la saison 207

Figure IV.14. Densité moyenne des bactéries capables de dégrader le N_2O quantifiée par qPCR sur le gène *nosZ* sous les deux espèces végétales échantillonnées en fonction de la saison 208

Figure IV.15. Evolution de la concentration des BTEX dans l'air du parking du CELP entre le 17 et le 20 avril 2012 210

Figure IV.16. Evolution de la concentration en BTEX en sortie du mur végétalisé biofiltrant par rapport à l'air du parking du CELP entre le 17 et le 20 avril 2012 212

Figure IV.17. Concentrations moyennes des BTEX entre le 17 et le 20 avril 2012 dans l'air du parking du CELP 213

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE. LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE URBAINE ET SON TRAITEMENT : UNE APPROCHE PLURIDISCIPLINAIRE

Tableau I.1. Familles de polluants urbains 31

Tableau I.2. Normes de qualité de l'air et concentrations moyennes annuelles du benzène et du NO_2 40

Tableau I.3. Valeurs cibles et concentrations maximales mesurées pour les 5 polluants considérés comme les plus préoccupants dans les PSC 43

Tableau I.4. Liste des substances potentiellement d'intérêt pour la gestion des risques sanitaires dans les PSC 45

Tableau I.5. Performances, limites et coûts des différents types de procédés de traitement de l'air 53

Tableau I.6. Classification des bioprocédés de traitement de l'air 55

Tableau I.7. Formules et unités utilisées pour le calcul des paramètres caractérisant l'effluent gazeux à traiter 65

Tableau I.8. Principaux microorganismes connus pour dégrader les BTEX 77

Tableau I.9. Localisation des opérons portant les gènes impliqués dans les voies de dégradation périphériques du toluène, ainsi que le type d'enzyme mise en jeu chez quelques bactéries modèles 79

Tableau I.10. Voies centrales méta de dégradation des BTEX passant par le catéchol 80

Tableau I.11. Gènes impliqués dans les voies centrales méta de dégradation des BTEX, ainsi que le gène spécifique codant la C23O chez quelques bactéries modèles 81

Tableau I.12. Voies centrales ortho de dégradation des BTEX passant par le catéchol 82

CHAPITRE II. TRAITEMENT DE L'AIR CONTENANT DE TRES FAIBLES CONCENTRATIONS DE TEX : INFLUENCE DE LA PRESENCE DE LA PLANTE ET DE L'APPORT D'ENGRAIS

Table 1. Composition of the nutrient solution used for fertilization after day 78 98

Table 2. Substrate induced respiration mesured at the end of the biofiltration run 99

Table 3. Denitrification enzyme activity mesured at the end of the biofiltration run 99

Tableau II.1. Calcul des concentrations théoriques de TEX dans la phase aqueuse des biofiltres 104

Tableau II.2. Activité potentielle de respiration exprimée en µg de carbone équivalent CO_2 par g de garnissage sec et par heure pour chaque hauteur des différents biofiltres 106

Tableau II.3. Taux d'abattement moyen des TEX calculés en fin d'expérimentation aux hauteurs 20 cm et 40 cm (sortie) pour chacun des différents biofiltres 106

Tableau II.4. Taux d'humidité calculé par rapport au poids du garnissage sec pour chaque hauteur des différents biofiltres 107

Tableau II.5. Composition de l'engrais retard utilisé dans les six biofiltres 113

Tableau II.6. Taux d'humidité calculé par rapport au poids du garnissage sec en fonction de la hauteur de colonne des différents biofiltres 117

CHAPITRE III. INFLUENCE DU TEMPS DE RESIDENCE SUR LES PERFORMANCES DU BIOFILTRE VEGETALISE ET CARACTERISATION DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE INDIGENE

Tableau III.1. Conditions réactionnelles de la qPCR sur le gène *rrs* 145

Tableau III.2. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de la région V3-V4 de l'ADNr 16S 147

Tableau III.3. Capacité d'élimination moyenne des biofiltre de 40cm de hauteur de garnissage et des biofiltre de 20cm de hauteur 153

CHAPITRE IV. VERS LA CARACTERISATION DU FONCTIONNEMENT D'UN MUR VEGETALISE BIOFILTRANT EN CONDITIONS REELLES

Tableau IV.1. Résumé des différentes campagnes d'échantillonnage réalisées pour les analyses microbiologiques du mur végétalisé du CELP avant la mise en route de la biofiltration 198

Tableau IV.2. Séquences des amorces utilisées pour la qPCR ciblant les gènes *nirK* et *nosZ* 199

Tableau IV.3. Conditions réactionnelles des qPCR sur les gènes *nirK* et *nosZ* 200

Tableau IV.4. Programme d'amplification des qPCR sur les gènes *nirK* et *nosZ* 201

Tableau IV.5. Abondances relatives et richesse des familles de COV retrouvées dans le parking du CELP 209

Tableau IV.6. Nombre de composés éliminés par le mur végétalisé biofiltant et richesse de chaque famille de composés identifiée en entrée (parking) et en sortie du mur végétalisé biofiltrant 211

LISTE DES ABREVIATIONS

2D : deux dimensions

ADEME : Agence De l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADN sb : Acide DésoxyriboNucléique simple brin

ADNr : Acide DésoxyriboNucléique ribosomal

AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail. *Nouvelle dénomination depuis 2010 : ANSES (Agence Nationale de SÉcurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail)*

BDQA : Base de Données de la Qualité de l'Air

BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières

BTEX : Benzène, Toluène, Éthylbenzène et Xylène

C_o : Concentration des composés en sortie de réacteur

CELP : Centre d'Echange de Lyon Perrache

C : Taux de recouvrement (Coverage)

Caméra CCD : caméra Couple Charge Device

C_i : Concentration des composés en entrée de réacteur

CO : Monoxyde de carbone

CO_2 : Dioxyde de carbone

cm : centimètre

CMR : Cancérigène Mutagène Reprotoxique

C/N/P : Carbone/Azote/Phosphore

COPARLY : COmité pour le contrôle de la Pollution Atmosphérique dans le Rhône et la région Lyonnaise. *Nouvelle dénomination depuis 2010 : ATMO Rhône-Alpes*

COV(NM) : Composés Organiques Volatils (Non Méthaniques)

DEA : Denitrification Enzyme Activity

DGGE : Denaturating Gradient Gel Electrophoreses

$D_{Jaccard}$: Indice de Jaccard

$D_{(-)YC}$: coefficient de Yue et Clayton

EBRT : Empty Bed Residence Time (Temps de résidence théorique du gaz en fût vide)

EC : Capacité d'Elimination

EMA : Ecole des Mines d'Alès

EPA : Environmental Protection Agency

ERP : Etablissement Recevant du Public

Fasta : format de fichier électronique

FID : Détecteur à Ionisation de Flamme

GC : Chromatographie en phase Gazeuse

h : heure

H_2O : eau

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

$H_{shannon}$: indice de Shannon-Weaver

INERIS : Institut National de l'EnviRonnement Industriel et des RisqueS

INVS : Institut National de Veille Sanitaire

LCSQA : Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l'Air

LEM : Laboratoire d'Ecologie Microbienne

LNE : Laboratoire National de métrologie et d'Essais

LPA : Lyon Parc Auto

K : degré Kelvin

m : mètre

m^2 : mètre carré

m^3 : mètre cube

MEDDE : Ministère de d'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie

MEDDTL : Ministère de d'Ecologie, du Développement durable, des Transports et du Logement

N : nombre total de séquences par échantillon

n_1 : nombre d'OTU ne comportant qu'une seule séquence

n_2 : nombre d'OTU comportant seulement deux séquences

NGS : Next Generation Sequencing (Nouvelle génération de séquençage à haut débit)

n_i : nombre de séquence de l'OTU i

NO : Monoxyde d'azote

NO_2 : Dioxyde d'azote

NPK : Azote/Phosphore/Potassium

NOx : Oxydes d'azote

O_3 : Ozone

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pb: paire de bases

(q)PCR : Réaction en Chaine par Polymérase (quantitative)

PCR : Réaction en Chaine par Polymérase

PM : Particules fines

PM_{10} : Particules de diamètre inférieur à 10 µm

$PM_{2,5}$: Particules de diamètre inférieur à 2,5 µm

PCO : PhotoCatalyse Oxidative

PCoA : Analyse en Coordonnées Principale

PTP : PicoTiterPlate™

PSC : Parcs de Stationnement Couverts

Q : Débit du gaz dans le réacteur ($m^3.h^{-1}$)

QAI : Qualité de l'Air Intérieur

RE : Removal Efficiency

s : seconde

S_{chao1} : indice de richesse estimée (OTU)

SIR : Substrate Induced Respiration

S_{obs} : indice de richesse observée (nombre total d'OTU observé)

STEP : STation d'Epuration

SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism

TE : Toluène et Éthylbenzène

TEX : Toluène, Éthylbenzène et Xylène

TiO_2 : oxyde de titane

UMBBD : University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database

UV : Ultra-Violet

INTRODUCTION GENERALE

« Notre maison brûle et nous regardons ailleurs ». Cette phrase, prononcée lors du IVème Sommet de la Terre en 2002 par Monsieur Jacques Chirac, alors Président de la République française, illustre bien la prise de conscience tardive des problèmes liés à la pollution atmosphérique et au réchauffement climatique. Il est aujourd'hui admis que les activités humaines sont responsables de la pollution atmosphérique et ont pour conséquence un dérèglement climatique menaçant les équilibres écologiques des écosystèmes et la survie des êtres vivants s'y développant. Cette prise de conscience a suscité de nombreuses questions et l'émergence d'une volonté d'instaurer des pratiques plus respectueuses de l'environnement et de la santé. En France, la partie législative du Code de l'environnement a été approuvée en l'an 2000 et la Charte de l'environnement a été intégrée à la Constitution en 2005. En 2007, le Grenelle de l'environnement a fixé les premiers objectifs clairs et ambitieux visant à réduire la pollution atmosphérique, notamment en milieu urbain.

La pollution atmosphérique se traduit par l'émission et l'accumulation de molécules modifiant gravement la composition de l'air que nous respirons. Parmi les polluants les plus dangereux, les oxydes de carbone, les oxydes d'azote, l'ozone, les composés organiques volatils et les particules fines peuvent être cités. En milieu urbain, les sources de pollution sont multiples et souvent mobiles (véhicules à moteur). Les polluants, souvent très volatils, diffusent rapidement dans l'atmosphère. L'architecture des villes, composée de bâtiments plus ou moins hauts, de rues étroites ou d'artères très larges constituant des canyons urbains, favorise le déplacement ou la stagnation des polluants. Il en résulte des volumes d'air pollué considérables et des niveaux de pollution très disparates dans les différents îlots urbains (Alexandri et Jones, 2008 ; Mansha *et al.*, 2011).

La pollution atmosphérique urbaine est un problème préoccupant qui a des conséquences reconnues et dramatiques sur la santé humaine et sur l'environnement. Des études récentes ont montré qu'elle provoque une diminution de l'espérance de vie des citadins, notamment dans les grandes villes du monde qui sont aussi les plus polluées (Krewski, 2009 ; Eilstein, 2010 ; Anderson *et al.*, 2011 ; Parrish *et al.*, 2011). Il apparaît donc urgent de mettre en place des solutions de lutte efficaces contre cette pollution. Pour cela, deux types d'action peuvent être engagés.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat*.

Le premier est de réduire de façon drastique la production et les émissions de polluants urbains. Une politique ferme limitant la circulation automobile et favorisant les économies d'énergie, par exemple, a permis de diminuer ces émissions au cours des dernières années (figure i.1). Plusieurs directives européennes constituent la base juridique de ces réductions d'émissions polluantes et fixent les règles en matière d'évaluation et de gestion de la qualité de l'air ambiant (Directive n°1996/62/CE) ainsi que les valeurs limites de nombreux polluants, tels que les oxydes d'azote, les particules (Directive n°1999/30/CE), le benzène (Directive n° 2000/69/CE) et l'ozone (Directive n°2002/3/CE). Ces actes ont été rassemblés sous une directive unique en 2008 concernant la qualité de l'air ambiant et un air pur pour l'Europe (Directive n°2008/50/CE). Mais, au regard des niveaux de pollution actuels, ces mesures préventives semblent malheureusement insuffisantes pour enrayer un phénomène déjà très présent.

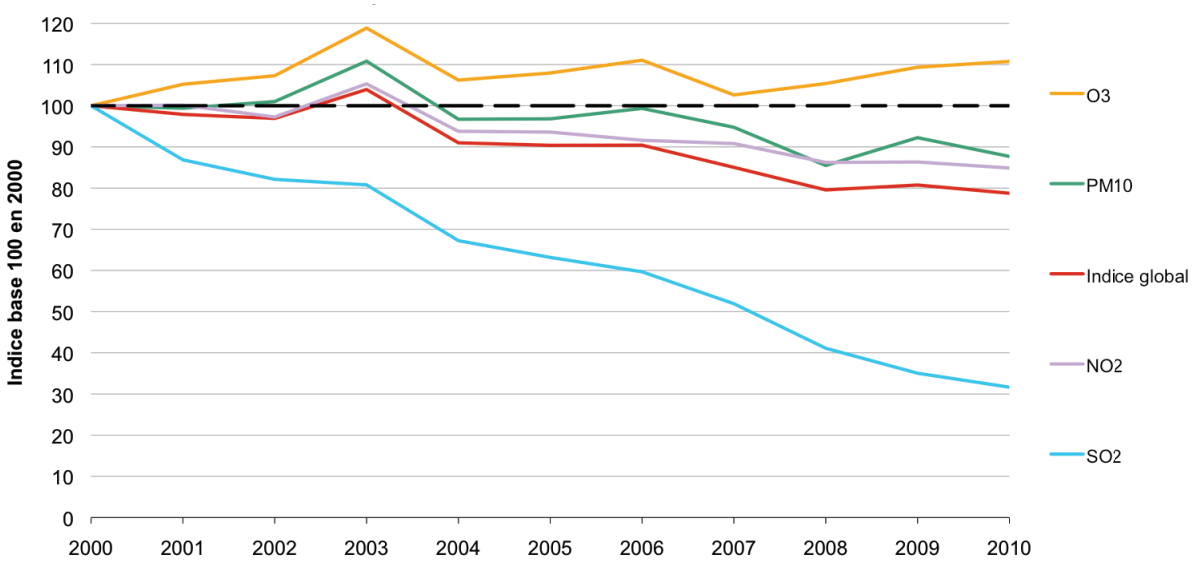


Figure i.1. Evolution de l'indice de la pollution de l'air par polluant pour les stations de fond urbain en France métropolitaine entre 2000 et 2010 (source : MEDDE, 2012 d'après les données BDQA, ADEME, 2011).

Le second type d'action envisageable est d'ordre curatif et vise à traiter la pollution. Cependant, le traitement de l'air urbain dans sa globalité n'est pas une solution réaliste. Les volumes d'air à traiter sont considérables, ils représentent plusieurs dizaines de milliards de mètres cube, et la pollution est trop diluée. Il paraît plus pragmatique de traiter cette pollution à partir de zones où elle est plus concentrée, par exemple au niveau des sources, comme cela se fait déjà au niveau de la pollution dite « industrielle »

(industrie pétrochimique, STEP, décharge, par exemple). En effet, les industriels, émetteurs réels ou potentiels de polluants atmosphériques, sont soumis à des normes de rejet concernant certains polluants par une réglementation spécifique selon le type d'activité.

Les espaces urbains confinés qui ne relèvent pas de l'habitat au sens large (domicile et bureau inclus), regroupent de nombreux lieux publics tels que les gares routières et ferroviaires, les réseaux de métro, les tunnels routiers et les parcs de stationnement couverts. Tous ces lieux concentrent une pollution liée au trafic qui est 10 à 100 fois supérieure à celle de l'atmosphère de la ville et dépasse très largement les valeurs guides proposées par l'OMS (OMS, 2006 ; INVS, 2012). La pollution rencontrée dans ces espaces confinés a des conséquences à deux niveaux. D'une part, elle est préoccupante pour la santé des travailleurs et des usagers. D'autre part, elle impacte nécessairement la qualité de l'air des alentours puisqu'elle diffuse inexorablement dans l'atmosphère sans qu'aucune réglementation n'encadre ces rejets. Il apparaît donc judicieux de développer des technologies capables de réduire la pollution intérieure de ces structures afin de limiter la diffusion de la pollution émise dans ces espaces vers l'extérieur.

Les Parcs de Stationnement Couverts (PSC) sont classés Etablissement Recevant du Public (ERP) depuis 2006. A ce titre, ils font l'objet d'une réglementation particulière, qui impose actuellement une ventilation mécanique et une surveillance partielle de la qualité de l'air concernant uniquement le monoxyde de carbone (CO) (Chapitre VI de l'Arrêté du 9 mai 2006). En revanche, il n'existe aucune obligation sur la qualité de l'air rejeté directement dans l'atmosphère par les systèmes de ventilation. La loi « Grenelle 2 » (2010) désigne comme objectif majeur la lutte contre la pollution de l'air. Elle intègre dans le Code de l'environnement la surveillance obligatoire de la qualité de l'air intérieur des ERP et devrait entrainer un durcissement de la règlementation dans les PSC (Article L125-5 du Code de l'environnement, modifié par la loi n°2008-788 du 12 juillet 2010).

Globalement, l'air des PSC est caractérisé par des volumes importants contenant des centaines de polluants à des concentrations relativement faibles (de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de $\mu g.m^{-3}$). Les composés majoritairement retrouvés sont les oxydes de carbone (CO et CO_2), les oxydes d'azote (NO et NO_2), les composés

organiques volatils (COV) et les particules fines (AFSSET, 2007). Parmi les COV, les Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylènes (BTEX) sont les plus connus.

Dans le cadre du traitement de l'air, les bioprocédés semblent être les plus adaptés aux volumes importants et aux concentrations en polluants relativement faibles, telles que celles rencontrées dans les PSC. Parmi ces procédés biologiques, la biofiltration est la technique la plus utilisée à l'échelle industrielle principalement en raison de sa simplicité de mise en œuvre et de ses faibles coûts d'investissement et de fonctionnement (Estrada *et al.,* 2012). Le principe de ce procédé repose sur l'utilisation d'un matériau support humide, permettant la croissance de microorganismes, au travers duquel le passage de l'air pollué est forcé. Ce procédé actif fait intervenir des mécanismes physico-chimiques de transfert des polluants de la phase gazeuse vers la phase aqueuse, et des processus biologiques liés à l'oxydation, complète ou partielle, des composés par les microorganismes qui les utilisent comme substrat ou source d'énergie. De nombreux paramètres influencent les performances épuratoires des biofiltres, tels que les éléments qui les composent, les paramètres physico-chimiques et les caractéristiques de l'effluent à traiter.

La biofiltration a été très largement utilisée pour le traitement d'odeurs et d'effluents industriels chargés en COV. Par contre, la biofiltration d'effluents contenant de très faibles concentrations en polluants a été peu étudiée et les rares recherches réalisées dans ce domaine ne portent que sur la problématique de l'air intérieur d'habitat (Ondarts *et al.*, 2012). Jusqu'à présent, aucune étude sur la biofiltration de l'air issu d'espaces urbains confinés, tel que les PSC, n'a été recensée.

Le procédé de biofiltration destiné au traitement de l'air d'espaces confinés nécessite une taille de réacteur conséquente ce qui implique une emprise au sol importante. L'espace foncier urbain disponible étant rare et cher, ce paramètre est particulièrement crucial lors de l'installation de biofiltre en ville. La diminution de la dimension des réacteurs (en surface et en épaisseur), sans pour autant diminuer les performances épuratoires, est donc un enjeu capital qui influe directement sur la viabilité économique de ce type de procédés. Dans cet objectif, l'augmentation des débits d'air traité est une solution envisageable qui a été peu étudiée.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat*.

Notre étude a consisté à évaluer les performances épuratoires d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de l'air issu de PSC, contenant de faibles concentrations de polluants, et le rôle des différents acteurs intervenant dans la dégradation de ces composés. Elle repose sur deux systèmes expérimentaux :

- un système expérimental pilote semi-industriel, fonctionnant dans des conditions réalistes et maîtrisées. Il intègre les contraintes techniques et économiques liées aux applications industrielles et tient compte des limites imposées par le travail en laboratoire.
- un biofiltre végétalisé de taille réelle sur site. Il s'agit d'un mur végétalisé installé fin 2007 sur une façade du Centre d'Echange de Lyon Perrache (CELP).

Le caractère innovant et pluridisciplinaire de cette étude a nécessité la collaboration de trois partenaires aux domaines de compétences complémentaires. La structuration de l'étude est schématisée dans la figure ci-dessous (figure i.2) :

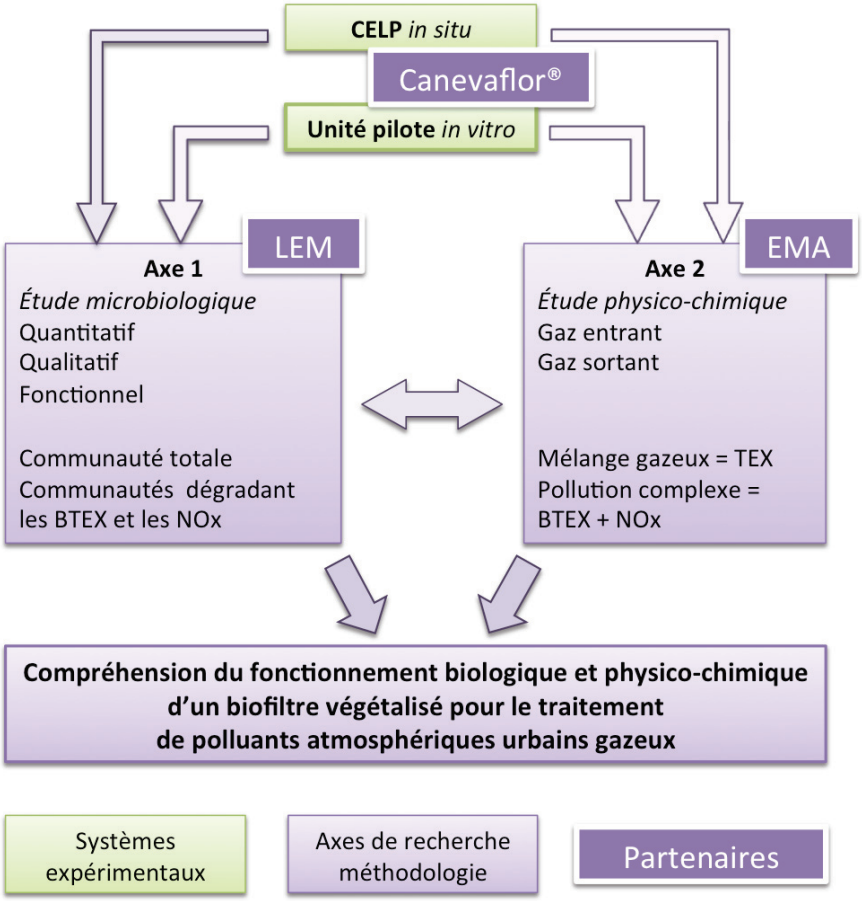


Figure i.2. Structuration de l'étude, basée sur l'utilisation de deux systèmes expérimentaux d'échelle complémentaire et déclinée en deux axes de recherches. Les partenaires impliqués dans la collaboration sont : La société Canevaflor®, le Laboratoire d'Ecologie Microbienne (LEM) et l'Ecole des Mines d'Alès (EMA)

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Ce travail a été financé par l'entreprise Canevaflor®, détentrice du brevet de la technologie (brevet n° FR-2968891, Peleszezak, 2010). Elle a bénéficié du soutien financier de l'ANRt (CIFRE n° 1241-2008) et d'Oséo. Elle a également apporté un soutien matériel, logistique et technique en mettant à disposition son savoir faire et le site expérimental *in situ* du CELP.

Au sein du Laboratoire d'Ecologie Microbienne (LEM), UMR 5557 CNRS – INRA, l'équipe « Groupes Fonctionnels Microbiens et Cycle de l'Azote » a apporté ses compétences en écologie, microbiologie environnementale et biologie moléculaire (axe 1 : « étude microbiologique »).

A l'Ecole des Mines d'Alès (EMA), l'équipe « Odeurs et COV » du Laboratoire Génie de l'Environnement et des Risques Industriels a accueilli la phase expérimentale sur l'unité pilote de biofiltration (axe 2 : « étude physico-chimique »). Elle a apporté ses compétences en génie des procédés et son expérience sur les bioprocédés.

Dans un contexte de recherche et développement, la compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique du biofiltre végétalisé est indispensable pour assurer sa maitrise opérationnelle. Cette étude présente plusieurs originalités :

- L'utilisation d'un biofiltre végétalisé dont les caractéristiques sont la présence de la plante, une épaisseur de garnissage modeste en comparaison des biofiltres classique et l'absence d'inoculation du garnissage,
- Le traitement de l'air issu de PSC, ce qui implique de faibles concentrations en polluants et des débits d'air très élevés,
- La caractérisation fonctionnelle de la communauté bactérienne impliquée dans la dégradation des NOx dans le biofiltre, basée sur des mesures d'activité potentielle de dénitrification,
- L'étude quantitative et qualitative de la communauté bactérienne totale du biofiltre par une approche moléculaire, basée sur l'utilisation de la PCR en temps réel et du pyroséquençage.

Les paramètres opératoires clefs, tels que la température, l'humidité du garnissage, les pertes de charge et l'apport d'engrais ont été suivis avec attention. L'irrigation et la fertilisation du garnissage ont été ajustées. L'influence de la présence de la plante a été

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat*.

évaluée dans différentes conditions d'amendement. L'influence du débit de l'effluent a été étudiée afin de déterminer les limites de fonctionnement du système.

Ce manuscrit est organisé de la façon suivante :

Le premier chapitre présentera une synthèse bibliographique qui a pour but de positionner le contexte de la pollution urbaine en décrivant ses sources et ses effets ainsi que l'état de la législation à son encontre. Un intérêt particulier sera porté aux polluants gazeux ciblés dans cette étude, les COV, dont les BTEX, et les NOx. De plus, les caractéristiques propres aux PSC seront détaillées. Dans une seconde partie, les procédés de traitement de l'air, plus spécifiquement la biofiltration, seront présentés. Les paramètres influençant les performances épuratoires de la biofiltration seront décrits ainsi que le principe de fonctionnement d'un biofiltre végétalisé. La dernière partie concernera les aspects biologiques de la dégradation des composés ciblés. Les microorganismes connus et les grandes voies métaboliques impliquées dans la biodégradation des BTEX et des NOx seront présentés.

Les trois chapitres suivants peuvent être regroupés selon deux phases expérimentales :

- Une première phase expérimentale ayant pour objet d'étude une unité pilote de biofiltration fonctionnant en conditions de laboratoire. Elle rassemble les chapitres II et III. Plusieurs paramètres opératoires clefs seront examinés afin de déterminer leur influence sur les performances épuratoires du biofiltre végétalisé.

Le deuxième chapitre s'articule en deux parties. Dans un premier temps, l'influence de la présence de la plante et la nécessité d'un apport d'engrais seront évaluées. Dans un second temps, l'irrigation et la fertilisation seront ajustées de façon à simplifier la mise en œuvre des biofiltres. La détermination du niveau de performances atteint ainsi que la stabilité de la capacité épuratoire dans le temps sont particulièrement importantes et seront mises en relief avec les faibles concentrations en polluants traitées. Une étude fonctionnelle des microorganismes permettra de rendre compte de l'activité de biodégradation des TEX (performances épuratoires), de la biomasse hétérotrophe totale (respiration) et du potentiel de dégradation des NOx (dénitrification) au sein des biofiltres végétalisés.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat*.

Dans l'objectif de réduire l'emprise au sol des biofiltres, l'augmentation des débits d'air traité ou la réduction de l'épaisseur du garnissage entraîne une diminution du temps de résidence des polluants dans le biofiltre. Ce paramètre ayant une influence importante sur les performances épuratoires, le troisième chapitre vise à déterminer les capacités limites du fonctionnement des biofiltres végétalisés. Par ailleurs, les biofiltres végétalisés ne sont pas inoculés et leur fonctionnement repose sur le développement des microorganismes indigènes du garnissage et de la motte de terreau. Afin d'appréhender les conséquences des conditions de fonctionnement sur l'abondance et la diversité des microorganismes dans les biofiltres, une étude quantitative et qualitative de la communauté bactérienne totale sera réalisée selon une approche moléculaire à partir de l'ADN métagénomique. La quantification des bactéries sera effectuée par PCR en temps réel. L'analyse de la diversité sera réalisée par la technique de pyroséquençage à partir de la communauté bactérienne totale.

- La seconde phase expérimentale correspond à la mise en place et au suivi d'un mur végétalisé biofiltrant d'échelle réelle sur site (CELP). Dans ces conditions, de nombreux paramètres tels que la complexité de l'effluent gazeux, les conditions climatiques et le couvert végétal peuvent influencer les performances épuratoires. Ce dispositif permettra de réaliser une caractérisation microbiologique du biofiltre au cours du temps, des saisons et en fonction des espèces végétales avant la mise en route de la biofiltration. Puis, une première évaluation des performances épuratoires sera effectuée par une analyse qualitative et quantitative des composés de l'effluent gazeux en amont et en aval du biofiltre. Les résultats obtenus feront l'objet du quatrième et dernier chapitre.

Enfin, la conclusion générale rappellera les principaux résultats obtenus permettant d'apporter les éléments nécessaires à une meilleure compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique du biofiltre végétalisé. Les pistes permettant d'améliorer la maitrise opérationnelle de ce nouveau procédé et les perspectives soulevées par ce travail seront également présentées.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat*.

CHAPITRE I. LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE URBAINE ET SON TRAITEMENT : UNE APPROCHE PLURIDISCIPLINAIRE

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat*.

INTRODUCTION **28**

1. LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE URBAINE **29**

1.1. CARACTERISTIQUES DE LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE URBAINE 29

1.1.1. Définition *29*

1.1.2. Composition de l'air urbains *30*

1.1.2.1. Oxydes d'azote (NOx) 31

1.1.2.2. Composés Organiques Volatils (COV) 32

1.2. SOURCES 33

1.2.1. NOx *34*

1.2.2. COV *35*

1.3. EFFETS DES COV ET NOX SUR L'ENVIRONNEMENT ET LA SANTE 36

1.3.1. Effets sur l'environnement *36*

1.3.2. Effets sur la santé *37*

1.3.1.1. NOx 37

1.3.1.2. BTEX 38

1.4. REGLEMENTATION ET SURVEILLANCE 38

1.4.1. Réglementation *38*

1.4.2. Surveillance *40*

1.5. PROBLEMATIQUE DES PARCS DE STATIONNEMENT COUVERTS (PSC) 41

1.5.1. Réglementation des PSC en France *41*

1.5.2. Recommandation et Valeurs guides *42*

1.5.3. Qualité de l'air dans les PSC en France *43*

2. TRAITEMENT DE L'AIR **48**

2.1. PROCEDES PHYSICO-CHIMIQUES 48

2.1.1. Absorption *48*

2.1.2. Adsorption *50*

2.1.3. Photocatalyse oxydative (PCO) *51*

2.2. LES BIOPROCEDES DE TRAITEMENT DE L'AIR 53

2.2.1. Biolaveur *55*

2.2.2. Les filtres percolateurs *56*

2.2.3. Les biofiltres *57*

2.3. PARAMETRES OPERATOIRES DE LA BIOFILTRATION 59

2.3.1. Compartiments du biofiltre *59*

2.3.1.1. Composition du matériau de garnissage 59

2.3.1.2. Microorganismes et inoculation 60

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

2.3.2. Paramètres physico-chimiques *62*
2.3.2.1. Température 62
2.3.2.2. Humidité relative 63
2.3.2.3. pH 64
2.3.3. Caractéristiques de l'effluent gazeux *65*
2.3.3.1. Débit, vitesse de passage et temps de résidence théorique du gaz 65
2.3.3.2. Qualité de l'effluent : cas des mélanges de polluants 66
2.3.3.3. Concentration de l'effluent : cas des faibles concentrations 67
2.4. BIOFILTRE VEGETALISE 68
2.4.1. Utilisation des plantes *68*
2.4.2. Filtre botanique et biofiltre végétalisé *69*

3. ACTEURS ET MECANISMES IMPLIQUES DANS LA BIODEGRADATION DES POLLUANTS CIBLES 73
3.1. BIODEGRADATION DES BTEX 73
3.1.1. Mécanismes et voies de biodégradation des BTEX *73*
3.1.2. Microorganismes impliqués dans la dégradation des BTEX *76*
3.1.3. Enzymes et gènes impliqués *77*
3.1.3.1. Voies périphériques : exemple du toluène 78
3.1.3.2. Voies centrales 79
3.2. BIODEGRADATION DES NOX : LA DENITRIFICATION 82
3.2.1. Mécanismes de la dénitrification *82*
3.2.2. Les bactéries dénitrifiantes *83*
3.2.3. Enzymes et gènes impliqués *84*

CONCLUSION 87

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Introduction

La compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de l'air urbain fait appel à des notions relevant de domaines scientifiques différents. En effet, des connaissances en matière de chimie atmosphérique urbaine, de législation, de génie des procédés et d'écologie microbienne ont été nécessaires pour mener à bien l'étude présentée dans ce manuscrit. Cette synthèse bibliographique a donc pour but de positionner le contexte particulier et pluridisciplinaire de l'étude.

Dans un premier temps, il est indispensable de définir ce qu'est la pollution atmosphérique urbaine. Quelles sont ses sources et sa composition ? Quels sont ses effets sur la santé et l'environnement ? Comment sont encadrées ses émissions d'un point de vue législatif et règlementaire ? Les réponses concernant les polluants gazeux qui seront décrites portent sur les oxydes d'azotes (NOx) et les Composés Organiques Volatils (COV), en particulier les BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylènes). Les spécificités des parcs de stationnement couverts, en termes de pollution et de réglementation seront spécifiquement détaillées.

Dans le cadre du traitement de l'air, différents procédés sont disponibles et leur mise en œuvre dépend des caractéristiques des gaz à traiter. Les technologies adaptées au traitement de gaz caractérisés par des débits élevés et de faibles concentrations seront présentées en mettant l'accent sur les procédés biologiques et notamment sur la biofiltration. Quels sont les principes de fonctionnement de ces bioprocédés et leurs différences ? Quels sont leurs avantages et leurs inconvénients ? Quels paramètres opératoires faut-il prendre en compte pour maîtriser les performances des biofiltres ? Qu'est ce qu'un biofiltre végétalisé ? La deuxième partie de ce chapitre apportera les réponses à ces questions.

Le fonctionnement des biofiltres s'appuie principalement sur les communautés microbiennes se développant dans le matériau de garnissage au travers duquel circule l'air à traiter. Il est donc primordial de connaître les microorganismes et les voies métaboliques impliqués dans la dégradation des polluants ciblés (NOx et BTEX). Ceci fera l'objet de la troisième partie de ce chapitre.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat*.

1. La pollution atmosphérique urbaine

La pollution atmosphérique est le résultat d'une utilisation excessive et irrationnelle des ressources planétaires. Cette pression anthropique a des conséquences graves sur l'environnement et la santé humaine. L'épisode du grand smog de Londres en 1952, durant lequel 12000 décès ont été attribués à la pollution (Bell et Davis, 2001), a fortement contribué à la prise de conscience du lien étroit entre pollution atmosphérique et augmentation de la mortalité. A la suite cet évènement dramatique, les impacts de la pollution atmosphérique sur la santé humaine et l'environnement en général ont reçu une attention croissante. Cela s'est traduit par un grand nombre d'études sur les impacts sanitaires ainsi que sur la détection et la quantification de composés toxiques dans l'air extérieur, et plus récemment dans l'air intérieur.

Depuis 2007, la moitié de la population mondiale vit en zone urbaine (Véron, 2007). En 2010, cette proportion a atteint 75% en Europe et 81% en Amérique du Nord (ONU, 2010). L'INSEE estime que 77% des français résident en zone urbaine et que 95% vivent sous l'influence des villes (Brutel et Levy, 2011). Les villes regroupent à la fois les plus grandes densités de population et les plus fortes émissions de polluants gazeux et particulaires (OMS, 2006). C'est pourquoi, la composition atmosphérique du milieu urbain, soumis à une pollution de nature chimique variée, fait aujourd'hui l'objet d'une attention particulière.

1.1. Caractéristiques de la pollution atmosphérique urbaine

1.1.1. Définition

La pollution atmosphérique est définie comme la contamination de l'air par un élément étranger, ou par l'accumulation d'un élément déjà naturellement présent, à une concentration suffisante pour provoquer un effet toxique ou écotoxique (Clean air act, 1956).

Deux caractéristiques de la pollution atmosphérique rendent très difficile son analyse fine, que ce soit sur un plan qualitatif ou quantitatif :

- sa complexité : elle est composée de plusieurs dizaines de milliers de substances solides ou gazeuses qui modifient les proportions normales des constituants de

l'air dit pur. L'air pur est composé exclusivement d'azote (78%), d'oxygène (21%) et de gaz rares : argon (0,97%), dioxyde de carbone (0,03%), hélium (traces) et méthane (traces) (ADEME, 2012). Seulement 250 molécules environ, considérées comme nuisibles pour la santé et l'environnement, sont utilisées en tant qu'indicateurs de pollution et font actuellement l'objet d'un suivi (CITEPA, 2011). En termes de pollution liée au trafic, 275 composés ont été recensés par l'AFSSET en 2007.

- la pollution atmosphérique urbaine est extrêmement diffuse. Les polluants se dispersent très rapidement après leur émission. Les volumes d'air contaminés sont donc colossaux alors que les concentrations en polluants sont relativement faibles, au regard de celles réellement émises au niveau des sources.

1.1.2. Composition de l'air urbain

Les polluants de l'air peuvent être séparés en deux catégories, selon leur nature :

- les polluants particulaires, abiotiques (poussières, métaux lourds…) ou biologiques (bactérie, virus, pollen…),
- et les polluants gazeux (organiques ou inorganiques) qui feront l'objet d'une attention particulière dans cette étude.

Ils peuvent également être classés selon leur mode d'action (OMS, 2006) :

- les polluants directs : ayant un impact direct sur l'environnement ou la santé. C'est le cas de nombreux polluants urbains, tels que le monoxyde de carbone, les oxydes de soufre et d'azote, les Composés Organiques Volatils (COV) et les particules fines,
- les polluants indirects : dont la présence affecte indirectement l'environnement et la santé. Le dioxyde de carbone, par exemple, a peu d'effets directs sur la santé mais est un gaz à effet de serre et participe donc au réchauffement climatique. Il s'agit également de polluants formés en présence de précurseurs dans des conditions météorologiques particulières. C'est le cas de l'ozone (O_3) troposphérique, par exemple, dont la formation est liée à la réactivité des NOx et des COV dans l'atmosphère sous l'effet du rayonnement solaire (UV). Ces derniers participent donc indirectement au réchauffement climatique.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Les principaux polluants détectés dans l'air des villes sont regroupés dans le tableau I.1 :

Familles	Polluants	sigles
Oxydes de carbone COx	Monoxyde de carbone Dioxyde de carbone	CO CO_2
Oxyde de soufre	Dioxyde de soufre	SO_2
Oxydes d'azote NOx	Monoxyde d'azote Dioxyde d'azote Protoxyde d'azote	NO NO_2 N_2O
Ozone	ozone	O_3
Composés Organiques Volatils COV	Hydrocarbures Aromatiques Monocyclique : - Benzène - Toluène - Ethylbenzène - Xylène	HAM : BTEX
	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques : Naphtalène, Benzo∝pyrène…	HAP
Particules en suspension	Total des particules en suspension (∅ < 40 µm) Particules (∅ < 10 µm) Particules « fines » (∅ < 2,5 µm)	TPS PM_{10} $PM_{2,5}$

Tableau I.1. Familles de polluants urbains (OMS, 2006).

Les deux familles de polluants ciblés dans cette étude sont les NOx et les BTEX appartenant à la famille des COV. C'est pourquoi, seuls ceux-ci sont détaillés ci-dessous.

1.1.2.1. Oxydes d'azote (NOx)

Les oxydes d'azote, notés NOx, regroupent historiquement les composés azotés comportant au moins un atome d'oxygène, soit le monoxyde d'azote (NO), le dioxyde d'azote (NO_2), le protoxyde d'azote ou oxyde de diazote (N_2O), le trioxyde de diazote (N_2O_3), le peroxyde d'azote ou tétraoxyde de diazote (N_2O_4) et le pentoxyde de diazote (N_2O_5). Cependant, le nombre de molécules regroupées sous la nomenclature NOx est souvent réduit aux seuls NO et NO_2.

Bien que traditionnellement exclu de cette terminologie au niveau des inventaires de rejets, le N_2O est également considéré comme un polluant important. Sa classification à part est due aux particularités de ses effets par rapport aux NO et NO_2. Polluant indirect, il a très peu d'effets sur la santé mais est un puissant gaz à effet de serre. Son pouvoir de réchauffement global sur 100 ans est 298 fois plus élevé qu'une masse équivalente de

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

dioxyde de carbone. Les sources de N_2O étant à 84% d'origine agricole (CITEPA, 2011), ce gaz ne sera pas discuté par la suite en tant que polluant urbain. Les deux principaux NOx quantifiés pour évaluer de la qualité de l'air, notamment en zones urbaines, sont le NO et le NO_2.

1.1.2.2. Composés Organiques Volatils (COV)

La définition des COV diffère selon les pays. En Europe, la signification du terme COV est précisée par la directive 1999/13/CE, du 11 mars 1999 ainsi que par la directive européenne 2010/75/UE du 24 novembre 2010. Elle définit un COV comme un composé organique ayant une pression de vapeur saturante de 0,01 KPa ou plus à une température de 293,15 K ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulières. La législation française exclut le méthane de cette définition, par l'arrêté du 29 mai 2000, on parle alors de COV Non Méthanique (COVNM).

Les COVNM forment un groupe vaste et hétérogène de composés organiques définis par leurs propriétés physiques (forte volatilité) et/ou par leur comportement hydrochimique (circulation sous la double forme liquide et gazeuse dans la porosité du sol) (BRGM, 2001).

Les principaux COV rencontrés dans l'air des villes sont les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), ainsi que les BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylène) qui sont des hydrocarbures aromatiques monocycliques (Barletta *et al.,* 2005 ; Roukos *et al.*, 2009 ; Parra *et al.*, 2010 ; Mansha *et al.*, 2011).

Benzène et dérivés, famille des BTEX

Les BTEX dérivent de l'anneau benzénique (figure I.1). La résonance des doubles liaisons confère à ces molécules une bonne stabilité et une faible réactivité. Ils sont considérés comme des solvants organiques volatils et hydrophobes bien que, comparativement à d'autres hydrocarbures aromatiques (comme les HAP), ces composés possèdent une solubilité dans l'eau relativement importante (Andreoni et Gianfreda, 2007).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

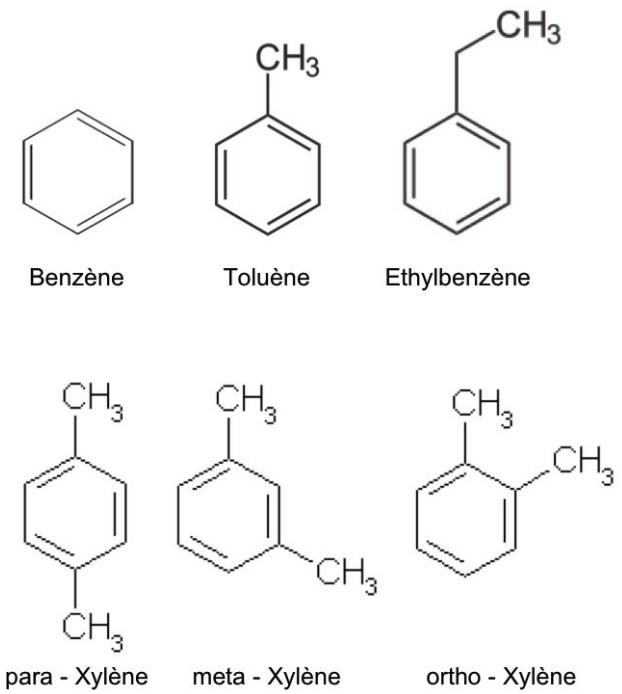


Figure I.1. Structure chimique des BTEX.

Les BTEX représentent plus de 60% des COVNM. Ils sont considérés comme un indicateur significatif de la pollution liée au trafic routier (Hoque *et al.*, 2008).

1.2. Sources

En zone urbaine, les principales sources de pollution sont les transports (routiers, aériens et autres), le secteur résidentiel et tertiaire et l'industrie comme l'illustre la figure I.2.

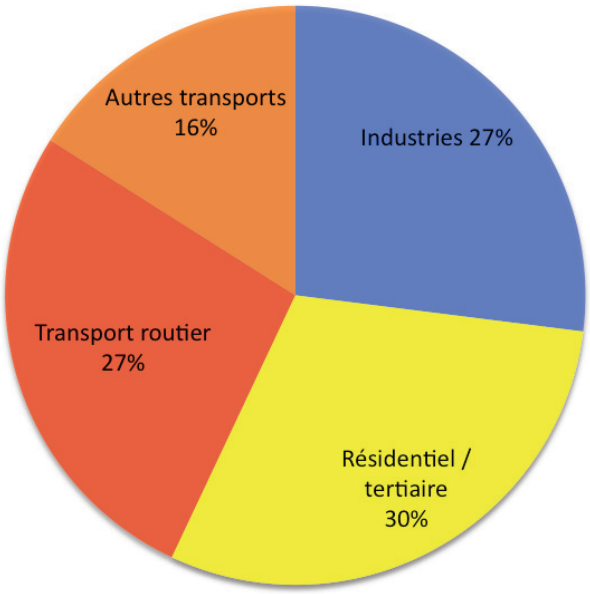


Figure I.2. Principales sources de pollution urbaine (Source : EPA, 2010).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Les émissions gazeuses issues du trafic routier sont caractérisées par la présence d'oxyde de carbone (CO), de NOx, de COV, dont les BTEX, et de particules fines (OMS, 2006).

1.2.1. NOx

Le NO et le NO_2 peuvent être formés par combinaison des atomes d'azote et d'oxygène de l'air lors de phénomènes naturels tels que des orages, les éruptions volcaniques ou les incendies de forêt (Delmas *et al.*, 1997 ; Labrador *et al.*, 2004).

Leurs sources principales sont d'origine anthropique. Ils sont produits lors de combustions à haute température et à haute pression comme dans les centres de combustion et par les moteurs des automobiles. Les moteurs diesel, du fait de leur fonctionnement à plus haute pression, émettent 2 à 3 fois plus de NOx que les moteurs à essence (Krazyzanowski *et al.*, 2005). Le NO représente plus de 95% des NOx émis par combustion, il est ensuite converti en NO_2 par oxydation dans l'air ambiant (Niu et Leung, 2010).

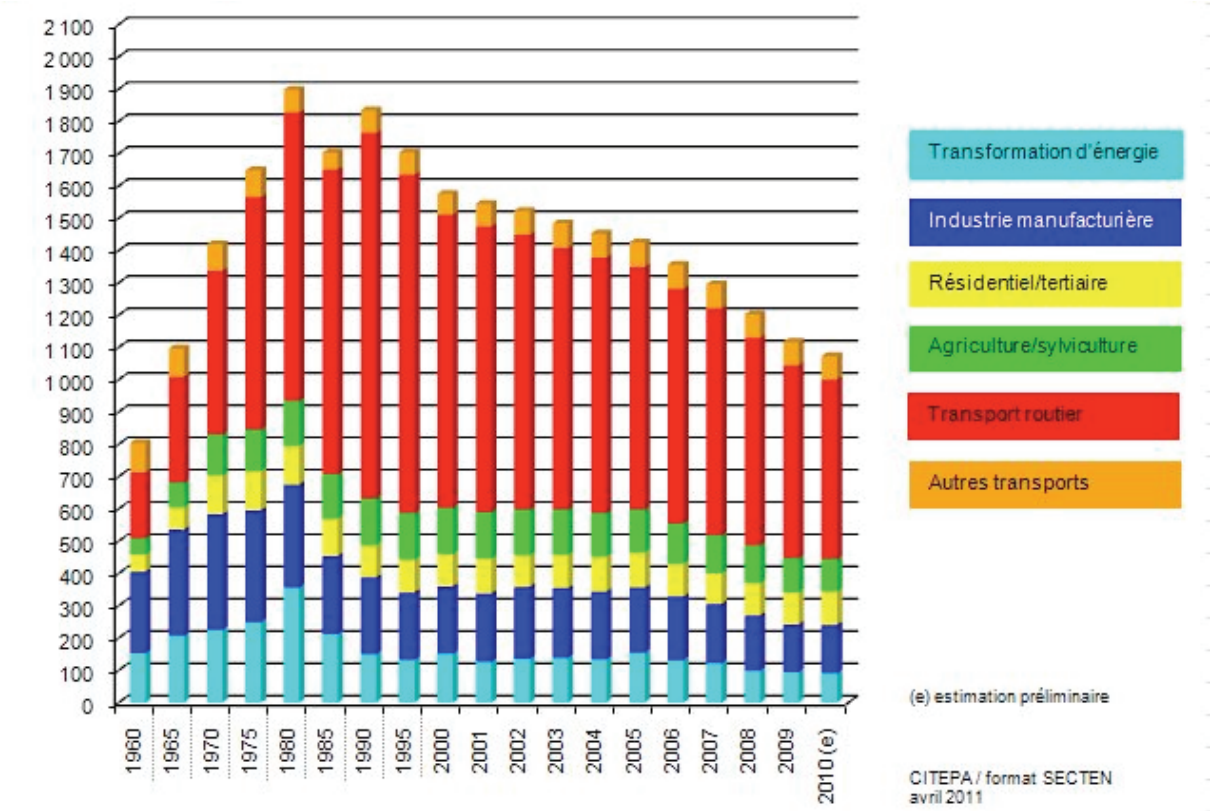


Figure I.3. Evolution des émissions atmosphériques annuelles de NOx (kT) par secteur en France métropolitaine de 1960 à 2010 (Source : CITEPA/Format SECTEN, 2011).

La figure I.3 présente l'évolution de la production de NOx (NO + NO_2) en France métropolitaine depuis 1960. Les émissions de NOx ont fortement diminué depuis les années 80-90, passant de 1871 kt en 1980 à 1117 kt en 2009, soit une baisse de 40%. Le transport routier reste le premier secteur émetteur, malgré le développement des pots catalytiques sur les véhicules, et représentait encore 54% des émissions en 2009 (CITEPA, 2011).

1.2.2. COV

Les COV sont émis par des sources biotiques telles que les forêts et la végétation en général (Kesselmeier et Staudt, 1999). Ces émissions représentaient en 2009 plus de la moitié des émissions globales de COV pour la France (CITEPA, 2011).

Ils sont également produits par des sources anthropiques et sont liés à tous les procédés de combustion ainsi qu'à l'utilisation de solvant dans de nombreux procédés industriels.

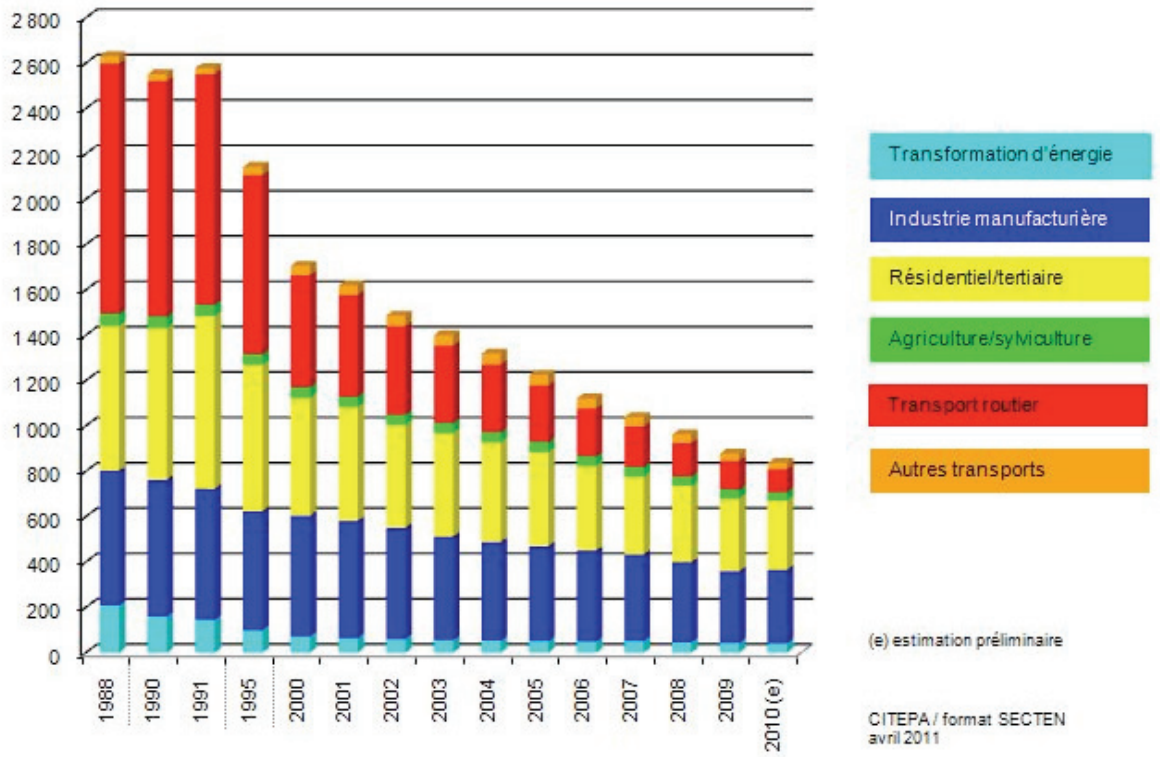


Figure I.4. Evolution des émissions atmosphériques annuelles de COVNM (kT) par secteur en France métropolitaine de 1988 à 2010 (Source : CITEPA/Format SECTEN, 2011).

Tous secteurs confondus, les émissions de COVNM pour la France métropolitaine ont diminué de près de 67% depuis 1988, passant de 2632 kt à 878 kt en 2009 (figure I.4).

Le transport routier est la troisième plus importante source avec 14% des émissions en 2009, mais c'est également le secteur dont les émissions ont le plus fortement baissé depuis 20 ans (CITEPA, 2011).

1.3. Effets des COV et NOx sur l'environnement et la santé

1.3.1. Effets sur l'environnement

Le principal effet de la pollution atmosphérique urbaine sur l'environnement est dû aux émissions de gaz à effet de serre (GES), responsables du réchauffement climatique qui bouleverse l'équilibre des écosystèmes (figure I.5). Si l'effet de serre a permis le développement et le maintien de la vie sur Terre, la présence excessive de GES dans l'atmosphère modifie la proportion d'énergie renvoyée dans l'espace par la surface terrestre. Cela provoque une accumulation de chaleur et d'énergie dans les basses couches de l'atmosphère à la base du réchauffement climatique.

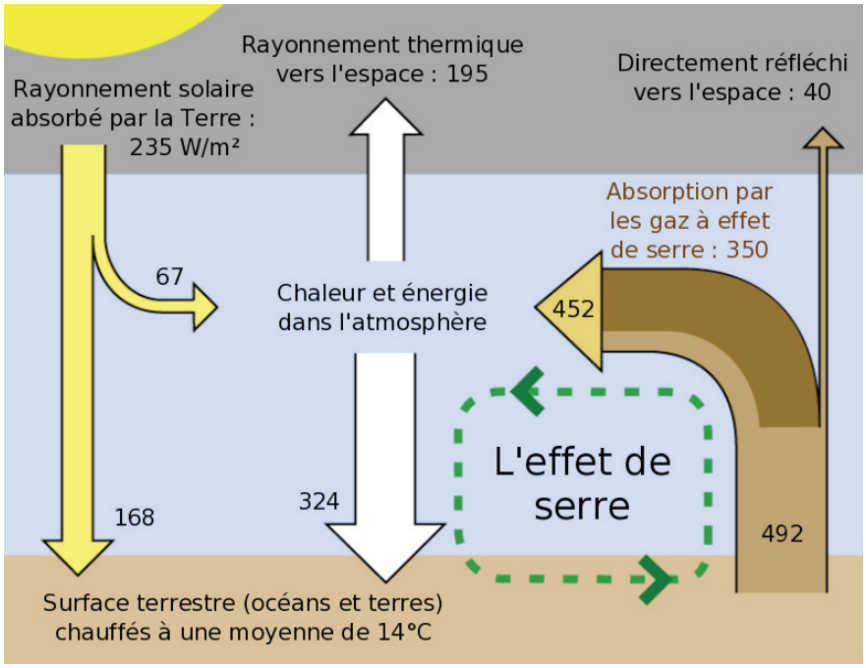


Figure I.5. Schéma de principe de l'effet de serre (d'après Kiehl et Trenberth, 1997).

Sous l'effet du rayonnement solaire, les NOx réagissent avec les COV et forment de l'ozone troposphérique. Ce composé est un GES, les NOx et les COV participent donc indirectement au réchauffement climatique (Le Cloirec, 2004).

Les NOx participent également à la formation des retombées acides, ainsi qu'à l'eutrophisation des sols (INERIS, 2005).

L'oxydation des COV en présence de radicaux hydroxyles (OH), d'ozone ou de nitrate forme des composés de pression saturante plus faible qui peuvent condenser sur les particules préexistantes et contribuer à la formation d'aérosols organiques secondaires (Kroll et Seinfeld, 2008).

1.3.2. Effets sur la santé

Les Nations Unies estiment à plus de 600 millions le nombre de personnes exposées à des niveaux de pollution nuisant à la santé en raison du trafic routier dans les villes. L'exposition à la pollution atmosphérique urbaine, aux taux rencontrés actuellement en Europe, au Canada ou aux États-Unis affecte significativement la santé humaine. Les effets de la pollution de l'air sur la santé humaine sont classés selon la durée de l'exposition : à court terme (heures, jours ou semaines) ou à long terme (mois ou années). Les effets observés pour des expositions à court terme affectent le système respiratoire en amplifiant des maladies respiratoires préexistantes telles que l'asthme, les allergies ou les maladies pulmonaires chroniques. Elles affectent également le système cardiovasculaire et augmentent le risque d'infarctus du myocarde, par exemple (Peel *et al.*, 2007). Les expositions à long terme à la pollution atmosphérique urbaine augmentent la mortalité (Nafstad *et al.*, 2004 ; Filleul *et al.*, 2005 ; Krewski, 2009 ; Eilstein, 2010 ; Anderson *et al.*, 2011 ; Parrish *et al.*, 2011), accroissent le nombre de cancers et de pneumonies (Nyberg *et al.*, 2000; Krewski *et al.*, 2005) mais sont également responsables de l'apparition de maladies respiratoires chroniques, notamment chez les jeunes enfants (Brauer *et al.*, 2002 ; Pope *et al.*, 2009 ; Szyszkowicz, 2009 ; Neupane *et al.*, 2010 ; Abelsohn et Stieb, 2011 ; Anderson *et al.*, 2011).

Toutefois, les biais induits par les méthodes d'évaluation reliant pollution et santé humaine laissent subsister des incertitudes importantes qui rendent difficile la distinction entre les effets sanitaires dus à une exposition chronique et les impacts à court terme.

1.3.1.1. NOx

Les NOx occasionnent des troubles respiratoires, l'inflammation et l'obstruction des voies aériennes, et augmentent le risque d'infarctus du myocarde (Grazulevicienne *et al.*, 2004). Ils favorisent la sensibilité aux attaques microbiennes (INERIS, 2005). Les

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

personnes à risque sont les fumeurs, les patients atteints de troubles respiratoires (tels que l'asthme ou les allergies) et les personnes fragiles comme les personnes âgées et atteintes de problèmes cardiovasculaires ou les jeunes enfants.

1.3.1.2. BTEX

Une exposition de courte durée au BTEX peut provoquer des irritations au niveau du nez et de la gorge et causer une dépression du système nerveux central dont les principaux symptômes sont la somnolence, les étourdissements, des maux de tête et une perte de la coordination (INERIS, 2004). L'exposition chronique au benzène, classé CMR (Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique), endommage le moelle osseuse et favorise le développement de cancers et de leucémies (Brosselin *et al.*, 2009). L'effet des autres BTEX est moins connu. Le toluène est considéré comme non cancérogène et non mutagène mais reprotoxique (INRS, 2010a). L'éthylbenzène et les trois isomères de xylène ne sont pas classés CMR à ce jour (INRS, 2010b et c).

1.4. Réglementation et surveillance

1.4.1. Réglementation

Le Clean Air Act est le premier texte de loi relatif à la qualité de l'air urbain. Motivé par le grand smog de Londres en 1952, il a été adopté par le Parlement anglais en 1956. Pourtant, ce n'est qu'en 1979, avec la Convention de Genève, que le premier cadre de coopération intergouvernementale (entrée en vigueur en 1983) voit le jour dans le but de protéger la santé et l'environnement contre la pollution atmosphérique. Plusieurs protocoles internationaux ont ensuite été adoptés, dont le protocole de Kyoto (1997) visant la réduction des gaz à effets de serre et celui de Göteborg (1999) fixant les plafonds d'émissions pour différents composés dont les NOx et les COV (tout deux entrés en vigueur en 2005).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a proposé des lignes directrices visant à réduire les effets sanitaires de la pollution de l'air en 1987. Elles ont été révisées en 1997 et remises à jour en 2005 (OMS, 2006).

Afin de limiter l'émission de polluants atmosphériques, la population est fortement incitée à limiter leur production en milieu urbain. Ceci passe par des mesures d'ordre préventives comme la diminution de la circulation de voitures dans les centres villes, le

développement des réseaux de transport en commun et de modes de transport alternatifs ou la réduction de la consommation en énergie des foyers. Des mesures curatives existent également comme la généralisation de l'utilisation de filtres à particules sur les pots d'échappement. Une législation de plus en plus stricte est par ailleurs mise en place et soumet le grand public et les industriels à des contraintes accrues en matière de maîtrise de la pollution atmosphérique. Par exemple, les directives européennes relatives au principe du pollueur-payeur (Directive 2004/35/CE), et à la qualité de l'air (Directive 2008/50/CE) ont toutes deux été retranscrites en droit français et intégrées au Code de l'environnement en 2010 (respectivement art L110-1 et L220-1 et suivants). En France, le Grenelle de l'environnement a également fixé des objectifs ambitieux (réduire de 20% les émissions de gaz à effet de serre d'ici 2020 et de 75% d'ici 2050) afin de réduire la dispersion dans l'atmosphère de polluants connus pour leur caractère nocif pour la santé et l'environnement.

Afin d'éviter, de réduire ou de prévenir les effets nocifs sur la santé humaine et/ou sur l'environnement, différentes valeurs de concentration en polluants ont été fixées par l'annexe 1 du décret n°2002-213, du 15 février 2002. Ces valeurs sont définies sur la base des connaissances scientifiques actuelles et font toujours référence à une durée d'exposition qui peut être d'une heure, d'une journée ou d'une année. Elles peuvent être séparées en deux catégories :

- Les valeurs limites correspondant à des niveaux d'exposition pouvant être atteints sur une période donnée mais qui ne doivent pas être dépassés une fois atteints.
- Les valeurs cibles correspondant à des niveaux d'exposition maximum souhaitable sur une période donnée (objectifs de qualité).

Les seuils d'alerte, de recommandation et d'information sont calculés sur des moyennes horaires pour permettre une meilleure gestion et une diffusion rapide de l'information.

Actuellement, seuls le benzène et le NO_2 font l'objet d'une réglementation. Le tableau I.2 regroupe la réglementation concernant ces composés ainsi que les moyennes annuelles mesurées en France et pour l'agglomération lyonnaise.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Législation		Moyennes annuelles observées (2010)		
		Type de site	France	Lyon
Benzène				
Objectif pour la qualité de l'air (moyenne annuelle)	2 µg.m^{-3}	Urbain et périurbain	0,9 µg.m^{-3}	1,2 µg.m^{-3}
Valeur limite (moyenne annuelle)	5 µg.m^{-3}			
Seuil de recommandation	aucun	Trafic	1,7 µg.m^{-3}	1,8 µg.m^{-3}
Seuil d'alerte	aucun			
NO_2				
Objectif pour la qualité de l'air (moyenne annuelle)	40 µg.m^{-3}	Urbain et périurbain	22 µg.m^{-3}	36 µg.m^{-3}
Valeur limite (moyenne annuelle)	40 µg.m^{-3}			
Seuil de recommandation (moyenne horaire)	200 µg.m^{-3}	Trafic	49 µg.m^{-3}	69 µg.m^{-3}
Seuil d'alerte (moyenne horaire)	400 µg.m^{-3}			

Tableau I.2. Normes de qualité de l'air et concentrations moyennes annuelles du benzène et du NO_2 (sources : OMS, 2006 ; MEDDTL, 2010 ; COPARLY, 2010).

Pour le benzène, la valeur limite annuelle est respectée aussi bien au niveau national que dans l'agglomération lyonnaise. Par contre, pour le NO_2 la valeur limite pour la moyenne annuelle est dépassée pour les sites de trafic routier. La valeur limite de 200 µg/m^3 en moyenne horaire, à ne pas dépasser plus de 18 heures par an, est dépassée sur huit sites de trafic dans les agglomérations suivantes : Aix-en Provence, Avignon, Lyon, Marseille, Paris et Toulouse (MEDDTL, 2010).

1.4.2. Surveillance

En France, depuis le 30 décembre 1996, la Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie (loi LAURE n°96-1236) impose une surveillance de la qualité de l'air et l'information du public en s'appuyant sur la définition de normes de qualité de l'air (tableau I.2). Cette surveillance porte sur l'ensemble du territoire depuis le 1er janvier 2010. L'Etat a mis en place le Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l'Air (LCSQA), composé de l'Institut National de l'EnviRonnement Industriel et des RisqueS (INERIS), du Laboratoire National de métrologie et d'Essais (LNE) et de l'Ecole des Mines de Douai, afin de garantir la qualité des mesures effectuées (Arrêté du 29 juillet 2010 – Code de l'environnement Livre II, Titre II). Un certain nombre d'autres

organismes ou associations régionales peuvent être agréés par le Ministère de d'Ecologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement (MEDDTL) dans le but de surveiller les niveaux de pollution des territoires et d'informer en direct les populations des risques encourus. En Rhône-Alpes par exemple, le COPARLY (Comité pour le contrôle de la Pollution Atmosphérique dans le Rhône et la région LYonnaise) a été remplacé par l'association Air Rhône-Alpes depuis le 14 janvier 2012 (Arrêté du 20 décembre 2011).

Le droit à l'information sur la qualité de l'air et ses effets sur la santé et l'environnement a été reporté dans l'article L125-4 du Code de l'environnement, entré en vigueur le 7 janvier 2012.

La procédure d'information et d'alerte, comportant deux niveaux, est gérée par le préfet qui doit informer le public et prendre des mesures d'urgence en cas de dépassement du seuil d'alerte (restriction de la circulation automobile dans les centres ville, réduction de la vitesse autorisée sur les grands axes périphériques, par exemple).

1.5. Problématique des parcs de stationnement couverts (PSC)

Un parc de stationnement couvert est un emplacement surmonté d'une toiture destiné au remisage des véhicules à moteur en dehors de la voie publique et pouvant accueillir plus de 10 véhicules à moteur d'un poids total en charge inférieur ou égal à 3,5 tonnes. Les différents niveaux de stationnement peuvent être superposés en superstructure (immeuble) ou en infrastructure (souterrain).

Les parcs de stationnement couverts, à l'exclusion de ceux liés exclusivement aux immeubles d'habitation, sont classés Etablissement Recevant du Public (ERP) depuis le 1er juillet 2006 par l'arrêté du 9 mai 2006.

1.5.1. Réglementation des PSC en France

Ces structures sont réglementées de façon à garantir la sécurité des usagers et travailleurs. L'arrêté du 9 mai 2006 (section IV article PS 31) stipule que la ventilation doit être « réalisée et surveillée de façon à s'opposer efficacement à la stagnation de gaz nocifs ou inflammables ». A ce titre, l'installation d'un système de ventilation pour le désenfumage et le renouvellement de l'air est obligatoire. Pour les parcs en superstructure, cette ventilation peut être naturelle dès lors que les surfaces

d'ouverture sont au moins égales à 50% de la totalité des façades et représentent au minimum 5% de la surface de plancher. De plus, ces ouvertures doivent être situées sur deux façades opposées pour favoriser les déplacements d'air. Pour les parcs en infrastructure (ainsi que pour les parcs en superstructure ne répondant pas aux normes précédemment citées), une ventilation mécanique est obligatoire et doit permettre un débit d'extraction minimum de 600 $m^3.h^{-1}$ par véhicule.

1.5.2. Recommandation et Valeurs guides

En 2005, les ministères en charge de la Santé et de l'Environnement ont demandé l'avis de l'AFSSET sur des valeurs limites de concentration en polluant dans l'air des PSC. Cette saisine faisait suite à la préparation par le ministère de l'Intérieur d'un arrêté qui proposait en particulier d'intégrer des valeurs limites de concentrations pour le monoxyde de carbone (CO) et le dioxyde d'azote (NO_2). Les travaux de l'AFSSET ont conduit à la détermination de deux valeurs de concentration en polluants applicables au contexte des PSC :

- les « valeurs cibles » : sont établies sur la base de critères strictement sanitaires, elles constituent des objectifs recommandables et non des valeurs limites d'expositions. Elles concernent des polluants pouvant avoir des effets nocifs sur la santé par inhalation et identifiés comme problématiques au sein des PSC.
- Les « valeurs de gestion » : elles concernent un composé unique qu'il est possible de surveiller en routine et qui représente un bon indicateur de pollution car sa concentration est bien corrélée avec celles des polluants identifiés comme problématiques. Leur respect permet le respect des « valeurs cibles ».

Les conclusions du rapport de l'AFSSET indiquent que, dans le contexte des PSC, les polluants les plus préoccupants sont le monoxyde de carbone (CO), le dioxyde d'azote (NO_2), les particules fines (PM) et le benzène. Les valeurs cibles recommandées pour ces polluants et pour des durées d'exposition de 30 minutes, représentatives de celles des usagers des PSC, sont représentées dans le tableau suivant (tableau I.3) :

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Polluants	Valeurs cibles ($\mu g.m^{-3}$)	Concentrations maximales mesurées ($\mu g.m^{-3}$)
CO	60 000	39 000
NO_2	157	532
PM_{10}	113	216
$PM_{2,5}$	93	91
Benzène	18	58

Tableau I.3. Valeurs cibles et concentrations maximales mesurées ($\mu g.m^{-3}$) pour les 5 polluants considérés comme les plus préoccupants dans les PSC (source : AFSSET, 2007).

Parmi ces substances, le benzène et le NO_2 apparaissent comme les plus problématiques, en termes de concentrations mesurées vis à vis des valeurs cibles. L'agence recommande le NO comme polluant « de gestion » le plus pertinent à surveiller en routine pour permettre notamment le pilotage de la ventilation des PSC.

L'ensemble des recommandations émises par l'AFSSET n'a pas été retenu et ne figure pas dans l'arrêté adopté le 9 mai 2006, relatif à la sécurité incendie et au risque de panique dans les PSC.

Aucune valeur réglementaire de qualité de l'air intérieur des parcs de stationnement couvert n'est imposée à ce jour par la législation française, ni par aucun autre pays (AFSSET, 2007).

1.5.3. Qualité de l'air dans les PSC en France

La qualité de l'air des PSC est mal connue. En effet, celle-ci dépend de nombreux facteurs tels que la taille et la disposition du parking (superstructure ou infrastructure), le mode de fréquentation (résidentiel ou très fréquenté) et le type de ventilation adopté par l'exploitant.

En France, les études réalisées depuis le début des années 2000 montrent que les niveaux de pollution rencontrés dans les PSC sont préoccupants, que ce soit pour les personnels travaillant dans les parkings mais également pour les usagers. Ils sont globalement 10 à 100 fois plus élevés que dans l'atmosphère de la ville (Atmosf'Air Bourgogne, 2001 ; Air Pays de Loire, 2003 et 2004 ; ATMO Poitou-Charentes, 2003 ; ASPA, 2005). De plus, il a été montré que les parkings ont un impact direct et non négligeable sur la qualité de l'air extérieur à leur proximité (AFSSET, 2007). Par

exemple, la concentration de NO_2 mesurée au mois de décembre 2002 dans un PSC de La Rochelle est parfaitement corrélée avec celle mesurée sur la place située au-dessus du parking souterrain. Lors des pics de concentrations de NO_2 mesurés dans le parking, des pics sont également enregistrés sur la place (ATMO Poitou-Charentes, 2003).

