



**HAL**  
open science

# Dégradation biologique des polychlorobiphényles

Matthieu Sangely

► **To cite this version:**

Matthieu Sangely. Dégradation biologique des polychlorobiphényles. Génie des procédés. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2010. Français. NNT : 2010INPT0094 . tel-04275913

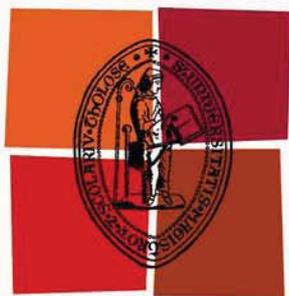
**HAL Id: tel-04275913**

**<https://theses.hal.science/tel-04275913v1>**

Submitted on 8 Nov 2023

**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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**  
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

**Discipline ou spécialité :**  
Génie des procédés et de l'environnement

---

**Présentée et soutenue par :**  
Matthieu SANGELY

**le :** jeudi 8 juillet 2010

**Titre :**

Dégradation biologique des polychlorobiphényles

---

**JURY**

Pr. Marie-Elisabeth BORREDON, LCA UMR INPT/INRA 1010, Président  
Dr. Caroline SABLAYROLLES, LCA UMR INPT/INRA 1010, Invitée  
Dr. Laurent THANNBERGER, VALGO SA, Invité  
DR. Christine GASPIN, INRA Toulouse, Invité  
Dr. Arnaud HELIAS, Montpellier SupAgro, Membre

---

**Ecole doctorale :**

Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Génie Chimique UMR INPT/UPS/CNRS 5503

**Directeur(s) de Thèse :**

Pr. Pierre STREHAIANO, LGC UMR INPT/UPS/CNRS 5503, Membre  
Dr. Mireille MONTREJAUD-VIGNOLES, LCA UMR INPT/INRA 1010, Membre

**Rapporteurs :**

Pr. Jean-Louis MOREL, LSE UMR INPL/INRA 1120  
Pr. Philippe GOULAS, IPREM - EEM UMR UPPA/CNRS 5254

A mes quatre grands-parents, ces inconnus.

*In a fundamental sense, the biosphere is the bacterio-sphere. Carl Woese 1994.*

## Remerciements

Ces remerciements sont l'occasion de saluer les personnes grâce auxquelles j'ai pu mener ce travail, conclusion de 4-5 ans de recherche.

En premier lieu, je remercie chaleureusement le professeur Elisabeth BORREDON d'avoir accepté de présider le jury de la soutenance de cette thèse. Je salue également la directrice de laboratoire qui a toujours encouragé les collaborations pluridisciplinaires, sans lesquelles cette thèse n'existerait pas.

Je remercie les professeurs Jean-Louis MOREL et Philippe GOULAS d'avoir lu en profondeur et jugé ce manuscrit. Ce fut un honneur d'avoir été évalué par vous.

Je salue chaleureusement mes deux directeurs de thèse, Pierre STREHAIANO et Mireille MONTREJAUD – VIGNOLES. Pierre, votre longue expérience de la microbiologie a été précieuse. Avec la biologie moléculaire on a vite fait d'oublier les enseignements de la microbiologie classique, pourtant essentielle à la bonne compréhension des phénomènes. Vous avez su me remettre sur les bons rails au moment d'interpréter certains résultats. J'espère sincèrement vous côtoyer de nouveau, sûrement au détour d'un GR pyrénéen ! Mireille, il y aurait beaucoup de chose à dire tant nos interactions durant ces 3 ans ont été nombreuses. J'espère m'être un peu amélioré à votre contact dans mon approche du métier de chercheur, dans mon expression écrite et orale si laborieuse au début de cette thèse. Je sais tout ce que je vous dois et je n'oublierai pas certains moments où vous m'avez donné l'aide que je voulais sans oser le demander. J'espère que nous continuerons à collaborer.

Je remercie également Christine GASPIN et Arnaud HELIAS d'avoir accepté de lire ce travail et de faire partie du jury.

Mireille a inculqué une culture d'équipe de recherche. Ce travail est aussi le fruit de toute une équipe, dont je veux remercier les membres ici : Caroline SABLAYROLLES qui a suivi au plus près cette thèse dont les compétences en chimie analytique et en analyse de cycle de vie ont été précieuses. Cette compétence s'allie avec une extrême gentillesse et bienveillance qui contribue grandement à créer une ambiance de travail à la fois agréable et efficace. Merci pour tout ! Claire VIALLE qui a subi bien malgré elle mes errements organisationnels. Tu as toujours été là pour me filer un coup de main même que pieds-levé. J'aurais aimé te rendre la pareille pour la fin de ta thèse mais heureusement pour toi, tu gères déjà tout très bien ! Je remercie également Audrey BRETON qui m'a sauvé la vie le jour de la soutenance en acceptant de m'assister. Encore une fois, je me sens coupable de ne pouvoir rendre le coup de main, sûrement la croix de ceux qui finissent en premier !

Un peu plus tard est arrivé Guillaume BUSSET, que je remercie vivement pour sa gentillesse et sa compétence extrême en analyse de cycle de vie. A vrai dire, je lui dois tout ou presque sur le sujet ! En plus de ressembler à Jared Leto, il a le don d'attirer la sympathie et je n'ai pas échappé à la règle. Guillaume, merci pour tout, je ne m'étends pas, j'ai déjà dit tout le bien que je pense de toi.

Ce qui me permet de faire la transition avec toute la joyeuse bande du laboratoire sans qui il est difficile de survivre au quotidien de la vie du thésard qui est remplie de frustration. Je vais de toute manière oublier des gens, mais j'aimerais remercier particulièrement Sylvain FORET, qui pour moi cumule les titres mondiaux d'homme le plus drôle avec celui d'homme le plus cultivé, ce fût une joie de partager le bureau avec toi ; Romain RICHARD qui dessous ses airs de basque terrifiant est l'une

des personnes les plus gentilles que j'ai croisées (et en plus il a deux prénom) ; William PIANG-SIONG, ton rire communicatif mettait de la joie dans ce bureau ; Leslie JAQUEMIN, la brillante relève, Emeline MORALES et son sourire communicatif, Dorothée, Louise et tous les autres... Lupita VACA-MEDINA : on a démarré et fini en même temps... Merci pour tous ces bons moments !; je pense aussi aux anciens combattants, Fabien GASC et Mathieu MAZZA de qui j'ai appris les us et coutumes du labos... Merci donc à tous, j'ai passé 3 excellentes années à vos côtés.

Sur mes 3 ans, j'ai tout de même passé presque 2 ans au sein de l'ENFA où j'ai rencontré bon nombre de gens qui m'ont beaucoup appris et aidés : Olivine GOUREAU, Nathalie DARDENNE, Virginy CHATAIN, Christine DUCAMP, Gilles LESPINASSE et le meilleur d'entre tous (et tout le monde sera d'accord !!) el Señor Felipe RAMON-PORTUGAL !

Je remercie également, l'entreprise VALGO, notamment Laurent THANNBERGER et Patrick COSTES. C'est un plaisir de travailler et d'échanger avec vous. J'ai joui d'une grande liberté assortie d'un soutien logistique sans faille !

Je n'oublie pas également les personnes qui très tôt dans ma scolarité m'ont donné le goût de la recherche : Georges MERLINA, Michel KAEMMERER, Maritxu GUIRESSE, Jean-Claude REVEL. Je remercie particulièrement Eric PINELLI avec j'ai passé une très année de MASTER et Jérôme SILVESTRE qui fût mon tout premier maitre de stage en laboratoire. Cette première expérience a vraiment été fondatrice et je ne l'oublierai jamais. Cette première expérience a été aussi l'occasion de croiser Bertrand POURRUT et Geoffroy PERCHET, qui par leur (contre)exemple m'ont indiqué le chemin qui mène vers la thèse. Merci les gars, à mon tour de voler la banque !

Je remercie bien évidemment ma famille qui est venue en masse à ma soutenance. Mes parents, mes sœurs qui ont toujours entretenus un climat de découverte à la maison, ce qui a probablement conditionné mon goût pour la recherche. Je me souviens de vos réserves quand j'ai voulu faire de la recherche, j'en avais de dire : c'est de votre faute !!

Je remercie chaleureusement Jessica MARTIRIGGIANO qui a accueilli le petit oiseau tombé du nid. Merci pour tout Bella.

Je veux également saluer Amandine FABRELLO. Nos discussions autour du café quotidien ont été très importantes pour moi. J'aurais aimé le dire mieux au moment voulu, mais merci.

Enfin, je tiens également à remercier sincèrement Chrystel AMBARD, qui a partagé les derniers moments de cette thèse qui sont par définition les plus pénibles... Ton aide et on soutien furent très important pour moi. Je ne le méritais peut-être pas, mais merci du fond du cœur de tout ce que tu as fait pour moi.

# Sommaire

<b>Sommaire</b>	<b>4</b>
-----------------	----------

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
------------------------------	----------

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique** \_\_\_\_\_ **4**

<b>I Introduction</b>	<b>5</b>
-----------------------	----------

<b>II Dépollution des sols</b>	<b>6</b>
--------------------------------	----------

<b>II.1 Interface complexe</b>	<b>6</b>
--------------------------------	----------

<b>II.2 Enjeux de la dépollution des sols contaminés</b>	<b>6</b>
----------------------------------------------------------	----------

<b>II.3 Techniques de dépollution des sols</b>	<b>7</b>
------------------------------------------------	----------

II.3.1 Généralités	7
--------------------	---

II.3.2 Objectif d'un chantier de dépollution	7
----------------------------------------------	---

II.3.3 Techniques non biologiques	8
-----------------------------------	---

II.3.3.1 Tri physique, lavage chimique.	8
-----------------------------------------	---

II.3.3.2 Désorption thermique	8
-------------------------------	---

II.3.3.3 Venting et air-sparging	9
----------------------------------	---

II.3.3.4 L'oxydation in-situ	9
------------------------------	---

<b>II.4 Législation</b>	<b>9</b>
-------------------------	----------

II.4.1 Directives européennes	9
-------------------------------	---

II.4.1.1 Directive n° 2004/35/CE du 21/04/04	9
----------------------------------------------	---

II.4.1.2 Proposition de Directive-Cadre Sol	10
---------------------------------------------	----

II.4.2 Droit français	10
-----------------------	----

II.4.2.1 Loi n° 75-633 du 15 juillet 1975	10
-------------------------------------------	----

II.4.2.2 Loi n° 76-663 du 19 juillet 1976	11
-------------------------------------------	----

II.4.2.3 Circulaire 8 février 2007	11
------------------------------------	----

<b>III Polychlorobiphényles</b>	<b>12</b>
---------------------------------	-----------

<b>III.1 Chimie des Polychlorobiphényles</b>	<b>12</b>
----------------------------------------------	-----------

<b>III.2 Synthèse</b>	<b>13</b>
-----------------------	-----------

<b>III.3 Propriétés physico-chimiques</b>	<b>14</b>
-------------------------------------------	-----------

<b>III.4 Formulations et usages des PCB</b>	<b>14</b>
---------------------------------------------	-----------

III.4.1 Différents usages des PCB	14
-----------------------------------	----

III.4.2 Spécialités commerciales à base de PCB	14
------------------------------------------------	----

<b>III.5 Toxicologie et dispersion dans l'environnement</b>	<b>15</b>
-------------------------------------------------------------	-----------

III.5.1 Risques toxicologiques	15
--------------------------------	----

III.5.2 Source et dispersion dans l'environnement	16
---------------------------------------------------	----

<b>III.6 Législation</b>	<b>16</b>
--------------------------	-----------

III.6.1	Droit international	16
III.6.2	Droit communautaire	17
III.6.2.1	Décision du 13 février 1973 de l'OCDE	17
III.6.2.2	Directive 76/769/CEE	17
III.6.2.3	Directive 85/467/CEE	17
III.6.2.4	Directive 96/59/CE	17
III.6.2.5	Autres textes	18
III.6.3	Droit français	18
III.6.3.1	Arrêté du 8 juillet 1975	18
III.6.3.2	Décret n° 87-59 du 2 février 1987	18
III.6.3.3	Décret n°2001-63 du 18 janvier 2001	18
<b>IV</b>	<b>Dégradation des PCB</b>	<b>19</b>
<b>IV.1</b>	<b>Dégradation aérobie</b>	<b>19</b>
IV.1.1	Généralités	19
IV.1.2	Temps de réaction et taux de dégradation observés	21
IV.1.3	Optimisation de l'oxydation des PCB	22
IV.1.3.1	Source de carbone et d'énergie	22
IV.1.3.2	Inducteurs	22
<b>IV.2</b>	<b>Dégradation anaérobie</b>	<b>22</b>
IV.2.1	Généralités	22
IV.2.2	Temps de réaction et taux de déchloration observés	26
IV.2.3	Optimisation de la déchloration réductive	27
IV.2.3.1	Source de carbone facilement assimilable	27
IV.2.3.2	Source d'électrons	27
IV.2.3.3	Accepteurs d'électrons	27
<b>IV.3</b>	<b>Traitement séquentiel anaérobie/aérobie</b>	<b>27</b>
<b>V</b>	<b>Microorganismes</b>	<b>28</b>
<b>V.1</b>	<b>Organismes cultivés</b>	<b>28</b>
V.1.1	Burkholderia xenovorans	28
V.1.1.1	Classification	28
V.1.1.2	Propriétés physico-chimiques	28
V.1.2	Phanerochaete chrysosporium	29
V.1.2.1	Classification	29
V.1.2.2	Propriétés physico-chimiques	30
<b>V.2</b>	<b>Identification des microorganismes non-cultivés</b>	<b>31</b>
V.2.1	Notions d'écologie microbienne	31
V.2.1.1	Généralités	31
V.2.1.2	Écologie microbienne des sols	32
V.2.2	Techniques d'identification	32
V.2.2.1	Techniques basées sur la morphologie et les réactions biochimiques	32
V.2.2.2	Les techniques basées sur la Génétique	33
V.2.2.2.1	L'ADN	34
V.2.2.2.2	Le gène codant pour l'ARNr 16S	34
V.2.2.2.3	Les techniques d'identification par séquençage du gène 16S rRNA	35
V.2.2.2.4	La librairie de clones et séquençage de Sanger	35
V.2.2.2.5	Le Pyroséquençage	36

<b>VI</b>	<b>L'analyse de cycle de vie</b>	<b>37</b>
<b>VI.1</b>	<b>Généralités</b>	<b>37</b>
<b>VI.2</b>	<b>Etapas d'une ACV</b>	<b>37</b>
VI.2.1	Définitions des préliminaires de l'étude	37
VI.2.2	Inventaire de cycle de vie	37
VI.2.3	Analyse des impacts du cycle de vie	38
VI.2.4	Interprétation et analyse de sensibilité	38
<b>VI.3</b>	<b>ACV et dépollution des sols</b>	<b>39</b>
<b>VII</b>	<b>Conclusion</b>	<b>41</b>

## **Chapitre 2 : Dégradation aérobie des polychlorobiphényles** **43**

<b>I</b>	<b>Introduction</b>	<b>44</b>
<b>II</b>	<b>Etude du potentiel de <i>Burkholderia xenovorans</i></b>	<b>45</b>
<b>II.1</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>45</b>
II.1.1	Expérimentation	45
II.1.1.1	Matériel	45
II.1.1.1.1	Réactifs et petits matériels	45
II.1.1.1.2	Micro-organisme	45
II.1.1.1.3	Sols	45
II.1.1.2	Méthodes	46
II.1.1.2.1	Essai de dépollution en milieu liquide	46
II.1.1.2.2	Essai de dépollution en milieu solide	46
II.1.2	Analyses	47
<b>II.2</b>	<b>Résultats et discussion</b>	<b>47</b>
II.2.1	Essai de dépollution en milieu liquide	47
II.2.1.1	Mesure de la croissance de <i>Burkholderia. Xenovorans</i>	47
II.2.1.1.1	Résultats	47
II.2.1.1.2	Discussion	48
II.2.1.2	Mesure de la dégradation des PCB	49
II.2.1.2.1	Résultats	49
II.2.1.2.2	Interprétation	49
II.2.2	Essai de dépollution en milieu solide	50
II.2.2.1	Résultats	50
II.2.2.1.1	Essais sur sol artificiel	50
II.2.2.1.2	Essai sur sol réel	53
II.2.2.2	Interprétation	56
<b>III</b>	<b>Etude du potentiel de <i>Phanerochaete chrysosporium</i></b>	<b>58</b>

<b>III.1</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>58</b>
III.1.1	Expérimentation	58
III.1.1.1	Matériel	58
III.1.1.1.1	Réactifs et petits matériels	58
III.1.1.1.2	Micro-organisme	58
III.1.1.1.3	Sol artificiel	58
III.1.1.2	Méthodes	58
III.1.1.2.1	Essais de dépollution en milieu liquide	58
III.1.1.2.2	Essais de dépollution en milieu solide	59
III.1.2	Analyses	60
<b>III.2</b>	<b>Résultats et Discussions</b>	<b>60</b>
III.2.1	Essais de dépollution en milieu liquide	60
III.2.1.1	Résultats	60
III.2.1.1.1	Expérimentation préliminaire	60
III.2.1.1.2	Fractionnement des PCB	61
III.2.1.1.3	Cinétiques	63
III.2.1.2	Interprétations	69
III.2.1.2.1	Expérimentation préliminaire	69
III.2.1.2.2	Fractionnement des PCB	69
III.2.1.2.3	Cinétiques	69
III.2.2	Essai de dépollution en milieu solide	70
III.2.2.1	Résultats	70
III.2.2.2	Interprétations	72
<b>IV</b>	<b>Conclusion</b>	<b>73</b>

## **Chapitre 3 : Dégradation anaérobie des PCB et application en traitement séquentiel** \_\_\_\_\_ **74**

<b>I</b>	<b>Introduction</b>	<b>76</b>
<b>II</b>	<b>Expérimentation à l'échelle laboratoire</b>	<b>77</b>
<b>II.1</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>77</b>
II.1.1	Expérimentations	77
II.1.1.1	Matériel	77
II.1.1.1.1	Réactifs et petits matériels	77
II.1.1.1.2	Sols	77
II.1.1.2	Méthodes	77
II.1.1.2.1	Obtention de microflores d'intérêt	77
II.1.1.2.2	Expérimentation anaérobie en sol	80
II.1.2	Analyses	81
<b>II.2</b>	<b>Résultats</b>	<b>81</b>
II.2.1	Expérimentation en milieu liquide	81

II.2.1.1	Résultats et interprétation	81
II.2.1.1.1	Observations macroscopiques	81
II.2.1.1.2	Estimation de la dégradation anaérobie	82
II.2.1.2	Discussion	86
II.2.2	Expérimentation en sols	87
II.2.2.1	Résultats	87
II.2.2.1.1	Expérimentations en sols artificiels	87
II.2.2.1.2	Expérimentations en sol réel	92
II.2.2.2	Discussion	96
<b>III</b>	<b>Traitement séquentiel</b>	<b>98</b>
<b>III.1</b>	<b>Matériels</b>	<b>98</b>
III.1.1	Réactifs et petits matériels	98
III.1.2	Sol	98
III.1.3	Microorganismes	99
<b>III.2</b>	<b>Méthodes</b>	<b>99</b>
III.2.1	Expérimentation	99
III.2.1.1	Mise en place des pilotes	99
III.2.1.2	Cycle anaérobie/aérobie	99
III.2.2	Analyses	100
<b>III.3</b>	<b>Résultats</b>	<b>100</b>
<b>III.4</b>	<b>Interprétation</b>	<b>101</b>
<b>IV</b>	<b>Conclusion</b>	<b>103</b>

## **Chapitre 4 : Identification de communautés microbiennes** **104**

<b>I</b>	<b>Introduction</b>	<b>105</b>
<b>II</b>	<b>Méthodologie</b>	<b>106</b>
<b>II.1</b>	<b>Obtention du jeu de données</b>	<b>106</b>
II.1.1	Echantillons analysés	106
II.1.2	Séquençage du gène 16S	106
II.1.2.1	Choix de la zone ciblée	106
II.1.2.2	Séquençage	107
<b>II.2</b>	<b>Analyse bioinformatique</b>	<b>107</b>
II.2.1	Moyen de calculs	107
II.2.2	Outils informatiques	107
II.2.2.1	Sélection des résultats	108
II.2.2.1.1	Analyse du jeu de données	108

II.2.2.1.2	Interprétation biologique	108
<b>III</b>	<b>Résultats</b>	<b>111</b>
<b>III.1</b>	<b>Analyse des données</b>	<b>111</b>
III.1.1	ReadQualStats	111
III.1.2	Pyrocleaner	113
<b>III.2</b>	<b>Traduction biologique</b>	<b>113</b>
III.2.1	Richesse taxonomique au niveau des familles	113
III.2.1.1	Sédiments frais (CJ2F, CJ3F et RH050F)	113
III.2.1.2	Sols et sédiments conditionnés	115
III.2.2	Intersection au niveau des familles	116
III.2.2.1	Sédiments frais	116
III.2.2.2	Communauté CJ2	117
III.2.2.3	Essais de dépollution biologique	117
III.2.3	Intersection au niveau des séquences	118
<b>IV</b>	<b>Interprétation</b>	<b>120</b>
<b>IV.1</b>	<b>Composition en famille des microflores</b>	<b>120</b>
IV.1.1	Familles issues du milieu naturel	120
IV.1.2	Familles issues des expérimentations	121
<b>IV.2</b>	<b>Intersections des familles</b>	<b>121</b>
IV.2.1	Familles issues du milieu naturel	121
IV.2.2	Familles issues des expérimentations avec CJ2	122
IV.2.3	Familles issues des essais de dépollution biologique	122
<b>IV.3</b>	<b>Intersections des espèces</b>	<b>122</b>
IV.3.1	Recherche exploratrice	122
IV.3.2	Recherche dirigée	123
<b>V</b>	<b>Conclusion</b>	<b>124</b>

## **Chapitre 5 : Analyses de cycle de vie** \_\_\_\_\_ **125**

<b>I</b>	<b>Introduction</b>	<b>126</b>
<b>II</b>	<b>Processus d'aération d'un sol lors du traitement biologique</b>	<b>127</b>
<b>II.1</b>	<b>Définition des objectifs et du champ de l'étude</b>	<b>127</b>
II.1.1	Objectifs de l'étude	127
II.1.2	Champ de l'étude	127
II.1.2.1	Systèmes comparés	127
II.1.2.1.1	Aération mécanique par retournement	127
II.1.2.1.2	Aération automatique par insufflation d'air	127
II.1.2.2	Définition de l'unité fonctionnelle	127
II.1.2.3	Frontières du système	128

II.1.2.4	Hypothèses	128
<b>II.2</b>	<b>Inventaire du Cycle de Vie du procédé</b>	<b>129</b>
II.2.1	Description des étapes du cycle de vie	129
II.2.2	Recueil des données	131
II.2.2.1	Données d'intrants	131
II.2.2.2	Données d'émissions et d'extraction	131
II.2.3	Analyse de la qualité des données	133
<b>II.3</b>	<b>Analyse des Impacts du Cycle de Vie du procédé</b>	<b>135</b>
II.3.1	Choix de la méthode et des catégories évaluées	135
II.3.2	Classification des résultats d'ICV	135
II.3.3	Caractérisation des impacts : résultats	136
<b>II.4</b>	<b>Interprétations</b>	<b>141</b>
<b>III</b>	<b>Processus de dépollution de sols pollués aux PCB : incinération vs dépollution biologique</b>	<b>143</b>
<b>III.1</b>	<b>Définition des objectifs et du champ de l'étude</b>	<b>143</b>
III.1.1	Objectifs de l'étude	143
III.1.2	Champ de l'étude	143
III.1.2.1	Systèmes comparés	143
III.1.2.1.1	Incinération	143
III.1.2.1.2	Traitement biologique	143
III.1.2.2	Définition de l'unité fonctionnelle	143
III.1.2.3	Frontières du système	144
III.1.2.4	Hypothèses	144
<b>III.2</b>	<b>Inventaire du Cycle de Vie des procédés</b>	<b>145</b>
III.2.1	Description des étapes du cycle de vie	145
III.2.2	Recueil des données	148
III.2.2.1	Données d'intrants	148
III.2.2.2	Données d'émissions et d'extraction	151
III.2.3	Analyse de la qualité des données	151
<b>III.3</b>	<b>Analyse des Impacts du Cycle de Vie des procédés</b>	<b>152</b>
III.3.1	Choix de la méthode et des catégories évaluées	152
III.3.2	Classification des impacts	152
III.3.3	Caractérisation des impacts : résultats	152
<b>III.4</b>	<b>Interprétation</b>	<b>157</b>
III.4.1	Analyse de sensibilité	157
III.4.2	Limites et recommandations	158
<b>IV</b>	<b>Conclusion</b>	<b>160</b>
	<b>Conclusion générale</b>	<b>161</b>

**Annexes** \_\_\_\_\_ *I*

**Références bibliographiques** \_\_\_\_\_ *i*

**Liste des tableaux** \_\_\_\_\_ *xi*

**Listes des figures** \_\_\_\_\_ *xiv*

**Liste des équations** \_\_\_\_\_ *12*

# **Introduction générale**

Situés à l'interface complexe entre l'hydrosphère, la géosphère et la biosphère, les sols sont un compartiment primordial à surveiller. Ils ont pour fonction essentielle de supporter physiquement toute activité humaine. Leur surface est limitée sur Terre, c'est donc une ressource à priori non renouvelable qu'il faut ménager. Les activités industrielles, notamment celles initiées dès le XIX<sup>ème</sup> siècle et l'accélération des progrès techniques, ont laissé derrière elles des sols pollués dangereux (Morel, 2009). L'industrie chimique, tout en permettant des progrès techniques décisifs, a émis un certain nombre de molécules qui, aujourd'hui, sont considérées comme néfastes pour l'Homme et son environnement. Les polychlorobiphényles (PCB) font partie de ces molécules très appréciées pour leurs propriétés industrielles qui polluent aujourd'hui les sols, et par extension les cours d'eau, la faune aquatique et terrestre.

Les PCB sont synthétisés pour la première fois en 1881 par Schmidt et Schultz en Allemagne (Maugh II, 1973). Le faible coût de production et la grande stabilité chimique de cette famille de molécules intéressent l'industrie dès les années 1930. Les premières productions industrielles de PCB sont réalisées dès 1929, à l'usine de la Theodore Swann Chemical Company à Anniston, Alabama, Etats-Unis. Rapidement, en 1935, la société Monsanto rachète l'usine et émet des licences de production de PCB à d'autres entreprises. La production de PCB devient mondiale et intensive (Beiles, 2000). Les PCB remplacent alors la famille des Chloronaphtalènes dans de nombreux usages nécessitant une stabilité chimique et thermique (NICNAS, 2002).

Un rapport de l'Assemblée Nationale rapporte que la production mondiale de PCB entre 1929 et 1987 a été de 1,3 millions de tonne dont environ 400 000 tonnes seraient dispersées dans l'Environnement. D'autres chiffres annoncent 750 000 tonnes dispersées. Malgré les premières alertes médicales dès 1937 (Drinker *et al.*, 1937) faisant état de l'effet de quelques hydrocarbures halogénés dont des PCB sur le foie, ce n'est qu'en 1966 qu'une équipe de recherche suédoise alerte la Communauté scientifique sur l'étendue de la contamination (Jensen, 1966). Il fallut attendre une catastrophe sanitaire majeure impliquant des PCB pour que les Etats-Unis, commencent à restreindre progressivement leur utilisation en 1973, jusqu'à leur interdiction complète en 1979 (US-EPA, 2007). L'Europe et la France emboîtèrent le pas avec un peu retard, les PCB n'étant interdits qu'en 1987.

Depuis de nombreuses études ont été menées sur la dispersion des PCB, révélant qu'aucun compartiment de l'Environnement n'est aujourd'hui épargné (Waid, 1986). Les PCB figurent ainsi sur la liste des polluants organiques persistants prioritaires établie par le Programme des Nations Unies pour l'Environnement en 2004 lors de la Convention de Stockholm (PNUE, 2004). Face à ce constat, les pouvoirs publics ont décidé la planification de la destruction de PCB (Décret n°2001-63 du 18 janvier 2001). En France, le plan prévoit la destruction de tous les appareils contenant des PCB au plus tard en 2010. Cependant, se pose toujours le problème des PCB déjà dispersés dans l'environnement. Les sols sont l'un des réceptacles de cette contamination. Dans ce domaine également le législateur a durci le cadre juridique afin de protéger le sol des pollutions dans le cadre du suivi des installations classées pour l'environnement (Article L551-1 et suivants pour la partie législative et Article D511-1 et suivants pour la partie réglementaire, du Code de l'environnement).

La conjonction de ces deux cadres législatifs favorise le lancement de programmes de recherche sur des techniques innovantes pour le traitement des sols contaminés par des PCB. C'est ainsi que la société VALGO, entreprise toulousaine spécialisée dans la réhabilitation des friches industrielles a financé le travail de thèse décrit dans ce manuscrit, portant sur la dégradation biologique des Polychlorobiphényles.

Pour traiter les sols contaminés par des PCB, des procédés thermiques sont généralement mis en place. Le plus célèbre d'entre eux est l'incinération à haute température. Malheureusement, les procédés thermiques impliquant des PCB peuvent mener à la production de PolyChloroDibenzoDioxines (PCDD) et de PolyChloroDibenzoFuranes (PCDF) autres hydrocarbures halogénés hautement toxiques. Il est donc important de chercher des voies

alternatives de traitement. Dès les années 70, la dégradation biologique des PCB est établie (Baxter *et al.*, 1975). En condition aérobie, quelques microorganismes sont capables de métaboliser des PCB faiblement chlorés. Une décennie plus tard, une équipe américaine, en étudiant la contamination de la Rivière Hudson à New-York, met en évidence le phénomène de biotransformation par voie anoxique (Brown *et al.*, 1987). Les solutions de traitement biologique deviennent alors une alternative envisageable à l'incinération ou au stockage systématique des sols contaminés par des PCB. Elles présentent plusieurs avantages. Elles sont moins onéreuses, n'émettent pas de sous-produits toxiques et nécessitent moins d'énergie fossile. Elles ont à priori un avantage environnemental. L'une des méthodes pour vérifier cet avantage environnemental des solutions biologiques est l'Analyse du cycle de vie.

L'analyse de cycle de vie permet de comparer les performances environnementales de procédés (Jolliet *et al.*, 2005). La question se pose pleinement pour le domaine de la dépollution biologique des sols. C'est pourquoi cet outil est de plus en plus évoqué par les pouvoirs publics et les professionnels de la dépollution lors du choix d'une technique. Dans le cadre d'un projet de recherche, l'ACV sert également de guide pour les choix à faire lors de la phase d'industrialisation d'un phénomène observé en laboratoire.

Malgré tous les avantages que peuvent avoir les solutions biologiques de traitement de sols contaminés par des PCB, malgré les nombreuses études en laboratoire, aucun spécialiste de la dépollution des sols ne propose aujourd'hui une offre commerciale pour le traitement de sols contaminés par des PCB par voie biologique. Il est alors important d'étudier la faisabilité de ce genre de technique et c'est à ce défi que se propose de répondre ce travail de thèse.

Le présent mémoire se compose de cinq chapitres. Le premier chapitre est la synthèse bibliographique. Ce tour d'horizon permet de dégager les grandes questions scientifiques qui ont guidé le plan de notre étude. La conclusion de ce chapitre fait littéralement office d'introduction scientifique au reste du manuscrit. Le chapitre 2 aborde le comportement des PCB au contact de bactéries en condition aérobie. Le chapitre 3 est son équivalent pour l'anaérobie. Ce chapitre 3 est conclu par l'essai de traitement séquentiel anaérobie/anaérobie. Ces deux chapitres estiment le potentiel technologique de microorganismes en vue de leur utilisation dans le cadre opérationnel. Si les microorganismes aérobies sont bien connus, il en est différemment pour les communautés anaérobies. Afin de combler cette lacune, le chapitre 4 étudie à l'aide des outils de la biologie moléculaire et de la bioinformatique la composition des communautés anaérobies ayant montré un potentiel technologique. Ces informations peuvent s'avérer très utiles pour optimiser leur culture, leur rendement, ou dans l'optique d'un dépôt de brevet. Enfin le chapitre 5 présente les résultats des analyses de cycle de vie menées dans le cadre de ces travaux. La première étude, dans une démarche de conception de procédé, compare deux systèmes d'aération de sol et permet de sélectionner la meilleure solution technologique. La seconde étude compare les performances environnementales de deux procédés de traitement de sols contaminés par les PCB, l'un basé sur l'incinération, l'autre, issu des travaux de cette thèse.

# **Chapitre 1 :**

# **Synthèse**

# **bibliographique**

# I INTRODUCTION

Le sujet des polychlorobiphényles est connu depuis les années 30. Ils ont été étudiés surtout pour leur toxicité après les années 60. Dès lors, le nombre de publication sur le sujet n'a jamais cessé d'augmenter. Cependant, en normalisant la production totale scientifique à 100 000 publications par an, le thème des PCB n'a connu ni effet de mode, ni délaissement. En effet, pour 100 000 publications, le nombre de publications sur les PCB oscille aux alentours de 25 lors des 4 dernières décennies. La Figure 86 et la Figure 87 de l'annexe I.1 présente ces statistiques de publication. Ce manuscrit et la présente étude bibliographique repose sur la lecture d'environ 130 publications.

## II DEPOLLUTION DES SOLS

### II.1 *Interface complexe*

Il existe de nombreuses possibilités pour définir la notion de sol. Un agronome y verra un support physique et chimique pour les cultures. Un géologue le considère comme le résultat de l'altération de la roche mère. Enfin, un urbaniste définit un espace sur lequel les hommes vivent. La pédologie a longtemps été une science vassalisée à la géologie. Vassili Dokoutchaïev, géologue devenu l'un des piliers de la pédologie moderne donne cette définition :

*"Par sol, on entend les horizons extérieurs des roches naturellement modifiées par l'influence mutuelle de l'eau, de l'air et des organismes vivants et morts ; c'est un corps naturel indépendant et variant." (Dokoutchaïev, 1883).*

Cette définition généralement acceptée par les pédologues met en évidence, dès 1883, la notion d'interface entre la géosphère et la biosphère. La pollution d'un sol peut entraîner la dégradation de la qualité de l'eau et de l'air en contact avec ce sol. Ainsi le sol va être un compartiment clef à surveiller. C'est un lieu privilégié de dispersion vers d'autres ressources vitales comme l'eau et l'atmosphère.

### II.2 *Enjeux de la dépollution des sols contaminés*

Le sol est une ressource limitée. Les terres émergées représentent environ 30 % de la surface terrestre soit environ 15 milliards d'hectares. Elle est soumise à trois principales utilisations i) l'urbanisation ; ii) l'agriculture ; iii) l'industrie. Le sol est donc à la fois le support direct de la vie et le support des activités nécessaires à son entretien. Comme toute ressource finie, le sol, à terme, est appelé à devenir une ressource précieuse. Un déficit de quantité ou de qualité de cette ressource entraîne des problèmes de santé publique importants. Ainsi, la dépollution des sols est devenue un outil essentiel du développement des zones à forte densité de peuplement concernées par des problèmes de contamination (Morel, 2009).

Historiquement, dans les pays dits développés, les industries génératrices d'emplois de masse, ont attiré vers elles les zones urbaines. Les villes ont rattrapé les usines autrefois implantées à la périphérie. À la fin de l'ère industrielle et à l'essor du secteur tertiaire, les zones industrielles sont entrées en conversion pour devenir des zones compatibles avec la proximité de riverains.

Sur un plan sanitaire, les sols ayant supporté une activité industrielle lourde ne sont pas compatibles avec d'autres usages. L'exposition des usagers (habitation, loisirs, commerces) à ces contaminations peut conduire à de lourds problèmes sanitaires. Préserver la santé des riverains est l'enjeu majeur de la dépollution des sols.

Sur un plan économique, les surfaces urbaines ont une valeur immobilière élevée. La présence d'une pollution induit une dépréciation qui peut annuler la valeur commerciale du terrain. Un des enjeux économiques de la dépollution des sols est la suppression de cette valeur négative et la valorisation immobilière des anciens espaces industriels en espaces urbains, touristiques ou commerciaux. C'est d'ailleurs cet aspect qui a permis l'essor de l'industrie de la dépollution en France et dans d'autres pays industrialisés (Japon, Allemagne, USA, Belgique).

## II.3 *Techniques de dépollution des sols*

### II.3.1 Généralités

Il existe trois grands types de mise en place de procédés de dépollution d'un sol pollué.

Les techniques hors-site : le sol est traité hors du chantier dans des centres habilités à la gestion des déchets. Le principal avantage de ces techniques est que le site n'est pas immobilisé. L'espace est immédiatement disponible pour la reconversion du site industriel. La durée de l'immobilisation du site est un facteur critique de la réalisation d'un chantier. Le sol excavé est à la sortie du site d'origine considéré légalement comme un déchet qu'il convient de gérer selon la réglementation en vigueur pour les déchets. Suivant la nature et la mesure de la pollution, le sol peut être considéré comme un déchet ultime particulièrement onéreux à traiter.

Les techniques *in situ* : le sol à traiter n'est pas excavé. Le dispositif de traitement est installé sur le sol non remanié. L'espace est immobilisé le temps du traitement. L'absence de manipulation, de transport et de stockage de terre conduit généralement à des coûts de traitement contenus.

Les techniques sur-site : le sol est excavé et traité sur le chantier à l'aide d'unité mobile de traitement. L'immobilisation du site est partielle et le sol n'est pas considéré comme un déchet car il n'a pas quitté son site d'origine. Il peut être réutilisé après traitement en remblai sur le site (Simonnot, 2009).

### II.3.2 Objectif d'un chantier de dépollution

Dans le contexte réglementaire actuel, l'objectif premier d'un chantier de dépollution est de rendre compatible le site avec les usages futurs. C'est la gestion d'un risque potentiel. Pour supprimer ce risque, il existe trois stratégies : i) éliminer la source ; ii) neutraliser le vecteur du risque ; iii) éliminer la cible. Les techniques de dépollution ne sont donc pas nécessairement destructrices. Une fois le risque éliminé, la source est par la suite stockée ou détruite. Il est donc parfois nécessaire d'ajouter un procédé destructeur tel que l'incinération (ADEME, 2009a).

Les solutions portant sur le vecteur et sur la cible ne seront pas développées dans cette synthèse. Un aperçu de quelques techniques est disponible dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Techniques de dépollution agissant sur le vecteur et sur la cible.

Type de médiation	Type de techniques	Exemples de techniques
Action sur la cible	Restriction d'accès	Grillage Gardiennage
	Restriction d'usage	Interdiction de boire l'eau du robinet Interdiction de pêche
Action sur le vecteur	Techniques hors-sites	Excavation et stockage en Centre d'enfouissement technique ou incinération
	Techniques sur-site	Vitrification in situ Confinement bétonné Bio stabilisation

## II.3.3 Techniques non biologiques

### II.3.3.1 Tri physique, lavage chimique.

Un certain nombre de polluants organiques hydrophobes tels que les PCB se lie préférentiellement à la matière organique. Dans un sol classique, cette matière organique (hors déchets végétaux ou animaux) se retrouve dans les fractions granulométriques fines des sols. Il est alors potentiellement intéressant d'effectuer un tri du sol contaminé. Ce tri physique est effectué par criblage classique, sec ou humide ou bien par hydrocyclonage. Deux fractions distinctes sont obtenues : i) fraction grossière à faible charge de contaminants ; ii) fraction fine à forte charge de contaminants. Grâce à cette concentration, le volume de matériau à traiter est diminué, ce qui a un impact sur le coût du traitement. Cette technique est d'autant plus adaptée pour les PCB les moins volatils (les plus chlorés) (ADEME, 2009a). Il est alors indispensable d'étudier la répartition granulométrique de la pollution dans le sol et de connaître les caractéristiques des fractions porteuses de polluants (densité, hydrophobie, phénomène d'adsorption).

Le lavage chimique consiste à extraire la pollution du sol à l'aide de procédés chimiques impliquant des agents d'extraction (eau, acides, bases, oxydants, réducteurs, complexants, solvants organiques...). Il existe une contrainte en lien avec les grandes quantités d'agent chimique à utiliser. Le lavage par des agents tensioactifs est un cas particulier du lavage chimique qui semble plus adapté aux hydrocarbures pétroliers (ADEME, 2009a)

### II.3.3.2 Désorption thermique

Le principe de la désorption thermique est fondé sur la capacité de volatilisation des polluants. Sous l'effet d'une augmentation de température, le polluant est transféré dans les vapeurs qui seront traitées par la suite. La désorption thermique a fait ses preuves à l'échelle industrielle sur des sols, des boues et des sédiments contaminés aux PCB. Cette méthode est souvent appliquée pour des pollutions par des produits pétroliers. Les limites de cette méthode sont inhérentes au choix du couple température/temps de séjour, parce que celui-ci peut provoquer la

formation de composés issus de la dégradation des PCB. Il devient délicat de parler de désorption thermique si des niveaux de destruction pyrolytique sont atteints. Le choix se fait alors entre une désorption basse température (250-450°C) et une désorption moyenne température (450-650°C). Bien que cette dernière soit plus efficace sur les PCB, la diversité des molécules de PCB (plus ou moins chlorés) dans les mélanges commerciaux ne facilite pas le procédé. De plus cette technique est non-destructive et nécessite un complément de traitement des fumées pour contrôler l'émission de PCDD et PCDF produits à ces températures. Le coût varie de 45 à 155 € la tonne selon, que l'on traite sur site ou hors site (ADEME, 2009b; Simonnot et Croze, 2008).

### **II.3.3.3 Venting et air-sparging**

Ces techniques consistent à extraire le polluant par la phase gazeuse du sol. Une dépression (venting) ou une surpression (air-sparging) d'air est installée dans le sol à dépolluer. L'air vicié du sol qui est saturé en polluant est extrait puis traité par un traitement d'air annexe. L'air non saturé introduit dans le sol va déplacer l'équilibre des phases du polluant. Une partie de la pollution va donc se volatiliser et le sol sera ainsi dépollué. Ces techniques sont couramment utilisées pour la dépollution de sols contaminés par des hydrocarbures. Ces dispositifs sont également utilisés pour favoriser les processus aérobies des bactéries du sol (ADEME, 2009a).

### **II.3.3.4 L'oxydation in-situ**

Cette technique permet de dégrader un polluant organique par voie oxydative en utilisant un agent oxydant chimique tel que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'ozone ( $O_3$ ) ou le permanganate ( $MnO_4^-$ ). Ces techniques sont fréquemment utilisées in-situ pour dégrader des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques ou des solvants chlorés (Simonnot et Croze, 2008).

### **II.3.3.1 La réduction in-situ**

Certains contaminants organiques se dégradent mieux en milieu réducteur. La réduction in-situ consiste à injecter dans le sol des sources d'électrons afin de créer un déficit d'accepteurs d'électrons et augmenter l'apétance des polluants en qualité d'accepteurs d'électrons. Cette technique est utilisée notamment pour la dépollution de solvants chlorés.

## **II.4 Législation**

Il n'y a pas à l'heure actuelle de cadre législatif spécifique pour la gestion des sols. Que ce soit au niveau communautaire ou national, la réglementation des sols émane de plusieurs autres textes indirectement liés au sol. Il y a donc beaucoup de textes impliqués dans la gestion des sols. Le paragraphe qui suit n'en est pas une liste exhaustive. Il reprend les principaux textes qui permettent de comprendre l'esprit et l'évolution de la réglementation appliquée à la gestion des sols pollués.

### **II.4.1 Directives européennes**

#### **II.4.1.1 Directive n° 2004/35/CE du 21/04/04**

*Directive n° 2004/35/CE du 21/04/04 sur la responsabilité environnementale en ce qui concerne la prévention et la réparation des dommages environnementaux.*

Cette directive introduit la notion de « pollueur-payeur ». Elle définit de manière précise les responsabilités engagées dans un scénario de pollution et beaucoup de notions essentielles comme celles de « dommages à l'Environnement » ou de « mesures de réparation ». Si cette directive annonce des principes forts et ouvre des perspectives de recours en justice, elle est focalisée sur les dommages faits aux ressources et au milieu naturel. Par exemple, dans la définition de l'objectif de la réparation primaire, il est dit :

*« L'objectif de la réparation primaire est de remettre en l'état initial, ou dans un état s'en approchant, les ressources naturelles ou les services endommagés. »*

Elle ne couvre pas le cas d'espaces industriels ou périurbains fortement anthropisés. Il n'y a pas de notion de réhabilitation en relation avec un usage futur.

### II.4.1.2 Proposition de Directive-Cadre Sol

Face au constat du manque de spécificité des directives devant un problème si crucial que la protection des sols, la Commission Européenne a émis en Septembre 2006 une proposition de directive cadre pour la protection des sols à l'image de la célèbre Directive-Cadre 2000/60/CE sur l'Eau. Ce texte prévoit l'affirmation des obligations de tous les acteurs liés à l'utilisation du sol en vue de la protection des sols et de leurs fonctions. Ces fonctions y sont précisément définies :

*« La présente directive définit un cadre pour la protection des sols et la préservation de leur capacité à remplir chacune des fonctions écologiques, économiques, sociales et culturelles suivantes:*

- a) production de biomasse, notamment pour l'agriculture et la foresterie;*
- b) stockage, filtrage et transformation d'éléments nutritifs, de substances et d'eau;*
- c) vivier de la biodiversité, notamment habitats, espèces et gènes;*
- d) environnement physique et culturel de l'homme et des activités humaines;*
- e) source de matières premières;*
- f) réservoir de carbone;*
- g) conservation du patrimoine géologique et architectural. »*

Enfin, ce projet de directive ne se focalise pas sur un retour à « l'état initial », mais sur « une réduction des risques » en relation avec les fonctions du sol définies précédemment.

## II.4.2 Droit français

En France, la réflexion sur la gestion des sites et sols pollués est initiée par l'Arrêté du 22/08/02 portant création d'un groupe de travail relatif aux sites et sols pollués dans le cadre du Conseil supérieur des installations classées. Jusqu'alors, les usages réglementaires appliqués aux sols contaminés s'appuyaient sur deux autres réglementations déjà établies, celle des déchets et celle des installations classées pour l'environnement (ICPE).

### II.4.2.1 Loi n° 75-633 du 15 juillet 1975

*Loi n° 75-633 du 15 juillet 1975 relative à l'élimination des déchets et à la récupération des matériaux modifiée.*

Tout sol pollué, excavé et transporté devient un déchet et donc nécessite un suivi défini dans cette loi. Les conditions d'admission en centre de stockage ou centre de traitement sont définies dans les annexes de l'Arrêté du 9 septembre 1997 relatif aux installations de stockage des déchets non dangereux. Il y est stipulé que les déchets contenant plus de 50 mg/kg de PCB sont interdits au stockage en centre. Les conditions d'admission des sols contaminés par les PCB sont définies dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Condition d'admission des sols contaminés par des PCB en centre d'enfouissement technique.**

Centre d'enfouissement technique	Concentration en PCB	
	(somme des 7 PCB n° IUPAC 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180)	
	en ppm	
Classe 1 « déchets dangereux »	10 < C < 50	
Classe 2 « déchets non dangereux »	1 < C < 10	
Classe 3 « déchets inertes »	< 1	

#### II.4.2.2 Loi n° 76-663 du 19 juillet 1976

*Loi n° 76-663 du 19 juillet 1976 relative aux installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) et son décret d'application n°77-1133 du 21 septembre 1977.*

Ce texte décrit les modalités à remplir pour qu'une organisation soit habilitée à poursuivre son activité malgré son caractère dangereux pour l'Environnement. Il est donc question de prévention et de bonnes pratiques industrielles et administratives. Cette loi permet au service de l'Etat de connaître toutes les installations sur le sol français susceptibles de menacer l'environnement et donc de les surveiller. C'est dans le cadre de ce réseau de surveillance que la plupart des pollutions de sols industriels est détectée et que des procédures de médiation sont lancées.

#### II.4.2.3 Circulaire 8 février 2007

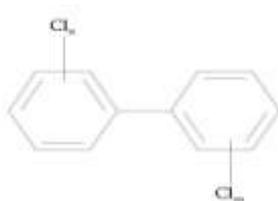
*Circulaire du 8 février 2007 relative aux Installations Classées - Prévention de la pollution des sols - Gestion des sols pollués.*

Cette circulaire fait suite à une grande concertation nationale au sujet de l'évaluation de la pertinence et de la qualité des outils méthodologiques préconisés lors de la définition et la gestion d'un site ou sol pollué. Les outils en vigueur étaient l'étude simplifiée des risques (ESR) suivi d'une étude détaillée des risques (EDR) si le site présentait une difficulté particulière. Cette concertation a permis de redéfinir de nouveaux guides méthodologiques et de réaffirmer certaines volontés politiques : i) Gérer le risque en fonction des usages ; ii) Favoriser les solutions in-situ ; iii) Favoriser les solutions biologiques.

## III POLYCHLOROBIPHENYLES

### III.1 *Chimie des Polychlorobiphényles*

Les Polychlorobiphényles sont des hydrocarbures halogénés. Cette famille regroupe les biphényles chlorés de formule empirique  $C_{12}H_{10-(n+m)}Cl_{n+m}$  (Figure 1) où n et m sont deux entiers tels que  $1 \leq n+m \leq 10$ .



**Figure 1 : Structure générale des Polychlorobiphényles.**

Le noyau biphényle peut contenir entre 1 et 10 atomes de chlore. Il y a donc 10 formules brutes, communes à de nombreux isomères. Suivant le nombre d'atomes de chlore substitués et leur position sur le noyau biphényle, il existe 209 PCB différents appelés « congénères » (Tableau 3). Ils ont une nomenclature IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Ils sont numérotés de 1 à 209 suivant leur nombre d'atomes de chlore.

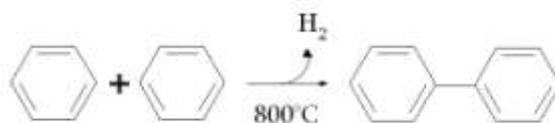
**Tableau 3 : Nomenclature, nombre de congénères, masses moléculaires et taux de chlore des différents isomères de PCB (Mhiri et de Marsac, 1997). Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre de congénères réellement synthétisables.**

Formule structurale	Degré de chloration	Nombre de congénères	Numéro IUPAC* des congénères	Masse moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )	% massique de Chlore
C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> Cl	1	3(3)	1-3	188,65	18,79
C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub>	2	12(12)	4-15	233,10	31,77
C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub>	3	24(23)	16-39	257,54	41,30
C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub>	4	42(41)	40-81	291,99	48,56
C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>5</sub>	5	46(39)	82-127	326,43	54,30
C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>6</sub>	6	42(31)	128-169	360,88	58,93
C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>7</sub>	7	24(18)	170-193	395,32	62,77
C <sub>12</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>8</sub>	8	12(11)	194-205	429,77	65,98
C <sub>12</sub> HCl <sub>9</sub>	9	3(3)	206-208	464,21	68,73
C <sub>12</sub> Cl <sub>10</sub>	10	1(1)	209	498,66	71,10

## III.2 Synthèse

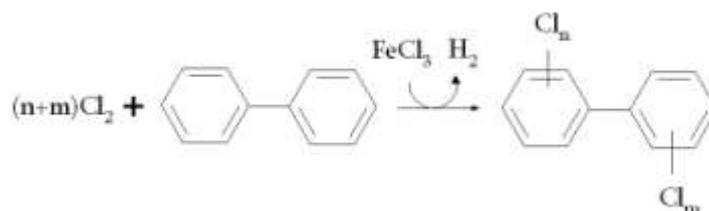
Les PCB ont été synthétisés pour la première fois en 1881 par Schimidt et Schultz (Waid, 1986). Leur production à grande échelle n'a pourtant débuté qu'en 1929. Ils sont fabriqués le plus souvent en 2 étapes à partir de benzène C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> et de dichlore Cl<sub>2</sub> (Figure 2 et Figure 3).

Etape 1 : Déshydrogénation du benzène



**Figure 2 : Synthèse du biphényle.**

Etape 2 : Chloration du biphényle



**Figure 3 : Synthèse des PCB.**

La chloration du noyau biphényle est progressive. Elle est stoppée lorsque le produit a atteint la masse volumique désirée. On obtient ainsi un mélange de différents PCB allant de 30 à 60 congénères. L'encombrement stérique des atomes de chlore ne permet de synthétiser que 182 congénères sur les 209 (Voogt et Brinkman, 1989).

### III.3 *Propriétés physico-chimiques*

Selon le taux de chlore, les PCB se présentent sous forme huileuse ou résineuse pour les mélanges les plus chlorés. Leur densité est supérieure à 1. Ils sont incolores ou jaunâtres, toujours selon le taux de chlore, et possèdent une odeur aromatique caractéristique. Ils sont particulièrement peu solubles : de  $5,9.10^3 \mu\text{g.L}^{-1}$  à  $0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le plus soluble. La solubilité diminue avec le taux d'atomes de chlore (INERIS, 2005).

Ils sont stables chimiquement, résistent bien à la chaleur, aux attaques acido-basiques et à l'oxydation. Ces propriétés sont d'autant plus marquées que le taux de chlore est élevé. Les PCB les moins chlorés commencent à se décomposer à partir de  $300^\circ\text{C}$  pour former du chlorure d'hydrogène (HCl), du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et de l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (Mhiri et de Marsac, 1997). Les PCB fortement chlorés restent très stables jusqu'à des températures très élevées. En dessous de  $900-1000^\circ\text{C}$ , leur combustion aboutit à la formation de PolyChloroDibenzo (PCD)-Dioxines ou de PCD-Furannes toxiques.

### III.4 *Formulations et usages des PCB*

#### III.4.1 Différents usages des PCB

Il existe de nombreux usages pour cette famille de molécules (Borja *et al.*, 2005; Mhiri et de Marsac, 1997):

- Fluides diélectriques (isolants) pour transformateurs et condensateurs de puissance ;
- Fluides caloporteurs dans certaines installations thermiques ;
- Additifs dans certaines formulations de pesticides et de pétroles ;
- Agent plastifiant dans des peintures, colles, encres, plastiques ;
- Huile de coupe pour le sciage des métaux ;
- Huile pour outils hydrauliques ;
- Lubrifiant de turbines et pompes.

#### III.4.2 Spécialités commerciales à base de PCB

La marque la plus courante de PCB est Aroclor® de l'américain Monsanto. La gamme des Aroclor se décline sous différentes formulations allant de l'Aroclor 1221 (21 % de Cl) à l'Aroclor 1268 (68 % de Cl). L'Aroclor 1242 est le plus utilisé dans le monde (Waid, 1986).