Un nombre limité d'études a été consacré à la qualité de l'air des PSC et la plupart de ces études se sont intéressées à une gamme très restreinte de polluants. Afin d'appréhender la diversité des polluants présents dans les PSC, l'ensemble des émissions liées au trafic automobile peuvent être considérés. De cette façon une liste de 275 substances a pu être établie par l'AFSSET en 2007. Elle regroupe des oxydes d'azote et de carbone, les particules, des COV dont les BTEX et des HAP ainsi que des métaux. Parmi toutes ces substances, une quarantaine sont jugées pertinentes pour la gestion des risques sanitaires (tableau I.4). Seulement une dizaine d'entre elles, considérées comme les plus problématiques en raison des concentrations mesurées dans les PSC, font l'objet de suivis lors des études récentes (en gras dans le tableau I.4) (AFSSET, 2007).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat*.

Substance	Substance
NO_2	Benzo(a)anthracène
CO	Chrysène
PM_{10}	Benzo(b)fluoranthène
$PM_{2.5}$	Benzo(k)fluoranthène
Benzène	**Benzo(a)pyrène**
Toluène	Dibenzo(a,h)antracène
Ethylbenzène	Benzo(g,h,i)pérylène
Xylène	Indéno(1,2,3-cd)pyrène
1,3-butadiène	Fluorène
Formaldéhyde	Arsenic
Acétaldéhyde	Baryum
Acroléine	Cadmium
Napthalène	Chrome
Acénaphtylène	Cobalt
Acénaphtène	Cuivre
Phénantrène	Mercure
Anthracène	Manganèse
Fluoranthène	Nickel
Pyrène	Plomb

Tableau I.4. Liste des substances potentiellement d'intérêt pour la gestion des risques sanitaires dans les PSC. En gras figurent les composés considérés comme les plus problématiques en raison des concentrations mesurées dans les PSC (source : AFSSET, 2007).

Cas des PSC de l'agglomération lyonnaise

Le COPARLY, récemment renommé ATMO Rhône-Alpes, et Lyon Parc Auto (LPA) ont lancé en 2009 un programme d'étude visant à améliorer les connaissances sur la qualité de l'air des PSC de l'agglomération lyonnaise. Cette étude de grande ampleur a été découpée en trois volets : un état des lieux de la qualité de l'air de 25 parcs, une étude approfondie d'un parc très fréquenté et une étude de différents scénarios de ventilation permettant d'améliorer la qualité de l'air des parkings. Les résultats de ce programme d'études, publiés en 2010 et 2011 (COPARLY, 2010 ; COPARLY, 2011a ; COPARLY, 2011b), ont mis en évidence la complexité des phénomènes intervenant dans l'émission et la répartition des polluants dans les PSC ce qui rend très difficile la détermination des niveaux de pollution. A typologie de parking équivalente (taille et disposition), le mode de fréquentation joue un rôle important sur la qualité de l'air. Par exemple, contrairement à l'idée reçue selon laquelle le niveau de pollution d'un parking fortement

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

fréquenté (ayant une circulation et un renouvellement de véhicule important) est plus élevé que celui d'un parking résidentiel (caractérisé par une circulation automobile moins dense), les travaux du COPARLY montrent que les taux de BTEX, et particulièrement de benzène et de toluène, sont plus élevés la nuit dans les parkings résidentiels probablement en raison de l'évaporation des carburants contenus dans les réservoirs des véhicules (figure I.6).

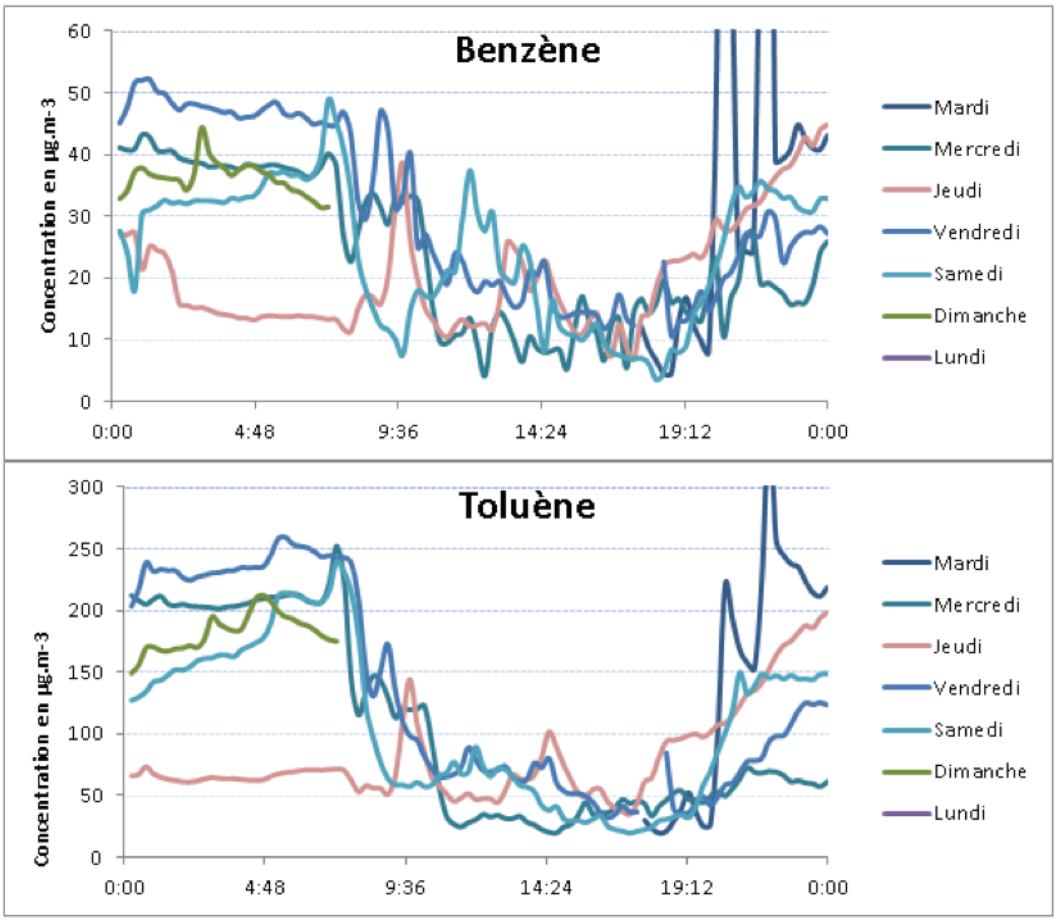


Figure I.6. Concentrations de benzène et de toluène (µg.m^{-3}) mesurées entre le 1er et le 8 mars 2011 dans le parking du Gros Cailloux à Lyon 4ème (COPARLY, 2011b).

Ces travaux mettent en évidence la nécessité d'utiliser différents polluants cibles pour la surveillance et la gestion de la qualité de l'air au sein des PSC. Enfin, pour diminuer de façon notable le nombre d'épisodes de dépassement des valeurs seuils préconisées par l'AFSSET, il apparaît indispensable d'augmenter ostensiblement les temps de ventilation en considérant la typologie et le mode de fréquentation du parking.

Ce dernier point renforce le problème lié aux rejets de polluants dans l'atmosphère urbaine par les systèmes de ventilation des PSC et à leur impact sur la qualité de l'air urbain. Afin de limiter ces rejets, le traitement de l'air issu des PSC pourrait donc être

envisagé. Néanmoins, actuellement, il n'existe aucun PSC équipé d'un système de traitement d'air à l'exception du parking du Centre d'Echange de Lyon Perrache (CELP).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat*.

2. Traitement de l'air

Il existe différentes technologies de traitement d'effluents gazeux dont la mise en œuvre est plus ou moins pertinente d'un point de vue technico-économique en fonction des gammes de débits et concentrations de polluants à traiter (figure I.7). Dans cette partie, seuls les procédés adaptés pour le traitement d'effluents gazeux caractérisés par des niveaux de concentrations largement inférieurs à 1 g.m^{-3} en polluants seront détaillés.

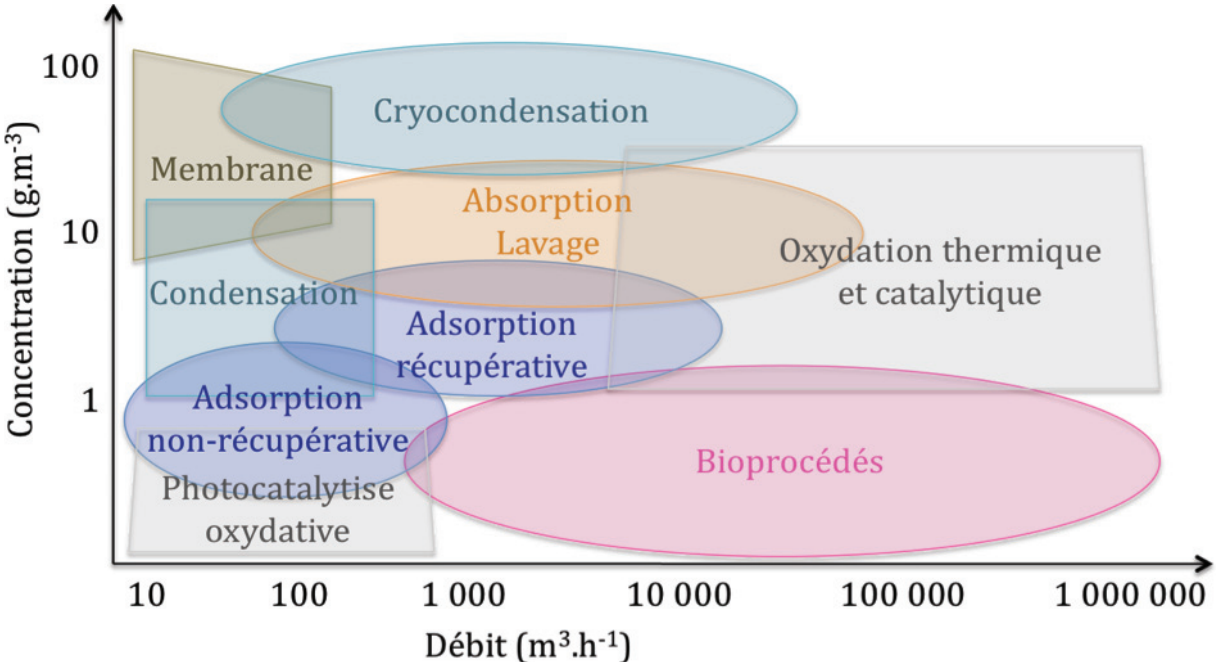


Figure I.7. Faisabilité technico-économique des principaux procédés de traitement de l'air en fonction de la concentration et du débit de l'effluent à traiter (d'après Herman *et al.*, 1998 ; Delhoménie et Heitz, 2005).

Les différents types de procédés utilisés pour le traitement de l'air peuvent être séparés en deux groupes ; les procédés physico-chimiques et les procédés biologiques.

2.1. Procédés physico-chimiques

2.1.1. Absorption

L'absorption est un procédé utilisé pour traiter des effluents gazeux dont la concentration en polluants est généralement de l'ordre de 10 g.m^{-3} (figure I.7). Cependant, son principe de fonctionnement est largement utilisé dans les bioprocédés. C'est pourquoi il paraît nécessaire de le décrire ici.

L'absorption est un processus de transfert d'un composé d'une phase gazeuse vers une phase liquide. Elle est réalisée dans une tour de lavage remplie d'un garnissage inorganique permettant d'augmenter la surface de contact gaz/liquide. Selon la solubilité des composés à traiter, le lavage est fait à l'eau ou avec l'addition de produits chimiques (figure I.8). L'absorption peut être :

- physique : le composé transféré ne subit alors aucune transformation chimique. Le flux de polluants transféré est proportionnel à la capacité de diffusion du composé dans les deux phases en contact. Le transfert dépend de la surface d'échange et du temps de contact gaz/liquide, de la température et du coefficient de diffusion du composé absorbé (Roustan, 2004).
- chimique : lorsque l'effluent est faiblement concentré des réactions chimiques sont mises en jeu. Suivant la nature des composés, ces réactions sont de type acido-basique (lavage à la soude pour l'H_2S ou à l'acide pour le NH_3) ou de type oxydoréduction (chlore ou ozone pour les composés azotés et les aromatiques) (Fanlo, 2005).

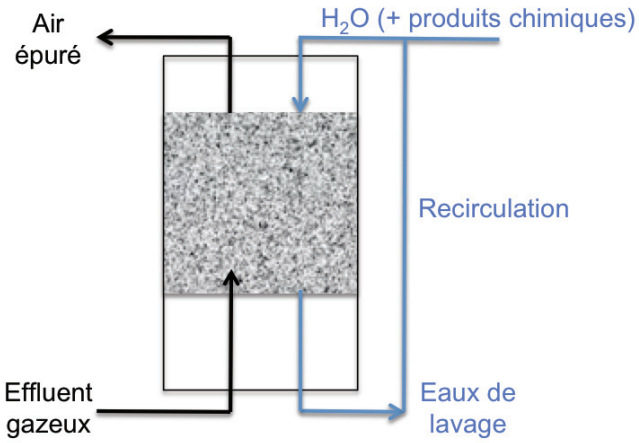


Figure I.8. Schéma de principe d'une tour de lavage.

Les procédés mettant en œuvre l'absorption permettent d'atteindre des abattements supérieurs à 95% dans de nombreux cas et sont adaptés à une vaste gamme de débits, de concentrations et de composés. L'absorption est largement utilisée pour le traitement d'effluents gazeux odorants provenant de stations d'épuration ou de local de stockage de boues (Van Groenestjin et Kraakman, 2005). Cette technique présente plusieurs avantages : la mise en route et le redémarrage du procédé sont immédiats et son fonctionnement est flexible et robuste face aux variations de charges brutales.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Les inconvénients principaux résident dans les coûts d'installation et de fonctionnement (consommation de réactifs chimiques et d'eau (Roustan, 2004)). Concernant le traitement d'effluents gazeux complexes, l'association de plusieurs tours de lavage, chacune spécifique au traitement d'une famille de composés, est nécessaire. Le contrôle permanent des paramètres opératoires (pertes de charge, débits liquides) est indispensable. Le coût de régénération ou d'élimination de la solution de lavage doit être également considéré (Delhoménie et Heitz, 2005),

2.1.2. Adsorption

L'adsorption est un phénomène de surface par lequel les composés gazeux se fixent sur les surfaces d'un support solide dit adsorbant (figure I.9). L'adsorbant le plus couramment utilisé est le charbon actif. Durant la phase de transfert gaz/solide, des interactions plus ou moins importantes s'établissent entre le composé adsorbé et l'adsorbant. L'adsorption physique, ou physisorption, met en jeu des liaisons de faibles énergies de type forces de Van der Walls. Elle est généralement réversible permettant ainsi une régénération de l'adsorbant. L'adsorption chimique, ou chimisorption, met en jeu des liaisons d'énergie supérieure, de type covalente. Elle est souvent irréversible ou difficilement réversible (Rouquerol *et al.*, 1999). L'adsorption est facilitée par les matériaux ayant une surface spécifique importante (1000 à 1200 $m^2.g^{-1}$ pour le charbon actif), et par la nature des groupes fonctionnels surfaciques en interaction physique ou chimique avec les polluants (Le Cloirec, 2003). La capacité d'adsorption est d'autant plus élevée que les composés à piéger ont une faible pression de vapeur saturante et peut être améliorée de façon significative par imprégnation de l'adsorbant avec des réactifs chimiques (Koller, 2004).

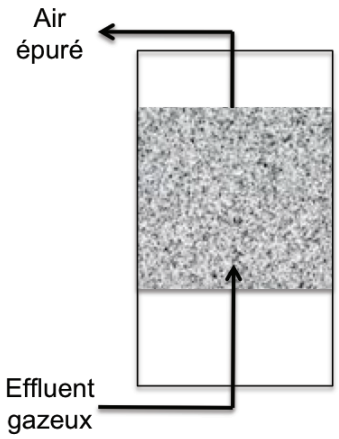


Figure I.9. Schéma de principe d'une tour d'adsorption.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

L'adsorption est particulièrement adaptée au traitement d'effluents très peu concentrés ce qui augmente la durée de vie de l'adsorbant avant saturation, et dont la concentration fluctue. De plus, c'est un des seuls procédés de traitement d'air applicable à une très large gamme de débit, pouvant aller jusqu'à 50 000 $m^3.h^{-1}$ (Le Cloirec, 2003).

Dans le cas du traitement de polluants atmosphériques, l'adsorption est utilisée en mode non régénératif car la nature des composés piégés ne présente aucun intérêt. Des imprégnations chimiques sont souvent utilisées pour augmenter les capacités d'adsorption.

Cette technique présente, toutefois, deux inconvénients majeurs :

- Elle n'est pas adaptée au traitement d'effluents chauds et humides (> 55°C et > 50% d'humidité relative), en raison de phénomène de compétition avec l'eau (Fanlo, 2005),
- Le renouvellement de l'adsorbant ainsi que l'élimination du matériau saturé représentent un coût supplémentaire (Le Cloirec, 2003).

2.1.3. Photocatalyse oxydative (PCO)

La photocatalyse est particulièrement adaptée au traitement d'effluents très faiblement concentrés. Elle est utilisée pour l'amélioration de la qualité de l'air intérieur. Son fonctionnement repose sur l'action de la lumière (artificielle le plus souvent) sur un catalyseur qui permet l'oxydation des polluants (figure I.10). Ainsi après adsorption des polluants sur le catalyseur, la dégradation des polluants en CO_2 et H_2O a lieu. L'énergie lumineuse nécessaire à cette dégradation se situe dans l'ultraviolet (UV) ce qui implique l'utilisation d'une lampe spécifique et une consommation d'énergie. L'oxyde de métal le plus utilisé en photocatalyse est l'oxyde de titane (TiO_2) car il permet la destruction complète de nombreux polluants organiques (Zhao et Yang, 2003 ; Wang *et al.*, 2007), ainsi que la dégradation complète et simultanée des NOx et des BTEX (Ao et Lee, 2002 ; Chen *et al.*, 2011).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

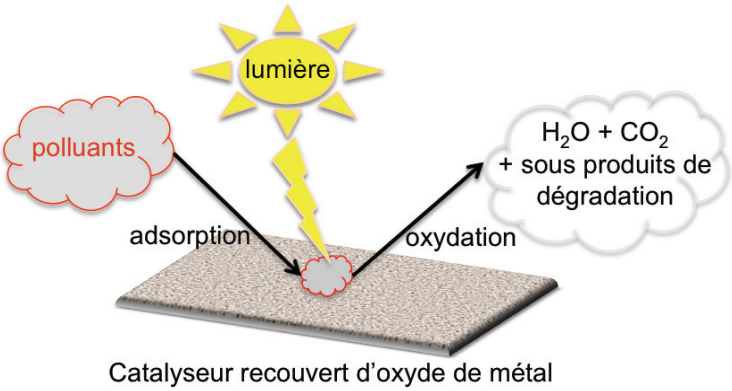


Figure I.10. Schéma de principe de la photocatalyse oxydative.

Les inconvénients majeurs de cette technique sont que le catalyseur doit être exempt de toute impureté et doit permettre un temps de contact entre le polluant et le catalyseur suffisamment long pour que la décomposition soit complète. Dans le cas contraire, des sous-produits pouvant présenter un risque de toxicité, comme le formaldéhyde, sont générés (Wang *et al.*, 2007). De plus, cette technique nécessite le brassage de grands volumes d'air ce qui, en plus d'être bruyant et énergivore, paraît incompatible avec le temps de contact nécessaire à la décomposition totale des composés (Debono, 2011).

Les capacités de photocatalyse dépendent de l'intensité lumineuse car plus l'intensité lumineuse est forte, plus les capacités sont importantes, ce qui entraîne donc une consommation énergétique plus conséquente. Le taux d'humidité de l'effluent est également un paramètre important, une humidité relative élevée diminue en effet l'activité photocatalytique (Staub de Melo et Trichês, 2012).

En résumé, le tableau suivant (tableau I.5) rassemble les performances, les limites et les coûts associés aux différents procédés physico-chimiques comparés à ceux des bioprocédés de traitement de l'air.

Technologie	Performances	Limites	Coûts / ($m^3.h^{-1}$) d'air
Absorption	- Abattement : 90-98% - Récupération possible des polluants dissous - Démarrage rapide - Flexible et robuste	- Inadapté aux polluants peu solubles - Consommation d'eau et de réactifs chimiques - Élimination de la solution de lavage	- Investissement : 12 – 95 € - Fonctionnement : 20 – 95 €
Adsorption	- Abattement : 90-98% - Récupération possible des polluants (désorption) - Démarrage rapide - Flexible et robuste	- Régénération ou élimination de l'adsorbant nécessaire - Humidité de l'effluent < 50%	- Investissement : 12 – 55 € - Fonctionnement : 8 – 27 €
Photocatalyse oxydative (PCO)	- Abattement : 90-98% - Faible encombrement - Compatible avec des très faibles concentrations en polluants - Démarrage rapide - Flexible et robuste	- Nettoyage nécessaire de la surface du catalyseur - Génération de sous produits toxiques ? - Système complexe	Non communiqués - Investissement : élevés - Fonctionnement : élevés
Bioprocédés	- Abattement : 80-98% - Compatible avec des débits élevés et de très faibles concentrations en polluants - Peu de maintenance	- Contrôle des paramètres opératoires -Encombrement important - Problèmes de pertes de charge	- Investissement : 8 – 55 € - Fonctionnement : 2 – 8 €

Tableau I.5. Performances, limites et coûts des différents types de procédés de traitement de l'air (d'après Delhoménie et Heitz, 2005 ; Staub de Melo et Trichês, 2012).

D'une façon générale, les procédés de sorption (absorption et adsorption) engendrent des coûts d'investissement et de fonctionnement similaires et importants surtout lorsqu'il s'agit de traiter des effluents très faiblement chargés en composés polluants (Delhoménie et Heitz, 2005). La technologie physico-chimique la mieux adaptée à ce type de concentrations est la PCO. Cependant, ses coûts d'investissement et de fonctionnement sont bien supérieurs à ceux des bioprocédés.

2.2. Les Bioprocédés de traitement de l'air

Le traitement biologique de l'air repose sur l'oxydation partielle ou complète des polluants contenus dans le gaz à traiter par les microorganismes. Cette transformation aboutit à la formation de biomasse, de CO_2, d'H_2O et sels minéraux (Bibeau *et al.* 1997, Pré *et al.*, 2004 ; Malhautier *et al.*, 2005). Les bioprocédés fonctionnent généralement à température ambiante, produisent peu de sous-produits de dégradation et nécessitent par conséquent des apports énergétiques réduits comparés aux autres types de procédés.

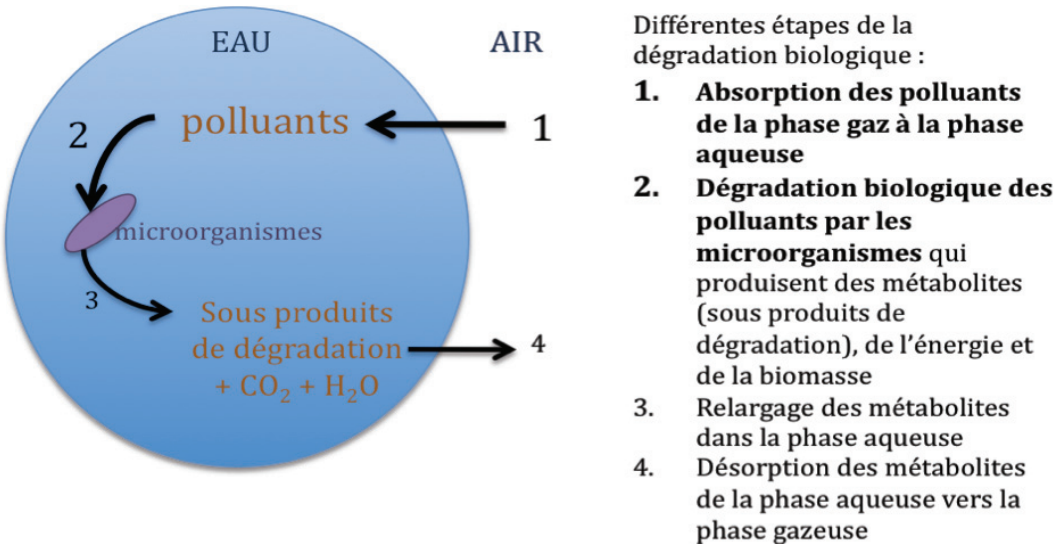


Figure I.11. Schéma de principe des transferts de polluants et de métabolites de biodégradation entre les phases aqueuse et gazeuse dans les bioprocédés de traitement de l'air (d'après Pré *et al.*, 2004).

Le processus d'épuration s'organise en deux étapes (figure I.11) :

- dans un premier temps, les polluants gazeux sont transférés dans la phase aqueuse (absorption),
- la seconde étape consiste en une biodégradation des composés par les microorganismes. Ceci permet la régénération de la phase aqueuse et favorise le transfert gaz/liquide des polluants.

La cinétique globale de ses deux phases est influencée par différents facteurs (Chapitre I, page 59) tels que (Kennes *et al.*, 2009 ; Kraakman *et al.*, 2011) :

- la nature des polluants à traiter (transfert, biodégradabilité),
- la biomasse microbienne (densité, diversité, structure, activité, fonction),
- la charge entrante (concentrations, vitesse de passage/temps de séjour),
- le matériau de garnissage utilisé (surface spécifique),
- les conditions opératoires (pH, température, humidité, oxygène, éléments nutritifs).

Les bioprocédés sont particulièrement adaptés au traitement d'effluents gazeux à fort débit, au delà de 100 000 $m^3.h^{-1}$, et à faible concentration, de quelques $mg.m^{-3}$ à plusieurs $g.m^{-3}$ (Fanlo, 2005 ; Kennes *et al.*, 2009). Ces techniques sont applicables à une large gamme de COV, dont les BTEX (Aizpuru *et al.*, 2001 ; Iranpour *et al.*, 2005 ; Haque *et al.*, 2012) et aux NOx (Jin *et al.*, 2005 ; Niu et Leung, 2010). De plus, ces procédés

présentent des coûts d'investissement et de fonctionnement modérés par rapport à ceux d'autres technologies de traitement de l'air (Prado *et al.*, 2009 ; Estrada *et al.*, 2012).

Le tableau I.6 présente les trois types de bioprocédés existant, classés en fonction de la mobilité de la phase aqueuse et de la biomasse.

Phase aqueuse	**Biomasse**	
	Libre	Fixée
Mobile	Biolaveur	Filtre percolateur
Immobile	-	Biofiltre

Tableau I.6. Classification des bioprocédés de traitement de l'air.

2.2.1. Biolaveur

Aussi appelé biofiltre à biomasse mobile, un biolaveur contient des microorganismes en suspension dans la phase liquide. Les étapes d'absorption et de biodégradation sont séparées spatialement. Le biolaveur est constitué, au minimum, de deux compartiments (figure I.12) : une tour d'absorption et un bioréacteur. La colonne d'absorption, conçue comme une tour de lavage chimique, peut être remplie ou non par un garnissage synthétique. Cette colonne permet le transfert des polluants de la phase gazeuse à la phase liquide. Le bioréacteur, ou bassin de boues activées, dans lequel se déroule l'étape de biodégradation, contient la biomasse en suspension. Ce compartiment est agité et oxygéné. L'ajout d'un décanteur peut s'avérer nécessaire pour certaines applications. Il permet de séparer la biomasse excédentaire de la phase aqueuse afin d'éviter son accumulation qui provoquerait le colmatage du réacteur.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

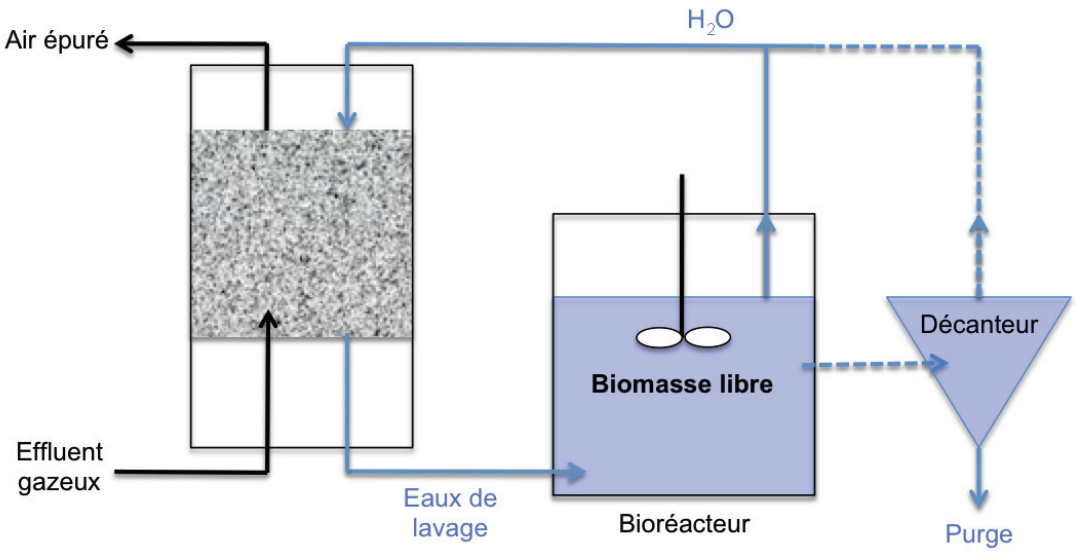


Figure I.12. Schéma de principe d'un biolaveur

Ce bioprocédé permet le traitement de polluants solubles dans l'eau et relativement concentrés (de l'ordre de quelques $g.m^{-3}$). Le contrôle des paramètres physico-chimiques est facilité par la circulation continue de l'eau. Les inconvénients de cette technique sont liés aux purges périodiques de la phase liquide obligatoires pour éviter l'accumulation de la biomasse au sein de la colonne de lavage mais aussi celle de sous-produits de dégradation potentiellement toxiques. Ces purges impliquent le traitement ultérieur des boues excédentaires et des eaux usées (Delhoménie et Heitz, 2005 ; Kennes *et al.*, 2009).

2.2.2. Les filtres percolateurs

Dans ce procédé, les phénomènes physique et biologique se déroulent dans un même compartiment et la biomasse est immobilisée. Les microorganismes adhèrent entre eux et forment un biofilm. Le développement d'un biofilm confère certains avantages par rapport aux systèmes planctoniques comme une augmentation de la densité locale de microorganismes ainsi que des activités métaboliques, et une protection contre des éléments toxiques ou inhibiteurs (Costerton *et al.,* 1994 ; Lazarova et Manem, 1995). Le garnissage utilisé est généralement synthétique. La circulation en continu de la phase aqueuse, contenant une solution nutritive, à travers le matériau de garnissage constitue la particularité du filtre percolateur (figure I.13).

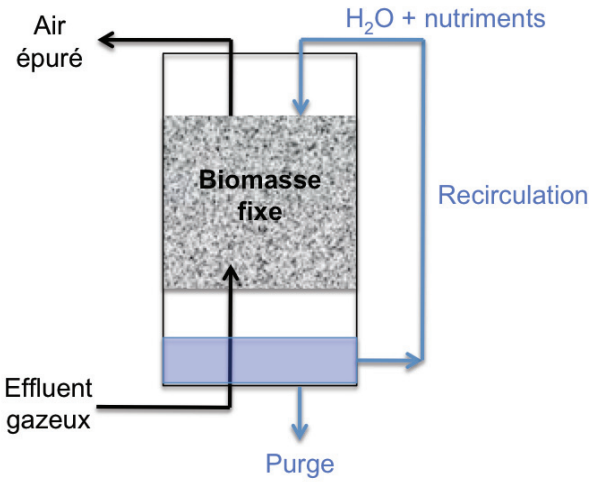


Figure I.13. Schéma de principe d'un filtre percolateur

Comme pour les biolaveurs, les filtres percolateurs sont adaptés au traitement de polluants facilement solubles dans l'eau. Ils peuvent traiter des débits importants à des concentrations relativement élevées (de quelques $mg.m^{-3}$ à 0,5 $g.m^{-3}$). Le contrôle des paramètres opératoires, tels que le pH et la quantité de nutriments, est facilité par la circulation de la phase aqueuse (Iranpour *et al.*, 2005 ; Delhoménie et Heitz, 2005).

En revanche, l'inoculation (Chapitre I, page 60) du système est indispensable et la croissance bactérienne doit être contrôlée pour éviter les risques de colmatage liés au développement du biofilm, impliquant l'augmentation des pertes de charges et donc de la consommation énergétique (Fanlo, 2005 ; Mudliar *et al.*, 2010).

2.2.3. Les biofiltres

Dans un biofiltre, la biomasse est fixée sur un garnissage organique ou inorganique et la phase aqueuse est immobile. Le passage de l'effluent gazeux pollué est forcé au travers du garnissage (figure I.14). La biodégradation des polluants a lieu au sein du biofilm formé par les microorganismes. Un système d'irrigation périodique permet de maintenir un taux d'humidité optimal du matériau support et d'apporter les éléments minéraux indispensables à la croissance de la biomasse.

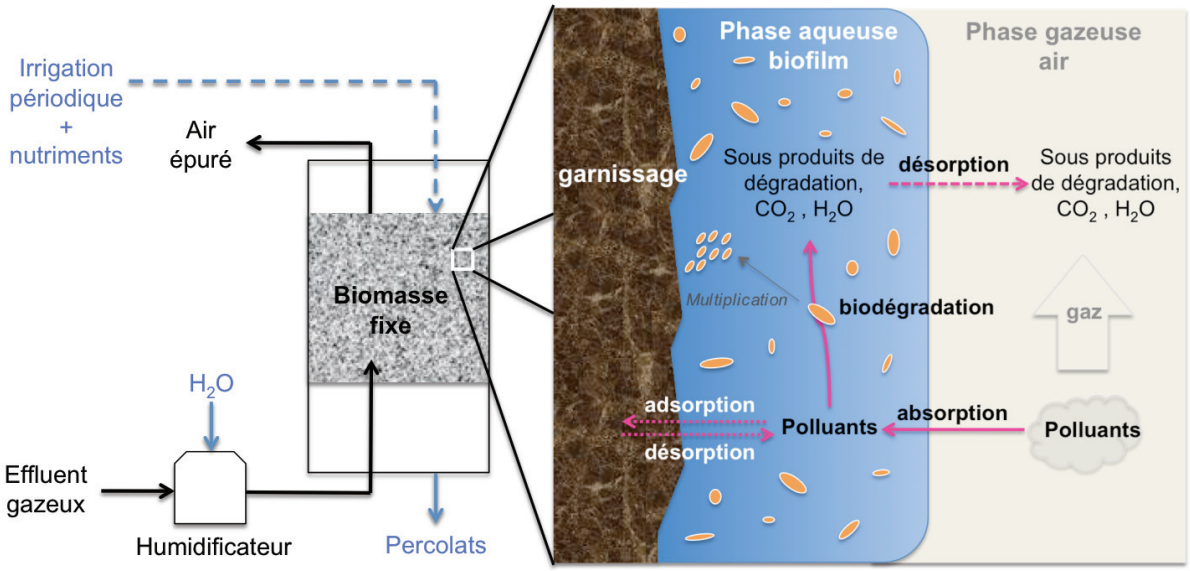


Figure I.14. Schéma de principe d'un biofiltre

La biofiltration est le procédé biologique le plus approprié pour le traitement de grands volumes d'air contenant des concentrations faibles de polluants (Mudliar *et al.*, 2010). Cette technique est la plus anciennement utilisée, ses premières applications datent de 1923 où des biofiltres, sous forme de lits de terre à ciel ouvert, étaient utilisés pour le traitement d'odeurs provenant des eaux d'égouts (Leson et Winer, 1991). Elle a fait l'objet d'un très grand nombre d'applications industrielles et est actuellement la plus couramment utilisée (Fanlo, 2005) en raison de sa relative facilité de mise en œuvre et des faibles coûts de fonctionnement (Schulz, 2009 ; Estrada *et al.*, 2012). Les limitations de la biofiltration résident dans la difficulté à éliminer certains composés récalcitrants et dans la lenteur des cinétiques de dégradation biologique, ce qui conduit à une emprise au sol très importante de ce procédé.

Depuis la fin des années 90, les recherches visant à améliorer les performances des biofiltres se sont concentrées sur :

- la compréhension des processus biologiques liés au fonctionnement de l'écosystème se développant dans le garnissage (Fanlo *et al.*, 1998 ; Khammar *et al.*, 2005 ; Maliyekkal *et al.*, 2004 ; Cabrol et Malhautier, 2011),

- les difficultés liées au transfert de masse des polluants entre les phases gazeuse et liquide (Paca *et al.*, 2010 ; Kraakman *et al.*, 2011).

Ces travaux sont réalisés essentiellement à l'échelle du laboratoire et mettent en œuvre des unités pilotes les plus représentatives possibles des biofiltres industriels utilisés pour le traitement de l'air. Ils visent principalement le traitement de gaz

contenant des concentrations en polluants mimant des émissions industrielles (Malhautier *et al.*, 2005 ; Guieysse *et al.*, 2008) qui sont généralement beaucoup plus élevées que celles rencontrées dans les PSC. De ce fait, les efficacités de traitement obtenues à partir de pilotes industriels sont difficilement extrapolables au traitement de l'air des PSC.

2.3. Paramètres opératoires de la biofiltration

Différents paramètres opératoires influencent les performances épuratoires des biofiltres. Ils peuvent être répartis en trois catégories :

- les compartiments du biofiltre (ou composantes physique et biologique) : nature et composition du matériau de garnissage, origine des microorganismes (inoculés ou indigènes),
- les paramètres physico-chimiques : température, taux d'humidité et pH,
- les paramètres caractérisant l'effluent gazeux : débit, vitesse de passage et temps de résidence théorique du gaz dans le garnissage, composition et concentration en polluants.

2.3.1. Compartiments du biofiltre

2.3.1.1. Composition du matériau de garnissage

Différents matériaux organiques et inorganiques sont utilisés en biofiltration. Parmi les garnissages organiques les plus utilisés, le compost (Delhoménie *et al.*, 2002a), les copeaux de bois (Chen *et al.*, 2008), les écorces de pin (Cabrol *et al.*, 2009), la tourbe (Aizpuru *et al.*, 2001), la fibre de coco (Martin *et al.*, 2004) et le sol (Nelson *et al.*, 2011) peuvent être cités. Des mélanges de matériaux organiques et inorganiques tels que du compost associé à de la perlite sont également utilisés comme garnissage de biofiltres (Corsi et Seed, 1995 ; Klapkova *et al.*, 2002). Il a été montré que la nature du matériau de garnissage a une forte influence sur les paramètres opératoires et les communautés microbiennes (Corsi et Seed, 1995 ; Hartung *et al.*, 2001 ; Ramirez-Lopez *et al.*, 2003 ; Martin *et al.*, 2004 ; Sakuma *et al.*, 2006 ; Alvarez-Hornos *et al.*, 2008 ; Habouzit *et al.*, 2011). Ceci est principalement dû aux propriétés physico-chimiques des garnissages tels

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

que leur surface spécifique, leur capacité de rétention en eau, leur capacité de sorption et le pH.

Les matériaux organiques sont beaucoup plus utilisés à l'échelle industrielle en raison de leur moindre coût et l'obtention de capacités d'élimination supérieures (Delhoménie et Heitz, 2005 ; Prado *et al.*, 2009 ; Estrada *et al.*, 2012). Ces avantages sont liés à plusieurs caractéristiques :

- la porosité : idéalement située entre 50 et 80%, elle favorise le transfert gaz/liquide, la fixation des microorganismes et la diversité des micro-niches (Mc Nevin et Bradford, 2000 ; Cohen, 2001),
- la capacité de rétention en eau : permet de réduire la fréquence de l'irrigation (Muldiar *et al.*, 2010),
- la capacité de sorption : permet le stockage de polluants en excès et leur relargage en cas de limitation, ce qui améliore la résistance du système aux fluctuations de charge en entrée (Chen *et al.*, 2004),
- le pouvoir tampon : permet de limiter la fréquence d'ajustement du pH (Kim *et al.,* 2000),
- la microflore indigène : permet la colonisation du biofiltre à partir des microorganismes initialement présents dans le garnissage (Mudliar *et al.*, 2010),
- l'apport de nutriments : représente une source énergétique supplémentaire pour la biomasse. Ceci permet de limiter les apports externes (Malhautier *et al.*, 2005 ; Govind et Narayan, 2005).

Les inconvénients des matériaux organiques sont liés à leur stabilité structurelle. Ils peuvent induire des pertes de charge supérieures à celles des matériaux inorganiques, ce qui implique un surcoût énergétique, et des problèmes de compaction augmentant le risque de colmatage (Delhoménie et Heitz, 2005, Estrada *et al.*, 2012). Pour limiter ces inconvénients, les matériaux organiques peuvent être utilisés en mélange avec des matériaux inorganiques, notamment avec de la perlite (Delhoménie et Heitz, 2005 ; Kennes *et al.*, 2009).

2.3.1.2. Microorganismes et inoculation

Les microorganismes sont les acteurs responsables de la biodégradation des polluants (Kennes *et al.*, 2009). Bien que leur développement et leur fonctionnement

soient influencés par l'ensemble des paramètres opératoires, ils représentent l'élément déterminant dans l'efficacité de la biofiltration. Ceci explique que les garnissages de biofiltres sont généralement inoculés (Cabrol et Malhautier, 2011). L'ensemencement peut être réalisé à partir (Pré *et al.*, 2004) :

- de boues activées diluées issues de stations d'épuration d'eaux usées,
- d'échantillons de sols ou d'eau contaminés par les composés cibles,
- de consortia bactériens enrichis au laboratoire ou de souches pures sélectionnées en fonctions des polluants à traiter,
- d'échantillons prélevés sur des biofiltres traitant des composés similaires.

Lors de la mise en œuvre de biofiltres à l'échelle industrielle, l'inoculation du garnissage par des boues de stations d'épuration est une pratique courante. Ces boues contiennent des communautés microbiennes denses et diverses mais non spécifiques aux polluants ciblés. Les communautés capables de dégrader les polluants sont sélectionnées au cours du fonctionnement du biofiltre durant une période dite « d'acclimatation » (Malhautier *et al.*, 2005).

La période d'acclimatation est définie, d'un point de vue biologique, comme le temps nécessaire à la sélection et la structuration spatiale d'un consortium microbien capable de dégrader efficacement les polluants à traiter (Bayle, 2005). Elle correspond donc à la mise en place d'un écosystème (Cabrol et Malhautier, 2011). Au niveau du fonctionnement d'un biofiltre, elle se rapporte à la « prise d'efficacité » du système, c'est-à-dire au délai requis pour atteindre un état stationnaire pendant lequel l'efficacité d'élimination des composés traités est maximale (Corsi et Seed, 1995). La durée de cette période dépend de nombreux facteurs, comme la complexité du gaz et les propriétés physico-chimiques des polluants traités, ainsi que des caractéristiques du garnissage par exemple (Corsi et Seed, 1995). La prise d'efficacité varie de quelques jours à quelques semaines (Cabrol et Malhautier 2011).

Certaines études ont montré que l'inoculation permet d'accélérer la prise d'efficacité et d'augmenter les performances d'un biofiltre, en termes de taux d'efficacité et de maintien des performances dans le temps (Prado *et al.*, 2005 ; Klapkova *et al.*, 2006 ; Ho *et al.*, 2008). Dans le cas des BTX, l'acclimatation de la communauté bactérienne au benzène ou au xylène (plus toxiques) favorise l'élimination du toluène (moins toxique) (Maliyekkal *et al.*, 2004).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

La nécessité d'ensemencer les biofiltres dépend de la biodégradabilité des polluants à traiter et de la nature du garnissage utilisé. Dans le cas de l'utilisation de garnissages organiques, tels que le compost, la tourbe ou le sol, colonisés par une microflore indigène (Delhoménie et Heitz, 2005 ; Kennes *et al.*, 2009), l'inoculation n'est pas indispensable. Il a été récemment mis en évidence que la communauté microbienne des biofiltres est principalement influencée par la composition de la biomasse indigène du support, et, dans une moindre mesure, par l'apport de l'inoculum (Cabrol *et al.*, 2012). Les microorganismes se développant naturellement dans le garnissage sont mieux adaptés à celui-ci et occupent l'espace. Ceux qui possèdent le potentiel métabolique nécessaire à la dégradation des polluants traités sont sélectionnés au cours de la phase d'acclimatation (Kennes *et al.*, 2009).

De nombreux microorganismes (bactéries et champignons) sont connus pour leurs capacités à dégrader une grande diversité de polluants (Mudliar *et al.*, 2010). La troisième partie de cette synthèse bibliographique est consacrée aux acteurs de la biodégradation des composés ciblés dans cette étude, ainsi qu'aux voies métaboliques mises en jeu (Chapitre I, page 73).

2.3.2. Paramètres physico-chimiques

2.3.2.1. Température

Les biofiltres fonctionnent généralement à température ambiante. La température de fonctionnement d'un biofiltre est affectée par les réactions biologiques exothermiques qui ont lieu dans le garnissage mais elle est essentiellement conditionnée par la température de l'effluent gazeux (Fanlo, 2005). Ce paramètre a une influence importante sur les performances épuratoires du biofiltre puisqu'il conditionne non seulement l'activité des microorganismes contenus dans le biofiltre mais aussi la solubilité des polluants.

Les communautés microbiennes se développant dans les biofiltres sont généralement mésophiles, c'est-à-dire adaptées à une gamme de température de 20°C à 45°C (Delhoménie et Heitz, 2005 ; Malhautier *et al.*, 2005). Pour le traitement des BTEX, la température optimale se situe entre 20°C et 32°C (Lu *et al.*, 1999 ; Yoon et Park, 2002 ; Darlington *et al.*, 2001 ; Alvarez-Hornos *et al.*, 2008). Dans le cas du traitement du

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

toluène par un biofiltre de tourbe, Sorial *et al.* (1997) ont montré que l'activité de dégradation augmente lorsque la température augmente sur une plage de 11°C à 32°C.

Toutefois, si des températures plus élevées favorisent l'activité des microorganismes, elles diminuent la solubilité des polluants dans la phase aqueuse (Vergara-Fernandez *et al.*, 2007 ; Kraakman *et al.*, 2011). Lors de l'utilisation d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de TEX à très faible concentration, Darlington *et al.* (2001) ont montré que l'activité biologique du biofiltre est optimale sur une plage de température comprise entre 23 et 26°C. La température optimale de dégradation peut être diminuée en augmentant la vitesse de passage de l'effluent pollué dans le biofiltre (Darlington *et al.*, 2001).

Peu de systèmes de biofiltration sont spécifiquement développés pour fonctionner à des températures comprises entre 0°C et 10°C (Mc Nevin et Bradford, 2000 ; Delhoménie et Heitz, 2005). Mc Nevin et Bradford (2000) citent des travaux réalisés par Pinette *et al.* (1994) révélant que des températures inférieures à 10°C n'affectent pas l'efficacité de traitement lorsque l'état stationnaire est atteint.

2.3.2.2. Humidité relative

Le taux d'humidité du garnissage est un paramètre crucial pour garantir l'efficacité du système. Il est affecté principalement par l'humidité de l'effluent gazeux à traiter car le passage permanent d'air au travers du biofiltre provoque naturellement un assèchement du garnissage. Par ailleurs, les réactions de biodégradation tendent à réchauffer le biofiltre entraînant une évaporation d'eau (Morales *et al.*, 2003). Tout comme la température, l'humidité conditionne à la fois le développement et l'activité des microorganismes mais aussi la disponibilité des polluants.

Le taux d'humidité recommandé est généralement compris entre 40% et 60% (Delhoménie et Heitz, 2005 ; Malhautier *et al.*, 2005). Pour le traitement du toluène, Shareefdeen *et al.* (2010) ont observé une augmentation de l'efficacité de biofiltration lorsque le taux d'humidité augmente de 30% à 50%. Par contre, les performances diminuent pour des niveaux d'humidité du garnissage de l'ordre de 70%.

Un taux d'humidité trop bas modifie la structure et la physiologie de la communauté bactérienne, réduit l'activité microbienne et favorise le développement des levures et champignons (Khammar, 2002 ; Sun *et al.*, 2002 ; Prenafeta-Boldu *et al.*, 2012). Un taux

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

d'humidité faible réduit la biodisponibilité des polluants en diminuant l'étape de transfert gaz/liquide (Alvarez-Hornos *et al.*, 2008). La déshydratation de certains garnissages organiques peut entraîner des dysfonctionnements irréversibles tels que le développement de fissures, à l'origine de chemins préférentiels du gaz (Mudliar *et al.*, 2010). De plus, certains garnissages organiques, comme la fibre de coco, deviennent hydrophobes une fois asséchés et sont très difficiles à ré-humidifier.

A l'inverse, un taux d'humidité trop élevé provoque une augmentation de la compaction du garnissage et des pertes de charge, limite le transfert des polluants de la phase gazeuse vers la phase aqueuse et favorise la formation de zones anoxiques (Pré *et al.*, 2004 ; Kennes *et al.*, 2009).

Afin de maintenir un taux d'humidité optimal, l'effluent à traiter est pré-humidifié, généralement à saturation (Corsi et Seed, 1995). Cette étape permet également d'éliminer les particules avant l'entrée dans le biofiltre (Iranpour *et al.*, 2005). Un système d'arrosage périodique en surface permet l'ajustement du taux d'humidité du biofiltre ainsi que l'ajout d'éléments nutritifs indispensables à la biomasse (Jorio *et al.*, 2000 ; Delhoménie *et al.*, 2001 ; Sheridan *et al.*, 2003).

2.3.2.3. pH

Le pH a une influence non négligeable sur les performances de la biofiltration (Lu *et al.*, 2002) car il conditionne l'état d'ionisation des solutés, leur taux de transfert et le développement des microorganismes. Les communautés microbiennes présentent dans les biofiltres sont généralement neutrophiles, c'est-à-dire adaptées à une gamme de pH de 6 à 8 (Delhoménie et Heitz, 2005 ; Malhautier *et al.*, 2005).

Lors de l'utilisation d'un biofiltre pour le traitement des NOx, Barnes *et al.* (1995) ont observé une dégradation optimale du NO pour des pH compris entre 6 et 7.

Lu *et al.* (2002) ont observé une dégradation des BTEX optimale à un pH de 7,5, l'activité de dégradation étant réduite de 20% à pH 5 ou 8,5. Cependant, des études ont montré que la dégradation des BTEX peut également avoir lieu pour des pH compris entre 4 et 6, grâce au développement de champignons (Aizpuru *et al.*, 2001 ; Kennes et Veiga, 2004 ; Mohammad *et al.*, 2007).

2.3.3. Caractéristiques de l'effluent gazeux

2.3.3.1. Débit, vitesse de passage et temps de résidence théorique du gaz

Le tableau I.7 présente les formules et les unités utilisées pour le calcul de ces trois paramètres reliés entre eux et permettant de déterminer les dimensions des biofiltres.

Paramètres	Formules	Unités utilisées
Débit de l'effluent	$Q = V_{air} / T$	- Q : Débit ($m^3.h^{-1}$) - V_{air}: Volume d'air à traiter (m^3) - T : Temps (h)
Vitesse de passage de l'air (en entrée de biofiltre)	$U = Q / S$	- U : Vitesse de l'air ($m.h^{-1}$) - Q : Débit ($m^3.h^{-1}$) - S : Surface du garnissage (m^2)
Temps de résidence théorique ou temps de résidence en fût vide	$EBRT = V_{garnissage} / Q$ ou $EBRT = H_{garnissage} / U$	- EBRT : Temps de résidence théorique (s) - Q : débit ($m^3.s^{-1}$) - $V_{garnissage}$: Volume de garnissage (m^3) - $H_{garnissage}$: Hauteur de garnissage (m) - U : Vitesse de l'air ($m.s^{-1}$)

Tableau I.7. Formules et unités utilisées pour le calcul des paramètres caractérisant l'effluent gazeux à traiter.

Le débit correspond au volume d'air à traiter par unité de temps, exprimé généralement en m^3 par heure.

La vitesse de passage de l'air est fonction du débit et de la surface du biofiltre. Exprimée le plus souvent en mètre par heure (parfois en mètre par seconde), elle est considérée en entrée de biofiltre car la porosité du garnissage, plus ou moins importante, entraîne une augmentation de la vitesse réelle du gaz dans le biofiltre. La vitesse moyenne de passage de l'effluent gazeux dans un biofiltre est de l'ordre de 50 à 150 $m.h^{-1}$ (Kennes *et al.*, 2009). Ces valeurs faibles peuvent s'expliquer par la lenteur des cinétiques de biodégradation des composés et engendrent des surfaces au sol importantes (Pré *et al.*, 2004). Plus le polluant est récalcitrant à la dégradation, plus la vitesse de passage de l'effluent gazeux doit être faible (Jorio *et al.*, 2000) et donc la surface du biofiltre élevée.

Le temps de résidence théorique du gaz dans le biofiltre (appelé également temps de séjour, « temps de résidence en fût vide » ou EBRT pour Empty Bed Residence Time)

représente le rapport entre le volume de garnissage et le débit, ou entre la hauteur du garnissage et la vitesse de passage de l'air. Tout comme la vitesse de passage de l'air, ce paramètre est calculé de façon théorique, en considérant que le biofiltre est vide. La porosité du garnissage, augmentant la vitesse de passage de l'air, implique un temps de résidence réel plus court que l'EBRT. Il est généralement exprimé en seconde et dépend du garnissage utilisé ainsi que de la nature et la concentration des polluants à traiter. Dans la plupart des études, l'EBRT est compris entre 10 s et quelques minutes (Corsi et Seed, 1995 ; Delhoménie et Heitz, 2005 ; Kennes *et al.*, 2009). Un EBRT court a un impact négatif sur les capacités d'élimination des biofiltres (Elmrini *et al.*, 2004) en raison de son influence simultanée sur :

- les phénomènes physico-chimiques : réduction des mécanismes de diffusion et de transfert des polluants de la phase gazeuse vers la phase aqueuse (biofilm) (Kraakman *et al.*, 2011),
- les processus biologiques : diminution de la biodisponibilité des polluants pour la microflore et du temps de contact entre polluants et microorganismes (Delhoménie et Heitz, 2005), augmentation de la charge en polluants pouvant devenir toxique pour les microorganismes (Corsi et Seed, 1995).

Plus le polluant est récalcitrant à la dégradation, peu soluble ou fortement concentré, plus l'EBRT doit être élevé, ce qui implique un volume de garnissage important (Delhoménie et Heitz, 2005).

2.3.3.2. Qualité de l'effluent : cas des mélanges de polluants

La plupart des études en laboratoire se focalisent sur le traitement d'effluents mono-polluants. Cependant, à l'échelle de la pollution urbaine et dans le cas particulier des émissions de PSC, les effluents gazeux à traiter sont chargés d'un mélange complexe de composés. Cette particularité entraîne des différences de performances épuratoires considérables par rapport au traitement d'un seul polluant, à la fois en termes de :

- prise d'efficacité : pour atteindre un taux d'abattement de 98 %, Corsi et Seed (1995) ont montré une prise d'efficacité de 11 jours pour le traitement d'un mélange de BTX contre seulement 24h pour le toluène seul,
- et de capacités d'élimination (Shim *et al.*, 2006 ; Lee et Cho, 2009 ; Chan et Lai, 2010) : la capacité d'élimination d'un mélange de composés étant systématiquement inférieure à celle d'un composé isolé.

Il paraît donc difficile d'extrapoler les performances obtenues en système mono-polluant à des systèmes de traitement de pollution complexe. En effet, la capacité d'élimination d'un biofiltre n'est pas la même pour tous les composés d'un mélange. Un ordre de dégradation s'établit dans le temps (cinétiques de dégradation) et dans l'espace (stratification des activités) (Deshusses *et al.*, 1999 ; Deshusses et Johnson, 2000 ; Aizpuru *et al.*, 2001 ; Khammar *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2005 ; Qi et Moe, 2006 ; Cai *et al.*, 2007 ; Cho *et al.*, 2007 ; Mathur et Majumber, 2008 ; Sempere *et al.*, 2008, Cabrol *et al.*, 2012). Les différences de performance observées pour les différents composés peuvent s'expliquer par une combinaison de phénomènes physico-chimiques et biologiques (Aizpuru *et al.,* 2001). Les interactions positives ou négatives entre substrats et microorganismes, tels que le cométabolisme ou les phénomènes d'inhibition, peuvent entraîner la dégradation préférentielle de certains composés. Plusieurs auteurs ont mis en évidence une corrélation positive entre l'ordre d'élimination et la disponibilité du composé dans le biofilm, estimée par sa constante de Henry (Deshusses et Johnson, 2000 ; Zhu *et al.,* 2004 ; Ikemoto *et al.,* 2006). Le biofilm n'étant pas une phase purement aqueuse, mais plutôt organique, l'ordre d'élimination est également influencé par l'hydrophobicité des polluants.

Pour les BTEX, l'ordre de biodégradation varie selon les conditions de fonctionnement (Maliyekkal *et al.*, 2004 ; Mathur *et al.*, 2007 ; Dou *et al.*, 2008 ; Lee et Cho, 2009). Les cinétiques de dégradation du toluène et l'éthylbenzène sont plus rapides que celle du xylène. Le niveau d'abattement du méta-xylène est supérieur à celui des isomères ortho et para.

Le traitement conjoint des NOx et des BTEX a été très peu étudié dans les biofiltres mais la capacité des bactéries dénitrifiantes à dégrader les BTEX a été démontrée en conditions anaérobie (Evans *et al.*, 1991 ; Fries *et al.*, 1994) et aérobie (Shinoda *et al.*, 2004). Ces travaux permettent de suggérer l'existence d'un potentiel de dégradation des NOx au sein de ces biofiltres.

2.3.3.3. Concentration de l'effluent : cas des faibles concentrations

Durant le processus de biodégradation, la concentration en polluant a un impact important sur l'activité des microorganismes et donc sur le taux d'abattement de ce polluant. Les voies métaboliques impliquées dans la dégradation des BTEX et des NOx sont en effet codées par des gènes inductibles c'est-à-dire transcrits en présence du

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

polluant (Chapitre I, pages 77 et 84). Dans le cas du traitement de l'air issu de PSC qui contient de très faibles concentrations en polluants, la biodisponibilité des composés est donc un paramètre prépondérant.

Très peu de données existent en ce qui concerne l'efficacité des bioprocédés pour le traitement de gaz contenant de très faibles concentrations en composés (quelques dizaines ou centaines de µg. m^{-3}). Une étude récente, menée sur le traitement de l'air intérieur, a mis en évidence un abattement de 55 à 99 % du toluène à une concentration comprise entre 14 et 81 µg.m^{-3} par biofiltration (Ondarts *et al.*, 2012).

Les systèmes biologiques mis en place pour le traitement de l'air intérieur font fréquemment intervenir des plantes (phytoremédiation ou biofiltre végétal). Darlington *et al.* (2001) ont observé des niveaux d'abattements variant de 20 à 60 % pour le toluène à une concentration initiale comprise entre 226 et 301 µg.m^{-3} grâce à un biofiltre végétalisé.

Bien que la pollution de l'air intérieur présente des concentrations très faibles en polluants, elle n'est pas pour autant représentative de la pollution atmosphérique urbaine de par la composition et les abondances relatives des polluants (Guieysse *et al.*, 2008). A l'heure actuelle, il n'a été recensé aucune étude utilisant la biofiltration pour traiter de BTEX à des concentrations équivalentes à celles rencontrées dans les PSC.

2.4. Biofiltre végétalisé

2.4.1. Utilisation des plantes

L'utilisation des plantes pour le traitement biologique de l'air est un concept qui voit le jour dans les années 80 avec les travaux pionniers du Dr Wolverton (1984) et de ses collaborateurs. Ces chercheurs de la NASA souhaitaient évaluer les capacités d'épuration de l'air des plantes d'intérieur pour améliorer l'atmosphère des futures stations spatiales. Ils ont démontré les capacités d'abattement de COV par 50 espèces de plantes. Les expérimentations menées entre 1984 et 1996 ont suggéré que le procédé fait intervenir conjointement les plantes et les microorganismes présents dans la motte. Depuis, de nombreuses études ont été réalisées pour démontrer les capacités des plantes d'intérieur à éliminer les COV, tels que les BTEX, contenus dans l'air intérieur et pour déterminer les mécanismes impliqués (figure I.15).

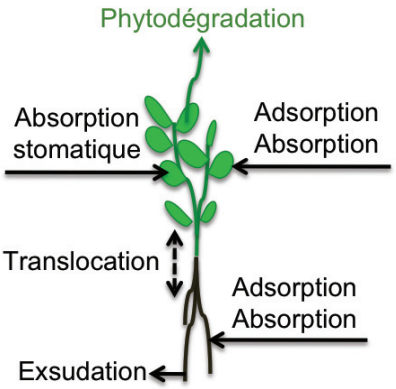


Figure I.15. Principaux mécanismes impliqués dans la phytoremédiation de l'air.

Les processus mis en œuvre sont l'absorption et l'adsorption à la surface des parties aériennes (cuticule) ainsi que l'absorption stomatique (Beattie et Seibel, 2007 ; Korte *et al.*, 2000). Ces polluants peuvent donc être séquestrés, détoxifiés ou métabolisés pour être transformés en CO_2 et en eau (Ugrekhelidze *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2000; Howsam *et al.*, 2001; Komp et McLachlan, 2001; Peck et Hornbuckle, 2001).

Plusieurs espèces de plantes, essentiellement des plantes d'intérieur (telles que *Spathiphyllum sp.*, *Chlorophytum elatum*, *Ficus sp.* et *Hedera helix* pour les plus connues), ont montré des capacités à éliminer le benzène (Wolverton *et al.*, 1985 ; Orwell *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2009). L'élimination des TEX a également fait l'objet d'études (Wolverton *et al.*, 1989 et 1993 ; Wood *et al.*, 2006 ; Orwell *et al.*, 2006 ; Yang *et al.,* 2009). La capacité d'élimination des BTEX varie considérablement d'une espèce à l'autre et en fonction du polluant considéré (Yoo *et al.*, 2006). Pour le benzène, par exemple, des niveaux d'abattement de 40 à 88 mg de benzène par m^3 d'air et par jour ont pu être atteints (Orwell *et al.*, 2006).

A ce jour, un nombre limité de plantes d'intérieur et une gamme de polluants restreinte au benzène et au formaldéhyde ont été testés pour évaluer l'efficacité de la phytoremédiation dans le traitement de l'air intérieur (Wolverton *et al.*, 1989 ; Ugrekhelidze *et al.*, 1997 ; Wood *et al.*, 2006).

2.4.2. Filtre botanique et biofiltre végétalisé

Les filtres botaniques et les biofiltres végétalisés sont deux types de procédés dans lesquels les capacités épuratrices des bactéries et des plantes sont utilisées pour éliminer les polluants. Ces procédés plantés constituent une alternative intéressante et

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

socialement acceptable en raison de leur aspect esthétique (Darlington *et al.*, 2001 ; Nelson et Wolverton, 2011).

Les filtres botaniques sont utilisés exclusivement dans le cadre du traitement de l'air intérieur d'habitat. La figure suivante (figure I.16) présente différents procédés de filtre botanique, sous forme de pot (biofiltre horizontal) ou sous forme de mur (biofiltre vertical).

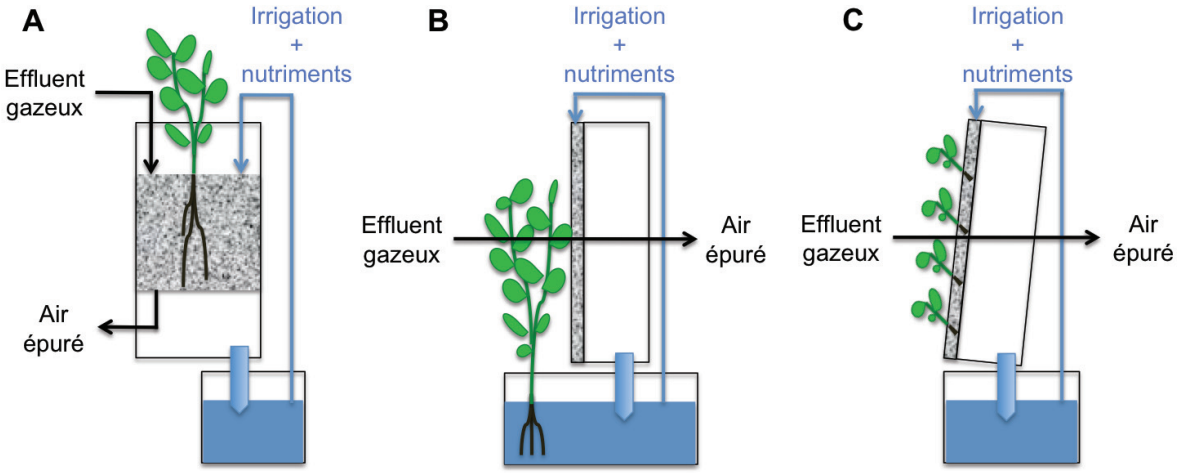


Figure I.16. Principe de fonctionnement de trois types de biofiltres hydroponiques plantés utilisés pour le traitement de l'air intérieur d'habitat. A : biofiltre horizontal sous forme de pot (Wang *et al.*, 2011). B et C : biofiltres verticaux sous forme de mur (Darlington *et al.*, 2001 ; Brevet : US-6727091, Darlington, 2004).

Le procédé repose sur la culture hydroponique de plante, ce qui implique une circulation constante d'une solution nutritive. L'air à traiter passe à travers le feuillage des plantes avant de traverser le garnissage qui est généralement inorganique :

- un mélange de charbon actif et de galet de schiste (figure I.16A) dans le cas de Wang *et al.* (2011),
- des pierres de lave disposées en parallèle (figure I.16B) dans le cas de Darlington *et al.* (2001).

Toutefois, il peut également être organique car le brevet américain US-6727091 déposé par Darlington en 2004 mentionne la possibilité d'utiliser de la fibre de coco comme support de culture des plantes.

Ces systèmes ont montré des capacités d'abattement de l'ordre de 20% pour le benzène (Darlington, 2004), de 20 à 60% pour le toluène (Darlington *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2011 et 2012) et de 60 à 90% pour le formaldéhyde (Darlington, 2004 ; Wang *et al.*, 2012). En plus d'améliorer la qualité de l'air intérieur, ils permettraient de réduire la

ventilation des habitations de 20% et d'économiser 10 à 15% de l'énergie consommée par les systèmes de climatisation (Wang *et al.*, 2011).

Les performances épuratoires de ces filtres botaniques restent cependant limitées en ce qui concerne les BTEX. De plus, le fonctionnement de ces biofiltres implique une consommation d'eau importante.

Le biofiltre planté évalué au cours de cette étude n'utilise pas l'hydroponie comme mode de culture des plantes. Il présente le même principe de fonctionnement qu'un biofiltre classique (figure I.17). Ce procédé implique toutefois le recours à un garnissage organique dans lequel les racines des plantes peuvent se développer. Le fonctionnement de ce biofiltre s'appuie sur les capacités de bioremédiation des microorganismes rhizosphériques et les capacités épuratrices des plantes (consommation de CO_2, fixation des COV...). La motte de sol des plantes apporte une microflore rhizosphérique riche et diversifiée susceptible de contenir des communautés microbiennes capables de dégrader les polluants (COV, NOx ...) en les utilisant comme sources de carbone et d'énergie (Le Roux *et al*,. 2003 ; Kim *et al.*, 2008b ; Burchett *et al.*, 2009 ; Glick, 2010).

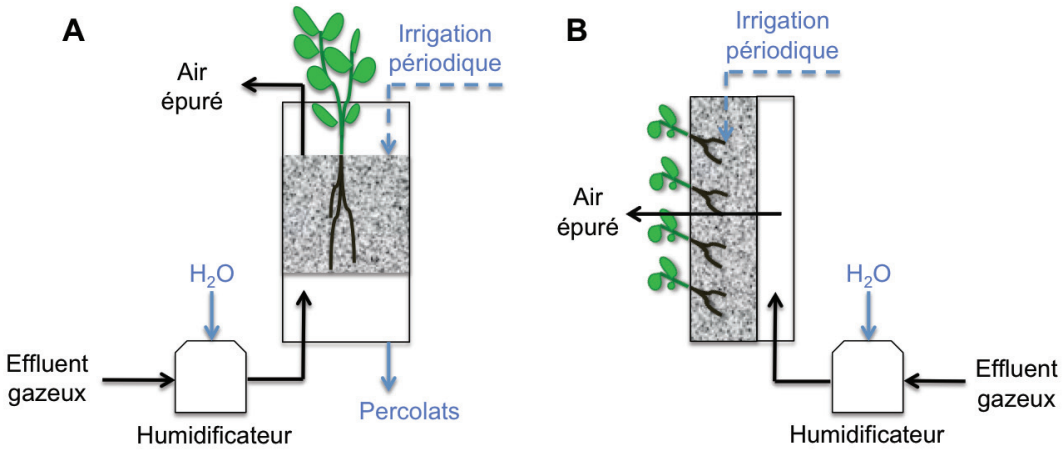


Figure I.17. Principe de fonctionnement du biofiltre planté utilisé au cours de l'étude. A : biofiltre horizontal sous forme de jardin. B : biofiltre vertical sous forme de mur végétalisé (Brevet : FR-2968891, Peleszezak, 2012).

Ce système vise le traitement de l'air provenant de tunnels routiers, de PSC ou de gares routières et ferroviaires. L'air à traiter est humidifié, puis est forcé au travers du garnissage où se développent les microorganismes et les racines avant de traverser le feuillage des plantes (Peleszezak, 2012). Actuellement, deux biofiltres végétalisés de ce type, sous forme de mur végétal, sont installés en France. L'un se trouve à Lyon, traitant

l'air provenant d'un PSC au Centre d'Echange de Lyon Perrache (2007) et l'autre dans la gare ferroviaire Magenta à Paris (2009).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat*.

3. Acteurs et mécanismes impliqués dans la biodégradation des polluants cibles

3.1. Biodégradation des BTEX

3.1.1. Mécanismes et voies de biodégradation des BTEX

La dégradation des BTEX, comme des autres composés aromatiques, est divisée en deux étapes qui peuvent être schématisées sous la forme d'un entonnoir (figure I.18).

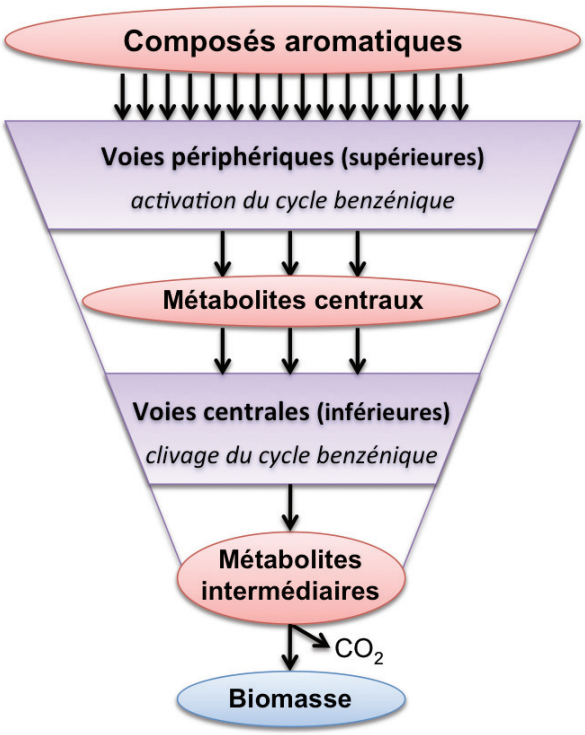


Figure I.18. Schéma de principe des deux étapes de biodégradation des composés aromatiques par les microorganismes (d'après Fuchs *et al.*, 2011).

- Première étape, voies périphériques (ou voies supérieures) :

La stabilité du cycle benzénique rend difficile l'étape initiale de dégradation des BTEX. Une « activation » du cycle est donc un préalable indispensable à sa destruction. De nombreuses voies périphériques existent. Spécifiques d'un composé, elles permettent la transformation d'une grande variété de composés organiques en quelques molécules intermédiaires clefs, comme le catéchol ou le protocatéchuate (en conditions aérobies) et le benzoyl-CoA (en conditions anaérobies). Ces molécules intermédiaires sont également appelées métabolites centraux.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

- Seconde étape, voies centrales (ou voies inférieures) :

Le cycle benzénique oxydé des métabolites centraux peut ensuite être détruit via les voies centrales. Ces voies permettent la transformation des métabolites centraux en CO_2 et métabolites intermédiaires qui seront utilisés directement pour la croissance des microorganismes.

Selon la disponibilité en oxygène du milieu où se développent les microorganismes dégradant les BTEX, les voies métaboliques mises en jeu diffèrent.

En condition aérobie, l'oxygène joue le rôle d'accepteur d'électrons. L'attaque initiale du cycle benzénique est réalisée par des mono ou dioxygénases. Chaque BTEX présente au moins une voie périphérique aboutissant au catéchol, qui peut être substitué. Le toluène peut également être transformé en protocatéchuate (figure I.19). Le cycle aromatique de ces intermédiaires centraux est ensuite rompu par l'action de dioxygénases qui peuvent intervenir entre les deux groupements hydroxyle (ortho-clivage) ou à proximité d'un des deux groupes hydroxyles (méta-clivage). Ces voies centrales aboutissent à la formation de pyruvate, acétaldéhyde, succinate et acétyl-CoA utilisés directement pour la croissance des microorganismes via le cycle de Krebs.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

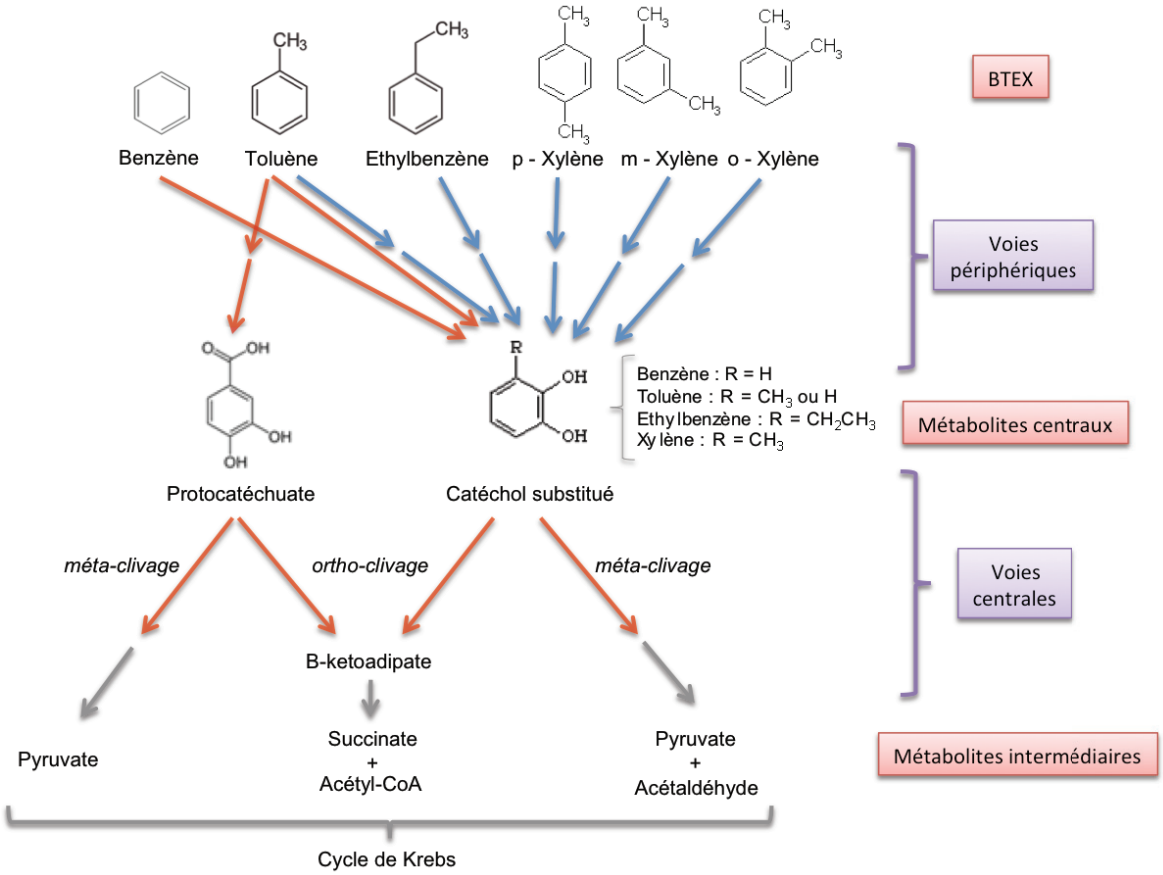


Figure I.19. Principales voies aérobies de biodégradation des BTEX. Flèches rouges : dioxygénases, flèches bleues : monooxygénases, flèches grises : autres réactions (d'après Cao *et al.*, 2009 ; Fuchs *et al.*, 2011 ; Stephens, 2012).

En conditions anaérobies, la présence d'autres accepteurs d'électrons comme le nitrate, le fer (III) et le sulfate sont nécessaires (Chakraborty et Coates, 2004). Les voies périphériques de biodégradation des BTEX convergent vers le benzoyl-CoA (figure I.20). Elles impliquent donc la présence d'un co-substrat et une consommation d'énergie sous forme d'ATP. La destruction du cycle benzénique est ensuite catalysée par des réductases spécifiques permettant la formation d'acétyl-CoA et de CO_2 (Fuchs *et al.*, 2011 ; Stephens, 2012).

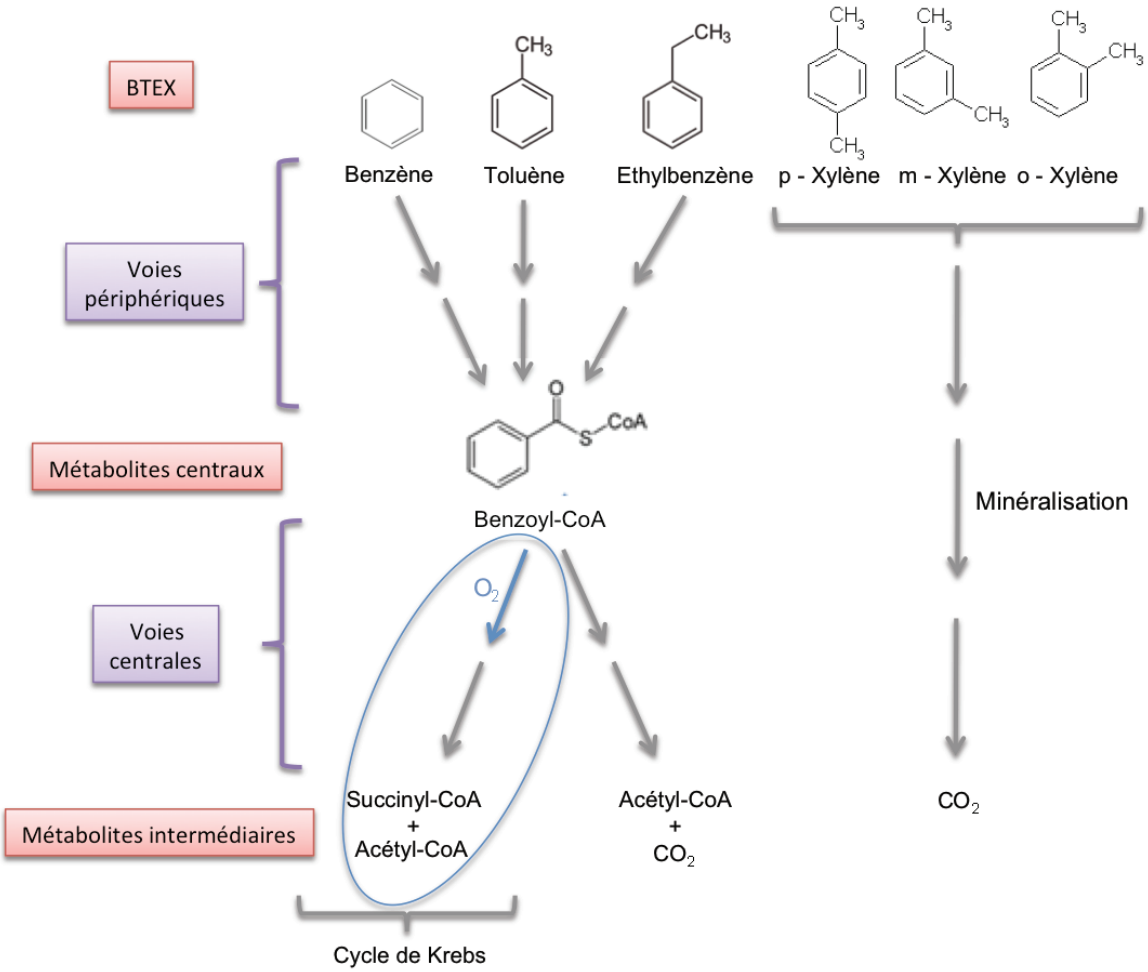


Figure I.20. Principales voies anaérobies de biodégradation des BTEX. Entourée en bleu : voie aérobie en présence fluctuante d'oxygène, flèche bleue : monooxygénases, flèches grises : autres réactions (Fuchs *et al.*, 2011 ; Stephens, 2012).

Lorsque la présence d'oxygène est fluctuante, une combinaison des voies aérobie et anaérobie est possible (figure I.20). Le benzoyl-CoA est alors oxydé via une chaîne de réaction NADPH dépendante aboutissant à la formation d'acétyl-CoA et de succinyl-CoA (Fuchs *et al.*, 2011).

3.1.2. Microorganismes impliqués dans la dégradation des BTEX

Une grande variété de microorganismes est capable d'utiliser les BTEX comme source de carbone. Ces microorganismes ont pu être isolés de différents environnements tels que les eaux ou les sols pollués mais également de procédés de traitement tel que les STEP ou les biofiltres.

Le tableau suivant (tableau I.8) regroupe les principaux genres bactériens connus pour dégrader les BTEX en aérobiose (Parales *et al.*, 2000 et 2008 ; Kim *et al.*, 2008a ; Farhadian *et al.*, 2008 ; Cao *et al.*, 2009 ; Chikere *et al.*, 2011) ou en anaérobiose (Kim *et*

al., 2002 ; Chakraborty *et al.*, 2005 ; Weelink *et al.*, 2010) ainsi que quelques champignons également capables d'utiliser les BTEX comme source de carbone (Yadav et Reddy, 1993 ; Auria *et al.*, 2000 ; Prenafeta-Boldu *et al.*, 2002 ; Estevez *et al.*, 2005 ; Cao *et al.*, 2009).

Genres	BTEX dégradés	Genres	BTEX dégradés
Bactéries			
Acinetobacter	BTE	*Desulfosarcina*	Xylène
Alcaligenes	Benzène	*Geobacter*	Toluène Benzène
Azoarcus	Toluène	*Planococcus*	BTEX
Arthrobacter	BTX	*Pseudomonas*	Toluène BTX
Bacillus	Toluène BTEX	*Pseudoxanthomonas*	BTEX
Blastochloris	Toluène	*Ralstonia*	Toluène
Burkholderia	Toluène	*Rhodococcus*	BTEX
Dechloromonas	Benzène	*Sphingomonas*	Toluène
Desulfobacerium	Xylène	***Thaurea***	Toluène Ethylbenzène
Desulfobacula	Toluène	*Thermus*	BTEX
Champignons			
Cladophialophora	BTEX	*Phanerochaete*	BTEX
Exophiala	Toluène	*Scedosporium*	Toluène
Paecilomyces	Toluène	*Trametes*	BT

Tableau I.8. Principaux microorganismes connus pour dégrader les BTEX. En gras : genres bactériens dégradant les BTEX en anaérobiose.

3.1.3. Enzymes et gènes impliqués

Les voies de biodégradation des BTEX ont été beaucoup étudiées, particulièrement les enzymes et gènes impliqués dans la dégradation du benzène et du toluène, ainsi que, dans une moindre mesure, de l'éthylbenzène. Les voies de dégradation des xylènes ont fait l'objet d'une attention mineure.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Dans la mesure où les voies périphériques sont variées entre les BTEX et pour chaque composé, nous avons retenu l'exemple du toluène pour illustrer la diversité de ces voies périphériques. Pour les voies centrales, les voies méta et ortho seront décrites.

3.1.3.1. Voies périphériques : exemple du toluène

Cinq voies périphériques ont été décrites concernant la dégradation du toluène en aérobiose. Elles aboutissent au catéchol, au 3-métylcatéchol ou au protocatéchuate (figure I.21).

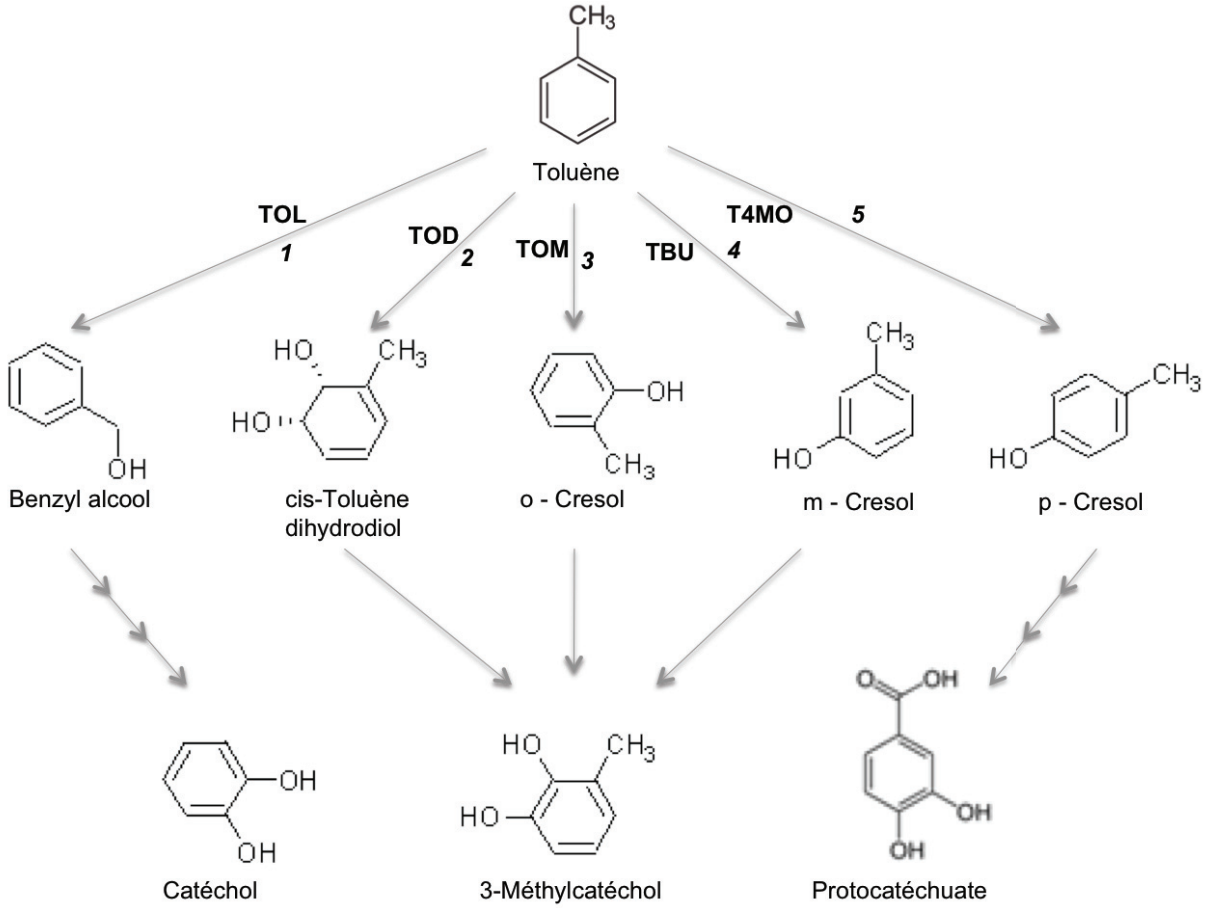


Figure I.21. Cinq voies périphériques de dégradation du toluène. En majuscule : le nom des opérons. 1 : *Pseudomonas putida* MT-2, 2 : *P. putida* F1, 3 : *Burkholderia vietnamiensis* G4, 4 : *Ralstonia picketti* PKO1, 5 : *P. mendocina* KR1 (d'après Gulensoy et Alvarez, 1999 ; Parales *et al.*, 2008 ; Cao *et al.*, 2009).

Ces voies sont codées par des gènes organisés en opérons dont la localisation peut être chromosomique (TOD chez *Pseudomonas putida* F1 et TBU chez *R. picketti* PKO1) ou plasmidique tels que TOL (*P. putida* MT-2) et TOM (*B. vietnamiensis* G4) (tableau I.9).
La localisation de T4MO n'a pas encore été décrite à ce jour (Gulensoy et Alvarez, 1999 ; Parales *et al.*, 2008).

Opéron	Localisation	Gènes	Type d'enzyme	Bactérie
TOL	Plasmide	*xylUWCMABN*	monooxygénase	*Pseudomonas putida* MT-2
TOD	Chromosome	*todC1C2BA*	dioxygénase	*P. putida* F1
TOM	Plasmide	*tomA0A1A2A3A4A5*	monooxygénase	*Burkholderia vietnamiensis* G4
TBU	Chromosome	*tbuA1UBVA2C*	monooxygénase	*Ralstonia picketti* PKO1
T4MO	-	*tmoABCDEF*	monooxygénase	*P. mendocina* KR1

Tableau I.9. Localisation des opérons portant les gènes impliqués dans les voies de dégradation périphériques du toluène, ainsi que le type d'enzyme mise en jeu chez quelques bactéries modèles (d'après Gulensoy et Alvarez, 1999 ; Parales *et al.*, 2008 ; Cao *et al.*, 2009).

Les enzymes mises en jeu sont principalement des monooxygénases, à l'exception de l'opéron TOD qui code une dioxygénase (Gulensoy et Alvarez, 1999 ; Parales *et al.*, 2008 ; Cao *et al.*, 2009).

3.1.3.2. Voies centrales

Voie méta de clivage du cycle benzénique

La voie de clivage dite méta permet la destruction du cycle benzénique via l'action de dioxygénases à proximité d'un des deux groupes hydroxyles des métabolites centraux (figure I.19). La première étape correspond à la dégradation du catéchol, plus ou moins substitué, par une catéchol-2,3-dioxygénase (C23O) et aboutit à la formation de métabolites secondaires qui sont ensuite dégradés en métabolites intermédiaires (tableau I.10).

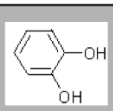
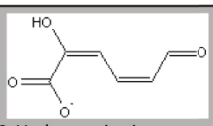
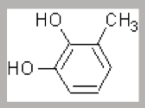
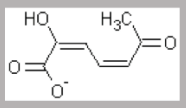
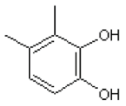
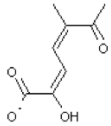
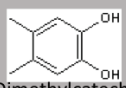
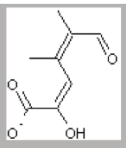
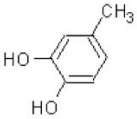
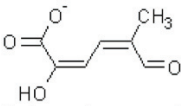
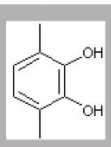
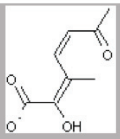
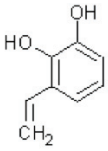
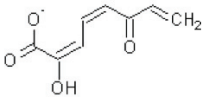
Composés	Métabolites centraux	Enzymes de clivage du cycle benzénique	Métabolites secondaires	Métabolites intermédiaires
Benzène	 Catéchol	Catéchol 2,3-dioxygenase	 2-Hydroxy-*cis,cis-muconate semialdehyde*	Acétaldéhyde + Pyruvate
Toluène				
m-Xylène	 3-Métylcatéchol	3-Métylcatéchol 2,3-dioxygenase	 *cis,cis-2-Hydroxy-6-oxohept-2,4-dienoate*	Acetate + Pyruvate + Acétaldéhyde
o-Xylène	 3,4-Dimethylcatechol	3,4-Dimétylcatéchol 2,3-dioxygenase	 2-Hydroxy-5-methyl-6-oxohepta-2,4-dienoate	CO_2
	 4,5-Dimethylcatechol	4,5-Dimétylcatéchol 2,3-dioxygenase	 2-Hydroxy-4,5-dimethyl-6-oxohexa-2,4-dienoate	
p-Xylène	 4-Métylcatéchol	4-Métylcatéchol 2,3-dioxygenase	 2-Hydroxy-6-oxoocta-2,4-dienoate	Pyruvate + propanal
	 3,6-Dimethylcatechol	3,6-Dimétylcatéchol 2,3-dioxygenase	 2-Hydroxy-3-methyl-6-oxohepta-2,4-dienoate	CO_2
Ethylbenzène	 3-Vinylcatéchol	3-Vinylcatéchol 2,3-dioxygenase	 2-Hydroxy-6-oxoocta-2,4,7-trienoate	Acétaldéhyde + Pyruvate + Lactate

Tableau I.10. Voies centrales méta de dégradation des BTEX passant par le catéchol (d'après Fuchs *et al.*, 2011 ; UMBBD, 2012).

Les gènes codant la C23O diffèrent selon les espèces bactériennes (tableau I.11).

Opéron	Gènes de la voie méta	Gène codant la C23O	Bactérie
TOL -	*xylXYZLTEGFJQKIH* -	*xylE*	*Pseudomonas putida* MT-2 *Sphingomonas aromaticivorans* F199
TOD	*todDEGIH*	*todE*	*P. putida* F1
TOM	*FER tomB orf HMSD HPDH ADA HOA 4OD 4OT orf Tn tomC*	*tomB*	*Burkholderia vietnamiensis* G4
TBU	*tbuWEFGKIHJ*	*tbuE*	*Ralstonia picketti* PKO1
-	-	cdo	Shingomonas stutzeri

Tableau I.11. Gènes impliqués dans les voies centrales méta de dégradation des BTEX, ainsi que le gène spécifique codant la C23O chez quelques bactéries modèles (d'après Parales *et al.*, 2008 ; Cao *et al.*, 2009).

La voie méta est très utilisée chez les bactéries et la C23O a été annotée sur le génome de 968 espèces bactériennes (GenBank, 2012). Elles appartiennent principalement au genre *Pseudomonas*, mais également à d'autres genres tels que *Bacillus*, *Streptomyces*, *Ralstonia, Burkholderia,* et *Sphingomonas* (Zylstra et Kim, 1997 ; Habe et Omori, 2003 ; Parales *et al.*, 2008 ; Djokic *et al.*, 2011).

Voie ortho de clivage du cycle benzénique

La voie de clivage dite ortho est également appelée voie du β-kétoadipate. Elle permet la destruction du cycle benzénique entre les groupes hydroxyles des métabolites centraux grâce à des dioxygénases (figure I.19). Cette voie débute par la dégradation du catéchol, plus ou moins substitué, par la catéchol-1,2-dioxygénase (C12O) et permet la formation de métabolites secondaires qui sont ensuite dégradés en métabolites intermédiaires (tableau I.12).

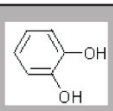
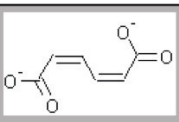
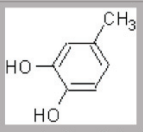
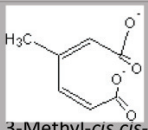
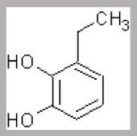
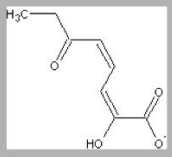
Composés	Métabolites centraux	Enzymes de clivage du cycle benzénique	Métabolites secondaires	Métabolites intermédiaires
Benzène	 Catéchol	Catéchol 1,2-dioxygenase	 *cis,cis-Muconate*	Succinate + Acétyl-CoA
Toluène p-Xylène	 4-Métylcatéchol	4-Métylcatéchol 1,2-dioxygenase	 3-Methyl-*cis,cis-hexadienedioate*	CO_2
Ethylbenzène	 3-Ethylcatéchol	3-éthylcatéchol 1,2-dioxygenase	 2-Hydroxy-6-oxoocta-2,4-dienoate	Acétaldéhyde + Pyruvate + Propanoate

Tableau I.12. Voies centrales ortho de dégradation des BTEX passant par le catéchol (d'après Fuchs *et al.*, 2011 ; UMBBD, 2012).

La C12O est codée par le gène *catA* porté par l'opéron catBCA chez *P. putida* PRS1. La voie ortho de clivage est aussi répandue que la voie méta. La C12O a ainsi été mise en évidence dans le génome de 1035 espèces bactériennes (GenBank, 2012) appartenant principalement aux genres *Acinetobacter* et *Pseudomonas*, mais également aux genres *Bulkhorderia*, *Agrobacterium* ou *Rhodococcus* (Seo *et al.*, 2009).

3.2. Biodégradation des NOx : La dénitrification

3.2.1. Mécanismes de la dénitrification

La dénitrification est un processus respiratoire au cours duquel des formes oxydées de l'azote (nitrate, nitrite, l'oxyde nitrique et protoxyde d'azote) sont utilisées comme accepteurs d'électrons durant l'oxydation anaérobie de la matière organique (figure I.22). Chacune des étapes est catalysée par une enzyme spécifique : la nitrate réductase, la nitrite réductase, l'oxyde nitrique réductase et l'oxyde nitreux réductase.

En conditions naturelles, la dénitrification peut se dérouler partiellement ce qui peut conduire à la libération de N_2O plutôt que de N_2 (Vilain *et al.*, 2012).

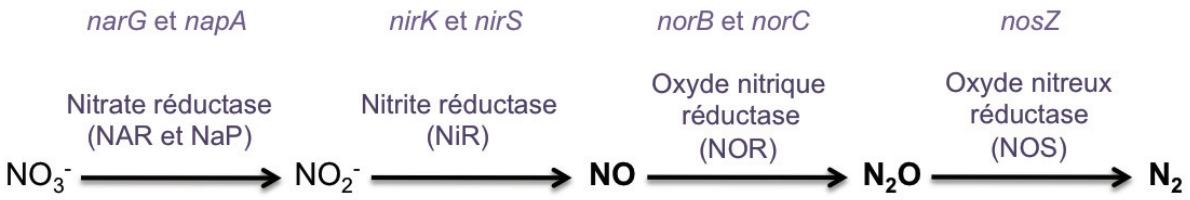


Figure I.22. Les différentes étapes du processus de dénitrification. En gras : les produits gazeux, en violet : les enzymes catalysant chaque réaction, en violet italique : les gènes codant ces enzymes (Knowles, 1982 ; Wallenstein *et al.*, 2006).

3.2.2. Les bactéries dénitrifiantes

Les bactéries dénitrifiantes, au sens strict, sont des bactéries capables de réduire NO_3^- ou NO_2^- en N_2O et /ou N_2 et qui peuvent utiliser l'énergie libérée au cours de cette réduction pour se développer (Mahne et Tiedje, 1995). Les dénitrifiants constituent un groupe fonctionnel représenté par des bactéries, physiologiquement et taxonomiquement différentes. Environ 130 espèces bactériennes dénitrifiantes appartenant à plus de 60 genres sont actuellement connues (Philippot *et al.*, 2007). Les principaux genres de bactéries dénitrifiantes sont *Agrobacterium, Bacillus, Enterobacter, Pseudomonas, Rhizobius* ou *Nocardia* (Philippot *et al.*, 2007). Le groupe des dénitrifiants peut représenter jusqu'à 5% de la communauté bactérienne dans un sol (Henry *et al.*, 2006).

Les bactéries dénitrifiantes sont en majorité hétérotrophes et tirent leur énergie de l'oxydation des matières organiques. Certaines peuvent être autotrophes et sont capables de se développer à partir de l'oxydation de carbone minéral et de donneurs d'électrons minéraux tels que l'hydrogène comme *Micrococcus denitrificans*, (Kurt *et al.*, 1987) ou de composés sulfurés réduits comme *Thiobacillus denitrificans* ou *Thiomicrospira denitrificans*, (Nisola *et al.*, 2011). Toutes les bactéries dénitrifiantes sont des bactéries aérobies-anaérobies facultatives pouvant s'adapter à une respiration sur NO_3^-, NO_2^- ou N_2O quand le milieu devient pauvre en O_2. Leur contribution au dégagement de N_2O est liée au fait qu'un faible pourcentage de ces bactéries est capable de réaliser toute la chaine de réaction (Germon et Hénault ,1995).

Plusieurs auteurs ont observé la dénitrification dans des biofiltres pour le traitement des NOx (Apel et Turick, 1993 ; Barnes *et al.*, 1995 ; Jiang *et al.*, 2008). L'efficacité de dégradation dépend de la disponibilité en carbone organique, particulièrement pour les fortes concentrations en NOx (Jin *et al.*, 2005). Différents composés peuvent être utilisés

comme sources de carbone et d'énergie, notamment certains COV comme les BTEX. Des activités de dénitrification ont, par exemple, pu être observées dans des biofiltres traitant du toluène (du Plessis *et al.*, 1998).

Bien que la dénitrification ait été longtemps considérée comme un processus exclusivement bactérien, de nombreux champignons du genre *Fusarium* sont connus pour réaliser la réduction du nitrite via la dénitrification. Le N_2O est le composé majoritairement formé mais quelques champignons produisent du N_2 (Shoun *et al.*, 1992).

3.2.3. Enzymes et gènes impliqués

L'étude des communautés dénitrifiantes est possible grâce à l'utilisation d'outils de biologie moléculaire ciblant spécifiquement les gènes de la fonction dénitrifiante (Braker *et al.*, 2001 ; Rösch *et al.*, 2002). Ces gènes de fonction (figure I.22), codant les enzymes de la chaîne respiratoire anaérobie, sont bien connus et semblent bien adaptés à l'étude de ces communautés (Braker *et al.*, 2000 ; Priemé *et al.*, 2002).

Gènes nar et nap codant des nitrates réductases,

Les nitrates réductase interviennent dans la réduction des nitrates en nitrites, première étape de la dénitrification. Il existe deux types de nitrate réductases chez les bactéries : NAR (membranaire) et NaP (périplasmique). NAR est codée par des gènes chromosomiques. Elle est constituée de trois sous-unités. La sous-unité catalytique est codée par le gène *narG*. La NaP est codée par des gènes soit chromosomiques soit plasmidiques. Elle est constituée de 2 sous-unités ; la sous-unité catalytique alpha est codée par le gène *napA* (Siddiqui *et al.*, 1993 ; Philippot et Hallin, 2006).

Les gènes *narG* et *narA* ont été utilisés pour étudier la diversité des bactéries capables de respirer le nitrate en absence d'oxygène. Cependant, de nombreuses bactéries appelées nitrate-réductrices n'effectuent que l'étape de réduction des nitrates en nitrites (Cheneby *et al.*, 2003). Ces bactéries ne sont pas considérées comme dénitrifiantes. C'est pourquoi l'étude des communautés dénitrifiantes, seules capables de dégrader les NOx, doit se baser sur des gènes qui codent les enzymes permettant la réduction des nitrites en produits gazeux.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Gènes des nitrites réductases, nir

Les nitrites réductases (NiR) sont responsables de la réduction des nitrites en oxyde nitrique ou en oxyde nitreux. Il existe deux types de nitrites réductases différentes en terme de structure, NirS et NirK (Braker *et al.*, 1998). Le type de NiR peut varier parmi des souches étroitement apparentées sur la base de l'ADN ribosique 16S (Coyne *et al.*, 1989). NirS contient un cytochrome cd1 et est constituée de deux sous-unités. Elle est codée par le gène *nirS* (Braker *et al.*, 2000 ; Priemé *et al.*, 2002). NirK contient une protéine trimétrique ayant deux types de centres cuivrique (CuI et CuII). Elle est codée par le gène *nirK* (Braker *et al.*, 2000 ; Priemé *et al.*, 2002).

Les gènes *nirS* et *nirK* sont très étudiés (Braker *et al.*, 1998, 2000, 2001 ; Avrahami *et al.*, 2002 ; Priemé *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2003 ; Taroncher-Oldenburg *et al.*, 2003) car ils sont communs et spécifiques à tous les dénitrifiants. De plus, les dénitrifiants ne possèdent généralement qu'un des deux types de nitrate réductases (Philippot et Hallin, 2006). Ces gènes constituent donc de bons candidats pour analyser la diversité des bactéries dénitrifiantes. De nombreuses études ont montré que la variabilité de la séquence *nirS* est plus importante que celle du gène *nirK*. De plus, le gène *nirS* est plus largement distribué taxonomiquement que le gène *nirK* (Braker *et al.*, 1998, 2000 ; Nogales *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2003 ; Yan *et al.*, 2003).

Il a été observé, en utilisant les gènes *nir*, que les propriétés physico-chimiques du milieu (concentration en nitrates, oxygène, carbone, pH…) peuvent avoir une influence importante sur la distribution spatiale des dénitrifiants (Braker *et al.*, 1998, 2001 ; Priemé *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2003). Cette influence n'est cependant pas systématique. Braker *et al.* (2000) ont en effet montré que les structures des communautés dénitrifiantes varient peu à différentes profondeurs dans des sédiments alors que les profils en oxygène sont différents.

Gènes nor codant l'oxyde nitrique réductase

L'oxyde nitrique réductase (NOR) intervient dans la réduction de l'oxyde nitrique en oxyde nitreux. Deux types de NOR existent : cNor, codée par le gène *norB,* et qNor, codée par le gène *norC* (Philippot et Hallin, 2006).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Gènes nos codant l'oxyde nitreux réductase

L'oxyde nitreux réductase (NOS) intervient dans la dernière étape de la dénitrification, la réduction de l'oxyde nitreux en diazote. La sous-unité catalytique de cette enzyme est codée par le gène *nosZ* (Rösch *et al*., 2002 ; Scala et Kerkhof, 1998). Tous les dénitrifiants ne possèdent pas le gène *nosZ*, les études réalisées sur ce gène ne permettent donc pas une vision exhaustive. L'étude de ce gène permet d'accéder aux organismes dénitrifiants capables de détoxifier les NOx et de former du N_2.

Conclusion

La qualité de l'air des PSC a récemment fait l'objet d'une plus grande attention, notamment à Lyon, et une évolution de la législation encadrant la QAI des parkings est à prévoir dans les années à venir. Celle-ci entraînera probablement le développement et l'accélération des systèmes de ventilation conduisant à une augmentation des volumes d'air pollué rejetés dans l'atmosphère. Le ministère de l'environnement a été alerté à plusieurs reprises sur cette problématique et il n'est pas exclu que ces rejets soit un jour réglementés. D'ici là, il est important de développer des technologies capables de répondre efficacement au problème de pollution en ville.

Parmi les procédés de traitement de l'air décrits dans cette synthèse bibliographique, la biofiltration est la seule présentant les caractéristiques nécessaires à la dépollution d'importants volumes d'air contenant des très faibles concentrations en polluants, telles que celles rencontrées dans les PSC. Jusqu'à présent, les biofiltres végétalisés principalement étudiés pour le traitement de l'air intérieur ont montré des performances épuratoires limitées en ce qui concerne les BTEX.

Les voies métaboliques microbiennes mises en jeu pour la biodégradation sont spécifiques à chaque polluant. Leur biodisponibilité est un facteur déterminant pour l'efficacité de ces processus dans la mesure où l'induction des gènes impliqués dans les dégradations des BTEX et des NOx est nécessaire. Une étude récente sur la biofiltration de l'air intérieur a cependant démontré qu'il était possible d'atteindre des taux d'abattement de 99% lors du traitement des très faibles concentrations de toluène. Les concentrations en polluants relevées dans les PSC sont supérieures à celles utilisées dans cette dernière étude ce qui suggère que ces performances peuvent également être atteintes avec le système de biofiltre végétalisé faisant l'objet de l'étude présentée dans ce manuscrit.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urabins gazeux. *Thèse de Doctorat*.

CHAPITRE II. TRAITEMENT DE L'AIR CONTENANT DE TRÈS FAIBLES CONCENTRATIONS DE TEX : INFLUENCE DE LA PRÉSENCE DE LA PLANTE ET DE L'APPORT D'ENGRAIS

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

INTRODUCTION **92**

PARTIE 1. ARTICLE : "BIOPURIFICATION OF AIR CONTAINING A LOW CONCENTRATION OF TEX : COMPARISON OF REMOVAL EFFICIENCY USING PLANTED AND NON-PLANTED BIOFILTERS" **95**

COMPLEMENTS DE DISCUSSION **101**

FAIBLES CONCENTRATIONS : PHENOMENES PHYSICO-CHIMIQUES VS BIODEGRADATION 101

Evaluation des phénomènes physico-chimiques au sein des biofiltres *102*

Faibles concentrations et dégradation biologique des composés *103*

SPATIALISATION DE LA DEGRADATION AU SEIN DU BIOFILTRE 105

PARTIE 2 : INFLUENCE DE L'APPORT D'ENGRAIS SUR LE FONCTIONNEMENT DU BIOFILTRE VEGETALISE **109**

1. INTRODUCTION **110**

2. MATERIEL ET METHODES **112**

2.1. SYSTEME EXPERIMENTAL PILOTE 112

2.2. PARAMETRES OPERATOIRES MESURES 114

2.2.1. Analyse de la phase gazeuse *114*

2.2.2. Température *114*

2.2.3. Pertes de charges *114*

2.2.4. Taux d'humidité *114*

2.3. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES 114

2.4. ANALYSES STATISTIQUES 115

3. RESULTATS **116**

3.1. PARAMETRES OPERATOIRES MESURES 116

3.1.1. Evolution des pertes de charge *116*

3.1.2. Humidité du garnissage *117*

3.2. FONCTIONNEMENT GLOBAL DES BIOREACTEURS 118

3.3. PERFORMANCES EPURATOIRES DETAILLEES 119

3.4. STRATIFICATION DES ACTIVITES MICROBIENNES 121

3.4.1. Activité de dégradation des TEX : profils longitudinaux d'élimination *121*

3.4.2. Activité potentielle de respiration : SIR *122*

2.4.3. Activité potentielle de dénitrification : DEA *123*

2.4.3. Relations entre les activités microbiennes *124*

3.5. DEVELOPPEMENT DES PLANTES DANS LES BIOFILTRES VEGETALISES 125

4. DISCUSSION 126

4.1. INFLUENCE DE L'HUMIDITE DU GARNISSAGE SUR LES PERFORMANCES EPURATOIRES 126

4.2. IRRIGATION ET PERTES DE CHARGE 128

4.3. INFLUENCE DE L'APPORT D'ENGRAIS SUR LES PERFORMANCES DES BIOFILTRES 130

4.4. INFLUENCE DE LA PRESENCE DE PLANTES SUR LES PERFORMANCES EPURATOIRES 131

CONCLUSION 133

Introduction

La qualité de l'air des villes est reconnue aujourd'hui comme problématique pour l'environnement et la santé humaine. Les concentrations de pollution rencontrées dans les espaces urbains confinés, tels que les parcs de stationnement couverts (PSC), de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de $\mu g.m^{-3}$ selon les composés, sont 10 à 100 fois plus élevées que les valeurs guides proposées par l'OMS (OMS, 2006). Pourtant, ces concentrations sont extrêmement faibles au regard de celles pour lesquelles des procédés de traitement d'air sont habituellement mis en œuvre, ce qui explique en partie que ces composés soient, pour l'instant, « simplement » dispersés dans l'atmosphère.

Le traitement de ces polluants, et plus précisément les BTEX et les NOx, contenus dans l'air des PSC avant leur rejet dans l'atmosphère constitue une solution innovante qui, jusqu'à présent, n'a pas été étudiée. Parmi les procédés de traitement de l'air, la biofiltration est un bioprocédé performant particulièrement adapté au traitement des effluents gazeux industriels à débits élevés et contenant des concentrations en polluants relativement faibles (de l'ordre du $mg.m^{-3}$ au $g.m^{-3}$). Ce procédé est largement utilisé en raison de sa facilité de mise en œuvre et de ses coûts de fonctionnement modérés (Estrada *et al.*, 2012).

Les travaux portant sur le traitement biologique de COV (BTEX) à des concentrations de l'ordre de la centaine de $\mu g.m^{3}$, comme c'est le cas dans les PSC, sont pourtant rares et focalisés sur la qualité de l'air intérieur d'habitat. Ondarts *et al.,* (2012) ont récemment montré que le traitement du toluène par biofiltration à des concentrations comprises entre 14 et 81 $\mu g.m^{-3}$ était possible avec un abattement de 97%. Par ailleurs, si l'intérêt des plantes dans l'amélioration de la qualité de l'air intérieur a été souligné, le rôle prépondérant de la microflore rhizosphérique dans l'abattement des polluants a été démontré par différents auteurs (Wolverton *et al.*, 1996 ; Burchett *et al.*, 2009). Darlington *et al.* (2001) ont évalué les performances d'un biofiltre végétalisé dans le cadre du traitement de la pollution de l'air intérieur, ces travaux ont mis en évidence des capacités d'épuration limitées, de 20% à 60% pour le toluène par exemple.

Il convient de préciser que ces biofiltres végétalisés sont adaptés à la croissance des plantes et présentent donc des caractéristiques différentes des systèmes classiques de

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

biofiltration, notamment en termes de volumes de matériau de garnissage. La hauteur en média filtrant, classiquement de l'ordre d'un mètre, ne représente que quelques dizaines de centimètres dans ces systèmes plantés qui sont en général à l'échelle du pot ou de la jardinière de plantes.

Cette étude a pour objectif d'évaluer les performances d'un biofiltre végétalisé mis en œuvre pour le traitement d'effluents gazeux contenant de faibles concentrations en polluants, représentatives de celles rencontrées dans les PSC. Pour cela, il est nécessaire d'évaluer l'influence des paramètres susceptibles de modifier les capacités d'élimination des composés. Il est clairement démontré que la disponibilité en éléments nutritifs (macro et micro éléments) dans les biofiltres influence la croissance et l'activité des microorganismes (Delhoménie *et al.,* 2002a ; Sakuma *et al*., 2009). De même, le taux d'humidité du garnissage des biofiltres conditionne à la fois l'activité des microorganismes et la disponibilité des polluants (Mudliar *et al*., 2010 ; Kraakman *et al*., 2011). Dans le cas de biofiltres végétalisés, la croissance et le bon développement des plantes vont aussi dépendre de ces paramètres, que la présence de la plante est susceptible de modifier. Il est donc primordial d'évaluer l'influence de la présence de la plante sur ces paramètres opératoires et sur les performances des biofiltres.

Une unité pilote de biofiltration simulant au mieux les systèmes mis en œuvre à l'échelle d'un PSC a été alimentée par un effluent gazeux synthétique contenant de faibles concentrations en TEX. Afin de déterminer les paramètres influençant les capacités d'épuration de ces composés dans les biofiltres végétalisés, ce chapitre s'articule autour de deux questionnements principaux :

- La présence de la plante influence-t-elle les performances de traitement ?
- Est-il nécessaire d'apporter des éléments nutritifs ? Un engrais solide peut-il être utilisé dans ce type de procédé ?

Ainsi, une attention particulière a été apportée à la gestion de la fertilisation et du taux d'humidité du garnissage, par l'ajustement des apports d'eau et d'engrais, de manière à simplifier la mise en œuvre des biofiltres et limiter les coûts de fonctionnement.

Ce chapitre est divisé en deux parties.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

La première partie a consisté à évaluer l'influence de la plante ainsi que l'apport d'éléments nutritifs (sous forme d'engrais liquide) sur les niveaux de performances des biofiltres. Les performances de biofiltres planté et non planté ont donc été comparées. L'apport d'engrais a été réalisé en cours de fonctionnement de façon à observer le comportement du biofiltre sans amendement et l'impact de ce dernier sur l'efficacité de traitement. Les microorganismes étant les auteurs de la biodégradation des polluants, la biomasse se développant au sein des biofiltres et son état physiologique global ont été évalués en mesurant l'activité microbienne de respiration. L'utilisation d'un mélange gazeux synthétique contenant des NOx, en plus des composés aromatiques n'a pas été possible au laboratoire. Par conséquent, la capacité réelle de dégradation des NOx au sein des biofiltres n'a pas été mesurée, mais le potentiel de dégradation a été estimé par des mesures d'activité potentielle de dénitrification. Les résultats ont fait l'objet d'un article publié dans la revue « Journal of Chemical Technology and Biotechnology ». Cette partie présente également des éléments complémentaires concernant les paramètres de fonctionnement du biofiltre.

La seconde partie se focalise sur l'apport d'éléments nutritifs, et plus précisément sur l'impact de l'utilisation d'un « engrais retard » sur le fonctionnement des bioréacteurs. L'irrigation de ces systèmes a également été ajustée de façon à améliorer la gestion du taux d'humidité du garnissage. Afin de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus malgré la variabilité des phénomènes biologiques impliqués dans le fonctionnement des biofiltres (Fernandez *et al.*, 2000 ; Morris *et al.*, 2002), des réplicats des différentes conditions testées ont été mis en œuvre. La vérification de la répétabilité des résultats fait souvent défaut dans les études des bioprocédés de traitement de l'air, principalement en raison de la lourdeur analytique et des surcoûts qu'entraînent la mise en place et le suivi de plusieurs réacteurs en parallèle.

PARTIE 1. Article : "Biopurification of air containing a low concentration of TEX : comparison of removal efficiency using planted and non-planted biofilters"

Research Article

Received: 10 October 2011 Revised: 7 December 2011 Accepted: 16 December 2011 Published online in Wiley Online Library: 1 February 2012

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jctb.3730

Biopurification of air containing a low concentration of TEX: comparison of removal efficiency using planted and non-planted biofilters

Anne Rondeau,[a,b,c,d*] Agnès Mandon,[d] Luc Malhautier,[e] Franck Poly[a,b,c] and Agnès Richaume[a,b,c]

Abstract

BACKGROUND: Underground car parks are confined spaces where traffic generates many pollutants such as toluene, ethylbenzene and xylene (TEX) and nitrogen oxides (NOx). The objective of this work was to evaluate the removal efficiency of low concentrations of TEX using planted and non-planted biofilters. Two pilot-scale units of biofiltration were set up. The gaseous mixture was generated to obtain a total TEX concentration of 600 μg m^{-3}. Elimination performance of both biofilters was monitored for 96 days. Microbial behavior and the potential capacity to degrade the NOx, were investigated.

RESULTS: The removal efficiency (RE) was 30% in the non-planted and 15% in the planted biofilter at day 3. The RE decreased more rapidly in planted biofilter than in non-planted until nutrient addition at day 77. Consequently, the RE increased to 70% in both reactors. The potential for carbon mineralization was higher than those found in soils. The denitrification activity indicated good conditions for synthesis and maintenance of the denitrifying enzyme pool in the mound of soil. This suggested that NOx could also be treated in such a system.

CONCLUSION: The efficiency of the planted biofilters in removing TEX was evaluated and found to have good potential for improving air quality.
© 2012 Society of Chemical Industry

Keywords: biofiltration; TEX; removal efficiency; planted biofilter; microbial activity

INTRODUCTION

Urban air pollution is increasingly recognized as a major public health problem and environmental issue.[1,2] Nitrogen oxides (NOx) and volatile organic compounds (VOCs), originating mainly from transport and heating modes, are among the pollutants of most concern because they are behind the formation of tropospheric ozone and contribute to global warming.[3] Often in cities, car parks are a confined environment in which complex pollution containing about 275 identified substances accumulates. The majority of these compounds are carbon oxides (COx), nitrogen oxides (NOx) and VOCs such as benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX).[4] The average concentrations of TEX (toluene, ethylbenzene and xylene) and NOx found in underground car parks, of the order of $10^1 - 10^2$ μg m^{-3}, often surpass the values recommended by public authorities.[5] In France, mechanical systems to extract the contaminated air from underground car parks were set up to manage fire risk regardless of indoor air quality. The polluted air released into the atmosphere through ventilation systems is then a source of pollution for underground car park surroundings. Constraints imposed on air quality by European policies were strengthened recently.[6,7] Therefore, the development of innovative solutions to treat various gaseous pollutants has received special attention in order to improve air quality.

The effectiveness of biological processes for the treatment of VOCs has been highlighted.[8,9,10] Among the solutions developed, biofiltration has been demonstrated to be an effective air pollution control technology for a wide range of applications such as wastewater treatment plants, rendering plants, chemical industries and composting facilities.[11] Furthermore, biofiltration processes are appropriate for treating high flow rates and low concentration of pollutants.[12] Their relatively low operational costs and their

* Correspondence to: Anne Rondeau, Université de Lyon, Lyon, F-69003, France. CNRS, UMR5557 USC INRA 1193, Ecologie Microbienne, France 43 boulevard du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, F-69622, France. E-mail: rondeau.anne@gmail.com

a Université de Lyon, F-69622 Lyon, France

b Université Lyon 1, Villeurbanne, France

c CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France

d Canevaflor®, 24 rue du Docteur Guffon, 69170, Tarare, France

e Laboratoire Génie de l'Environnement Industriel, Ecole des Mines d'Alès, Avenue de Clavières 6, 30319, Alès Cedex, France

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

limited environmental impact contribute to the increasing success of biofiltration compared with other gas treatment strategies.[13]

Industrial biofiltration systems are designed so that pollutant concentrations ranging from mg m^{-3} to g m^{-3} can be treated. Such concentrations are far above those observed in underground car parks.

Planted biofilters involve the venting of contaminated gas streams through a porous packed solid media in which plants can grow. They constitute a promising alternative, which combines the capacity of bacteria and plants to reduce pollutants and provide an aesthetic value. The operation of the biofilter relies on both the bioremediation capacities of microorganisms from the soil and the purifying capacities of plants (CO_2 fixation, and absorption of VOCs). The planted mound of soil sustains a rich and diverse rhizosphere microflora. These microorganisms can degrade many pollutants (VOCs, NOx, etc.), using them as substrates or energy sources.[14,15]

Although the plant–bacteria associations are well studied with the agronomic perspective of improving crop yields, their use in pollution control remains poorly studied despite their promising use for improving air quality in an urban context.

In the present study, the capacity of biofiltration to reduce gaseous pollutants from confined spaces such as underground car parks or road tunnels before releasing them into the atmosphere was investigated. A synthetic gaseous mixture was generated to be representative of emissions from underground car parks. This gaseous mixture was characterized by a very low concentration of TEX corresponding to 200 μg m^{-3} air for each compound and a superficial gas velocity of 100 m h^{-1}. The elimination performance of planted and non-planted biofilters supplied with this polluted gas was monitored. Both the microbial behavior and the potential capacity to degrade NOx were also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Laboratory scale biofiltration system

The experimental set-up used for continuous experiments is schematically represented in Fig. 1. Two biofilter columns made of transparent PVC tubing with an internal diameter of 15 cm and a height of 40 cm, corresponding to a packing volume of 7.6×10^{-3} m^3, were filled with 2.143 kg of filtering material. The filtering material was provided by Canevaflor (Tarare, France) and mainly consisted of a mixture of coco fibres and perlite. It was characterized by a dry bulk density of 90.4 kg m^{-3} and a void fraction of 95%.

Each column was equipped with two gas sampling ports located at the inlet and at the outlet of the biofilter.

The polluted gas was obtained by volatilizing a liquid mixture containing toluene, ethylbenzene and xylenes (TEX) (99+% Extra Pure, Alpha Aesar, Karlsruhe, Germany) in compressed air via a syringe pump (Apparatus Pump 11 Pico Plus, Harvard, Massachusetts, USA) in order to provide a total pollutant concentration of 600 μg m^{-3} (200 μg m^{-3} for each compound). The gaseous stream was homogenized and humidified in a scrubber (>98% relative humidity). Each column was supplied in an upward flow mode with polluted air containing TEX with a volumetric flow of 1.8 m^3 h^{-1} corresponding to a superficial gas velocity of 100 m h^{-1} and a constant empty bed retention time (EBRT) of 14 s. The pressure drops were followed during the experiment and never exceeded 80 Pa (data not shown).

One biofilter was planted with *Hedera helix* grown in 9 cm diameter pots containing soil. The planted mound of soil was introduced in the centre of the top column in the filtering material near the gas outlet. In the non-planted biofilter, the plant was removed before placing the mound of soil in the filtering material. In both biofilters, the mound of soil was used as inoculant. The biofilter columns were maintained at room temperature (between 19 and 21 °C) under standard horticultural fluorescent tubes alternating 12 h of light and 12 h in the dark.

The composition of nutrient solution added to each column from day 78 is given in Table 1. This solution provided nitrogen, phosphorus and potassium sources (24/20/02 at a concentration of 0.7 g L^{-1}). Every 2 days, 80 mL of the nutrient solution were homogeneously distributed drop by drop on the top of the packing material. The fertilization provided 4 mg nitrogen day^{-1} and enabled a C/N/P ratio of 100/5/1 to be obtained.

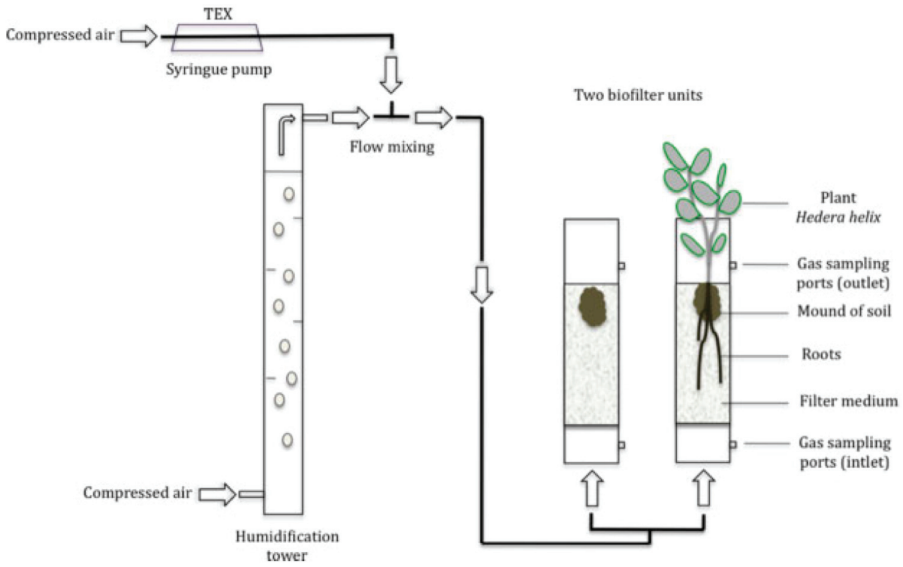


Figure 1. Experimental setup of the laboratory-scale biofiltration system.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Table 1. Composition of the nutrient solution used for fertilization after day 78

Nitrogen	24%
NO_3	10%
NH_4	12.2%
$CO(NH_2)_2$	1.8%
P_2O_5	**20%**
K_2O	**2%**
MgO	**2%**
Trace elements	
B	0.0125%
Cu	0.0025%
Mn	0.025%
Mo	0.0013%
Zn	0.01%
Fe	0.03%

Analytical methods

Inlet and outlet synthetic polluted air streams were sampled daily. An AirmoBTX gas chromatograph (GC) equipped with a column (MXT30CE; 30 m; 0.28 mm internal diameter; 1 µm film) and a flame ionization detector (FID) (Chromatotec group, Bordeaux, France) was used to measure the TEX gas-phase concentrations. Gas-phase samples (460 mL) were withdrawn from the biofilter sampling ports and automatically injected into the GC/FID. TEX concentrations were determined from an internal calibration curve. The biodegradation was monitored by calculating the TEX removal efficiency from the average of five successive quantifications as follows:

$$RE = \left[1 - \frac{C_o}{C_i}\right] \times 100$$

where *RE* is removal efficiency, C_o is TEX concentration at the column outlet, and C_i is TEX concentration at the column inlet.

Measurements of bacterial activities

At the end of the experiment, the packing material was removed from the PVC columns and separated according to depth from the inlet (0–10 cm, 10–20 cm, 20–30 cm and 30–40 cm). The soil was separated from the packing material in the section near the gas outlet (30–40 cm). The water content was determined after drying a portion of each sample at 105 °C overnight.

Investigation of the bacterial activity was performed by measuring the carbon mineralization potential using substrate induced respiration (SIR)[16] and denitrifying enzyme activity (DEA) on samples over a short period.[17,18]

For the SIR measurements, samples of filtering material (equivalent to 5 g oven dried) extracted at 20–30 cm and 30–40 cm were placed in 150 mL sterile plasma flasks with a rubber stopper. 1 mL of glucose was added to obtain a final concentration of 1.2 mg glucose g^{-1} dry soil. Additional water was added to achieve 70% of the water holding capacity. The plasma flasks were closed and incubated at 28 °C for 6 h. Gas samples were analyzed every 30 min to measure the CO_2 concentration using a gas chromatograph equipped with a catharometer (µGC R-3000; SRA Instruments, Marcy l'Etoile, France). SIR was expressed as µg C-CO_2 h^{-1} g^{-1} dry filtering material.

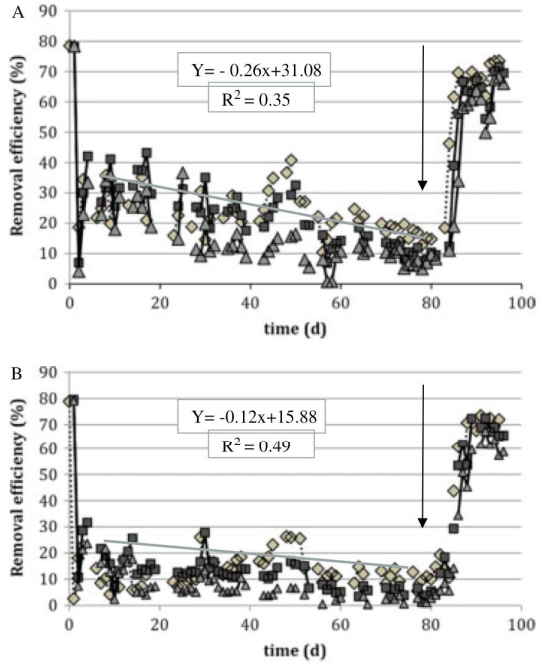


Figure 2. Evolution of removal efficiency of the biofilters vs. time (day): (A) non-planted biofilter; and (B) planted biofilter. ◇ Toluene, ■ Ethylbenzene, △ Xylene. Arrows indicate the beginning of the nutrient supply.

For the DEA measurements, samples (5 g equivalent oven-dried) taken from the mound of soil and in the filtering material (30–40 cm) were placed into 150 mL plasma flasks. The atmosphere of each flask was evacuated and replaced by a 90 : 10 He : C_2H_2 mixture to provide anaerobic conditions and to inhibit N_2O-reductase activity. Ten ml of distilled water containing KNO_3 (200 µg NO_3-N g^{-1} dry soil), glucose (0.5 mg C g^{-1} dry soil) and glutamic acid (0.5 mg C g^{-1} dry soil) were added. Additional water was provided to achieve soil saturation and flasks were sealed with rubber stoppers. During incubation at 28 °C, gas samples (200 µL) were taken at 2, 4 and 6 h and immediately analyzed for N_2O production using the µGC R-3000 (SRA Instruments, Marcy l'Etoile, France). DEA was expressed as µg N-N_2O h^{-1} g^{-1} dry filtering material.

RESULTS AND DISCUSSION

Efficiency of TEX removal in planted and non-planted biofilter

An overview of the performance for both biofilters during the whole experimental period of 96 days is presented in Fig. 2. Operation and performance of biofilters is reported in terms of TEX removal efficiency (RE) as a function of time (days).

The trends in abatement were similar in both biofilters. After the peak of 75 to 80% efficiency, two periods could be distinguished. This rapid and transient removal was probably due to the adsorption phenomenon of aromatics in the packing material.[19]

In the first phase (day 3 to 77), the biofilters behaved differently. The removal efficiency was higher in the non-planted than in the planted biofilter with about 30% and 15% RE, respectively (Fig. 2(A), (B)). The pollutant removal efficiency decreased rapidly in the non-planted biofilter, as indicated by the regression coefficient

 © 2012 Society of Chemical Industry

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

(−0.26). In the planted biofilter, the RE remained very low and almost constant with a regression coefficient of −0.12. This observation might be due to the balance between available nitrogen and carbon sources in the biofilters as suggested by the increase in efficiency following the fertilization. The competition for nitrogen between plant roots and bacteria[20,21] as well as the limitation of microbial growth by the availability of mineral nutrients rather than energy substrates[22,23] are well known in planted soil. In the non-planted biofilter, nitrogen was presumably more available than in planted ones which would explain the difference in RE.

Several authors have found that the performance of VOC degrading biofilters was improved when an extra source of ammonium and phosphate was provided to the reactor.[24,25] The lack of nutrients in a planted biofilter due to plant nutrition as well as the consumption of available nutrients by microorganisms in a non-planted biofilter might be responsible for the low RE observed, as suggested by Delhomenie *et al*.[26] In order to test this hypothesis, a nutrient solution containing nitrogen and trace elements was applied during the second phase (day 78 to 96) to obtain a C : N : P ratio of 100 : 5:1.

In this second phase, shortly after the nutrient addition, both reactors showed a significant increase in RE, ranging from 10 up to 70% (Fig. 2(A), 2(B)). This observation confirmed that the low phosphate and nitrogen content in the packing materials and in the water used for watering were probably responsible for the limitation of microbial activity observed during the first phase.

Microbiological analysis

In biofilters, pollutants contained in the gaseous mixture are oxidized or converted into biomass by the action of microorganisms.[12] In many cases, biofilters are run for long periods of time with an appropriate substrate or with selected acclimatized microorganisms from diverse sources. They are inoculated into the packing material to enhance the biofilter start-up procedure and to ensure pollutant removal efficiency.[10] In this study, microorganisms originated from the mound of soil which was placed into the filtering material both in the planted and non-planted biofilters. The potential for carbon mineralization was measured from packing material sampled at 30–40 cm and 20–30 cm bed height (Table 2). Activities were slightly higher than those found in cultivated soils indicating that the microorganisms could grow and colonize the packing material.[27,28] Since the initial maximum respiratory response is related to the current size of living microbial biomass, these results suggested the presence of a high number of microorganisms in the filtering material.[16] Using a compost biofilter to remove toluene, Juteau *et al*. found densities of culturable heterotrophic bacteria up to 10^{10} per gram.[29] The higher activity observed in the 30–40 cm samples compared with the 20–30 cm samples suggests a higher number of microorganisms in the upper zone of the biofilter. This is probably due to the presence of the soil mound in this zone.

Whatever the depth, the carbon mineralization potential was higher in the planted than in the non-planted biofilter. Plant roots are known to sustain microbial growth via root exudates by providing carbon and energy sources.[30] The presence of a plant in the biofilter enables high numbers of microorganisms to be maintained and thus may contribute to keeping a high potential for metabolizing organic pollution.

Monoaromatic hydrocarbons are known to be mineralized under both aerobic and anaerobic conditions. Foght and Evans *et al*. reported the growth of enrichment cultures on toluene and xylene under denitrifying conditions.[31,32] Denitrifying bacteria are also capable of converting nitrogen oxides (NOx) into bioavailable nitrogen via a dissimilatory reductive pathway.[33] NOx are emitted from all combustion processes, and they are probably present in underground car parks.

Table 2. Substrate- induced respiration (µg C-CO_2 g^{-1} filtering material h^{-1}) measured at the end of the biofiltration run

	Non-planted biofilter A	Planted biofilter B
Filtering material (30–40 cm)	19	28
Filtering material (20–30 cm)	15	21

Table 3. Denitrification enzyme activity (µg N-$N_2$0 g^{-1} filtering material h^{-1}) measured at the end of the biofiltration run

	Non-planted biofilter A	Planted biofilter B
Mound of soil (30–40 cm)	2.7	2.0
Filtering material (30–40 cm)	1.2	1.5

Therefore, DEA was measured along the biofilter height (0–10 cm, 10–20 cm, 20–30 cm, 30–40 cm) from samples of the packing material and of the mound of soil in the 30–40 cm zone.

DEA was detected only in the 30–40 cm zone of the filtering material and in the soil mound (Table 3). These activity levels were slightly higher than those measured in pasture soils and indicated good conditions for the synthesis and maintenance of the denitrifying enzyme pool especially in the soil mound but also in the filtering material.[28] These results showed that active bacteria can persist in planted biofilters and suggested that NOx could also be degraded in such a system.

CONCLUSIONS

The performance of a new type of biofilter that has the potential for improving air quality of urban environments in an aesthetically pleasing manner was investigated experimentally. The efficiency of planted and non-planted biofilters in removing low concentrations of TEX was evaluated and found to have good potential for improving air quality. Results show that planted and non-planted biofilters can remove low concentrations of TEX, and endogenous soil microorganisms can be used as an inoculum in these filters. Furthermore, no acclimation to pollutant was required. The induction of enzymes participating in metabolic pathways of aromatic hydrocarbon degradation was likely to occur in both planted and non-planted biofilters. As previously reported in the literature, the addition of a nutrient solution was essential to maintain TEX degradation in a non-planted biofilter. This study emphasizes how essential this supply is for TEX removal in a planted system. Nevertheless, the optimization of nutrient supply needs to be further investigated.

The denitrifying activity measured in both planted and non-planted biofilters suggested that these biofilters could be efficient in removing NOx.

Further investigations will also be needed in order to gain insights into the dynamic diversity of the bacterial community in the biofilter with and without plants. Investigations of microbial communities in biofilters remain relatively scarce, although the

 © 2012 Society of Chemical Industry

structure of the communities would provide key information for understanding the coupling or uncoupling between microbial diversity and removal efficiency. Different techniques such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) could provide useful information about species richness, and relative abundance. The quantification and characterization of functional bacterial populations actively involved in degradation processes are also required to understand and to control the functioning of such planted biofilters. This could be achieved by targeting specific genes involved in key functions by real time PCR. The *xylE1* gene encoding catechol 2,3 di-oxygenase which is involved in the early stage of TEX degradation could be used to estimate the density of TEX degraders.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are greatly indebted to M. Fages, S. Bayle and P. Legrand (Ecole des Mines d'Alès) for their help in monitoring the pilot unit and for their support. Thanks also to N. Guillaumaud (Laboratoire d'Ecologie Microbienne, UMR5557, Lyon) for technical assistance in the measurement of DEA. We thank Canevaflor for technical and financial support, and John Hughes, Thomas Pommier and Cirus Mallon for improving the English of the MS.

REFERENCES

1 Krzyzanowski M, Kuna-Dibbert B and Schneider J, Introduction in *Health Effects of Transport-related Air Pollution*, ed by Krzyzanowski M, Kuna-Dibbert B and Schneider J. World Health Organization Europe, Copenhague pp. 1–5 (2005).
2 Institut de Veille Sanitaire (INVS), (2006). www.invs.sante.fr
3 INERIS, Institut National de l'Environnement et des Risques. Fiche de données écotoxicologique et environnementales des substances chimiques : les oxydes d'azote. Version N°1. 11–17 (2005).
4 Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET). Recommandations pour la qualité de l'air dans les parcs de stationnement couverts. Saisine n°2005/006 (2007).
5 COPARLY Comité pour le contrôle de la Pollution Atmosphérique dans le Rhône et la région Lyonnaise, Qualité de l'air dans les parcs de stationnement couverts. Etat des lieux dans 25 parcs de l'agglomération lyonnaise, pp. 27–35 (2010).
6 Communauté Européenne. Directive 2004/35/CE du Parlement européen et du Conseil, du 21 avril 2004, sur la responsabilité environnementale en ce qui concerne la prévention et la réparation des dommages environnementaux (2004).
7 Communauté Européenne. Directive 2008/50/CE du Parlement européen et du Conseil du 21 mai 2008 concernant la qualité de l'air ambiant et un air pur pour l'Europe (2008).
8 Leson G and Winer AM, Biofiltration: an innovative air pollution control technology for VOC emissions. *J Air Waste Manag Assoc* **41**:1045–1054 (1991).
9 Deshusses MA, Biological waste air treatment in biofilters. *Current Opin Biotechnol* **3**:335–339 (1997).
10 Mudliar S, Giri B, Padoley K, Satpute D, Dixit R and Bhatt P, *et al*, Bioreactors for treatment of VOCs and odours – a review. *J Environ Manag* **91**:1039–1054 (2010).
11 Pagans E, Font X and Sánchez A, Biofiltration for ammonia removal from composting exhaust gases. *Chem Eng J* **113**:105–110 (2005).
12 Malhautier L, Khammar N, Bayle S and Fanlo JL, Biofiltration of volatile organic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**:16–22 (2005).
13 Van Groenestijn JW and Kraakman NJR, Recent developments in biological waste gas purification in Europe. *Chem Eng J* **113**:85–91 (2005).
14 Le Roux X, Bardy M, Loiseau P and Louault F, Stimulation of soil nitrification and denitrification by grazing in grasslands: do changes in plant species composition matter? *Oecologia* **137**:417–425 (2003).
15 Glick BR, Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol Adv* **28**:367–374 (2010).
16 Anderson JPE and Domsch KH, A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol Biochem* **10**:215–221 (1978).
17 Smith MS and Tiedje JM, Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. *Soil Biol Biochem* **11**:261–267 (1979).
18 Tiedje JM, Simkins S and Groffman PM, Perspectives on measurement of denitrification in the field including recommended protocols for acetylene based methods. *Plant Soil* **115**:261–284 (1989).
19 Aizpuru A, Malhautier L, Roux JC and Fanlo JL, Biofiltration of a mixture of volatile organic compounds on granular activated carbon. *Biotechnol Bioeng* **83**:479–488 (2003).
20 Jackson LE, Schimel JP and Firestone MK, Short-term partitioning of ammonium and nitrate between plants and microbes in an annual grassland. *Soil Biol and Biochem* **21**:409–415 (1989).
21 Wang J and Bakken LR, Competition for nitrogen during mineralization of plant residues in soil: microbial response to C and N availability. *Soil Biol. Biochem* **29**:163–170 (1997).
22 Helal HM and Sauerbeck D, Effects of plant roots on carbon metabolism of soil microbial biomass. *Zeitschrìft fur PJanzenernährung Bodenkunde* **149**:l–188 (1986).
23 Merckx R, Dijkstra A, den Hartog A and van Veen JA, Production of root-derived material and associated microbial growth in soil at different nutrient levels. *Biol Fertiliz Soils* **5**:126–132 (1987).
24 Song J, Ramirez J and Kinney KA, Nitrogen utilization in a vapor-phase biofilter. *Water Res* **37**:4497–4505 (2003).
25 Aizpuru A, Dunat B, Christen P, Auria R, Garcia-Pena I and Revah S, Fungal biofiltration of toluene on ceramic rings. *J Environ Eng* **131**:396–402 (2005).
26 Delhomenie MC, Bibeau L, Roy S, Brzezinski R and Heitz M, Influence of nitrogen on the degradation of toluene in a compost-based biofilter. *J Chem Biotechnol* **76**:997–1006 (2001).
27 Orwin KH and Wardle DA, New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. *Soil Biol Biochem* **36**:1907–1912 (2004).
28 Patra AK, Abbadie L, Clays-Josserand A, Degrange V, Grayston SJ and Loiseau P, *et al*, Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecol Soc Am* **75**:65–80 (2005).
29 Juteau P, Larocque R, Rho D and LeDuy A, Analysis of the relative abundance of different types of bacteria capable of toluene degradation in a compost biofilter. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**:863–868 (1999).
30 Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S and Vivanco JM, The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Plant Biol* **57**:233–266 (2006).
31 Foght J, Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *J Mol Microbiol Biotechnol* **15**:93–120 (2008).
32 Evans PJ, Mang DT and Young LY, Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* **57**:450–454 (1991).
33 Wang A, WU L, Ren N, Zhao D and Yan M, Feasibility of denitrifying phosphorus removal technique using nitrite as electron acceptor. *China Environ Sci* 2005–05 (2005).

 © 2012 Society of Chemical Industry

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Compléments de discussion

Les résultats précédemment présentés dans l'article ont révélé qu'un biofiltre végétalisé est capable de traiter un effluent gazeux caractérisé par des concentrations en TEX particulièrement faibles (200 $\mu g.m^{-3}$ par composé). Un taux d'élimination de 70% a effectivement été observé. L'efficacité de dégradation est similaire pour les deux conditions expérimentales testées, biofiltre planté ou non planté, dès lors que la disponibilité en nutriments n'est pas limitante.

Le traitement de très faibles concentrations par biofiltration est un des aspects innovants de l'étude qui n'a pas été discuté dans l'article. Durant le processus de biodégradation, la concentration en polluants organiques conditionne l'activité des microorganismes et donc les performances du procédé (Guieysse *et al.*, 2008). Il convient, dans un premier temps, d'évaluer la part des phénomènes physico-chimiques dans l'élimination des polluants. Ainsi, les capacités de sorption du matériau support ont été approchées. Dans un second temps, la concentration des composés dans la phase liquide a été évaluée afin d'estimer la disponibilité des polluants pour les microorganismes. En s'appuyant sur des exemples issus de la littérature, des hypothèses sur les mécanismes permettant d'expliquer la biodégradation de polluants en faibles concentrations dans la phase gazeuse sont proposées.