Le nom commercial des solutions de PCB varie avec le pays de fabrication. On peut citer : Clophen® (Bayer, Allemagne), Phenoclor® (Caffaro, Italie), Kanechlor® (Kanegafuchi, Japon), Sovol® (ex-URSS), Delor® (ex-Tchécoslovaquie).

En France, c'est la société Prodelec qui a commercialisé les mélanges de PCB sous la marque Pyralène® dès 1948. On estime à 115 000 tonnes la production française de PCB dont 60 000 furent destinés à la fabrication de matériels électriques.

Les huiles destinées aux transformateurs et aux capacités peuvent être appelées communément askarel. Ce terme renvoie aujourd'hui surtout aux huiles destinées aux matériels électriques contenant des PCB.

## III.5 Toxicologie et dispersion dans l'environnement

### III.5.1 Risques toxicologiques

Les PCB peuvent se classer en deux grands groupes en matière de toxicologie. Il y a les PCB dits dioxine-like (DL-PCB) ayant les mêmes effets que les dioxines, et les non dioxines-like (NDL-PCB). Le groupe des DL-PCB correspond aux PCB coplanaires au nombre de 13. Les PCB coplanaires sont des molécules non-substituées en position ortho ce qui autorise la libre rotation des deux noyaux biphényles autour de la liaison C-C. Les DL-PCB sont plus toxiques que les NDL-PCB. La toxicité d'un mélange commercial est donc fortement influencée par la quantité d'impuretés de type PCD-Dioxine ou PCD-Furane et de la quantité de PCB coplanaires. Cependant des études tendent à montrer que les NDL-PCB seraient des perturbateurs endocriniens et altéreraient la fonction de reproduction chez les mammifères (EFSA, 2005).

Les différentes formulations de PCB ont une faible toxicité aiguë : LD50 de 0,4 g/kg à 11,3 g/kg de poids de corps chez le rat (Tableau 4). Les PCB ne sont pas reconnus comme substances cancérigènes. Ils sont cependant classés dans la catégorie 2A par l'International Agency for Research on Cancer (IARC), signifiant que ces molécules sont probablement cancérigènes (Waid, 1986).

**Tableau 4 : Aspects et toxicologie des différentes formulations de PCB type Aroclor (Waid, 1986).**

Nom	Aspect	LD50 par voie orale chez le rat en mg/kg
Aroclor 1221	Huile fluide de couleur claire.	3,980
Aroclor 1232	Huile fluide de couleur claire.	4,470
Aroclor 1242	Huile fluide de couleur claire.	8,650
Aroclor 1248	Huile fluide de couleur claire.	11,000
Aroclor 1254	Huile visqueuse de couleur jaune clair.	11,900
Aroclor 1260	Résine légèrement collante jaune clair.	10,000 <sup>a</sup>
Aroclor 1262	Résine collante jaune clair	11,300 <sup>a</sup>
Aroclor 1268	Poudre de couleur blanche à blanc-cassé.	10,90 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Administré dans une huile de maïs à 50%

Des expositions répétées ou une forte dose ingérée peuvent entraîner des irritations cutanées (chloracné), hyperpigmentation des ongles, troubles oculaires (hyperhémie, œdèmes, kystes conjonctivaux), des perturbations neurologiques (céphalée, vertiges). Les PCB peuvent également provoquer des affections gastro-intestinales et des troubles hépatiques (Mhiri et de Marsac, 1997).

## III.5.2 Source et dispersion dans l'environnement

Il n'existe pas à ce jour de source naturelle de PCB dans l'environnement. Les PCB sont introduits dans l'environnement principalement de trois manières :

- Usages dispersifs en contact avec l'environnement : Lubrifiant, plastifiant, pesticides...
- Fuites d'appareils contenant des PCB (accidents, malveillances, négligences)
- Entreposage, production et transport des PCB.

Les PCB peuvent se disperser par voie aérienne (sous forme volatile ou aérosols). Leur faible biodégradabilité et le caractère hydrophobe des PCB en font des polluants organiques persistants (POP) aujourd'hui ubiquitaires. Ils sont présents à tous les étages de la chaîne alimentaire (Borja *et al.*, 2005; Environnement-Canada, 1988). Ils s'accumulent dans les tissus adipeux et se concentrent de plus en plus lorsque l'on monte dans les niveaux trophiques. 21 000 t de PCB seraient dispersées dans les sols de la planète (Meijer *et al.*, 2003). Ce chiffre est une estimation qui ne prend pas en compte les PCB sur les sols industriels et urbains, qui sont pourtant les plus exposés. Une estimation japonaise propose le chiffre de 400 000 t de PCB émis vers l'environnement (Mhiri et de Marsac, 1997).

Les catastrophes sanitaires les plus marquantes dues aux PCB sont celles de 1968 au Japon, dans la ville de Fukuoka, sur l'île de Kyushu. Une fuite du liquide caloporteur d'un échangeur de chaleur sur la chaîne de production a contaminé l'huile de consommation (Ikeda *et al.*, 1987). Près de 2000 personnes se sont empoisonnées en consommant cette huile. Cet empoisonnement est connu comme l'épisode Yusho (maladie de l'huile en japonais). Les symptômes immédiats étaient une sévère chloracnée, une hyperpigmentation des ongles, de la peau et des gencives (Aoki, 2001; Kuratsune *et al.*, 1972). Un événement similaire se répéta en 1979 à Taiwan (épisode Yu-Cheng). Les mêmes causes ont produit les mêmes effets (Hsu *et al.*, 1985). Les études cliniques menées les années suivant les 2 catastrophes ont permis de mieux connaître la toxicité des PCB sur le long terme et notamment sur la fonction de reproduction. Sur les 39 enfants nés de mères intoxiquées présentant une hyperpigmentation, 8 sont morts avant 1983 (Hsu *et al.*, 1985). Pendant 15 ans, les enfants issus de mères empoisonnées ont présenté des retards de croissance et du développement mental, des dyskinésies, une lenteur générale et un QI moyen faible, aux alentours de 70 (Rogan *et al.*, 1988; Winneke *et al.*, 2002). En France, la crise de la dioxine de Juin 1999 serait attribuée à la contamination accidentelle par du pyralène (30kg environ) d'un stock de graisse de 56 T recyclé par un fabricant hollandais d'aliments destinés à l'élevage. Plus 2500 fermes ont potentiellement utilisé ce stock de graisse (Bernard *et al.*, 2002). Si cette crise n'a pas fait de victime, elle a fortement impacté le milieu agricole et a marqué les esprits.

## III.6 Législation

### III.6.1 Droit international

Sur le plan international, un texte fait figure de référence sur les Polluants Organiques Persistants (POP) et donc sur les PCB, c'est la Convention de Stockholm. Edité en 2001, dans le cadre du Programme des Nations Unies sur l'Environnement (PNUE), l'objet de ce traité est la réduction des émissions et la destruction des POP. Ce texte recommande l'interdiction de la production, de l'importation et de l'exportation des 9 POP prioritaires (Aldrine, Chlordane, Dieldrine, Endrine, Heptachlore, Hexachlorobenzène, Mirex, Toxaphène, PCB) et la restriction des

usages pour le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT). L'effet recherché est la diminution voire la disparition de 12 POP cibles (les 10 déjà cités plus les dioxines et furannes) à l'horizon 2025 (PNUE, 2004).

## III.6.2 Droit communautaire

L'Union Européenne a ratifié la Convention de Stockholm. Les lois européennes sont les moteurs de la lutte des Etats-membres contre les POP. Il existe donc un cortège de directives concernant les PCB.

### III.6.2.1 Décision du 13 février 1973 de l'OCDE

La Décision de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) du 13 février 1973 est la première restriction juridique de l'utilisation des PCB dans l'industrie. C'est le premier texte officiel s'appliquant sur le territoire européen qui mentionne les PCB et qui limite leur production et leurs usages. Elle intervient quelques années après la décision américaine de limiter les usages et productions des PCB.

### III.6.2.2 Directive 76/769/CEE

*« Directive 76/769/CEE du Conseil, du 27 juillet 1976, concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses. »*

Cette directive fixe la teneur maximum autorisée dans les préparations commerciales (0,1 % en masse). Elle interdit l'usage dispersif. Cependant, l'utilisation des PCB en systèmes clos est maintenue. Les appareils déjà installés peuvent continuer à fonctionner.

### III.6.2.3 Directive 85/467/CEE

*« Directive 85/467/CEE du Conseil du 1er octobre 1985 portant sixième modification (polychlorobiphényles/polychloroterphényles) de la directive 76/769/CEE concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses. »*

La teneur maximale autorisée passe de 0,1 % à 0,01 % dans les préparations de PCB. Elle durcit également les dispositions de la Directive 76/769/CEE, puisqu'elle interdit la mise en service d'appareils utilisant des PCB même en circuit clos.

### III.6.2.4 Directive 96/59/CE

*« Directive 96/59/CE du Conseil du 16 septembre 1996 concernant l'élimination des polychlorobiphényles et des polychloroterphényles (PCB et PCT). »*

Elle fixe le cadre légal du plan d'élimination des PCB. A l'horizon 2010, les huiles mises en service ou recyclées devront contenir moins de 0,005 % de PCB en masse.

### III.6.2.5 **Autres textes**

*« Décision 2006/507/CE: Décision du Conseil du 14 octobre 2004 concernant la conclusion, au nom de la Communauté européenne, de la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants. »*

Ce texte est la réponse communautaire suite aux dispositions signées lors de la Convention de Stockholm. Tous les textes émis par les états membres devront respecter l'esprit et la lettre de ce texte.

### III.6.3 **Droit français**

#### III.6.3.1 **Arrêté du 8 juillet 1975**

*« Arrêté du 8 juillet 1975 relatif aux conditions d'emploi des polychlorobiphényles et des polychloroterphényles (PCB et PCT) »*

Cet arrêté limite l'usage des PCB aux systèmes clos ne présentant pas de risques pour l'environnement. C'est la version française des textes européens à ce sujet.

#### III.6.3.2 **Décret n° 87-59 du 2 février 1987**

*« Décret n°87-59 du 2 février 1987 relatif à la mise sur le marché, à l'utilisation et à l'élimination des polychlorobiphényles et polychloroterphényles. »*

Ce décret est la transposition de la directive 85/467/CEE et interdit la production, la commercialisation et l'usage des huiles contenant des PCB en France dans la limite de 50 ppm de PCB.

#### III.6.3.3 **Décret n°2001-63 du 18 janvier 2001**

*« Décret n°2001-63 du 18 janvier 2001 modifiant le décret n° 87-59 du 2 février 1987 relatif à la mise sur le marché, à l'utilisation et à l'élimination des polychlorobiphényles et polychloroterphényles. »*

Ce décret fixe la limite du 31 décembre 2010 pour l'élimination des préparations contenant plus de 50 ppm de PCB. C'est le dernier texte de loi en vigueur relatif aux PCB.

## IV DEGRADATION DES PCB

### IV.1 *Dégradation aérobie*

#### IV.1.1 Généralités

Plusieurs bactéries sont connues pour dégrader les PCB en condition aérobie. Parmi elles, on peut citer de manière non exhaustive, le genre *Pseudomonas*, e.g. strain LB400, LB410, *putida*, *fluorescens*, le genre *Rhodococcus* et la bactérie *Thauera chlorobenzoica*. Seuls les PCB faiblement chlorés peuvent se dégrader par voie aérobie. Une bactérie sort cependant du lot : *Burkholderia xenovorans LB400*. Cette bactérie a les meilleurs rendements de dégradation et peut dégrader le 2,4,5,2',4,5,-pentachlorobiphényle.

La dégradation se fait le plus souvent par une double oxygénation sur la partie du noyau biphényle la moins chlorée par l'enzyme 2,3 biphényl dioxygénase, puis par la 2,3 dihydroxy-biphenyl dioxygénase. Cette étape entraîne la fissure du cycle phénolique cible. On observe alors la formation d'acide chlorobenzoïque (**A**) et un acide 2-ceto-penta-4-énoïque. (**B**).

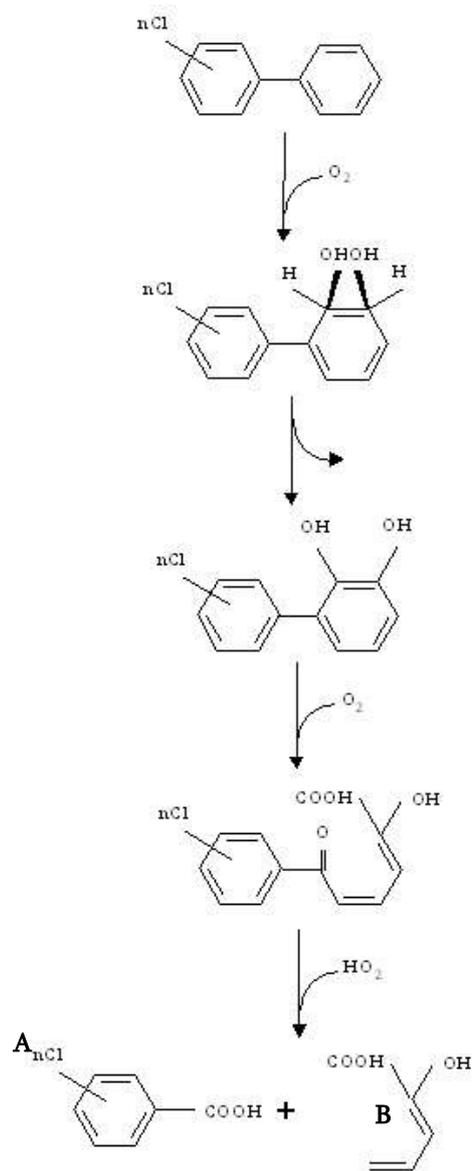


Figure 4 : Dégradation des PCB par voie aérobie (Mhiri et de Marsac, 1997).

L'acide chlorobenzoïque subira une attaque similaire (dioxygénation). L'acide 2-ceto-penta-4-énoïque se transforme en acétaldéhyde (C) et en acide pyruvique (D) qui sont des composés participant au métabolisme de la cellule (exemple : synthèse de l'acetyl-CoA). Le chlore sera évacué sous forme de  $\text{Cl}^-$ .

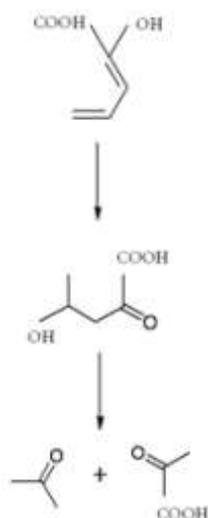


Figure 5 : Dégradation des PCB par voie aérobie (suite) (Mhiri et de Marsac, 1997).

Le champignon *Phanerochaete chrysosporium* (agent de la pourriture blanche) est également capable de minéraliser certains PCB, via un cortège d'enzymes extracellulaires de types peroxydases ou laccases. Il aurait également, selon une étude récente, la capacité de déchlorer des PCB relativement chlorés (hexachlorés) en condition non lignolytique (riche en azote) (De *et al.*, 2006b).

#### IV.1.2 Temps de réaction et taux de dégradation observés

Les temps de réaction en aérobie sont bien plus courts qu'en anaérobie. On observe des taux de dégradation de 100% en 7 jours de culture liquide pour l'Aroclor 1242 (Borja *et al.*, 2005). Il existe des corrélations entre le taux de chlore, le taux de dégradation et la vitesse de réaction. Plus le taux de chlore est élevé, plus les réactions sont lentes. Les positions des atomes de chlore sur le noyau biphenyle influent également sur la dégradation aérobie. Les composés substitués en ortho sur un phényle seront plus récalcitrants à la dépollution biologique (Borja *et al.*, 2005).

Un des facteurs limitants de la biodégradation des PCB est la faible biodisponibilité de ces composés dans les sols. Afin d'améliorer ce paramètre, il est possible d'utiliser des tensioactifs. De nombreux tensioactifs commerciaux ont été testés. Bien qu'efficaces, ces tensioactifs se révèlent parfois être eux-mêmes toxiques et récalcitrants à la biodégradation. Il apparaît alors utile d'étudier les possibilités offertes par les tensioactifs d'origine biologique (ex : rhamnolipides) ou les tensioactifs issus de l'industrie agroalimentaire (ex : Tween 80, lécithine de soja, cyclodextrines) (Fava et Ciccotosto, 2002; Fava et Gioia, 2000).

Le phénomène de biodisponibilité touche la déchloration réductive et la dégradation aérobie. Il existe également des moyens d'optimiser ces 2 réactions.

## IV.1.3 Optimisation de l'oxydation des PCB

### IV.1.3.1 Source de carbone et d'énergie

Une source de carbone et d'énergie est souvent requise afin d'assurer un niveau de biomasse suffisant pour la dégradation des PCB. Elle peut également initier un phénomène de co-métabolisation des PCB en ajoutant une source de carbone au milieu de culture. On peut citer, le glucose ou le xylose (Tandlich *et al.*, 2001).

### IV.1.3.2 Inducteurs

Certaines molécules sont capables d'activer les gènes responsables de la dégradation des PCB. Ils induisent la voie métabolique des PCB, ce sont donc des inducteurs. Le biphényle ou les monochlorobiphényles sont parfois utilisés pour optimiser la dégradation des PCB. Plus récemment, les terpènes, des composés non-toxiques et issus de biomasse végétale ont été utilisés dans le même but. Le carvone et le limonène peuvent être cités en exemples. Dans son étude, Tandlich montre que l'addition de Carvone dans un essai de biodégradation de DELOR 103 par *Pseudomonas stutzeri* permettrait une dégradation entre 30 – 70 % contre 7 – 37 % sans carvone. Ces résultats sont obtenus lorsque la source de carbone est le xylose (Tandlich *et al.*, 2001).

## IV.2 *Dégradation anaérobie*

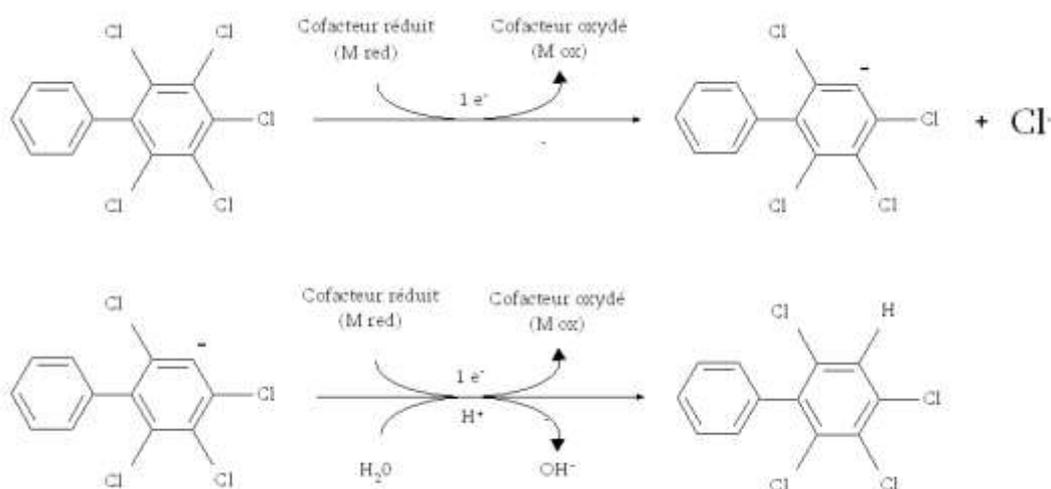
### IV.2.1 Généralités

Les réactions impliquant les PCB en anaérobiose ont été découvertes en 1987 par une équipe américaine qui travaillait sur les sédiments contaminés de l'Hudson river (Brown *et al.*, 1987). L'hypothèse de la déchloration réductrice alors formulée a été vérifiée un an plus tard par Quensen et son équipe (Quensen *et al.*, 1990).

Un certain nombre de microorganismes anaérobies a été identifié et isolé. On peut citer *Desulfomonile tiedjei*, *Desulfitobacterium*, *Dehalobacter restrictus*, *Dehalospirillum multivorans*, *Desulfuromonas chloroethenica*, *Dehalococcoides ethanogenes* et les bactéries anaérobies facultatives *Enterobacter strain MS- 1* et *Enterobacter agglomerans* (Borja *et al.*, 2005).

On s'affranchit souvent de la complexité des interactions interspécifiques en agissant au niveau de la communauté de bactéries. Ainsi, il est également judicieux de tester les microflores totales ayant acquis la capacité de déchloration réductrice. Bedard *et al.* ont présenté en 2006 (Bedard *et al.*, 2006) une communauté, issue de sédiments contaminés, libre de son substrat d'origine. Une étude phylogénétique montre que les microorganismes font partie des groupes suivants : Clostridiales, Bacteroidales, Burkholdriales, Desulfuromonadales, Rhodocyclales, Pseudomonadales ou de la classe des Dehalococcoidetes. La plupart des espèces identifiées dans ces communautés est inconnue ou non-cultivable, ce qui rend leur étude difficile.

De manière générale, la déchloration réductrice correspond à une hydrogénation du PCB suivant la réaction présentée Figure 6 :



**Figure 6 : La déchloration réductive (Mhiri et de Marsac, 1997).**

Depuis, les choses ont été affinées et certaines propositions de voies métaboliques ont pu être proposées (Figure 7 ; Figure 8 ; Figure 9 ; Figure 10). Il en ressort que les microorganismes anaérobies peuvent déchloration des PCB contenant au maximum neuf atomes de chlore (Wiegel et Wu, 2000) ; ce qui représente le nombre maximum d'atomes de chlore pour une mixture commerciale. Suivant les organismes, une préférence est détectée pour les hydrogénations des sites *meta* et *para* (2 et 3) du noyau biphenyle. Ainsi, on assiste souvent à une accumulation de PCB *ortho*-substitués.

Les PCB servant d'accepteurs d'électrons ont préférentiellement plus de 6 atomes de chlore. Il en résulte une accumulation, en absence d'oxygène, de PCB tetrachlorés.

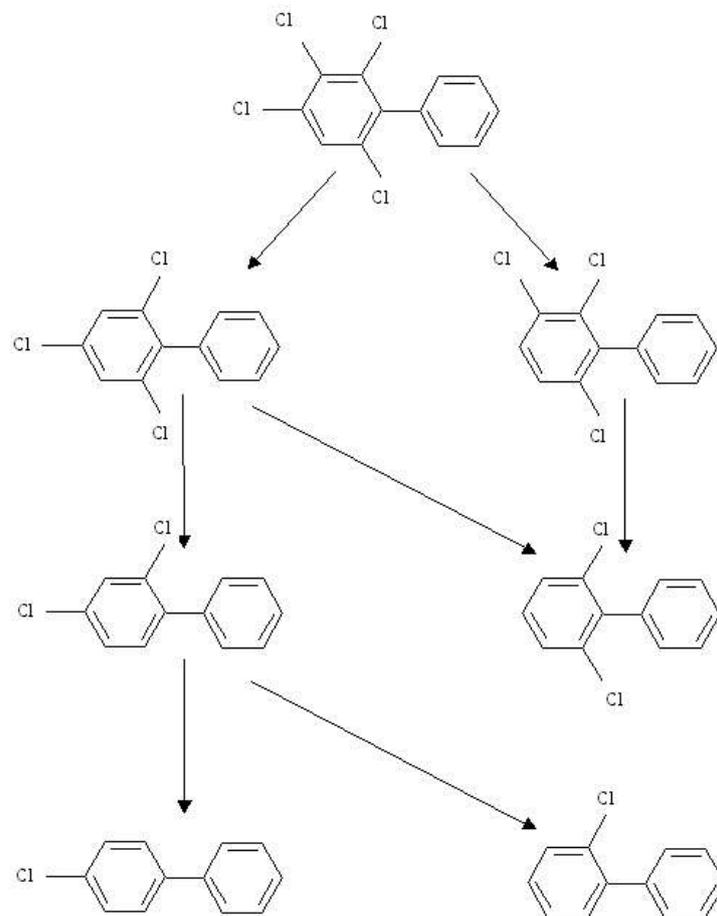


Figure 7 : Proposition de déchloration réductive du 2,3,4,6-tetrachlorobiphényle (Wiegel et Wu, 2000).

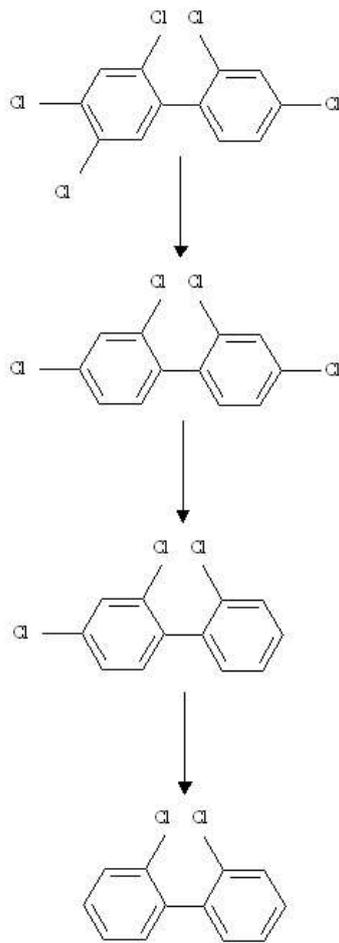


Figure 8 : Proposition de déchloration réductive du 2,2',4,4',5-pentachlorobiphényle (Fish et Principe, 1994).

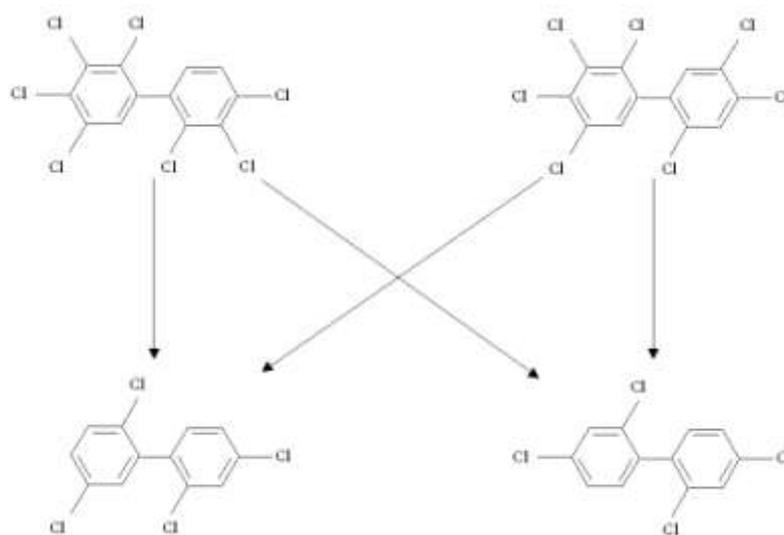


Figure 9 : Proposition de déchloration réductive de deux heptachlorobiphényles (Bedard *et al.*, 2006).

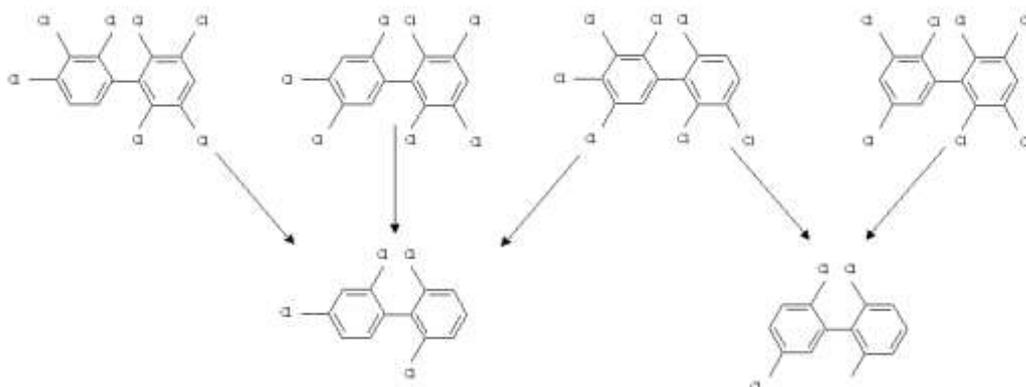


Figure 10 : Proposition de déchloration réductive de quatre heptachlorobiphényles (Bedard *et al.*, 2006).

## IV.2.2 Temps de réaction et taux de déchloration observés

Les temps de réaction observés pour la déchloration réductive des PCB sont très variables d'une étude à l'autre (Borja *et al.*, 2005). Ils vont dépendre de la communauté microbienne de départ, du type de déchloration (ortho-, meta-, para-déchloration), de la température, du taux de chlore initial. L'Aroclor 1242 s'enrichie en mono- et dichlorobiphényles. La proportion initiale de la somme des mono- et di-chlorobiphényles passe de 9% à 88% après 8 semaines d'exposition à la communauté microbienne de Hudson River en condition anaérobie (Quensen *et al.*, 1990). Ce traitement augmente fortement la prédominance des atomes de chlore ortho-substitués. Des résultats similaires sont observés pour l'Aroclor 1248. Cette même communauté permet d'enlever 63% d'atomes de chlore meta- et para-substitués de l'Aroclor 1254 en 25 semaines. En revanche, après 1 an d'exposition à l'Aroclor 1260, seuls 15% de ces atomes de chlore meta- et para-substitués sont enlevés (Quensen *et al.*, 1990).

De meilleurs résultats ont été obtenus avec une communauté microbienne issue de Woods Pond, un site contaminé par l'Aroclor 1260. En 12 semaines, 83% des penta-, hexa-, heptachlorobiphényles ayant les positions 2,3,4 ou 2,3,5 ou 2,3,4,5 chlorés, sont déchlorés pour donner un mélange de tetra- et pentachlorobiphényles (Wiegel et Wu, 2000).

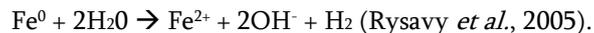
## IV.2.3 Optimisation de la déchloration réductive

### IV.2.3.1 Source de carbone facilement assimilable

Un des facteurs limitants de la déchloration *in situ* est la présence ou non d'une source de carbone dans le milieu. En ajoutant cette source, la biomasse va augmenter et entraîner une augmentation de la demande d'accepteurs d'électrons. Cela va ainsi favoriser l'utilisation des atomes de chlore des PCB comme accepteurs finaux de la chaîne respiratoire. De plus, les bactéries anaérobies facultatives vont se développer en utilisant le dioxygène disponible et renforcer l'anaérobiose. On peut citer comme sources de carbone facilement assimilables le glucose, xylose, pyruvate ou l'acétate (Borja *et al.*, 2005).

### IV.2.3.2 Source d'électrons

Il est démontré que des donneurs d'électrons, comme l'hydrogène, favorisent la déchloration réductive de certains PCB. L'addition de Fe<sup>0</sup> dans un milieu de culture permet la production de H<sub>2</sub> :



### IV.2.3.3 Accepteurs d'électrons

Bien que la présence d'accepteurs d'électrons autres que les PCB inhibe la déchloration réductive, les souches responsables de cette transformation appartiennent parfois aux groupes fonctionnels des sulfatoréducteurs ou nitrate-réducteurs. Ainsi, l'addition de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ou de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> stimule la croissance des bactéries responsables de la déchloration des PCB. Par exemple, le FeSO<sub>4</sub> permet de fournir du sulfate pendant que le Fe<sup>2+</sup> neutralise la production de sulfites toxiques par la formation d'un complexe insoluble FeS (Borja *et al.*, 2005).

## IV.3 *Traitement séquentiel anaérobie/aérobie*

Le traitement séquentiel est aujourd'hui la voie privilégiée pour le traitement des PCB les plus récalcitrants à la biodégradation. On cumule ainsi les avantages des deux traitements. Le traitement anaérobie permet d'abaisser le taux de chlore des PCB ce qui permet d'augmenter leur accessibilité pour la dégradation aérobie. Ainsi, une étude a pu montrer la dégradation de 66% en concentration de l'Aroclor 1260 (concentration initiale : 58,7 ppm) grâce au traitement séquentiel. Le traitement aérobie seul ne permettrait de dégrader que 10 % de l'Aroclor 1260 (Master *et al.*, 2002).

# V MICROORGANISMES

## V.1 Organismes cultivés

### V.1.1 Burkholderia xenovorans

#### V.1.1.1 Classification

*Burkholderia xenovorans* a longtemps été classée comme une espèce de *Pseudomonas*. La souche LB400 a été rattachée à la famille des *Burkholderiaceae* en 2001 par Fain et Haddock (Fain et Haddock, 2001). C'est une bactérie Gram-négative, mobile, en forme de bâtonnets long de 1 à 2  $\mu\text{m}$  et large de 0,5  $\mu\text{m}$ . Elle est mésophile (pas de croissance à 42°C). Elle a été isolée à partir d'un sol contaminé par des PCB sur un site d'enfouissement à Moreau (New York, USA) en 1986 (Goris *et al.*, 2004). Sa classification actuelle est présentée dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Classification de *Burkholderia xenovorans*

<b>Règne</b>	procaryote
<b>Embranchement</b>	Protéobacteries
<b>Classe</b>	Bétaprotéobactéries
<b>Ordre</b>	Burkholderiales
<b>Famille</b>	Burkholderiaceae
<b>Genre</b>	Burkholderia
<b>Espèce</b>	xenovorans
<b>Souche</b>	LB 400

#### V.1.1.2 Propriétés physico-chimiques

*Burkholderia xenovorans* est la plus connue des bactéries ayant la capacité de dégrader des xénobiotiques récalcitrants à la biodégradation. Elle est capable de dégrader du 2,3-dichlorobiphényle, du 2,2'-dichlorobiphényle, du 2,4'-dichlorobiphényle, du 2,4,4'-trichlorobiphényle, du 2,5,4'-trichlorobiphényle, du 2,3,2',3'-tetrachlorobiphényle, du 2,5,2'-trichlorobiphényle, du 2,3,2',5'-tetrachlorobiphényle, du 2,4,2',4'-tetrachlorobiphényle, du 2,5,3',4'-tetrachlorobiphényle, du 2,5,2',5'-tetrachlorobiphényle, du 2,3,4,2',5'-pentachlorobiphényle et du 2,4,5,2',5'-pentachlorobiphényle avec des rendements de dégradation allant de 80 % à 100 % (Mhiri et de Marsac, 1997). Il existe d'autres PCB dégradés par ce microorganisme. Comme tous les microorganismes capables de métaboliser des PCB, *Burkholderia xenovorans* présente une enzyme de type 2,3-dioxygénase capable d'opérer une dioxydation sur un site 2,3 libre du noyau biphényle. On produit alors un PCB dihydroxylé, étape préalable à la scission du noyau biphényle. Les métabolites finals sont l'acide chlorobenzoïque correspondant et un acide organique, tous deux facilement dégradables.

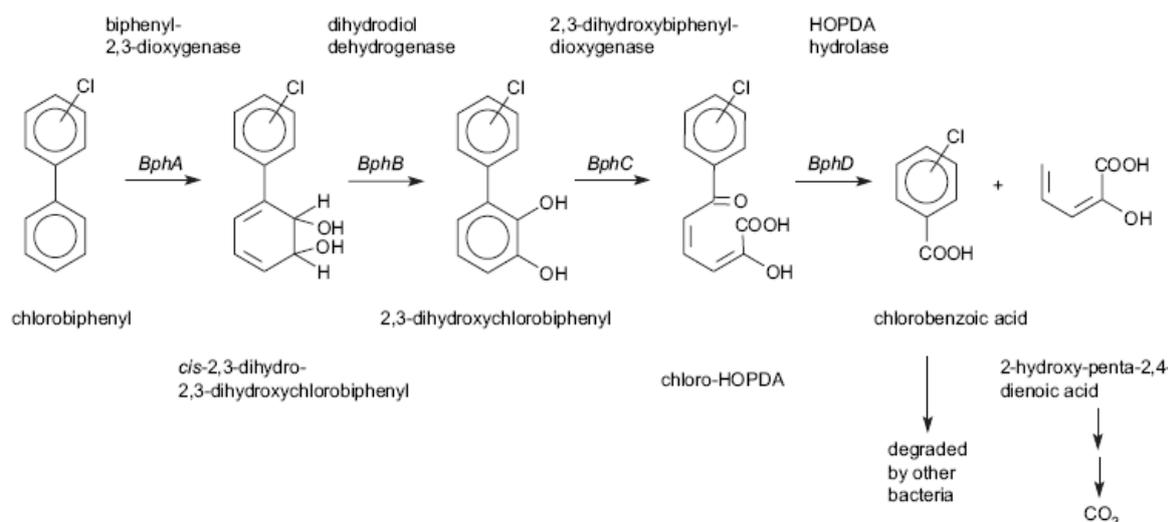


Figure 11 : Voie métabolique de la biphényle dioxygénase (Borja *et al.*, 2005).

Une des originalités de *Burkholderia xenovorans*, par rapport au reste des bactéries est sa capacité à utiliser un site 3,4 libre en lieu et place du site 2,3. Ainsi, elle augmente son spectre d'action en dégradant certains PCB *ortho*-substitués pourtant très récalcitrants via une médiation classique en 2,3. Ce phénomène est probablement lié à la spécificité des substrats de la 2,3-dioxygénase de *Burkholderia xenovorans* et non à la présence d'une seconde enzyme distincte.

Cette enzyme, la 2,3-dioxygénase, est aussi capable de s'attaquer à du dibenzofurane et dibenzodioxine ouvrant la perspective d'une biodégradation des dioxines et furanes polychlorés.

Les capacités enzymatiques de *Burkholderia xenovorans* sont si intéressantes que son matériel génétique est utilisé en bioingénierie afin de conférer à d'autres microorganismes la capacité de synthétiser la 2,3-dioxygénase (L'Abbée *et al.*, 2004). De plus, des essais ont été menés pour insérer le gène permettant la synthèse de l'enzyme capable de métaboliser l'acide chlor(A)benzoïque afin que *Burkholderia xenovorans* puisse compléter la minéralisation des PCB (Jorge *et al.*, 2006). Ces techniques bien que présentant des résultats intéressants se heurtent, en Europe, à la législation sur l'usage dispersif de microorganismes OGM.

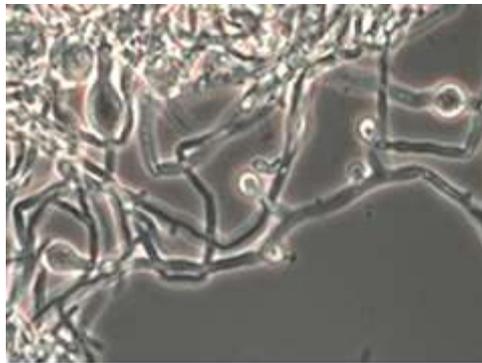
## V.1.2 *Phanerochaete chrysosporium*

### V.1.2.1 Classification

*Phanerochaete chrysosporium* est un basidiomycète décrit en 1974 par Harold H. Burdsall, Jr (Burdsall, 1974). Ce champignon se développe sur les tissus ligneux de végétaux. Ses fructifications se présentent en fin basidiocarpes d'environ 250 µm formant une fine croûte blanche et ocre. Les hyphes de diamètre compris entre 3 et 9 µm sont faiblement ramifiés. Le mycélium présente classiquement des chlamydospores terminaux ou intercalaires de 50 à 60 µm de diamètre (Burdsall, 1985). La classification de ce microorganisme est présentée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Classification de *Phanerochaete chrysosporium*

<b>Règne</b>	Fungi
<b>Division</b>	Basidiomycètes
<b>Classe</b>	Homobasidiomycètes
<b>Ordre</b>	Polyporales
<b>Famille</b>	Phanerochaetaceae
<b>Genre</b>	Phanerochaete
<b>Espèce</b>	chrysosporium
<b>Souche</b>	LCP: 51 995



BY: TRICIA JOHN & ALEKS SPURMANIS

### V.1.2.2 Propriétés physico-chimiques

*Phanerochaete chrysosporium* est un organisme capable de dégrader la lignine via un cortège d'enzymes de type peroxydase. Deux enzymes ont été identifiées en particulier, la lignine peroxydase (LiP) et la manganèse peroxydase (MnP) (Valli et Gold, 1991). Depuis la fin des années 90, les capacités de *Phanerochaete chrysosporium* à dégrader plusieurs contaminants organiques récalcitrants à la biodégradation ont été mises en évidence. En effet, *Phanerochaete chrysosporium* est capable de dégrader plusieurs polychlorophénols. Pour des temps d'exposition de l'ordre du mois (entre 24 et 32 jours), on reporte des rendements de dégradation de 50% pour le 2,4-dichlorophénol (Valli et Gold, 1991) et de 61% pour le 2,4,5-trichlorophénol (Joshi et Gold, 1993). Des travaux ont montré que ce champignon pouvait également biotransformer du 2,7-dichloro-bibenzo-dioxine et du Dinitrotoluène (Valli *et al.*, 1992).

Les PCB ont également été testés. Dietrich *et al.*, montre que *Phanerochaete chrysosporium* est capable de dégrader des dichlorobiphényles dans des proportions modestes, 11,6 % en 28 jours (Dietrich *et al.*, 1995). Plus récemment, des essais ont été menés sur des PCB extraits de sols contaminés. Des rendements de dégradation allant de 34 % à 73 % ont été obtenus pour des concentrations allant de 600 mg.L<sup>-1</sup> à 3000 mg.L<sup>-1</sup> (Ruiz-Aguilar *et al.*, 2002). D'autres études ont permis d'observer des rendements de dégradation de 89 % (De *et al.*, 2006a) et 50 % (Kamei *et al.*, 2006) pour du PCB 153 hexachloré.

Certaines de ces études mettent en évidence le rôle des peroxydases en condition lignolytique, i.e., en carence d'azote, notamment la LiP. Une voie métabolique a été proposée pour le 4,4'-dichlorobiphényle. Le premier

métabolite serait le PCB monohydroxylé. Ce métabolite peut, par la suite, subir une méthylation. Le PCB ainsi transformé subit la casse du noyau biphényle pour former des acides chlorobenzoïques (Kamei *et al.*, 2006).

Cependant, *Phanerochaete chrysosporium* aurait également la capacité d'opérer une biotransformation de PCB en condition non-lignolytique en faisant intervenir d'autres enzymes, notamment la nitrate réductase. L'originalité de cette voie métabolique est la possibilité pour *Phanerochaete chrysosporium* d'opérer une déchloration réductive en condition aérobie (De *et al.*, 2006a).

## ***V.2 Identification des microorganismes non-cultivés***

Afin de comprendre plus précisément les systèmes biologiques capables de bio transformer les PCB, il est nécessaire de connaître la composition de ces systèmes. Les techniques permettant d'identifier des bactéries ont évolué avec l'apparition et le développement de la génétique. L'arrivée de ces méthodes a bouleversé les classifications classiques. L'un des grands apports des techniques récentes est la possibilité d'étudier les bactéries non cultivables. Une grande majorité des bactéries n'a jamais été cultivée. Ceci est d'autant plus vrai pour les bactéries de l'Environnement présentes dans les sols et sédiments. Leur habitat est difficile à recréer en conditions artificielles. Ce paragraphe présente les différentes options permettant d'identifier des microorganismes dans un milieu complexe.

### **V.2.1 Notions d'écologie microbienne**

#### **V.2.1.1 Généralités**

Les bactéries sont des organismes procaryotes généralement classés selon une nomenclature de type « COFGER » i.e. Classe, Ordre, Famille, Genre, Espèce, Race. Pour les bactéries, la notion de Race est remplacée par celle de Souche. La notion d'espèce en microbiologie est différente de celle définie pour les Eucaryotes. La reproduction des bactéries étant asexuée, le critère d'interfécondité n'est pas applicable. La notion d'espèce pour les bactéries est historiquement basée sur une différenciation basée sur des critères morphologiques et biochimiques. Il n'est pas rare de voir des espèces changer de classification, notamment avec l'arrivée de la génétique. Une bactérie se nomme par convention en italique par son genre puis son espèce.

**Tableau 7 : Exemple d'une classification évolutive : *Burkholderia xenovorans*.**

<b>Année</b>	<b>Auteurs</b>	<b>Classification</b>
1986	(Bopp, 1986)	<i>Pseudomonas sp. LB400</i>
1989	(Bopp, 1989)	<i>Pseudomonas putida LB400</i>
1998	(Kumamaru <i>et al.</i> , 1998)	<i>Burkholderia cepacia</i>
1999	(Bartels <i>et al.</i> , 1999)	<i>Burkholderia sp LB400</i>
2004	(Goris <i>et al.</i> , 2004)	<i>Burkholderia xenovorans</i>

### V.2.1.2 Ecologie microbienne des sols

Le sol est une interface complexe entre biosphère et géosphère. A ce titre, c'est le siège de nombreuses réactions biochimiques participant à la régulation des cycles naturels des éléments (Carbone, Azote...). Ces réactions sont principalement le fait des bactéries du sol. Ces microflore sont donc extrêmement abondantes et variées. Classiquement, on trouve par lecture microscopique directe plusieurs milliards d'individus dont une fraction, estimée à 1%, est cultivable (Meyer *et al.*, 1997). Les enjeux principaux de l'écologie microbienne des sols et sédiments sont d'estimer la grande biodiversité du milieu et de s'intéresser aux 99% d'individus non cultivables.

## V.2.2 Techniques d'identification

### V.2.2.1 Techniques basées sur la morphologie et les réactions biochimiques

Le hollandais Antoine van Leeuwenhoek est le premier à décrire des microorganismes dans la première partie du XVIIIème siècle (Meyer *et al.*, 1997). Drapier de formation, il détournera ses instruments permettant de vérifier la qualité de ses tissus pour observer la nature. Il décrira de nombreux protozoaires, eucaryotes unicellulaires et procaryotes. Ces premières descriptions sont uniquement basées sur des critères morphologiques grossiers. Par la suite, avec l'amélioration des techniques microscopiques, les critères s'affineront. Le Tableau 8 présente quelques exemples de ces critères (Meyer *et al.*, 1997).

**Tableau 8 : Exemples de critères morphologiques.**

<b>Echelle</b>	<b>Critère</b>	<b>Exemples d'observation</b>
Macroscopique	Relief de la colonie	Lisse, Muqueux, Rugueux
	Couleur	Blanche, Rouge
	Taille	(-)
	Transparence	Opaque, Translucide
	Allure des contours	Lisse, Dentelé
Microscopique	Coloration de Gram	Positive, Négative
	Forme	Coques, Bacilles, Spirallés...
	Mode de Groupement	Chaînes, grappes...
	Taille	(-)
	Mobilité	Cils, Flagelle

Le XIXème siècle voit les techniques se moderniser et l'avènement de Louis Pasteur. De plus en plus d'organismes sont décrits et de nouveaux outils sont nécessaires pour continuer de classer de manière cohérente les microorganismes. Ces critères s'appuieront sur le métabolisme de la bactérie. Ils permettent de classer plus précisément les microorganismes. Ainsi, un faisceau d'observations à la fois morphologiques et biochimiques autorisera la discrimination des espèces. C'est donc une notion arbitraire. Le Tableau 9 présente quelques exemples de ces critères.

**Tableau 9 : Exemples de critères biochimiques.**

<b>Critère</b>	<b>Exemples d'observation</b>
Catalase	Positive, Négative
Métabolisme des sucres	Positive, Négative
Métabolisme des acides gras	Positive, Négative

### V.2.2.2 Les techniques basées sur la Génétique

Dès le XIXème siècle, le contenu du noyau de la cellule est étudié. On y découvre une substance riche en phosphore, puis on en extrait des protéines et des acides. En 1944, l'américain Avery apporte des précisions sur le rôle de l'ADN (Voet et Voet, 2005) et découvre que l'ADN est le support génétique des microorganismes. Presque

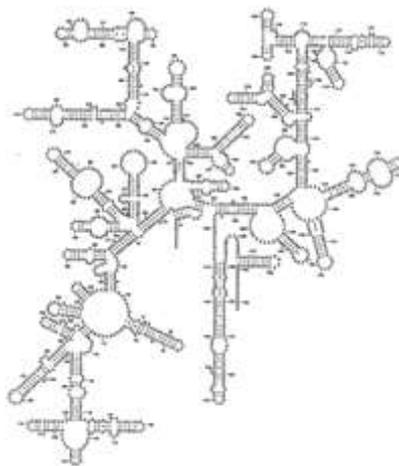
10 ans plus tard, en 1953, Watson, Crick et Franklin découvrent la structure hélicoïdale de l'ADN. Ce fût le point de départ de nombreuses révolutions scientifiques, dont celles de l'écologie microbienne. Des outils comme le coefficient de Chargaff sont apparus, accélérant l'état des connaissances. Ensuite, l'arrivée de la PCR (Polymerase Chain Reaction) dans les années 90 ont permis la création de nombreux outils au service de la microbiologie (Meyer *et al.*, 1997). De nouveaux critères de classification vont apparaître. La distance génétique entre individus va compléter les critères morphologiques et biochimiques. La précision apportée par ces outils va bouleverser les classifications. De plus, ces techniques ne sont plus dépendantes de la culture de la bactérie en souche pure. Ceci va permettre d'identifier une part non négligeable de microorganismes, les bactéries non-cultivables, en particulier les bactéries du sol.

### ***V.2.2.2.1 L'ADN***

L'Acide DésoxyriboNucléique est une macromolécule composée d'un enchaînement d'acides nucléiques. Cet enchaînement contient toutes les informations nécessaires au développement de l'individu et à sa propagation. L'ADN est composé de parties dites « codantes » et de parties « non-codantes ». Le rôle de chacune est encore à l'étude. Les parties « codantes » permettent le processus de transduction qui conduit à la synthèse des protéines. Ces protéines seront les unités fonctionnelles capables d'effectuer tous les processus biologiques permettant la viabilité de l'individu.

### ***V.2.2.2.2 Le gène codant pour l'ARNr 16S***

L'ARN ribosomal 16S (Figure 12) est une sous-unité de l'ARN ribosomal. L'ARN ribosomal est impliqué dans la traduction de l'information génétique codée sur un ARN messager. Il est constitué successivement de zones pouvant s'apparier suivant des liaisons Watson-Crick et de zones non appariées formant des boucles. L'enchaînement de ces zones et la présence d'interactions longue distance confèrent une structure tertiaire à l'ARN ribosomal. Cette structure est indispensable à la fonction d'interface entre les ARN messagers et transferts.



**Figure 12 : Structure en 2 dimensions de l'ARNr 16S (Perke, 2003).**

Une mutation du gène dans une partie appariée rend l'ARNr non fonctionnel. La mutation ne se propage donc pas. Ainsi, les parties appariées sont extrêmement conservées et communes pour toutes les bactéries. Les parties dites en boucle peuvent muter de manière muette. Il en résulte une très grande variabilité interspécifique. Ces deux

éléments, alternance de zones conservées et de zones ultra variables, font de ce gène un bon candidat pour l'identification. En effet, en choisissant des amorces dans les zones conservées encadrant sur le gène une zone variable, toutes les bactéries seront visées et le polymorphisme de la partie variable sera facilement estimé.

### ***V.2.2.2.3 Les techniques d'identification par séquençage du gène 16S rRNA***

Il existe différentes techniques pour identifier une communauté de bactéries à l'aide du gène 16S rRNA. Elles sont toutes basées sur le même principe. Il faut dans un premier temps extraire toute l'ADN de toutes les cellules présentes dans l'échantillon. C'est l'extraction métagénomique. Tout l'ADN, codant, non codant, dégradé ou fonctionnel, est extrait puis purifié. Ensuite, à l'aide d'amorces spécifiques, une amplification du gène 16S rRNA est réalisée. Cette amplification permet d'extraire les différentes versions du gène 16S présentes dans l'extrait métagénomique. Les principales différences sont dans le séquençage et dans la technique utilisée pour estimer le polymorphisme (Weisburg *et al.*, 1991).

### ***V.2.2.2.4 La librairie de clones et séquençage de Sanger***

Cette technique nécessite 2 étapes distinctes. En effet, pour un séquençage de Sanger, il faut préalablement isoler les différentes versions du gène 16S ARNr afin de les comparer entre elles.

#### **V.2.2.2.4.1 La librairie de clones :**

Former une librairie de clones consiste à insérer une copie de gène 16S ARNr issue de l'environnement dans une bactérie hôte, le plus souvent de type *E. Coli*. Les bactéries hôtes recombinantes, *id est*, ayant intégré la copie du gène 16S ARNr dans leur génome, seront cultivées et amplifiées par PCR (Weisburg *et al.*, 1991). Cette technique permet d'isoler les différentes versions du gène 16S présentes dans l'environnement étudié. Une fois cette librairie constituée, il faut estimer le polymorphisme du gène 16S. Comme une version de ce gène correspond à une espèce, déterminer le polymorphisme du gène revient grossièrement à déterminer la diversité spécifique du milieu étudié. On sélectionne un représentant pour chaque espèce discriminée lors de l'évaluation du polymorphisme pour le séquençage de Sanger. La capacité de séquençage de cette méthode est limitée, il est inutile de séquencer plusieurs fois la même version du gène 16S.

#### **V.2.2.2.4.2 Le séquençage**

Le séquençage est la détermination de l'enchaînement d'acides nucléiques d'un fragment d'ADN. Cet enchaînement est la signature génétique de l'individu. Les différentes versions isolées du gène 16S sont séquencées par synthèse de brins d'ADN complémentaires à l'aide de didésoxynucléotides marqués par fluorescence mélangés à des désoxyribonucléotides classiques. Lorsque l'ADN polymérase intègre un didésoxynucléotide, la réaction s'arrête. Ainsi, on obtiendra un mélange de fragments de taille différente avec un didésoxynucléotide fluorescent terminal. La lecture de la longueur des brins et de la nature du didésoxynucléotide permet de reconstituer la séquence du brin initial. Une fois les séquences déterminées, un traitement bioinformatique permet d'estimer la distance génétique entre l'individu et les bases de données mondiales. Après avoir choisi un seuil de ressemblance, les différentes espèces peuvent être discriminées. Encore une fois, la notion d'espèce en microbiologie est arbitraire.

L'avantage de cette technique est qu'elle apporte une précision accrue par rapport aux techniques classiques. En revanche, le clonage est une étape limitante qui restreint l'étude aux espèces les plus représentées dans le milieu d'origine (Weisburg *et al.*, 1991).

#### ***V.2.2.2.5 Le Pyroséquençage***

Le Pyroséquençage est une technique de séquençage dite « haut débit » (Margulies *et al.*, 2005). Elle permet de s'affranchir de l'étape de clonage. L'ensemble des copies du gène codant pour l'ARNr 16S est séquencé en même temps sans séparation préalable. Une fois les séquences déterminées, un traitement bioinformatique permet d'estimer la distance génétique entre l'individu et des bases de données mondiales. Après avoir choisi un seuil de ressemblance, les différentes espèces peuvent être discriminées (Liu *et al.*, 2008). Cette technique s'affranchit donc du clonage et permet une information quantitative et qualitative de la microflore. En dépit de son énorme potentiel, il est encore difficile de pouvoir affirmer avec précision les niveaux de détection des espèces. Les performances de ces techniques sont très dépendantes de la qualité de l'extraction initiale, et l'étape de la PCR peut introduire une déformation de l'image de la microflore de départ.