Par ailleurs, les activités biologiques ne sont pas homogènes au sein du biofiltre. Des activités de respiration et de dénitrification plus élevées en haut de la colonne qu'au niveau de l'arrivée de l'air pollué ont été observées. Il semble donc pertinent de vérifier s'il y a également une stratification de l'activité de dégradation des TEX au sein des biofiltres. La détermination de relations, si elles existent, entre les fluctuations environnementales et la spatialisation des activités biologiques a fait l'objet d'une attention particulière.

Faibles concentrations : phénomènes physico-chimiques vs biodégradation

Pour comprendre le fonctionnement d'un biofiltre, il est important de s'intéresser aux phénomènes biologiques et physico-chimiques intervenant dans l'élimination des composés.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Lors du fonctionnement des biofiltres pour le traitement de l'air, le premier processus d'élimination est dû aux mécanismes physico-chimiques et correspond (Kraakman *et al*., 2011) :

- à des phénomènes de sorption des polluants à la surface du garnissage (adsorption),
- au transfert des polluants de la phase gazeuse à la phase aqueuse (absorption).

La biodégradation des composés se met en place progressivement, l'élimination des composés par cette voie n'est observable que dans un second temps (Aizpuru, 2001).

Dans le cas du traitement de faibles charges en polluants, en fonction des capacités de sorption du garnissage utilisé, la part de ces phénomènes physico-chimiques peut devenir particulièrement importante, voire constituer la seule forme d'élimination.

Evaluation des phénomènes physico-chimiques au sein des biofiltres

Dans le but d'évaluer et de quantifier la part de ces phénomènes de sorption dans les biofiltres végétalisés mis en œuvre au laboratoire, l'identification et la quantification des composés adsorbés sur le garnissage ont été réalisées à l'IRCE Lyon (Institut de Recherche sur la Catalyse et l'Environnement de Lyon). Pour cela, la volatilisation des composés piégés sur des échantillons de garnissage a été réalisée par désorption thermique. Les composés libérés ont été séparés par chromatographie en phase gazeuse après une étape de pré-concentration par la technique de micro-extraction en phase solide (SPME). La quantification et l'identification de ces composés n'ont cependant pas été possibles en raison de l'humidité du garnissage. Ces mesures sont généralement pratiquées à partir de matériaux secs. Dans notre cas, la proportion d'eau par rapport aux faibles quantités de polluants fixées sur le garnissage a rendu impossible la détection des composés recherchés.

Afin de contourner cette difficulté et d'appréhender au mieux les phénomènes de sorption au sein des biofiltres, la quantité de polluants fixés sur le garnissage a été estimée à partir des taux d'abattement mesurés durant les deux premiers jours de fonctionnement. En effet, un taux d'abattement élevé et de courte durée est caractéristique des phénomènes de sorption des composés sur le garnissage (Aizpuru *et al*., 2003). Le calcul permettant cette estimation est basé sur la quantité de polluants

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

éliminée durant cette phase de sorption rapportée au volume de garnissage utilisé. Dans notre cas, un taux d'abattement d'environ 80% a été observé dès le début de l'expérimentation (jours 1 et 2) avant d'atteindre des valeurs proches de zéro (jour 3). Ainsi, en tenant compte de la concentration en TEX en entrée et sortie de biofiltre, du débit gazeux et de la durée pendant laquelle ce niveau d'abattement (80%) a été observé (2 jours), environ 41,5 mg de TEX ont été piégés par biofiltre. Cela correspond à une capacité de sorption des TEX d'environ 5,4 $g.m^{-3}$ de garnissage humide. Cette capacité de sorption est relativement faible par rapport à celle obtenue à partir d'autres garnissages organiques tel que le compost par exemple, pour lequel elle est comprise entre 17 et 24$g.m^{-3}$ (Delhoménie *et al.*, 2002b). Elle est également nettement inférieure à celle mesurée pour des matériaux tel que le charbon actif utilisé dans certains procédés physico-chimiques. Aizpuru *et al.* (2003) ont montré que la capacité de sorption du charbon actif utilisé comme garnissage de biofiltre est d'environ 8 kg de $COV.m^{-3}$ de garnissage humide.

Faibles concentrations et dégradation biologique des composés

Après ajout de nutriments, les biofiltres végétalisés ont atteint un état stationnaire durant lequel des performances épuratoires supérieures à 70% d'abattement des TEX ont été observées. Cette seconde phase d'élimination est due à l'activité de la composante microbienne du biofiltre (Khammar *et al.,* 2005). La capacité d'élimination (EC) des réacteurs peut être calculée pendant la période stationnaire selon la formule suivante (Kennes *et al.*, 2009) :

$$EC = \frac{Q \cdot (C_{in} - C_{out})}{V}$$

Q : débit de l'effluent à traiter ($m^3.h^{-1}$)

C_{in} et C_{out} : concentrations des TEX ($mg.m^{-3}$) respectivement en entrée et en sortie des réacteurs

V : volume de garnissage traversé (m^3)

La capacité d'élimination est exprimée en mg de TEX éliminés par m^3 de garnissage et par heure ($mg.m^{-3}.h^{-1}$). Dans les biofiltres végétalisés, elle est d'environ 99 $mg.m^{-3}.h^{-1}$.

Afin d'évaluer la disponibilité des polluants pour les microorganismes, les concentrations théoriques de TEX dans la phase aqueuse des biofiltres peuvent être

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

estimées en utilisant le coefficient de partage air-eau de chacun des composés (loi de Henry). Le calcul de ces concentrations repose sur les hypothèses suivantes :

- les biofiltres sont considérés comme des réacteurs à l'équilibre,
- la température est supposée constante et égale à 20°C (en pratique elle varie de 19 à 21°C durant l'expérimentation),
- la phase aqueuse du biofiltre est assimilée à de l'eau pure.

Les résultats sont présentés dans le tableau II.1. La constante de Henry de chaque composé est donnée pour une température de 20°C, sous sa forme adimensionnelle, c'est-à-dire comme le rapport de la concentration du composé dans l'eau sur sa concentration dans la phase gazeuse (Aizpuru, 2001).

Composé	$H_{20°C}$	C_g (µg.m^{-3})	C_l (µg.L^{-1})
Toluène	4,50	200	0,90
Éthylbenzène	4,05	200	0,81
Xylène	3,80	200	0,76

Tableau II.1. Calcul des concentrations théoriques de TEX dans la phase aqueuse des biofiltres (µg.L^{-1}). Pour chaque composé sont indiquées la constante de Henry ($H_{20°C}$) à 20°C sous sa forme adimensionnelle, la concentration dans la phase gazeuse (C_g) et la concentration théorique dans la phase aqueuse (C_l).

L'alimentation des pilotes conduit à des concentrations théoriques de TEX dans la phase aqueuse de 0,90 ; 0,81 et 0,76 µg.L^{-1} respectivement pour chacun des TEX.

Roch et Alexander (1997) ont suggéré que la dégradation biologique des polluants est influencée par la disponibilité des molécules. La présence de polluants en très faibles concentrations peut empêcher leur dégradation rapide dans l'environnement. Cet effet est d'autant plus marqué que les bactéries n'ont pas été préalablement acclimatées aux polluants à traiter. Ces auteurs ont également montré que la concentration seuil de toluène dissous dans l'eau pour développer et maintenir une activité de dégradation due aux bactéries est de 0,9 µg.L^{-1}. Cette valeur correspond à la concentration en toluène estimée dans les biofiltres (tableau II.1) mis en œuvre dans le cadre de notre étude, ce qui est compatible avec une dégradation biologique.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette activité biologique de dégradation des polluants malgré les faibles concentrations :

- Les microorganismes sont capables de dégrader certains COV par co-métabolisme en utilisant un autre substrat carboné pour la croissance. Pahm et Alexander (1993), ont suggéré que la présence simultanée de plusieurs sources de carbone en faible concentration favoriserait la minéralisation des composés. Les oxydes de carbone, par exemple, peuvent être utilisés comme sources de carbone complémentaires. Lors d'une étude en laboratoire sur l'élimination des COV par des plantes en pot, Orwell *et al.* (2006) ont observé que la présence de toluène accélère l'élimination du xylène. De plus, dans des conditions de carence, les microorganismes sont capables d'augmenter rapidement leur affinité pour un substrat limitant ou de s'acclimater à dégrader un grand nombre de sources carbonées (Kovarova-Kovar et Egli, 1998).
- La formation et le développement de biofilm peuvent également permettre d'atteindre plus aisément de telles performances d'élimination. L'accumulation des polluants au sein du biofilm augmente leur biodisponibilité jusqu'à ce que la dégradation biologique devienne possible (Singh *et al.*, 2006).
- La présence de plantes peut fournir, via l'exsudation racinaire, suffisamment de substrat énergétique et de carbone pour la croissance des microorganismes comme le montrent les activités microbiennes enregistrées dans la rhizosphère de biofiltres végétalisés sous forme de pots. Dans le cadre de l'amélioration de la qualité de l'air de bureau par ces systèmes, Wood *et al.* (2006) ont montré qu'une concentration de 300 à 400 $\mu g.m^{-3}$ de COV totaux est suffisante pour induire une réponse biologique permettant d'atteindre des niveaux d'abattement des COV de l'ordre de 75%.

Spatialisation de la dégradation au sein du biofiltre

Une stratification de l'activité potentielle de dénitrification a été observée dans les biofiltres, cette dernière n'ayant pu être détectée que dans la moitié supérieure des biofiltres, entre 20 cm et 40 cm (Table 2, page 99). Les mesures de respiration présentées dans l'article portaient sur les hauteurs supérieures du garnissage, entre 20 cm et 40 cm (Table 3, page 99). Celles-ci ont été complétées par des mesures réalisées

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

sur les échantillons de garnissage provenant des hauteurs 0-10 cm et 10-20 cm. L'ensemble des résultats figure dans le tableau II.2 :

Hauteur	SIR (µg C eq CO_2.gGS^{-1}.h^{-1})	
	Non Planté	Planté
30-40 cm	19	28
20-30 cm	15	21
10-20 cm	18	15
0-10 cm	17	15

Tableau II.2. Activité potentielle de respiration (SIR) exprimée en µg de carbone équivalent CO_2 par g de garnissage sec et par heure (µg C eq CO_2.g^{-1}GS.h^{-1}) pour chaque hauteur des différents biofiltres.

Bien que les mesures de respiration révèlent la présence d'une biomasse sur toute la hauteur des biofiltres, celle-ci semble plus importante dans la partie supérieure du garnissage.

Afin d'évaluer l'homogénéité de l'activité de dégradation des TEX, les mesures du taux d'élimination de ces composés réalisées à 40 cm ont été complétées, en fin d'expérimentation, par des mesures effectuées à mi-hauteur (20 cm). Les résultats sont présentés dans le tableau II.3.

Hauteur	Abattement moyen des TEX pour chaque biofiltre (%)	
	Non Planté	Planté
40 cm	70	69
20 cm	0	0

Tableau II.3. Taux d'abattement moyen des TEX (%) calculés en fin d'expérimentation aux hauteurs 20 cm et 40 cm (sortie) pour chaque biofiltre.

Aucune activité n'a été détectée à 20 cm. L'abattement des TEX a donc lieu uniquement dans la partie supérieure des réacteurs, comprise entre 20 cm et 40 cm de hauteur de garnissage.

Les observations macroscopiques des deux biofiltres suggèrent une différence d'humidité entre le bas et le haut des colonnes. Plusieurs auteurs ont démontré que le taux d'humidité du garnissage est un paramètre particulièrement important pour le développement et le maintien des activités biologiques et donc des performances épuratoires des biofiltres (Klapkova *et al.*, 2006 ; Badilla *et al.*, 2010 ; Shareefdeen *et al.*, 2010). Cette observation pourrait expliquer la répartition des activités microbiennes au sein des biofiltres végétalisés, notamment l'activité de dégradation des TEX. Afin de vérifier cette hypothèse, des mesures du taux d'humidité aux différentes hauteurs du garnissage ont été effectuées. Les résultats sont présentés dans le tableau II.4 :

Hauteur	Humidité pour chaque biofiltre (%/GS)	
	Non Planté	Planté
motte	276	218
30-40 cm	240	197
20-30 cm	241	142
10-20 cm	11	13
0-10 cm	10	10

Tableau II.4. Taux d'humidité (%) calculé par rapport au poids du garnissage sec (GS) pour chaque hauteur des différents biofiltres.

Les résultats montrent que l'humidité du garnissage est environ 20 fois plus élevée dans la partie supérieure des biofiltres ce qui corrobore les observations macroscopiques.

Les activités de dénitrification et de dégradation des TEX sont localisées exclusivement entre 20 et 40 cm de hauteur, zone dans laquelle le taux d'humidité du garnissage est plus élevé. Un taux d'humidité trop bas (de l'ordre de 10%) s'avère incompatible avec la mise en place et le maintien de ces activités microbiennes. La teneur en eau du garnissage semble bien avoir un impact direct sur les activités microbiennes et, par conséquent, sur les performances épuratoires des biofiltres. L'irrigation des biofiltres est donc un paramètre essentiel même si celle-ci est difficile à maîtriser.

Ces observations suggèrent que :

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

- l'augmentation de l'humidité dans la partie basse du biofiltre pourrait favoriser le développement d'une activité de dégradation des composés dans cette zone. Si la dégradation des TEX est répartie sur toute la hauteur de colonne, les capacités d'abattement des biofiltres sont susceptibles d'être améliorées. Un suivi particulier sera porté sur l'irrigation dans la partie suivante,
- un taux d'abattement des TEX de l'ordre de 70% est obtenu pour une hauteur de garnissage de seulement 20 cm (entre 20 et 40 cm). L'utilisation d'un biofiltre d'épaisseur plus faible semble donc être envisageable. Cette hypothèse fera également l'objet d'une attention particulière au chapitre suivant.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

PARTIE 2 : Influence de l'apport d'engrais sur le fonctionnement du biofiltre végétalisé

1. Introduction

La conception d'aménagements urbains mettant en œuvre des procédés de traitement d'air doit prendre en compte l'acceptabilité de ces équipements par les citadins, notamment en termes esthétiques. L'utilisation de plantes dans les biofiltres, conçus sous forme de toitures ou de murs végétalisés, permet une intégration paysagère de ce procédé. L'introduction de nouvelles zones végétalisées dans les centres ville favorise également la biodiversité et contribue au bien-être des citadins (Brown et Grant, 2005). L'aspect esthétique des biofiltres végétalisés est donc un facteur important pour encourager leur installation au cœur des villes. Par conséquent, il est nécessaire de maîtriser et d'entretenir le développement des plantes au sein des biofiltres. Ceci implique une irrigation et un apport d'engrais suffisant pour assurer une croissance pérenne des végétaux.

Par ailleurs, comme cela a été mis en avant précédemment, l'humidité du garnissage et la présence de nutriments influencent les capacités d'élimination des TEX au sein des biofiltres. De nombreux auteurs ont effectivement montré que ces deux paramètres ont un impact important sur les activités microbiennes et donc sur les performances épuratoires des biofiltres (Aizpuru *et al.*, 2001 ; Delhoménie *et al.*, 2002a ; Song *et al.*, 2003 ; Klapkova *et al.*, 2006 ; Sakuma *et al.*, 2009 ; Badilla *et al.*, 2010 ; Shareefdeen *et al.*, 2010).

Cette seconde partie de chapitre est consacrée à l'étude de l'influence de l'apport d'engrais. Elle aborde plus particulièrement l'impact de l'utilisation d'un « engrais retard » sur le fonctionnement des réacteurs, l'objectif étant de simplifier et homogénéiser les apports d'azote et de phosphore. L'humidité du garnissage jouant un rôle important dans la capacité d'abattement des réacteurs (Partie 1, page 107), une attention particulière a également été portée sur l'irrigation des biofiltres. Dans le but de mieux comprendre l'influence de ces deux paramètres opératoires sur le fonctionnement microbien du biofiltre végétalisé, l'activité de la microflore des biofiltres a été étudiée en ciblant trois communautés fonctionnelles. Des mesures de respiration ont été réalisées afin d'estimer la biomasse et d'apprécier l'état physiologique de la communauté hétérotrophe totale. L'activité de la communauté microbienne dégradant les TEX a été suivie en vue de déterminer les performances épuratoires des biofiltres.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Enfin, des mesures d'activité potentielle de dénitrification ont été effectuées pour évaluer la présence d'une communauté bactérienne potentiellement capable de dégrader les NOx. Ces activités ont toutes été mesurées à différentes hauteurs de garnissage afin d'observer leur répartition spatiale au sein des biofiltres.

Le dispositif expérimental utilisé comporte six biofiltres et inclut la mise en place de réplicats afin de vérifier la reproductibilité des résultats observés. L'objectif de ce travail est de répondre aux questions suivantes :

- l'utilisation d'un engrais retard (sous forme solide dans le garnissage) est-elle compatible avec l'élimination des TEX au sein des biofiltres ? Cet engrais retard est-il suffisant ou est-il nécessaire d'apporter un fertilisant supplémentaire ? Ces deux conditions (avec et sans fertilisant supplémentaire) modifient-elles l'influence de la plante sur l'efficacité de traitement ?
- dans ces nouvelles conditions d'amendement, quelles sont les performances épuratoires d'un biofiltre végétalisé d'une épaisseur de 40 cm traitant de faibles concentrations de TEX ? Quel est l'état physiologique de la biomasse se développant dans les biofiltres ? Y-a-il un potentiel de dégradation des NOx ?
- comment sont réparties les activités microbiennes au sein du biofiltres ? Les conditions d'amendement influencent-elles cette répartition ?

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

2. Matériel et Méthodes

2.1. Système expérimental pilote

Le dispositif expérimental utilisé lors de cette étude est similaire à celui présenté dans l'article (figure 1, page 97).

En résumé, les colonnes de biofiltre contenant 40 cm de hauteur de garnissage sont alimentées simultanément par un flux ascendant d'un mélange gazeux synthétique humide, contenant 600 µg.m^{-3} de TEX (200 µg.m^{-3} de chaque composé). Le débit d'air appliqué (1,8 m^3.h^{-1}) correspond à une vitesse de passage de l'air en entrée de colonne de 100 m.h^{-1} (EBRT de 14 s).

Six biofiltres fonctionnant sous trois conditions différentes ont été suivis en parallèle durant 68 jours (figure II.1). Deux biofiltres témoins ne comportent pas de plante mais seulement la motte de terreau (NP) et les quatre autres sont plantés d'un lierre, *Hedera helix* (biofiltres P et PE).

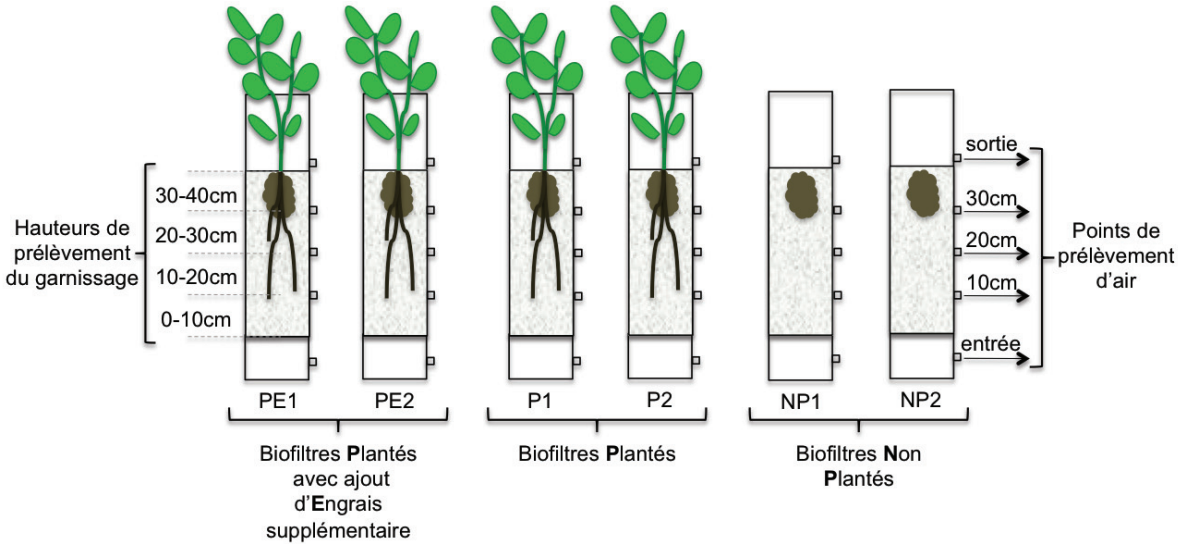


Figure II.1. Description de l'installation pilote utilisée comportant six biofiltres avec engrais retard alimentés simultanément en TEX. PE1 et PE2 : biofiltres Plantés avec ajout d'Engrais liquide. P1 et P2 : biofiltres Plantés. NP1 et NP2 : biofiltres Non Plantés. Les points de prélèvement d'air pour les analyses chromatographiques sont situés en entrée, à 10, 20, 30 cm de hauteur et en sortie (40 cm). Le garnissage est échantillonné en fonction de la hauteur dans le biofiltre pour les analyses microbiologiques, entre 0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm et 30-40 cm.

Le garnissage utilisé pour l'ensemble des biofiltres de cette étude est le même que celui utilisé précédemment (Materials and methods, page 97) dans lequel a été ajouté un « engrais retard » (NPK 12/12/17, Canevaflor, Tarare, France). Cet engrais à diffusion

lente se présente sous forme de billes hydrosolubles dans lesquelles l'engrais est enrobé. Ces granulés sont largement utilisés en horticulture car ils permettent une meilleure gestion de la fertilisation. La dissolution de l'enrobé permet une diffusion progressive de l'engrais au cours du temps. La composition complète de cet engrais figure dans le tableau II.5. La concentration utilisée est de 1,4 $kg.m^{-3}$ de garnissage, ce qui correspond à 10,5 g d'engrais retard par biofiltre soit une quantité totale d'azote apportée d'environ 1,3 g sur 12 mois. L'utilisation de cet engrais retard a été testée dans chaque biofiltre.

Composition engrais granulé NPK 12.12.17			
Macro-éléments		**Oligo-éléments**	
Azote	**12%**	B	0,02%
NO_3	5,5%	Fe	0,3%
NH_4	6,5%	Zn	0,01%
P_2O_5	**12%**		
K_2O	**17%**		
MgO	**2%**		

Tableau II.5. Composition de l'engrais retard utilisé dans les biofiltres (Canevaflor®, Tarare, France).

La nécessité de compléter l'apport d'éléments nutritifs a été également étudiée en ajoutant un engrais supplémentaire (sous forme liquide) dans deux biofiltres plantés (PE). L'engrais utilisé est identique à celui décrit dans l'article (Table 1, page 98). Dans ce cas, 80 mL d'une solution d'engrais (NPK 24/20/02) à 0,7 $g.L^{-1}$ ont été apportés manuellement de manière homogène à la surface du garnissage tous les deux jours.

L'irrigation est assurée grâce à des micro-goutteurs disposés à la surface du garnissage (au pied de la plante). Le dispositif d'irrigation comporte un programmateur permettant un pilotage automatique et indépendant de l'arrosage dans les différents biofiltres. La quantité d'eau apportée a été ajustée en cours d'expérimentation et varie entre 40 mL et 90 mL en moyenne par jour et par biofiltre. L'absence d'eau de percolation en pied de colonne a été vérifiée quotidiennement.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

2.2. Paramètres opératoires mesurés

2.2.1. Analyse de la phase gazeuse

Les concentrations de chaque composé de l'effluent gazeux ont été déterminées quotidiennement en entrée et en sortie de réacteur par GC/FID (Materials and methods, page 98). Le taux d'élimination des TEX a été calculé sur une moyenne de 3 mesures consécutives réalisées en sortie de réacteur (erreurs standards inférieures à 6%) par rapport à la moyenne de 40 mesures consécutives réalisées en entrée de réacteur (erreurs standards inférieures à 4%). Des mesures supplémentaires ont été réalisées à 10, 20 et 30 cm de hauteur une à deux fois par semaine. Le taux d'élimination a été calculé pour ces différentes hauteurs de biofiltre comme décrit précédemment (Materials and methods, page 98).

2.2.2. Température

La température ambiante a été suivie en continu à l'aide d'un thermo enregistreur digital (Testo 174, TESTO, France). La température moyenne mesurée durant les 68 jours de suivi du fonctionnement des biofiltres varie de 24°C à 29°C (nuit/jour), avec un minimum de 18°C la nuit et un maximum de 32°C le jour.

2.2.3. Pertes de charges

Les pertes de charges ont été mesurées quotidiennement pour chaque biofiltre à l'aide d'un micromanomètre à tubes inclinables (Mk4, Airflow Developments, Canada). Elles sont exprimées en $KPa.m^{-1}$.

2.2.4. Taux d'humidité

Le taux d'humidité du garnissage a été mesuré en fin d'expérimentation selon la méthode décrite précédemment (Materials and methods, page 98). Ces mesures ont été réalisées pour chaque hauteur de prélèvement de garnissage, ainsi que dans la motte.

2.3. Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques concernant la communauté microbienne totale et la communauté bactérienne dénitrifiante ont été effectuées à la fin de l'expérimentation selon le protocole décrit dans l'article (Materials and methods, page 98). Les mesures des activités potentielles de SIR et de DEA ont été réalisées sur les échantillons de

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

garnissage prélevés aux différentes hauteurs des biofiltres (figure II.1). La motte a été dissociée du garnissage à partir des échantillons prélevés entre 30 et 40 cm et constitue un échantillon indépendant.

2.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données issues des mesures d'activités, de concentration en TEX ont été effectuées à l'aide du logiciel R V.2.6.2. La normalité et l'homoscédasticité n'étant pas vérifiées lors des tests de Shapiro-Wilk et de Bartlett, les comparaisons des moyennes obtenues ont été réalisées par des analyses de variance basées sur le test de Kruskal-Wallis (non paramétrique). Le seuil de rejet du risque α (seuil de signification) a été fixé à 5%.

3. Résultats

Le fonctionnement des biofiltres a été suivi pendant 68 jours en prenant en compte les paramètres suivants :

- les pertes de charges et la teneur en eau du garnissage,
- les performances épuratoires globales des bioréacteurs,
- les performances épuratoires de chaque composé et la stratification de l'activité de dégradation des TEX en fonction de la hauteur de colonne,
- les activités microbiennes potentielles (SIR, DEA).

3.1. Paramètres opératoires mesurés

3.1.1. Evolution des pertes de charge

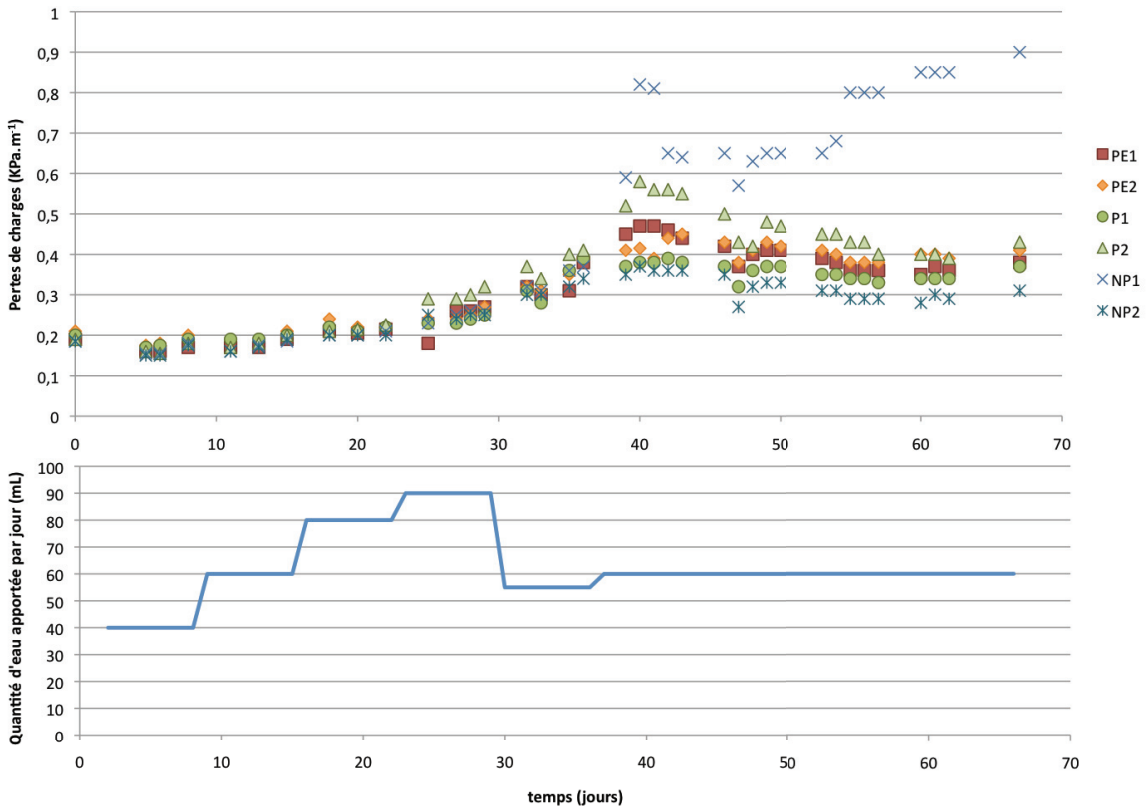


Figure II.2. En haut : Evolution des pertes de charge (KPa.m^{-1}) en fonction du temps (jours). PE : biofiltres Plantés avec ajout d'Engrais ; P : biofiltres Plantés ; NP : biofiltres Non Plantés. En bas : Quantité d'eau apportée quotidiennement par biofiltre (mL).

La figure II.2 représente l'évolution des pertes de charge mesurées entre l'entrée et la sortie des réacteurs au cours de l'étude, ainsi que les apports d'eau journalier. L'évolution des pertes de charge pour les différents biofiltres suit une tendance similaire

(à l'exception du biofiltre NP1 qui sera présenté séparément). Les pertes de charge augmentent progressivement jusqu'au jour 41, passant de 0,2 à 0,44 KPa.m^{-1}. Elles diminuent ensuite avant de se stabiliser à une valeur moyenne de 0,38 KPa.m^{-1}. Ces variations ne sont pas corrélées avec les différentes quantités d'eau apportées. Aucune différence significative des pertes de charges n'a été observée entre les biofiltres plantés ou non (avec ajout d'engrais ou non) excepté pour un biofiltre non planté (NP1).

Dans le biofiltre NP1, les pertes de charge augmentent rapidement après le 36ème jour pour atteindre 0,82 KPa.m^{-1} à j40, puis 0,9 KPa.m^{-1} en fin d'expérimentation. Ce comportement est révélateur d'un colmatage au niveau du garnissage de ce biofiltre.

3.1.2. Humidité du garnissage

Le taux d'humidité du garnissage a été mesuré en fin d'expérimentation sur toute la hauteur de colonne pour les différents bioréacteurs. Il est exprimé en pourcentage par rapport au poids du garnissage sec (GS).

Hauteurs	Humidité pour chaque biofiltre (%/GS)					
	PE1	PE2	P1	P2	NP1	NP2
motte	366	417	349	327	402	344
30-40 cm	254	333	296	325	281	356
20-30 cm	254	343	251	310	388	280
10-20 cm	304	587	243	323	357	302
0-10 cm	327	260	48	399	504	284
Moyenne	301 *(48)*	388 *(124)*	237 *(114)*	337 *(35)*	386 *(81)*	313 *(35)*

Tableau II.6. Taux d'humidité (%) calculé par rapport au poids du garnissage sec (GS) en fonction de la hauteur de colonne des différents biofiltres. Moyenne des taux d'humidité : calculée pour chaque réacteur ; écarts-types : italique entre parenthèse. PE : biofiltre Planté avec ajout d'Engrais ; P : biofiltre Planté ; NP : biofiltre Non Planté.

Les taux d'humidité moyens du garnissage sont hétérogènes entre réplicats (tableau II.6). Trois groupes de biofiltres peuvent être différenciés :

- PE1, P2 et NP2 présentent des taux d'humidité moyens proches (317% en moyenne) avec des écarts-types faibles ce qui signifie que l'humidité est répartie de façon homogène sur la hauteur du garnissage,

- PE2 et NP1 présentent des taux d'humidité moyens plus élevés (387% en moyenne), les écarts-types importants indiquent une répartition moins homogène de l'humidité dans le garnissage,

- P1 présente le taux d'humidité moyen le plus faible (237%), notamment en raison d'une teneur en eau très basse en entrée du gaz à traiter (0-10 cm).

3.2. Fonctionnement global des bioréacteurs

Les niveaux d'efficacités d'élimination des TEX (%) ont été suivis au cours du temps pour chacun des six biofiltres (figure II.3).

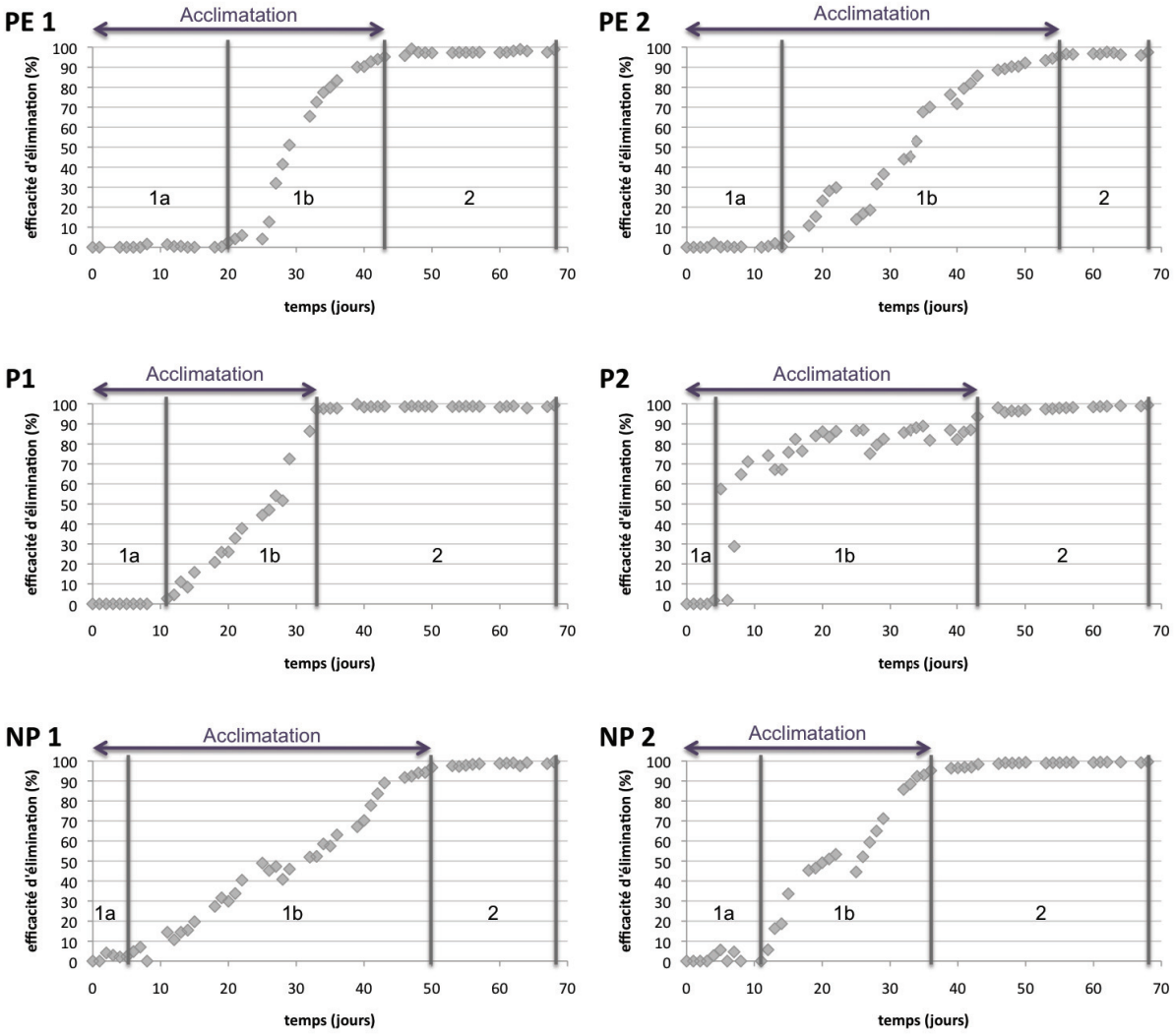


Figure II.3. Efficacité d'élimination des TEX (%) au cours du temps (jours). PE1 et PE2 : biofiltres Plantés avec ajout d'Engrais ; P1 et P2 : biofiltres Plantés ; NP1 et NP2 : biofiltres Non Plantés. Les phases de fonctionnement sont séparées par les barres verticales ; 1a : latence, 1b : optimisation, 2 : stationnaire. La période d'acclimatation (1) est indiquée par une double flèche.

L'évolution de l'efficacité d'élimination des TEX est similaire dans les six biofiltres. Deux périodes peuvent être distinguées (figure II.3) :

- La période d'acclimatation (1) :

Regroupant les phases de latence (1a) et d'optimisation (1b), cette période est définie comme le temps nécessaire à la sélection et à la structuration spatiale d'un consortium microbien efficace pour la dégradation des polluants (Bayle, 2005). Elle correspond donc à la mise en place d'un écosystème efficace pour la dégradation des composés et représente la durée de prise d'efficacité du réacteur avant que celui-ci atteigne un état stationnaire.

- La période stationnaire (2) :

Elle correspond à la période pendant laquelle l'abattement des composés se stabilise à son maximum. Les études de biofiltration sont largement focalisées sur cette période car elle permet d'approcher les performances épuratoires optimales des réacteurs. La période stationnaire est considérée dès lors que des performances épuratoires stables se maintiennent dans le temps.

Dans le cadre de cette étude, des performances épuratoires supérieures à 97% d'abattement des TEX sont atteintes pour les six bioréacteurs. Toutefois, des variations de la durée des différentes phases de fonctionnement sont observées y compris entre réplicats (figure II.3).

La période d'acclimatation présente une durée globale moyenne de 44 jours pour les six réacteurs. Elle est en moyenne de :

- 49 jours pour les biofiltres PE (43 jours pour PE1 et 55 jours pour PE2),
- 38 jours pour les biofiltres P (33 jours pour P1 et 43 jours pour P2),
- 45 jours pour les biofiltres NP (50 jours pour NP1 et 37 jours pour NP2).

La période stationnaire observée sur la durée de l'expérimentation varie entre 14 jours pour PE1 et 34 jours pour P1.

3.3. Performances épuratoires détaillées

La figure II.4 présente les efficacités d'élimination de chacun des trois polluants pour les différents biofiltres.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

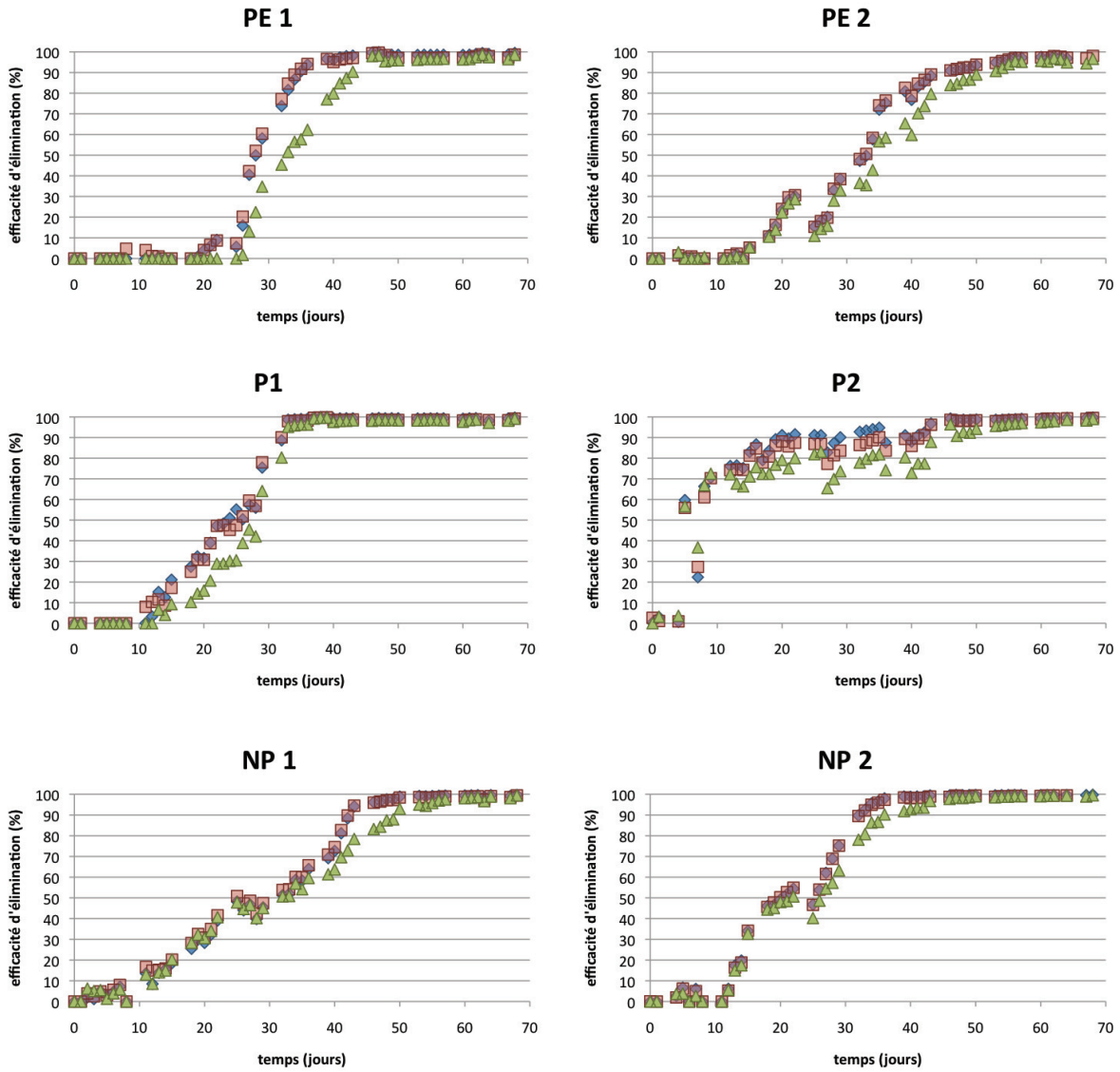


Figure II.4. Efficacité d'élimination de chacun des TEX (%) au cours du temps (jours). PE1 et PE2 : biofiltres Plantés avec ajout d'Engrais ; P1 et P2 : biofiltres Plantés ; NP1 et NP2 : biofiltres Non Plantés.

Les dégradations du toluène et de l'éthylbenzène (TE) présentent des cinétiques similaires dans tous les biofiltres et pendant toute la durée de l'expérimentation. Par contre, la cinétique de dégradation du xylène semble plus lente que celle des TE durant la phase d'optimisation, ce qui est particulièrement visible pour PE1. Ce décalage n'est pas observé durant toute la phase d'optimisation pour les autres réacteurs. La prise d'efficacité concernant la dégradation du xylène présente un décalage d'environ 5 jours en moyenne. Cette différence n'est cependant pas significative, probablement en raison de l'importante variabilité observée entre les réacteurs (figure II.4).

3.4. Stratification des activités microbiennes

3.4.1. Activité de dégradation des TEX : profils longitudinaux d'élimination

La figure II.5 présente les profils de concentration des TEX en fonction de la hauteur de colonne durant la période stationnaire (jour 68 : fin d'expérimentation), pour chaque biofiltre. Le rapport C_o/C_i correspond au rapport de la concentration de TEX au point de prélèvement du gaz sur la concentration de TEX en entrée de réacteur. Exprimé en pourcentage, il représente la concentration de TEX restant à éliminer à chaque hauteur (10, 20, 30 et 40 cm). Ce type de représentation permet de visualiser la contribution de chaque strate de garnissage dans la dégradation des TEX et donc de mieux localiser l'activité de la communauté microbienne capable de dégrader ces polluants au sein des biofiltres.

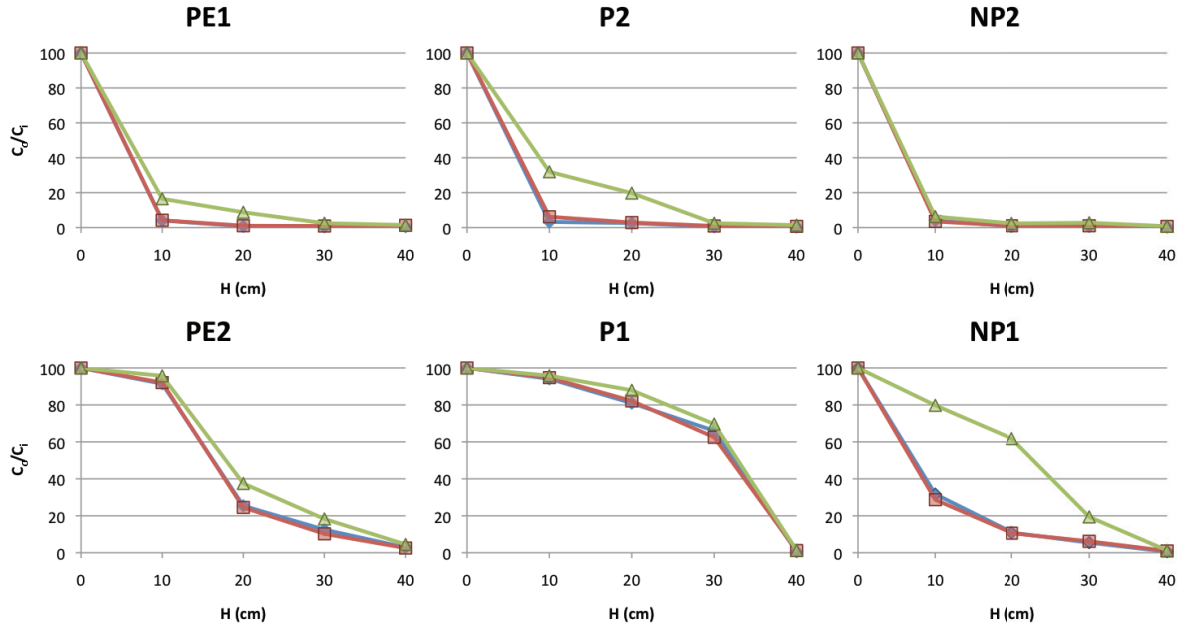


Figure II.5. Profils longitudinaux d'élimination de TEX dans chaque biofiltre en fin d'expérimentation (jour 68). C_o/C_i (%) : concentration en TEX à la hauteur H par rapport à la concentration de ces composés en entrée de réacteur. H : hauteur de garnissage (cm). PE1 et PE2 : biofiltres Plantés avec ajout d'Engrais ; P1 et P2 : biofiltres Plantés ; NP1 et NP2 : biofiltres Non Plantés.

TOLUENE
ETHYLBENZENE
XYLENE

Pour les six biofiltres, les profils longitudinaux de dégradation du toluène et l'éthylbenzène (TE) sont semblables. Les profils de dégradation du xylène sont similaires à ceux observés pour les TE, à l'exception des biofiltres P2 et NP1 pour

lesquels la dégradation du xylène est décalée vers les hauteurs supérieures. Ce constat est particulièrement visible pour NP1 (figure II.5).

Une variabilité relativement importante est observée non seulement entre les différents profils mais aussi entre réplicats. Pour quatre des six biofiltres (PE1, PE2, P2 et NP2) la majeure partie de l'activité de dégradation des TEX se situe entre 0 et 20 cm de hauteur par rapport à l'entrée du gaz, dont un (NP2) présente une efficacité totale d'élimination dès 10 cm de hauteur de garnissage. Pour P1, l'activité de dégradation est située dans la moitié supérieure du biofiltre (entre 20 et 40 cm). Pour NP1, les dégradations des TE sont majoritairement situées dans la moitié inférieure alors que l'activité de dégradation du xylène est répartie sur toute la hauteur de garnissage.

3.4.2. Activité potentielle de respiration : SIR

La figure II.6 présente les activités potentielles de respiration (SIR) mesurées aux différentes hauteurs dans les biofiltres pour les trois conditions de fonctionnement testées. Cette mesure permet d'évaluer la biomasse et l'état physiologique de la communauté microbienne hétérotrophe totale. Les moyennes et écarts-types ont été calculés pour chaque condition.

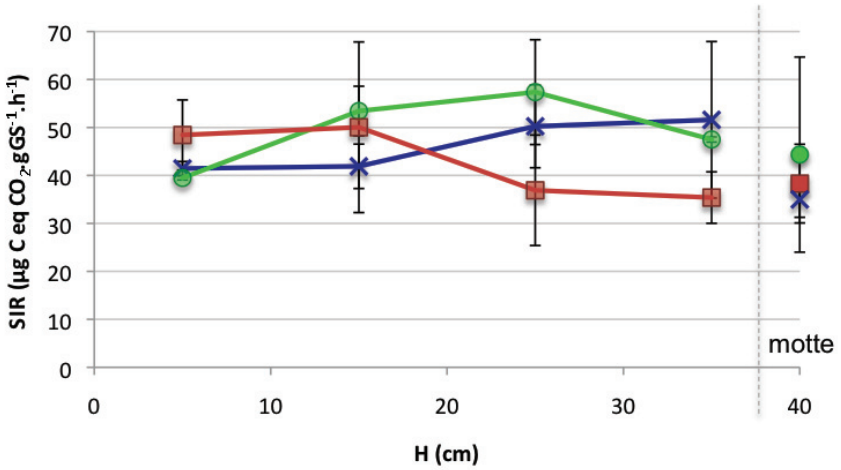


Figure II.6. Activité potentielle de respiration (SIR) exprimée en µg de carbone équivalent CO_2 par g de garnissage sec et par heure (µg C eq $CO_2.g^{-1}GS.h^{-1}$) en fonction de la hauteur de biofiltre. Les valeurs correspondent à la moyenne obtenue pour les deux réplicas d'une même condition de fonctionnement. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 2).

PE
P
NP

D'importantes disparités sont observées pour la SIR entre biofiltres ainsi qu'entre réplicats (figure II.6). La répartition de l'activité potentielle de respiration dans les

biofiltres est relativement hétérogène et varie entre 29 et 65 µg C eq $CO_2.g^{-1}GS.h^{-1}.h^{-1}$, ce qui peut expliquer qu'aucune différence significative n'ait été détectée entre les conditions de fonctionnement testées.

Toutefois, une tendance peut être soulignée dans les réacteurs PE. Ces biofiltres présentent une SIR légèrement plus élevée dans la partie basse des biofiltres (entre 0 et 20 cm) que dans la moitié supérieure. La tendance inverse est observée pour les autres réacteurs (à l'exception de la hauteur 10-20 cm pour les biofiltres P).

L'activité SIR moyenne mesurée sur l'ensemble des biofiltres est de 45 µg C eq $CO_2.g^{-1}GS.h^{-1}$. Elle est sensiblement identique dans la motte.

2.4.3. Activité potentielle de dénitrification : DEA

La figure II.7 présente les activités potentielles de dénitrification (DEA) mesurées aux différentes hauteurs des biofiltres pour les trois conditions de fonctionnement testées. Cette mesure permet d'observer la présence éventuelle d'une communauté dénitrifiante et donc d'évaluer le potentiel de dégradation des NOx dans les réacteurs. Les moyennes et écarts type ont été calculés pour chaque condition.

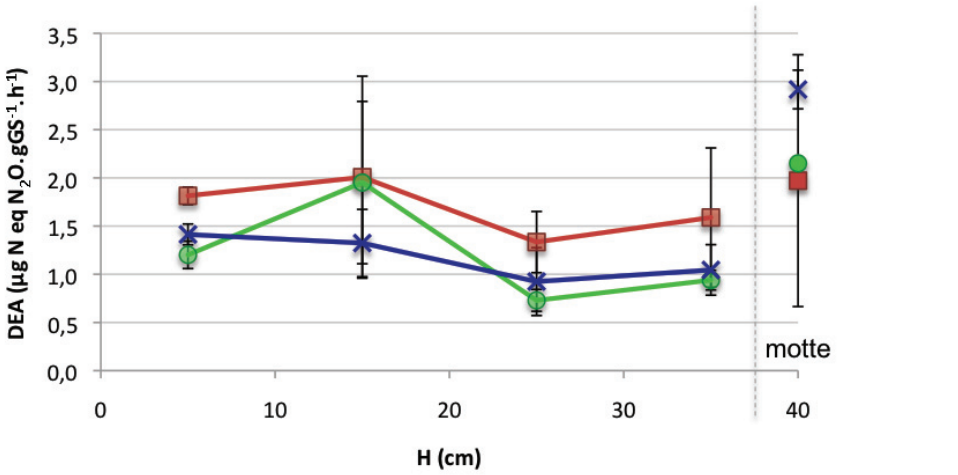


Figure II.7. Activité potentielle de dénitrification exprimée en µg d'azote équivalent N_2O par g de garnissage sec et par heure (µg N eq $N_2O.g^{-1}GS.h^{-1}$) en fonction de la hauteur de biofiltre. Les valeurs correspondent à la moyenne obtenue pour les deux réplicas d'une même condition de fonctionnement. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 2).

Une variabilité importante entre réplicats est également observée pour la DEA. Elle varie entre 0,65 et 3,06 µg N eq $N_2O.g^{-1}GS.h^{-1}$. Ici encore, aucune différence significative n'a été détectée entre les conditions de fonctionnement testées.

Cependant, la DEA tend à être plus élevée dans la partie basse des biofiltres, quelles que soient les conditions de fonctionnement considérées. De plus, les biofiltres PE semblent montrer une DEA légèrement plus importante que les autres réacteurs.

La DEA globale moyenne mesurée sur l'ensemble des biofiltres est de 1,52 µg N eq $N_2O.g^{-1}GS.h^{-1}$. Au niveau de la motte, la DEA parait plus élevée que dans le garnissage.

2.4.3. Relations entre les activités microbiennes

Aucune corrélation n'a été détectée entre la SIR ou la DEA et l'activité de dégradation des TEX.

La figure II.8 montre les ratios (exprimés en pourcentage) des valeurs de DEA sur les valeurs de SIR en fonction de la hauteur de biofiltre et pour les trois conditions de fonctionnement.

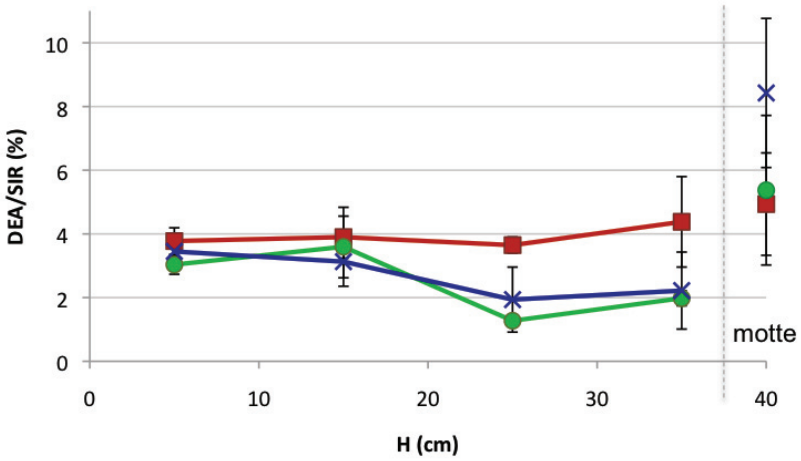


Figure II.8. Ratios (%) de la DEA sur la SIR en fonction de la hauteur de biofiltre. Les valeurs correspondent à la moyenne obtenue pour les deux réplicas d'une même condition de fonctionnement. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 2).

PE
P
NP

Au niveau du garnissage, les biofiltres PE présentent des ratios significativement plus élevés que les réacteurs P ($p = 0,01$) et NP ($p = 0,03$). Ces ratios sont également plus homogènes sur la hauteur de garnissage que pour les autres réacteurs. Les ratios des biofiltres P et NP sont significativement inférieurs dans la partie haute du garnissage (entre 20 et 40 cm) que dans la partie basse ($p < 0,01$).

3.5. Développement des plantes dans les biofiltres végétalisés

Le développement des plantes n'a pas fait l'objet d'une étude spécifique par des mesures de la surface foliaire ou racinaire, néanmoins leur croissance a été suivie par des observations macroscopiques quotidiennes des parties aériennes qui ont permis de vérifier qu'elles présentaient un développement similaire entre les deux conditions d'amendement testées.

En fin d'expérimentation, lors du prélèvement des échantillons de garnissage, une attention particulière a été portée à l'appareil racinaire des plantes. Ceci a permis de détecter la présence de racines jusque dans les parties basses des biofiltres (0-10 cm). Toutefois, la densité racinaire est nettement plus importante au niveau de la motte ainsi que dans la hauteur 30-40 cm, puis elle décroît fortement en dessous de la hauteur de 20-30 cm.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

4. Discussion

Les paramètres opératoires conditionnant les activités microbiennes et le développement des plantes, que sont le taux d'humidité du garnissage et la fertilisation, ont été examinés. Le but était de mieux comprendre leurs impacts sur les performances épuratoires des bioréacteurs, le développement de la biomasse et l'état physiologique de la communauté hétérotrophe totale (SIR), ainsi que sur le potentiel de dégradation des NOx au sein des biofiltres. L'influence de la présence de la plante a également été appréciée.

Trois conditions de fonctionnement de biofiltres végétalisés ont été testées en parallèle et dupliquées afin de tenir compte de la variabilité des bioréacteurs dans l'analyse et la comparaison des résultats obtenus. Chaque biofiltre contenait un engrais retard, sous forme de granulés directement mélangés avec le garnissage, de manière à déterminer la compatibilité entre l'utilisation de ce type de fertilisation et l'élimination des TEX dans ce système de traitement d'air.

Les six biofiltres ont été alimentés par un effluent gazeux synthétique contenant un mélange de TEX à une concentration de 600 $\mu g.m^{-3}$ (200 $\mu g.m^{-3}$ pour chaque composé). Tous ont montré des performances épuratoires supérieures à 97% d'abattement des TEX. Ces résultats sont plus élevés que ceux présentés dans l'article et confirment qu'un biofiltre végétalisé est un dispositif efficace pour le traitement d'air contaminé par de faibles concentrations de TEX.

Cependant, en considérant la stratification de l'activité de dégradation des TEX au sein de chaque biofiltre, des divergences ont été observées, y compris entre réplicats d'une même condition de fonctionnement (figure II.5).

4.1. Influence de l'humidité du garnissage sur les performances épuratoires

Le taux d'humidité du garnissage est un paramètre crucial dans le fonctionnement des biofiltres car il conditionne à la fois le développement et l'activité des microorganismes mais aussi la disponibilité des polluants (Mudliar *et al.*, 2010 ; Kraakman *et al.*, 2011). De plus, pour les biofiltres végétalisés, ce paramètre est également important pour garantir la croissance des plantes.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Dans la première partie de ce chapitre, il a été montré qu'une teneur en eau très faible du garnissage (< 20%) a un impact négatif sur l'activité des microorganismes et les capacités d'épuration des biofiltres végétalisés (Partie 1, page 107). Dans le cadre d'une étude sur la biofiltration du toluène, Sakuma *et al*. (2009) ont montré que la biomasse active est plus importante dans les zones où le taux d'humidité est plus élevé. Plusieurs auteurs ont également montré qu'un taux d'humidité trop bas réduit l'activité microbienne et modifie la structure et la physiologie de la communauté bactérienne dans les biofiltres (Sun *et al*., 2002 ; Sakuma *et al*., 2009 ; Prenafeta-Boldu *et al*., 2012).

Alors que tous les réacteurs ont reçu une alimentation en eau identique, une variabilité importante du taux d'humidité et de la répartition de l'eau dans les biofiltres a été observée en fin d'expérimentation (Tableau II.4). De même, malgré des niveaux d'abattement global similaires, la répartition de l'activité de dégradation des TEX dans le garnissage est différente selon les biofiltres, notamment entre réplicats.

Sur la base de ces deux observations, trois situations peuvent être distinguées, indépendamment des conditions de fonctionnement testées.

Lorsque le taux d'humidité du garnissage est en moyenne de 300% et que la répartition de l'eau sur la hauteur des biofiltres est homogène, l'activité de dégradation des TEX à l'état stationnaire se situe principalement dans la section proche de l'entrée du gaz. C'est le cas des biofiltres PE1, P2 et NP2 pour lesquels l'élimination des TEX est quasiment totale dès 20 cm de hauteur de garnissage. Selon la nature du garnissage utilisé, un taux d'humidité optimal pour lequel les performances des biofiltres sont maximales a été suggéré par différents auteurs (Klapkova *et al*., 2006 ; Badilla *et al*., 2010 ; Nelson et Bohn, 2011). Dans le cas des biofiltres végétalisés, nos résultats indiquent que cet optimum se situe autour de 300% d'eau par rapport au poids sec du garnissage.

Une deuxième situation correspond à un taux d'humidité plus élevé (387% en moyenne pour PE2 et NP1) ainsi qu'à une répartition de l'eau plus hétérogène dans le garnissage. Dans ce cas, l'activité de dégradation des TEX est répartie sur la hauteur de la colonne. L'élimination totale des TEX n'est donc atteinte qu'à 40 cm de hauteur de garnissage. Une teneur en eau excessive limite le transfert de l'oxygène dans les biofiltres provoquant la formation de zones moins oxygénées, au sein desquelles la

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

dégradation des composés est fortement ralentie (Shareefdeen *et al.*, 2010). Ce phénomène pourrait expliquer qu'un taux d'humidité proche de 400% dans les biofiltres végétalisés entraine une distribution plus étalée de l'activité de biodégradation et la nécessité de toute la hauteur de colonne pour atteindre l'élimination complète des composés.

La dernière situation, similaire à celle des biofiltres A et B présentés dans l'article (Partie 1, page 107), est caractérisée par un taux d'humidité plus faible (237% pour P1) et une répartition hétérogène de l'eau dans le garnissage. La moitié inférieure du biofiltre (surtout entre 0 et 10 cm) proche de l'entrée du gaz, est moins humide que la partie haute. Dans ce cas, l'activité de dégradation des TEX est localisée principalement dans la partie haute, plus humide.

Ces trois situations semblent indiquer une influence du taux d'humidité et de la répartition de l'eau dans le garnissage sur la stratification de l'activité de dégradation des TEX dans les biofiltres. Cependant, l'analyse statistique de ces résultats n'a pas permis de mettre en évidence de corrélation significative entre l'humidité du garnissage et l'activité de dégradation des TEX, ce qui peut s'expliquer par le nombre limité de réplicats. La reproductibilité du fonctionnement des bioréacteurs n'est donc pas évidente, même lors d'études menées en laboratoire dans des conditions contrôlées. Ce constat renforce l'importance de la mise en place de réplicats en nombre suffisant pour permettre une analyse statistique des résultats obtenus et ainsi améliorer la compréhension du fonctionnement des biofiltres.

4.2. Irrigation et pertes de charge

L'irrigation des biofiltres est un paramètre important car il conditionne le taux d'humidité du garnissage et contribue aux pertes de charge générées par le passage de l'air au travers du biofiltre. L'écoulement d'un fluide au travers d'un milieu poreux s'accompagne d'une transformation d'énergie mécanique en énergie thermique, généralement exprimée sous forme d'une baisse de pression ou perte de charge (Fanlo, 1994). Ces pertes de charge représentent donc un facteur clef influençant directement la puissance et la consommation électrique des ventilateurs et, par conséquent, les coûts d'installation et de fonctionnement des biofiltres (Estrada *et al.*, 2012).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Afin de limiter les consommations d'eau et d'énergie des biofiltres végétalisés, le volume et la fréquence des apports en eau doivent permettre un fonctionnement efficace sans pour autant générer d'eau de percolation (i.e perte d'eau, de nutriments et de polluants transférés vers cette phase aqueuse), ni une augmentation trop importante des pertes de charge. L'apport quotidien de 7,9 L d'eau par m^3 de garnissage a permis de maintenir des pertes de charges inférieures à 400 $Pa.m^{-1}$ en moyenne (figure II.2) et d'atteindre des performances élevées pour un biofiltre fonctionnant à des températures moyennes comprises entre 24°C et 29°C.

Cependant, le biofiltre NP1 présente une augmentation drastique des pertes de charge caractéristiques d'un phénomène de colmatage. Le colmatage d'un biofiltre peut être dû à une croissance importante de la biomasse entraînant le développement d'un biofilm épais empêchant le passage de l'air à travers le garnissage, comme cela a été observé par Ryu *et al.* (2010). Dans notre étude, les observations macroscopiques du garnissage lors du prélèvement des échantillons n'ont pas permis de constater la présence d'un biofilm visible à l'œil nu. De plus, les mesures de SIR des échantillons provenant du réacteur NP1 ne montrent pas de développement particulièrement important de la biomasse dans ce biofiltre par rapport aux autres.

Par contre, alors que l'alimentation en eau est identique pour les six biofiltres, deux réacteurs présentent des taux d'humidité moyens plus élevés, PE2 (388%) et NP1 (386%) par rapport à une moyenne d'environ 300% pour les quatre autres. Un taux d'humidité trop élevé peut entraîner une réduction de porosité du garnissage, ce qui a pour conséquence une augmentation des pertes de charge (Delhoménie et Heitz, 2005). Pourtant, seul le biofiltre NP1 présente un phénomène de colmatage. Il est possible que la présence de la plante dans PE2 ait permis de limiter les pertes de charge malgré l'humidité élevée du garnissage. L'hypothèse proposée est que le développement du système racinaire de la plante induit la formation de multiples voies qui facilitent le passage du gaz au sein du biofiltre en constituant des chemins préférentiels susceptibles de limiter les pertes de charge.

Cette possibilité peut néanmoins avoir des conséquences négatives car la création de passages préférentiels pourrait entraîner une diminution de l'efficacité d'épuration (Mudliar *et al*., 2010), ce qui n'est pas observé dans notre cas.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

4.3. Influence de l'apport d'engrais sur les performances des biofiltres

La présence de macronutriments et de micronutriments est un facteur déterminant pour le développement des microorganismes et la croissance des plantes. Dans les biofiltres, l'utilisation de garnissage organique peut apporter les nutriments nécessaires au développement de la biomasse microbienne mais Morgenroth *et al.* (1996) ont montré qu'un épuisement rapide de ces ressources nutritives induit une diminution des performances épuratoires. Dans le cas de l'utilisation d'un biofiltre végétalisé, la présence de plantes a un impact négatif sur les performances épuratoires lorsque la disponibilité en nutriments (notamment en azote) est faible (Partie 1, page 98). De plus, différents auteurs ont montré qu'un apport supplémentaire d'azote et de phosphore augmente les performances des biofiltres (Corsi et Seed, 1995 ; Morgenroth *et al.,* 1996 ; Delhoménie *et al*., 2002a ; Song et *al.*, 2003 ; Mathur *et al.*, 2007).

Le garnissage utilisé dans les biofiltres végétalisés contient un engrais retard incorporé directement dans le garnissage lors de sa fabrication. Ce type d'engrais est couramment utilisé en horticulture, aussi bien pour des plantes en pots qu'au champ. En revanche, les engrais solides sont très peu utilisés en biofiltration que ce soit lors d'études de laboratoire ou au niveau industriel. Les apports de solution nutritive sont généralement réalisés au cours du fonctionnement via le système d'irrigation du biofiltre (Delhoménie et Heitz, 2005). Pourtant, il semble particulièrement intéressant d'incorporer l'engrais directement dans le garnissage, à la fois pour réduire la fréquence des apports et pour favoriser une répartition plus homogène des nutriments au sein du garnissage. La durée de vie de cet engrais retard étant d'environ une année il faut envisager d'amender le biofiltre avec un engrais liquide, via le système d'arrosage, au delà de ce délai. L'utilisation d'un engrais retard lors de la mise en fonctionnement du biofiltre peut néanmoins présenter l'avantage d'une répartition plus homogène des ressources nutritives permettant une meilleure acclimatation des microorganismes et favorisant leur développement sur toute la hauteur du biofiltre.

Après 68 jours de fonctionnement :

- aucune différence n'a été mise en évidence entre les performances épuratoires atteintes par les biofiltres végétalisés alimentés ou non en engrais liquide supplémentaire,

- les activités potentielles de respiration et de dénitrification ont été détectées sur toute la hauteur des biofiltres, indépendamment des conditions d'amendement testées.

Ces résultats montrent que l'engrais retard permet d'apporter les nutriments nécessaires au fonctionnement des communautés microbiennes se développant au sein des biofiltres. Son utilisation favorise le développement des plantes et permet de maintenir une biomasse importante capable de dégrader les TEX (et potentiellement les NOx) dans les bioréacteurs.

Le ratio DEA/SIR est significativement plus élevé dans les biofiltres ayant reçu un apport d'engrais supplémentaire (PE) que dans les autres réacteurs (figure II.8). Ce constat est encore plus flagrant dans la partie supérieure des biofiltres à proximité de la surface, où est apporté l'engrais liquide. La diminution des ratios DEA/SIR observée dans cette zone pour les biofiltres n'ayant pas reçu d'engrais supplémentaire est difficilement explicable. Elle ne peut être imputée à la présence de plantes qui pourrait consommer préférentiellement les ressources azotées puisque les biofiltres non plantés présentent le même phénomène. Par contre, il est clair qu'une augmentation de la disponibilité en azote permet de favoriser l'activité potentielle de dénitrification par rapport à la biomasse hétérotrophe totale dans les biofiltres végétalisés. Ce résultat suggère que la présence de NOx, constituant une source d'azote dans les gaz traversant les biofiltres, pourrait favoriser l'activité des microorganismes dégradant ces composés.

4.4. Influence de la présence de plantes sur les performances épuratoires

Les observations macroscopiques quotidiennes ont permis de vérifier que les plants de lierre présentaient un développement normal et similaire entre les deux conditions d'amendement testées.

Les biofiltres plantés ne présentent pas un fonctionnement différent des biofiltres non plantés, comme cela a déjà été mentionné dans la première partie de ce chapitre. Un apport supplémentaire d'engrais n'influence pas les capacités d'élimination des TEX dans les biofiltres plantés. La présence de lierre ne semble donc pas avoir d'impact direct sur les performances épuratoires des bioréacteurs lorsque la disponibilité en nutriment est suffisante.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Toutefois, ce résultat est à nuancer car une seule espèce a été utilisée lors de cette étude. Une variabilité importante des performances épuratoire des COV selon l'espèce végétale sélectionnée a été mise en évidence (Orwell *et al*., 2006 ; Lui *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2009). Yang *et al.* (2009) ont évalué les capacités d'élimination des COV de 28 plantes d'intérieur, et ont montré que le lierre (*Hedera helix*) était l'une des trois plantes les plus efficaces pour l'élimination du toluène.

Par ailleurs, il serait intéressant d'évaluer l'impact à plus long terme de la présence de plantes sur le fonctionnement des réacteurs. La présence de végétaux au développement plus avancé peut entraîner une modification de la qualité et de la quantité des exsudats racinaires. Cela pourrait avoir un impact sur la microflore rhizosphérique dans le biofiltre et par conséquent, sur les capacités d'élimination des polluants.

Les biofiltres sont généralement installés à l'extérieur et donc soumis à des conditions climatiques fluctuantes. Dans le cas des biofiltres végétalisés, le couvert végétal peut avoir un impact sur le fonctionnement global des réacteurs, notamment lors de la saison hivernale où les températures sont plus basses.

Conclusion

Pour un biofiltre végétalisé de faible épaisseur (40 cm) par rapport aux biofiltres classiques, cette étude a permis de montrer que :

- Un taux d'élimination des TEX supérieur à 97% a été atteint pour les trois conditions opératoires testées.

- L'apport d'éléments nutritifs sous la forme d'engrais retard (granulés hydrosolubles), est une source de nutriment compatible avec le fonctionnement efficace des biofiltres végétalisés. De plus, l'intégration de cet engrais au sein du garnissage permet de limiter la fréquence des apports de fertilisant, du moins à court terme. Une diffusion continue et homogène de l'azote, du phosphore et des oligoéléments favorise le développement de la biomasse sur toute la hauteur de colonne.

- L'humidité du garnissage est un paramètre important bien que l'irrigation de tels biofiltres reste difficile à maîtriser. Un taux d'humidité d'environ 300% semble correspondre à un optimum pour garantir des performances élevées. Une répartition hétérogène de l'eau dans le garnissage entraîne une modification de la stratification de l'activité de dégradation des TEX sans pour autant diminuer les performances épuratoires. Une teneur en eau du garnissage faible (< 20%) a un impact négatif sur les activités microbiennes au sein des biofiltres.

- L'activité potentielle de dénitrification a été détectée sur toute la hauteur de garnissage. Elle augmente lorsque la disponibilité en azote au sein du garnissage est plus élevée. Les biofiltres végétalisés possèdent donc un fort potentiel de dégradation des NOx.

- La plante ne semble pas jouer de rôle déterminant concernant l'efficacité d'élimination des TEX dès lors que la disponibilité en macro et micro-nutriments n'est pas limitée. Sa présence pourrait permettre de limiter les pertes de charge lorsque l'humidité du garnissage est élevée.

Ces résultats montrent que le biofiltre végétalisé est un procédé efficace pour le traitement d'effluents gazeux caractérisés par de faibles concentrations de TEX, telles

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

que celles rencontrées dans les parcs de stationnement couverts. Les conditions d'alimentation en gaz testées au laboratoire sont équivalentes à celles utilisées dans les systèmes de biofiltration classique, à savoir un débit d'air permettant une vitesse de passage de l'air de 100 $m.h^{-1}$. Lorsque l'humidité du garnissage est bien maîtrisée (taux d'humidité d'environ 300% et répartition homogène de l'eau dans les biofiltres), l'élimination complète des TEX est atteinte dès 20cm de hauteur de garnissage. Ce résultat permet de suggérer que l'épaisseur de garnissage peut être réduite et/ou que la charge de polluants traitée peut être augmentée. Il paraît donc envisageable d'augmenter les volumes d'air traités à concentration en polluants constante tout en conservant les performances épuratoires obtenues avec ce type de système. L'impact de la vitesse de passage de l'air sur les performances des biofiltres fait l'objet du chapitre suivant.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

CHAPITRE III. INFLUENCE DU TEMPS DE RÉSIDENCE SUR LES PERFORMANCES DU BIOFILTRE VÉGÉTALISÉ ET CARACTÉRISATION DE LA COMMUNAUTÉ BACTÉRIENNE INDIGÈNE

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

1. INTRODUCTION 138

2. MATERIELS ET METHODES 141

2.1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL 141

2.2. PARAMETRES OPERATOIRES MESURES 142

2.2.1. Analyse de la phase gazeuse 142

2.2.2. Capacité d'élimination 142

2.2.3. Température 142

2.2.4. Pertes de charge 143

2.2.5. Taux d'humidité 143

2.3. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES : ETUDE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE TOTALE 143

2.3.1. Stratégie d'échantillonnage et extraction de l'ADN métagénomique 143

2.3.2. Etude quantitative de la communauté bactérienne totale par PCR quantitative ciblant le gène rrs 144

2.3.3. Etude qualitative de la communauté bactérienne totale par pyroséquençage de l'ADNr 16S 146

2.3.4. Analyses statistiques 150

3. RESULTATS 152

3.1. FONCTIONNEMENT DES REACTEURS ET CAPACITE D'ELIMINATION 152

3.1.1. Fonctionnement global des réacteurs 152

3.1.2. Capacité d'élimination 153

3.2. PERFORMANCES EPURATOIRES DETAILLEES 153

3.2.1. Abattement des TEX dans les biofiltres de 40 cm 154

3.2.2. Abattement des TEX dans les biofiltres de 20 cm 155

3.2.3. Comparaison de l'abattement des TEX dans les réacteurs C et D 156

3.3. STRATIFICATION DE L'ACTIVITE MICROBIENNE DE DEGRADATION DES TEX 156

3.3.1. Stratification de l'activité dans les biofiltres de 40 cm 157

3.3.2. Stratification de l'activité dans les biofiltres de 20 cm 158

3.4. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES : ETUDE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE TOTALE 158

3.4.1. Densité de la communauté bactérienne totale 158

3.4.1.1. Densité bactérienne dans les biofiltres de 40 cm 159

3.4.1.2. Densité bactérienne dans les biofiltres de 20 cm 160

3.4.1.3. Comparaison des densités bactériennes dans les réacteurs C et D 160

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

3.4.1.4. Relation entre l'activité de dégradation des TEX et la densité bactérienne 161
3.4.2. Diversité de la communauté bactérienne totale 161
3.4.2.1. Analyse générale des résultats de pyroséquençage 161
3.4.2.2. Courbes de raréfaction basées sur l'indice de richesse estimée (S_{chao1}) 162
3.4.2.3. Richesse aux différentes hauteurs de garnissage 163
3.4.2.4. Diversité bactérienne aux différentes hauteurs de garnissage 164
3.4.2.5. Relation entre l'activité de dégradation des TEX et la diversité bactérienne 166
3.4.2.6. Identification taxonomique 166
3.4.2.4. Comparaison globale de la richesse et de la structure de la communauté bactérienne totale 170
4. DISCUSSION 172
4.1. PERFORMANCES EPURATOIRES ET CAPACITE D'ELIMINATION 172
4.2. INFLUENCE DE L'EBRT SUR LES PERFORMANCES EPURATOIRES 174
4.3. ETUDE DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE TOTALE 176
4.3.1. Influence des bactéries indigènes dans la dégradation des composés 176
4.3.2. Influence des conditions de fonctionnement sur la densité de la communauté bactérienne totale 177
4.3.3. Influence des conditions de fonctionnement sur la diversité de la communauté bactérienne totale 180
5. CONCLUSION 186

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

1. Introduction

Le traitement de l'air pollué provenant d'espaces urbains confinés tels que les parcs de stationnements couverts représente une solution innovante pour réduire la dispersion des polluants gazeux dans l'atmosphère. Toutefois, les volumes d'air vicié générés sont colossaux et représentent plusieurs centaines de milliers de mètres cube par heure, selon la taille du parking considéré. L'espace foncier disponible pour l'installation de système de traitement d'air est limité dans les zones urbaines. Leur développement sous forme de mur végétalisé biofiltrant permet de réduire considérablement leur empreinte au sol.

Cependant l'évolution de la législation des ERP laisse entrevoir pour les gestionnaires des PSC l'augmentation des contraintes en termes de qualité de l'air intérieur (QAI) vis-à-vis des travailleurs et des usagers (loi n°2008-788 du 12 juillet 2010, relative à la surveillance obligatoire de la QAI des ERP). Pour garantir une meilleure QAI dans ces structures, une solution simple est d'augmenter les débits des systèmes de ventilation. Mais cela aura des conséquences directes sur le volume d'air pollué rejeté dans l'atmosphère urbain et donc sur le dimensionnement des systèmes de traitement d'air afin de préserver la qualité de l'air de la ville, notamment aux abords des PSC.

Les surfaces disponibles en façade de bâtiment pour accueillir des murs végétalisés biofiltrants sont elles-aussi restreintes. L'augmentation des débits d'air pollué (i.e augmentation de la vitesse de passage de l'air) dans les biofiltres semble être une solution envisageable pour augmenter les volumes d'air traités sans modifier l'emprise au sol ou en façade des systèmes de traitement.

La capacité d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de faibles concentrations de TEX a été mise en évidence en conditions opératoires standard, c'est à dire avec une épaisseur de garnissage de 40 cm et une vitesse de passage de l'air de 100 $m.h^{-1}$ (correspondant à un EBRT de 14s). Des performances épuratoires supérieures à 97% d'abattement des TEX ont pu être observées (Chapitre II, partie 2, page 118).

L'augmentation du débit d'air à traiter par un biofiltre induit une diminution de l'EBRT (Chapitre I, page 65). De nombreux auteurs ont mis en évidence qu'une diminution de l'EBRT entraîne une baisse significative des taux d'abattement des COV

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

dans les biofiltres (Jorio *et al.*, 2000 ; Yoon et Park, 2002 ; Delhoménie *et al.*, 2002a ; Sakuma *et al.*, 2006 ; Rene *et al.*, 2010). Ce paramètre affecte directement les performances épuratoires par son effet sur les phénomènes physico-chimiques et biologiques intervenant dans le processus de biofiltration (Elmrini *et al.*, 2004). La diminution de l'EBRT a un impact négatif sur les mécanismes de diffusion et de transfert des polluants de la phase gazeuse vers la phase aqueuse (Kraakman *et al.*, 2011), ainsi que sur la biodégradation des composés en limitant le temps de contact entre polluants et microorganismes (Delhoménie et Heitz, 2005). Cela entraîne également une augmentation de la charge en polluants qui peut devenir toxique pour les microorganismes (Corsi et Seed, 1995).

Dans une optique d'amélioration de la maîtrise opérationnelle du biofiltre végétalisé, ce chapitre est consacré à l'évaluation des conséquences d'une diminution de l'EBRT, résultant soit de l'augmentation des volumes d'air traités, soit de la réduction de l'épaisseur des biofiltres, sur les performances épuratoires et sur la stratification des activités microbiennes responsables de la dégradation des TEX au sein des réacteurs.

La caractérisation quantitative et qualitative de la communauté bactérienne totale sera effectuée avant et après fonctionnement des réacteurs par des techniques de biologie moléculaire, telles que la PCR en temps réel (qPCR) et le pyroséquençage, ciblée sur l'ADNr 16S. Elle doit permettre de mieux comprendre le fonctionnement biologique du biofiltre et notamment l'impact des conditions opératoires sur la répartition des bactéries au sein du garnissage, en termes de densité, de richesse et de composition (abondance relative).

Les microorganismes du biofiltre végétalisé proviennent principalement de la microflore indigène du garnissage et de la motte de terreau. L'étude de la diversité ainsi que l'identification des bactéries présentes doit également permettre de déterminer l'influence de l'origine de la microflore sur la structure des communautés au sein du biofiltre.

Par ailleurs la technique de séquençage haut débit mise en œuvre dans cette étude n'a, à notre connaissance, jamais été utilisée pour caractériser la communauté bactérienne totale au sein d'un biofiltre. Ainsi, l'étude de cette communauté dans les biofiltres végétalisés par pyroséquençage est inédite et constitue, par conséquent, une

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

première évaluation de cette technique pour l'analyse microbiologique des systèmes de biofiltration.

2. Matériels et méthodes

2.1. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé est similaire au précédent (Chapitre II, figure 1, page 97) et la concentration de l'effluent gazeux synthétique humide est identique, soit 600 µg.m^{-3} de TEX (200 µg.m^{-3} de chaque TEX).

Six biofiltres plantés d'un lierre (*Hedera helix*) ont été alimentés simultanément en flux ascendant par un débit de 3,6 m^3.h^{-1} d'air à traiter, ce qui correspond à une vitesse de passage de l'air en entrée de 200 m.h^{-1}. Deux conditions ont été testées et répliquées deux fois. L'unité pilote, présentée sur la figure suivante (figure III.1) était donc composée de :

- Trois biofiltres comportant 40 cm de garnissage (nommés C1, C2, C3) pour lesquels l'EBRT de l'effluent est de 7,6 secondes,
- Trois biofiltres comportant seulement 20 cm de garnissage (D1, D2, D3) pour lesquels l'EBRT de l'effluent est de 3,8 secondes.

Le fonctionnement de ces biofiltres a été suivi durant 50 jours.

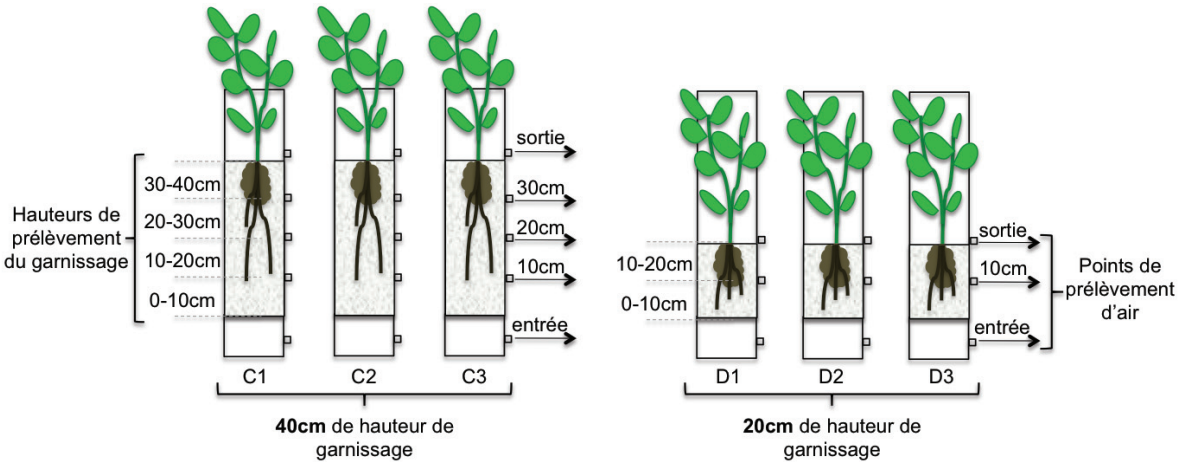


Figure III.1. Description de l'installation pilote. C1, C2 et C3 : biofiltres comportant 40 cm de hauteur de garnissage. D1, D2 et D3 : biofiltres comportant 20 cm de garnissage. Les points de prélèvement de gaz pour les analyses chromatographiques (matérialisés par des flèches) sont situés tous les 10 cm de hauteur de garnissage, soit à 0 (= entrée), 10, 20, 30 et 40 cm (= sortie) pour les biofiltres de 40 cm et à 0 (=entrée), 10 et 20 cm (= sortie) pour les biofiltres de 20 cm. Pour les analyses microbiologiques, le garnissage est échantillonné en fin d'expérience en fonction de la hauteur, entre 0-10, 10-20, 20-30 et 30-40 cm.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Le garnissage utilisé est identique à celui décrit précédemment et contient la même concentration d'engrais retard (NPK 12/12/17), à savoir 1,375 $kg.m^{-3}$ de garnissage correspondant à une quantité totale d'azote apportée d'environ 165 g $.m^{-3}$ sur 12 mois.

L'irrigation a été ajustée par rapport à la vitesse de passage de l'air de manière à maintenir un taux d'humidité constant et homogène sur la hauteur de garnissage tout en évitant la percolation qui pourrait éliminer une partie des TEX par lessivage. La quantité d'eau apportée était de 80mL par biofiltre tous les deux jours, soit 5,2 $L.m^{-3}$ de garnissage et par jour. Par ailleurs, le garnissage a été humidifié lors de l'installation des biofiltres de sorte que la répartition de l'eau soit parfaitement homogène sur toute la hauteur dès le début de l'expérimentation.

L'absence d'eau de percolation en pied de colonne a été vérifiée régulièrement.

2.2. Paramètres opératoires mesurés

2.2.1. Analyse de la phase gazeuse

Les mesures de concentration en TEX ont été réalisées comme décrit précédemment (Chapitre II, partie 1, page 98). Les efficacités d'élimination, exprimées en pourcentage, et les erreurs standard ont été calculées selon la même méthode (Chapitre II, partie 1, page 98). L'erreur standard des mesures était inférieure à 4% en entrée et inférieure à 6% aux différents niveaux de prélèvement.

2.2.2. Capacité d'élimination

La capacité d'élimination (EC) des réacteurs, durant la phase stationnaire, a été calculée pour les deux conditions de fonctionnement selon la formule précédemment décrite (Chapitre II, partie 1, page 103)

2.2.3. Température

La température ambiante a été mesurée durant les 50 jours de fonctionnement comme décrit précédemment (Chapitre II, partie 2, page 114). Elle était en moyenne de 19,5°C et a varié entre 15°C et 22°C.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

2.2.4. Pertes de charge

Les pertes de charges ont été mesurées quotidiennement pour chaque biofiltre à l'aide d'un micro-manomètre électronique (MP101, Kimo, France). Elles sont en moyenne de 1,2 $KPa.m^{-1}$ pour les biofiltres de 40cm de hauteur de garnissage et de 0,4 $KPa.m^{-1}$ pour les biofiltres de 20 cm.

2.2.5. Taux d'humidité

Le taux d'humidité du garnissage a été mesuré en fin d'expérimentation selon la méthode décrite précédemment (Chapitre II, partie 1, page 98). Il était en moyenne de 316 % pour cinq des six biofiltres. Le réacteur D3 présente un assèchement de la partie basse du garnissage, entre 0 et 10 cm. La moyenne du taux d'humidité de ce biofiltre est de 183 %.

2.3. Analyses microbiologiques : Etude quantitative et qualitative de la communauté bactérienne totale

2.3.1. Stratégie d'échantillonnage et extraction de l'ADN métagénomique

Stratégie d'échantillonnage

La communauté bactérienne totale a été analysée de manière quantitative et qualitative. Des échantillons de garnissage et de motte ont été prélevés avant la mise en route des biofiltres, ils correspondent au T_0 de l'expérimentation. En fin d'expérimentation, des échantillons de garnissage ont été prélevés à différentes hauteurs (figure III.1). Pour la hauteur 30-40cm, la motte a été séparée du garnissage de manière à distinguer ces 2 compartiments. Au total 26 échantillons ont été prélevés (2 T_0, 5x3=15 dans les pilotes C et 3x3=9 dans les pilotes D).

Extraction et dosage de l'ADN métagénomique

L'ADN métagénomique a été extrait des échantillons à l'aide du kit « Fast DNA® SPIN Kit For Soil » (MP Biomedicals, USA). Le protocole fourni par le fabriquant a été modifié afin d'augmenter son efficacité sur les échantillons utilisés. Les échantillons de 0,5 g conservés à -20°C sont broyés une première fois au moyen du broyeur FAST PREP 24 (MP Biomedicals, USA) à une vitesse de 6 $m.s^{-1}$ pendant 30 s avant l'ajout des premières

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

solutions du kit. Après ajout de la solution d'élution de l'ADN, la matrice de silice est incubée 12 min à 55°C avant de récupérer l'ADN par centrifugation.

La quantification de l'ADN a été réalisée par dosages spectrophotométriques (Xenius, Safas, Monaco) à l'aide du kit « Quant it™ Picogreen® dsDNA Assay kit » (Molecular probes®, Invitrogen, UK). La qualité de l'ADN a été vérifiée par migration sur un gel d'agarose à 1%. La pureté de l'ADN a été vérifiée au NanoDrop® (Thermo Scientific, USA).

L'ADN métagénomique est ensuite conservé à -20°C.

Gène ciblé : utilisation de l'ADNr 16S ou gène rrs

L'ADNr 16S (aussi appelé gène *rrs*), codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomique 16S, est l'un des gènes des organismes procaryotes qui comporte à la fois :

- des régions très conservées, qui permettent de sélectionner des amorces universelles pour l'amplification spécifique des bactéries,
- et des régions très variables, qui permettent de distinguer les espèces de bactéries entre elles et de les classer en fonction de leur phylogénie.

Présent dans chaque cellule bactérienne, il constitue une cible fiable et efficace pour la quantification et l'étude de la diversité et de la structure de la communauté bactérienne totale provenant d'échantillons environnementaux par exemple.

2.3.2. Etude quantitative de la communauté bactérienne totale par PCR quantitative ciblant le gène rrs

La quantification de la communauté bactérienne totale est effectuée par PCR quantitative en temps réel (qPCR) ciblée sur le gène *rrs*. Les réactions de qPCR sur le gène *rrs* sont réalisées selon le protocole décrit par Zouache *et al.* (2012), en utilisant les amorces 519F (5'-CAGCMGCCGCGGTAANWC-3') et 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTT-3') dont les numéros correspondent à leur position sur le gène rrs d'*Escherichia coli* (Lane, 1991). Ce couple d'amorces génère un fragment de 407 paires de bases (pb). Les qPCR sont réalisées au moyen du kit « LightCycler DNA Master SYBR® Green I » (Roche Applied Science, USA), selon les conditions réactionnelles synthétisées dans le tableau III.1. Le thermocycler utilisé est un LightCycler® LC480 (Roche Applied Science, USA). Le

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

programme d'amplification est le suivant : 10 min d'activation initiale à 95°C, 40 cycles de trois étapes : dénaturation (15 s à 95°C), hybridation (1 min à 63°C) et élongation (30 s à 72°C). La courbe de fusion est obtenue par le programme suivant : 5 s à 95°C, 1 min à 65°C, gradient de 65°C à 97°C en 5min par incréments de 0,11°C. Elle a permis de vérifier la spécificité de l'amplification du gène *rrs*.

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par tube (µL)
Master MIX SYBR Green	2X	1X	10
Amorce 519F	10µM	300nM	0,6
Amorce 907R	10µM	300nM	0,6
Solution d'ADN métagénomique	2,5ng.µL^{-1}	5ng	2
Eau PCR-Grade		qsp 20µL	6,8
Volume final		20µL	20

Tableau III.1. Conditions réactionnelles de la qPCR sur le gène *rrs*.

La qPCR repose sur la détermination du « cycle seuil » (ou cycle threshold, C_T), c'est-à-dire le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour que le niveau de fluorescence émis par les fragments amplifiés dépasse le seuil de détection. La réaction de qPCR *rrs* comprend, en plus des échantillons environnementaux, une gamme standard et un témoin négatif.

La gamme standard permet de déterminer la relation entre le cycle seuil mesuré par la qPCR (C_T) et le nombre de copies du gène cible. Elle est réalisée à partir du plasmide pQuantAlb16S contenant le fragment de 407 pb du gène *rrs* incluant les séquences des amorces 519F et 907R (Zouache *et al.,* 2012). Sept points de gamme standard ont été réalisés, correspondant à des quantités allant de 10^7 à 10^1 copies du gène *rrs* par tube.

Tous les échantillons et points de gamme ont été répliqués. Les résultats de quantification des standards ont montré une efficacité supérieure à 90% et un taux d'erreur inférieur à 2% pour tous les échantillons.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

2.3.3. Etude qualitative de la communauté bactérienne totale par pyroséquençage de l'ADNr 16S

La diversité de la communauté bactérienne totale est étudiée par pyroséquençage de l'ADNr 16S. Les amorces utilisées, ciblant la région V3-V4 de l'ADNr 16S, ont été choisies car elles permettent d'évaluer de façon fiable la diversité bactérienne à partir de séquences courtes (Liu *et al.*, 2007 ; Kumar *et al.*, 2011). La technique de pyroséquençage repose sur le séquençage à très haut débit des séquences ciblées et permet une vue d'ensemble de la communauté bactérienne.

Les 24 échantillons d'ADN métagénomique ont été envoyés à l'entreprise GenoScreen (Lille, France) pour la réalisation des étapes préparatoires (amplification PCR du gène ciblé et étiquetage des amplicons) et du pyroséquençage. Le séquenceur utilisé est un 454 GS-FLX® (Roche Applied Sciences / 454 Life Sciences) permettant la lecture de fragments de 450 pb. Le protocole employé est divisé en trois étapes (figure III.2).

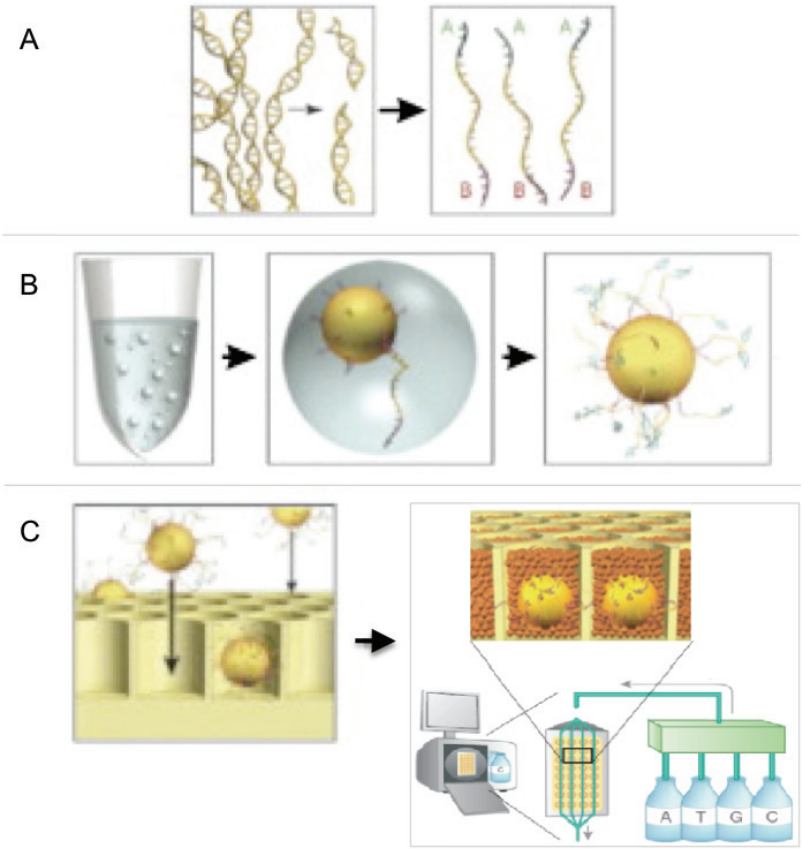


Figure III.2. Schéma de principe du pyroséquençage. A : étape 1, préparation de la banque d'ADNr 16S simple brin. B : étape 2, amplification PCR en émulsion (emPCR™). C : étape 3, séquençage en plaque picotitrée. (D'après Ansorge, 2009 ; Tucker *et al.*, 2009).

La première étape (figure III.2.A) consiste en la préparation d'une banque d'ADNr 16S simple brin à partir de l'ADN métagénomique. Une amplification PCR est réalisée sur chacun des 24 échantillons en utilisant un couple d'amorces 16S générant un fragment d'une taille de 429 pb. Chaque amorce comporte trois parties (tableau III.2): (i) la séquence permettant l'amplification de la région ciblée de l'ADNr 16S, (ii) une étiquette de 10 nucléotides (spécifique à chaque échantillon) et (iii) un adaptateur (spécifique de chaque brin d'ADN). Les produits PCR obtenus sont purifiés et quantifiés par dosage au Picogreen® afin de réaliser un mélange parfaitement équimolaire et éviter la surreprésentation d'un échantillon par rapport à un autre. Un des adaptateurs des amorces utilisées est lié à une molécule de biotine qui permet l'immobilisation des amplicons d'ADNr 16S sur des billes (de 40 µm de diamètre) recouvertes de streptavidine. Après dénaturation des fragments d'ADN fixés sur les billes, le brin non biotinylé libéré est utilisé comme matrice d'ADN simple brin pour former la banque d'ADNr 16S simple brin (ADNr 16S sb).

Amorces	Séquences
83125-16S-F	5' *CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG***ACGAGTGCGT**TACGGRAGGCAGCAG 3'
83125-16S-R	5' *CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG***ACGAGTGCGT**GGACTACCAGGGTATCTAAT 3'

Tableau III.2. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de la région V3-V4 de l'ADNr 16S (fragment de 429pb, adaptateur et étiquettes exclus). En italique : les adaptateurs. En gras : les étiquettes (spécifiques à chaque échantillon). Souligné : la séquence ciblant l'ADNr 16S.

La deuxième étape (figure III.2.B) correspond à l'amplification par PCR en émulsion (emPCR™). Les ADNr 16S sb sont mis au contact de billes portant en surface des amorces complémentaires de l'un des adaptateurs, ce qui permet de ne fixer qu'une molécule d'ADNr 16S sb par bille. Les billes porteuses des ADNr 16S sb sont émulsionnées dans un mélange eau-huile contenant les réactifs PCR. Chaque bille est emprisonnée à l'intérieur d'une goutte dans laquelle a lieu la réaction d'amplification PCR, permettant une amplification clonale de chaque fragment.

La troisième étape (figure III.2.C) correspond au séquençage en plaques picotitrées. Les billes portant des ADNr 16S sb sont disposées sur des plaques picotitrées (PTP pour PicoTiterPlate™) constituées de puits de 44 µm de diamètre, ce qui permet le dépôt d'une seule bille par puits. Ainsi, dans chaque puits une réaction de séquençage peut avoir lieu et plusieurs centaines de milliers de réaction de séquençage peuvent être

réalisées en parallèle sur une plaque. Un mélange réactionnel, contenant l'ADN polymérase et des microbilles recouvertes de sulfurylases et de luciférases, est ajouté dans chaque puits. La PTP chargée est ensuite placée dans le séquenceur. Les nucléotides sont ajoutés séquentiellement (ordre fixe) dans la PTP pendant le cycle de séquençage. Lorsqu'un nucléotide complémentaire à la matrice d'ADN est coulé dans un puits, la polymérase étend le brin d'ADN existant en entraînant un signal lumineux enregistré par la caméra CCD de l'appareil. L'analyse des images permet la détermination de la séquence d'ADN.

L'ensemble des séquences lues est rassemblé dans un fichier Fasta pour la réalisation des analyses des données.

Analyses bioinformatiques

L'analyse bioinformatique des données brutes envoyées par GenoScreen a été réalisée à l'aide du logiciel Mothur v.1.15.0 (Schloss *et al.*, 2009) sur la plateforme de bioinformatique Ibio du laboratoire d'Ecologie Microbienne. L'ensemble des séquences lues a été filtré de façon à garantir la qualité des séquences analysées. Les séquences trop courtes (< 200pb) ou dont les amorces et/ou étiquettes étaient mal séquencées, ainsi que les séquences chimériques ont été exclues de l'analyse.

L'ensemble des données filtrées a été comparé à la base de données Silva (www.arb-silva.de) pour l'identification taxonomique des séquences obtenues. Seules les séquences présentant une similarité ≥ 97% avec celles de la base de données Silva ont été considérées comme membres présumés du groupe affilié. Les séquences ont ensuite été regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTU) en utilisant des seuils de similarité de 80%, 90%, et 97%, correspondant respectivement au seuil de définition des phylum, genre et espèce (Hugenholtz, 2002 ; Will *et al.*, 2010). Pour estimer l'effort d'échantillonnage aux différents niveaux taxonomiques, les courbes de raréfaction correspondantes ont été réalisées pour chaque échantillon. Afin de pouvoir comparer la diversité de la communauté bactérienne totale dans les différents échantillons, il a été nécessaire de standardiser l'effort d'échantillonnage. Pour cela, un sous échantillonnage aléatoire d'un nombre défini (correspondant au nombre de séquences de l'échantillon en présentant le moins) de séquences parmi toutes les séquences obtenues a été effectué.

Calculs des indices de richesse et de diversité

Indices de richesse

La richesse observée S_{obs} est égale au nombre total d'OTU dans chaque échantillon.

L'estimateur de richesse S_{chao1} a été utilisé pour prédire la richesse spécifique totale de chaque échantillon avec un intervalle de confiance de 95%. Cet indice est basé sur le nombre total d'OTU observés S_{obs} :

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{n_1 (n_1 - 1)}{2 (n_2 + 1)}$$

Où : n_1 est le nombre d'OTU ne comportant qu'une seule séquence et n_2 le nombre d'OTU comportant seulement deux séquences.

Taux de recouvrement

Le calcul du taux de recouvrement C (Coverage) permet d'estimer la proportion de diversité recouverte dans chaque échantillon.

$$C = 1 - \frac{n_1}{N}$$

Où : n_1 est le nombre d'OTU ne comportant qu'une seule séquence et N le nombre total de séquences de l'échantillon.

Indices de diversité

La diversité de la communauté bactérienne totale a été estimée en utilisant l'indice de Shannon-Weaver, $H_{shannon}$:

$$H_{shannon} = -\sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} ln \frac{n_i}{N}$$

Où : S_{obs} est le nombre total d'OTU observés, n_i le nombre de séquences de l'OTU i et N le nombre total de séquences de l'échantillon.

Cet indice prend en compte à la fois la richesse et l'abondance des OTU. Contrairement à d'autres indices, comme celui de Simpson, il est sensible à la présence d'espèces rares (faiblement représentée en nombre d'OTU).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

2.3.4. Analyses statistiques

Le logiciel R v.2.6.2 a été utilisé pour réaliser les analyses statistiques concernant les performances épuratoires des réacteurs, les activités microbiennes de dégradation des TEX, la densité bactérienne et la diversité. Pour la plupart des variables, la normalité et l'homoscédasticité n'ont pas pu être vérifiées lors des tests de Shapiro-Wilk et de Bartlett. Les comparaisons des moyennes obtenues pour chaque hauteur des réacteurs, ainsi qu'entre réacteurs, ont donc été réalisées par des analyses de variance basées le test de Kruscal-Wallis (non paramétrique). Pour les corrélations entre variables, le coefficient de corrélation linéaire a été calculé avec la méthode de Spearman (non paramétrique).

La comparaison globale de la diversité de la communauté bactérienne totale (richesse et structure) des différents échantillons provenant des biofiltres de 40 cm et de 20 cm (classés par hauteur de prélèvement) a été réalisée à l'aide de l'algorithme Unifrac inclus dans Mothur. Afin de tenir compte de la diversité totale, ces tests statistiques ont été effectués en pondérant le nombre d'OTU avec la totalité des séquences sous échantillonnées correspondant à chaque OTU. L'Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) a été réalisée sur la base des matrices de distances construites à partir des deux algorithmes Jclass et ThetaYC :

- Jclass, basé sur l'indice de Jaccard, décrit les différences observées entre les membres de deux ensembles (ou communautés) :

$$D_{Jaccard} = \frac{S_{AB}}{S_A + S_B - S_{AB}}$$

Où : S_{AB} est le nombre d'OTU partagés entre les communautés A et B, S_A le nombre d'OTU de la communauté A et S_B le nombre d'OTU de la communauté B.

Cet algorithme permet d'évaluer la similarité entre les différentes hauteurs des biofiltres en termes de richesse. Il ne prend pas en compte l'abondance relative des OTU.

- ThetaYC, basé sur le coefficient de Yue et Clayton, mesure la différence entre deux ensembles en tenant compte de l'abondance relative des OTU retrouvés dans chaque communauté :

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

$$D_{\Theta_{YC}} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{S_T} a_i b_i}{\sum_{i=1}^{S_T} (a_i - b_i)^2 + \sum_{i=1}^{S_T} a_i b_i}$$

Où : S_T est le nombre total d'OTU des communautés A et B, a_i l'abondance relative des OTU de la communauté A et b_i l'abondance relative des OTU de la communauté B.

Cet algorithme permet donc de décrire les différences de structure entre les communautés en termes de richesse et d'abondance relative des OTU.

Les représentations graphiques en 2D ont ensuite été faites sur le logiciel Excel (Microsoft Office Mac 2008) en prenant en compte les deux premiers axes des matrices de distances (axes les plus explicatifs).

Pour l'ensemble de ces tests statistiques, le seuil de rejet du risque α (seuil de signification) a été fixé à 5%.

3. Résultats

3.1. Fonctionnement des réacteurs et capacité d'élimination

3.1.1. Fonctionnement global des réacteurs

Les performances des six biofiltres ont été suivies sur une période de 50 jours. L'évolution de l'efficacité d'élimination globale des TEX est présentée sur la figure suivante (figure III.3) :

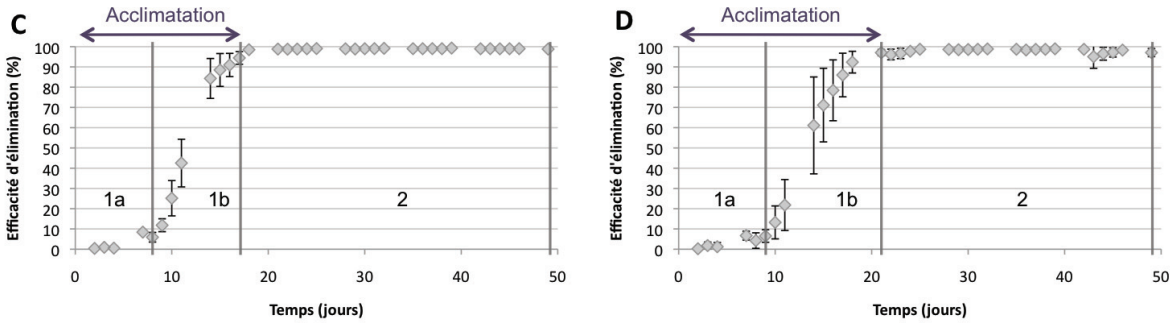


Figure III.3. Evolution de l'efficacité moyenne d'élimination globale des TEX pour les réacteurs C (biofiltres comportant 40 cm de hauteur de garnissage) et D (biofiltres de 20 cm de hauteur). Les barres d'erreur représentent les écarts types (n = 3). Les phases de fonctionnement sont séparées par les barres verticales ; 1a : latence, 1b : optimisation, 2 : stationnaire. La période d'acclimatation (1) est indiquée par une double flèche.

L'allure générale des courbes d'abattement est très similaire entre réplicats, ce qui indique une bonne reproductibilité entre les réacteurs. Deux périodes peuvent être distinguées :

- La période d'acclimatation

Elle regroupe les phases de latence et d'optimisation. La phase de latence présente une durée de 8 jours pour les réacteurs C et de 9 jours, en moyenne, pour les réacteurs D. La durée moyenne de prise d'efficacité (phase d'optimisation) est de 9 jours pour les réacteurs C et de 11 jours pour les réacteurs D. La période d'acclimatation présente une durée moyenne totale de :
- 17 ± 2 jours pour les réacteurs C,
- 20 ± 2 jours pour les réacteurs D.

Cette différence de 3 jours n'est pas statistiquement significative.

- La période stationnaire

La période stationnaire moyenne observée sur la durée de l'expérimentation est de 32 jours pour les réacteurs C et de 29 jours pour les réacteurs D.

Le fonctionnement global des réacteurs est donc semblable dans les deux conditions de fonctionnement. Une efficacité d'élimination globale des TEX supérieure à 98% est atteinte dans les six biofiltres.

3.1.2. Capacité d'élimination

Les capacités d'élimination (EC) ont été calculées en fin de période stationnaire (jours 49). Le tableau III.3 présente les moyennes obtenues à partir des résultats des deux types de réacteurs.

Réacteurs	Hauteur de garnissage (cm)	Débit de l'effluent (m^3)	EBRT (s)	Charge en polluants ($mg.m^{-3}$ garnissage.h^{-1})	Capacité d'élimination ($mg.m^{-3}$ garnissage.h^{-1})
C	40	3,6	7,6	283	**279** (*1*)
D	20	3,6	3,8	565	**555** (*3*)

Tableau III.3. Capacité d'élimination moyenne ($mg.m^{-3}.h^{-1}$) des réacteurs C (biofiltre de 40 cm de hauteur de garnissage) et D (biofiltre de 20 cm de hauteur). Entre parenthèse, en italique : écarts types entre réplicats (n = 3).

L'EC est en moyenne de 279 $mg.m^{-3}.h^{-1}$ pour les réacteurs C (biofiltres contenant 40 cm de hauteur de garnissage) et de 555 $mg.m^{-3}.h^{-1}$ pour les réacteurs D (biofiltres de 20 cm de hauteur de garnissage). Cette différence est liée au volume de garnissage, deux fois moindre dans les réacteurs D. La quantité de polluants éliminée est identique pour les deux types de réacteurs, elle est de 2,13 $mg.h^{-1}$ en moyenne.

3.2. Performances épuratoires détaillées

Les deux figures suivantes présentent l'évolution des performances épuratoires de chaque composé pour les réacteurs C (figure III.4) et D (figure III.5).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

3.2.1. Abattement des TEX dans les biofiltres de 40 cm

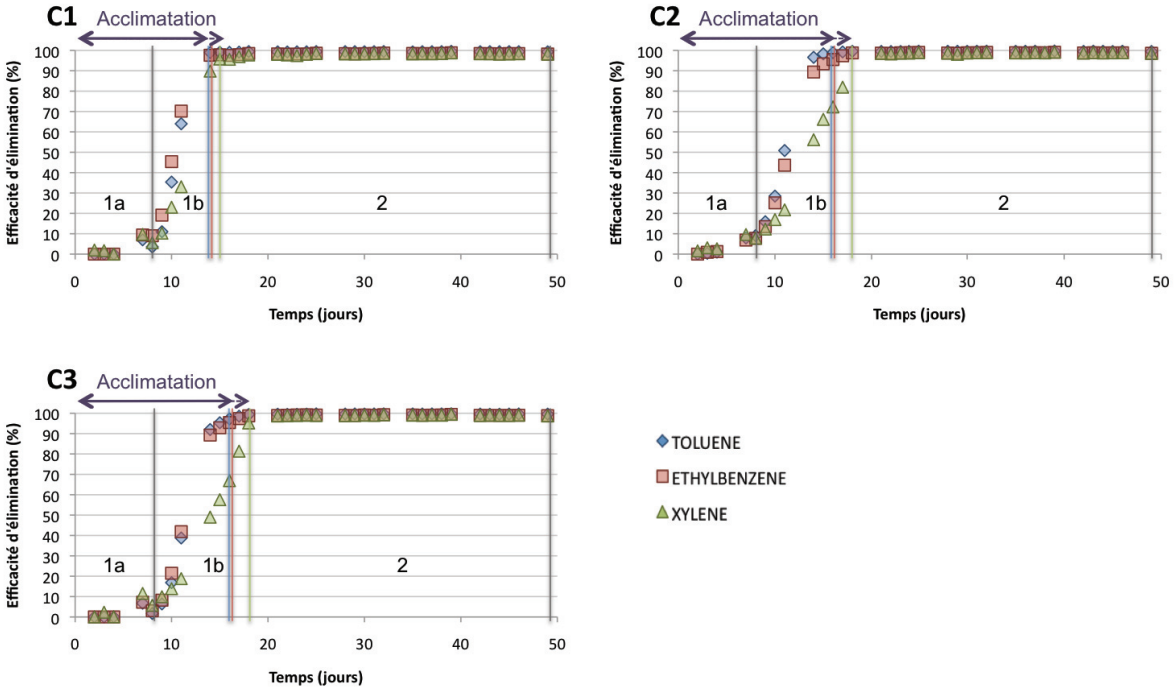


Figure III.4. Evolution de l'efficacité d'élimination de chaque composé pour les biofiltres comportant 40 cm de hauteur de garnissage (réacteurs C1, C2 et C3). Les phases de fonctionnement sont séparées par les barres verticales ; 1a : latence, 1b : optimisation (couleur correspondant au composé), 2 : stationnaire. La période d'acclimatation (1) est indiquée par une double flèche.

Les courbes d'abattement des trois composés sont similaires pour les réacteurs C (figure III.4). La phase de latence est de 8 jours. Compte tenu de l'erreur standard des mesures de concentrations en TEX (< 4% en entrée et < 6% en sortie), l'abattement observé pendant cette phase, ne dépassant pas 10%, est considéré comme nul.

Durant la phase d'optimisation, les performances d'élimination du toluène et de l'éthylbenzène sont très similaires alors que celle du xylène présente un décalage d'un à deux jours. L'efficacité augmente linéairement pendant les premiers jours de cette phase avant de se stabiliser, ce qui permet de calculer la vitesse maximale de prise d'efficacité pour chaque composé (en pourcentage d'élimination par jour). Cette vitesse est en moyenne de 16%, 14% et 11%/jour respectivement pour le toluène, l'éthylbenzène et le xylène. La vitesse de prise d'efficacité n'est pas significativement plus faible pour le xylène que pour les deux autres composés ($p = 0,079$) dans ces trois réacteurs.

La période d'acclimatation est en moyenne de 15 jours pour le toluène et l'éthylbenzène et de 17 jours pour le xylène.

Durant la période stationnaire, les trois composés sont éliminés simultanément avec des taux d'abattement supérieurs à 98%.

3.2.2. Abattement des TEX dans les biofiltres de 20 cm

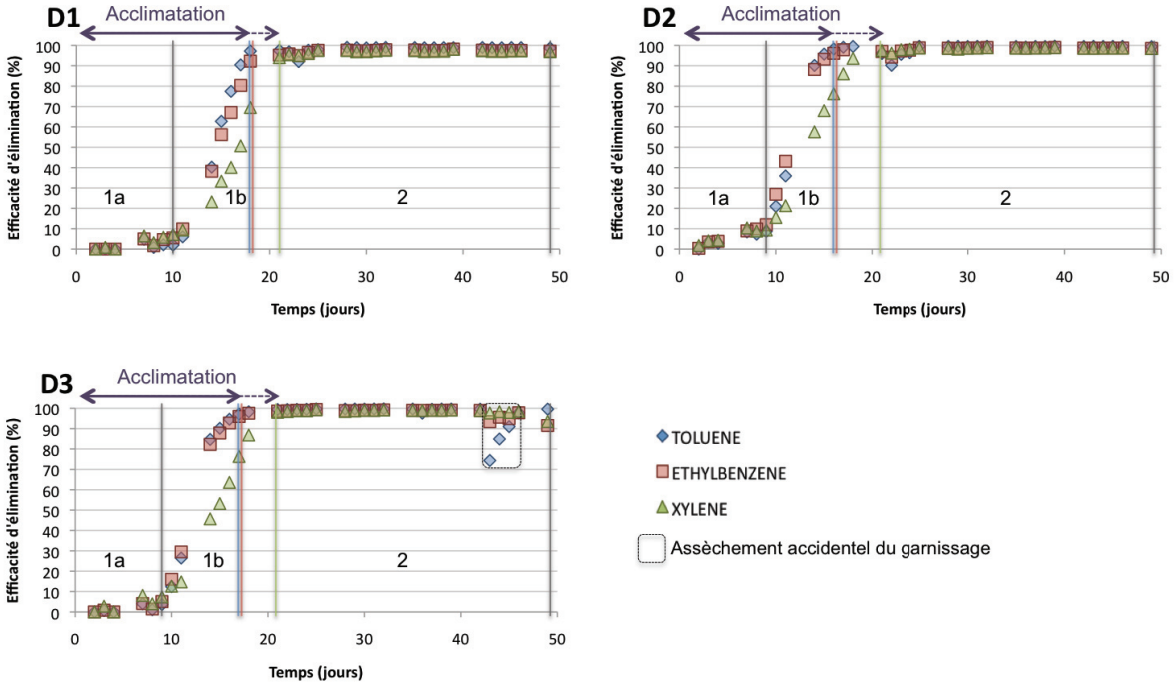


Figure III.5. Evolution de l'efficacité d'élimination de chaque composé pour les biofiltres comportant 20 cm de hauteur de garnissage (D1, D2, D3). Les phases de fonctionnement sont séparées par les barres verticales ; 1a : latence, 1b : optimisation (couleur correspondant au composé), 2 : stationnaire. La période d'acclimatation (1) est indiquée par une double flèche.

Les courbes d'abattement des trois composés sont similaires pour les trois biofiltres D également (figure III.5).

La phase de latence est identique pour les 3 composés, elle varie de 8 à 10 jours selon le réacteur. L'abattement observé pendant cette phase, ne dépassant pas 10%, est considéré comme nul.

Durant la phase d'optimisation, les performances d'élimination du toluène et de l'éthylbenzène sont très similaires alors que celle du xylène présente un décalage de 3 à 5 jours. De la même façon que pour les réacteurs C, la vitesse maximale de prise d'efficacité peut être calculée pour chaque composé (en pourcentage d'élimination par jour). Cette vitesse est en moyenne de 14%, 12% et 9%/jour respectivement pour le toluène, l'éthylbenzène et le xylène. La vitesse de prise d'efficacité est significativement plus faible pour le xylène que pour les deux autres composés ($p = 0,039$).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

La période d'acclimatation est en moyenne de 17 jours pour le toluène et l'éthylbenzène et de 21 jours pour le xylène.

Durant la période stationnaire, les trois composés sont éliminés simultanément avec des taux d'abattement similaires et supérieurs à 98%.

Une perte d'efficacité est observée dans le réacteur D3 au cours de la dernière semaine de fonctionnement (jours 43 à 49), en raison d'un phénomène d'assèchement accidentel du garnissage en pied de colonne. La dégradation du toluène chute de 30% à j43 et retrouve progressivement son niveau maximal en fin d'expérimentation.

3.2.3. Comparaison de l'abattement des TEX dans les réacteurs C et D

La comparaison des vitesses maximales de prise d'efficacité entre composés dans les deux types de réacteurs ne montre aucune différence significative entre le toluène et l'éthylbenzène. Par contre, la différence observée entre le xylène et les deux autres composés est statistiquement significative ($p = 0,006$). La mise en place de la dégradation du xylène est plus lente que celle du toluène ($p = 0,013$) et que celle de l'éthylbenzène ($p = 0,045$). L'ordre suivant peut donc être établi, concernant la vitesse de prise d'efficacité des TEX dans les biofiltres végétalisés :

Toluène = Ethylbenzène > Xylène

3.3. Stratification de l'activité microbienne de dégradation des TEX

La figure III.6 présente les profils longitudinaux de dégradation des TEX en fin de période stationnaire (jour 49), pour chaque biofiltre.

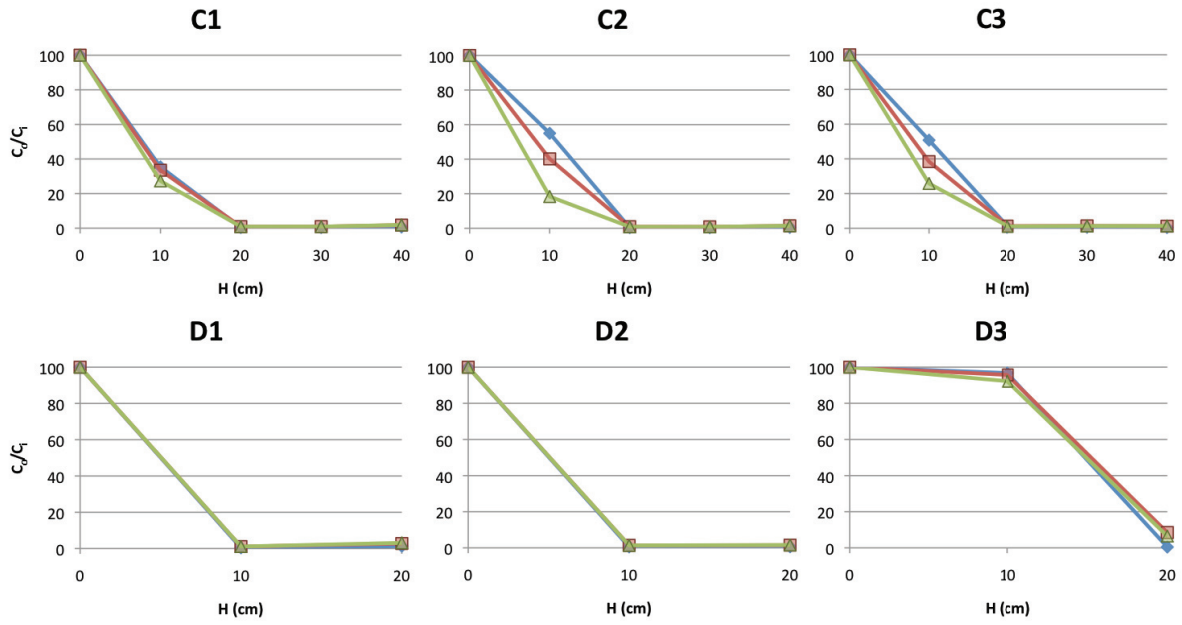


Figure III.6. Profils longitudinaux d'élimination de TEX dans chacun des biofiltres en fin de période stationnaire (jour 49). C_o/C_i (%) représente la charge en TEX restant à dégrader par rapport à la charge en entrée de réacteur. H correspond à la hauteur de garnissage traversé en centimètre. C1, C2 et C3 : biofiltres comportant 40 cm de hauteur de garnissage. D1, D2 et D3 : biofiltres comportant 20 cm de hauteur de garnissage.

3.3.1. Stratification de l'activité dans les biofiltres de 40 cm

Les trois réacteurs C présentent des profils similaires. L'activité de biodégradation des TEX est située dans les 20 premiers centimètres de garnissage, et majoritairement dans les 10 premiers centimètres.

A 10 cm de hauteur de garnissage, une différence de dégradation est observée entre les trois composés. Le xylène est significativement mieux dégradé que le toluène et l'éthylbenzène ($p = 0,049$). Par contre, la différence observée entre la dégradation du toluène et celle de l'éthylbenzène dans les réacteurs C2 et C3 n'est pas significative. L'ordre de dégradation observé à cette hauteur pour ces trois composés est donc :

Xylène > Ethylbenzène = Toluène

A 20 cm de hauteur de garnissage, l'abattement des composés est identique et supérieur à 98%.

3.3.2. Stratification de l'activité dans les biofiltres de 20 cm

Dans les réacteurs D, les profils d'abattement des trois composés ne sont pas significativement différents. La dégradation complète des TEX est obtenue entre 0 et 10 cm pour les réacteurs D1 et D2 et entre 10 et 20 cm pour le réacteur D3.

Le réacteur D3 présente un profil différent des deux autres. L'assèchement observé dans la partie basse durant la dernière semaine de fonctionnement (jours 43 à 49) des biofiltres peut expliquer cette différence. Cette particularité ne modifie pas l'analyse du fonctionnement global des réacteurs D, ni celle des performances épuratoires de chaque polluant.

3.4. Analyses microbiologiques : Etude quantitative et qualitative de la communauté bactérienne totale

Compte tenu de l'assèchement anormal observé dans le réacteur D3 les résultats des réacteurs D présentés dans cette partie ne concerneront que les réacteurs D1 et D2.

3.4.1. Densité de la communauté bactérienne totale

Les deux figures suivantes présentent la densité de la communauté bactérienne totale mesurée par qPCR sur le gène *rrs*, dans les biofiltres de 40 cm (réacteurs C : figure III.7) et ceux de 20 cm (réacteurs D : figure III.8), pour les différentes hauteurs de garnissage et les échantillons prélevés à T_0.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

3.4.1.1. Densité bactérienne dans les biofiltres de 40 cm

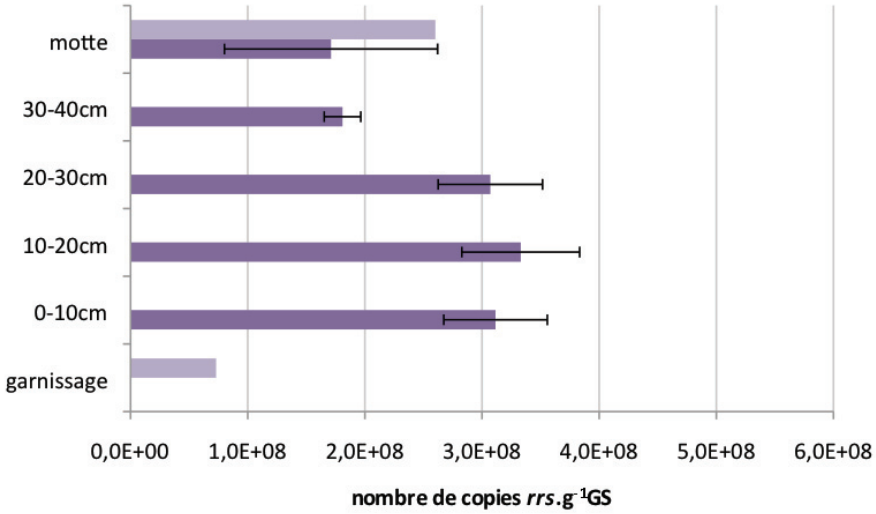


Figure III.7. Nombre moyen de copies du gène *rrs* par g de garnissage sec (ou motte de terreau sèche) dans les biofiltres de 40 cm de hauteur de garnissage. Les barres claires représentent les échantillons de garnissage et de motte prélevés avant la mise en route des biofiltres (T_0). Les barres foncées représentent la moyenne des 3 réacteurs C pour chaque hauteur de prélèvement. Les barres d'erreur représentent les écarts type (n = 3).

Les résultats montrent une densité globale moyenne de $2{,}8.10^8$ copies du gène *rrs* par g de garnissage sec dans les réacteurs C après fonctionnement. Cette valeur est 3,5 fois plus élevée que celle mesurée sur le garnissage à T_0.

Le nombre de copie du gène *rrs* n'est pas significativement différent entre les hauteurs 0-10, 10-20 et 20-30 cm (figure III.7). En revanche il est significativement plus élevé d'environ 75% dans la partie comprise entre 0 et 30 cm que dans la hauteur 30-40 cm ($p < 0{,}01$). Dans cette dernière hauteur, le nombre de copies *rrs* par masse sèche est similaire à celui mesuré dans la motte (pas de différence significative).

Le nombre de copies *rrs* dans la motte après fonctionnement est similaire à celui mesuré à T_0.

3.4.1.2. Densité bactérienne dans les biofiltres de 20 cm

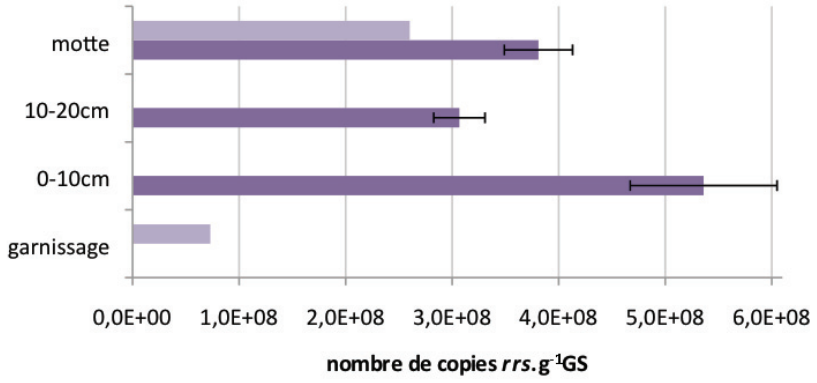


Figure III.8. Nombre moyen de copies du gène *rrs* par g de garnissage sec (ou motte de terreau sèche) dans les biofiltres de 20 cm de hauteur de garnissage. Les barres claires représentent les échantillons de garnissage et de motte prélevés avant la mise en route des biofiltres (T_0). Les barres foncées représentent la moyenne des réacteurs D1 et D2 pour chaque hauteur de prélèvement. Les barres d'erreur représentent les écarts type (n = 2).

Les résultats montrent une densité globale moyenne de $3{,}7.10^8$ copies du gène *rrs* par g de garnissage sec dans les biofiltres après fonctionnement. Cette valeur est 5 fois plus élevée que celle mesurée sur le garnissage à T_0.

Le nombre de copie du gène *rrs* est significativement plus élevé dans la partie basse du garnissage (0-10 cm) que dans la partie haute (10-20 cm) ($p = 0{,}003$) et que dans la motte ($p = 0{,}043$) (figure III.8).

Le nombre de copies *rrs* de la hauteur 10-20 cm est similaire à celui mesuré dans la motte (pas de différence significative).

Le nombre de copies *rrs* dans la motte après fonctionnement est similaire à celui mesuré à T_0.

3.4.1.3. Comparaison des densités bactériennes dans les réacteurs C et D

Globalement le nombre de copies *rrs* est significativement plus élevé dans les réacteurs D que dans les réacteurs C ($p = 0{,}01$). Cette différence est liée au grand nombre de copies *rrs* de la hauteur 0-10 cm des réacteurs D, significativement plus élevé que dans chacune des autres hauteurs ($p \leq 0{,}023$). Il n'y a pas de différences significatives entre le nombre de copies *rrs* de la hauteur 10-20 cm des réacteurs D et celui de chacune des hauteurs des réacteurs C.

Le nombre de copies *rrs* est significativement plus élevé dans la motte des réacteurs D que dans celle des réacteurs C (p = 0,019).

3.4.1.4. Relation entre l'activité de dégradation des TEX et la densité bactérienne

La figure III.9 présente la corrélation entre l'activité de dégradation des TEX (exprimée en pourcentage d'efficacité d'élimination) et la densité bactérienne (mesurée en nombre de copies du gène *rrs* par g de garnissage sec) pour les échantillons provenant du garnissage en fin d'expérimentation.

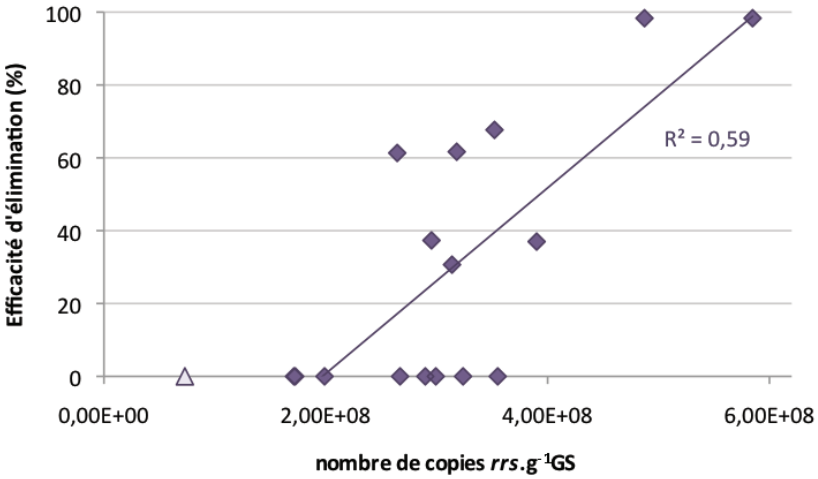


Figure III.9. Corrélation entre l'activité de dégradation des TEX (% d'élimination) et la densité bactérienne (nombre de copies *rrs* par g de garnissage sec). Losanges pleins : échantillons provenant du garnissage en fin d'expérimentation ; triangle vide : garnissage à T_0 ; ligne : droite de corrélation ; R^2 : coefficient de corrélation de Spearman.

Le coefficient de corrélation linéaire de Spearman, de 0,59, indique une corrélation positive entre la densité bactérienne et l'activité de dégradation des TEX. Dans les zones où la dégradation des TEX est plus importante, la densité bactérienne est significativement plus élevée (p = 0,015).

3.4.2. Diversité de la communauté bactérienne totale

3.4.2.1. Analyse générale des résultats de pyroséquençage

Les données brutes issues du pyroséquençage comportaient 211 797 séquences. Après application des filtres et l'élimination des chimères, 44 461 séquences de bonne qualité ont été conservées, soit 21% du nombre total de séquences initiales, dont 11 289 séquences uniques. Parmi les séquences exclues, 97% présentaient une taille inférieure

à 200 pb et 3% correspondaient à des séquences chimériques ou avaient un défaut d'étiquetage (0,3%).

Les courbes de raréfaction réalisées à partir des 44 461 séquences de bonne qualité pour les trois seuils de similarité définis (80%, phylum ; 90%, genre et 97%, espèce) ont montré que l'asymptote n'est atteinte pour aucun des niveaux taxonomiques. Cela signifie que, malgré le nombre important de séquences obtenues, l'échantillonnage n'est pas exhaustif. Afin de permettre une analyse comparative des différents échantillons, la standardisation de l'effort d'échantillonnage a été effectuée. Le nombre de séquences obtenues pour chaque échantillon variant de 727 à 14318, un sous échantillonnage de 727 séquences par échantillon a été réalisé. Ainsi, 24 x 727 = 17 448 séquences ont été ré-échantillonnées aléatoirement parmi les 44 461.

3.4.2.2. Courbes de raréfaction basées sur l'indice de richesse estimée (S_{chao1})

Après standardisation de l'effort d'échantillonnage, les courbes de raréfactions basées sur l'indice de richesse estimées en OTU (S_{chao1}) ont été réalisées pour chaque échantillon aux trois différents seuils de similarité utilisés pour la constitution des OTU. La figure III.10 montre les courbes de raréfaction moyennes obtenues pour chacun de ces trois seuils, en fonction du nombre de séquences sous échantillonnées.

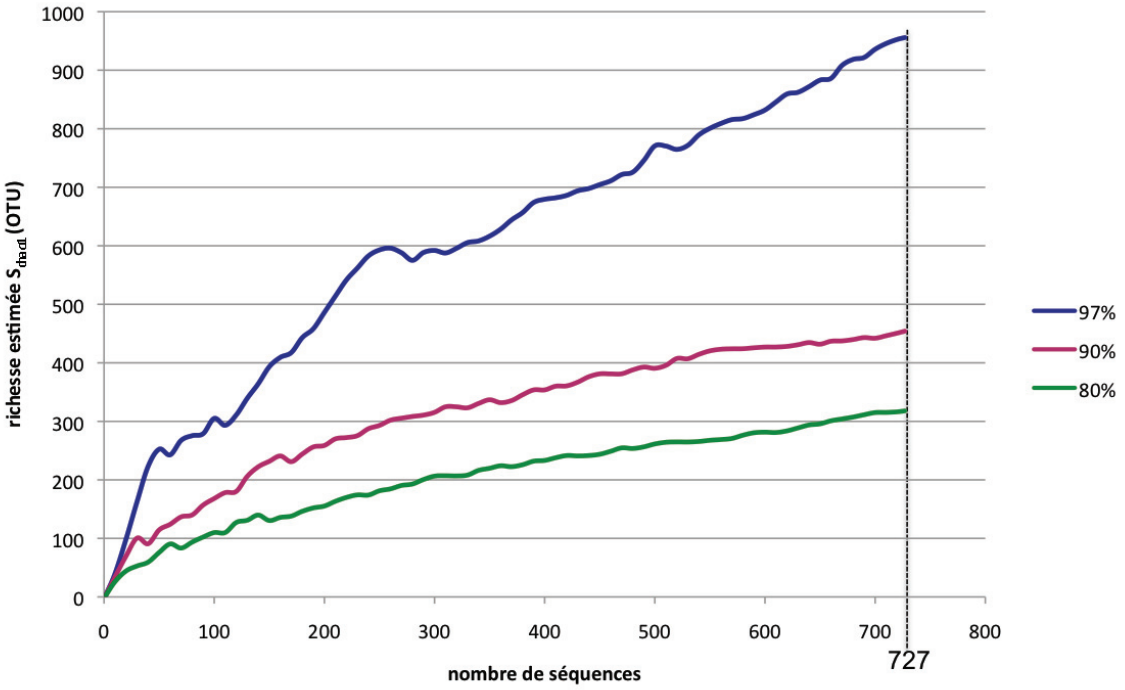


Figure III.10. Courbes de raréfaction moyennes basées sur l'indice de richesse estimée S_{chao1} (OTU) en fonction du nombre de séquences sous échantillonnées, pour les seuils de similarité de 80%, 90% et 97%.

Ces courbes de raréfaction montrent que la richesse estimée moyenne des échantillons est de 956, 454 et 317 OTU pour les seuils de similarité de 97%, 90% et 80% respectivement.

Les analyses de diversité ont ensuite été réalisées à partir des OTU constituées avec un seuil de 90% de similarité. Le taux de recouvrement calculé pour ce seuil ne varie pas de façon significative entre les différentes hauteurs de prélèvement, ni entre les deux types de réacteur. Il est en moyenne de 83%.

3.4.2.3. Richesse aux différentes hauteurs de garnissage

La richesse observée (S_{obs}) a été déterminée pour chaque échantillon provenant des biofiltres de 40 cm et de 20 cm ainsi que pour les échantillons de garnissage et de motte réalisés à T_0.

La figure III.11 présente les moyennes des richesses observées calculées à partir des réplicats des différentes hauteurs de garnissage pour chaque type de réacteur.

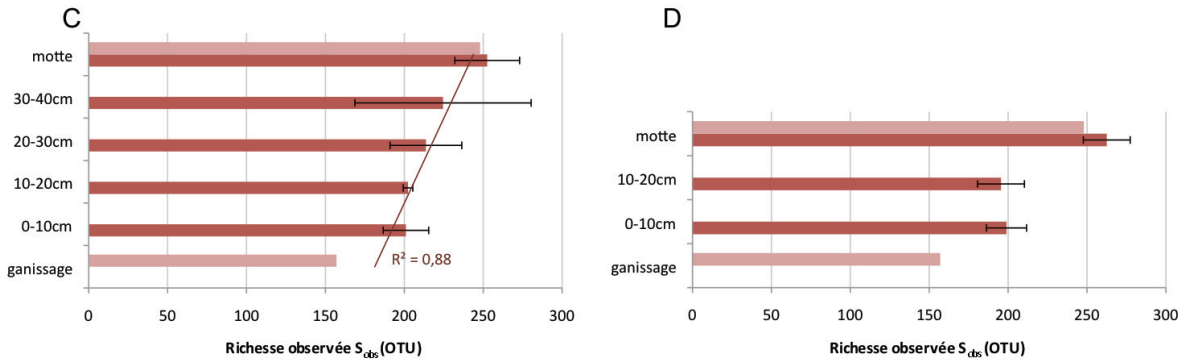


Figure III.11. Richesse observée (S_{obs}) en OTU des biofiltres de 40 cm de hauteur de garnissage (réacteurs C) et ceux de 20 cm (réacteurs D). Barres claires : échantillons de garnissage et de motte prélevés avant la mise en route des biofiltres (T_0). Barres foncées : moyennes pour chaque hauteur de prélèvement à 50 jours. Barres d'erreur : écarts types (n = 3 pour C et n = 2 pour D). Lignes : droite de corrélation ; R^2 : coefficient de corrélation de Spearman.

À T_0, la richesse observée est 36% plus élevée dans la motte que dans le garnissage.

Richesse observée dans les biofiltres de 40 cm

Après 50 jours de fonctionnement, la richesse observée est en moyenne de 248 OTU au niveau de la motte. Elle n'est pas significativement différente de celle observée à T_0.

Au niveau du garnissage la richesse observée ne varie pas de façon significative en fonction de la hauteur dans le garnissage. Elle est en moyenne de 210 OTU toutes

hauteurs confondues, soit 25% plus élevée qu'à T_0. Par ailleurs, elle est significativement inférieure (de 15%) à celle observée dans la motte (p = 0,032).

La corrélation linéaire entre la richesse et la hauteur de prélèvement présente un coefficient de 0,88. Cette corrélation, bien que non statistiquement significative indique toutefois que la richesse tend à diminuer à mesure que l'on s'éloigne de la motte.

Richesse observée dans les biofiltres de 20 cm

Après 50 jours de fonctionnement, la richesse observée est en moyenne de 263 OTU au niveau de la motte et n'est pas significativement différente de celle observée à T_0.

Dans le garnissage, il n'y pas de variation significative de cette richesse en fonction de la hauteur de prélèvement. Elle est en moyenne de 197 OTU toutes hauteurs confondues, soit 20% plus élevée qu'à T_0. De plus, elle est très significativement inférieure (de 25%) à celle observée dans la motte (p = 0,004).

Dans ces biofiltres, la richesse et la hauteur de prélèvement ne sont pas corrélées.

Comparaison de la richesse observée dans les réacteurs C et D

Aucune différence statistiquement significative n'a été détectée entre les deux types réacteurs, probablement en raison de la variabilité élevée observée entre réplicats.

Au niveau du garnissage, les moyennes des richesses observées entre 0 et 20 cm sont identiques pour les deux types de réacteurs (202 et 198 OTU respectivement pour les réacteurs C et D). Elles sont globalement plus faibles que celles obtenues entre 20 et 40 cm dans les réacteurs C (220 OTU en moyenne).

3.4.2.4. Diversité bactérienne aux différentes hauteurs de garnissage

Afin d'estimer la diversité bactérienne, l'indice de Shannon a été calculé pour chaque échantillon provenant des biofiltres de 40 cm (réacteurs C) et de 20 cm de hauteur totale de garnissage (réacteurs D), ainsi que pour les échantillons de garnissage et de motte réalisés à T_0 (figure III.12).

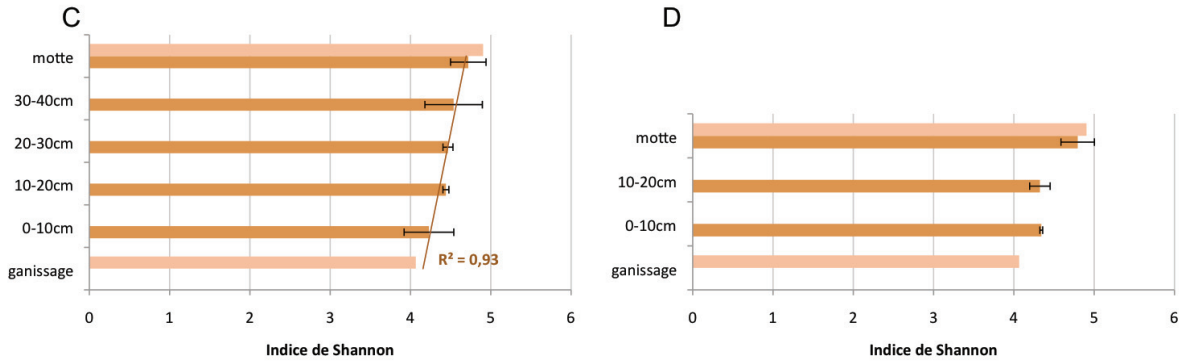


Figure III.12. Indice de Shannon des biofiltres de 40 cm de hauteur de garnissage (réacteurs C) et ceux de 20 cm (réacteurs D). Barres claires : échantillons de garnissage et de motte prélevés avant la mise en route des biofiltres (T_0). Barres foncées : moyennes pour chaque hauteur de prélèvement à 50 jours. Barres d'erreur : écarts types (n = 3 pour C et n = 2 pour D). Lignes : droite de corrélation ; R^2 : coefficient de corrélation de Spearman.