## VI L'ANALYSE DE CYCLE DE VIE

### VI.1 *Généralités*

L'analyse de cycle de vie (ACV) est un outil d'aide à la décision qui s'appuie sur une méthodologie rigoureuse et transparente qui est toujours en cours de développement et d'amélioration (Jolliet *et al.*, 2005). L'intérêt de cette méthode est d'évaluer les impacts potentiels sur l'environnement dus à la production d'un bien ou au fonctionnement d'un procédé, et ce, sur l'ensemble du cycle de vie, c'est-à-dire du « berceau au tombeau ». A cet effet, il est nécessaire d'établir des bilans matière et énergie puis d'interpréter les flux en termes d'impacts potentiels sur l'environnement. L'analyse de cycle de vie est standardisée par les normes internationales ISO 14040 et ISO 14044 (2006). La première délimite le cadre général de la méthodologie et la seconde en décrit chacune des étapes en détail.

### VI.2 *Etapas d'une ACV*

#### VI.2.1 Définitions des préliminaires de l'étude

Selon les normes, il est indispensable de commencer par fixer les objectifs et le champ de l'étude. Cette étape primordiale, qui oriente les suivantes, consiste à définir le cadre à l'intérieur duquel toute l'analyse va être réalisée (ISO14040, 2006). A cet effet, il faut tout d'abord connaître les raisons de la réalisation de l'ACV et la portée des résultats. Ensuite, il convient de définir l'unité fonctionnelle qui correspond à une unité de service rendu par un bien, un service ou un procédé. Elle permet de comparer les impacts environnementaux de différents biens, services ou procédé, à service rendu égal. En outre, le système doit être limité dans l'espace et dans le niveau de détail pour éviter que le problème et l'analyse ne deviennent infinis dans le temps et dans l'espace. En effet, en considérant les intrants et émissions de toutes les étapes de cycle de vie qui entrent en jeu de près ou de loin dans le processus de fabrication d'un produit ou de fonctionnement d'un procédé, le système peut prendre une dimension planétaire (Anex, 2009). Il convient donc de privilégier les flux de matière et d'énergie et les étapes les plus importants et les plus représentatifs du système et à ne pas considérer les étapes strictement identiques. Finalement, le choix d'une règle d'allocation des flux doit être fait en fonction des critères d'importance mis en avant entre les différents flux, à savoir des critères économiques, environnementaux ou massiques.

#### VI.2.2 Inventaire de cycle de vie

Cette longue étape d'inventaire du cycle de vie (ICV) a pour but de rassembler et de quantifier l'ensemble des flux de matière et d'énergie associés à chaque processus élémentaire du cycle de vie. Il convient d'insister sur l'importance d'exprimer tous les flux en fonction de l'unité fonctionnelle. Par ailleurs, cette phase s'accompagne d'un diagramme de flux (ou modélisation de cycle de vie ou arbre des processus) lequel offre une vision systémique et limitée de l'étude. La pertinence de l'inventaire implique une connaissance fine des procédés à analyser. Finalement, l'ICV sert de référence pour le calcul des impacts environnementaux associés à chacun des intrants et des émissions inventoriés. Il s'agit ainsi d'une étape critique car l'omission ou l'imprécision de certaines données peut modifier grandement les conclusions de l'ACV.

## VI.2.3 Analyse des impacts du cycle de vie

Sur la base de l'inventaire de cycle de vie et dans le respect des hypothèses faites lors de la définition des préliminaires de l'ACV, cette étape d'analyse des impacts du cycle de vie (AICV) caractérise les flux préalablement inventoriés en impacts sur l'environnement. Pour cela, il est indispensable de procéder au choix de la méthode de caractérisation des impacts qui sera employée puis des catégories d'impacts qui seront évaluées. A cet effet, deux méthodes existent: une évaluation des effets directs dite « midpoint » et une évaluation des effets indirects dite « endpoint ». La première caractérise des impacts intermédiaires en évaluant le pouvoir d'action objectif des agents sur l'environnement (par exemple l'acidification, l'eutrophisation, le réchauffement global). La seconde caractérise quant à elle les dommages causés par les mêmes agents sur des sujets à protéger donc plus subjectifs (par exemple la santé humaine, les ressources non renouvelables) (Jolliet *et al.*, 2005). Finalement, quelle que soit la méthode, des scores d'impacts sont calculés et traduits en diagrammes d'impacts.

## VI.2.4 Interprétation et analyse de sensibilité

L'ultime phase de l'ACV établit un lien entre les trois premières phases en ce sens qu'elle extrait, à partir des résultats d'ICV et d'AICV, les conclusions et recommandations générales en fonction des objectifs de départ. A ce stade, il est possible de revenir sur certains choix opérés lors des trois étapes susmentionnées. De ce fait, l'ACV apparaît comme une méthode itérative (ISO14040, 2006) comme l'illustre la Figure 13 :

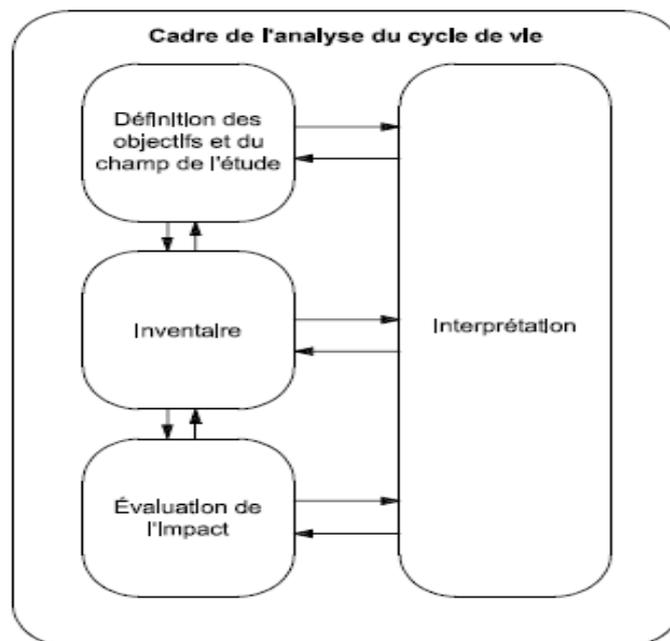


Figure 13 : Etape de l'ACV (ISO14040, 2006)

## VI.3 ACV et dépollution des sols

La recherche bibliographique effectuée sur le thème des analyses de cycle de vie des techniques de dépollution de sols pollués a abouti à un premier constat : l'application de la méthodologie ACV à ce type d'activité est récente et peu développée. En effet, sur 21 publications potentiellement en rapport avec le sujet, seules 13 ont finalement été retenues qui présentent un lien direct entre ACV et dépollution de sols pollués. Cependant, aucune analyse de cycle de vie sur la dépollution de sols contenant des PCB n'a été retrouvée.

Dans un premier temps, les ACV réalisées peuvent être divisées en deux parties distinctes et complémentaires à savoir une qui regroupe des études (7 au total) sur la méthodologie ACV appliquée aux techniques de dépollution de sols pollués et une qui répertorie des ACV appliquées à des techniques de dépollution de sols pollués pour une substance précise (4 au total). Deux études attelées à une revue générale de la bibliographie des ACV de techniques de dépollution de sols pollués viennent notamment confirmer le peu de références existantes tout en apportant un regard synthétique complémentaire à l'analyse des publications sélectionnées et préalablement analysées (Morais et Delerue-Matos, 2009; Suèr *et al.*, 2004).

A travers ces publications, différentes problématiques propres aux ACV de techniques de dépollution de sols pollués sont traitées. En effet, Hellweg *et al.*, (Hellweg *et al.*, 2004) étudient la question de l'intégration du temps dans les évaluations d'impacts à très long terme. Ils s'appuient notamment sur l'exemple du cadmium et du cuivre. Le problème de temps soulevé par Hellweg *et al.*, s'applique essentiellement aux métaux plus qu'aux polluants organiques. En effet, le paramètre temporel diverge complètement puisque les métaux ne se dégradent pas contrairement aux molécules organiques, même à des échelles de temps étendues.

Volkwein *et al.*, (Volkwein *et al.*, 1999) de leur côté s'orientent davantage vers le développement d'un logiciel qui permet d'analyser systématiquement différents processus élémentaires (bioventing, excavation etc.) qui entrent en jeu dans les techniques de dépollution des sols pollués. Enfin Lesage *et al.*, (Lesage *et al.*, 2007a; Lesage *et al.*, 2007b) proposent d'explorer une approche d'inventaire de cycle de vie « conséquentielle » au lieu de l'approche standard « attributionnelle ». La comparaison proposée par Lesage *et al.*, entre les analyses ce cycle de vie conséquentielle et attributionnelle s'appuie sur les impacts évalués. Pour les deux approches, les impacts primaires c'est-à-dire liés aux polluants à traiter et les impacts secondaires c'est-à-dire liés à l'ensemble des procédés de dépollution sont inclus dans l'analyse. En revanche, l'approche conséquentielle évalue des impacts tertiaires c'est-à-dire des impacts liés à l'activité qui aura lieu sur le site remédié.

D'un point de vue méthode d'ACV, les unités fonctionnelles sont, en général, définies sur le même modèle : produire une certaine quantité de sols dépollués ou traiter une certaine quantité de sols, avec pour chacun une valeur de référence (Diamond *et al.*, 1999; Toffoletto *et al.*, 2007).

Les frontières du système diffèrent selon les études et selon les objectifs de l'ACV. En effet, Bender *et al.*, (Bender *et al.*, 1998) incluent par exemple le transport des travailleurs sur le lieu de travail ; Cadotte *et al.* (Cadotte *et al.*, 2007) considèrent les impacts liés au montage/démantèlement des infrastructures parce qu'ils veulent comparer la construction d'un site permanent pour traiter des sols ou la construction d'infrastructures temporaire sur le lieu à dépolluer. Par ailleurs, de façon générale, aucune étude n'inclut la construction des engins.

Il est intéressant de relever qu'avec les publications étudiées, l'essentiel des techniques de dépollution des sols pollués sont comparées entre elles : les techniques sur site, in-situ ou ex-situ : enfouissement hors site, confinement, chaulage, et bioleaching (Blanc *et al.*, 2004) ; recouvrement par de l'asphalte, excavation et lavage du

sol, traitement biologique et traitement thermique (Volkwein *et al.*, 1999) ; pompage et traitement des eaux récupérées, bioslurping, bioventing et biosparging, bioslurping, bioventing et oxydation chimique, traitement ex-situ par biopile (Cadotte *et al.*, 2007).

Quant au choix des méthodes d'évaluation d'impacts sélectionnées dans les différentes études, il ne semble pas se dégager de tendance consensuelle. En effet, sont entre autres utilisées les méthodes « midpoint » EDIP97 (« Environmental Design of Industrial Products ») ou US EPA TRACI (« Tool for the Reduction and Assessment of Chemical and other environmental Impact ») et la méthode « endpoint » IMPACT 2002+ (Morais et Delerue-Matos, 2009). Néanmoins, quelle que soit la méthode d'évaluation, la plus grande part des impacts environnementaux est attribuée à l'excavation (Diamond *et al.*, 1999) et aux transports des sols (Page *et al.* 1999). En outre, l'étude de Toffoletto *et al.* qui compare un centre permanent de traitement avec des installations temporaires, corrobore cette conclusion quant à l'importance des transports concluant que l'avantage environnemental d'un traitement dans un site permanent disparaît si la distance entre le site pollué et le lieu de traitement excède 200 kilomètres (Toffoletto *et al.*, 2007).

## VII CONCLUSION

Cette synthèse ciblée sur la thématique de la dépollution des sols contaminés par les PCB indique que ce sujet répond à un enjeu scientifique et technologique. Bien qu'interdits depuis maintenant plus de 30 ans, les PCB restent des polluants extrêmement surveillés. Le plan national d'élimination des PCB confinés arrive à échéance cette année. Il reste maintenant à évaluer le niveau de la contamination liée aux PCB dispersés et son risque associé. Les sols contaminés par les PCB, souvent situés sur d'anciens sites industriels, peuvent avoir un fort potentiel de valorisation immobilière. De plus, il apparaît clairement que le cadre législatif tend vers un durcissement de l'attitude des pouvoirs publics envers les exploitants émetteurs de polluants. Lors de la gestion de sol contaminé, les solutions biologiques sont maintenant explicitement recommandées par les outils méthodologiques fournis par les services de l'Etat.

Cette étude bibliographique révèle donc qu'en dépit du caractère récalcitrant des PCB, un certain nombre de microorganismes sont capables d'opérer une biotransformation. Deux types de réactions entrent principalement en jeu, la déchloration réductive et la l'hydroxylation oxydative. Une rapide étude de ces deux phénomènes révèle qu'ils sont parfaitement complémentaires pour obtenir la minéralisation complète des PCB dont ceux fortement chlorés. Pour les mécanismes aérobies, plusieurs types de microorganismes présentent à priori un potentiel technologique. Il est intéressant de s'intéresser à une bactérie du sol présentant une particularité enzymatique pour la comparer à un organisme fongique capable de dégrader un grand nombre de xénobiotiques. Dans le cas des champignons, leur comportement abiotique vis-à-vis des PCB est peu étudié. Ainsi nous consacrerons un chapitre à l'étude du potentiel technologique de *Burkholderia xenovorans*, et de *Phanerochaete chrysosporium*.

Si pour les conditions aérobies, les microorganismes sont assez bien connus, il reste beaucoup à découvrir sur les microflore anaérobies capables de dégrader les PCB. Pour s'en affranchir, il serait tentant de se servir de l'ingénierie génétique et de transférer des gènes d'intérêt dans des bactéries hôtes adéquats. Mais il est tout aussi intéressant de se rappeler que la nature est le premier producteur d'OGM au contact des pollutions émises par l'Homme. Le choix a été fait d'utiliser cette dernière propriété et de prélever des microflore dans un milieu naturel pollué par des PCB. Le troisième chapitre de ce mémoire sera consacré à l'étude du potentiel technologique de sept communautés issues de sédiments prélevés dans un célèbre fleuve français contaminé par les PCB. L'un des freins principaux à la mise en place de solution biologique est le peu de connaissances acquises lors de l'industrialisation des procédés. Si la littérature regorge d'exemples réussis de dépollution biologique de PCB en laboratoire, il n'y a que très peu de cas appliqués sur le terrain. A la lumière du savoir acquis lors du chapitre 3, un changement d'échelle de traitement sera effectué afin de tester la communauté sélectionnée lors d'un traitement séquentiel anaérobie/aérobie.

L'un des nouveaux enjeux de la thématique de la dépollution biologique de sols contaminés par des polluants organiques est la connaissance des microflore actives. De plus en plus d'outils issus de la biologie moléculaire sont appliqués sur le terrain pour contrôler la présence de gènes ou d'individus d'intérêt. L'étude des microorganismes présents dans un essai de dépollution biologique peut également apporter de précieuses indications qui permettent d'orienter les amendements à conduire afin d'optimiser l'efficacité du traitement. Lors de ces travaux de thèse, les microflore de six milieux ont été étudiées via un pyroséquençage suivi d'une analyse bioinformatique. Cette technique très récente n'est que très peu utilisée dans le contexte de l'étude de microflore tellurique et encore moins dans celui de la dépollution des sols. Le quatrième chapitre de ce mémoire sera consacré à l'étude génétique de communautés anaérobies.

Enfin, ce mémoire sera conclu par une analyse de cycle de vie qui permettra d'évaluer précisément la performance énergétique d'un procédé de traitement biologique de sols contaminés par les PCB. Cette méthodologie encre définitivement nos recherches dans sa phase applicative, en répondant aux exigences des acteurs du domaine de la dépollution des sols. En effet, si les bureaux d'études spécialisés dans la dépollution des sols maîtrisent des anciens outils méthodologiques comme l'évaluation détaillée des risques, l'outil complet qu'est l'analyse de cycle de vie est encore peu utilisé. Le caractère comparatif de l'analyse de cycle de vie est pourtant un élément important dans le choix de la meilleure technique de dépollution. Le cinquième est dernier chapitre de ce mémoire de thèse relatera l'analyse de cycle de vie comparative de deux filières de traitement de sol contaminé par les PCB : l'incinération et la dépollution biologique, sur la base des résultats obtenus lors de cette thèse.

Ce plan répond aux principales problématiques soulevées par cette étude bibliographique :

- Quel est le niveau de performance théorique des microorganismes capables de dégrader les PCB par voie aérobie (Chapitre 2) ? Par voie anaérobie (Chapitre 3) ? Lors d'un traitement séquentiel (Chapitre 3) ?
- Comment peut-on améliorer la connaissance des microflores anaérobioses intervenant dans la dégradation des PCB ? (Chapitre 4)
- Quels sont les performances environnementales, réelles d'un traitement biologique par rapport à son concurrent thermique aujourd'hui privilégié ? (Chapitre 5)

**Chapitre 2 :**  
**Dégradation**  
**aérobie des**  
**polychlorobiphényl**  
**es**

# I INTRODUCTION

Comme le souligne la synthèse bibliographique, les PCB sont récalcitrants à la dégradation par voie oxydative. Ceci est d'autant plus vrai que le nombre d'atomes de chlore autour du noyau biphényle est grand. Cependant, la voie oxydative est connue pour être la plus efficace pour achever l'ouverture de cycle aromatique, étape nécessaire à la minéralisation complète du PCB. C'est donc une voie qu'il est nécessaire de connaître en vue de la mise en place d'un procédé de traitement de sol contaminé par des PCB. La littérature cite plusieurs microorganismes capables de dégrader des PCB par voie oxydative. Parmi ceux-ci, une bactérie, *Burkholderia xenovorans*, et un champignon, *Phanerochaete chrysosporium*, sont retenus pour cette étude. L'objectif des travaux reportés dans ce chapitre est de tester le potentiel technologique de ces deux souches cultivées.

La première partie de ce chapitre étudie la bactérie *Burkholderia xenovorans*, anciennement *Pseudomonas putida* LB400, qui est identifiée comme la bactérie capable de dégrader des PCB possédant le meilleur potentiel technologique. Grâce aux propriétés de son enzyme 2,3 biphényle dioxygénase, qui est plus polyvalente que celle d'autres espèces, elle est capable de dégrader des PCB relativement chlorés. Ses capacités sont, dans un premier temps, testées en milieu aqueux afin de s'assurer que la souche disponible au laboratoire ainsi que le milieu de culture choisis, permettent la dégradation de PCB. Dans un second temps, cette souche est testée sur un sol artificiel contaminé, puis sur un sol issu d'un environnement contaminé depuis au moins 20 ans.

La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à l'organisme fongique *Phanerochaete chrysosporium*. Ce champignon, également connu sous le nom d'agent de la pourriture blanche, a été très étudié pour ses capacités métaboliques. Ses enzymes, capables de dégrader des matériaux organiques complexes, tels les lignines, peuvent dégrader un grand nombre de contaminants organiques, dont les PCB. Les mécanismes enzymatiques mettent en jeu des espèces radicalaires de l'oxygène extrêmement réactives et permettent à ce champignon de dégrader des PCB fortement chlorés. De plus, la matière organique que constitue le mycélium de *Phanerochaete chrysosporium* est susceptible d'avoir un pouvoir de sorption sur les molécules hydrophobes présentes dans l'eau. Il est intéressant de mesurer précisément ce phénomène et d'estimer l'effet conjoint des capacités métaboliques et des propriétés mécaniques de son mycélium. Ce thème est développé dans la première partie du sous-chapitre consacré à *Phanerochaete chrysosporium*. La seconde partie présente ses capacités dans le contexte d'un essai de dépollution d'un sol artificiel contaminé par des PCB.

Le contenu de ce chapitre doit permettre de conclure quant au potentiel technologique de ces deux microorganismes dans le cadre d'un traitement aérobie d'eaux ou de sols contaminés par des PCB.

## II ETUDE DU POTENTIEL DE BULKHOLDERIA XENOVORANS

### II.1 *Matériel et méthodes*

#### II.1.1 Expérimentation

##### II.1.1.1 Matériel

###### *II.1.1.1.1 Réactifs et petits matériels*

Les PCB sont issus du PCB-Mix 3 fourni par Cluzeau Info Labo (France). Ce mix contient 10 mg.L<sup>-1</sup> dans du cyclohexane de chacun des 7 PCB suivants : n°IUPAC 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180. L'Aroclor 1254 Technical grade provient d'Ultra Scientifique (North Kingstown, RI, USA). Le solvant d'extraction est du *n*-hexane suprasolv (VWR, Merk, France). Le 2,4,5,6 Tetrachlorometaxylene (TCMX) 10 mg.L<sup>-1</sup> dans du cyclohexane provient de chez Cluzeau Info Labo (France). Le carvone et le biphényle proviennent d'Aldrich (France) et sont purs à 98 %.

Les sels minéraux K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> proviennent de chez Sigma et sont purs à 99 %. Le ZnSO<sub>4</sub> et le Ba(OH)<sub>2</sub> viennent de Prolabo (France). L'acide aminobenzoïque, la biotine, l'acide folique, la niacinamide, la pyridoxal, la pyridoxamine, la riboflavine, la thiamine, l'acide lipoïque, la vitamine B12, l'acide D-Pantothenique et la pyridoxine proviennent de chez Aldrich-Fisher (France). Le bouillon de tryptocaséine de soja vient de chez Prolabo (France).

Les fermenteurs en verre ont un diamètre de 12 cm et une hauteur de 20 cm. Leur volume utile est de 2 L.

###### *II.1.1.1.2 Micro-organisme*

La bactérie *Bulkholderia xenovorans* CIP 108558 est issue de la collection de l'Institut Pasteur (France).

###### *II.1.1.1.3 Sols*

###### II.1.1.1.3.1 Sol artificiel

La kaolinite est fournie par Fluka (France). La tourbe blanche utilisée vient d'une jardinerie Botanic (31670 Labège, France). Le sable est conforme à la norme NF XPS 54-207 (hygiène de bacs à sable) et est fabriqué par EcoTerre/Ecobati (84 270 Védene, France).

###### II.1.1.1.3.2 Sol réel

Le sol réel provient d'un atelier de démantèlement de composés électriques du Centre de détention de Villeneuve-sur-lot. Il est appelé par la suite sol « VsL ». Les caractéristiques agronomiques de ce sol sont données dans le Tableau 10.

**Tableau 10 : Propriétés physicochimique du sol VsL.**

	Paramètre	Valeur
Classe granulométrique	Supérieure à 1,25 mm	3,9 %
	Entre 1,25 mm et 0,5 mm	11,5 %
	Entre 0,5 mm et 0,125 mm	49,3 %
	Entre 0,125 mm et 0,05 mm	5,3 %
	Inférieure à 0,05 mm	30,0 %
	Matière organique (%MS)	3,3
	Carbone (indicatif en g/kgMS)	19,1
	Azote (NTK) (mg de N/kgMS)	689,1
	Phosphore (mg/kgMS)	864,8
	Potassium (g/kgMS)	6,6
	Calcium (g/kgMS)	4,8

## II.1.1.2 Méthodes

### II.1.1.2.1 Essai de dépollution en milieu liquide

Les milieux de culture sont préparés dans des erlenmeyers de 250 mL avec la solution minérale minimale (SMM) suivante, pour 1L : 77,5 mL de solution contenant :  $K_2HPO_4$  : 56,77 g.L<sup>-1</sup> ;  $KH_2PO_4$  : 21,94 g.L<sup>-1</sup> ;  $NH_4Cl$  : 27,61 g.L<sup>-1</sup> ; 1 mL de  $MgSO_4$  200 g.L<sup>-1</sup> ; 1 mL  $FeSO_4$  10 g.L<sup>-1</sup> ; 1 mL  $CaCl_2$  3g.L<sup>-1</sup>. Cent mL de SMM sont autoclavés 25 min à 120°C sous 1 bar. A la sortie de l'autoclave, on ajoute 1 mL d'une solution de glucose stérile à 250 g.L<sup>-1</sup>. Sont ajoutés à cette solution 10 µL d'une solution vitaminée préalablement filtré à 0,22 µm contenant 200 mg.L<sup>-1</sup> de chacun des produits suivants : acide aminobenzoïque, biotine, acide folique, niacinamide, pyridoxal, pyridoxamine, riboflavine, thiamine, acide lipoiq, vitamine B12, acide D-Pantothenique et pyridoxine. On ajoute 100 µL d'une solution de PCB 10 mg.L<sup>-1</sup> dans du cyclohexane. L'ensemble des manipulations est réalisé sous atmosphère stérile.

*Bulkhoderia xenovorans* est cultivée dans un bouillon Trypto Caséine de Soja à 3 % en masse. Elle est repiquée 3 fois dans la SMM. Les milieux réactionnels sont ensemencés avec 2 mL du 3ème repiquage.

Les cultures sont placées sous agitation rotative à 30°C pendant 15 jours. Des prélèvements sont faits à T=0j et à T=16j. L'expérimentation est réalisée en triplicat.

### II.1.1.2.2 Essai de dépollution en milieu solide

#### II.1.1.2.2.1 Sol artificiel

Le sol artificiel est préparé avec 10 % de tourbe blanche, 60 % de sable et 30 % de kaolinite en masse.

Huit cents grammes de ce sol sont disposés dans des fermenteurs. Les fermenteurs en verre de 2 L sont autoclavés (25 min, 120 °C sous 1 bar). Des cultures de *Bulkhoderia xenovorans* de 200 mL sont lancées dans la SMM. La culture bactérienne est mélangée manuellement sous atmosphère stérile aux 800 g de sol. Pour l'expérimentation témoin, la culture est remplacée par 200 mL de SMM stérile. Une fois un mélange homogène obtenu, 250 µL d'une solution d'Aroclor 1254 Technical grade à 400 mg.mL<sup>-1</sup> dans l'hexane sont ajoutés.

Une fois les sols dopés, les fermenteurs sont connectés de manière stérile à une colonne d'air pressurisée. L'air envoyé dans les fermenteurs est filtré à 0,22 µm par une membrane hydrophobe. Un prélèvement d'environ 100 g est effectué après 90 jours sous atmosphère stérile.

#### II.1.1.2.2.2 Sol réel

Huit cents grammes de sol VsL sont disposés dans des fermenteurs. Les fermenteurs sont autoclavés (25 min, 120 °C sous 1 bar). Sous atmosphère stérile, 200 mL de SMM stérile pour la modalité témoin. Pour la modalité ensemencée, 200 mL de culture de *Burkholderia xenovorans* sont ajoutés sous atmosphère stérile.

Les fermenteurs sont ensuite connectés de manière stérile à une colonne d'air pressurisée. L'air envoyé dans les fermenteurs est filtré à 0,22 µm par une membrane hydrophobe. Un prélèvement d'environ 100 g est effectué après 60 jours sous atmosphère stérile.

## II.1.2 Analyses

Le suivi de la croissance bactérienne dans les essais liquides est réalisé par mesure de la densité optique à 600 nm. La consommation de glucose est mesurée avec la méthode au DNS. La teneur en PCB est analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. L'ensemble de ces méthodes analytiques sont décrites dans les annexes II-1 et II.2.

## II.2 *Résultats et discussion*

### II.2.1 Essai de dépollution en milieu liquide

#### II.2.1.1 Mesure de la croissance de *Burkholderia. Xenovorans*

##### II.2.1.1.1 *Résultats*

Les résultats de la mesure de la croissance et de la consommation des sucres sont présentés sur la Figure 14. Ces mesures permettent de vérifier la stérilité des expérimentations témoins ainsi que la bonne croissance de la bactérie étudiée.