À T_0, l'indice de Shannon est plus élevé dans la motte (4,90) que dans le garnissage (4,07).

Diversité bactérienne dans les biofiltres de 40 cm

Après 50 jours de fonctionnement, au niveau de la motte, l'indice de Shannon est en moyenne de 4,72. Il n'est pas significativement différent de celui calculé à T_0.

Au niveau du garnissage l'indice de Shannon ne varie pas significativement entre les hauteurs de prélèvement. Il est en moyenne de 4,42 toutes hauteurs confondues, soit 8% plus élevé qu'à T_0. Cet indice n'est pas significativement inférieur dans le garnissage par rapport à la motte au seuil de rejet de 5% ($p = 0,089$).

Le coefficient de corrélation entre la diversité (indice de Shannon) et la hauteur de prélèvement est de 93% mais n'est pas statistiquement significatif. Néanmoins, il indique que la diversité tend à diminuer à mesure que l'on s'éloigne de la motte.

Diversité bactériennes dans les biofiltres de 20cm

Après 50 jours de fonctionnement, au niveau de la motte, l'indice de Shannon est en moyenne de 4,79 et n'est pas significativement différent de celui calculé à T_0.

Dans le garnissage l'indice de Shannon ne varie pas de façon significative en fonction de la hauteur de prélèvement. Il est en moyenne de 4,33 toutes hauteurs confondues, soit 6% plus élevé qu'à T_0, mais significativement plus faible que dans la motte ($p = 0,012$).

Aucune corrélation n'est observée entre la diversité et la hauteur de prélèvement pour ces réacteurs.

Comparaison de la diversité dans les réacteurs C et D

Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les réacteurs, probablement en raison de l'importante variabilité observée entre réplicats.

3.4.2.5. Relation entre l'activité de dégradation des TEX et la diversité bactérienne

Bien que la richesse et la diversité semblent plus faibles dans la partie basse des réacteurs C, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'activité de dégradation des TEX et les indices de richesse et de diversité. Par contre, ces indices sont significativement plus faibles dans les hauteurs où la dégradation a été détectée (0-20 cm pour les réacteurs C et 0-10 cm pour les réacteurs D1 et D2) que dans les autres ($p = 0,04$ pour la richesse observée et l'indice de Shannon).

3.4.2.6. Identification taxonomique

L'affiliation taxonomique réalisée par comparaison des séquences obtenues à la base de données Silva a mis en évidence 24 phylums bactériens. Parmi ces derniers, 12 présentent une fréquence relative supérieure à 1% dans au moins une hauteur de biofiltre et représentent plus de 99% du nombre total d'OTU dans chaque biofiltre. Les fréquences relatives de ces 12 phylums ont été calculées en fonction du nombre total d'OTU détectés pour chaque échantillon. Pour les différentes hauteurs, les moyennes des fréquences relatives ont été réalisées à partir des réplicats. Elles sont représentées dans la figure III.13.C pour les biofiltres de 40 cm et figure III.13.D pour les biofiltres de 20 cm.

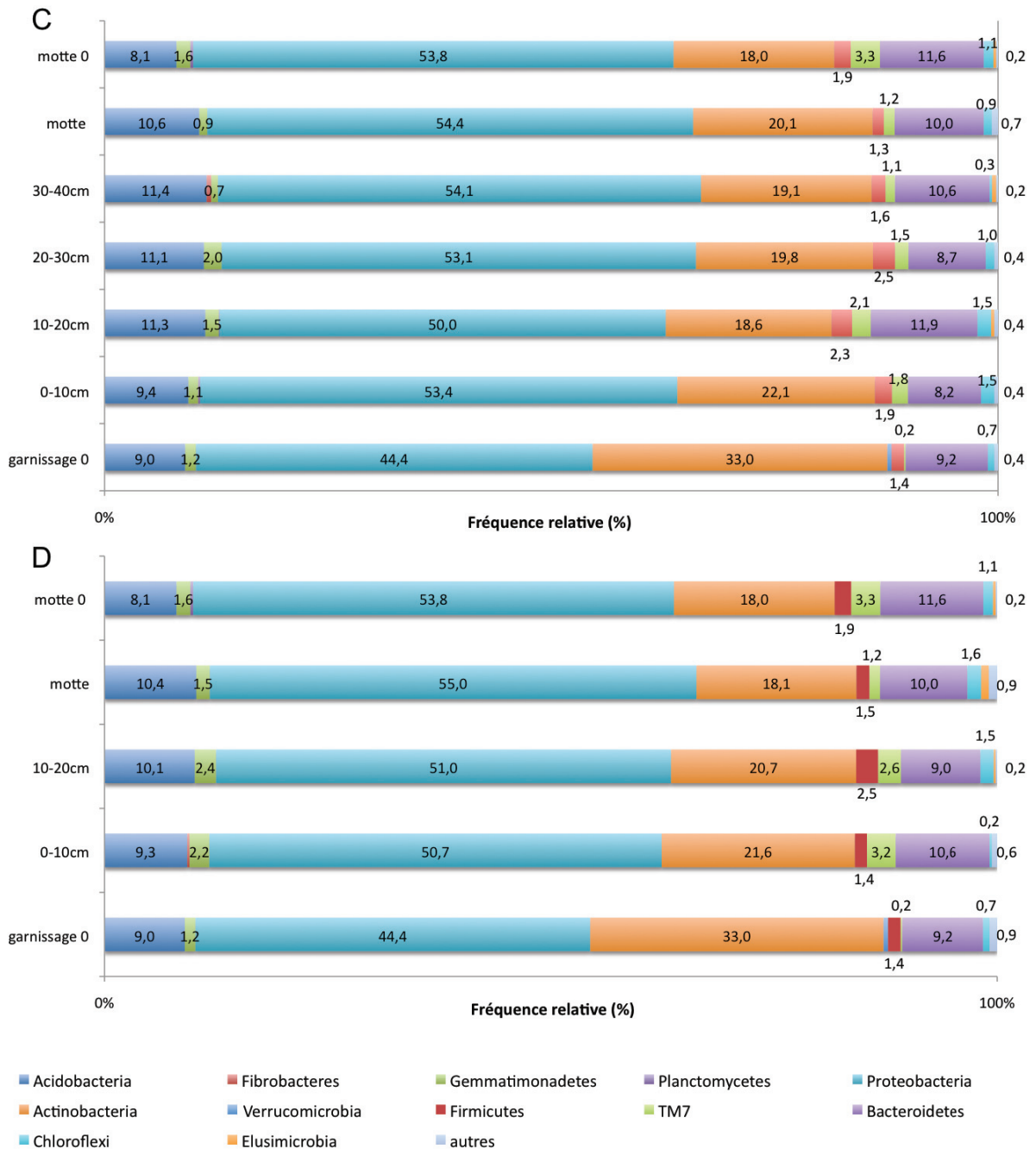


Figure III.13. Fréquences relatives moyennes (%) des OTU affiliés aux 12 phylums les plus représentés pour chaque hauteur de garnissage et pour les T_0. C : biofiltres de 40 cm de hauteur de garnissage. D : biofiltres de 20 cm. Les fréquences relatives sont exprimées en pourcentage du nombre total d'OTU détectés pour chaque échantillon. Les moyennes sont réalisées sur les réplicats des différentes hauteurs.

D'une façon générale, la répartition globale des 12 phylums les plus représentés ne varie pas de façon significative entre les différentes hauteurs de prélèvement, ni entre réacteurs. Quelques tendances peuvent toutefois être soulignées, notamment entre le garnissage à T_0 et les autres échantillons.

Les 4 phylums dominants sont les *Proteobacteria* (bleu ciel), les *Actinobacteria* (orange), les *Bacteroidetes* (violet) et les *Acidobacteria* (bleu foncé). Ils représentent environ 93% du nombre total d'OTU.

Le phylum des *Proteobacteria* est le plus représenté avec une fréquence relative moyenne d'environ 54% dans la motte et le garnissage après 50 jours de fonctionnement. Ces fréquences relatives sont similaires à celles observées dans la motte à T_0. Par contre, elles sont plus élevées (d'environ 20%) que celles retrouvées dans le garnissage à T_0.

Quatre classes de *Proteobacteria* ont été détectées, leurs fréquences relatives sont présentées figure III.14.

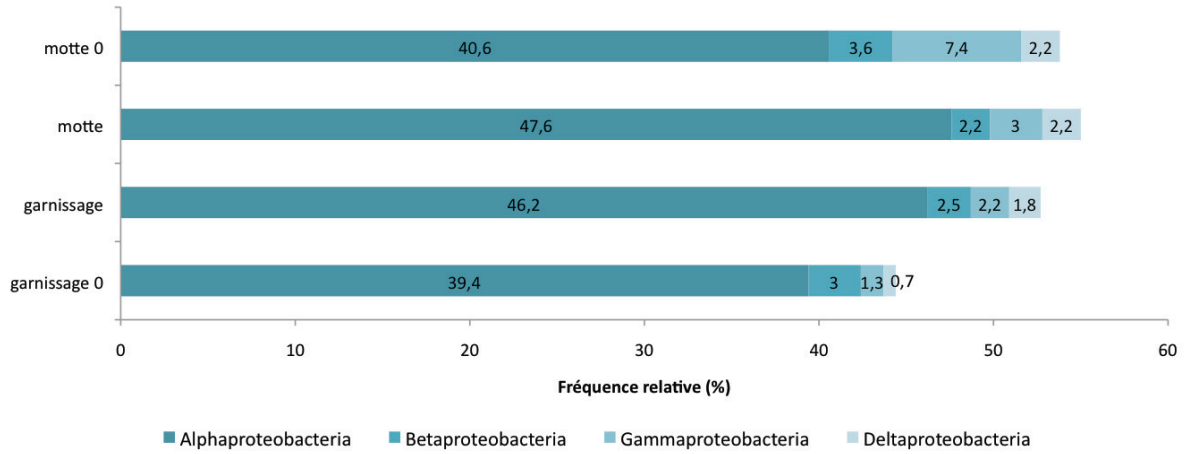


Figure III.14. Fréquences relatives (%) des 4 classes de *Proteobacteria* détectées. Pour la motte et le garnissage après fonctionnement, les résultats présentés correspondent aux moyennes des échantillons provenant des deux types de réacteurs.

Les *Alphaproteobacteria* dominent très largement et représentent en moyenne 40% et 47% des *Proteobacteria* détectées avant et après fonctionnement des réacteurs. Parmi les *Proteobacteria*, les principaux genres retrouvés sont *Sphingomonas, Rhizomicrobium, Burkholderia* et *Xanthobacter* représentés respectivement par 2,4%, 2,1%, 1% et 0,7% de la totalité des OTU détectés dans le garnissage après fonctionnement (contre 2,3%, 2,4%, 0,3% et 2,3% respectivement dans le garnissage à T_0).

Les *Actinobacteria* représentent 20% de la totalité des OTU détectés après fonctionnement des réacteurs. Cette fréquence est similaire à celle observée dans la motte à T_0. Par contre, elle est plus faible (d'environ 40%) que celle observée dans le garnissage à T_0. Les principaux genres retrouvés sont *Pseudonocardia* et *Mycobacterium*

représentés respectivement par 1,5% et 0,5% de la totalité des OTU détectés en fin d'expérimentation dans le garnissage (contre 0,5% et 2,4% à T_0).

Les *Acidobacteria* représentent 10% de la totalité des OTU détectés après fonctionnement des réacteurs. Leur fréquence est légèrement plus élevée qu'à T_0, à la fois dans la motte et dans le garnissage. Cette tendance est plus marquée dans les biofiltres de 40 cm que dans ceux de 20 cm. Les principaux genres retrouvés sont *GP-3* et *GP-1* représentés respectivement par 4,1% et 3,2% de la totalité des OTU détectés dans le garnissage après fonctionnement (contre 2,3% et 3,7% à T_0).

Les *Bacteroidetes* représentent 9,7% de la totalité des OTU détectés après 50 jours de fonctionnement. Cette fréquence est similaire à celle observée dans le garnissage à T_0. Par contre, elle est plus faible (d'environ 20%) que dans la motte à T_0.

Concernant les autres phylums, la présence de *Firmicutes* (2,1%) et de *Gemmatimonadetes* (1,6%) peut être soulignée, ainsi que la présence du groupe de bactéries *TM7* (1,8%).

Pour ce dernier groupe, la fréquence relative observée à T_0 est très faible dans le garnissage (0,2%) et supérieure à 3% dans la motte (figure III.13). Les différences observées entre les hauteurs de prélèvement ne sont pas statistiquement significatives, cependant la même tendance est observée dans les deux réacteurs.

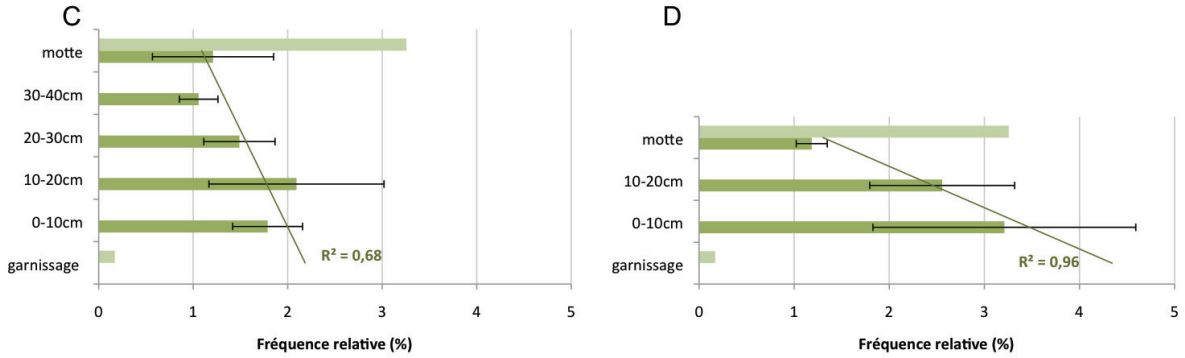


Figure III.15. Fréquences relatives du phylum *TM7* dans les biofiltres de 40 cm de hauteur de garnissage (réacteurs C, à gauche) et ceux de 20 cm (réacteurs D, à droite). Barres claires : échantillons de garnissage et de motte prélevés avant la mise en route des biofiltres (T_0). Barres foncées : moyennes pour chaque hauteur de prélèvement à 50 jours. Barres d'erreur : écarts types (n=3 pour C et n=2 pour D). Lignes : droite de corrélation, R^2 : coefficient de corrélation de Spearman.

Après 50 jours de fonctionnement, ce groupe est 3 fois moins présent dans la motte (figure III.15). Dans le garnissage, il est retrouvé à toutes les hauteurs avec une

fréquence 5,5 à 13,5 fois supérieure qu'à T_0. Dans les biofiltres de 40 cm de hauteur, l'augmentation de la fréquence du groupe *TM7* est plus importante dans les hauteurs situées entre 0 et 20 cm (R^2 = 0,68). Pour les biofiltres de 20 cm de hauteur, cette augmentation est encore plus importante, notamment au niveau 0-10cm (R^2 = 0,96).

3.4.2.4. Comparaison globale de la richesse et de la structure de la communauté bactérienne totale.

Pour déterminer l'influence des conditions opératoires sur le développement et la répartition de la microflore indigène, une analyse globale de la richesse et de la structure de la communauté bactérienne totale a été effectuée. Elle est basée sur la comparaison de la diversité et/ou de la richesse de la communauté totale à T_0 et en fin d'expérimentation pour chaque hauteur de prélèvement de garnissage. La figure suivante présente les Analyses en Coordonnées Principales (PCoA), réalisées sur l'ensemble des échantillons provenant des différentes hauteurs de prélèvement, basées sur la richesse en OTU uniquement (Jclass, figure III.16.A) et en tenant compte de l'abondance relative des OTU (ThetaYC, figure III.16.B).

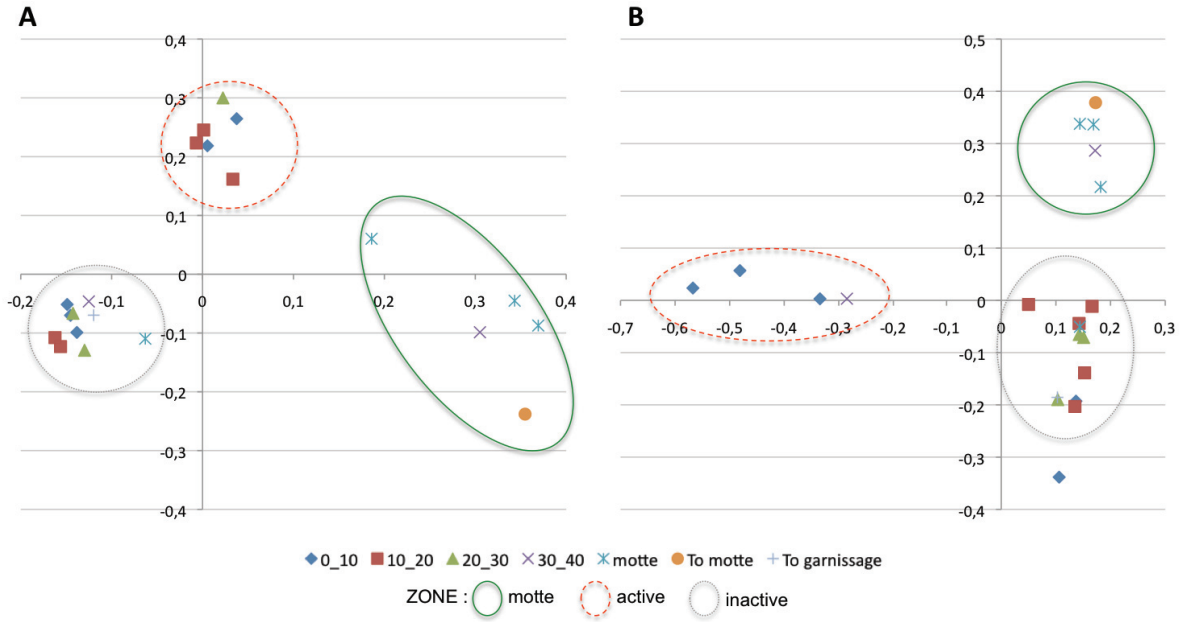


Figure III.16. Analyses en Coordonnées Principales (PCoA) de la diversité de la communauté bactérienne totale en termes de richesse (A : Jclass) et de structure (richesse et abondance relative) (B : ThetaYC). Chaque point correspond à un échantillon provenant des deux types de réacteurs classés en fonction de la hauteur de prélèvement.

En termes de richesse, les tests statistiques (Unifrac) ont montré que la communauté bactérienne totale est significativement différente à toutes les hauteurs de prélèvement

($p < 0,001$) à l'exception de la motte. La motte à T_0 est similaire à celle observée après fonctionnement ($p = 0,08$). Elle est également similaire à la diversité observée au sein de la hauteur 30-40 cm ($p = 0,06$).

D'un point de vue structure, la communauté bactérienne totale est également significativement différente à toutes les hauteurs des biofiltres, ainsi qu'avec les T_0 ($p<0,001$).

Les représentations graphiques des PCoA permettent cependant de regrouper les échantillons selon trois zones :

- une zone « motte » contenant l'échantillon T_0 de la motte et une majorité d'échantillons provenant de la motte ou prélevés au voisinage de la motte (biofiltres de 40 cm uniquement) après fonctionnement.
- une zone « active » correspondant à une majorité d'échantillons provenant des hauteurs où une activité de biodégradation des TEX a été détectée.
- une zone « inactive » qui rassemble l'échantillon T_0 du garnissage ainsi qu'une majorité d'échantillons provenant des hauteurs de prélèvement où aucune activité de biodégradation des TEX n'a été détectée.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

4. Discussion

Deux conditions de fonctionnement ont été testées en parallèle et répliquées afin de tenir compte de la variabilité des bioréacteurs dans l'analyse et la comparaison des résultats obtenus. Trois biofiltres comportaient 40 cm de hauteur totale de garnissage (réacteurs C) et trois autres seulement 20 cm (réacteurs D).

Tous les biofiltres végétalisés ont été alimentés par un effluent gazeux synthétique contenant un mélange de TEX à une concentration de 600 $\mu g.m^{-3}$ (200 $\mu g.m^{-3}$ pour chaque composé), avec une vitesse de passage de l'air de 200 $m.h^{-1}$, entrainant un EBRT de 7,6 s pour les réacteurs C et de 3,8 s pour les réacteurs D. Ainsi, l'influence de ce paramètre sur les performances épuratoires a été examinée afin de déterminer les capacités limites de ce système de traitement d'air.

La communauté bactérienne totale a été caractérisée aux niveaux quantitatif et qualitatif, avant et après fonctionnement des biofiltres, dans le but d'évaluer l'impact des conditions opératoires sur le développement et la répartition des bactéries, ainsi que l'influence de l'origine de la microflore indigène du garnissage et de la motte.

4.1. Performances épuratoires et capacité d'élimination

Le fonctionnement des six biofiltres a été suivi quotidiennement durant 50 jours. Tous ont montré un fonctionnement global homogène et une très bonne reproductibilité a été observée entre réplicats (figure III.3). Des performances épuratoires supérieures à 98% d'abattement ont pu être constatées pour chaque composé. Cependant la mise en place et la stratification des activités de dégradation des TEX se sont révélées différentes entre composés ainsi qu'entre les deux types de réacteurs.

La vitesse de prise d'efficacité concernant la dégradation du xylène est significativement plus faible que pour les deux autres composés (figures III.4 et III.5). Ce constat, fait dans les deux types de réacteurs, est similaire aux résultats présentés dans la littérature. Plusieurs auteurs ont effectivement montré que les cinétiques de dégradation du toluène et de l'éthylbenzène (TE) sont plus rapides que celle du xylène (Aizpuru, 2001 ; Maliyekkal *et al.*, 2004 ; Mathur *et al.*, 2007 ; Dou *et al.*, 2008 ; Lee et Cho, 2009). Dans certains cas, cette différence est accompagnée d'un taux d'élimination du xylène plus faible comparé aux deux autres composés durant la période stationnaire

(Aizpuru, 2001 ; Maliyekkal *et al.,* 2004). Mais, le plus souvent, les mêmes performances sont atteintes pour le xylène avec quelques jours de retard par rapport aux TE (Mathur *et al.*, 2007 ; Dou *et al.*, 2008 ; Jo *et al.*, 2008 ; Lee et Cho, 2009), comme c'est le cas dans notre étude. Ce résultat peut être expliqué par les différences de biodégradabilité de ces composés. Comme cela a été discuté précédemment (Chapitre II, partie 1, page 103), la concentration des polluants dans la phase aqueuse est un facteur limitant les activités microbiennes (Guieysse *et al.*, 2008). Le xylène présente un coefficient de Henry plus faible que les autres composés (Aizpuru, 2001) ce qui signifie qu'il est moins soluble dans la phase aqueuse du biofiltre. Sa biodisponibilité est donc plus faible que celle des TE. Par ailleurs, le xylène peut être cométabolisé avec le toluène (Charng *et al.*, 1993) et plusieurs études ont montré que la présence du toluène stimule l'élimination du xylène (Alvarez et Vogel, 1991 ; Oh *et al.*, 1994 ; Yeom *et al.,* 1997 ; Orwel *et al.*, 2006). L'hypothèse proposée est que l'acclimatation des microorganismes à la dégradation du toluène induit l'activité d'enzymes intervenant dans les voies centrales de dégradation des composés aromatiques (Chapitre I, page 74), notamment la 3-méthylcatéchol 2,3 dioxygénase et la 4-méthylcatéchol 1,2 dioxygénase permettant la destruction du cycle benzénique par les voies de clivage meta et ortho respectivement (Chapitre I, page 79 et 81).

L'élimination des composés a également été mesurée à différentes hauteurs dans le garnissage et les profils de dégradation des TEX ont révélé des différences de stratification de cette activité entre composés ainsi qu'entre réacteurs (figure III.6).

Les réacteurs C et D ne présentent pas la même capacité d'élimination des TEX, elles étaient respectivement de 279 et 555 $mg.m^{-3}.h^{-1}$. Plusieurs auteurs ont montré que la capacité d'élimination de ces composés augmente proportionnellement avec la charge en polluants lorsque celle-ci est inférieure au $g.m^{-3}.h^{-1}$ (Jorio *et al.,* 1998 ; Delhoménie *et al.*, 2002a ; Peishi *et al.*, 2004 ; Sakuma *et al*, 2006 ; Vergara-Fernandez *et al.*, 2007). Dans notre cas, la capacité d'élimination est artificiellement augmentée par la diminution de la hauteur totale de garnissage. Néanmoins, l'élimination complète des TEX est atteinte dès 10 cm de hauteur de garnissage dans les réacteurs D, alors que dans les réacteurs C elle ne l'est qu'à 20 cm. Les concentrations en polluants appliquées sur ces deux types de réacteurs étant identiques, cette différence peut être expliquée soit par une activation plus forte des voies de dégradation des TEX, soit par la densité

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

bactérienne des biofiltres, plus élevée dans les réacteurs D que C. Les densités bactériennes mesurées à partir des échantillons de garnissage provenant des deux types de réacteurs, effectivement plus élevées dans les réacteurs D, nous permettent d'appuyer cette seconde hypothèse sans que cela exclut la première (ces éléments sont discutés dans le paragraphe 4.3.2, page 177).

Dans les réacteurs C, la dégradation des TEX est située entre 0 et 20 cm de hauteur. Le xylène est significativement mieux dégradé que les autres composés à 10 cm. Au vue des résultats décrits précédemment, ce constat est surprenant d'autant plus que plusieurs auteurs ont observé des résultats inverses (Corsi et Seed, 1995 ; Mathur *et al.*, 2007). Néanmoins, les conditions opératoires sont différentes de celles retenues dans le cadre de notre étude. Pour les travaux réalisés par Corsi et Seed (1995) en biofiltration, les concentrations de BTX sont supérieures à 200 $mg.m^{-3}$.

Lors du traitement de faibles concentrations par un biofiltre végétalisé, dans les conditions opératoires testées, la dégradation du xylène est donc plus lente que celle des TE durant la phase d'optimisation mais ce décalage n'est plus visible durant la phase stationnaire où l'élimination des trois composés est supérieure à 98%. De plus, l'élimination maximale peut être atteinte en 10 cm de hauteur de garnissage.

4.2. Influence de l'EBRT sur les performances épuratoires

L'EBRT a une influence directe sur les performances épuratoires des biofiltres en conditionnant la biodisponibilité des polluants (Elmrini *et al.*, 2004). La diminution de l'EBRT (i.e augmentation du débit ou de la vitesse de passage de l'air) n'est pas favorable au transfert des composés de la phase gazeuse vers la phase aqueuse (Kraakman *et al.*, 2011), mais elle peut néanmoins induire une augmentation de la quantité de polluants au sein du biofilm pouvant avoir un effet toxique sur les microorganismes (Corsi et Seed, 1995). L'impact de ces deux modifications sur la capacité épuratoire du biofiltre dépend de la concentration de l'effluent à traiter. Les biofiltres sont généralement conçus pour traiter d'importants volumes d'air contenant des concentrations en polluants beaucoup plus élevées (du $mg.m^{-3}$ au $g.m^{-3}$) que celles utilisées dans cette étude. C'est pourquoi, les EBRT appliqués sont d'ordinaire de l'ordre de plusieurs dizaines de secondes à quelques minutes (Corsi et Seed, 1995 ; Kennes, 1996 ; Jorio *et al.*, 1998 ; Alvarez-Hornos *et al.*, 2008 ; Dorado *et al.*, 2008 ; Oh *et al.*, 2009 ; Rene *et al.*, 2010). Très peu d'études ont été

réalisées avec un EBRT inférieur à 15 s. Sakuma *et al.* (2006) ont mis en évidence une élimination de 95% du toluène avec un EBRT de 13,5 s mais les concentrations en toluène de l'effluent traité étaient de 10 à 400 $mg.m^{-3}$. Lors du traitement de concentrations largement inférieures au $mg.m^{-3}$, la charge en polluants n'a probablement pas d'impacts en termes de toxicité, mais elle peut, en revanche, limiter la biodisponibilité en substrat. Dans ce cas (EBRT court et teneurs en composés faibles), le transfert des polluants vers le biofilm constitue l'étape limitante (Picioreanu *et al.*, 2000 ; Delhoménie et Heitz, 2005).

Comme cela a été démontré précédemment, un biofiltre végétalisé de 40 cm de hauteur de garnissage est capable d'éliminer plus de 97% des TEX à une concentration de 600 $\mu g.m^{-3}$ avec un EBRT de 14 s (Chapitre II, partie 2, page 119). Cet EBRT, relativement court, est donc bien compatible avec la biodégradation de faibles concentrations en TEX et n'engendre pas de pertes de charge excessives (< 400 $Pa.m^{-1}$). Une étude récente sur la biofiltration de l'air intérieur a également montré qu'il était possible de traiter de très faibles concentrations de toluène (14 à 81 $\mu g.m^{-3}$) avec un EBRT de 19 s (Ondarts *et al.*, 2012).

Au cours de notre étude, le débit d'air appliqué sur les biofiltres de 40 cm (réacteurs C) a été multiplié par 2, correspondant à un EBRT de 7,6 s. Les performances épuratoires obtenues avec ces réacteurs, supérieures à 98% d'abattement, indiquent qu'un EBRT court permet bien la biodégradation de faibles concentrations de TEX. Cependant, les pertes de charge générées dans ces conditions opératoires, de 1 200 $Pa.m^{-1}$, sont relativement élevées et engendrent une augmentation de la consommation électrique du système. L'analyse des profils de dégradation de ces réacteurs révèle que l'élimination totale des TEX est atteinte systématiquement dès 20 cm de hauteur de garnissage (figure III.6). Ce résultat suggère qu'un EBRT deux fois plus court, de 3,8 s, peut être suffisant pour garantir l'efficacité du système tout en limitant les pertes de charge. Les performances obtenues avec les biofiltres de 20 cm de hauteur (réacteurs D) confirment cette hypothèse. Un seul exemple d'étude réalisée avec un EBRT aussi court a été recensé. Il s'agit d'une étude de Ryu *et al.* (2008) dans laquelle les auteurs ont montré les capacités particulières d'un biofiltre garni avec de la mousse de polyuréthane (garnissage synthétique) pour le traitement du toluène à une concentration de 3,6 $g.m^{-3}$. Un taux d'élimination de 90% a alors été observé avec un EBRT de 3,5 s. Des pertes de

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

charge très conséquentes, de 2 400 Pa.m^{-1}, ont également été constatées par les auteurs, résultant d'un développement important de la biomasse et nécessitant le lessivage du garnissage. Toutefois, les conditions opératoires de cette étude diffèrent de celles des biofiltres végétalisés, non seulement en termes de concentration en polluants mais aussi de caractéristiques physico-chimiques et hydrodynamiques du garnissage.

Les profils de dégradation des réacteurs D montrent que l'élimination totale des composés est atteinte en 10 cm de hauteur de garnissage (figure III.6). L'activité de biodégradation des composés est située entre 0 et 10 cm pour les réacteurs D1 et D2. Une hauteur de 10 cm de garnissage semble donc suffisante pour obtenir un abattement total des TEX dans des conditions de faibles concentrations.

L'ensemble de ces résultats suggère que les limites de fonctionnement des biofiltres n'ont pas été atteintes, c'est-à-dire que :

- La vitesse de passage de l'air appliqué sur les biofiltres végétalisés peut être augmentée jusqu'à 200 m/h (multipliée par deux par rapport aux conditions standard) tout en garantissant une élimination totale des composés. Cela permettrait le traitement de volumes d'air beaucoup plus importants,
- L'épaisseur de garnissage peut être réduite de 40 à 20 cm sans limiter les performances épuratoires.

Dans les conditions de fonctionnement testées (débit élevé et faibles concentrations en TEX), un EBRT très court, inférieur à 4 s, est compatible avec une dégradation biologique des ces composés.

4.3. Etude de la communauté bactérienne totale

4.3.1. Influence des bactéries indigènes dans la dégradation des composés

L'inoculation du garnissage des biofiltres à partir de souches pures ou de consortia microbiens sélectionnés pour leurs capacités à dégrader les composés ciblés est une pratique courante (Malhautier *et al.,* 2005). Elle permet notamment d'accélérer la prise d'efficacité et d'augmenter les performances des biofiltres (Prado *et al.*, 2005 ; Klapkova *et al.*, 2006 ; Ho *et al.*, 2008). Néanmoins, les microorganismes naturellement présents dans les garnissages organiques peuvent posséder les capacités métaboliques

nécessaires à la dégradation des polluants traités, leur développement étant alors favorisé au cours de la période d'acclimatation (Malhautier *et al.*, 2005 ; Kennes *et al.*, 2009). Plusieurs études sur la biofiltration du toluène ont montré que la microflore indigène de compost est suffisante pour développer et atteindre des capacités d'abattement de 60 à 95% (Delhoménie *et al.*, 2001 et 2002a), notamment pour le traitement de faibles concentrations (Ondarts *et al.*, 2012).

Dans notre étude, le garnissage utilisé est composé essentiellement de fibres de coco et de perlite. Les biofiltres n'ont pas été inoculés, au sens strict du terme. Les microorganismes proviennent de la microflore indigène du garnissage et/ou de la motte de terreau et de la rhizosphère des plantes. Ils peuvent également être apportés par l'alimentation en air et par l'eau d'arrosage car elles n'ont pas été stérilisées avant utilisation.

La période d'acclimatation observée dans les biofiltres végétalisés, d'environ 19 jours en moyenne, est similaire à celle constatée par plusieurs auteurs lors du traitement des mêmes composés (concentrations supérieures à 200 $mg.m^{-3}$) par des biofiltres ensemencés à partir de boues de STEP pré-acclimatées aux polluants à traiter (Aizpuru, 2001) ou non (Corsi et Seed, 1995). De plus, tous les genres bactériens dominants retrouvés en fin d'expérimentation ont été détectés dans les échantillons de motte et/ou de garnissage à T_0 (figure III.13). Ces résultats signifient que la microflore indigène des biofiltres végétalisés comporte des microorganismes capables de dégrader les TEX et de s'acclimater rapidement aux conditions opératoires testées. Compte tenu des performances épuratoires atteintes, ces derniers permettent l'élimination complète des TEX.

4.3.2. Influence des conditions de fonctionnement sur la densité de la communauté bactérienne totale

A T_0, la densité bactérienne mesurée dans la motte est trois fois supérieure à celle retrouvée dans le garnissage (figure III.7). Ce premier résultat n'est pas surprenant car la motte contenait une plante et sa microflore rhizosphérique alors que le garnissage (matériau organo-minéral peu biodégradable) présentait une faible teneur en eau et ne contenait aucune source nutritive complémentaire qui aurait pu favoriser un développement microbien. Le garnissage contient néanmoins 10^7 copies du gène *rrs*.g^{-1}

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

de matériaux sec ce qui indique la présence d'une microflore indigène à une concentration non négligeable.

Evolution temporelle de la densité de la communauté bactérienne totale

Après 50 jours de fonctionnement, aucune modification statistiquement significative de la densité bactérienne au niveau de la motte n'a été constatée (figures III.7 et III.8). La totalité des TEX étant éliminée dans les parties basses des biofiltres, ce résultat suppose que les ressources nutritives contenues dans la motte ont été suffisantes pour maintenir la biomasse initiale durant 50 jours.

Au niveau du garnissage, une augmentation de la densité bactérienne est observée entre T_0 et la fin de l'expérimentation où 10^8 copies du gène *rrs*.g^{-1} ont été recensées. Ce résultat est nettement plus faible que la densité bactérienne mesurée par qPCR ciblant le même gène, comprise en 10^{11} et 10^{13} copies d'ADNr 16S g^{-1}, dans un biofiltre garni de compost traitant des TEX (Prenafeta-Boldu *et al.,* 2012). Cet écart peut s'expliquer, d'une part, par la densité bactérienne initiale du matériau support (de l'ordre de 10^{12} copies d'ADNr 16S g^{-1} dans l'étude précédemment citée) et, d'autre part, par les concentrations en TEX utilisées dans notre étude, 500 à 5000 fois plus faibles que celles appliquées par Prenafeta-Boldu *et al*. Une disponibilité en substrat plus réduite peut effectivement limiter la croissance bactérienne. Dans le cas du traitement de très faibles concentrations en toluène, Ondarts *et al.* (2012) ont constaté une forte diminution de la densité bactérienne dans les biofiltres. Ils ont suggéré que l'apport très limité de polluants n'était pas suffisant pour maintenir la densité bactérienne initiale. L'augmentation de la densité bactérienne observée dans nos biofiltres montre qu'une concentration de 600 $\mu g.m^{-3}$ de TEX permet non seulement le maintien, mais également la croissance des bactéries.

Stratification de la densité de la communauté bactérienne totale après fonctionnement

Une stratification de la densité bactérienne est observée dans le garnissage en fin d'expérimentation et deux zones peuvent être distinguées :

- à proximité de la motte : la densité bactérienne du garnissage est équivalente à celle de la motte, multipliée par 3 en moyenne par rapport au T_0.

- à proximité de l'entrée de l'effluent gazeux : la densité bactérienne est multipliée par 4 dans les biofiltres de 40 cm de hauteur et par 6 dans les biofiltres de 20 cm de hauteur de garnissage.

L'augmentation de la densité de la communauté bactérienne totale est donc particulièrement visible dans les zones actives pour la dégradation des TEX. La corrélation linéaire entre l'efficacité d'élimination et la densité bactérienne confirme que le nombre de bactéries est significativement supérieur dans les zones où la dégradation des TEX est la plus forte (figure III.9). Le même résultat a fréquemment été observé dans les bioréacteurs, où la stratification de la densité bactérienne respecte généralement le gradient de concentration des composés à dégrader, dès lors que celle-ci n'est pas toxique pour les microorganismes (Cabrol *et al.*, 2011). Ondarts *et al.* (2012) ont également observé une densité bactérienne plus élevée dans les zones actives des biofiltres lors du traitement de très faibles concentrations en toluène. Ces résultats indiquent que la disponibilité en substrat (TEX) favorise probablement le développement des microorganismes capables de les métaboliser. Dans notre étude, les conditions opératoires et la disponibilité en TEX ont donc une réelle incidence sur la densité de la microflore des biofiltres végétalisés.

En revanche, la concentration en TEX appliquée étant identique pour les deux types de réacteurs, il est difficile d'expliquer pourquoi la densité bactérienne est significativement plus élevée dans la zone active pour la dégradation des TEX des biofiltres de 20 cm par rapport à celles des biofiltres de 40 cm de hauteur. La proximité de la motte de terreau et la présence des racines de la plante (plus développées à proximité de la motte), créent peut être des conditions environnementales particulières, notamment en termes d'abondance et/ou de disponibilité d'éléments nutritifs complémentaires, favorisant la croissance de la biomasse dans cette zone.

Ce phénomène permet également d'expliquer l'augmentation de la densité bactérienne observée dans les zones de garnissage inactives pour la dégradation des TEX. La totalité des polluants ayant été dégradée dans les parties basses, les éléments nutritifs nécessaires à la croissance bactérienne dans ces zones proviennent probablement de la motte de terreau et de la plante via l'exsudation racinaire (Macek *et al.*, 2000).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

4.3.3. Influence des conditions de fonctionnement sur la diversité de la communauté bactérienne totale

Dans les bioprocédés de traitement d'air, la diversité et la structure de la communauté bactérienne sont généralement étudiées par des techniques moléculaires dites de « fingerprint » comme la SSCP (Single Conformation Polymorphism) (Junca *et al.*, 2003 ; Khammar *et al.*, 2005) ou la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophorese) (Chung, 2007; Cabrol *et al.*, 2010 ; Okunishi *et al.*, 2012 ; Sun *et al.*, 2012) basée sur l'amplification PCR de l'ADNr 16S ou par des méthodes de clonage-séquençage de l'ADNr 16S. Ces méthodes moléculaires permettent d'approcher la diversité de la microflore en éliminant les biais liés à la culture des microorganismes (Cabrol *et al.*, 2010). Cependant, elles ne permettent d'étudier que la flore dominante de la communauté ce qui conduit à une sous estimation de la diversité réelle. L'utilisation des nouvelles techniques de séquençage haut débit (NGS : Next Generation Sequencing), ou pyroséquençage permettent d'accéder à un très grand nombre de séquences et de couvrir plus largement la diversité bactérienne réelle (Sogin *et al.*, 2006). Ces techniques conservent tout de même les biais, liés à l'extraction d'ADN et l'amplification PCR (Roesch *et al.*, 2007 ; Zinger *et al.*, 2012). Il faut également prendre en compte les erreurs de séquençage qui, sur le nombre important de séquences obtenues, peuvent devenir très significatives (Kunin *et al.*, 2010). C'est pourquoi, des précautions doivent être prises lors de l'analyse bioinformatique des données recueillies (Schloss *et al.*, 2011).

L'utilisation des NGS est de plus en plus courante pour l'étude des communautés microbiennes d'échantillons environnementaux de sols (Roesch *et al.*, 2007 ; Vogel *et al.*, 2009 ; Will *et al.*, 2010), dont les sols contaminés par des HAP (Singleton *et al.*, 2011). Par contre, le recours à ces techniques pour l'étude des communautés bactériennes de bioprocédés de traitement d'air est encore rare, une seule étude concernant le traitement de l'H_2S par un filtre percolateur a été recensée (Li *et al.*, 2011). A notre connaissance, le pyroséquençage n'a jamais été utilisé pour l'analyse de la diversité des communautés bactériennes dans les biofiltres.

Dans notre étude, l'analyse et la comparaison de la diversité bactérienne des échantillons provenant de la motte des plantes et du garnissage des biofiltres, avant et après fonctionnement, ont été réalisées par pyroséquençage 454 de l'ADNr 16S. Le

nombre totale de séquences analysées (727 séquences analysées par échantillon, soit 17 448 séquences au total) est modeste en comparaison de celui utilisé dans d'autres études, compris le plus souvent entre un millier et plusieurs dizaines de milliers de séquences (Roesch *et al.*, 2007 ; Will *et al.*, 2010 ; Singleton *et al.*, 2011). Néanmoins, il reste conséquent au regard de ceux utilisés jusqu'à présent pour les analyses de diversité réalisées par la technique de clonage-séquençage dans les bioprocédés, de l'ordre de 100 à 200 clones (Sakano et Kerkhof, 1998 ; Bramucci *et al.*, 2003 ; Kabelitz *et al.*, 2009 ; Kristiansen *et al.*, 2011). Il permet de répondre à notre objectif qui est d'avoir une vision d'ensemble des taxons majoritaires constituant la diversité bactérienne dans les biofiltres végétalisés.

La très grande majorité des espèces bactériennes n'ayant pas été caractérisée taxonomiquement, l'analyse de la diversité est donc basée sur les OTU. Ces unités sont construites par regroupement des séquences similaires après comparaison par alignement, selon un degré défini de similarité, ce qui permet de délimiter des groupes taxonomiques monophylétiques. Le choix du seuil de similarité a été réalisé à partir des courbes de raréfactions basées sur l'indice de richesse estimée (S_{chao1}) (figure III.10). Une augmentation du seuil de similarité conduit à une surestimation de la richesse car elle tient compte des phylotypes rares, dont la présence peut être amplifiée par les erreurs de séquençage (Liu *et al.*, 2007). Un compromis permettant de conserver une profondeur d'échantillonnage maximale tout en minimisant la surestimation est nécessaire. Kunin *et al.* (2010) ont déterminé qu'un seuil ≤ 97% permet d'éviter cette surestimation pour des études visant un niveau taxonomique très fin (niveau espèce). Dans notre cas, un seuil de similarité de 90%, correspondant au niveau taxonomique du genre, semble suffisant pour être en mesure d'observer des différences de structures entre les échantillons. Il permet d'obtenir un taux de recouvrement de 83% conférant une vision relativement large de la diversité. De plus, les courbes de la figure III.10 montrent que la richesse estimée est proche de l'asymptote au seuil de 90% similarité. Ce seuil de 90% de similarité a donc été choisi pour les analyses de richesse et de diversité de la communauté bactérienne totale des biofiltres végétalisés.

Les résultats de l'étude quantitative de la communauté bactérienne totale ont été analysés d'un point de vue temporel en comparant la diversité observée à T_0 à celle relevée en fin d'expérimentation. Ils ont également été examinés d'un point de vue

spatial afin de déterminer si la diversité de la microflore présentait une stratification longitudinale dans les biofiltres après fonctionnement.

La diversité des différents échantillons a été analysée en termes de richesse spécifique, exprimée ici en nombre d'OTU, ainsi qu'en tenant compte de l'abondance relative des OTU avec le calcul de l'indice de Shannon. Le choix de cet indice est pertinent car il permet de ne pas sous-estimer les espèces (OTU) faiblement représentées. Ce point est particulièrement important dans notre étude puisqu'environ 30% des OTU présentent une fréquence inférieure à 5 OTU sur les 24 échantillons. Cela signifie qu'une proportion élevée de phylotypes rares a été détectée malgré le seuil de similarité choisi (relativement bas). Les faibles concentrations en TEX utilisées, impliquant une pression de sélection limitée, peuvent expliquer ce phénomène.

Evolution temporelle de la diversité de la communauté bactérienne totale

Les résultats de l'analyse qualitative de la communauté bactérienne totale à T_0 ont révélé que la motte contenait une microflore plus riche et diversifiée que le garnissage (figure III.11). Cette différence, moins marquée que pour la densité bactérienne, peut également être expliquée par la disponibilité et la variété des ressources nutritives dans ces deux types de matériaux.

Après 50 jours de fonctionnement, dans la motte, aucune modification de la richesse et de la diversité n'a été observée (figures III.11 et III.12). Ce résultat suppose que les conditions de ressources nutritives ont peu varié dans cette zone au cours de l'expérimentation permettant ainsi le maintien du niveau de diversité initial.

Au niveau du garnissage, une augmentation globale d'environ 20 à 25% de la richesse a été mise en évidence. L'indice de Shannon est également plus élevé d'environ 7%. L'augmentation des ressources carbonées, liée au passage de l'air pollué, ainsi que l'apports d'engrais et l'irrigation, favorisant la diffusion et la disponibilité des ressources nutritives, peuvent être à l'origine de ce résultat (Cabrol *et al.*, 2011).

Stratification de la diversité de la communauté bactérienne totale

L'analyse statistique globale a révélé une importante variabilité au niveau des échantillons ce qui rend difficile la mise en évidence de différences significatives, en termes de richesse et de structure, entre chaque section de colonne des biofiltres.

Toutefois, elle a permis de distinguer deux zones de garnissage (figure III.16) ; l'une regroupant des échantillons provenant des hauteurs où la dégradation des TEX est observée (= zone active) et l'autre regroupant les échantillons des hauteurs où la dégradation des TEX n'a pas été mise en évidence car la totalité des composés est dégradée en amont (= zone inactive). De plus, les zones actives pour la dégradation des TEX présentent une richesse observée et une diversité (indice de Shannon) significativement plus faible que les zones inactives. Une stratification de la diversité a déjà été observée au sein de biofiltre lors du traitement de COV (Khammar *et al.*, 2005 ; Cabrol *et al.,* 2012). Cette stratification est généralement liée à la biodégradabilité et à la disponibilité des composés et deux cas peuvent être distingués. Lorsque les composés sont facilement biodégradables, l'augmentation de leur disponibilité s'accompagne d'une augmentation de la diversité bactérienne (Cabrol *et al.*, 2010). Par contre, dans le cas des composés toxiques, ou plus récalcitrants à la dégradation, la diversité bactérienne observée est plus faible (Bayle *et al.*, 2009), ce qui peut s'expliquer par le développement d'une microflore spécifique des composés à dégrader. Dans notre étude, la concentration des composés ne peut pas être considérée comme toxique pour les microorganismes. En revanche, la faible disponibilité des TEX peut entraîner une sélection des bactéries capables de développer une affinité élevée pour ces composés.

Par ailleurs, dans les biofiltres de 40 cm, la diversité (en termes de richesse et d'abondance relative) tend à augmenter davantage en s'éloignant de l'entrée du gaz (figures III.11 et III.12). La proximité de la motte et des racines des plantes pourrait jouer un rôle trophique favorisant le développement d'une microflore plus riche et diversifiée. Cependant, ce phénomène n'est pas observé dans les biofiltres de 20 cm de hauteur, ce qui indique que le passage de l'air et la concentration en TEX disponible ont un impact plus important que la motte et/ou la plante et limitent la diversité de la communauté bactérienne se développant dans le garnissage.

Approche taxonomique

La diversité de la communauté bactérienne totale des biofiltres végétalisés a également été étudiée selon l'approche taxonomique (figure III.13). Cette approche n'a pas permis de mettre en évidence des variations statistiquement significatives entre les communautés initiale et finale, ni en fonction de la hauteur des biofiltres. Par contre, elle

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

a permis de recenser les bactéries capables de se développer au sein des biofiltres végétalisés.

Une importante diversité de phylums bactériens a été observée puisque 24 phylums ont été détectés. Parmi eux, 4 phylums dominent largement ; les *Proteobacteria*, les *Actinobacteria*, les *Acidobacteria* et les *Bacteroidetes*. Les *Proteobacteria* sont les plus représentées et notamment la classe des *Alphaproteobacteria*, suivie par les *Betaproteobacteria*, les *Gammaproteobacteria* et les *Deltaproteobacteria*. Ces 4 phylums, ainsi que les *Gemmatimonadetes*, les *Firmicutes* et les *TM7*, détectés à des abondances relatives supérieures à 1% dans nos biofiltres, sont fréquemment retrouvés dans les environnements contaminés par des BTEX ou des HAP, tels que les sols (Hendrickx *et al*., 2006 ; Kim et Jeon, 2009 ; Kabelitz *et al.*, 2009 ; Singleton *et al*., 2011) ou les eaux (Alfreider et Vogt, 2007 ; Chang *et al*., 2007). Dans une moindre mesure, les phylums *Chloroflexi*, *Fibrobacteres*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* et *Elusimicrobia* ont également été trouvés dans les biofiltres végétalisés.

Parmi les genres bactériens identifiés à des fréquences relatives supérieures ou égales à 1%, une majorité d'entre eux est connue pour leur capacité à dégrader les BTEX. Il s'agit des genres *Sphingomonas* et *Xanthobacter* pour les *Alphaproteobacteria* (Junca et Pieper, 2003 ; Cao *et al*., 2009 ; Chikere *et al.*, 2011), *Burkholderia* pour les *Betaproteobacteria* (Hendrickx *et al.*, 2006 ; Sipila *et al*., 2008 ; Parales *et al*., 2008), *Mycobacterium* pour les *Actinobacteria* (Cavalca *et al.,* 2004 ; Chikere *et al*., 2011), *GP1* et *GP3* pour les *Acidobacteria* (Sipila *et al.*, 2008 ; Xie *et al.*, 2011), ainsi que le groupe des *TM7* (Kabelitz *et al*., 2009 ; Luo *et al*., 2009 ; Xie *et al.*, 2011).

Malgré l'absence de différence significative de la distribution de ces genres bactériens dans les biofiltres que ce soit d'un point de vue temporel ou spatial, le groupe des *TM7* présente une évolution particulièrement intéressante. Ce groupe bactérien est assez peu connu, il serait relativement proche des *Chloroflexi* (Rappé et Giovannoni, 2003). Des bactéries appartenant à ce groupe ont été retrouvées dans divers environnements terrestres et aquatiques ainsi que dans la salive humaine (Hugenholtz *et al*., 2001). Elles ont également été identifiées dans des boues activées (Hugenholtz *et al.*, 2001 ; Bayle, 2005). Des études plus récentes ont mis en évidence les capacités des *TM7* à dégrader le toluène (Luo *et al.,* 2009) et le benzène (Xie *et al*., 2011) dans les sols. Dans les biofiltres végétalisés, l'abondance relative très faible des *TM7* dans le garnissage (0,2%) à T_0 a été

multipliée par 10 en moyenne après 50 jours de fonctionnement. La répartition longitudinale de ce groupe montre que cette augmentation est plus élevée en partie basse des biofiltres, à proximité de l'entrée du gaz (figure III.15). Il y a donc un enrichissement des *TM7* dans les zones actives des biofiltres, sans doute lié à la présence des TEX. Cette hypothèse est appuyée par les différences constatées entre les réacteurs D et C. En effet, leur fréquence est plus élevée dans les réacteurs D, notamment dans la zone active pour la dégradation des TEX où la quantité de polluants dégradée est largement supérieure. Les *TM7* sont donc probablement des acteurs importants de la dégradation des TEX dans les biofiltres végétalisés.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

5. Conclusion

Ce chapitre a permis de démontrer les potentialités du biofiltre végétalisé pour traiter des concentrations de TEX représentatives de celles rencontrées dans les PSC avec un EBRT inférieur à 4 s. Cette étude est la première à montrer la possibilité de traiter les TEX à très faibles concentrations par biofiltration, avec un EBRT aussi court. Il est donc possible à la fois d'augmenter les volumes d'air traités par les biofiltres végétalisés et de réduire l'épaisseur de garnissage.

De plus, un taux d'élimination supérieur à 98% a été observé en seulement 10 cm de hauteur de garnissage, suggérant que les limites du système n'ont pas été atteintes. En diminuant davantage l'EBRT, le maintien des performances épuratoires pourrait être observé. Il serait donc intéressant d'évaluer les possibilités d'augmenter davantage les volumes d'air traités par les biofiltres végétalisés et/ou de réduire encore l'épaisseur de garnissage.

La caractérisation de la microflore a permis de mettre en évidence que les bactéries indigènes des biofiltres sont capables de s'acclimater rapidement aux conditions fonctionnement et d'assimiler les TEX comme sources de carbone et d'énergie.

Une augmentation de la densité bactérienne a été constatée, notamment dans les zones actives pour la dégradation des BTEX, ce qui indique que les concentrations utilisées favorisent la croissance de la biomasse. La présence de la motte et de la plante contribue probablement à la croissance bactérienne dans les zones inactives mais également dans les zones actives lorsqu'elles sont situées à proximité.

Une augmentation de la richesse et de la diversité de la communauté bactérienne totale a également été constatée après 50 jours de fonctionnement, particulièrement dans les zones inactives. Cela suggère que la dégradation des TEX à faibles concentrations nécessite l'intervention de bactéries présentant une forte affinité pour ces composés. Le groupe des *TM7* a été proposé comme un des acteurs possibles de cette dégradation. Ces résultats indiquent également que les conditions opératoires des biofiltres végétalisés induisent vraisemblablement des modifications profondes sur des genres faiblement représentés.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

CHAPITRE IV. FONCTIONNEMENT DU BIOFILTRE VÉGÉTALISÉ EN CONDITIONS RÉELLES : ÉTUDE DU MUR VÉGÉTALISÉ BIOFILTRANT DU CELP

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

1. INTRODUCTION 190

2. MATERIELS ET METHODES 192

2.1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL *IN SITU* 192

2.1.1. Principe du mur végétalisé biofiltrant 192

2.1.2. Caractéristiques du site du Centre d'Echanges de Lyon Perrache (CELP) 193

2.2. PARAMETRES OPERATOIRES MESURES 195

2.2.1. Analyses de l'air 195

2.2.2. Température 197

2.2.3. Vitesse de l'air 197

2.2.4. Taux d'humidité de l'air 197

2.2.4. Taux d'humidité du garnissage 197

2.3. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES 197

2.3.1. Campagnes et stratégie d'échantillonnage 197

2.3.2. Etude fonctionnelle des communautés microbiennes 199

2.3.3. Etude quantitative de la communauté dénitrifiante par PCR quantitative ciblant les gènes nirK et nosZ 199

2.4. ANALYSES STATISTIQUES 201

3. RESULTATS 202

3.1. ETUDE DE LA MICROFLORE DU MUR VEGETALISE AVANT LA MISE EN ROUTE DE LA BIOFILTRATION ... 202

3.1.1. Influence de l'espèce végétale sur le fonctionnement des communautés microbiennes 202

3.1.2. Influence des variations saisonnières sur le fonctionnement des communautés microbiennes et la densité des dénitrifiants 204

3.1.2.1. Etude fonctionnelle des communautés microbiennes en fonction de la saison 204

3.1.2.2. Densité de la communauté bactérienne dénitrifiante en fonction de la saison 206

3.2. FONCTIONNEMENT DU MUR VEGETALISE BIOFILTRANT DU CELP 208

3.2.1. Caractérisation de l'air à traiter 208

3.2.1.1. Identification des familles de COV présentes dans l'air du parking du CELP 208

3.2.1.2 Quantification des BTEX dans l'air du parking du CELP 210

3.2.2. Capacités d'abattement du mur végétalisé biofiltrant du CELP 211

3.2.2.1. Mesures qualitatives de l'abattement des COV par le mur végétalisé biofiltrant 211

3.2.2.2. Mesures quantitatives de l'abattement des BTEX par le mur végétalisé biofiltrant 212

4. DISCUSSION 214

4.1. INFLUENCE DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES SUR LE FONCTIONNEMENT DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DU MUR VEGETALISE AVANT LA MISE EN ROUTE DE LA BIOFILTRATION 214

4.1.1. Influence de l'espèce végétale sur le fonctionnement des communautés microbiennes du mur végétalisé *214*
4.1.2. Influence des variations saisonnières sur le fonctionnement des communautés microbiennes du mur végétalisé *216*
4.2. FONCTIONNEMENT DU MUR VEGETALISE BIOFILTRANT DU CELP 217
4.2.1. Caractérisation de l'effluent gazeux à traiter : qualité de l'air du parking du CELP *217*
4.2.2. Performances épuratoires du biofiltre végétalisé en conditions réelles de fonctionnement *218*
5. CONCLUSION 220

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

1. Introduction

Dans les chapitres précédents, l'amélioration de la compréhension du fonctionnement du biofiltre végétalisé a été basée sur la mise en œuvre d'une unité pilote de laboratoire. Cette approche a permis de déterminer les performances épuratoires de ce système dans des conditions maîtrisées mais néanmoins réalistes au regard des concentrations en polluants retrouvées dans les PSC.

Si les performances atteintes au laboratoire laissent supposer que le biofiltre végétalisé est un dispositif efficace pour le traitement de l'air issu de PSC avant son rejet dans l'atmosphère, l'évaluation *in situ* de ce procédé innovant est indispensable pour valider ces résultats.

En conditions réelles de fonctionnement, de nombreux paramètres peuvent influencer les performances épuratoires. Un biofiltre sur site est soumis aux fluctuations des conditions climatiques, particulièrement la température qui peut avoir un impact à la fois sur la solubilité des polluants (Kraakman *et al.*, 2011) et sur l'activité des communautés microbiennes se développant au sein du garnissage (Darlington *et al.*, 2001 ; Delhoménie et Heitz, 2005).

L'air pollué des PSC est composé d'un mélange de polluants bien plus complexe que l'effluent gazeux synthétique généré au laboratoire (Chapitre I, page 43). Des différences importantes de performances épuratoires sont généralement observées lors du traitement de mélange de composés (Corsi et Seed, 1995 ; Lee et Cho, 2009 ; Chan et Lai, 2010). Elles sont essentiellement liées aux interactions positives ou négatives entre les composés et les microorganismes, tels que le cométabolisme ou les phénomènes d'inhibitions, qui peuvent entrainer la dégradation préférentielle de certains composés (Chapitre I, page 66). Elles sont également liées à la présence et à l'activité de microorganismes aux capacités épuratoires diverses.

La présence d'un couvert végétal plus ou moins dense et diversifié peut également influencer la densité, la composition et l'activité des communautés microbiennes dans les sols, notamment via les exsudations racinaires (Patra *et al.*, 2006 ; Lamb *et al.*, 2011).

Ce dernier chapitre repose sur l'étude d'un mur végétalisé biofiltrant installé depuis 2007 sur le site expérimental du CELP. Ce travail constitue la première étude consacrée au fonctionnement du biofiltre végétalisé en conditions réelles.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Dans un premier temps, le mur végétalisé a fait l'objet d'un suivi microbiologique avant la mise en route du système d'alimentation en air afin de déterminer dans quelle mesure le couvert végétal et les variations saisonnières sont susceptibles de modifier l'activité des microorganismes se développant au sein du garnissage. L'étude fonctionnelle de la communauté microbienne hétérotrophe totale et de la communauté dénitrifiante a été réalisée par des mesures d'activités potentielles de respiration et de dénitrification. La capacité à dégrader les NOx parmi les microorganismes présents a également été recherchée par l'étude quantitative de la communauté dénitrifiante, réalisée par PCR en temps réel (qPCR) en ciblant deux gènes spécifiques de la dénitrification : *nirK* et *nosZ*.

Dans un second temps, environ un an après la mise en fonctionnement du système d'alimentation en air pollué provenant du parking du CELP, des analyses quantitatives (BTEX) et qualitatives (COV totaux) de l'air ont été réalisées dans le parking et en sortie du biofiltre. Cette démarche visait à connaître la composition des émissions gazeuses dans le parking du CELP et à évaluer les performances épuratoires du biofiltre végétalisé.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

2. Matériels et méthodes

2.1. Dispositif expérimental *in situ*

2.1.1. Principe du mur végétalisé biofiltrant

Le mur végétalisé biofiltrant a été conçu et développé par l'entreprise Canevaflor®. Il fait l'objet de plusieurs brevets aux niveaux national et international. La vocation première de ce dispositif est d'être esthétique et décoratif. Il permet de créer de nouveaux espaces végétalisés en centre ville et ainsi d'augmenter la biodiversité et la qualité de vie des citadins. Dans le but d'améliorer la qualité de l'air urbain, l'utilisation de ce mur végétalisé en tant que biofiltre a été envisagée.

Sa structure autoportante est constituée de gabions électro soudés en acier galvanisé superposables qui forment, une fois assemblés, un mur continu (figure IV.1). L'ensemble est recouvert d'une toile imputrescible assurant la retenue du garnissage du mur. Un réseau d'irrigation est installé au cœur du mur, il est piloté par une armoire contenant un programmateur et une série d'électrovannes permettant d'ajuster l'irrigation et la fertilisation des différentes zones du mur. Le mur est rempli d'un garnissage spécifique (Canevaflor®, Tarare, France), principalement composé de fibre de coco et de perlite, contenant un engrais retard (Chapitre II, partie 2, page 112). Ce garnissage sert de support de plantation.

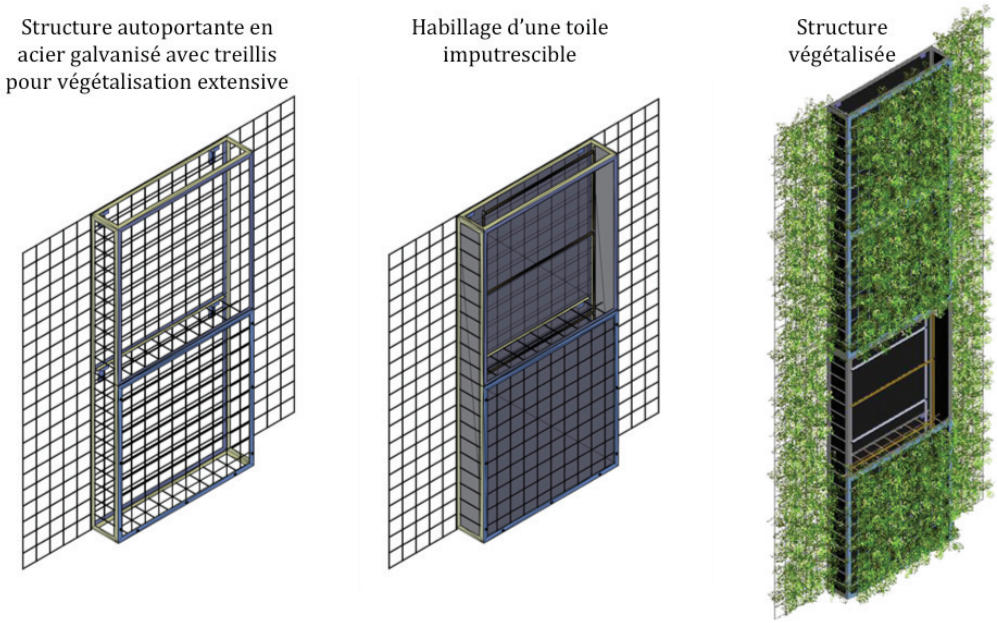


Figure IV.1. Structure d'un mur végétalisé Canevaflor® combinant végétalisation intensive et extensive (grille latérale pour le développement de végétaux grimpants) (Source : Canevaflor®).

Une large palette végétale peut-être utilisée en fonction de l'emplacement géographique et de l'orientation du mur. Il s'agit principalement des plantes vivaces choisies pour leur rusticité et leur esthétique et non en raison de leurs capacités éventuelles d'épuration de l'air. Elles sont associées en mélange de façon à créer des jeux de volumes et de couleurs (figure IV.2).

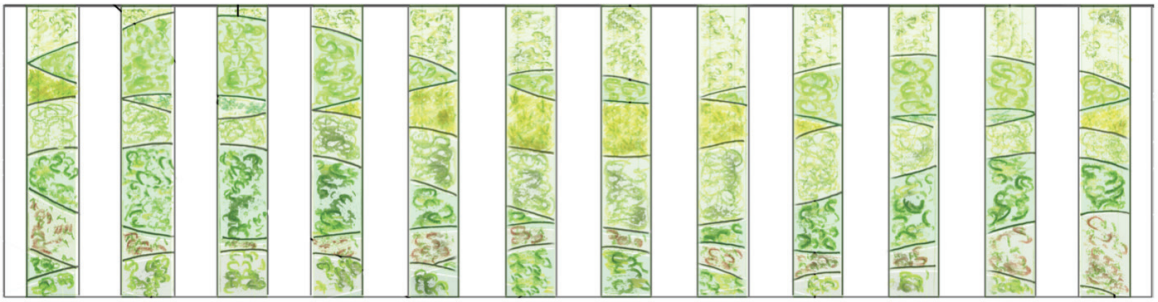


Figure IV.2. Plan de plantation initial des 12 colonnes du mur végétalisé biofiltrant du CELP (Source : Canevaflor®).

Le système d'acheminement de l'air à traiter est situé sur la face arrière du mur (face non végétalisée), contre le mur d'origine, et force le passage de l'air dans le sens horizontal à travers le mur végétal (figure IV.3). Ce procédé est considéré comme expérimental dans la mesure où les performances épuratoires n'ont jamais été quantifiées dans de telles conditions de fonctionnement.

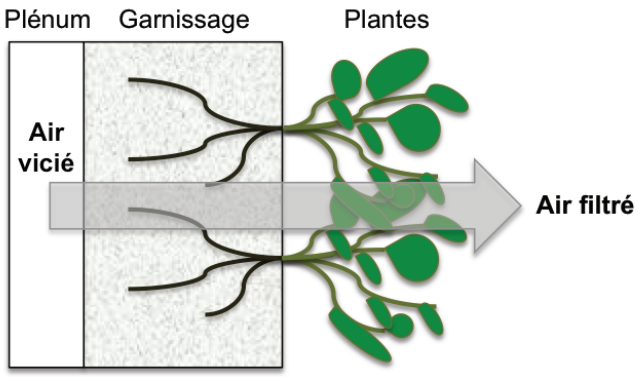


Figure IV.3. Schéma de principe du fonctionnement du mur végétalisé biofiltrant.

2.1.2. Caractéristiques du site du Centre d'Echanges de Lyon Perrache (CELP)

Le parking du CELP comporte 3 niveaux disposés en superstructure et compte 890 places de stationnements. Il ne possède pas de système mécanique d'extraction d'air puisqu'il comporte de larges ouvertures sur les façades est et ouest, considérées comme suffisantes pour garantir le renouvellement de l'air à l'intérieur du parking. Les locaux

techniques de l'exploitant (EIFIA) ne sont pas situés dans le parking mais dans le CELP, au niveau de la gare routière.

Le mur végétalisé Canevaflor® du CELP a été installé début décembre 2007 sur la commande du Grand Lyon. Il est situé sur la façade du pilier sud-ouest du CELP (figure IV.3). Ce pilier cylindrique creux est une des rampes d'accès au parking du CELP.

Le mur se présente en 12 colonnes individualisées réparties de manière égale sur la façade du pilier. Chaque colonne mesure 12 m de haut, 1 m de large et 40 cm d'épaisseur (figure IV.4). Elles portent, de part et d'autre, des grilles de 50 cm de large sur toute leur hauteur, permettant un développement de végétaux grimpant. La surface du mur est de 230 m². Avec 144 m² de grille latérale, la surface totale végétalisée est de 374 m².

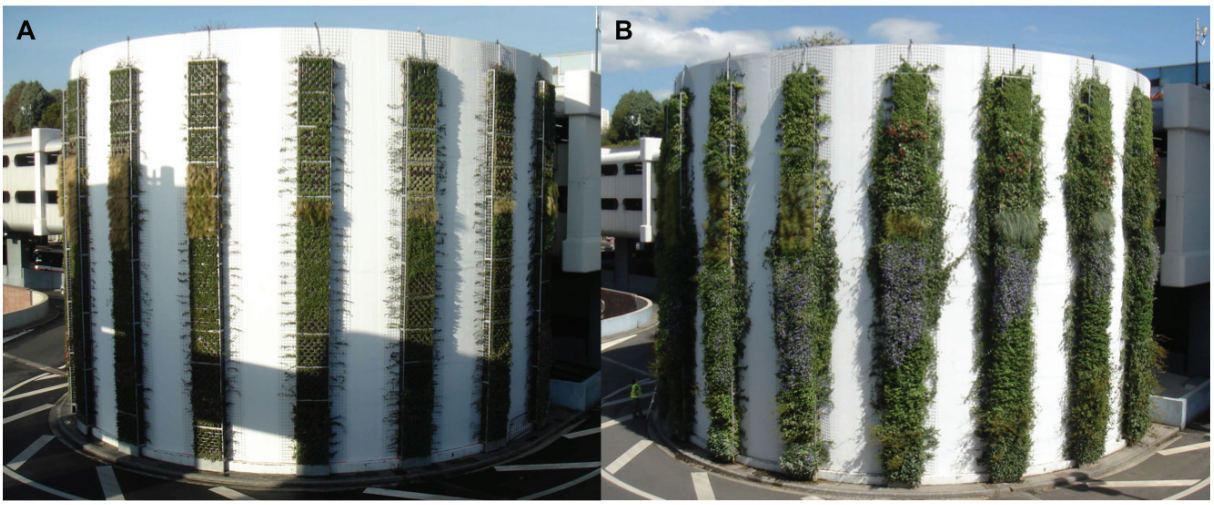


Figure IV.4. Photographies du mur végétalisé biofiltrant du CELP à la plantation en décembre 2007 (A) et après reprise des végétaux en mai 2008 (B) (Source : Canevaflor®).

Vingt six espèces différentes sont implantées dans le mur, 8 espèces de plantes grimpantes sur les côtés des colonnes et 18 espèces vivaces sur la face des colonnes. Selon les colonnes, ces végétaux sont disposés en mélange ou en blocs mono-spécifiques. Le plan de plantation établi lors de la conception du mur végétalisé (figure IV.2) a évolué par la suite en fonction du développement des plantes et des entretiens.

Sur les 12 colonnes, 3 sont équipées du système de biofiltration et peuvent être alimentées par l'air provenant du parking (figure IV.5).

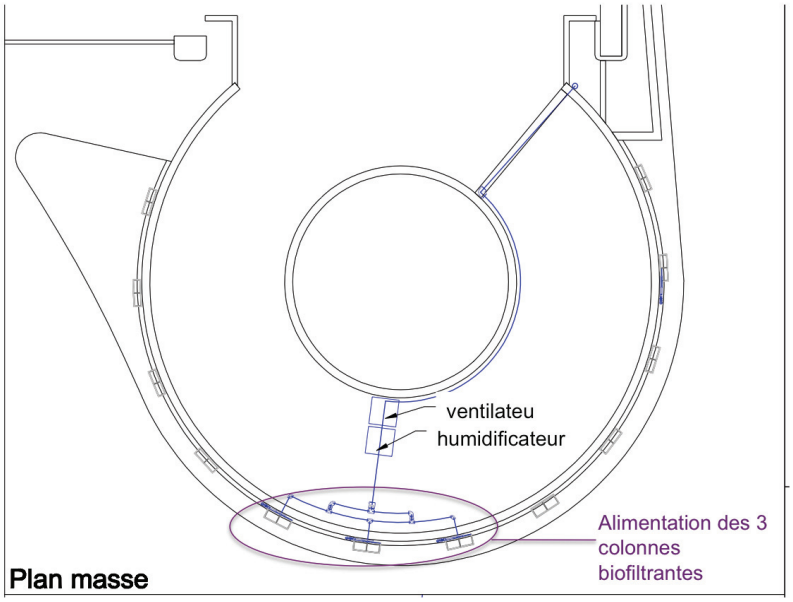


Figure IV.5. Plan de masse du cylindre du CELP équipé du mur végétalisé biofiltrant (Source : Canevaflor®).

Le système de biofiltration est composé d'un ventilateur positionné sur le toit du cylindre (figure IV.5). Le prélèvement de l'air à l'intérieur du parking est réalisé grâce à une canalisation dont l'entrée se situe dans la rampe d'accès au parking ce qui permet de collecter les gaz d'échappement des véhicules en phase d'accélération. Puis l'air extrait est humidifié de manière à garantir un taux d'humidité supérieur à 90%. L'air vicié humide est ensuite acheminé par des canalisations jusqu'aux plénums situés en face arrière du mur végétal et passe horizontalement à travers le garnissage à une vitesse de 100 $m.h^{-1}$ (figure IV.3).

2.2. Paramètres opératoires mesurés

2.2.1. Analyses de l'air

Les analyses de l'air du parking du CELP et en sortie du mur végétalisé biofiltrant ont été réalisées entre le 17 et le 20 avril 2012. Au niveau du parking, les prélèvements d'air ont été réalisés dans la rampe d'accès, près de la bouche d'aspiration du système d'alimentation du biofiltre. Au niveau du mur végétalisé, deux types de prélèvements ont été effectués :

- en sortie des colonnes biofiltrantes (sortie biofiltre),
- sur des colonnes non alimentées en air pollué de façon à mesurer les éventuelles émissions des plantes.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Pour ces prélèvements, un cône de mesure de débit d'air (cône K120, Kimo, France) a été utilisé afin de s'affranchir de l'atmosphère extérieure (figure IV.6). Ce cône était fixé directement sur la grille du mur végétalisé au minimum une heure avant de prélever l'air pour les analyses quantitatives et qualitatives. Il a également été utilisé pour mesurer la vitesse de l'air et l'hygrométrie en sortie du biofiltre.

Figure IV.6. Photographie du cône de prélèvement positionné sur le mur végétalisé.

Analyses quantitatives des BTEX

Les concentrations en BTEX ont été mesurées comme décrit dans le Chapitre II (partie 1, page 98). Ces mesures, ne pouvant pas être réalisées simultanément aux différents niveaux de prélèvement, ont été effectuées en alternance entre l'intérieur du parking et la sortie du mur biofiltrant. Elles ont été systématiquement répétées trois fois de manière à vérifier la reproductibilité des résultats obtenus.

Analyses qualitatives des COV

Les prélèvements d'air pour les analyses qualitatives des COV ont été réalisés dans des tubes adsorbants (Airtoxic, IRCE Lyon, France) fournis par l'IRCE Lyon. Ces tubes, remplis de trois couches d'adsorbants, permettent de piéger une large gamme de COV. L'analyse des composés piégés a été effectuée par l'IRCE Lyon selon la chaine analytique suivante : thermodésorption/chromatographie en phase gazeuse (GC)/spectrométrie de masse (MS), le gaz vecteur étant l'hélium (He). La thermodésorption est divisée en deux étapes après une purge de 2 min à température ambiante :

- une désorption primaire : 5 min à 280°C, débit He de 35 $mL.min^{-1}$
- une désorption secondaire : 3 min à 300°C, débit He de 15 $mL.min^{-1}$.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

La séparation des composés est réalisée en GC (colonne DB-VRX ; 60 m ; diamètre interne 250 µm ; épaisseur de film 1,4 µm). L'identification des composés est ensuite réalisée en MS (mode d'ionisation : impact électronique ; plage de masse : 19 – 300 u.m.a). Les résultats sont qualitatifs (présence/absence) et semi-quantitatifs (calcul de l'abondance relative des composés piégés).

Pour ces analyses un des tubes Airtoxic n'a pas été utilisé pour les prélèvements et constitue un « témoin blanc » permettant d'évaluer le nombre de composés susceptibles de constituer un bruit de fond dans les échantillons.

2.2.2. Température

La température ambiante a été mesurée durant la semaine de prélèvement comme décrit précédemment (Chapitre II, partie 2, page 114). Elle était en moyenne de 10°C et a varié entre 5°C et 15°C.

2.2.3. Vitesse de l'air

La vitesse de l'air a été mesurée à l'aide d'un anémomètre à fil chaud (VT100, Kimo, France). Elle est en moyenne de 102 ± 7 $m.h^{-1}$ en entrée de plénum et se maintient à cette vitesse en sortie du biofiltre. Ceci permet d'affirmer que l'air traverse bien le garnissage.

2.2.4. Taux d'humidité de l'air

Le taux d'humidité de l'air alimentant le mur végétalisé biofiltrant a été mesuré à l'aide d'un thermo-hygromètre électronique (HD100, Kimo, France). Il est en moyenne de 93% ce qui permet de valider le fonctionnement du système d'humidification d'air.

2.2.4. Taux d'humidité du garnissage

Le taux d'humidité du garnissage a été mesuré pour tous les échantillons prélevés comme cela est décrit dans le Chapitre II (partie 1, page 98).

2.3. Analyses microbiologiques

2.3.1. Campagnes et stratégie d'échantillonnage

Campagnes d'échantillonnage

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Trois campagnes d'échantillonnage ont été réalisées avant la mise en route du biofiltre végétalisé (tableau IV.1).

Dates de prélèvement	Plantes échantillonnées	Mesures d'activités	Gènes quantifiés	Objectif de la campagne d'échantillonnage
Printemps 2008	*Stipa tenuifolia, Convolvulus sabatius, Hypericum calycinum, Heuchera sp.* et *Stachys lanata*	SIR et DEA	aucun	Influence de l'espèce végétale sur le fonctionnement des communautés microbiennes
Printemps 2009	*Convolvulus sabatius* et *Hypericum calycinum*	SIR et DEA	*nirK* et *nosZ*	Influence de la saison sur les communautés microbiennes (densité et fonction)
Hiver 2010	*Convolvulus sabatius* et *Hypericum calycinum*	SIR et DEA	*nirK* et *nosZ*	

Tableau IV.1. Résumé des différentes campagnes d'échantillonnage réalisées pour les analyses microbiologiques du mur végétalisé du CELP avant la mise en route de la biofiltration.

La première campagne d'échantillonnage a eu lieu au printemps 2008. Elle avait pour objectif d'étudier l'influence de l'espèce végétale sur le fonctionnement des communautés microbiennes se développant dans le garnissage. L'échantillonnage a porté sur cinq espèces végétales : *Stipa tenuifolia, Convolvulus sabatius*, *Hypericum calycinum*, 2 espèces d'*Heuchera* (considéré ici comme *Heuchera sp.*), et *Stachys lanata* (tableau IV.1). Le choix de ces espèces a été conditionné par l'état des plantes par rapport à l'ensemble du mur et la présence de l'espèce dans le plus grand nombre de colonnes. Elles étaient réparties sur 9 des 12 colonnes du mur végétalisé et positionnées entre 1 et 9 m de hauteur de façon équivalente d'une colonne à l'autre.

Les deux campagnes suivantes avaient pour objectif d'étudier l'influence des variations saisonnières (printemps 2009 et hiver 2010) sur les communautés microbiennes. Deux espèces de plantes (choisies en fonction des résultats obtenus lors de la première campagne de mesure du printemps 2008 et de l'évolution du plan de plantation) ont été échantillonnées. Elles étaient réparties sur 6 colonnes, entre 4 et 7 m de hauteur.

Stratégie d'échantillonnage

Les échantillons de garnissage (environ 20 g) ont été prélevés aux pieds de chaque espèce de plante, à proximité de la rhizosphère mais en dehors de la motte. Ces échantillons ont ensuite été stockés à 4°C quelques jours avant leur utilisation pour les mesures d'activités, puis conservés à -20°C en vue des analyses moléculaires.

2.3.2. Etude fonctionnelle des communautés microbiennes

Les analyses microbiologiques ont été réalisées à partir des échantillons prélevés lors des trois campagnes d'échantillonnage. Les mesures d'activités potentielles de respiration (SIR) et de dénitrification (DEA) ont été effectuées selon le protocole précédemment décrit (Chapitre II, partie 1, page 98).

2.3.3. Etude quantitative de la communauté dénitrifiante par PCR quantitative ciblant les gènes nirK et nosZ

Extraction et dosage de l'ADN métagénomique

L'extraction et le dosage de l'ADN métagénomique extrait des échantillons de garnissage ont été réalisés comme précédemment (Chapitre III, page 143).

Gènes ciblés : nirK et nosZ

Le gène *nirK* est l'un des deux gènes codant la nitrite réductase responsable de la réduction des nitrites (NO_2^-) en oxyde nitrique (NO) (Chapitre I, page 85). A lui seul, il ne permet donc pas de couvrir l'ensemble de la communauté dénitrifiante mais il est spécifique aux bactéries dénitrifiantes ce qui en fait une cible de choix pour la quantification de ces bactéries.

Le gène *nosZ* code l'oxyde nitreux réductase responsable de la réduction de l'oxyde nitreux (N_2O) en diazote (N_2) (Chapitre I, page 86). Toutes les bactéries dénitrifiantes ne possèdent pas ce gène mais il permet d'accéder aux bactéries capables de réaliser la dernière étape de la dénitrification correspondant à la dégradation totale des NOx et aboutissant à la formation du N_2.

Amorces utilisées

Les couples d'amorces permettant l'amplification des gènes ciblés sont présentés dans le tableau IV.2.

Nom des amorces	Séquences	Taille du fragment attendu	Références
NIR K 876 NIR K 1040	5' ATYGGCGGVCAYGGCGA 3' 5' GCCTCGATCAGRTTRTGGTT 3'	165 pb	Henry *et al.*, 2004
nosZ2-F nosZ2-R	5' CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT 3' 5' CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA 3'	266 pb	Henry *et al.*, 2006

Tableau IV.2. Séquences des amorces utilisées pour la qPCR ciblant les gènes *nirK* et *nosZ*.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

qPCR ciblant les gènes nirK et nosZ

Les qPCR ciblant les gènes *nirK* et *nosZ* ont été réalisées au moyen du kit « QuantiTech SYBR® Green PCR » (QUIAGEN, France). Les mélanges réactionnels utilisés pour les deux gènes sont présentés dans le tableau IV.3.

Gène ciblé	***nirK***	***nosZ***
Master Mix SYBR Green (2X)	10 µL	12,5 µL
Amorces	1 µM de chaque	1 µM de chaque
T4 gene protein 32 (Qbiogen, France)	400 ng	100 ng
ADN métagénomique	5 ng	5 ng
Eau DNAse free	qsp 20 µL	qsp 25 µL
Volume final	20 µL	25 µL

Tableau IV.3. Conditions réactionnelles des qPCR sur les gènes *nirK* et *nosZ*.

Le thermocycler utilisé est un LightCycler® LC480 (Roche Applied Science, USA). Les programmes d'amplification sont présentés dans le tableau IV.4.

Une gamme standard de 10^7 à 10^2 copies de chaque gène par tube a été réalisée. Pour le gène *nirK*, elle a été réalisée à partir d'un clone purifié portant un plasmide contenant un fragment de 164 pb du gène *nirK* de *Sinorhizobium meliloti 1021*. Pour le gène *nosZ*, elle a été réalisée à partir de l'ADN génomique de *Pseudomonas aeruginosa PA14* extrait à l'aide du kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Allemagne).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Gène ciblé	*nirK*	*nosZ*
Activation initiale	15 min à 95°C	10 min à 95°C
5 cycles		
Dénaturation	15 s à 95°C	15 s à 95°C
Hybridation	30 s à 63°C Avec diminution de 1°C par cycle	30 s à 68°C Avec diminution de 1°C par cycle
Elongation	30 s à 72°C	30 s à 72°C
50 cycles		
Dénaturation	15 s à 95°C	15 s à 95°C
Hybridation	30 s à 58°C	30 s à 63°C
Elongation	30 s à 72°C	30 s à 72°C
Courbe de fusion (vérification de la spécificité de l'amplification du gène ciblé)	15 s à 95°C	15 s à 95°C
	20 s à 68°C	20 s à 60°C
	5 min gradient de 68°C à 98°C	5 min gradient de 60°C à 95°C

Tableau IV.4. Programme d'amplification des qPCR sur les gènes *nirK* et *nosZ*.

Tous les échantillons et points des gammes ont été dupliqués. Les résultats de quantification des standards ont montré une efficacité supérieure à 90% et un taux d'erreur inférieur à 2% pour tous les échantillons.

2.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données issues des mesures d'activités, de densité bactérienne et de concentration en BTEX ont été effectuées à l'aide du logiciel R V.2.6.2. La normalité et l'homoscédasticité n'étant pas vérifiées lors des tests de Shapiro-Wilk et de Bartlett, les comparaisons des moyennes obtenues ont été réalisées par des analyses de variance basées sur le test de Kruskal-Wallis (non paramétrique). Le seuil de rejet du risque α (seuil de signification) a été fixé à 5%.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

3. Résultats

3.1. Etude de la microflore du mur végétalisé avant la mise en route de la biofiltration

3.1.1. Influence de l'espèce végétale sur le fonctionnement des communautés microbiennes

Activité potentielle de respiration : SIR

La figure IV.7 présente les activités potentielles de respiration (SIR) mesurées pour les échantillons de garnissage prélevés sous les cinq espèces de plantes choisies. Cette mesure permet d'évaluer la biomasse et l'état physiologique de la communauté microbienne hétérotrophe totale. Les moyennes et écarts-types ont été calculés pour chaque espèce.

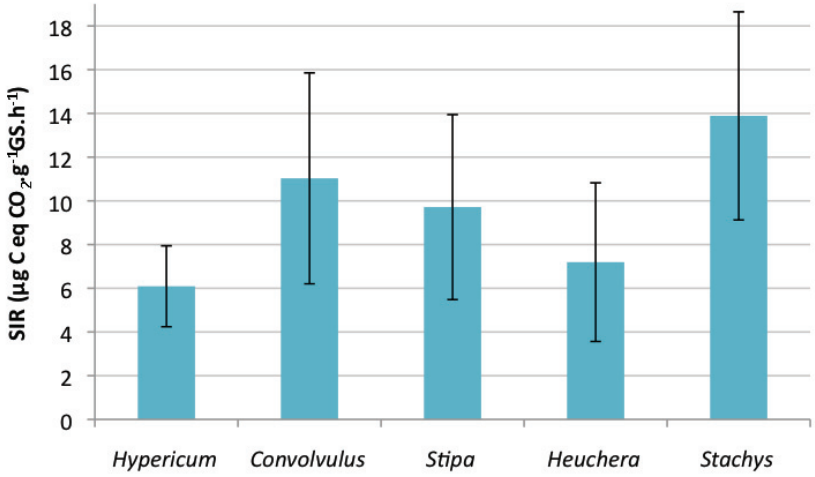


Figure IV.7. Activité potentielle de respiration (SIR) exprimée en µg de carbone équivalent CO_2 par g de garnissage sec et par heure (µg C eq $CO_2.g^{-1}GS.h^{-1}$) en fonction de l'espèce végétale échantillonnée. Les valeurs correspondent à la moyenne obtenue pour chaque espèce. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 27).

Pour chaque espèce végétale, une variabilité importante des valeurs de SIR est observée. Néanmoins, des différences statistiquement significatives de l'activité potentielle de respiration sont détectées en fonction de l'espèce végétale présente. La communauté microbienne hétérotrophe se développant à proximité des racines des *Stachys* présente une SIR deux fois plus élevée que celle située sous les *Hypericum* et les *Heuchera* ($p < 10^{-8}$). Sous les *Convolvulus* la communauté microbienne hétérotrophe montre également une SIR près de deux fois supérieure à celle mesurée dans les échantillons prélevés sous les *Hypericum* ($p < 0,01$). Ces résultats semblent montrer que

la plante (espèce végétale) peut moduler l'activité de la communauté microbienne hétérotrophe. L'activité des microorganismes associés à ces différentes plantes peut donc être classée comme suit :

(*Stachys* ≥ *Convolvulus* = *Stipa*) >> *Heuchera* = *Hypericum*

Activité potentielle de dénitrification : DEA

La figure IV.8 présente les activités potentielles de dénitrification (DEA) mesurées pour les échantillons de garnissage prélevés sous les cinq espèces de plantes choisies. Cette mesure permet d'observer la présence éventuelle d'une communauté dénitrifiante et donc d'évaluer le potentiel de dégradation des NOx par le biofiltre. Les moyennes et écarts-types ont été calculés pour chaque espèce.

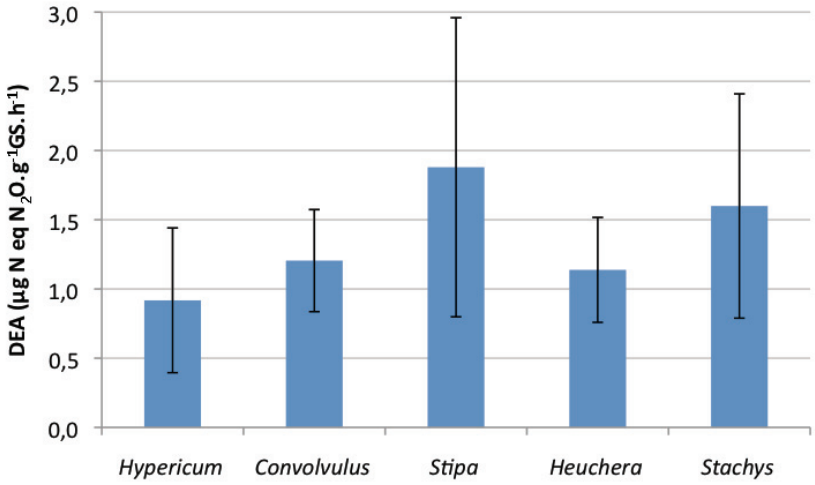


Figure IV.8. Activité potentielle de dénitrification (DEA) exprimée en µg d'azote équivalent N_2O par g de garnissage sec et par heure (µg N eq $N_2O.g^{-1}GS.h^{-1}$) en fonction de l'espèce végétale échantillonnée. Les valeurs correspondent à la moyenne obtenue pour chaque espèce. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 27).

Une importante variabilité est également observée pour chaque espèce végétale. Toutefois, des différences statistiquement significatives ont été mises en évidence en fonction de l'espèce végétale. L'activité potentielle de dénitrification est significativement plus élevée à proximité des racines des *Stachys* et des *Stipa* que sous les autres espèces ($p < 0,01$). Sous les *Hypericum* la DEA est significativement plus faible que sous les *Convolvulus* et les *Heuchera* ($p < 0,01$). Comme pour la SIR, un classement peut être suggéré en considérant l'effet positif de la plante sur l'activité potentielle de la communauté dénitrifiante :

Stipa = *Stachys* >> *Convolvulus* = *Heuchera* > *Hypericum*

Relation entre les activités microbiennes

La figure IV.9 montre les ratios (exprimés en pourcentage) des valeurs de DEA sur les valeurs de SIR en fonction de l'espèce végétale échantillonnée.

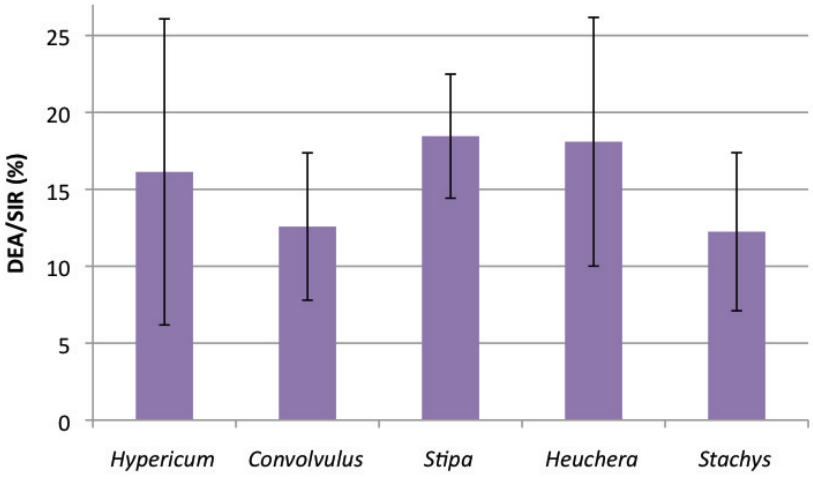


Figure IV.9. Ratios (%) de la DEA sur la SIR en fonction de l'espèce végétale sous laquelle ont été prélevés les échantillons. Les valeurs correspondent à la moyenne obtenue pour chaque espèce. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 27).

Le ratio DEA/SIR est significativement plus faible à proximité des racines des *Stachys* et des *Convolvulus* que sous les *Stipa* et les *Heuchera* ($p < 0,03$). La comparaison des moyennes obtenues sur les échantillons prélevés sous les autres espèces ne montre pas de différences significatives.

3.1.2. Influence des variations saisonnières sur le fonctionnement des communautés microbiennes et la densité des dénitrifiants

3.1.2.1. Etude fonctionnelle des communautés microbiennes en fonction de la saison

Afin d'étudier l'impact des variations saisonnières sur les communautés microbiennes se développant dans le garnissage du mur végétalisé biofiltrant, les activités potentielles de respiration (SIR) et de dénitrification (DEA) ont été mesurées dans les échantillons prélevés à proximité des racines d'*Hypericum calycinum* et de *Convolvulus sabatius* au printemps 2009 et durant l'hiver 2010.

Activité potentielle de respiration : SIR

La figure IV.10 présente les moyennes des activités potentielles de respiration (SIR) mesurées dans les échantillons prélevés sous les deux espèces de plantes en fonction de la saison (printemps 2009/hiver 2010).

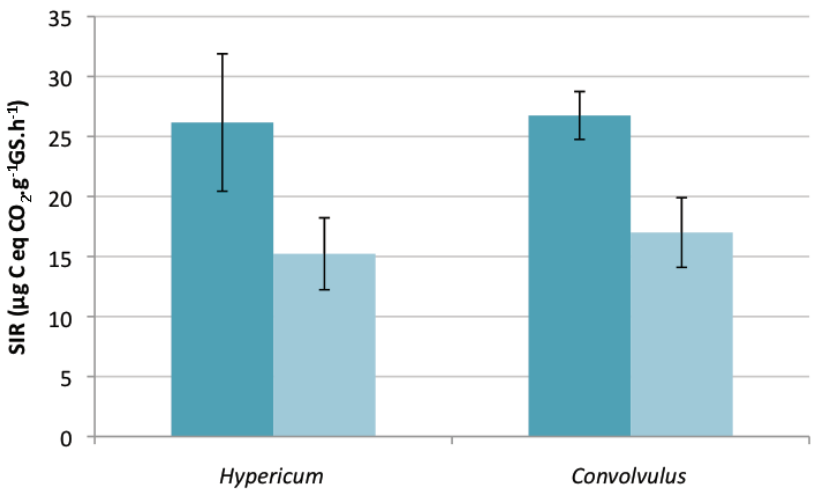


Figure IV.10. Activité potentielle de respiration (SIR) moyenne exprimée en µg de carbone équivalent CO_2 par g de garnissage sec et par heure (µg C eq $CO_2.g^{-1}GS.h^{-1}$) sous les deux espèces végétales échantillonnées en fonction de la saison (barres foncées : printemps 2009 et barres claires : hiver 2010). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 18).

Aucune différence statistiquement significative n'a été détectée entre les deux espèces végétales échantillonnées. En revanche, la SIR est significativement plus élevée (d'environ 60%) au printemps qu'en hiver ($p < 10^{-5}$).

Activité potentielle de dénitrification : DEA

La figure IV.11 présente les activités potentielles de dénitrification (DEA) mesurées sous les deux espèces de plantes échantillonnées en fonction de la saison (printemps 2009/hiver 2010).

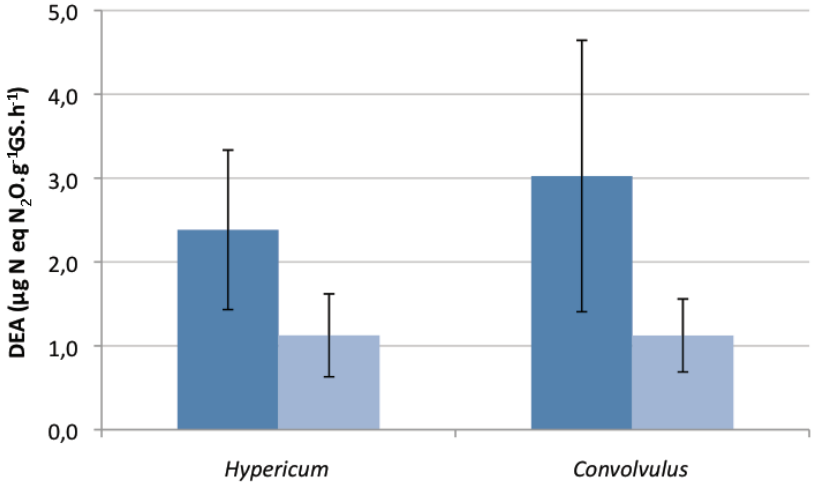


Figure IV.11. Activité potentielle de dénitrification (DEA) moyenne exprimée en µg d'azote équivalent N_2O par g de garnissage sec et par heure (µg N eq $N_2O.g^{-1}GS.h^{-1}$) sous les deux espèces végétales échantillonnées en fonction de la saison (barres foncées : printemps 2009 et barres claires : hivers2010). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 18).

Aucune différence statistiquement significative n'a été détectée entre les deux espèces végétales échantillonnées. En revanche, comme cela a été observé pour la SIR, la DEA varie de façon significative en fonction de la saison, elle est en moyenne 2,5 fois plus élevée au printemps qu'en hiver ($p < 10^{-3}$).

Relation entre les activités microbiennes

La figure IV.12 montre les ratios (exprimés en pourcentage) des valeurs de DEA sur les valeurs de SIR pour les deux espèces végétales échantillonnées et en fonction de la saison.

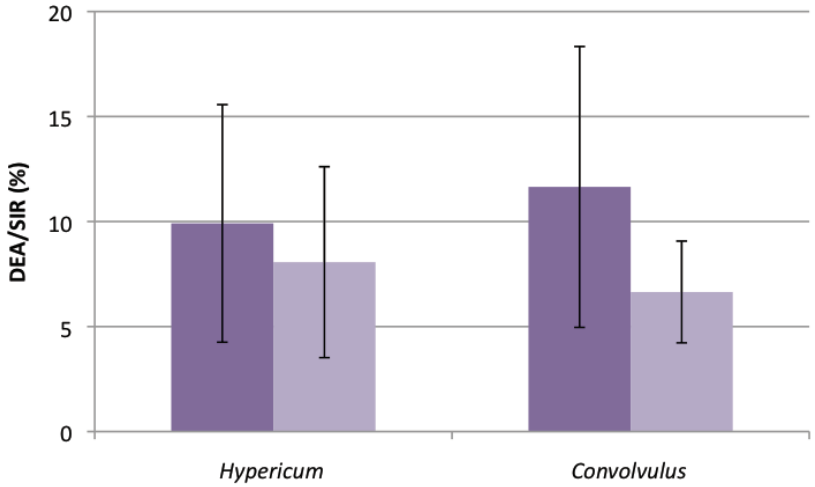


Figure IV.12. Ratios (%) de la DEA sur la SIR sous les deux espèces végétales échantillonnées en fonction de la saison (barres foncées : printemps 2009 et barres claires : hiver 2010). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 18).

Les ratios ne sont pas statistiquement différents en fonction de l'espèce végétale sous laquelle ont été prélevés les échantillons, ni en fonction de la saison. Néanmoins, l'écart entre les ratios printemps/hiver semble plus important sous les *Convolvulus*.

3.1.2.2. Densité de la communauté bactérienne dénitrifiante en fonction de la saison

La densité de la communauté bactérienne dénitrifiante a été mesurée par qPCR ciblant les gènes *nirK* et *nosZ*, codant respectivement la nitrite réductase et l'oxyde nitreux réductase.

Densité des bactéries capables de dégrader le $N0_2$: quantification du gène nirK

La figure IV.13 présente la densité des bactéries capables de réduire le NO_2 en N0, mesurée en quantifiant le gène *nirK* par qPCR. Les moyennes ont été calculées pour les

échantillons prélevés sous chaque espèce de plante échantillonnée, en fonction de la saison (printemps / hiver).

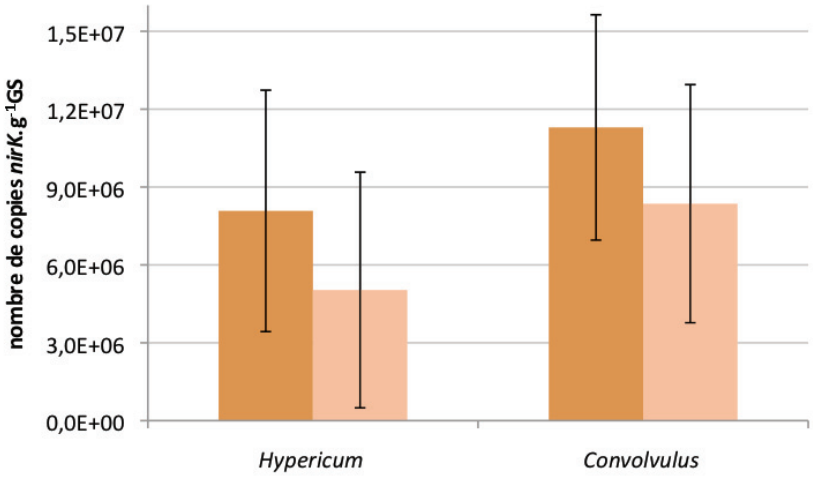


Figure IV.13. Densité moyenne des bactéries capables de dégrader le NO_2 (nombre de copies *nirK*.g^{-1}GS) quantifiée par qPCR sur le gène *nirK* sous les deux espèces végétales échantillonnées en fonction de la saison (barres foncées : printemps 2009 et barres claires : hiver 2010). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 18).

Le nombre de copies du gène *nirK* par g de garnissage sec ne varie pas de façon significative en fonction de la saison. La densité des bactéries capables de dégrader le NO_2 n'est donc pas différente entre le printemps et l'hiver.

En revanche, la densité des bactéries dénitrifiantes possédant le gène *nirK* est significativement plus élevée à proximité des racines des *Convolvulus* que sous les *Hypericum* quelle que soit la saison considérée ($p = 0,03$).

Densité des bactéries capables de dégrader le N_2O : quantification du gène nosZ

La figure IV.14 présente la densité des bactéries capables de réduire le N_2O en N_2, mesurée par qPCR sur le gène *nosZ*. Les moyennes ont été calculées pour les échantillons prélevés sous les deux espèces végétales échantillonnées, en fonction de la saison (printemps / hiver).

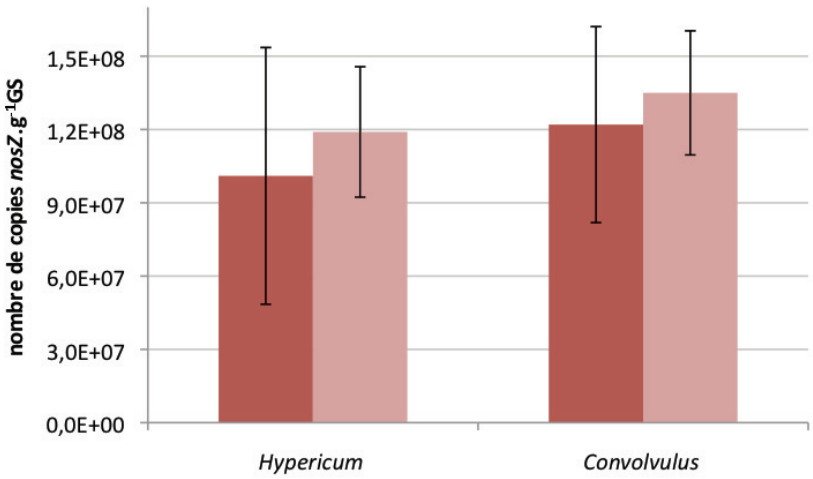


Figure IV.14. Densité moyenne des bactéries capables de dégrader le N_2O (nombre de copies *nos*.g^{-1}GS) quantifiée par qPCR sur le gène *nosZ* sous les deux espèces végétales échantillonnées en fonction de la saison (barres foncées : printemps 2009 et barres claires : hivers 2010). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 18).

Le nombre de copies du gène *nosZ* par g de garnissage sec ne varie pas de façon significative en fonction de la saison. La densité des bactéries capables de dégrader le N_2O n'est donc pas différente entre le printemps et l'hiver.

Bien que les résultats semblent légèrement plus élevés à proximité des racines des *Convolvulus* que sous les *Hypericum*, cette différence n'est pas significative.

3.2. Fonctionnement du mur végétalisé biofiltrant du CELP

Les analyses de l'air ont été réalisées par des mesures qualitatives et semi-quantitatives des COV (GC-MS) et par des mesures quantitatives des BTEX uniquement (GC-FID).

3.2.1. Caractérisation de l'air à traiter

L'air à traiter a été caractérisé à partir des échantillons d'air prélevés dans la rampe d'accès au parking (niveau 3).

3.2.1.1. Identification des familles de COV présentes dans l'air du parking du CELP

La composition en COV de l'air du parking du CELP a été approchée de façon qualitative et semi-quantitative. Pour plus de lisibilité, les composés identifiés ont été regroupés par famille chimique. Le tableau IV.5 présente les abondances relatives (%) de chaque famille de composés ainsi que le nombre de composés identifiés (richesse) par famille pour chaque prélèvement. Afin d'approcher la composition journalière

globale de l'air du parking, l'abondance relative moyenne calculée sur la base des quatre prélèvements d'air ainsi que le nombre de composés identifiés par famille figurent également dans le tableau ci-dessous. Ces résultats tiennent compte des composés n'ayant pas pu être séparés (mélange hydrocarbures) ou identifiés (composés non identifiés).

Familles de composés	Abondances relatives (%) / *Richesse (nombre de composés)*				Abondances relatives moyennes (%)	*Richesse (nombre de composés)*
	8h30	13h	17h30	18h45		
Alcènes	ND	ND	ND	3,9 / *8*	**1,0 ± 2,0**	***8***
Acides	8,9 / *1*	ND	26,1 / *1*	ND	**8,8 ± 12,3**	***1***
Halogénés	ND	ND	0,8 / *1*	1,5 / *1*	**0,6 ± 0,7**	***2***
Aldéhydes	5,8 / *4*	14,3 / *3*	6,9 / *4*	3,9 / *5*	**7,7 ± 4,6**	***6***
Ethers	ND	2,4 / *1*	ND	ND	**0,6 ± 1,2**	***1***
Cétones	ND	ND	1,5 / *1*	2,2 / *1*	**0,9 ± 1,1**	***2***
Alcanes	4,8 / *5*	10,4 / *5*	15,0 / *8*	24,1 / *22*	**13,6 ± 8,2**	***27***
Terpènes	0,7 / *1*	ND	2,0 / *1*	0,9 / *1*	**0,9 ± 0,8**	***1***
Alcools	ND	1,6 / *1*	0,3 / *1*	2,2 / *1*	**1,0 ± 1,1**	***2***
Aromatiques	24,1 / *6*	31,4 / *5*	28,6 / *8*	36,1 / *12*	**30,0 ± 5,0**	***13***
Composés non identifiés	11,4 / *14*	40,0 / *11*	14,1 / *24*	5,6 / *24*	**17,8 ± 15,2**	***52***
Mélanges hydrocarbures	44,3 / *4*	ND	4,9 / *1*	19,5 / *6*	**17,2 ± 19,9**	***7***
Richesse totale	***35***	***26***	***50***	***81***		***126***

Tableau IV.5. Abondances relatives (%) et richesse (nombre de composés) des familles de COV retrouvées dans le parking du CELP correspondant aux 4 prélèvements d'air réalisés à différents moments de la journée. La moyenne journalière des abondances relatives et de la richesse sont présentées pour chaque famille. ND : famille Non Détectée.

Une importante variabilité est observée entre les prélèvements. Les prélèvements effectués en fin de journée présentent une richesse plus élevée que ceux réalisés en début ou milieu de journée.

Un nombre total de 126 composés a été recensé dans l'air du parking, dont 59 n'ont pas pu être identifiés. Les 67 composés identifiés sont répartis en 10 familles. Les alcanes et les aromatiques sont les familles dominantes avec 27 et 13 composés respectivement. En termes d'abondances relatives ces deux familles représentent en

moyenne 13,6% (alcanes) et 30% (aromatiques) de la masse totale des composés piégés.

3.2.1.2 Quantification des BTEX dans l'air du parking du CELP

La figure IV.15 présente l'évolution des concentrations en BTEX dans l'air du parking du CELP entre le mardi 17 et le vendredi 20 avril 2012.

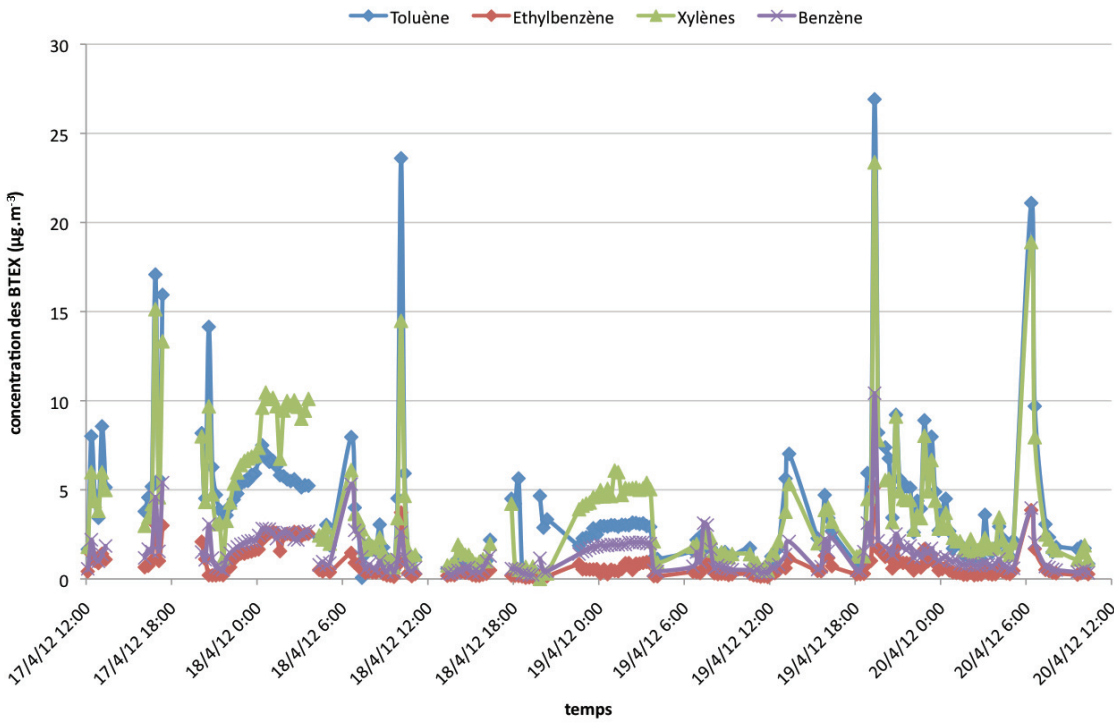


Figure IV.15. Evolution de la concentration des BTEX (µg.m^{-3}) dans l'air du parking du CELP entre le mardi 17 et le vendredi 20 avril 2012.

Ces résultats montrent que l'évolution de la concentration des BTEX est similaire quel que soit le composé considéré. Les concentrations sont très variables au cours du temps, notamment durant la journée où des pics de concentrations pouvant atteindre 15 à 25 µg.m^{-3} sont enregistrés pour le toluène et les xylènes.

Les concentrations du toluène et des xylènes sont globalement identiques (pas de différence significative). Les concentrations de ces deux composés sont significativement plus élevées que celle du benzène ($p < 0,01$) et de l'éthylbenzène ($p < 10^{-4}$). Pour ces deux derniers composés, la concentration du benzène est significativement plus élevée que celle de l'éthylbenzène ($p < 0,01$). Les concentrations respectives des BTEX peuvent donc être classées dans l'ordre suivant :

Toluène = Xylènes > Benzène > Ethylbenzène

3.2.2. Capacités d'abattement du mur végétalisé biofiltrant du CELP

3.2.2.1. Mesures qualitatives de l'abattement des COV par le mur végétalisé biofiltrant

Les mesures qualitatives des COV ont été réalisées en entrée (parking) et en sortie du biofiltre, ainsi qu'au niveau d'une colonne non alimentée en air pollué afin d'estimer les éventuelles émissions de ces composés par les plantes (témoin plante). Le tableau IV.6 présente le nombre de composés éliminés par le biofiltre ainsi que le nombre total de composés détectés (richesse) au cours de la semaine d'expérimentation pour chaque niveau de prélèvement, soit pour 4 prélèvements à l'intérieur du parking, 3 prélèvements en sortie de biofiltre et 3 prélèvements « témoin plante ». Les résultats du « témoin blanc » (correspondant au bruit de fond détecté dans le tube Airtoxic n'ayant pas été utilisé pour les prélèvements) sont présentés à part.

Familles de composés	Richesse (nombre de composés)				Nombre de composés éliminés
	parking	Sortie biofiltre	Témoin plante	Témoin blanc	
Alcènes	8	1	1	1	**8**
Acides	1	1	ND	ND	**0**
Halogénés	2	1	1	1	**2**
Aldéhydes	6	6	8	4	**1**
Ethers	1	ND	ND	ND	**1**
Cétones	2	5	1	1	**1**
Alcanes	27	4	1	1	**22**
Terpènes	1	5	5	ND	**0**
Alcools	2	1	ND	2	**0**
Aromatiques	13	8	4	1	**8**
Azote	ND	1	ND	ND	**0**
Composés non identifiés	52	15	8	ND	**47**
Mélanges hydrocarbures	7	4	2	4	**3**
Richesse totale	***126***	***56***	***35***	***16***	***93***

Tableau IV.6. Nombre de composés éliminés par le mur végétalisé biofiltant et richesse (nombre de composés) de chaque famille de composés identifiés en entrée (parking) et en sortie du mur végétalisé biofiltrant. Témoin plante : résultats obtenus au niveau des plantes (hors alimentation en air pollué). Témoin blanc : bruit de fond détecté dans le tube Airtoxic n'ayant pas été utilisé lors des prélèvements. ND : famille Non Détectée.

Ces résultats montrent que 93 des 126 composés détectés dans le parking ne sont pas retrouvés en sortie du biofiltre. Le nombre de composés détectés en sortie de biofiltre est significativement plus faible que dans le parking ($p = 0,04$). Environ 74% des composés détectés dans l'air du parking sont donc éliminés par le biofiltre. Les alcènes et les halogénés sont complètement éliminés. Les aromatiques, les alcanes et les composés non identifiés sont éliminés à 60%, 80% et 90% respectivement.

Il est important de souligner que certains composés sont effectivement émis par la végétation, notamment des terpènes. Dans cette famille de composés, l'alpha-pinène, le béta-myrcène, le camphène, le limonène et l'eucalyptol ont été détectés. Le limonène est le seul terpène à avoir été retrouvé également dans le parking.

3.2.2.2. Mesures quantitatives de l'abattement des BTEX par le mur végétalisé biofiltrant

La figure IV.16 présente l'évolution de la concentration globale des BTEX en sortie du biofiltre végétalisé par rapport à celle de l'air du parking du CELP entre le mardi 17 et le vendredi 20 avril 2012.

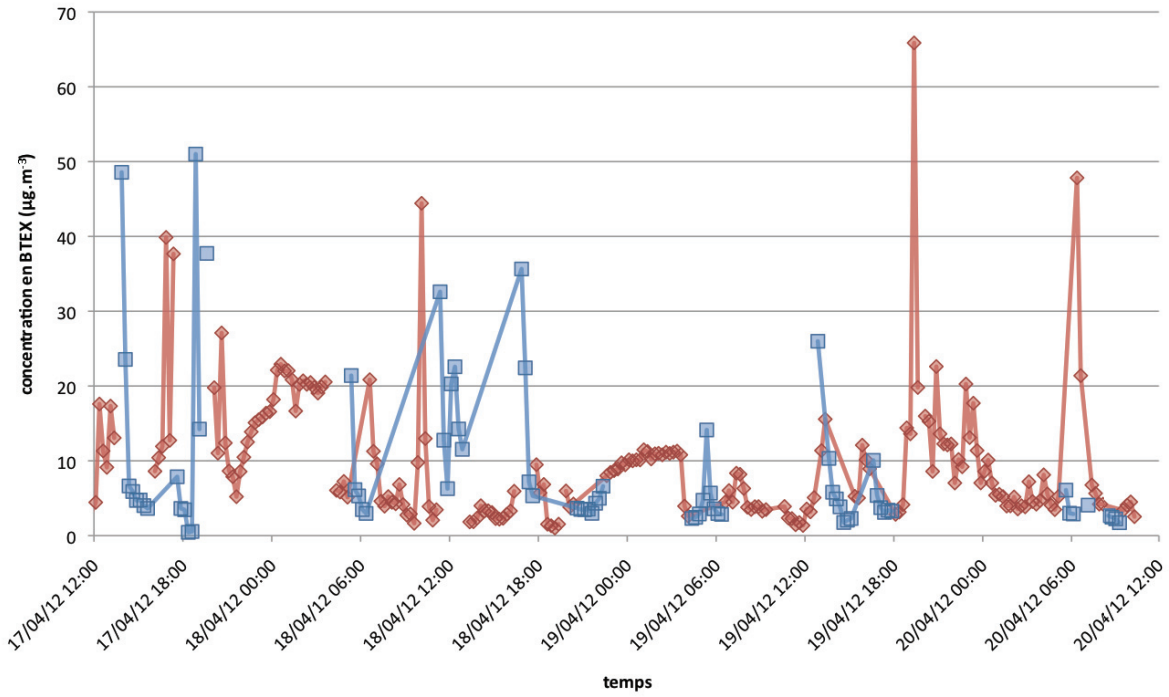


Figure IV.16. Evolution de la concentration en BTEX ($\mu g.m^{-3}$) en sortie du mur végétalisé biofiltrant (carrés bleus) par rapport à l'air du parking du CELP (losange rouge) entre le mardi 17 et le vendredi 20 avril 2012.

Aucune différence significative n'est détectée entre les concentrations en BTEX mesurées en entrée (parking) et en sortie de biofiltre. D'importantes variations de la concentration des BTEX sont observées au cours du temps.

Malgré la grande variabilité observée (Figure IV.16), la concentration de chacun des BTEX a été moyennée sur la durée totale de la campagne d'analyses pour les trois niveaux de prélèvement d'air : parking, sortie de biofiltre et « témoin plante » (Figure IV.17). L'objectif de cette figure est de donner une idée de la quantité moyenne de BTEX retrouvée aux différents niveaux de prélèvement entre le 17 et le 20 avril 2012.

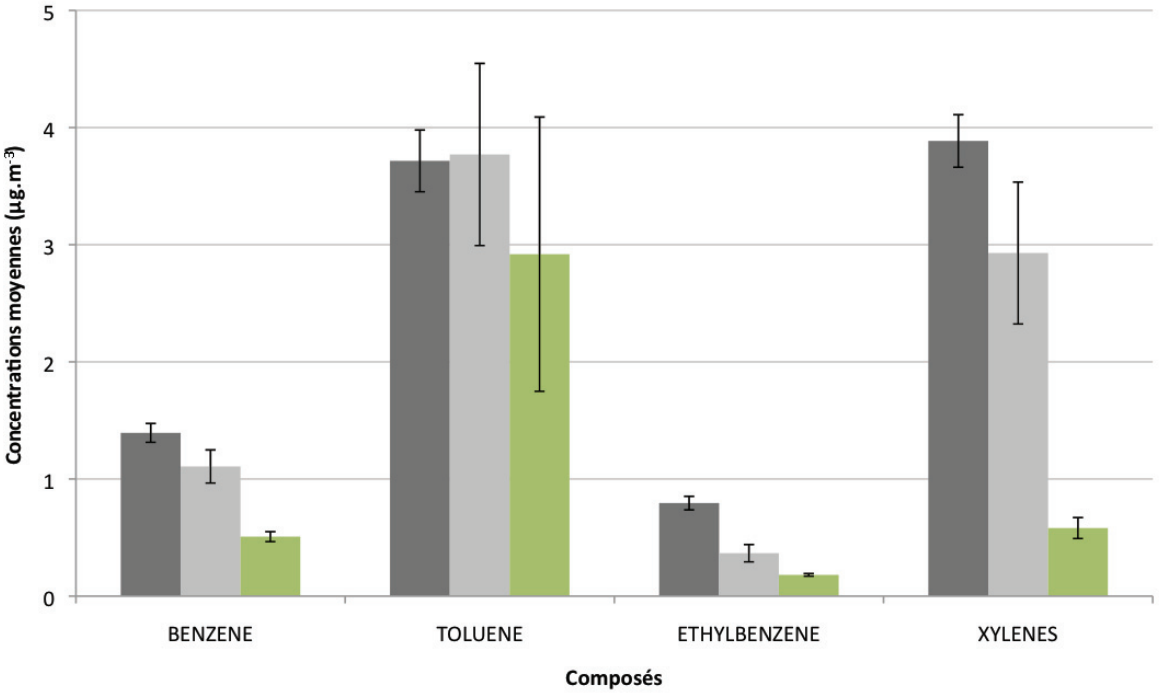


Figure IV.17. Concentrations moyennes des BTEX (µg.m^{-3}) entre le 17 et le 20 avril 2012 dans l'air du parking du CELP (barres gris foncé), en sortie du mur végétalisé biofiltrant (barres gris clair) et au niveau de la colonne « témoin plante » (barres vert clair). Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

L'importante variabilité des mesures ne permet pas de détecter de différence statistiquement significative entre les différents niveaux de prélèvement d'air. En revanche, les différences entre composés mises en évidence au niveau du parking (page 210) sont également visibles en sortie de biofiltre.

Concernant le « témoin plante », tous les BTEX sont détectés mais à des concentrations systématiquement plus faibles qu'aux autres niveaux de prélèvement, à l'exception du toluène. La concentration de ce dernier composé est effectivement similaire à celles retrouvées dans le parking ou en sortie de biofiltre.

4. Discussion

Le mur végétalisé biofiltrant du CELP constitue un dispositif expérimental d'échelle 1 permettant d'approcher le fonctionnement du biofiltre en conditions réelles.

La microflore se développant dans le garnissage du biofiltre a été étudiée avant la mise en route du système de biofiltration. Cette caractérisation microbiologique a pour objectifs d'étudier l'impact de l'espèce végétale et de la saisonnalité sur le fonctionnement et/ou la densité des communautés microbiennes. Ces deux paramètres opératoires, qui n'ont pas été suivis sur l'unité pilote au laboratoire, correspondent néanmoins à des paramètres clefs pour la compréhension du fonctionnement du biofiltre végétalisé.

Après la mise en route du système d'alimentation en air du biofiltre, les performances épuratoires du mur végétalisé biofiltrant ont été estimées. La composition de l'air du parking du CELP a tout d'abord été caractérisée avant d'évaluer, par des mesures qualitatives (COV) et quantitatives (BTEX), les capacités d'abattement du biofiltre végétalisé.

4.1. Influence des conditions environnementales sur le fonctionnement des communautés microbiennes du mur végétalisé avant la mise en route de la biofiltration

4.1.1. Influence de l'espèce végétale sur le fonctionnement des communautés microbiennes du mur végétalisé

De nombreux auteurs se sont intéressés à l'influence des plantes sur l'activité, la densité et la composition des communautés microbiennes rhizosphérique dans les sols (Patra *et al.*, 2006 ; Garbeva *et al.*, 2008 ; Berg et Smalla, 2009 ; Lamb *et al.*, 2011). Certaines espèces de végétaux sont en effet capables de sélectionner la microflore se développant au sein de la rhizosphère, notamment via l'exsudation racinaire (Macek *et al.*, 2000). Cette propriété est largement utilisée en phytoremédiation pour la dépollution des sols, les végétaux choisis pour leurs capacités épuratives fonctionnent généralement en association avec des microorganismes qui facilitent l'absorption et/ou détoxifient certaines molécules avant leur assimilation par les plantes (Chaudhry *et al.*, 2005 ; Rayu *et al.*, 2012).

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

Dans le cadre de la phytoremédiation de l'air, les études récentes soulignent le rôle prédominant des microorganismes contenus dans le support de culture des plantes (Kim *et al*., 2008b ; Burchett *et al*., 2009 ; Xu *et al*., 2010). Toutefois, peu d'études se sont focalisées sur la microflore des « plantes dépolluantes ».

Dans le cas du mur végétalisé, les *Stachys* et les *Convolvulus* sont significativement plus favorables au développement d'une biomasse hétérotrophe active que les autres espèces testées (figure IV.7). Plusieurs auteurs ont démontré l'impact de l'espèce végétale sur le fonctionnement microbien dans les sols (Kourtev *et al*., 2002 ; Garbeva *et al*., 2008 ; Lamb *et al*., 2011) mais aucune étude ciblant spécifiquement les plantes utilisées dans le mur végétalisé n'a été recensée.

En ce qui concerne la communauté bactérienne dénitrifiante, les *Stipa* et les *Stachys* ont un impact significativement plus favorable sur l'activité potentielle de dénitrification (DEA) que les trois autres espèces (figure IV.8). Les résultats obtenus semblent également révéler que l'espèce *Convolvulus sabatius* est favorable à l'activité potentielle de dénitrification alors qu'*Hypericum calycinum* paraît avoir un effet moins bénéfique sur l'activité potentielle des dénitrifiants. Patra *et al*. (2006) ont déjà montré que l'activité de la communauté dénitrifiante varie selon l'espèce végétale présente. L'abondance des bactéries constitue également un paramètre susceptible de conditionner les niveaux d'activités. Dans le cas du mur végétalisé du CELP, les mesures d'abondance de la communauté dénitrifiante en fonction de la saison (campagnes d'échantillonnage de 2009 et 2010) ont permis de mettre en évidence que la densité des bactéries possédant le gène *nirK* est effectivement plus faible sous les *Hypericum* que sous les *Convolvulus* (figure IV.13). Les activités microbiennes au sein du garnissage du mur végétalisé sont donc influencées par la nature du couvert végétal.

Les ratios DEA/SIR sont significativement moins élevés à proximité des racines des *Stachys* et des *Convolvulus* que sous les *Stipa* et les *Hypericum*. Bien que les *Stipa* se soient révélés parmi les deux espèces les plus favorables à la DEA, les espèces telles que *Stachys lanata* et *Convolvulus sabatius* permettent de favoriser davantage la DEA par rapport à la biomasse hétérotrophe totale dans le biofiltre végétalisé. Ces résultats montrent que l'effet de la plante est différent selon la communauté microbienne ciblée. Les deux dernières espèces citées pourraient être choisies pour favoriser la dégradation des NOx dans les biofiltres végétalisés.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

4.1.2. Influence des variations saisonnières sur le fonctionnement des communautés microbiennes du mur végétalisé

Sous nos latitudes, les conditions climatiques évoluent en fonction des saisons, notamment en termes de température. Ce paramètre a une forte influence sur les performances épuratoires des biofiltres car il conditionne l'activité des microorganismes et la solubilité des polluants (Delhoménie et Heitz, 2005 ; Kraakman *et al*., 2011). Le développement des végétaux est également affecté par la température et évolue en fonction des saisons. Les variations saisonnières de la température sont donc importantes à prendre en compte lors de la mise en œuvre de biofiltres végétalisés.

Au cours de cette étude, l'influence de la saison a été examinée entre le printemps 2009 et l'hiver 2010. Les températures moyennes observées durant ces deux périodes étaient respectivement de 18°C et -5°C. La SIR et la DEA sont significativement plus faibles en hiver qu'au printemps pour les deux plantes échantillonnées. Le même constat a déjà été fait dans les sols au sein desquels l'activité bactérienne diminue en hiver (Van Kessel *et al*., 1993 ; Nicolardot *et al*., 1994). Braker *et al*. (2010) ont montré que la diminution de la DEA dans des sols incubés à basse température (4°C) était accompagnée d'une baisse de la densité bactérienne (*nirK* et *nirS*). Dans le mur végétalisé, nous n'avons pas observé de variation quantitative des dénitrifiants en fonction de la saison (figures IV.13 et IV.14). La diminution de la DEA observée durant la saison hivernale serait donc plutôt liée à une altération du fonctionnement enzymatique. Les enzymes de la dénitrification sont en effet sensibles aux conditions environnementales. In vitro, la température optimale de fonctionnement de ces enzymes se situe autour de 30°C. Les variations du niveau d'activité potentielle de dénitrification peuvent donc être attribuées à un effet négatif des conditions climatiques (température) sur le métabolisme des bactéries dénitrifiantes. L'épaisseur relativement faible du garnissage (40 cm) ne suffit probablement pas à tamponner les variations de température contrairement à ce qui a pu être observé dans les sols à des profondeurs inférieures à 30 cm (Cannavo et al., 2004).

Ces résultats semblent indiquer que lors du fonctionnement du biofiltre végétalisé, les températures hivernales pourraient limiter les activités microbiennes et par conséquent les performances épuratoires. Toutefois, il est important de noter que la température de fonctionnement d'un biofiltre est principalement conditionnée par la

température de l'effluent gazeux (Fanlo, 2005). Dans le cas du CELP (parking ouvert), la température de l'air à traiter est sensiblement identique à la température extérieure. En revanche, la température dans un parking souterrain (fermé) en hiver est généralement plus élevée qu'à l'extérieur, de +12°C à +20°C (COPARLY, 2011b). L'air plus chaud de ces parkings pourrait donc permettre de conserver une température compatible avec les activités microbiennes au sein du garnissage et ainsi maintenir les performances épuratoires des biofiltres végétalisés durant l'hiver.

4.2. Fonctionnement du mur végétalisé biofiltrant du CELP

4.2.1. Caractérisation de l'effluent gazeux à traiter : qualité de l'air du parking du CELP

L'AFSSET a estimé en 2007 à plus de 275 le nombre de molécules différentes potentiellement émises par les véhicules à moteur dans les PSC. Cette estimation tient compte d'un certain nombre de famille de composés qui n'ont pas été mesurés dans notre étude, tels que les NOx, ou l'ozone par exemple. Dans l'air du parking du CELP, nous avons pu recenser 126 COV (tableau IV.5). Cette importante diversité traduit bien la complexité de l'effluent gazeux à traiter dans les conditions réelles de fonctionnement du biofiltre végétalisé. Les familles de COV majoritaires sont les alcanes et les composés aromatiques.

Des variations importantes du nombre de composés détectés ont été observées selon l'horaire de prélèvement (figure IV.15). Ce résultat est concordant avec la fréquentation du parking, dont l'affluence est concentrée entre 5h et 8h le matin et 17h et 20h le soir (EIFIA, communication personnelle). Contrairement aux conditions stables d'alimentation en air pollué que nous avons appliquées pour le fonctionnement de l'unité pilote (Chapitres II et III), le biofiltre végétalisé du CELP est donc amené à fonctionner dans des conditions de concentrations fluctuantes de l'effluent gazeux à traiter. Ce point est d'autant plus important qu'il est connu pour avoir un impact négatif sur le fonctionnement des procédés biologiques (Littlejohns et Daugulis, 2008 ; Rene *et al*., 2012).

La concentration en BTEX mesurée, de l'ordre de 10 $\mu g.m^{-3}$ en moyenne, est cohérente avec les résultats obtenus par le COPARLY (2010) pour ce même parking. Cette concentration en BTEX est relativement faible par rapport à celles relevées dans

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

des parkings souterrains ce qui peut s'expliquer par l'aération naturelle importante du parking du CELP. Pour des parkings souterrains lyonnais, tels que les parkings des Terreaux, du Gros Cailloux ou de la place Poncet par exemple, la concentration en BTEX est de l'ordre de 350 à 550 $\mu g.m^{-3}$ (COPARLY, 2010). Les performances épuratoires obtenues avec l'unité pilote de biofiltration, supérieures à 98% d'abattement pour des concentrations en TEX de 600 $\mu g.m^{-3}$, suggère qu'un biofiltre végétalisé pourrait être efficace pour traiter l'air issus de ce type de PSC.

4.2.2. Performances épuratoires du biofiltre végétalisé en conditions réelles de fonctionnement

D'un point de vue quantitatif, aucune différence statistiquement significative n'a été détectée entre l'entrée (parking) et la sortie du biofiltre végétalisé. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat :

- les très faibles concentrations en BTEX mesurées (entre 1 et 4 $\mu g.m^{-3}$ en moyenne pour chaque composé), proches du seuil de sensibilité du GC-FID utilisé (de l'ordre de 1 $\mu g.m^{-3}$),
- l'importante variabilité de la concentration en BTEX observée au cours du temps,
- l'alternance des mesures en entrée et en sortie du biofiltre (figure IV.16),
- les faibles températures enregistrées durant la période de prélèvement (10°C en moyenne) qui peuvent limiter les activités microbiennes responsables de la dégradation des composés.

D'un point de vue qualitatif, les mesures des COV en entrée et en sortie du biofiltre montrent que le nombre de composés détectés est significativement plus faible en sortie du biofiltre végétalisé. Plus de 70% des composés identifiés dans l'effluent gazeux à traiter n'ont pas été détectés en sortie de biofiltre. Il est difficile de déterminer si ces composés ont réellement été dégradés par les microorganismes ou s'ils ont seulement été adsorbés ou absorbés sur le garnissage humide. Les aldéhydes détectés en sortie du biofiltre, par exemple, pourraient être des sous-produits intermédiaires de la dégradation des alcanes, dont 80% des composés ne sont pas retrouvé en sortie du biofiltre. Néanmoins, les aldéhydes identifiés en sortie du biofiltre ont également été détectés dans l'air du parking. S'il n'est pas possible d'affirmer que ces composés sont

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

dégradés au sein du biofiltre sur la base de ces résultats, le biofiltre végétalisé semble tout de même capable d'éliminer une large gamme de COV.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

5. Conclusion

La caractérisation microbiologique du mur végétalisé avant la mise en route du système d'alimentation en air a permis de mettre en évidence le développement d'une microflore active au sein du garnissage. La présence d'une communauté bactérienne dénitrifiante potentiellement active a également été démontrée et le potentiel génétique nécessaire à la dégradation complète des NOx a été détecté.

L'espèce végétale a une influence sur le fonctionnement des communautés microbiennes se développant dans le garnissage et certaines plantes, comme *Stachys lanata*, *Stipa tenuifolia* et *Convolvulus sabatius,* favorisent de façon significative les activités potentielles de respiration et de dénitrification. Ces plantes pourraient donc être privilégiées lors de l'installation de murs végétalisés biofiltrants afin de favoriser la dégradation des NOx par le biofiltre végétalisé.

Les conditions climatiques conditionnent également le fonctionnement des microorganismes au sein du biofiltre. En hiver, les activités potentielles de respiration et de dénitrification sont fortement diminuées ce qui indique que les performances épuratoires du biofiltre végétalisé pourraient être plus faibles en hiver. Néanmoins la densité de la communauté bactérienne dénitrifiante n'est pas affectée par la baisse des températures ce qui laisse présager qu'une reprise du fonctionnement normal est possible lors de l'augmentation des températures.

Cette première étude du mur végétalisé biofiltrant en conditions réelles a permis d'apporter des éléments importants pour la compréhension du fonctionnement biologique du biofiltre végétalisé.

Les niveaux de pollutions retrouvés dans le parking du CELP n'ont pas permis de mesurer un abattement des BTEX. Une réduction de plus de 70% du nombre de composés détectés dans le parking a été observée en sortie de biofiltre. Ce résultat très encourageant semble indiquer que le biofiltre végétalisé pourrait être efficace pour l'élimination de nombreux composés. Il conviendrait néanmoins de vérifier la réelle dégradation de ces composés afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas seulement d'un déplacement de la pollution de l'air du parking vers le garnissage du biofiltre. Dans ce but, l'utilisation de composés marqués au carbone 13 (^{13}C) pourrait par exemple être envisagée.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat*.

La pollution atmosphérique a des répercutions dramatiques reconnues sur l'environnement et la santé humaine, notamment en ville. L'amélioration de la qualité de l'air urbain est une des priorités majeures pour les décennies à venir qui passera nécessairement par la mise en place de systèmes de traitement d'air efficaces, au plus près des sources de polluants. Le développement de procédés capables de filtrer l'air issus d'espaces urbains confinés, tels que les parcs de stationnement couverts, constitue une solution innovante permettant de répondre à cette problématique.

Pour traiter l'air issu de ces structures, caractérisé par des volumes importants contenant de faibles concentrations en polluants, la biofiltration est le procédé le plus adapté tant d'un point de vue technique que d'un point de vue économique (coûts d'investissement et de fonctionnement).

Les objectifs de cette thèse étaient d'évaluer les performances d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques issus d'environnements urbains confinés tels que les PSC. La compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique du biofiltre végétalisé ainsi que le rôle des différents acteurs intervenant dans la dégradation des polluants sont des impératifs indispensables pour assurer la maîtrise opérationnelle de ce bioprocédé novateur.

L'influence des paramètres opératoires, tels que la présence de plante, le taux d'humidité du garnissage, la fertilisation, et le débit d'air appliqué sur les performances du biofiltre végétalisé a été étudiée. Une meilleure connaissance de la microflore indigène du biofiltre a été acquise à travers la caractérisation fonctionnelle (respiration, dégradation des TEX et activité potentielle de dénitrification), quantitative (densité bactérienne) et qualitative (diversité bactérienne) des communautés bactériennes.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans le fonctionnement du biofiltre, ses capacités ont été évaluées à différents niveaux en s'appuyant sur le suivi expérimental d'une unité pilote d'échelle semi-industrielle permettant de reproduire au laboratoire des conditions de fonctionnement proche des conditions réelles.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat*.

Le biofiltre végétalisé est-il un procédé efficace pour traiter les TEX ?

Au cours de cette étude sur pilote, il a été montré qu'un biofiltre végétalisé est capable d'éliminer plus de 97% des TEX à faibles concentrations dans des conditions de fonctionnement standard (40 cm d'épaisseur de garnissage et vitesse de passage de 100m.h^{-1}).

→ Un biofiltre végétalisé est donc un dispositif efficace pour traiter des concentrations en polluants relativement faibles, telles que celles rencontrées dans les PSC.

Des performances épuratoires supérieures à 98% d'abattement ont également été obtenues dans des conditions plus extrêmes (20 cm d'épaisseur de garnissage et vitesse de passage de l'air de 200 m.h^{-1}), correspondant à un EBRT inférieur à 4 s, ce qui n'avait jamais été montré pour de si faibles concentrations.

→ Il est donc bien possible de réduire l'empreinte au sol des biofiltres végétalisés, à la fois en augmentant les volumes d'air traités et en réduisant l'épaisseur de garnissage, tout en maintenant des performances maximales.

De plus, l'élimination complète des TEX a été obtenue dès 10 cm de hauteur de garnissage dans les biofiltres de 20 cm d'épaisseur totale de garnissage, indiquant que les limites du système n'ont pas été atteintes.

→ Un EBRT inférieur à 2 s pourrait être suffisant pour obtenir des performances épuratoires maximales. Réduire davantage l'épaisseur de garnissage ne présente pas d'intérêt car 20 cm correspond au minimum nécessaire pour garantir le développement et la croissance des plantes. En revanche, il serait intéressant de rehausser la vitesse de passage de l'air pour permettre le traitement de volumes d'air encore plus important pour des surfaces de biofiltre moindre.

La fertilisation est indispensable à la mise en place et au maintien de ces performances. Elle peut sans problème être réalisée à partir d'un engrais retard (solide) mélangé directement avec le garnissage. Mais, si cette fertilisation peut procurer suffisamment d'éléments nutritifs pour environ une année de fonctionnement, par la suite, l'ajout d'une solution nutritive via le système d'irrigation doit être envisagé.

La plante dans le biofiltre a-t-elle seulement un intérêt esthétique ou constitue-t-elle aussi un avantage en terme de fonctionnement ?

La présence de plantes dans le biofiltre végétalisé présente avant tout un intérêt esthétique permettant l'intégration paysagère de procédé de traitement d'air au cœur des villes. Cette particularité facilite et encourage l'installation de tels systèmes car, en plus de leur capacité à améliorer la qualité de l'air urbain, ils permettent l'implantation de nouvelles zones végétalisés ayant des bienfaits reconnus sur la biodiversité et la santé psychologique des citadins.

La présence d'une microflore abondante et diversifiée au niveau des systèmes racinaires ainsi que le rôle des plantes dans la sélection des microorganismes rhizospérique sont bien connus dans les sols. Qu'en est-il dans les biofiltres végétalisés ? La présence de la plante peut-elle influencer les performances épuratoires et/ou les caractéristiques de la microflore présente dans le garnissage des biofiltres ?

Notre étude a permis de montrer que la présence de lierre ne semble pas avoir d'influence directe sur les performances épuratoires du biofiltre dans des conditions de fonctionnement standard (40 cm d'épaisseur de garnissage, EBRT de 14 s), dès lors que la disponibilité en nutriments est suffisante.

En revanche, dans des conditions de fonctionnement plus extrêmes (EBRT inférieur à 8 s), elle pourrait favoriser la croissance bactérienne dans les zones inactives pour la dégradation des TEX. Ce constat a également été fait dans les biofiltres de 20 cm d'épaisseur de garnissage, où la présence de la plante semble stimuler la croissance bactérienne dans les zones actives pour la dégradation des TEX, probablement en apportant des éléments nutritifs via l'exsudation racinaire.

→ La plante pourrait donc avoir un impact indirect mais positif sur les performances des biofiltres végétalisés lorsque l'épaisseur du garnissage est réduite.

Ces résultats suggèrent plusieurs pistes de recherches intéressantes. Dans un premier temps, il sera nécessaire de vérifier l'influence de la plante dans les biofiltres de 20 cm d'épaisseur de garnissage en comparant les performances et les densités bactériennes obtenues avec des biofiltres non plantés.

Ensuite, la qualité et la quantité des exsudats racinaires étant variables d'une espèce végétale à une autre, comme cela a été montré dans le mur végétalisé du CELP, certaines

plantes favorisent effectivement l'abondance et l'activité des microorganismes. L'utilisation d'autres plantes pourrait être envisagée afin d'évaluer l'impact de différentes espèces végétales sur la microflore des biofiltres et *in fine* sur les performances épuratoires. Le choix d'espèces les plus favorables au développement d'une microflore active et efficace pour la dégradation des polluants pourrait alors permettre d'améliorer les performances épuratoires des biofiltres végétalisés soumis à des fluctuations environnementales naturelles.

L'influence de la plante mérite également d'être étudiée à plus long terme car les caractéristiques des exsudats racinaires varient au cours de la vie de la plante et notre étude ne permet pas de prédire le maintien des fonctions épuratoires du biofiltre dans le temps.

La microflore indigène du biofiltre végétalisé contribue-t-elle aux performances épuratoires ?

La microflore indigène du biofiltre est capable de s'acclimater rapidement aux conditions opératoires et permet la dégradation complète des TEX à faibles concentrations.

→ L'inoculation du biofiltre végétalisé, à partie de souche pure ou de consortia microbiens, n'est donc pas nécessaire. Les microorganismes indigènes possèdent le potentiel génétique nécessaire à la dégradation des TEX.

Par contre, il n'a pas été possible de déterminer si l'origine de cette microflore indigène, motte ou garnissage, joue un rôle dans la mise en place et/ou le maintien des performances épuratoires du biofiltre. Pour vérifier l'impact des microorganismes provenant de la motte, une expérimentation pourrait être réalisée sans installer de motte au sein du garnissage du biofiltre.

Bien que le mélange gazeux alimentant les biofiltres ne contienne pas de NOx, la présence d'une communauté dénitrifiante potentiellement active a été démontrée. L'activité potentielle de cette communauté est influencée par la disponibilité en azote dans le garnissage ce qui suggère que l'alimentation en NOx du biofiltre pourrait favoriser l'activité de dénitrification.