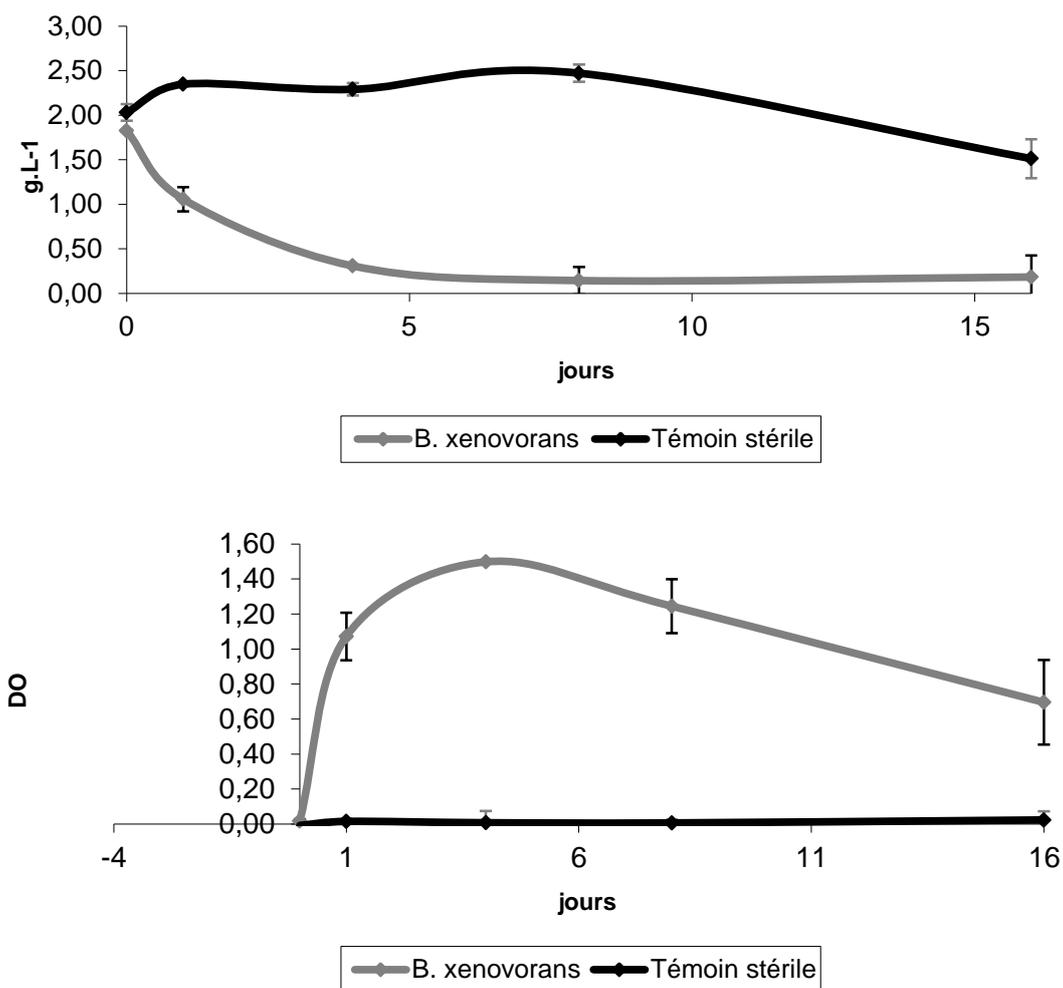


Figure 14 : Cinétique des paramètres de croissance. A : Densité Optique à 600 nm ; B : Concentration en glucose

### II.2.1.1.2 Discussion

Les résultats présentés dans la Figure 14 indiquent qu'il n'y a pas de consommation de sucre et pas de croissance bactérienne dans l'expérimentation témoin. Elles sont donc bien restées stériles. En présence de *Burkholderia xenovorans*, le glucose a été consommé en 4 jours. Cette consommation est corrélée avec l'augmentation de la densité optique. On en déduit que le milieu de culture est adapté à la croissance de cette bactérie et que les PCB ajoutés n'entraîne pas une toxicité excessive qui inhiberait toute croissance.

Les témoins sont bien restés stériles et une croissance microbienne a été observée pour l'expérimentation inoculée avec *Burkholderia xenovorans*.

## II.2.1.2 Mesure de la dégradation des PCB

### II.2.1.2.1 Résultats

Les résultats de l'expérimentation de *Burkholderia xenovorans* en milieu liquide pour les 7 PCB sont présentés sur la Figure 15. Les résultats sont exprimés en pourcentage résiduel. Le 100% représente la quantité de PCB détecté à t=0 jour. Les résultats des pourcentages de PCB résiduel sont donnés par l'Équation 1 :

$$\%PCB_{\text{résiduel}} = \frac{\text{Concentration PCB}_{t=16\text{jours}}}{\text{Concentration PCB}_{t=0\text{jour}}}$$

Équation 1 : Calcul de la teneur résiduelle en PCB.

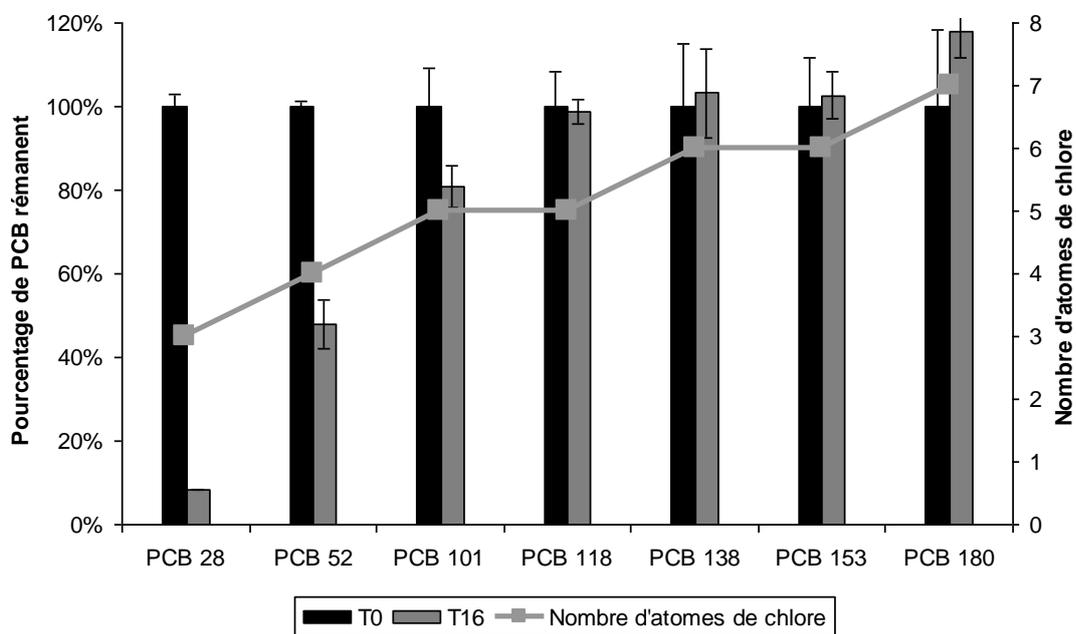


Figure 15 : Comparaison de la quantité de PCB entre t = 0 jour et t = 16 jours en présence de *Burkholderia xenovorans* par PCB en fonction du nombre d'atomes de chlore.

Les pourcentages de dégradation à 16 jours oscillent entre 0 % et presque 100% suivant le PCB considéré. Plus le nombre d'atomes de chlore du PCB est important, plus il est réfractaire à la biodégradation par *Burkholderia xenovorans*.

### II.2.1.2.2 Interprétation

Les enzymes utilisées dans les réactions de dégradation de PCB procèdent à une dioxygénation du noyau biphenyle. Les atomes de chlore protègent le noyau biphenyle de ces attaques enzymatiques. Il est donc logique d'observer une corrélation négative entre les rendements de dégradation à 16 jours et le nombre d'atomes de chlore autour du noyau biphenyle. L'enzyme utilisée par *Burkholderia xenovorans* pour dégrader les PCB est capable d'avoir deux fonctions : une activité 2,3 biphenyle dioxygénase et 3,4 biphenyle dioxygénase (Furukawa et Fujiharaa, 2008). On remarque que pour le PCB 28 (Figure 16-A), les sites « 5,6 », « 2',3' » et « 5',6' » sont disponibles pour une attaque

enzymatique de la 2,3 biphényle dioxygénase. Le rendement de dégradation est proche de 100 %. Pour le cas du PCB 52 (Figure 16-B), le rendement de dégradation est de 50 % au bout de 16 jours. Ce PCB ne présente pas de site du type « 2,3 » disponible pour attaque classique de la 2,3 biphényle dioxygénase. Cependant il possède 2 sites du type « 3,4 » susceptibles de subir une dioxygénation via l'activité 3,4 biphényle dioxygénase. Enfin pour le PCB 101 (Figure 16-C), il n'y a plus qu'un seul site du type « 3,4 » de disponible pour une attaque enzymatique et le rendement chute, aux alentours de 20 %. Pour ces deux derniers cas, seule la 3,4 biphényle dioxygénase semblerait intervenir et le rendement de dégradation est proportionnel au nombre de sites disponibles.

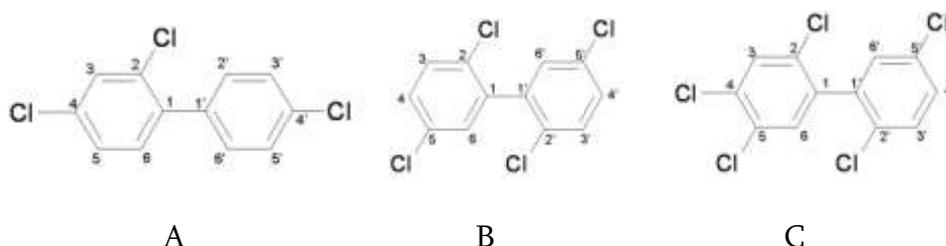


Figure 16 : Formules développées des PCB 28 (A), PCB 52 (B) et PCB 101 (C).

Ces observations confirment les résultats observés dans la littérature (Mhiri et de Marsac, 1997; Rodrigues *et al.*, 2006). Le large spectre des PCB concernés par une biotransformation confirme également les conclusions des études enzymologiques au sujet de la 2,3 biphényle dioxygénase (Haddock *et al.*, 1995).

Cette expérience permet de montrer que les conditions de culture nécessaire à la dégradation de PCB par la souche de *Burkholderia xenovorans* sont maîtrisées au sein du laboratoire.

## II.2.2 Essai de dépollution en milieu solide

### II.2.2.1 Résultats

#### II.2.2.1.1 Essais sur sol artificiel

Les résultats de l'expérimentation sur le sol artificiel sont présentés sur la Figure 17. Les concentrations en PCB ont été normalisées par rapport à la concentration initiale pour chaque modalité. La valeur initiale t=0 a été arbitrairement ramenée à 1. Les valeurs des concentrations normalisées sont données par l'Équation 2 :

$$\text{Concentration normalisée}_{PCB} = \frac{\text{Concentration}_{PCB}}{\text{Concentration expérimentation } t = 0 \text{ jour}_{PCB}}$$

Équation 2 : Calcul des concentrations normalisées.

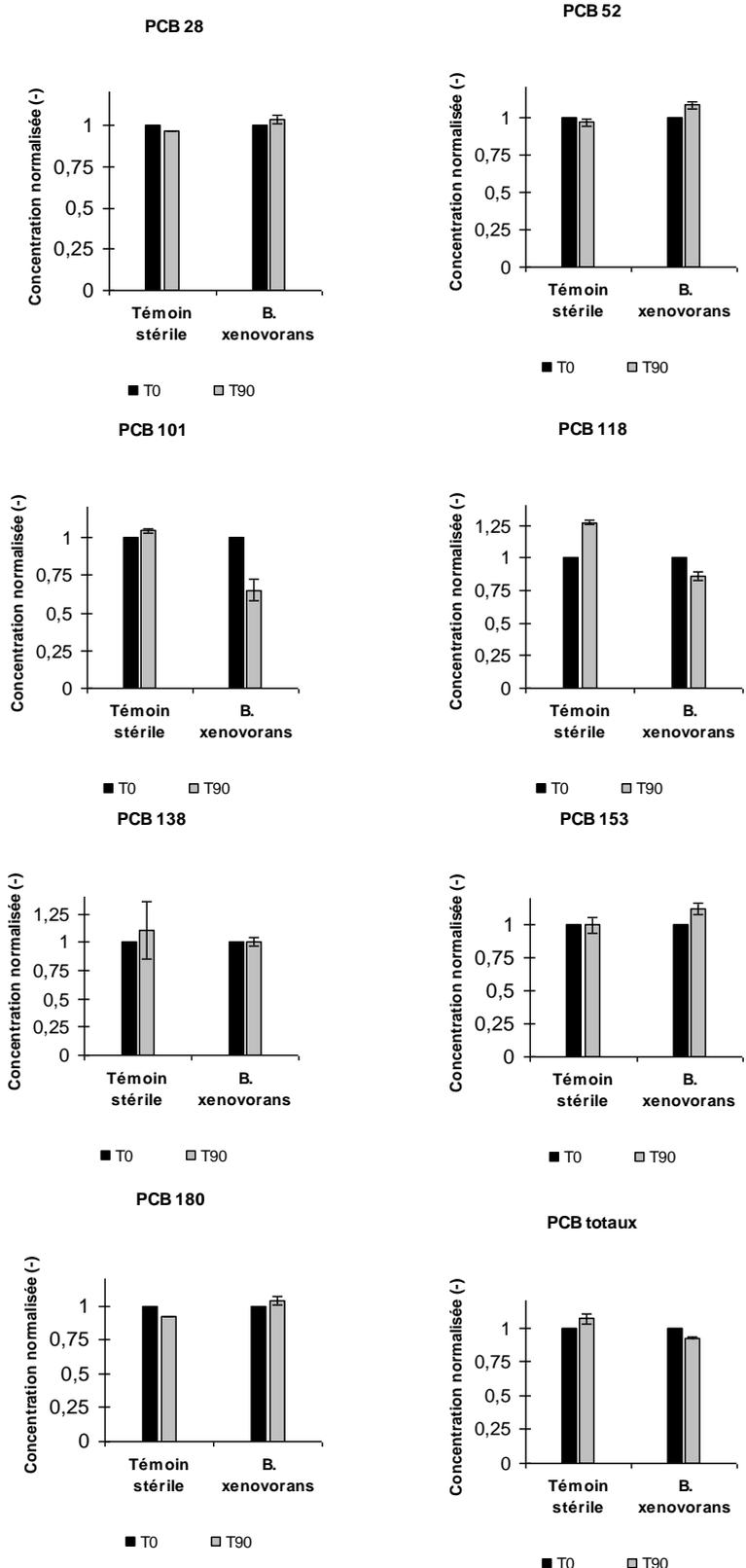


Figure 17 : Comparaison de l'évolution après 90 jours de la quantité de PCB entre l'expérimentation stérile et l'expérimentation en présence de *Burkholderia xenovorans*.

Après 90 jours d'incubation, l'expérimentation Témoin ne montre pas de dégradation pour aucun des 7 PCB étudiés. En présence de *Burkholderia xenovorans*, une diminution de la concentration est observée pour les PCB 101 et 118.

Le Tableau 11 présente les valeurs des rendements de dégradation et les vitesses moyennes journalières de dégradation. Les valeurs des rendements de dégradation sont données par l'équation Équation 3 Les vitesses moyennes journalières de dégradation sont calculées grâce à l'Équation 4 :

$$\%dégradation_{PCB} = \frac{(Concentration_{PCB_{t=0jours}} - Concentration_{PCB_{t=90jours}})}{Concentration_{PCB_{t=0jours}}}$$

**Équation 3 : Calcul du rendement de dégradation de PCB.**

$$Vitesse\ moyenne\ journalière_{PCB} = \frac{(Concentration_{PCB_{t=0jours}} - Concentration_{PCB_{t=90jours}})}{90}$$

**Équation 4 : Calcul de la vitesse moyenne journalière de dégradation de PCB.**

**Tableau 11 : Rendements de dégradation et vitesses journalières moyennes de dégradation de PCB par *Burkholderia xenovorans* en sol artificiel.**

N°IUPAC	Nombre de chlore	Rendement de dégradation en %	Vitesse moyenne journalière de dégradation en µg/kg/j
PCB 28	3	-3,70 ± 2,5	-0,1 ± 0,0
PCB 52	4	-8,00 ± 2,6	-4,4 ± 0,1
PCB 101	5	34,83 ± 11,0	34,4 ± 3,8
PCB 118	5	13,82 ± 3,8	11,7 ± 0,4
PCB 138	6	-0,53 ± 3,3	-0,6 ± 0,0
PCB 153	6	-12,50 ± 4,1	-9,4 ± 0,4
PCB 180	7	-4,17 ± 2,8	-0,6 ± 0,0

35 % de la quantité initiale de PCB 101 a été dégradée. Le PCB 118 a été également dégradé à hauteur de 12,50 %. On observe une augmentation de 13 % de la concentration en PCB 153. Le calcul de la dégradation totale sur la somme de 7 PCB révèle une dégradation de 7 % seulement.

Pour les PCB 28, 52, 138, 153 et 180, les dosages n'ont pas montré de dégradation. Les résultats obtenus après 90 jours sont même parfois légèrement supérieurs à la valeur initiale. Ainsi par calcul on obtient pour ces PCB des valeurs négatives pour les rendements de dégradation et pour les vitesses moyennes journalières de dégradation qui n'ont pas de sens biochimique.

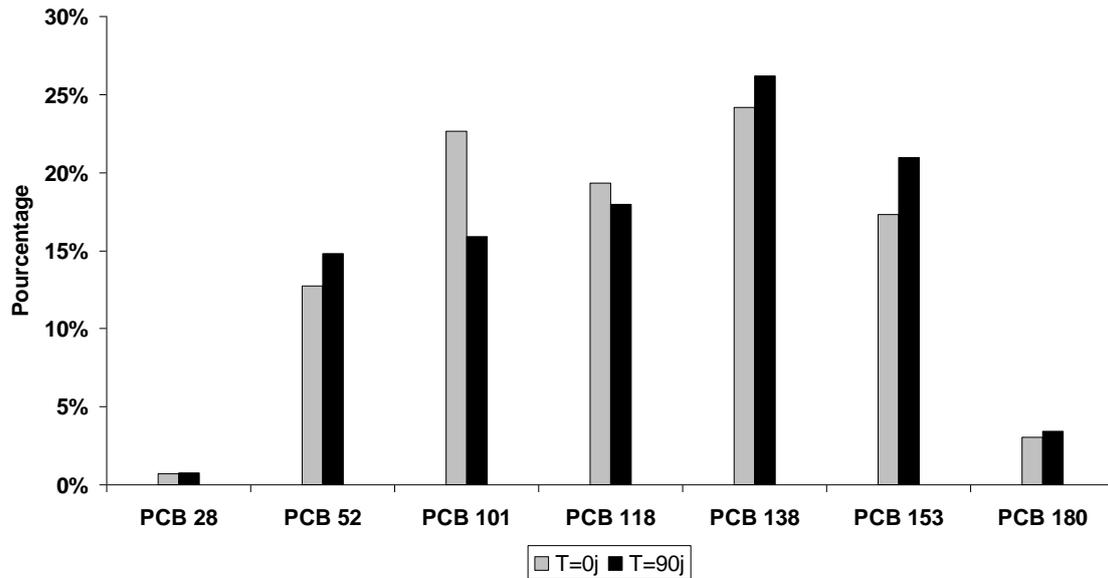
Cette disparition sélective de PCB modifie la composition initiale de la contamination. La Figure 18 présente l'évolution de la composition de la contamination en PCB. Les valeurs par PCB sont données par l'Équation 5 :

$$\%PCBi = \frac{\text{ConcentrationPCBi}}{\sum \text{ConcentrationPCB}}$$

Où i = (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180)

Et  $\sum \text{ConcentrationPCB}$  est la somme de la concentration des 7 PCB.

**Équation 5 : Calcul de la composition de la contamination en PCB.**



**Figure 18 : Evolution de la composition de la contamination en PCB entre t=0 jour et t=90 jours.**

Après 90 jours d'exposition à *Burkholderia xenovorans* la contamination s'enrichie légèrement en PCB 138 et 153 alors qu'elle s'appauvrit en PCB 101 et 118.

### **II.2.2.1.2 Essai sur sol réel**

Les résultats présentés dans la Figure 19 montrent les concentrations des PCB dans l'essai de dépollution biologique d'un sol réel contaminé par des PCB en présence de *Burkholderia xenovorans*.

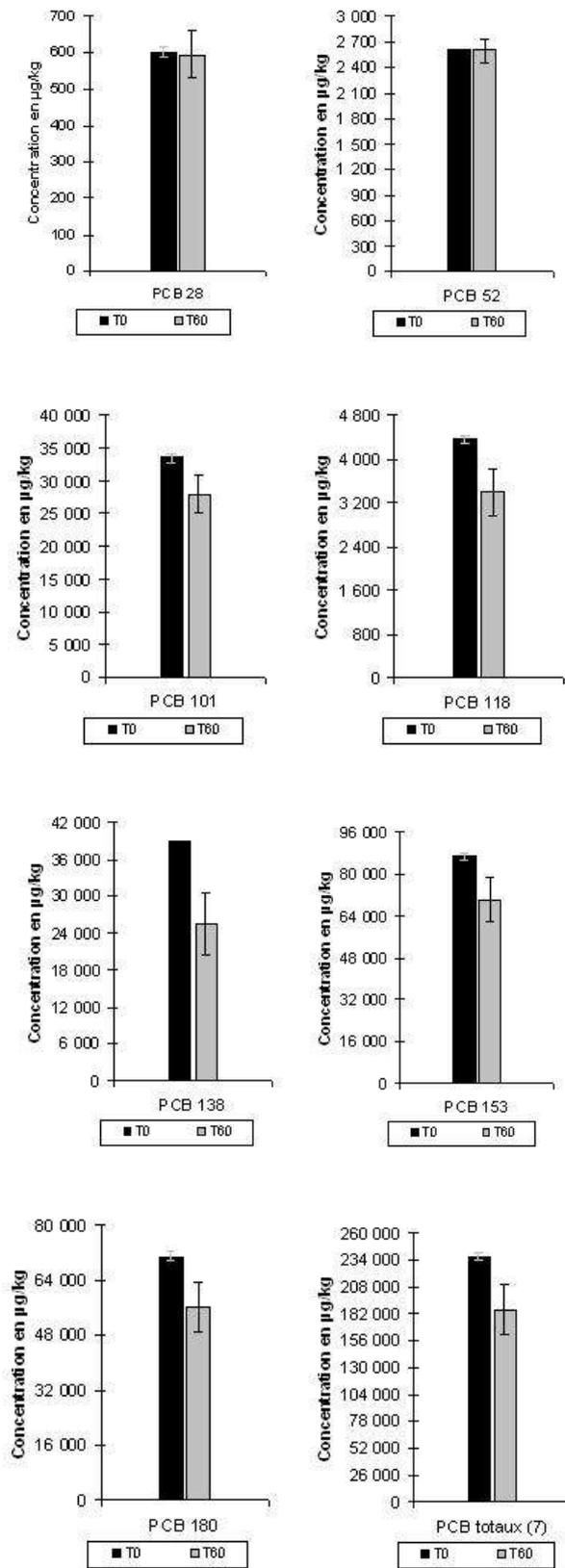


Figure 19 : Concentrations de PCB en sol réel contaminé par *Burkholderia xenovorans* après 60 jours d'expérimentation.

Une diminution de la concentration est détectée pour tous les PCB à l'exception des PCB 28 et 52. Le Tableau 12 présente les résultats numériques calculés pour les rendements de dégradation à 60 jours et les vitesses moyennes journalières de dégradation. Les valeurs des rendements de dégradation sont données par l'Équation 6. Les vitesses moyennes journalières sont calculées grâce à l'Équation 7.

$$\%d\u00e9gradation_{PCB} = \frac{(Concentration_{PCB_{t=0\text{jours}}} - Concentration_{PCB_{t=60\text{jours}}})}{Concentration_{PCB_{t=0\text{jours}}}}$$

**Équation 6 : Calcul du rendement de dégradation de PCB.**

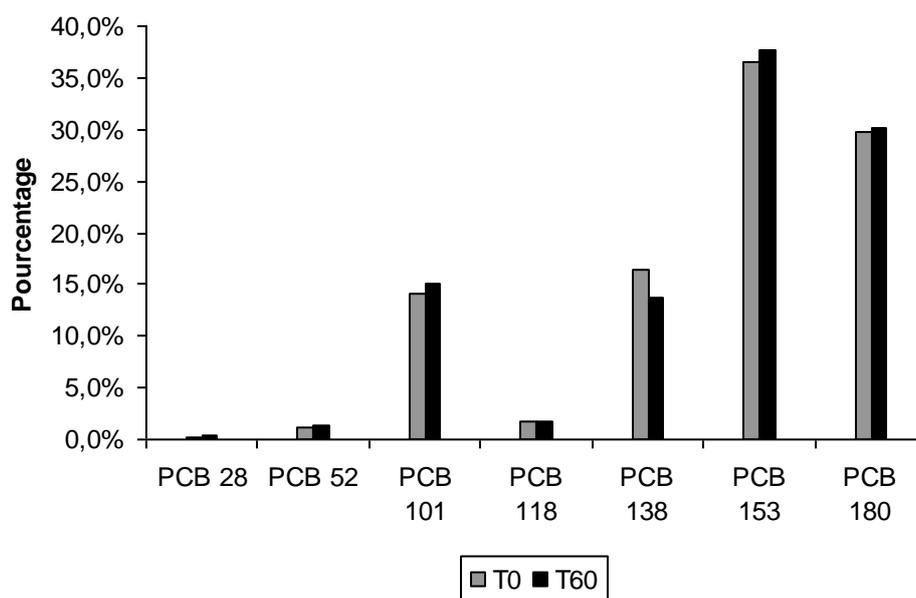
$$Vitesse\ moyenne\ journali\u00e8re_{PCB} = \frac{(Concentration_{PCB_{t=0\text{jours}}} - Concentration_{PCB_{t=60\text{jours}}})}{60}$$

**Équation 7 : Calcul de la vitesse moyenne journalière de dégradation de PCB.**

**Tableau 12 : Rendements de dégradation et dégradation moyenne des PCB par *Burkholderia xenovorans* dans un sol contaminé.**

N°IUPAC	Nombre de chlore	Rendement de dégradation en %	Vitesse moyenne journalière de dégradation en µg/kg/j
PCB 28	3	0,7 ± 13,0	0,1 ± 0,3
PCB 52	4	0,0 ± 5,4	0,0 ± 2,4
PCB 101	5	16,5 ± 6,7	91,6 ± 35,4
PCB 118	5	21,9 ± 8,5	15,8 ± 5,9
PCB 138	6	34,6 ± 12,7	225,0 ± 82,5
PCB 153	6	19,6 ± 8,5	283,3 ± 117,9
PCB 180	7	21,2 ± 8,4	250,0 ± 94,3

Des rendements de dégradation extrêmement faibles sont observés pour les PCB 28 et 52. Pour les PCB les plus représentés, des rendements de dégradation compris entre 16 % et 35 % sont observés. Le meilleur rendement de dégradation est observé pour le PCB 138. L'évolution de la composition de la contamination en PCB est donnée dans la Figure 20.



**Figure 20 : Evolution de la composition de la contamination en PCB entre t=0 jour et t=60 jours.**

La composition de la contamination en PCB est assez stable. On note que les PCB 28, 52 et 118 ne sont que très peu représentés dans la contamination. On note également un léger appauvrissement en PCB 138.

### II.2.2.2 Interprétation

Les rendements de dégradation des PCB après 60 jours en milieu solide diffèrent des rendements de dégradation observés après 16 jours en milieu liquide. Il semblerait que le passage en milieu solide induise un certain nombre de paramètres qui influencent de manière négative les rendements de dégradation. L'analyse de l'évolution de la composition relative de la contamination en PCB pour l'essai en sol artificiel montre que *Burkholderia xenovorans* a une activité presque monospécifique dans ce sol en modifiant essentiellement la proportion de PCB 101 (Figure 18). Les PCB les plus chlorés qui ne sont pas dégradés voient leur pourcentage relatif augmenter. Cet enrichissement relatif a déjà été rapporté dans la littérature (Borja *et al.*, 2005). Les rendements de dégradation observés dans ce sol artificiel pour *Burkholderia xenovorans* (Tableau 11) suggèrent qu'un traitement unique de la contamination par un catabolisme aérobie n'est pas suffisant pour gérer une pollution au PCB de plusieurs dizaines de  $\text{mg.kg}^{-1}$ .

Lors de l'essai de dépollution en sol réel, les rendements de dégradation obtenus sont meilleurs. Ce sol présente une pollution ancienne et complexe résultant du mélange de différentes formulations de PCB. Deux explications peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène : i) la concentration en PCB est plus élevée que dans le sol artificiel, ce qui augmente le contact entre le polluant ciblé et le microorganisme capable de le dégrader (dans la limite de la toxicité de ce polluant) ; ii) les caractéristiques physicochimiques du sol vont avoir une influence sur la biodisponibilité des molécules hydrophobes ciblées. L'étude de la composition relative de la contamination (Figure 20) révèle que lors de cet essai, seule la composition relative de PCB 138 a évolué. Ce PCB est à la fois présent dans le sol avec une forte concentration et présente une conformation favorable à sa dégradation par la biphényle dioxygénase de *Burkholderia xenovorans*. On confirme donc que *Burkholderia xenovorans* a plus d'affinité pour le PCB 138 que pour le PCB 153 (Mhiri et de Marsac, 1997). Seul le pourcentage relatif du PCB 138 décroît. Ce résultat diffère de ceux observés lors de l'expérimentation en sol artificiel. Il semblerait que des phénomènes de

type déchloration ou translocation de chlore ait eu lieu dans notre essai. Porté à une humidité de 20%, le sol VsL présente un aspect boueux avec peu de structure ce qui ne facilite pas les échanges gazeux. Malgré l'aération des fermenteurs, il semblerait que lors de la rectification de l'humidité, des conditions anaérobies se sont localement formées, permettant ces phénomènes de libération des sites susceptibles d'être attaqués par la biphényle dioxygénase. Ceci pourrait expliquer les rendements de dégradation et les vitesses journalières moyennes observées (Tableau 12) pour cet essai, notamment pour les PCB fortement chlorés, tels que les PCB 153 et PCB 180. En effet, une étude (Haddock *et al.*, 1995) révèle que la 2,3 biphényle dioxygénase seule est capable de déchloration. Une autre étude (Erickson et Mondello, 1993) montre une dégradation de 15 % du PCB 153 par cette même enzyme confirmant qu'elle est capable d'agir sur la molécule même en présence d'un chlore sur l'un des carbone ciblés par l'attaque enzymatique.

**Les résultats en milieu solide et ceux en milieu liquide diffèrent. En milieu solide, la composition de la contamination va avoir une grande influence sur les résultats de dégradation. En milieu réel, le traitement a montré une capacité de traitement moyenne journalière de plus de 0,85 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour la somme des 7 PCB étudiés.**

# III ETUDE DU POTENTIEL DE PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM

## III.1 *Matériel et méthodes*

### III.1.1 Expérimentation

#### III.1.1.1 Matériel

##### III.1.1.1.1 *Réactifs et petits matériels*

Les réactifs utilisés ont déjà été décrits pour l'expérimentation avec *Burkholderia xenovorans*.

Le filtre à membrane hydrophobe 0,22 µm pour stériliser l'aération est un filtre Millipore (France). Les fermenteurs en verre ont un diamètre de 12 cm et une hauteur de 20 cm. Leur volume utile est de 2 L.

##### III.1.1.1.2 *Micro-organisme*

Le champignon *Phanerochaete chrysosporium* LCP: 51 995 est issu de la collection du Muséum National d'Histoire Naturelle (France).

##### III.1.1.1.3 *Sol artificiel*

La kaolinite est fournie par Fluka (France). La tourbe blanche utilisée vient d'une jardinerie Botanic (31670 Labège, France). Le sable est conforme à la norme NF XPS 54-207 (hygiène de bacs à sable) et est fabriqué par EcoTerre/Ecobati (84 270 Védene, France).

#### III.1.1.2 Méthodes

##### III.1.1.2.1 *Essais de dépollution en milieu liquide*

###### III.1.1.2.1.1 Expérimentation préliminaire

Une première expérimentation en milieu liquide de 100 mL est effectuée afin de maîtriser au mieux la culture du champignon qui peut se révéler capricieuse et mesurer rapidement le potentiel de *Phanerochaete chrysosporium* en milieu liquide.

Les milieux de culture sont préparés dans des erlenmeyers de 250 mL. La solution mère minérale minimale (SMM) a la composition suivante, pour 1L : 77,5 mL de solution contenant :  $K_2HPO_4$  : 56,77 g.L<sup>-1</sup> ;  $KH_2PO_4$  : 21,94 g.L<sup>-1</sup> ;  $NH_4Cl$  : 27,61 g.L<sup>-1</sup> ; 1 mL de  $MgSO_4$  200 g.L<sup>-1</sup> ; 1 mL  $FeSO_4$  10 g.L<sup>-1</sup> ; 1 mL  $CaCl_2$  3g.L<sup>-1</sup>. Cent mL de SMM sont autoclavés 25 min à 120°C sous 1 bar. A la sortie de l'autoclave, on ajoute 1 mL d'une solution de glucose stérile à 250 g.L<sup>-1</sup>. Sont ajoutés à cette solution 10 µL d'une solution vitaminée préalablement filtrée à 0,22 µm contenant 200 mg.L<sup>-1</sup> de chacun des produits suivants : Acide aminobenzoïque, Biotine, Acide folique, Niacinamide,

Pyridoxal, Pyridoxamine, Riboflavine, Thiamine, Acide lipoiqye, Vitamine B12, Acide D-Pantothenique et Pyridoxine. On ajoute 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de PCB à 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  dans l'hexane. L'ensemble des manipulations est réalisé sous atmosphère stérile.

*Phanerochaete chrysosporium* est cultivé sur un milieu de malt liquide 2% en masse sous agitation rotative à 30°C. Les mycéliums sphériques de diamètre d'environ 10 mm sont divisés en 10 fragments. L'inoculation des milieux se fait en ajoutant 5 fragments par erlenmeyer.

Les cultures sont placées sous agitation rotative à 30°C pendant 15 jours. Des prélèvements sont faits à  $t = 0$  jour et à  $t = 16$  jours. L'expérimentation est réalisée en triplicat.

#### III.1.1.2.1.2 Estimation du fractionnement des PCB

Une culture liquide de *Phanerochaete chrysosporium* en grand volume a pour objectif d'estimer le fractionnement des PCB entre la fraction résiduelle en solution, la fraction sorbée sur le champignon et la fraction effectivement dégradée après 7 jours d'incubation.

Cinq cents mL de SMM sont préparés et autoclavés (20 min, 1 bar, 120°C) dans des erlenmeyers de 1L. A la sortie de l'autoclave, 5 mL d'une solution de glucose à 200  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 50  $\mu\text{L}$  d'une solution vitaminée à 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  sont ajoutés de manière stérile. Les milieux ainsi préparés sont ensuite dopés avec 500  $\mu\text{L}$  de la solution de PCB à 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  dans l'hexane pour obtenir une concentration de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans les milieux. Ils sont alorsensemencés avec 15 fragments de *Phanerochaete chrysosporium*, soit environ 35 mg de matière sèche. Cent mL sont prélevés à  $t=0$  jour pour analyse. A  $t=7$  jours, les cultures sont filtrées sur papier Whatman ( $\varnothing$  11  $\mu\text{m}$ ).

#### III.1.1.2.1.3 Cinétiques

Cette expérimentation permet d'établir les cinétiques de sorption des PCB sur le mycélium et de disparition dans l'eau. L'objectif est de déterminer les pas de temps de ces phénomènes et donc de vérifier leur viabilité dans le cadre d'un procédé industriel.

Six fermenteurs sont préparés avec le protocole décrit dans le paragraphe III.1.1.2.1.2. Un fermenteur est analysé pour chaque point de la cinétique. L'analyse d'un fermenteur inclut le dosage des PCB dans la phase aqueuse et dans la matière organique constituée par le mycélium du champignon. Un fermenteur sera analysé pour chacun des temps suivants :  $t=0\text{j}$ ,  $t=1\text{j}$ ,  $t=2$ ,  $t=3$ ,  $t=7$  et  $t=15\text{j}$ .

#### III.1.1.2.2 Essais de dépollution en milieu solide

Le sol artificiel sec est composé de sable, de kaolinite et de tourbe blanche (60:30:10; m:m:m).

Huit cents grammes de ce sol sont disposés dans des fermenteurs. Les fermenteurs sont autoclavés (25 min, 120 °C sous 1 bar). Sous atmosphère stérile, 200 mL de SMM (stérile ouensemencée avec *Phanerochaete chrysosporium* selon expérimentation) sont ajoutés. Après un mélange manuel sous atmosphère stérile, 250  $\mu\text{L}$  d'une solution d'Aroclor 1254 Technical grade 400  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans l'hexane sont ajoutés. Les fermenteurs sont connectés de manière stérile à une colonne d'air. L'air envoyé dans les fermenteurs est filtré à 0,22  $\mu\text{m}$  par une membrane hydrophobe.

Un prélèvement d'environ 100 g est effectué après 120 jours sous atmosphère stérile.

### III.1.2 Analyses

Les quantités de PCB contenues dans les échantillons d'eau, de sol et sur le mycélium de *Phanerochaete chrysosporium* sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Les méthodes analytiques utilisées lors de ces expérimentations sont décrites dans les annexes II.2 et II.3.

## III.2 Résultats et Discussions

### III.2.1 Essais de dépollution en milieu liquide

#### III.2.1.1 Résultats

##### III.2.1.1.1 Expérimentation préliminaire

Les chromatogrammes des dosages des 7 PCB dans la phase liquide de l'expérimentation SMM + *Phanerochaete chrysosporium* sont présentés sur la Figure 21.

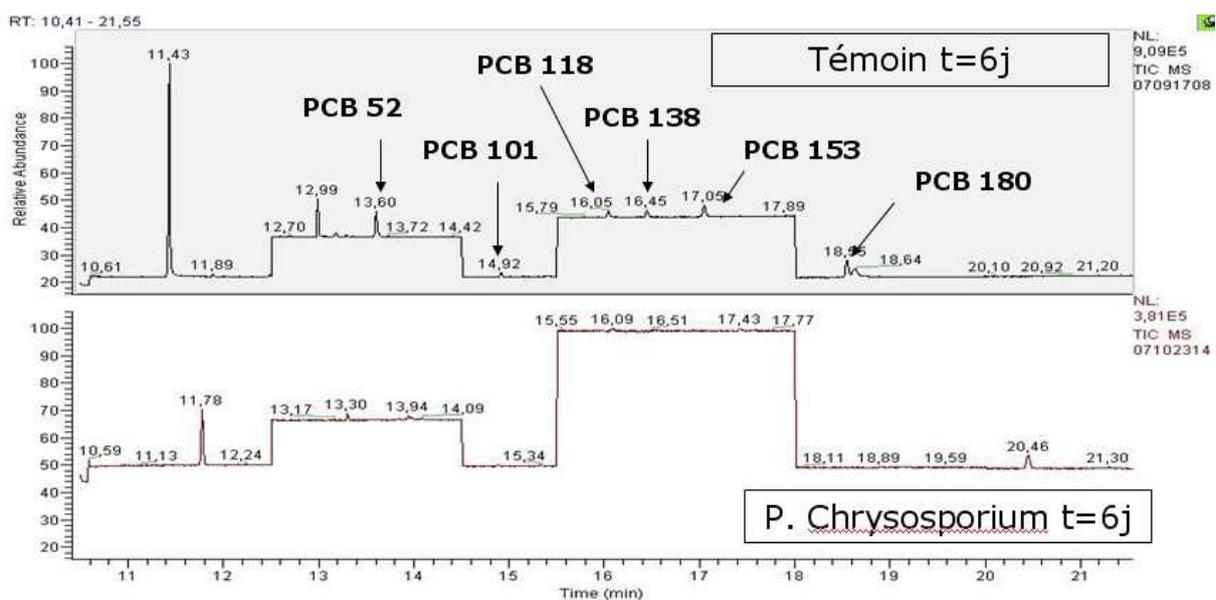


Figure 21 : Chromatogramme des extractions à T= 6 jours pour un témoin et pour P.chrysosporium.

On observe qu'il n'y a plus de PCB détectables dans la phase aqueuse par l'analyse. Le nombre d'atomes de chlore n'a pas d'influence sur la disparition des PCB. L'hypothèse que les PCB soient sorbés sur le mycélium a été formulée. Pour la vérifier, un rapide rinçage au *n*-hexane du mycélium collecté manuellement préalablement à l'analyse de l'eau a été effectué. Les chromatogrammes issus de ces rinçages sont présentés Figure 22.

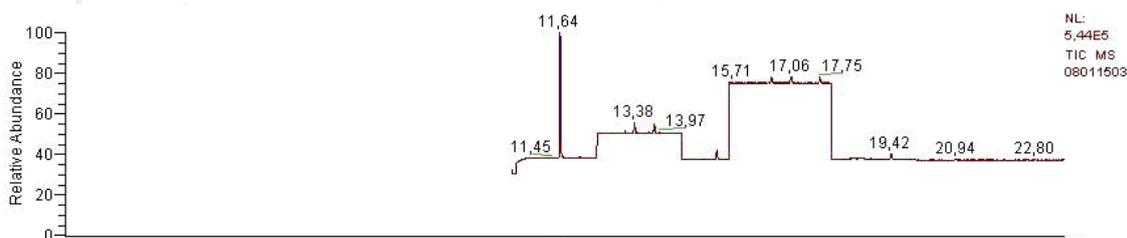


Figure 22 : Chromatogrammes issus du rinçage au *n*-hexane du mycélium de *Phanerochaete chrysosporium*

On observe que les 7 PCB sont détectables dans l'extrait hexanique. Ils ne sont pas toutefois quantifiables. Leur présence dans cet extrait issu d'une procédure non optimisée confirme l'hypothèse formulée lors du dosage en milieu liquide.

### III.2.1.1.2 Fractionnement des PCB

La Figure 23 montre les chromatogrammes obtenus avec les extraits issus de la phase aqueuse de l'expérimentation à  $t = 0$  jour, à  $t = 16$  jours et du mycélium du champignon.

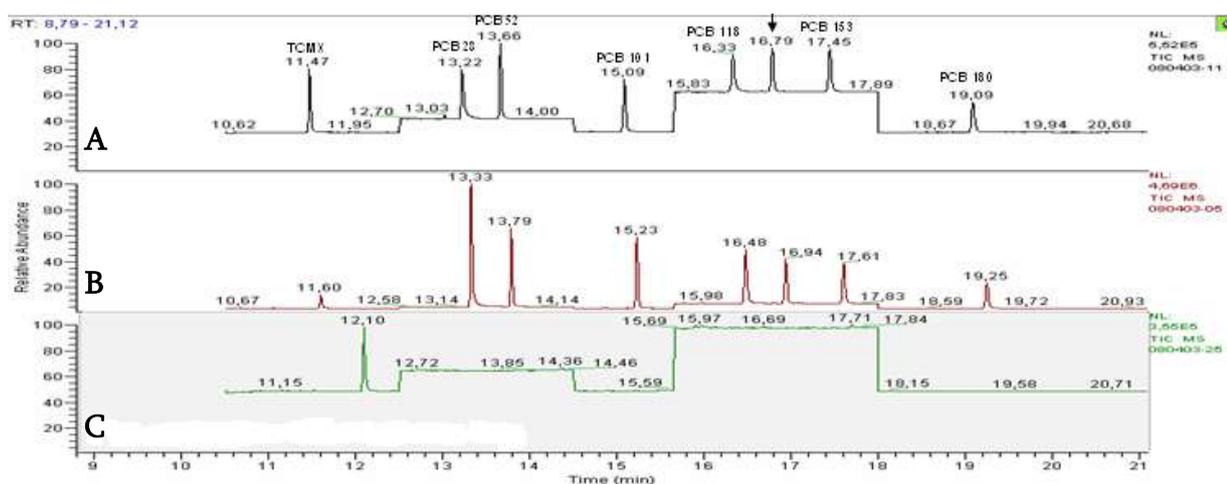


Figure 23 : Chromatogrammes issus des extractions menées sur la phase aqueuse à  $t = 0$  jour (A), sur le mycélium de *Phanerochaete chrysosporium* à  $t = 7$  jours (B) et sur la phase aqueuse à  $t = 7$  jours (C).

Comme pour l'expérience préliminaire, il n'y a plus de PCB détecté dans la solution après 7 jours. La quantité de PCB liée au mycélium est cette fois-ci quantifiable. Ainsi il devient possible de calculer un fractionnement des PCB dans cet essai de dépollution en milieu aqueux. Trois fractions sont définies : i) fraction résiduelle ; ii) fraction liée ; iii) fraction dégradée. La fraction dégradée est calculée pour chaque PCB grâce à l'Équation 8 :

$$\text{Fraction Dégradée} = \frac{(m_{PCBeau_{t=0\text{ jour}}} - m_{PCBeau_{t=7\text{ jours}}} - m_{PCBliés_{t=7\text{ jours}}})}{m_{PCBeau_{t=0\text{ jour}}}}$$

Équation 8 : Calcul de la fraction dégradée.

La Figure 24 présente ce bilan quantitatif du fractionnement des 7 PCB dans l'essai de dépollution. La valeur dans le compartiment 'fraction résiduelle' a été fixée à la limite de détection, *id est*, 40 ng.L<sup>-1</sup>.

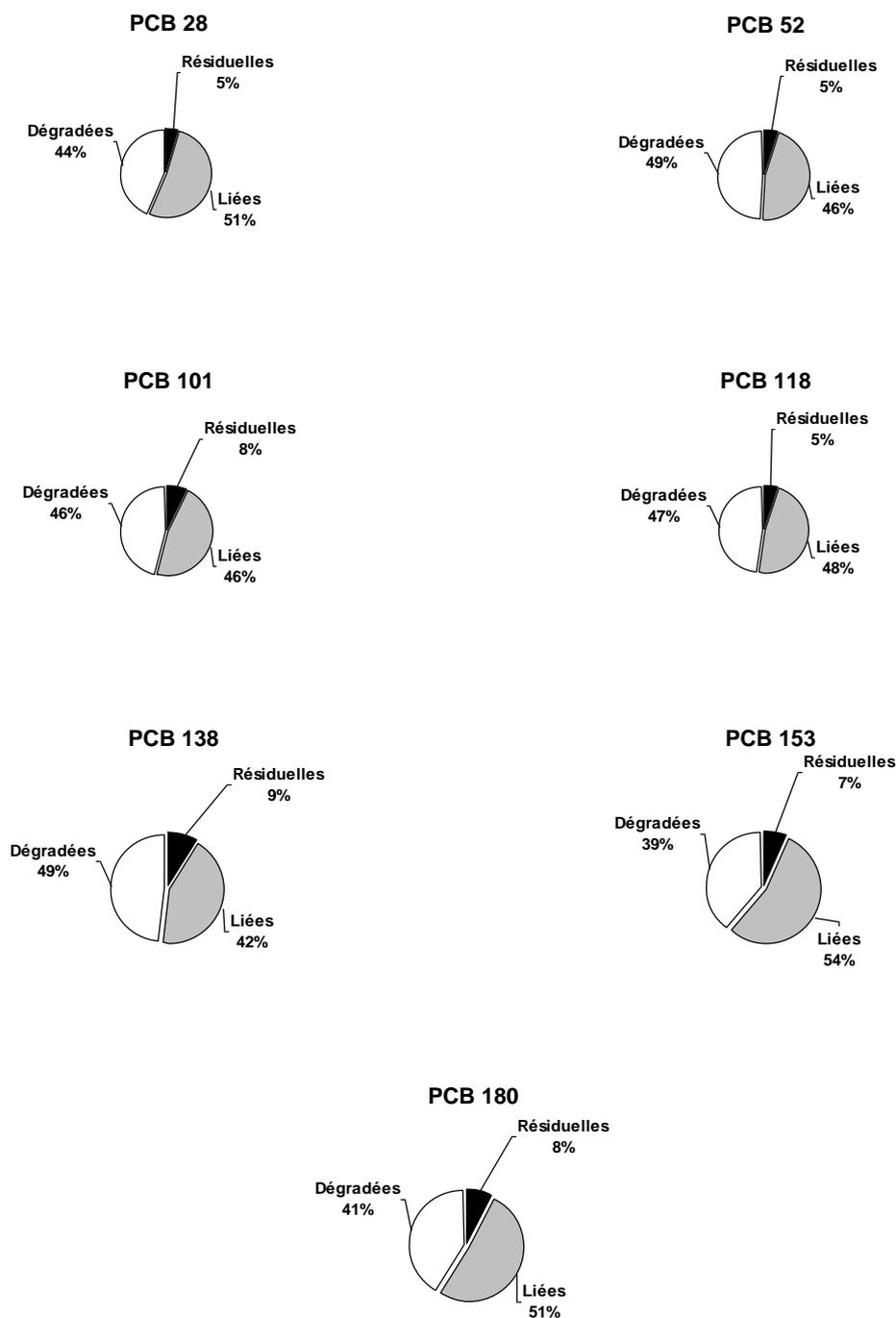


Figure 24 : Fractionnement des 7 PCB.

Une part comprise entre 42% et 54% n'est pas dégradée mais adsorbée sur la matière organique. En revanche, la part estimée des PCB dégradé est comprise entre 39% et 49%. L'influence du nombre d'atomes de chlore autour du noyau biphenyle est faible.

### III.2.1.1.3 Cinétiques

La Figure 25 présente les résultats de la croissance du champignon lors de la cinétique.

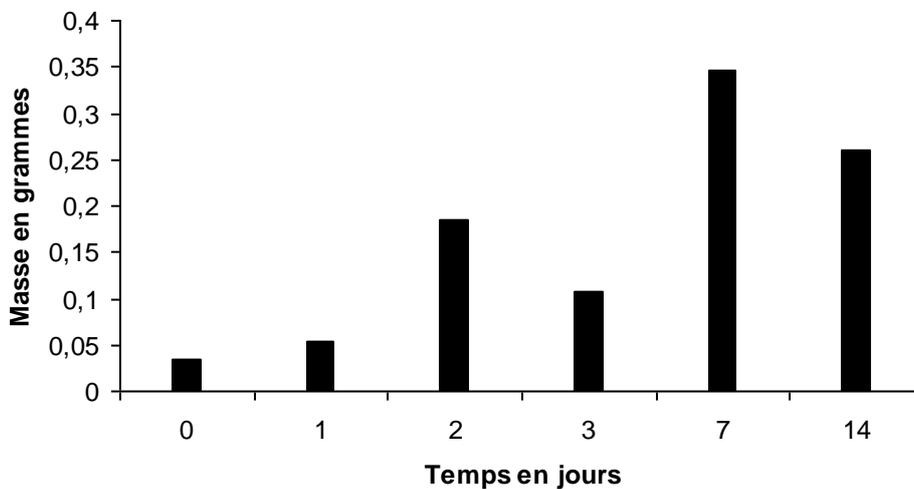
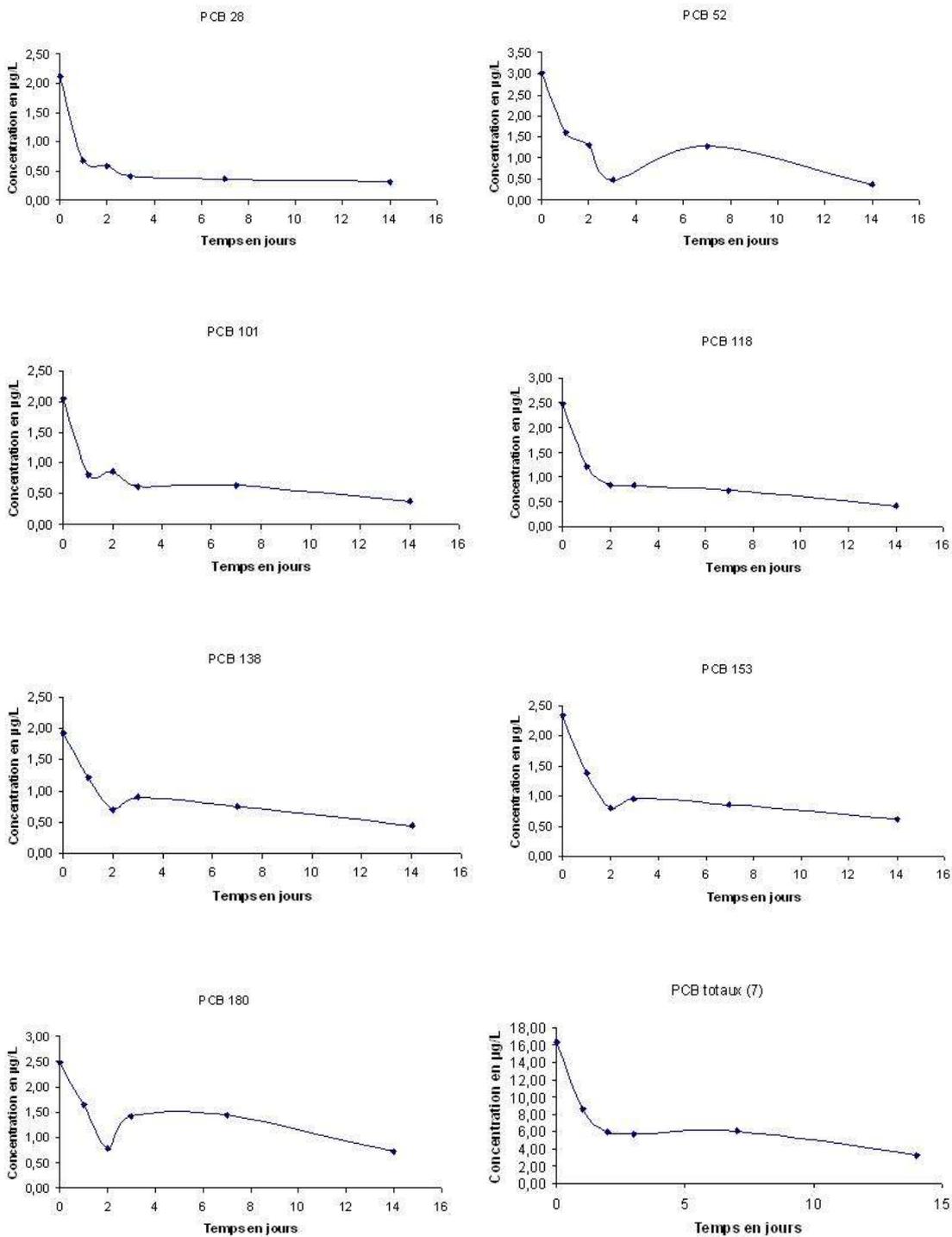


Figure 25 : Masse de mycélium de *Phanerochaete chrysosporium* récoltée dans les 6 expérimentations de la cinétique.