→ Les biofiltres végétalisés pourraient donc contribuer également à l'élimination des NOx.

Malgré la difficulté de mise en œuvre d'expérimentations au laboratoire impliquant l'utilisation des NOx, il semble pertinent de réaliser une étude ultérieure incluant ces composés afin de mesurer le niveau de performance des biofiltres végétalisés vis à vis des NOx.

Les conditions de fonctionnement du biofiltre permettent-elles de maintenir et de sélectionner une communauté bactérienne efficace ?

La densité bactérienne est influencée par les conditions de fonctionnement. La disponibilité en TEX permet la croissance de la communauté bactérienne totale qui est particulièrement marquée dans les zones actives pour la dégradation des TEX.

→ Les faibles concentrations en polluants rencontrées dans les PSC sont susceptibles de stimuler la croissance bactérienne au sein des biofiltres végétalisés.

La diversité de la communauté bactérienne totale, en termes de richesse et de structure, n'est pas particulièrement influencée par les conditions opératoires en raison des faibles concentrations en TEX (i.e. disponibilité des composés) n'imposant pas une pression de sélection très forte pour les microorganismes. Néanmoins, parmi les bactéries susceptibles d'être directement impliquées dans la dégradation des TEX, nous avons montré la présence et un enrichissement important du groupe des *TM7*, notamment dans les zones où la dégradation des TEX est la plus forte.

→ Ce résultat laisse supposer que le groupe des *TM7* est probablement impliqué dans la dégradation des TEX au sein des biofiltres végétalisés.

Afin de caractériser la communauté bactérienne responsable de la dégradation des TEX, il est envisageable de cibler les gènes de fonction impliqués dans la dégradation de ces composés. Des couples d'amorces spécifiques permettant de cibler certains de ces gènes ont été publiés. Cependant, même en choisissant de cibler les voies centrales de dégradation des TEX (moins nombreuses que les voies périphériques), la diversité des gènes impliqués est telle qu'il serait nécessaire d'utiliser plusieurs cibles pour espérer couvrir totalement la communauté bactérienne dégradant les TEX.

Le mur végétalisé biofiltrant : des résultats prometteurs !

Les expérimentations menées en conditions réelles sur le mur végétalisé biofiltrant du CELP ont permis de mettre en évidence la présence d'une microflore active possédant le potentiel génétique nécessaire à la dégradation complète des NOx au sein du garnissage. Comme attendu, les variations saisonnières (notamment la température) et le couvert végétal ont une influence sur les activités microbiennes. En ce qui concerne les performances épuratoires du biofiltre *in situ*, une réduction importante du nombre de composés détectés a été mesurée entre le parking et la sortie du biofiltre.

→ Ces premiers résultats très prometteurs nous encouragent à poursuivre l'étude et le développement de ce nouveau type de procédés.

De nombreuses pistes restent néanmoins à explorer. Tout d'abord, l'installation d'un mur végétalisé biofiltrant sur un site expérimental présentant des concentrations en polluants plus proches de celles des parkings souterrains permettrait de valider les résultats obtenus au laboratoire dans des conditions réelles de fonctionnement.

Une épaisseur de garnissage de 20 cm permettant l'élimination des polluants, il conviendrait de valider le maintien de telles performances *in situ*.

Par ailleurs, si les biofiltres traditionnels ont une espérance de vie finie (estimée de 4 à 5 ans pour les matériaux de garnissage organiques), nous ne disposons pas du recul nécessaire pour évaluer celle des biofiltres végétalisés. Le traitement de faibles concentrations en polluants implique le développement d'une biomasse plus réduite que celle des procédés traitant de fortes concentrations. Le garnissage utilisé, bien qu'en partie organique, présente une très bonne stabilité structurelle. Ces deux arguments laissent supposer que l'espérance de vie des biofiltres végétalisés peut être plus longue que celle des procédés traditionnels. Il conviendrait donc de valider également ce dernier point.

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A. Rondeau, 2013. Compréhension du fonctionnement biologique et physico-chimique d'un biofiltre végétalisé pour le traitement de polluants atmosphériques urbains gazeux. *Thèse de Doctorat.*

ABELSOHN A. AND STIEB D.M., 2011. Health effects of outdoor air pollution. *Canadian Family Physician*. 57(8): 881–887.

ADEME, 2012. www.ademe.fr « quelle est la definition de "l'air pur" ? ». Disponible sur : http://www.buldair.org/content/quelle-est-la-definition-de-%C2%AB-l-air-pur-%C2%BB. Consulté le 12/07/2012.

AFSSET, 2007. Recommandations pour la qualité de l'air dans les parcs de stationnement couverts. Saisine n°2005/006. 240p.

AIR PAYS DE LA LOIRE, 2003. Mesures de la qualité de l'air à l'intérieur du parking du Ralliement à Angers, 6 juin au 5 juillet 2002. Rapport référencé E-FDz040048-FDz. 21p.

AIR PAYS DE LA LOIRE, 2004. Mesures de la qualité de l'air à l'intérieur du parking Graslin à Nantes, 13 octobre au 3 décembre 2003. Rapport référencé E-FDz02921-FDz-CBt. 20p.

AIZPURU A., 2001. Biofiltration d'un mélange de COV. *In Ecole Doctorale des sciences exactes et de leurs applications*. Spécialité chimie et microbiologie de l'eau. PAU/ALES : Université de Pau et des Pays de l'Adour.

AIZPURU A., MALHAUTIER L., ROUX J.C. AND FANLO J.L., 2001. Biofiltration of a mixture of volatile organic emissions. *Journal of the Air & Waste Management Association.* 51(12): 1662–1670.

AIZPURU A., MALHAUTIER L., ROUX J.C. AND FANLO J.L., 2003. Biofiltration of a gaseous mixture of volatile organic compounds on granular activated carbon. *Biotechnology & Bioengineering*. 83(4): 479-488.

AIZPURU A., DUNAT B., CHRISTEN P., AURIA R., GARCIA-PEÑA I. AND REVAH S., 2005. Fungal biofiltration of toluene on ceramic ings. *Journal of Environmental Engineering*. 131(3): 396–402.

ALEXANDRI E. AND JONES P., 2008. Temperature decreases in an urban canyon due to green walls and green roofs in diverse climates. *Building and Environment*. 43(4): 480-493.

ALFREIDER A. AND VOGT C., 2007. Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. *Water Air Soil Pollution*. 183(1-4):415–426

ALVAREZ P. J. AND VOGEL T. M., 1991. Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Applied Environmental Microbiology.* 57(10): 2981-2985.

ÁLVAREZ-HORNOS F.J., GABALDÓN C., MARTÍNEZ-SORIA V., MARTÍN M., MARZAL P. AND PENYA-ROJA J.M., 2008. Biofiltration of ethylbenzene vapours: influence of the packing material. *Bioresource Technology.* 99(2): 269–276.

ANDERSON J.P.E. AND DOMSCH K.H., 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology & Biochemistry.* 10(3): 215-221.

ANDERSON H.R., FAVARATO G. AND ATKINSON R.W., 2011. Long-term exposure to outdoor air pollution and the prevalence of asthma: meta-analysis of multi-community prevalence studies. *Air Quality, Atmosphere & Health*. Disponible sur : http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11869-011-0145-4.

ANDREONI V. AND GIANFREDA L., 2007. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Applied Microbiology Biotechnology.* 76(2): 287–308

ANSORGE W.J., 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology.* 25(4): 195-203.

AO C.H. AND LEE S.C., 2002. Removal of indoor air ppb level volatile organic compounds (VOCs) and NOx by Heterogeneous photocatalysis. *Better Air Quality in Asian and Pacific Rim Cities (BAQ 2002), Hong Kong, SAR*. PS 37.

APEL W.A. AND TURICK C.E., 1993. The use of denitrifying bacteria for the removal of nitrogen oxides from combustion gases. *Fuel*. 72(12): 1715–1718.

ARRETE DU 9 MAI 2006, portant approbation de dispositions complétant et modifiant le règlement de sécurité contre les risques d'incendie et de panique dans les établissements recevant du public (parcs de stationnement couverts). *Journal Officiel de la République Française*, n°157 du 8 juillet 2006.

ARRETE DU 29 MAI 2000, portant modification de l'Arrêté du 2 Février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux emissions de toutes natures des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation. *Journal Officiel de la République Française*, n°144 du 23 juin 2000.

ARRETE DU 29 JUILLET 2010, relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de l'enregistrement au titre de la rubrique n° 1311 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement. *Journal Officiel de la République Française*, n° 174 du 30 juillet 2010.

ARRETE DU 20 DECEMBRE 2011, relatif à la publication du bulletin officiel du Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement. *Journal Officiel de la République Française*, n° 5 du 6 janvier 2012.

ASPA, 2005. Campagne de mesure dans les lieux publics sur l'agglomération mulhousienne, rapport relatif à la campagne de mesures qui s'est déroulée du 21 février au 20 avril 2005. Rapport référencé ASPA05113001-ID. 46p.

ATMOSF'AIR BOURGOGNE, 2001. Parking Tremouille, résultats des mesures : mai/juin 2001. 14p.

ATMO POITOU-CHARENTES, 2003. Etude de la qualité de l'air dans le parking souterrain de la place de Verdun à La Rochelle du 6 au 20/12/2002. 37p.

AURIA R., FRERE G., MORALES M., ACUÑA M.E AND REVAH S., 2000. Influence of mixing and water addition on the removal rate of toluene vapors in a biofilter. *Biotechnology and Bioengineering*. 68(4): 448-455.

AVRAHAMI S., CONRAD R. AND BRAKER G., 2002. Effect of soil ammonium concentration on N_2O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Applied Environmental Microbiology*. 68(11): 5685-5692.

BADILLA D.B., GOSTOMSKI P.A. AND DALIDA M.L.P., 2010. Influence of water content on biofiltration performance. *ASEAN Journal of Chemical Engineering*. 10(2): 31-39.

BAIS H.P., WEIR T.L., PERRY L.G., GILROY S. AND VIVANCO, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Plant Biology*. 57: 233-266.

BARLETTA B., MEINARDI S., SHERWOOD ROWLAND F., CHAN C.-Y., WANG X., ZOU S., YIN CHAN L. AND BLAKE D. R., 2005. Volatile organic compounds in 43 chinese cities. *Atmospheric Environment*. 39(32): 5979–5990.

BARNES J.M., APEL W.A. AND BARETT K.B., 1995. Removal of nitrogen oxides from gas streams using biofiltration. *Journal of Hazardous Materials.* 41(2-3): 315-326.

BAYLE S., 2005. Traitement d'effluents gazeux chargés en composés organiques volatils par oxydation biologique : approche écologique des communautés microbiennes. *In Ecole Doctorale Ecosystème Evolution microbiologie Modélisation. Spécialité Ecologie microbienne.* LYON/ ALES: Université Claude Bernard Lyon 1.

BAYLE S., MALHAUTIER L., DEGRANGE V., GODON J.J. AND FANLO J.L., 2009. Structural and functional responses of sewage microbial communities used for the treatment of a complex mixture of volatile organic compounds (VOCs). *Journal of Applied Microbiology*. 107(1): 85-96.

BEATTIE G.A. AND SEIBEL J.R., 2007. Uptake and localization of gaseous phenol and p-cresol in plant leaves. *Chemosphere*. 68(3): 528-536.

BELL M.L. AND DAVIS D.L., 2001. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environmental health perspectives*. 109 (Suppl 3): 389-394.

BERG G., AND SMALLA K., 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology.* 68(1): 1–13.

BIBEAU L., HEITZ M., KIARED K., LEROUX A., BRZEZINSKI R. AND VIEL G., 1997. Biological purification of exhaust air containing toluene vapor in a filter-bed reactor. The *Canadian Journal of Chemical Engineering*. 75(5): 1-8.

BRAKER G., FESEFELDT A. AND WITZEL K.P., 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied Environmental Microbiology*. 64(10): 3769–3775.

BRAKER G., ZHOU J., WU L., DEVOL A.H. AND TIEDJE J.M., 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Applied Environmental Microbiology*. 66(5): 2096–2104.

BRAKER G., AYALA-DEL-RÍO H.L., DEVOL A.H., FESEFELDT A. AND TIEDJE J.M., 2001. Community structure of denitrifiers, bacteria, and *Archaea* along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nir*S) and 16S rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology*. 67(4): 1893–1901.

BRAKER G., SCHWARZ J., AND CONRAD R., 2010. Influence of temperature on the composition and activity of denitrifying soil communities. *FEMS Microbiology Ecology.* 73(1): 134–148.

BRAMUCCI, M., KANE H., CHEN M. AND NAGARAJAN V., 2003. Bacterial diversity in an industrial wastewater bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62(5-6): 594-600.

BRAUER M., HOEK G., VAN VLIET P., MELIESFSTE K., FISHER P.H., WIJGA A., KOOPMAN L.P., NEIJENS H.J., GERRITSEN J., KERKHOF M., HEINRICH J., BELLANDER T. AND BRUNEKREEF B., 2002. Air pollution from traffic and the development of respiratory infections and asthmatic and allergic symptoms in children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medecine*. 166(8): 1092-1098.

BRGM, 2001. Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes, applications dans un contexte d'Evaluation Détaillée des Risques pour les ressources en eau. Rapport référencé : BRGM/RP-50662-FR. 177p.

BROSSELIN P, RUDANT J., ORSI L., LEVERGER G, BARUCHEL A., BERTRAND Y., NELKEN B., ROBERT A., MICHEL G., MARGUERITTE G., PEREL Y., MECHINAUD F., BORDIGONI P., HEMON D. AND CLAVEL J., 2009. Acute childhood leukaemia and residence next to petrol stations and automotive repair garages: the ESCALE study (SFCE). *Occupational and Environmental Medecine.* 66(9): 598-606.

BROWN C. AND GRANT M., 2005. Biodiversity and human health: what role for nature in healthy urban planning? *Built Environment.* 31(4): 326–338.

BRUTEL C. AND LEVY D., 2011. Le nouveau zonage en aires urbaines de 2010. *INSEE Première*, (1374).

BURCHETT M.D., TORPY F. AND BRENNAN J., 2009. Towards improving indoor air quality with potted -plants a multifactorial investigation. *Final Report to Horticulture Australia Ltd*.

CABROL L., MALHAUTIER L., POLY F., LEPEUPLE A.S. AND FANLO J.L., 2009 Shock loading in biofilters: impact on biodegradation activity distribution and resilience capacity. *Water Science and Technology*. 59(7): 1307-1314.

CABROL L., MALHAUTIER L., POLY F., LEPEUPLE A.S. AND FANLO J.L., 2010. Assessing the bias linked to DNA recovery from biofiltration woodchips, for microbial community investigation by fingerprinting. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85(3): 2253-2258.

CABROL L. AND MALHAUTIER L., 2011. Integrating microbial ecology in bioprocess understanding: the case of gas biofiltration. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90(3): 837–849.

CABROL L., MALHAUTIER L., POLY F., LEPEUPLE A.S. AND FANLO J.L., 2012. Bacterial dynamics in steady-state biofilters: beyond functional stability. *FEMS Microbiology Ecology*. 79(1): 260–271.

CAI Z., KIM D. AND SORIAL G.A., 2007. A comparative study in treating two VOC mixtures in trickle bed air biofilters. *Chemosphere.* 68(6): 1090–1097.

CANNAVO P., RICHAUME A., AND LAFOLIE F., 2004. Fate of nitrogen and carbon in the vadose zone: in situ and laboratory measurements of seasonal variations in aerobic respiratory and denitrifying activities. *Soil Biology and Biochemistry.* 36(3): 463–478.

CAO B., NAGARAJAN K. AND LOH K.C., 2009. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85(2): 207–228.

CAVALCA L., DELL'AMICO E. AND ANDREONI V., 2004. Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monoxygenase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 64(4): 576–587.

CHAKRABORTY R. AND COATES J.D., 2004. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology Biotechnology.* 64(4): 437–446.

CHAKRABORTY R., O'CONNOR S.M., CHAN E. AND COATES J.D., 2005. Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by *Dechloromonas* strain RCB. *Applied and Environmental Microbiology.* 71(12): 8649–8655.

CHAN W.C. AND LAI T.Y., 2010. Compounds interaction on the biodegradation of acetone and methyl ethyl ketone mixture in a composite bead biofilter. *Bioresource Technology*. 101(1): 126–130.

CHANG Y.T., LEE J.-F. AND CHAO H.P., 2007. Variability of communities and physiological characteristics between free-living bacteria and attached bacteria during the PAH biodegradation in a soil/water system. *European Journal of Soil Biology.* 43(5-6): 283–296.

CHARNG M.K., VOICE T.C. AND CRIDDLE C.S., 1993. Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotechnology and Bioengineering*. 41(11): 1057–1065.

CHAUDHRY Q., BLOM-ZANDSTRA M., GUPTA S.K. AND JONER E., 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental Science and Pollution Research – International.* 12(1): 34–48.

CHEN J., KOU S. AND POON C., 2011. Photocatalytic cement-based materials: comparison of nitrogen oxides and toluene removal potentials and evaluation of self-cleaning performance. *Building and Environment*. 46(9): 1827–1833.

CHEN Y.D., BARKER J.F. AND GUI L., 2008. A strategy for aromatic hydrocarbon bioremediation under anaerobic conditions and the impacts of ethanol: a microcosm study. *Journal of contaminant hydrology*. 96(1-4): 17–31.

CHENEBY D., HALLET S., MONDON A., MARTIN-LAURENT F., GERMON J.C. AND PHILIPPOT L., 2003. Genetic characterization of the nitrate reducing community based on *narG* nucleotide sequence analysis. *Microbial Ecology*. 46(1): 113–121.

CHIKERE C.B., OKPOKWASILI G.C. AND CHIKERE B.O., 2011. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech.* 1(3): 117–138.

CHO J., ZEIN M.M., SUIDAN M.T. AND VENOSA A.D., 2007. Biodegradability of alkylates as a sole carbon source of ethanol or BTEX. *Chemosphere*. 68(2): 266-273.

CHUNG Y.C., 2007. Evaluation of gas removal and bacterial community diversity in a biofilter developed to treat composting exhaust gases. *Journal of Hazardous Materials.* 144(1-2): 377–385.

CITEPA/FORMAT SECTEN, 2011. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de Serre en France – Séries sectorielles et analyses étendues. Rapport référencé : CITEPA 880. 328p.

CLEAN AIR ACT, 1956. Chapiter 52 : 4&5 Eliz. 38p.

LE CLOIREC P., 2003. Adsorption en traitement de l'air. *Ed. Techniques Ingénieur*, G1776.

LE CLOIREC P., 2004. COV (Composés Organiques Volatils). *Ed. Techniques Ingénieur*, G1835.

CODE DE L'ENVIRONNEMENT, 2010. Partie législative, Livre 1er, Titre II, Chapitre IV : Droit d'accès à l'information relative à l'environnement. Article L 125-4.

COHEN Y., 2001. Biofiltration - the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioressource technology*. 77(3): 257-274.

COLLINS C.D., BELL J.N. AND CREWS C., 2000. Benzene accumulation in horticultural crops. *Chemosphere.* 40(1): 109–114.

COPARLY, 2010. Qualité de l'air dans les parcs de stationnements couverts. Etat des lieux dans 25 parcs de l'agglomération lyonnaise, mesures réalisées en 2008-2009. 39p.

COPARLY, 2011a. Qualité de l'air dans les parcs de stationnement couverts. Etude détaillée dans le parc République à Lyon, mesures réalisées en 2009-2010. 40p.

COPARLY, 2011b. Qualité de l'air dans les parcs de stationnement couverts. Etude de différentes methods de ventilation dans deux parkings de Lyon, mesures réalisées en 2010-2011. 38p.

CORSI R.L. AND SEED L., 1995. Biofiltration of BTEX: media, substrate, and loadings effects. *Environmental Progress*. 14(3): 151–158.

COSTERTON J.W., LEWANDOWSKI Z., DEBEER D., CALWELL D., KORBER D. AND JAMES G., 1994. Biofilms, the customize microniche. *Journal of Bacteriology*. 176(8): 2137-2142.

COYNE M.S., ARUNAKUMARI A., AVERILL B.A. AND TIEDJE J.M., 1989. Immunological identification and distribution of dissimilatory cd1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* 55(11): 2924– 2931.

DARLINGTON A.B., DAT J.F. AND DIXON M.A., 2001. The biofiltration of indoor air: air flux and temperature influences the removal of toluene, ethylbenzene, and xylene. *Environmental Science & Technology.* 35(1): 240–246.

DARLINGTON A.B., 2004. Room air cleansing using hydroponic plants. University of Guelph Brevet : US-6727091, Date de dépôt: 31 mai 2002, Date de délivrance: 27 avr. 2004.

DEBONO O., 2011. Oxydation photocatalytique de composés organiques volatils et suivi de leurs intermédiaires réactionnels : étude en réacteurs statique et dynamique à des concentrations typiques de l'air intérieur. In ECOLE DOCTORALE : *Sciences Pour l'Ingénieur, Géosciences, Architecture (SPIGA)*, THESE N° 2011EMNA0005. Université Nantes Angers Le Mans.

DECRET N° 2002-213 DU 15 FEVRIER 2002 portant transposition des directives 1999/30/CE du Conseil du 22 avril 1999 et 2000/69/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 novembre 2000 et modifiant le décret n° 98-360 du 6 mai 1998 relatif à la surveillance de la qualité de l'air et de ses effets sur la santé et sur l'environnement, aux objectifs de qualité de l'air, aux seuils d'alerte et aux valeurs limites.

DELHOMÉNIE M.C., BIBEAU, L., GENDRON, J., BRZEZINSKI, R., AND HEITZ, M., 2001. Influence of nitrogen on the degradation of toluene in a compost-based biofilter. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 76(9): 997-1006.

DELHOMÉNIE M.C., BIBEAU L., BREDIN N., ROY S., BROUSSAU S., BRZEZINSKI R., KUGELMASS J. L. AND HEITZ M. 2002a. Biofiltration of air contaminated with toluene on a compost-based bed. *Advances in Environmental Research*. 6(3): 239–254.

DELHOMÉNIE M.C., BIBEAU L., AND HEITZ M., 2002b. A study of the impact of particle size and adsorption phenomena in a compost-based biological filter. *Chemical Engineering Science*. 57(24): 4999 – 5010.

DELHOMÉNIE M.C. AND HEITZ M., 2005. Biofiltration of air: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 25(1-2): 53-72.

DELMAS R., SERÇA D. AND JAMBERT C., 1997. Global inventory of NOx sources. *Nutrient Cycling in Agroecosystems.* 48(1-2): 51–60.

DESHUSSES M.A., 1997. Biological waste air treatment in biofilters. *Current Opinion in Biotechnology*. 3(3): 335–339.

DESHUSSES M.A., JOHNSON C.T., AND LESON G., 1999. Biofiltration of high loads of ethyl acetate in the presence of toluene. *Journal of Air and Waste Management*. 49(8): 973-979.

DESHUSSES M.A. AND JOHNSON C.T., 2000. Development and validation of a simple protocol to rapidly determine the performance of biofilters for VOC treatment. *Environmental Science & Technology*. 34(3): 461–467.

DIRECTIVE 1999/13/CE du conseil du 11 mars 1999 Relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l'utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations. *Journal Officiel des Communautés Européennes*. n°L 85.

DIRECTIVE 2004/35/CE du Parlement Européen et du Conseil, du 21 avril 2004, sur la responsabilité environnementale en ce qui concerne la prévention et la réparation des dommages environnementaux. *Journal Officiel des Communautés Européennes*. n° L 143.

DIRECTIVE 2008/50/CE du Parlement Européen et du Conseil du 21 mai 2008 concernant la qualité de l'air ambiant et un air pur pour l'Europe. *Journal Officiel des Communautés Européennes*. n°L 152.

DIRECTIVE EUROPEENNE 2010/75/UE du 24 novembre 2010 relative aux émissions industrielles (prévention et réduction intégrées de la pollution). *Journal Officiel des Communautés Européenne.* n°L 334.

DJOKIC L., NARANCIC T., NIKODINOVIC-RUNIC J., SAVIC M. AND VASILJEVIC B., 2011. Isolation and characterization of four novel Gram-positive bacteria associated with the rhizosphere of two endemorelict plants capable of degrading a broad range of aromatic substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(4): 1227-1238.

DORADO A.D., BAQUERIZO G., MAESTRE J.P., GAMISANS X., GABRIEL D. AND LAFUENTE J., 2008. Modeling of a bacterial and fungal biofilter applied to toluene abatement: kinetic parameters estimation and model validation. *Chemical Engineering Journal.* 140(1-3): 52–61.

DOU J., LIU X., HU Z. AND DENG D., 2008. Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction. *Journal of Hazardous Materials*. 151(2-3): 720–729.

EILSTEIN D., 2010. Exposition prolongée à la pollution atmosphérique et mortalité par pathologies respiratoires. *Revue française d'allergologie*. 50: 51-61.

ELMRINI H., BREDIN N., SHAREEFDEEN Z. AND HEITZ M., 2004. Biofiltration of xylene emissions: bioreactor response to variations in the pollutant inlet concentration and gas flow rate. *Chemical Engineering Journal.* 100(1-3): 149–158.

EPA, 2010. Effects of future emissions and a changed climate on urban air quality. EPA Grant Number : R833371. 146p.

ESTEVEZ E., VEIGA M.C. AND KENNES C., 2005 Biodegradation of toluene by the new fungal isolates *Paecilomyces variotii* and *Exophiala oligosperma*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32(1): 33–37

ESTRADA J.M., (BART) KRAAKMAN N.J.R., LEBRERO R. AND MUÑOZ R., 2012. A sensitivity analysis of process design parameters, commodity prices and robustness on the economics of odour abatement technologies. *Biotechnology Advances.* 30(6): 1354-1363.

EVANS P.J., MANG D.T. AND YOUNG L.Y., 1991. Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology.* 57(2): 450–454.

FANLO J.L., 1998. Des bactéries désodorisantes. *Biofutur*. 175: 20-23.

FANLO J.L. 2005. *Pollutions olfactives : Origine, législation, analyse, traitement. Edition Dunod, Coll. L'usine Nouvelle*. 388 p.

FARHADIAN M., VACHELARD C., DUCHEZ D. AND LARROCHE C., 2008. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresource Technology.* 99(13): 5296–5308.

FERNANDEZ A. S., HASHSHAM S.A., DOLLHOPF S.L., RASKIN L., GLAGOLEVA O., DAZZO F.B., HICKEY R.F., CRIDDLE C.S. AND TIEDJE J.M., 2000. Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(9): 4058-4067.

FILLEUL L, RONDEAU V, VANDENTORREN S, LE MOUAL N, CANTAGREL A, ANNESI-MAESANO I, CHARPIN D, DECLERCQ C, NEUKIRCH F, PARIS C, VERVLOET D, BROCHARD P, TESSIER JF, KAUFFMANN F, BALDI I., 2005. Twenty five year mortality and air pollution: results from the French PAARC Survey. *Journal of Occupational and Environmental Medecine*. 62(7): 543-460.

FOGHT J., 2008. Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 15(2-3): 93-120.

FRIES M.R., ZHOU J., CHEE-SANFORD J. AND TIEDJE J. M., 1994. Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(8): 2802–2810.

FUCHS G., BOLL M. AND HEIDER J., 2011. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology*. 9(11): 803–816.

GARBEVA P., ELSAS J.D. AND VEEN J.A., 2008. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant and Soil.* 302(1-2): 19–32.

GENEBANK, 2012. National Center for Biotechnology Information. Disponible sur : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ Consulté le 20/06/12.

GERMON J.C., AND HENAULT C., 1995. Processus d'émissions de méthane et d'oxydes gazeux par les sols. Perrier A. (Coord.). *In Agriculture et Gaz à Effet de Serre*. *Dossier de l'Environnement de l'I.N.R.A.* n°10 : 29-38.

GLICK B.R., 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*. 28(3): 367–374.

GOVIND R. AND NARAYAN S., 2005. Selection of bioreactor media for odor control. In: *Biotechnology for Odour and Air Pollution Control*, *Eds Shareefdeen Z. and A. Singh*, *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.* p 65-100.

GRAZULEVICIENNE R., MAROZIENE L., DULSKIENE V., MALINAUSKIENE V., AZARAVICIENE A., LAURINAVICIENE D., AND JANKAUSKIENE K., 2004. Exposure to urban nitrogen dioxide pollution and the risk of myocardial infarction. *Scandinavian Journal of Work, Environment Health*. 30(4): 293-298.

VAN GROENESTIJN J.W. AND KRAAKMAN N.J.R., 2005. Recent developments in biological waste gas purification in Europe. *Chemical Engineering Journal.* 113(2-3): 85-91.

GUIEYSSE B., HORT C., PLATEL V., MUNOZ R., ONDARTS M. AND REVAH S., 2008. Biological treatment of indoor air for VOC removal: potential and challenges. *Biotechnology advances.* 26(5): 398–410.

GULENSOY N. AND ALVAREZ P.J.J., 1999. Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbon biodegradation capabilities. *Biodegradation.* 10(5): 331-340.

HABE H. AND OMORI T., 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67(2): 225-243.

HABOUZIT F., GEVAUDAN G., HAMELIN J., STAYER J.P. AND BERNET N., 2011. Influence of support material properties on the potential selection of *Archaea* during initial adhesion of a methanogenic consortium. *Bioresource Technology*. 102(5): 4054–4060.

HAQUE F., DE VISSCHER A. AND ARINDOM S., 2012. Biofiltration for BTEX removal. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 42(24): 2648-2692.

HARTUNG E., JUNGBLUTH T. AND BUSCHER W., 2001. Reduction of ammonia and odor emissions from a piggery with biofilters. *Congrès ASAE Annual Meeting* as Paper N°97-4126.

HELAL H.M. AND SAUERBECK D., 1986. Effects of plant roots on carbon metabolism of soil microbial biomass. *Zeitschrìft fur PJanzenernährung Bodenkunde*. 149(2): 181-188.

HENDRICKX B., JUNCA H., VOSAHLOVA J., LINDNER A., RUEGG I., FABER F., EGLI T., MAU M., SCHLOMANN M., BRENNEROVA M., BRENNER V., PIEPER D.H., TOP E.M., DEJONGHE W., BASTIAENS L. AND SPRINGAEL D., 2006. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *Journal of Microbiological Methods.* 64(2): 230–265.

HENRY, S., BAUDOIN E., LOPEZ-GUTIERREZ J.C., MARTIN-LAURENT F., BRAUMAN A. AND PHILIPPOT L., 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *Journal of microbiological methods.* 59(3): 327–335.

HENRY S., BRU D., STRES B., HALLET S. AND PHILIPPOT L., 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology.* 72(8): 5181-5189.

HERMAN S., HERMIA J. AND LE CLOIREC P., 1998. Chapitre 15 : La séparation des COV sur membranes. *In Les COV dans l'Environnement*. L. T. E. DOC (ed).

HO K.L., CHUNG Y.C., LIN Y.H. AND TSENG C.P., 2008. Microbial populations analysis and field application of biofilter for the removal of volatile-sulfur compounds from swine wastewater treatment system. *Journal of hazardous materials*. 152(2): 580–588.

HOQUE R.R., KHILLARE P.S., AGARWAL T., SHRIDHAR V. AND BALACHANDRAN S., 2008. Spatial and temporal variation of BTEX in the urban atmosphere of Delhi, India. *Science of The Total Environment*. 392 (1): 30-40.

HOWSAM M., JONES K.C. AND INESON P., 2001. Dynamics of PAH deposition, cycling and storage in a mixed-deciduous (*Quercus-Fraxinus*) woodland ecosystem. *Environmental Pollution*. 113 (2): 163-176.

HUGENHOLTZ, P., TYSON G.W., WEBB R.I., WAGNER A.M. AND BLACKALL L.L., 2001. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain bacteria with no known pure-culture representatives. *Applied and Environmental Microbiology* 67(1): 411–419.

HUGENHOLTZ P., 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology*. 3(2): 1–8.

IKEMOTO S., JENNINGS A.A. AND SKUBAL K.L., 2006. Modeling hydrophobic VOC biofilter treatment in the presence of nutrient stimulation and hydrophilic VOC inhibition. *Environmental Modeling and Software*. 21(10): 1387-1401.

INERIS, 2004. Exposition par inhalation au benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes (BTEX) dans l'air. Sources, mesures et concentrations Mise à jour du 21/12/2004. 29p.

INERIS, 2005. Fiche de données écotoxicologiques et environnementales des substances chimiques : les oxydes d'azote. Mise à jour du 25/07/2005. 51p.

INRS, 2010a. Fiche DEMETER : Toluène. N°DEM 060. 7p.

INRS, 2010b. Fiche DEMETER : Ethylbenzène. N°DEM 003. 6p.

INRS, 2010c. Fiche DEMETER : Xylènes. N°DEM 007. 6p.

INVS, 2012. Evaluation des conséquences sanitaires des pics de pollution atmosphérique. Note de position de L'Institut De Veille Sanitaire. 4p.

IRANPOUR R., COX H.H.J., DESHUSSES M.A. AND SCHROEDER E.D., 2005. Literature review of air pollution control biofilters and biotrickling filters for odor and volatile organic compound removal. *Environmental Progress.* 24(3): 254–267.

JACKSON L.E., SCHIMEL J.P. AND FIRESTONE M.K., 1989. Short-term partitioning of ammonium and nitrate between plants and microbes in an annual grassland. *Soil Biology & Biochemistry.* 21(3): 409-415.

JIANG R., HUANG S. AND YANG J., 2008. Biological removal of NOx from simulated flue gas in aerobic biofiltre. *Global NEST Journal*. 10(2): 241-248.

JIN Y., VEIGA M. C. AND KENNES C., 2005. Bioprocesses for the removal of nitrogen oxides from polluted air. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 80(5): 483–494.

JO M.S., RENE E.R., KIM S.H. AND PARK H.S., 2008. An analysis of synergistic and antagonistic behavior during BTEX removal in batch system using response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*. 152(3): 1276-1284.

JORIO, H., KIARED K., BRZEZINSKI R., LEROUX A., VIEL G. AND HEITZ M., 1998. Treatment of air polluted with high concentrations of toluene and xylene in a pilot-scale biofilter. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* 73(3): 183–196.

JORIO H., BIBEAU L., VIEL G. AND HEITZ M. ,2000. Effects of gas flow rate and inlet concentration on xylene vapors biofiltration performance. *Chemical Engineering Journal.* 76(3): 209–221.

JUNCA H. AND PIEPER D.H., 2003. Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries. *Environmental Microbiological*. 6(2): 95-110.

KABELITZ N., MACHACKOVA J., IMFELD G., BRENNEROVA M., PIEPER D.H., HEIPIEPER H.J. AND JUNCA H., 2009. Enhancement of the microbial community biomass and diversity during air sparging bioremediation of a soil highly contaminated with kerosene and BTEX. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82(3): 565-577.

KENNES C., COX H.H.J., DODDEMA H.J. AND HARDER W., 1996. Design and performance of biofilters for the removal of alkylbenzene vapors. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 66(3): 300-304.

KENNES C. AND VEIGA M.C., 2004. Fungal biocatalysts in the biofiltration of VOC-polluted air. *Journal of Biotechnology*. 113(1–3): 305-319.

KENNES C., RENE E. R. AND VEIGA M. C., 2009. Bioprocesses for air pollution control. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 84(10): 1419–1436.

VAN KESSEL C., PENNOCK D. J. AND FARRELL R. E., 1993. Seasonal variations in dénitrification and nitrous oxide evolution at the landscape scale. *Soil Science Society of America Journal*. 57: 988-995.

KESSELMEIER J. AND STAUDT M., 1999. Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *Journal of atmospheric chemistry.* 33(1): 23–88.

KHAMMAR N., 2002. Structure et fonctionnalité des communautés microbiennes au sein d'unité de biofiltration utilisées pour le traitement d'un mélange complexe de composés organiques volatils. *In Ecole Doctorale Ecosystème Evolution microbiologie Modélisation. Spécialité Ecologie microbienne*. LYON/ ALES: Université Claude Bernard Lyon

KHAMMAR N., MALHAUTIER L., DEGRANGE V., LENSI R., GODON J.J. AND FANLO J.-L., 2005. Link between spatial structure of microbial communities and degradation of a complex mixture of volatile organic compounds in peat biofilters. *Journal of Applied Microbiology*. 98(2): 476–490.

KIEHL J.T. AND TRENBERTH K.E., 1997. Earth's annual global mean energy budget. *Bulletin of the American Meteorological Society*. 78(2): 197–208.

KIM H.S., KIM Y. J., CHUNG J.S. AND XIE Q., 2002. Long-term operation of a biofilter for simultaneous removal of H_2S and NH_3. *Journal of the Air and Waste Management Association.* 52(12): 1389-1398.

KIM H., MC CONNELL L.L. AND MILLNER P., 2005. Comparison of odorous volatile compounds from fourteen different commercial composts using solid-phase microextraction. *American Society of Agricultural and Biological engineers*. 48(1): 315-320.

KIM J.M. AND JEON C.O., 2009. Isolation and characterization of a new benzene, toluene, and ethylbenzene degrading bacterium, *Acinetobacter sp*. B113. *Current Microbiology*. 58(1): 70–75.

KIM J.M., LE N.T., CHUNG B.S., PARK J.H., BAE J.W., MADSEN E.L. AND JEON C.O., 2008a. Influence of soil components on the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-, m-, and p-xylenes by the newly isolated bacterium *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. *Applied and Environmental Microbiology.* 74(23): 7313–7320.

KIM K.J., KIL M.J., SONG J.S., YOO E.H., SON K.C. AND KAYS S.J., 2008b. Efficiency of volatile formaldehyde removal by indoor plants: contribution of aerial plant parts versus the root zone. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* 133(4): 521–526.

KIM N.J., HIRAI M. AND SHODA M., 2000. Comparison of organic and inorganic packing materials in the removal of ammonia gas in biofilters. *Journal of hazardous materials*. 72(1): 77–90.

KLAPKOVÁ E., HALECKÝ M., FITCH M., SOCCOL C.R. AND PACA J., 2006. Impact of biocatalyst and moisture content on toluene/xylene mixture biofiltration. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49(6): 1001–1006.

KNOWLES R., 1982. Denitrification. *Microbiological reviews*. 46(1): 43-70.

KOLLER E., 2004. Traitement des pollutions industrielles : eau, air, déchets, sols, boues. *Edition Dunond, Collection L'usine Nouvelle, Environnement et Sécurité*. 424p.

KOMP P. AND MCLACHLAN M. S., 2001. Influence of temperature on the plant/air partitioning of polychlorinated biphenyls. *Environment Sciences and Technology.* 31: 886–890.

KORTE, F., KVESITADZE G., UGREKHELIDZE D., GORDEZIANI M., KHATISASHVILI G., BUADZE O., ZAALISHVILI G. AND COULSTON F., 2000. Organic toxicants and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 47(1): 1–26.

KOURTEV P.S., EHRENFELD J.G., AND HÄGGBLOM M., 2002. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. *Ecology.* 83(11): 3152–3166.

KOVÁROVÁ-KOVAR K., AND EGLI T., 1998. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and molecular biology reviews.* 62(3): 646–666.

KRAAKMAN, N.J.R., ROCHA-RIOS J. AND LOOSDRECHT M.C.M., 2011. Review of mass transfer aspects for biological gas treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(4): 873–886.

KRAZYZANOWSKI M., KUNA-DIBBERT B. AND SCHNEIDER J., 2005. Introduction in health effects of transport – related air pollution, ed by Krzyzanowski M., Kuna-Dibbert B. and Schneider. *Journal of World Health Organization Europe*. Copenhague p.1-5.

KREWSKI, D., BURNETT R., JERRETT M., POPE C.A., RAINHAM D., CALLE E., THURSTON G. AND THUN M., 2005. Mortality and long-term exposure to ambient air pollution: ongoing analyses based on the American Cancer Society cohort. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.* 68(13-14): 1093–1109.

KREWSKI D., 2009. Evaluating the effects of ambient air pollution on life expectancy. *New England Journal of Medicine*. 360(4): 413–415.

KRISTIANSEN, A., PEDERSEN K.H., NIELSEN P.H., NIELSEN L.P., NIELSEN J.L. AND SCHRAMM A., 2011. Bacterial community structure of a full-scale biofilter treating pig house exhaust air. *Systematic and Applied Microbiology.* 34(5): 344–352.

KROLL J.H. AND SEINFELD J.H., 2008. Chemistry of secondary organic aerosol: formation and evolution of low-volatility organics in the atmosphere. *Atmospheric Environment*. 42(16): 3593–3624.

KUMAR P.S., BROOKER M.R., DOWD S.E. AND CAMERLENGO T., 2011. Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S pyrosequencing. *PLoS ONE.* 6(6): 1-8.

KUNIN V., ENGELBREKTSON A., OCHMAN H. AND HUGENHOLTZ P., 2010. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology.* 12(1): 118–123.

KURT M., DUNN J. AND BOURNE J. R., 1987. Biological denitrification of drinking water using autotrophic organisms with hydrogen in a fluidized-bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 29(4): 493-501.

LABRADOR L. J., VON KUHLMANN R. AND LAWRENCE M.G., 2004. Strong sensitivity of the global mean OH concentration and the tropospheric oxidizing efficiency to the source of NOx from lightning. *Geophysical Research Letters.* 31(6): 1–4.

LAMB E.G., KENNEDY N. AND SICILIANO S.D., 2011. Effects of plant species richness and evenness on soil microbial community diversity and function. *Plant and Soil.* 338(1): 483–495.

LANE D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York, pp 115–175

LAZAROVA V. AND MANEM J., 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*. 29(10): 2227–2245.

LEE E.H. AND CHO K.S., 2009. Effect of substrate interaction on the degradation of methyl tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene by *Rhodococcus* sp. *Journal of Hazardous Materials*. 167(1-3): 669–674.

LESON G. AND WINER A.M., 1991. Biofiltration: an innovative air pollution control technology for VOC emissions. *Journal Air & Waste Management Association.* 41(8):1045-1054.

LI J., YE G., SUN D., SUN G., ZENG X. AND LIANG S., 2011. Performances of two biotrickling filters in treating H2S-containing waste gases and analysis of corresponding bacterial communities by pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 95(6): 1633-1641.

LITTLEJOHNS J.V., AND DAUGULIS A.J., 2008. Response of a solid–liquid two-phase partitioning bioreactor to transient BTEX loadings. *Chemosphere.* 73(9): 1453–1460.

LIU X., TIQUIA S.M., HOLGUIN G., WU L., NOLD S.C., DEVOL A.H., LUO K., PALUMBO A.V., TIEDJE J.M. AND ZHOU J., 2003. Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sédiments within the oxygen-deficient zone off the pacific coast of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(3): 3549-60

LIU Y.J., MU Y.J., ZHU Y.G., DING H. AND CRYSTAL ARENS N., 2007. Which ornamental plant species effectively remove benzene from indoor air? *Atmospheric environment.* 41(3): 650–654.

LOI LAURE n°96-1236 du 30/12/96 sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie JO n° 1 du 1er janvier 1997.

LOI n°2008-788 du 12 juillet 2010, relative à la surveillance obligatoire de la qualité de l'air intérieur des établissement recevant du public.

LU C., LIN M. R., AND CHU C., 1999. Temperature effects of trickle-bed biofilter for treating BTEX vapors. *Journal of Environmental Engineering.* 125(8): 775–779.

LU C., LIN M. R., AND CHU C., 2002. Effects of pH, moisture, and flow pattern on trickle-bed air biofilter performance for BTEX removal. *Advances in Environmental Research.* 6(2): 99–106.

LUO C., XIE S., SUN W., LI X. AND CUPLLES A.M., 2009. Identification of a novel toluene-degrading bacterium from the candidate phylum *TM7*, as determined by DNA stable isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology.* 75(13): 4644–4647.

MACEK T., MACKOVA M., AND KÁS J., 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances.* 18(1): 23–34.

MAHNE I. AND TIEDJE J.M., 1995. Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. *Applied Environmental Microbiology.* 61(3): 1110-1115

MALHAUTIER L., KHAMMAR N., BAYLE S. AND FANLO, J.L., 2005. Biofiltration of volatile organic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 68(1): 16–22.

MALIYEKKAL S. M., RENE E. R., PHILIP L. AND SWAMINATHAN T., 2004. Performance of BTX degraders under substrate versatility conditions. *Journal of hazardous materials.* 109(1-3): 201–211.

MANSHA M., 2011. Status and spatial visualization of toxic pollutants (BTEX) in urban atmosphere. *Advances in Chemical Engineering and Science.* 1(4): 231–238.

MARTIN L., RUIZ N., MAESTRE J.P., DIAZ O., GAMISANS X., GABRIEL D. AND LAFUENTE J., 2004. Characterization of organic packing materials in the removal of ammonia gas in automated biofilters. *In Proc. 11th Intern Conf. FAO ESCORENA Network on Recycling of Agricultural, Municipal and Industrial Residues in Agriculture* (RAMIRAN 2004).

MATHUR A. K., MAJUMDER C. B. AND CHATTERJEE S., 2007. Combined removal of BTEX in air stream by using mixture of sugar cane bagasse, compost and GAC as biofilter media. *Journal of Hazardous Materials.* 148(1-2): 64–74.

MATHUR A.K. AND MAJUMBER C.B., 2008. Biofiltration and kinetic aspects of a biotrickling filter for the removal of paint solvent mixture laden air stream. *Journal of hazardous materials*. 152(3): 1027-1036.

MCNEVIN D. AND BARFORD J., 2000. Biofiltration as an odour abatement strategy. *Biochemical engineering journal.* 5(3): 231-242.

MEDDE, 2012. www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr «Evolution de l'indice de la pollution de l'air par polluant pour les stations de fond urbain en France métropolitaine entre 2000 et 2010 (source : SOeS, d'après les données BDQA, ADEME, juin 2011) ». Disponible sur : http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/227/1101/evolution-qualite-lair-agglomerations-francaises-situation.html. Consulté le 6/09/2012.

MEDDTL, 2010. Bilan de la qualité de l'air en France en 2010 et des principales tendances observées au cours de la période 2000-2010. 37p.

MEDINA V.F., DEVINNY J.S. AND RAMARATNAM M., 1995. Biofiltration of toluene vapors in a carbon-medium biofilter. *In Biological Unit Processes for Hazardous Waste Treatment*, Proc. Third International *In situ* and on-site Bioreclamation Symposium, Hinchee R.E., Skeen R.S., Sayle G.D. Eds., Battelle press, Columbus, OH, USA.

MERCKX R., DIJKSTRA A., DEN HARTOG A. AND VAN VEEN J.A., 1987. Production of root-derived material and associated microbial growth in soil at different nutrient levels. *Biology Fertility Soils.* 5(2): 126-132.

MOE W.M. AND QI B., 2004. Performance of a fungal biofilter treating gas-phase solvent mixtures during intermittent loading. *Water research.* 38(9): 2259–2268.

MOHAMMAD B.T., VEIGA M.C. AND KENNES C., 2007. Mesophilic and thermophilic biotreatment of BTEX-polluted air in reactors. Biotechnology and Bioengineering. 97(6): 1423-1438.

MORALES M., HERNANDEZ S., CORNABE T., REVAH S. AND AURIA R., 2003. Effect of drying on biofilter performance: modeling and experimental approach. *Environmental science and technology*. 37(5): 985-992.

MORGENROTH E., SCHROEDER E.D., CHANG D.P.Y. AND SCOW K.M., 1996. Nutrient limitation in a compost biofilter degrading hexane. *Journal of the Air & Waste Management Association.* 46(4): 300–308.

MORRIS C. E., BARDIN M., BERGE O., FREY-KLETT P., FROMIN N., GIRARDIN H., GUINEBRETIÈRE M. H., LEBARON P., THIÉRY J. M. AND TROUSSELLIER M., 2002. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66(4) : 592-616.

MUDLIAR S., GIRI, B., PADOLEY K., SATPUTE D., DIXIT R., BHATT P., PANDEY R., JUWARKAR A. AND VAIDYA A., 2010. Bioreactors for treatment of VOCs and odours - a review. *Journal of Environmental Management*. 91(5): 1039–1054.

NAFSTAD P., HAHEIM L.L., WISLOFF T., GRAM F., OFTEDAL B., HOLME I., HJERMANN I. AND LEREN P. 2004. Urban air pollution and mortality in a cohort of Norwegian men. *Environmental Health Perspectives*. 112(5): 610-615.

NELSON M., AND BOHN H.L., 2011. Soil-based biofiltration for air purification: potentials for environmental and space life support application. *Journal of Environmental Protection*. 2(8): 1084–1094

NELSON M. AND WOLVERTON B.C., 2011. Plants + soil/Wetland microbes: food crop systems that also clean air and water. *Advances in Space Research*. 47(4): 582–590.

NEUPANE B., JERRETT M., BURNETT R.T., MARRIE T., ARAIN A. AND LOEB M., 2010. Long-term exposure to ambient air pollution and risk of hospitalization with community-acquired pneumonia in older adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 181(1): 47–53.

NICOLARDOT B., FAUVET G. AND CHENEBY D., 1994. Carbon et nitrogen cycling through soil microbial biomass at various temperatures. *Soil Biology and Biotechnology*. 26(2): 253-261.

NISOLA G.M., REDILLAS M.C.F.R., CHO E., HAN L., YOO N. AND CHUNG W. J., 2011. Comparison of reactive porous media for sulfur-oxidizing denitrification of high nitrate strength wastewater. *Biochemical Engineering Journal.* 58: 79–86

NIU H. AND LEUNG D. Y. C., 2010. A review on the removal of nitrogen oxides from polluted flow by bioreactors. *Environmental Review*. 18: 175-189.

NOGALES B., TIMMIS K.N., NEDWELL D.B. AND OSBORN A.M., 2002. Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Applied and environmental microbiology*. 68(10): 5017–5025.

NYBERG F., GUSTAVSSON P., JÄRUP L., BELLANDER T., BERGLIND N., JAKOBSSON R. AND PERSHAGEN G., 2000. Urban air pollution and lung cancer in Stockholm. *Epidemiology.* 11(5): 487–495.

OH Y.S., SHAREEFDEEN Z., BALTZIS B.C., BARTHA R., 1994. Interactions between benzene, toluene, and p-xylene (BTX) during their biodegradation. *Biotechnology and Bioengineering.* 44: 533–538

OKUNISHI S., MORITA Y., HIGUCHI T., MAEDA H. AND NISHI K., 2012 Transformation of microflora during degradation of gaseous toluene in a biofilter detected using PCR-DGGE. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 62(7): 748-757.

OMS, 2006. Air quality guidelines. Global update 2005. Particulate matter, ozone, nitrogen oxide and sulfur dioxide. 484p.

ONDARTS M., HORT C., SOCHARD S., PLATEL V., MOYNAULT L. AND SEBY F., 2012. Evaluation of compost and a mixture of compost and activated carbon as biofilter media for the treatment of indoor air pollution. *Environmental Technology.* 33(3): 273–284.

ORWELL R.L., WOOD R.L., TARRAN J., TORPY F. AND BURCHETT M.D., 2004. Removal of benzene by the indoor plant/substrate microcosm and implications for air quality. *Water, Air, and Soil Pollution.* 157(1-4): 193–207.

ORWELL R.L., WOOD R.A., BURCHETT M.D., TARRAN J. AND TORPY F., 2006. The potted-plant microcosm substantially reduces indoor air VOC pollution : II. Laboratory study. *Air & Soil Pollution.* 177(1-4): 59-80.

ORWIN K.H. AND WARDLE D.A., 2004. New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. *Soil Biology & Biochemistry.* 36(11): 1907-1912.

PACA J., HALECKY M. AND FITCH M., 2009. Steady-state performance of an activated carbon biofilter degrading styrene: effects of residence time and inlet concentration. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 59(1): 45-51.

PACA J., HALECKY M., VANEK T., KOZLIAK E. AND JONES K., 2010. Removal of saturated aliphatic hydrocarbons (gasoline components) from air via bacterial biofiltration. *Journal of Environmental Science and Health Part A*. 45(9): 1037-1047.

PAHM M.A. AND ALEXANDER M., 1993. Selecting inocula for the biodégradation of organic compounds at low concentration. *Microbial Ecology*. 25(3): 275-286.

PARALES R.E., DITTY J.L. AND HARWOOD C.S., 2000. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(9): 4098–4104.

PARALES, R. E., PARALES, J. V., PELLETIER, D. A. AND DITTY J. L., 2008. Chapter 1 Diversity of microbial toluene degradation pathways. *Advances in Applied Microbiology*. 64: 1–73.

PARRA, M., ELUSTONDO, D., BERMEJO, R. AND SANTAMARIA J., 2009. Ambient air levels of volatile organic compounds (VOC) and nitrogen dioxide (NO_2) in a medium size city in Northern Spain. *Science of The Total Environment.* 407(3):999-1009.

PARRISH D. D., SINGH H. B., MOLINA L. AND MADRONICH S., 2011. Air quality progress in North American megacities: a review. *Atmospheric Environment.* 45(39): 7015–7025.

PATRA A.K., ABBADIE L., CLAYS-JOSSERAND A., DEGRANGE V., GRAYSTON S.J., LOISEAU P., LOUAULT F., MAHMOOD S., NAZARET S., PHILIPPOT L., POLY F., PROSSER J.I., RICHAUME A. AND LE ROUX X., 2005. Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *The Ecological Society of America*. 75(1): 65-80.

PATRA A.K., ABBADIE L., CLAYS-JOSSERAND A., DEGRANGE V., GRAYSTON S.J., GUILLAUMAUD N., LOISEAU P., LOUAULT F., MAHMOOD S., NAZARET S., PHILIPPOT L., POLY F., PROSSER J.I. AND LE ROUX X., 2006. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environmental Microbiology*. 8 (6): 1005-1016.

PECK A.M. AND HORNBUCKLE K.C., 2001. Use of climate-controlled chamber to evaluate the uptake of persistent pollutants by leaves. 44th *Conference on Great Lakes Research*. 105-106.

PEEL J.L., METZGER K.B., KLEIN M., FLANDERS W. D., MULHOLLAND J. A. AND TOLBERT P.E., 2007. Ambient air pollution and cardiovascular emergency department visits in potentially sensitive groups. *American Journal of Epidemiology.* 165(6): 625–633.

PEISHI S., XIANWAN Y., RUOHUA H., BING H. AND PING Y., 2004. A new approach to kinetics of purifying waste gases containing volatile organic compounds (VOC) in low concentration by using the biological method. *Journal of Cleaner Production.* 12(1): 95–100

PELESZEZAK P., 2012. Mur végétal avec circulation interne d'air. Brevet Canevaflor : FR-2968891, Date de dépôt: 20 décembre 2010, date de délivrance : 22 juin 2012.

PHILIPPOT L. AND HALLIN S., 2006. Chapter 9: Molecular analysis of soil denitrifyng bacteria. *In Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis*. Edited by Cooper, J.E. and Rao J.R. CABI publishing.

PHILIPPOT L, HALLIN S. AND SCHLOTER M., 2007. Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *In Advances in Agronomy*. 96: 249-305.

PINETTE R. GIGGEY M.D., MARCY G.J. AND O'BRIEN M.A., 1994. Performance of biofilters at two agitated bin composting facilities. In: *Proceedings of the 87th annual meeting of the Air and Waste Management Association*, Ohio, *Air and Waste Management Association*.

PICIOREANU C, VAN LOOSDRECHT M.C.M. AND HEIJNEN J.J., 2000. Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: a two-dimensional modeling study. *Biotechnology & Bioengineering*. 69: 504– 15.

DU PLESSIS C.A., KINNEY K.A., SCHROEDER E.D., CHANG D.P.Y. AND SCOW K.M., 1998. Denitrification and nitric oxide reduction in an aerobic toluene-treating biofilter. *Biotechnology & Bioengineering.* 50(4): 408-415.

POPE C.A., EZZATI M. AND DOCKERY D., 2009. Fine-particulate air pollution and life expectancy in the United States. *The New England Journal of Medicine*. 360: 376-386.

PRADO O., VEIGA M.C., AND KENNES C., 2005. Treatment of gas-phase methanol in conventional biofilters packed with lava rock. *Water Research*. 39(11): 2395-2393.

PRADO O.J., GABRIEL D. AND LAFUENTE J., 2009. Economical assessment of the design, construction and operation of open-bed biofilters for waste gas treatment. *Journal of Environmental Management*. 90(8): 2515-2523.

PRÉ P., LE CLOIREC P., GERENTE C. AND ANDRES Y., 2004. Bioprocédés en traitement de l'air : mise en œuvre. *Ed. Techniques Ingénieur*, G1780.

PRENAFETA-BOLDÚ F.X., VERVOORT J., GROTENHUIS J.T.C. AND VAN GROENESTIJN J.W., 2002. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora sp*. strain T1. *Applied and Environmental Microbiology.* 68(6): 2660–2665.

PRENAFETA-BOLDÚ F. X., GUIVERNAU M., GALLASTEGUI G., VIÑAS M., HOOG G. S. AND ELÍAS A., 2012. Fungal/bacterial interactions during the biodegradation of TEX hydrocarbons (toluene, ethylbenzene and p-xylene) in gas biofilters operated under xerophilic conditions. *FEMS Microbiology Ecology*. 80(3): 722–734.

PRIEMÉ A., BRAKER G. AND TIEDJE J.M., 2002. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(4): 1893–1900.

QI B. AND MOE W.M., 2006. Performance of low pH biofilters treating a paint solvent mixture: continuous and intermittent loading. *Journal of hazardous materials*. 135(1-3): 303-310.

RAMÍREZ-LÓPEZ E., CORONA-HERNÁNDEZ J., DENDOOVEN L., RANGEL P. AND THALASSO F., 2003. Characterization of five agricultural by-products as potential biofilter carriers. *Bioresource Technology.* 88(3): 259–263.

RAPPÉ M.S., AND GIOVANNONI S.J., 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology.* 57(1): 369–394.

RAYU S., KARPOUZAS D.G., AND SINGH B.K., 2012. Emerging technologies in bioremediation: constraints and opportunities. *Biodegradation.* 23(6): 917-926.

RENE E.R., MURTHY D.V.S. AND SWAMINATHAN T., 2010. Effect of flow rate, concentration and transient-state operation on the performance of a biofilter treating xylene vapors. *Water Air Soil Pollution*. 211(1-4): 79–93.

RENE E.R., MOHAMMAD B.T., VEIGA M.C. AND KENNES C., 2012. Biodegradation of BTEX in a fungal biofilter: Influence of operational parameters, effect of shock-loads and substrate stratification. *Bioresource Technology* 116: 204–213.

ROCH, F., AND ALEXANDER M., 1997. Inability of bacteria to degrade low concentrations of toluene in water. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 16(7): 1377–1383.

ROESCH L.F.W., FULTHORPE R.R., RIVA A., CASELLA G., HADWIN A.K.M., KENT A.D., DAROUB S.H.F., CAMARGO A.O., FARMERIE W.G. AND TRIPLETT E.W., 2007. Pyrosequencing enumerates and

contrasts soil microbial diversity. *International Society for Microbial Ecology Journal.* 1**:** 283-290.

ROUKOS J., RIFFAULT V., LOCOGE N. AND PLAISANCE H., 2009. VOC in an urban and industrial harbor on the French North Sea coast during two contrasted meteorological situations. *Environmental Pollution*. 157: 3001–3009.

ROUQUEROL F., ROUQUEROL J. AND SING K., 1999. *Adsorption by Powders and Porous Solids: Principles, Methodology and Applications*. Academic Press, Inc., New York.

ROUSTAN M., 2004. Absorption en traitement de l'air. *Ed. Techniques Ingénieur*, G1750.

LE ROUX X., BARDY M., LOISEAU P. AND LOUAULT F., 2003. Stimulation of soil nitrification and denitrification by grazing in grasslands: do changes in plant species composition matter? *Oecologia.* 137(3): 417–425.

RÖSCH C., MERGEL A. AND BOTHE H., 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(8)**:** 3818-3829.

RYU H.W., KIM S.J., CHO K.S. AND LEE T.H., 2008. Toluene degradation in a polyurethane biofilter at high loading. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 13 (3): 360-365.

RYU H.W., CHO K.S. AND CHUNG D.J., 2010. Relationships between biomass, pressure drop, and performance in a polyurethane biofilter. *Bioresource Technology*. 101(6): 1745-1751.

SAKANO, Y., AND KERKHOF L., 1998. Assessment of changes in microbial community structure during operation of an ammonia biofilter with molecular tools. *Applied and Environmental Microbiology.* 64(12): 4877–4882.

SAKUMA T., HATTORI T. AND DESHUSSES M.A., 2006. Comparison of different packing materials for the biofiltration of air toxics. *Journal of the Air & Waste Management Association.* 56(11): 1567–1575

SAKUMA T., HATTORI T. AND DESHUSSES M.A., 2009. The effects of a lower irrigation system on pollutant removal and on the microflora of a biofilter. *Environmental Technology.* 30(6): 621–627.

SCALA D.J. AND KERKHOF L.J., 1998. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS Microbiology Letters*. 162: 61–68.

SCHLOSS P.D., WESTCOTT S.L., RYABIN T., HALL J.R., HARTMANN M., HOLLISTER E.B., LESNIEWSKI R., OAKLEY B.B., PARKS D.H., ROBINSON C.J., SAHL J.W., THALLINGER G.G., VAN HORN D.J. AND WEBER, C.F., 2009. Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(23): 7537–7541.

SCHLOSS, P.D., GEVERS D., AND WESTCOTT S.L., 2011. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. Eds: Gilbert J. A. *PLoS ONE.* 6(12): 1-14.

SCHULZ T.J., 2009. Biofiltration full scale applications: challenges and solutions. *Proceedings of the 3rd Congress on Biotechniques for Air Pollution Control*, Delft, The Netherlands, 28-30/09/2009. Eds: Bartacek J. and Lens P.N.L. pp 83-84.

SEMPERE F., GALBALDON C., MARTINEZ-SORIA V., MARZAL P., PENYA-ROYA J.M. AND ALVAREZ-HORNOS F.J., 2008. Performance evaluation of a trickling filter treating a mixture of oxygenated VOCs during intermittent loading. *Chemosphere*. 73: 1533-1539.

SEO J.S., KEUM Y.S. AND LI Q.X., 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 6: 278- 309.

SHAREEFDEEN Z.M., SHAIKH A.A. AND AZAM S.M., 2010 Effect of water content on biofilter performance. *Journal of chemical engineering of Japan*. 43(7): 569-574.

SHERIDAN B. A., CURRAN T.P. AND DODD V.A., 2003. Biofiltration of n-butyric acid for the control of odour. *Bioresource Technology.* 89(2): 199–205.

SHIM E.H., KIM J., CHO K.-S. AND RYU H.W., 2006. Biofiltration and inhibitory interactions of gaseous benzene, toluene, xylene, and methyl tert-butyl ether. *Environmental Science & Technology.* 40(9): 3089–3094.

SHINODA Y., SAKAI Y., UENISHI H., UCHIHASHI Y., HIRAISHI A., YUKAWA H., YURIMOTO H. AND KATO N., 2004. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera sp.* strain DNT-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3): 1385–1392.

SHOUN H., KIM D.H., UCHIYAMA H. AND SUGIYAMA J., 1992. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 94(3): 277-281.

SIDDIQUI R.A., WARNECKE-EBERZ U., HENGSBERGER A., SCHNEIDER B., KOSTKA S. AND FRIEDRICH B., 1993. Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of Bacteriology*. 175(8): 5867-5876.

SINGH R., PAUL D. AND JAIN R.K., 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology.* 14(9): 389–397.

SINGLETON D.R., RICHARDSON S.D. AND AITKEN M.D., 2011 Pyrosequence analysis of bacterial communities in aerobic bioreactors treating polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Biodegradation.* 22(6): 1061–1073.

SIPILÄ T.M., KESKINEN A.K., ÅKERMAN M.L., FORTELIUS C., HAAHTELA K. AND YRJÄLÄ K., 2008. High aromatic ring-cleavage diversity in birch rhizosphere: PAH treatment - specific changes of I.E.3 group extradiol dioxygenases and 16S rRNA bacterial communities in soil. *International Society for Microbial Ecology Journal.* 2: 968-981.

SMITH M.S. AND TIEDJE J.M., 1979. Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. *Soil Biology & Biochemistry.* 11(3): 261-267.

SOGIN M.L., MORRISON H.G., HUBER J.A., WELCH D.M., HUSE S.M., NEAL P.R., ARRIETA J.M. AND HERNDL G.J., 2006. Microbial diversity in the deep dea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings Of the National Academy of Sciences of the United State of America.* 103(32): 12115–12120

SONG J., RAMIREZ J. AND KINNEY K.A., 2003. Nitrogen utilization in a vapor-phase biofilter. *Water Research*. 37(18): 4497-4505.

SORIAL G., SMITH F.L., SUIDAN M.T., BISWAS P. AND BRENNE R.C., 1997. Performance of peat biofilter: impact of the empty bed residence time, temperature and toluene loading. *Journal of Hazardous Materials*. 53(1-3): 19–33

STAUB DE MELO J.V. AND TRICHÊS G., 2012. Evaluation of the influence of environmental conditions on the efficiency of photocatalytic coatings in the degradation of nitrogen oxides (NOx). *Building and Environment.* 49: 117–123.

STEPHENS S., 2012. BTEX Metabolism Metapathway Map. UM-BBD, Disponible sur: http://umbbd.ethz.ch/BTEX/BTEX_map.html. Consulté le 6/06/2012.

SUN Y., QUAN X., CHEN J., YANG F., XUE D., LIU Y. AND YANG Z., 2002. Toluene vapour degradation and microbial community in biofilter at various moisture content. *Process Biochemistry.* 38(1): 109–113.

SUN W., SUN X., AND CUPPLES A.M., 2012. Anaerobic methyl tert-butyl ether-degrading microorganisms identified in wastewater treatment plant samples by stable isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology.* 78(8): 2973–2980.

SZYSZKOWICZ M., 2009. Air pollution and ED visits for chest pain. *The American Journal of Emergency Medicine*. 27(2): 165-168.

UGREKHELIDZE, D., KORTE, F. AND KVESITADZE G., 1997. Uptake and transformation of benzene and toluene by plant leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 37(1): 24–29.

UMBBD, 2012. Microbial biocatalytic reactions and biodegradation pathways. Disponible sur : http://umbbd.ethz.ch/ Consulté le 20/06/2012.

TARONCHER-OLDENBURG G., GRINER E.M., FRANCIS C.A., AND WARD B.B., 2003. Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(2): 1159–1171.

TIEDJE J.M., SIMKINS S. AND GROFFMAN P.M., 1989. Perspectives on measurement of denitrification in the field including recommended protocols for acetylene based methods. *Plant and Soil*. 115: 261-284.

TUCKER T., MARRA M. AND FRIEDMAN J.M., 2009. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *The American Journal of Human Genetics.* 85(2): 142–154.

VERGARA-FERNÁNDEZ A., LARA MOLINA L., PULIDO N. A. AND AROCA G., 2007. Effects of gas flow rate, inlet concentration and temperature on the biofiltration of toluene vapors. *Journal of Environmental Management*. 84(2): 115–122.

VERON J., 2007. La moitié de la population mondiale vit en ville. *Population & Sociétés, Bulletin mensuel d'information de l'institut national d'études démographique*. 435: 1-4.

VILAIN G., GARNIER J., ROOSE-AMSALEG C. AND LAVILLE P., 2012 Potential of denitrification and nitrous oxide production from agricultural soil profiles (Seine Basin, France). *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 92(1): 35–50.

VOGEL T.M., SIMONET P., JANSSON J.K., HIRSH P.R., TIEDJE J.M., VAN ELSAS J.D., BAILEY M.J., NALIN R. AND PHILIPPOT L., 2009. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. *Nature Reviews Microbiology.* 7: 252.

WALLENSTEIN M.D., MYROLD D.D., FIRESTONE M. AND VOYTEK M., 2006. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological Applications*. 16(6): 2143-2152.

WANG, J. AND BAKKEN L.R., 1997. Competition for nitrogen during mineralization of plant residues in soil: microbial response to C and N availability. *Soil Biology & Biochemistry.* 29(2): 163-170.

WANG A., WU L., REN N., ZHAO D. AND YAN M., 2005. Feasibility of denitrifying phosphorus removal technique using nitrite as electron acceptor. *China Environmental Science*. 2005-05.

WANG S., ANG H.M. AND TADE M.O., 2007. Volatile organic compounds in indoor environment and photocatalytic oxidation: state of the art. *Environment International*. 33: 694–705.

WANG Z. AND ZHANG J.S., 2011 Characterization and performance evaluation of a full-scale activated carbon-based dynamic botanical air filtration system for improving indoor air quality. *Building and Environment*. 46(3): 758-768.

WANG Z., PEI J. AND ZHANG J.S., 2012. Modeling and simulation of an activated carbon-based botanical air filtration system for improving indoor air quality. *Building and Environment*. 54: 109–115.

WEELINK S.A.B., EEKERT M.H.A. AND STAMS A.J.M., 2010. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 9(4): 359–385.

WILL C., THURMER A., WOLLHERR A., NACKE H., HEROLD N., SCHRUMPF M., GUTKNECHT J., WUBET T., BUSCOT F. AND DANIEL R., 2010. Horizon-specific bacterial community composition of german grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology.* 76(20): 6751–6759.

WOLVERTON B.C., MCDONALD R.C. AND WATKINS E.A., 1984. Foliage plants for removing indoor air pollutants from energy-efficient homes. *Economic Botany.* 38(2): 224–228.

WOLVERTON B.C., MCDONALD R.C. AND MARBLE L.K., 1985. Removal of benzene and its derivatives from polluted water using the reed/microbial filter technique. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences*. 29: 119-127.

WOLVERTON B. C., JOHNSON A. AND BOUNDS K., 1989. Interior landscape plants for indoor air pollution abatement. *Interiorscape*. 8(6): 37-63.

WOLVERTON B.C. AND WOLVERTON J.D., 1993. Plants and soils microorganisms: removal of formaldehyde, xylene, and ammonia from the indoor environment. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences*. 38(2): 11-15.

WOLVERTON B.C. AND WOLVERTON J.D., 1996. Interior plants: their influence on airborne microbes insides energy-efficient buildings. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences*. 41(2): 99-105.

WOOD R.A., BURCHETT M.D., ALQUEZAR R., ORWELL R.L., TARRAN J. AND TORPY F., 2006. The potted-plant microcosm substantially reduces indoor air VOC pollution: I. Office field-study. *Water, Air, and Soil Pollution.* 175(1-4): 163–180.

XIE, S., SUN W., LUO C. AND CUPPLES A.M., 2011. Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing. Biodegradation. 22(1): 71-81.

XU Z., QIN N., WANG J. AND TONG H., 2010. Formaldehyde biofiltration as affected by spider plant. *Bioresource Technology.* 101(18): 6930–6934.

YADAV J.S. AND REDDY C.A., 1993. Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium. Applied and Environmental Microbiology*. 59(3): 756-762.

YAN T., FIELDS M.W., WU L., ZU Y., TIEDJE J.M. AND ZHOU J., 2003. Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (nirK and nirS) from nitrate and uranuim-contaminated groundwater. *Environmental Microbiology*. 5(1): 13-24.

YANG D.S., PENNISI S.V., SON K.C. AND KAYS S.J., 2009. Screening indoor plants for volatile organic pollutant removal efficiency. *HortScience.* 44(5): 1377–1381.

YEOM S.H. AND YOO Y.J., 1997. Overcoming the inhibition effects of metal ions the degradation of benzene and toluene by *Alcaligenes xylosoxidans* Y234. *Korean Journal of Chemical Engineering.* 14(3): 204-208.

YOON I.K. AND PARK C.H., 2002. Effects of gas flow rate, inlet concentration and temperature on biofiltration of volatile organic compounds in a peat-packed biofilter. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 93(2): 165–169.

ZHU X., SUIDAN,M.T., PRUDEN A., YANG C., ALONSO C., KIM B.J. AND KIM B.R., 2004. Effect of substrate Henry's constant on biofilter performance. *Journal of the Air and Waste Management Association*. 54(4): 409-418.

ZHAO J. AND YANG X., 2003. Photocatalytic oxidation for indoor air purification: a literature review. *Building and Environment*. 38(5): 645–654.

ZINGER L., GOBET A. AND POMMIER T., 2012. Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. *Molecular Ecology.* 21(8): 1878–1896.

ZOUACHE K., MICHELLAND R.J., FAILLOUX A.B., GRUNDMANN G.L. AND MAVINGUI P., 2012. Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Molecular Ecology*. 21(9): 2297–2309.

ZYLSTRA G.J. AND KIM E., 1997. Aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 19(5-6): 408–414.