La croissance du champignon est irrégulière en fonction du temps. La masse de mycélium est plus faible pour le fermenteur 3 jours que pour le fermenteur 2 jours. Cependant les deux valeurs les plus hautes sont trouvées pour t=7 jours et t=14 jours, alors que les valeurs les plus faibles sont observées pour t=0 jour et t=1 jour.

Les résultats de la cinétique de la concentration en PCB dans l'eau sont présentés Figure 26.



**Figure 26 : Cinétique de la concentration des PCB dans la phase aqueuse.**

Pour tous les PCB étudiés, une chute de la concentration est observée dans les premières 48 heures. La concentration en PCB se stabilise autour du tiers de la valeur initiale entre le 3<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour de la cinétique, et ce, quel que soit le PCB considéré. Pour les PCB fortement chlorés (6 ou 7 atomes de chlore), la disparition dans le milieu aqueux se fait de manière linéaire durant les premières 48 h. Elle peut être alors modélisée par un polynôme du premier ordre de la forme :

$$\text{MassePCB}_{\text{résiduel}} = A \times \text{Temps} + B$$

On observe que le coefficient A a pour dimension [Masse].[Volume].[Temps]<sup>-1</sup> et peut être définie comme une vitesse de disparition. Les résultats de cette modélisation sont présentés dans le Tableau 13.

**Tableau 13 : Vitesse de disparition dans la phase aqueuse.**

N° IUPAC	Nombre de Chlore	Vitesse disparition en mg.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup> regression linéaire.
PCB 138	6	0,3027	0,99
PCB 153	6	0,3857	0,98
PCB 180	7	0,4285	0,99

Les résultats issus de l'extraction faite sur le mycélium sont présentés Figure 27.

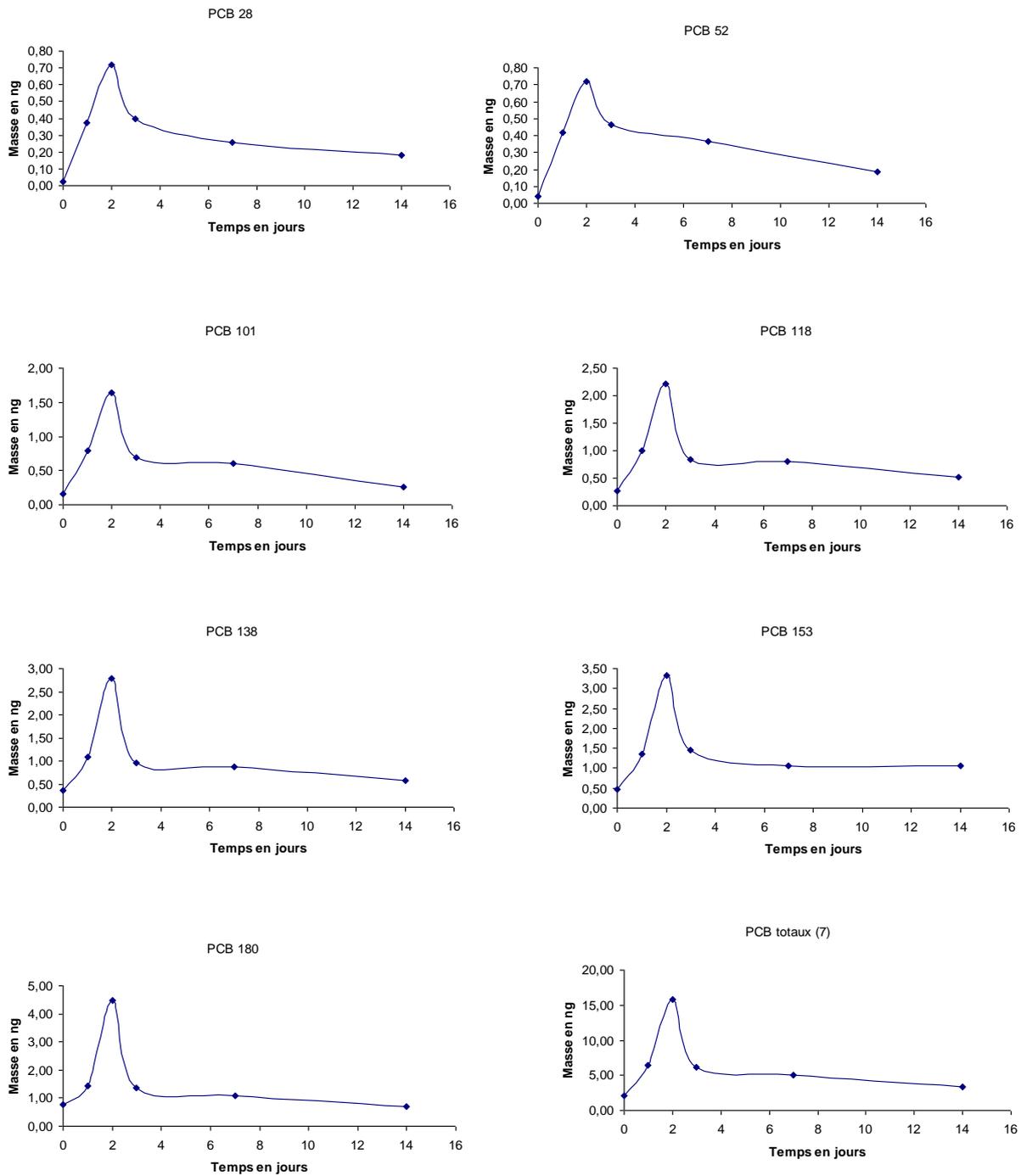


Figure 27 : Cinétique de sorption sur le mycélium de *Phanerochaete chrysosporium*.

Cette cinétique de sorption sur les premières 48 h peut être modélisée par un polynôme du premier ordre de la forme :

$$\text{MassePCB}_{\text{lié}} = A \times \text{Temps} + B$$

On observe que le coefficient A a pour dimension  $[Masse].[Temps]^{-1}$  et peut être définie comme une vitesse de sorption. Les résultats de cette modélisation sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Vitesse de sorption par PCB sur *Phanerochaete chrysosporium*.

N° IUPAC	Nombre de Chlore	Vitesse de sorption en $ng.j^{-1}$	R <sup>2</sup> régression linéaire.
PCB 28	3	0,3472	1
PCB 52	4	0,3378	0,99
PCB 101	5	0,7441	0,99
PCB 118	5	0,9741	0,98
PCB 138	6	1,2098	0,95
PCB 153	6	1,4374	0,95
PCB 180	7	1,8579	0,88

Une relation linéaire entre la vitesse de sorption sur *Phanerochaete chrysosporium* et le nombre de chlore d'un PCB peut être dégagée. Les résultats de cette modélisation sont présentés Figure 28.

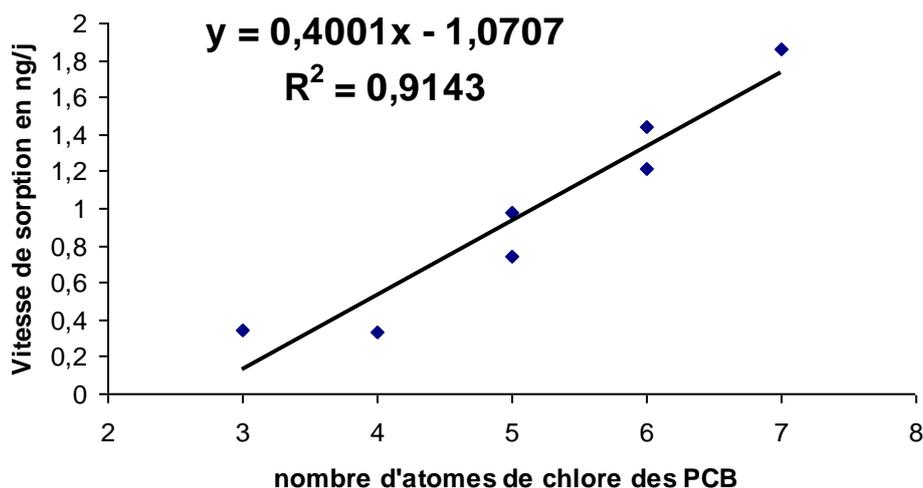
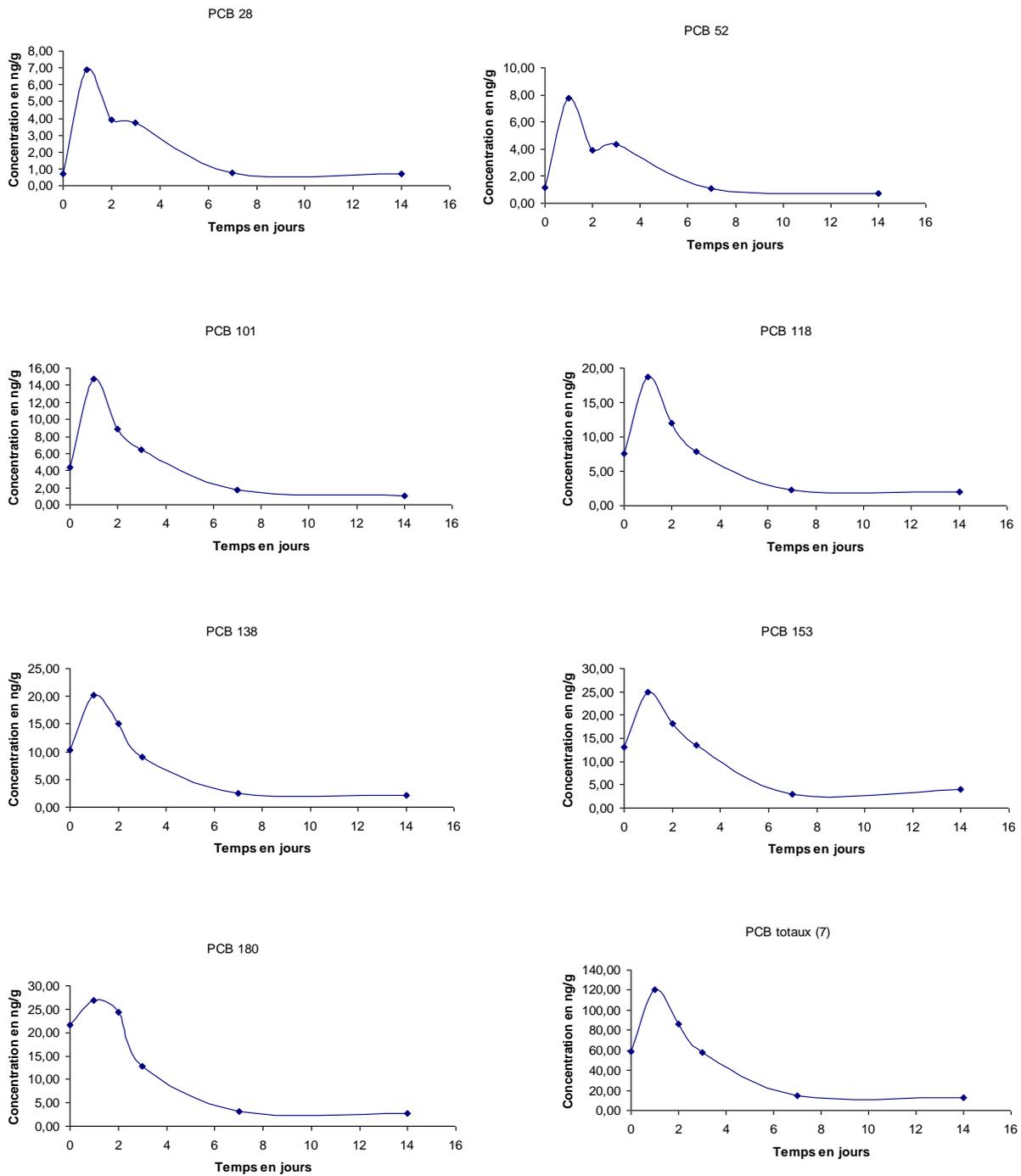


Figure 28 : Régression linéaire de la vitesse d'adsorption en fonction du nombre de chlore des PCB.

Lors de ces calculs, la masse de mycélium n'a pas été intégrée. Le mycélium a été considéré comme un matériau inerte non saturé en PCB. Pour vérifier cette hypothèse, les dosages de la quantité de PCB sur le champignon ont été pondérés par la masse de mycélium subissant l'extraction. La Figure 29 présente les résultats obtenus pour les dosages des PCB sur la matière organique en tenant compte de la masse du champignon.



**Figure 29 : Cinétique de la concentration en PCB sur le mycélium.**

On observe un comportement cinétique similaire pour tous les PCB. Une concentration est déterminée à  $t = 0$  jour. Le maximum de concentration sur le champignon a lieu après 24 heures de contact. Ensuite la concentration chute jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour pour se stabiliser à un niveau faible.

## III.2.1.2 Interprétations

### III.2.1.2.1 *Expérimentation préliminaire*

Après 6 jours les PCB ne sont plus détectés dans la solution, *id est* en concentration inférieure à la limite de quantification de 40 ng.L<sup>-1</sup> (Figure 21). Il est possible que les PCB soient sorbés sur la matière organique que constitue le champignon. Cette hypothèse a été rapidement confirmée par l'analyse de PCB menée sur le mycélium du champignon (Figure 22). Des traces de PCB y ont été détectées sans pouvoir être quantifiées. Le PCB 180, heptachloré ne semble pas mieux conservé que les PCB tri-, quadri-, penta- ou hexachlorés. Une fraction des PCB est donc sorbée sur le champignon. L'échelle de notre expérience ne permet pas de faire un bilan quantitatif entre la fraction de PCB adsorbée sur *Phanerochaete chrysosporium*, la fraction effectivement dégradée sous l'influence du champignon et la fraction restant dans la solution. L'expérimentation effectuée sur des volumes réactionnels de 500 mL permet d'estimer ce fractionnement.

### III.2.1.2.2 *Fractionnement des PCB*

Ce changement d'échelle de l'expérimentation a permis d'estimer le fractionnement des PCB lors d'un essai de dépollution en milieu aqueux en présence de *Phanerochaete chrysosporium*. Une part comprise entre 42% et 54% n'est pas dégradée mais sorbée sur la matière organique. En revanche, la part estimée des PCB dégradés est comprise entre 39% et 49% (Figure 24). Ces résultats ont fait l'objet d'une publication d'un article scientifique (Sangely *et al.*, 2009b). Une étude (Ruiz-Aguilar *et al.*, 2002) montre des pourcentages de dégradations compris entre 34 % et 73 % avec le même organisme sur des PCB extraits depuis un sol contaminé. Cependant lors de leur expérimentation, l'extrait issu du mycélium est mélangé à la fraction résiduelle. Il en est de même pour les résultats obtenus par une autre équipe (Kamei *et al.*, 2006), où les pourcentages de dégradation atteignent 50 % pour un PCB dichloré. Nos résultats apportent donc une nouvelle information sur le devenir des PCB au contact de *Phanerochaete chrysosporium*. A la lumière de ce résultat, il reste à déterminer les cinétiques de sorption et de dégradation. Ces informations permettront de connaître les vitesses de réactions et de savoir si ce microorganisme est compatible avec un usage industriel.

### III.2.1.2.3 *Cinétiques*

Les résultats de la mesure de la croissance du champignon (Figure 25) dans cette cinétique permettent de conclure qu'une croissance a lieu dans chacun des fermenteurs. Cependant, celle-ci a été hétérogène d'un fermenteur à l'autre. Cette hétérogénéité peut s'expliquer par la difficulté de fournir un ensemencement initial homogène à partir de matériaux frais. Les particularités de croissance des champignons, sensibles à l'agitation et à la forme du fermenteur peuvent également expliquer une part de l'hétérogénéité.

Lors de l'analyse des PCB résiduels (Figure 26), une forte baisse est constatée pour tous les PCB lors des premières 48h de l'expérimentation. Ensuite, la concentration en PCB dans l'eau se stabilise autour du tiers de la valeur initiale quel que soit le PCB considéré. Cette disparition de PCB peut avoir deux origines : la biotransformation sous l'effet de *Phanerochaete chrysosporium* ou la biosorption sur le mycelium. Cette hypothèse est affinée par la mesure de la quantité de PCB liée au champignon (Figure 27). Pour les PCB ayant plus de 3 atomes de chlore, la vitesse de sorption sur le champignon peut être prédite de manière fiable. Ce résultat peut être expliqué par les propriétés induites par le nombre d'atomes de chlore. En effet selon la littérature, plus le nombre d'atomes de chlore est élevé plus la molécule est hydrophobe. Dans un mélange diphasique avec une phase aqueuse et une

phase organique, les molécules les plus hydrophobes vont avoir tendance à passer rapidement vers la phase organique constituée ici par le mycélium du champignon.

Le maximum de concentration de PCB (Figure 29) sur le mycélium est observé pour t=1 jour pour tous les PCB et pour la somme des PCB totaux. Ce résultat peut être expliqué par la forte croissance dans le fermenteur destiné au point t=2 jours de la cinétique. Ceci indique également que le système peut potentiellement traiter de plus grande concentration de PCB dans l'eau. En effet, au maximum de la sorption totale à t= 2 jours, la concentration sur le mycélium n'est pas maximale. Le système n'est donc pas saturé.

*Phanerochaete chrysosporium* possède un vrai potentiel technologique en milieu liquide. Il permet d'extraire les PCB de l'eau en quelques heures puis de les dégrader dans un pas de temps plus long, de l'ordre de la semaine.

## III.2.2 Essai de dépollution en milieu solide

### III.2.2.1 Résultats

Les résultats de l'essai de dépollution biologique de sol par *Phanerochaete chrysosporium* sont illustrés par la Figure 30.

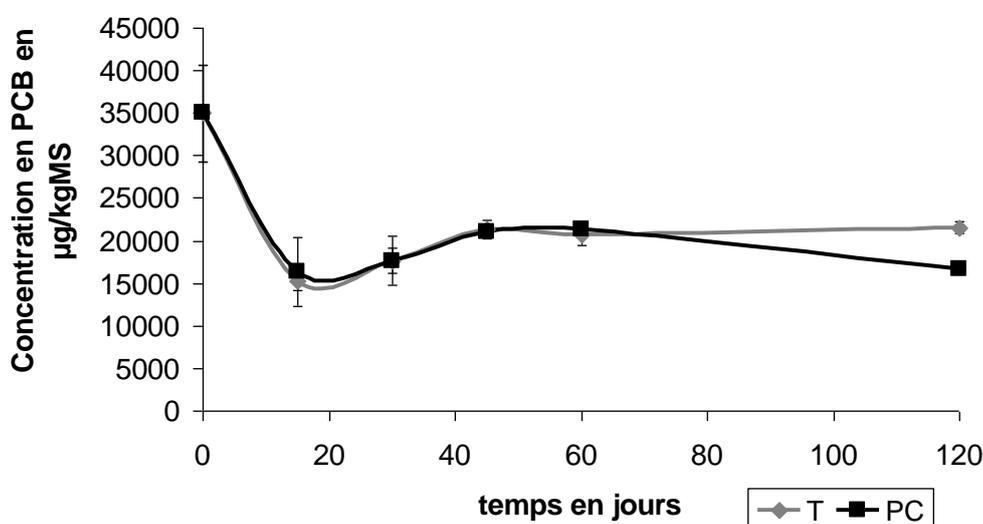


Figure 30 : Résultats de la cinétique de dégradation des PCB (somme des 7 PCB) en sol en présence de *Phanerochaete chrysosporium*. T : Témoin ; PC : *Phanerochaete chrysosporium*.

On remarque pendant les 60 premiers jours, les fluctuations de la concentration de la somme de 7 PCB sont identiques pour la modalité témoin et *Phanerochaete chrysosporium*. Après 120 jours, une différence est observée. Pour mieux mettre en évidence ce phénomène, les résultats pour la modalité *Phanerochaete chrysosporium* sont normalisés en prenant comme valeur de référence la valeur de l'expérimentation stérile. Ainsi, l'effet de

*Phanerochaete chrysosporium* est plus facilement identifiable. Les résultats de cette modalité entre 45 jours et 120 jours sont présentés dans la Figure 31. Les concentrations normalisées sont obtenues avec l'Équation 9.

$$Concentration\ normalisée_{PCB} = \frac{Concentration_{PCB}}{Concentration\ experimentation\ t = 0\ jour_{PCB}}$$

Équation 9 : Calcul des concentrations normalisées.

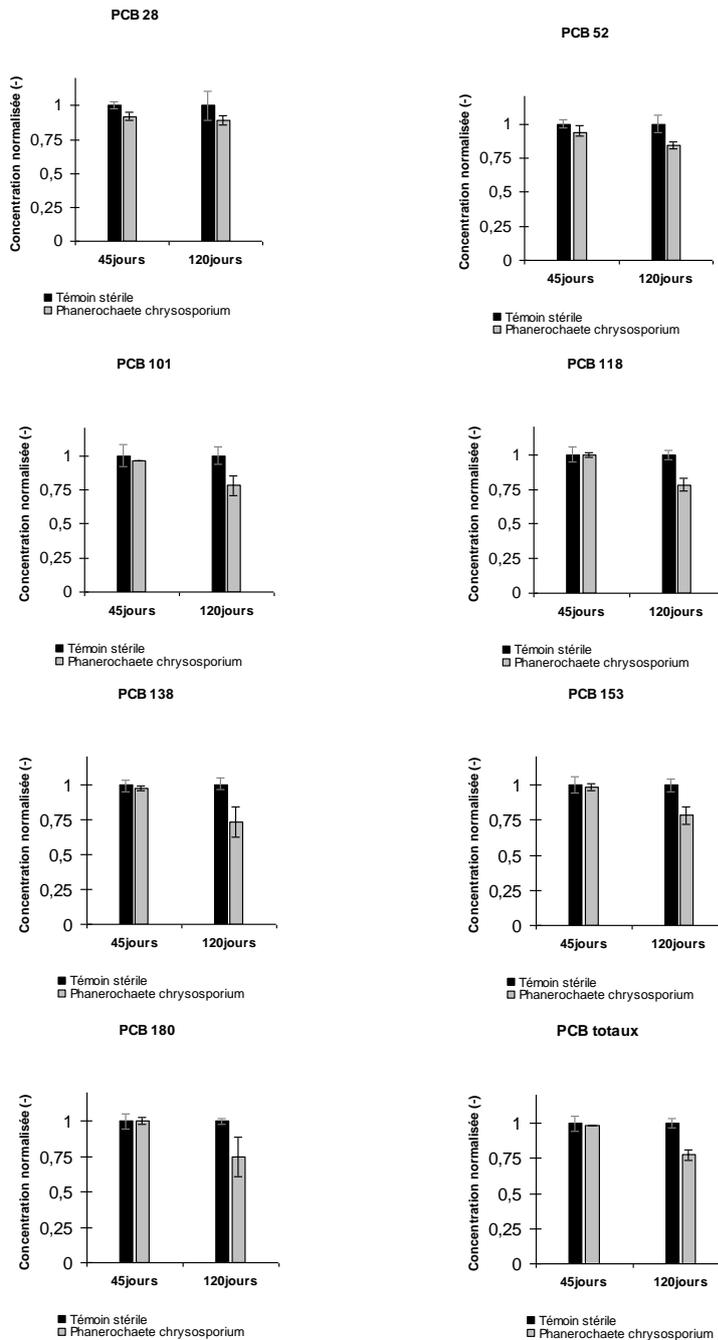


Figure 31 : Résultats par PCB de l'essai de dépollution biologique de sol artificiel par *Phanerochaete chrysosporium*. Valeurs normalisées par les résultats de l'expérimentation témoin.

On observe qu'en présence de *Phanerochaete chrysosporium* les rendements de dégradation entre 45 jours et 120 jours oscillent entre 11 % et 25 % pour le PCB le plus chloré.

### III.2.2.2 Interprétations

Entre 0j et 15j, une baisse de la concentration en PCB est observée, jusqu'à un minimum relatif à t = 15 jours. Puis, on observe une hausse vers un maximum à t = 45 jours. Le comportement similaire des trois fermenteurs témoins et des trois fermenteurs dont la matière organique a été inoculée par *Phanerochaete chrysosporium* exclut l'hypothèse d'une répartition hétérogène de la contamination dans le sol. Suivant la date de prélèvement les PCB sont plus ou moins accessibles à l'extraction. Ce phénomène peut provenir du mode de dopage des sols par flash d'hexane contenant des PCB. Bien que le sol soit vigoureusement mélangé après dopage, il est possible que les PCB soient adsorbés sur la verrerie. Progressivement la concentration en PCB se stabilise après 45 jours.

Après cette période de stabilisation, la présence de *Phanerochaete chrysosporium* a un effet sur la concentration en PCB. Par rapport aux témoins stériles, une dégradation de 23 % de la somme totale des PCB est observée. Si beaucoup d'études ont été menées sur les capacités de biodégradation de ce champignon dans l'eau, peu de résultats sont disponibles sur la biodégradation des PCB dans les sols. *Phanerochaete chrysosporium* montre ses capacités de biodégradation de PCB possédant de 3 à 7 atomes de chlore en condition non-lignolytique. Les rendements par rapport au témoin stérile sont moins bons qu'en phase liquide. *Phanerochaete chrysosporium* n'est pas un champignon tellurique et sa mise en œuvre en sol réel n'est pas envisageable sans apport massif de matière organique. Un tel apport augmenterait le volume et le poids du sol à traiter ce qui dans un contexte industriel est contre productif. C'est pourquoi *Phanerochaete chrysosporium* n'a pas été testé sur un sol réel.

**En sol, en inoculant la matière organique avant la constitution du sol artificiel, un rendement de dégradation de 23 % a été observé par rapport à l'expérimentation stérile. Cependant, la mise en œuvre industrielle d'un procédé de traitement des sols avec *Phanerochaete chrysosporium* semble inenvisageable.**

## IV CONCLUSION

La question scientifique soulevée lors de la synthèse bibliographique à laquelle ce chapitre se propose de répondre était :

*Quel est le niveau de performance théorique des microorganismes capables de dégrader les PCB par voie aérobie ?*

Les résultats présentés dans la première partie de ce chapitre ont permis de mettre en avant les capacités de *Burkholderia xenovorans* pour la dégradation biologique des PCB. Les résultats obtenus en milieu aqueux corroborent les observations préalablement décrites dans la littérature scientifique. Ils ont cependant permis de vérifier l'efficacité de la souche et des conditions de culture utilisées. Une fois ces résultats acquis, les essais en sol ont confirmé que cet organisme avait un vrai potentiel technologique. Les conditions expérimentales n'ont pas permis d'observer une diminution significative de la concentration totale en PCB du sol artificiel contaminé par l'Aroclor 1254. Cependant dans le détail, on observe que 3 PCB ont préférentiellement été dégradés avec des rendements allant de 12 % à 19 % en l'espace de 90 jours. En sol réel, des rendements de dégradation entre 0 % et 35 % sont observés. Les PCB les plus dégradés sont ceux qui sont les plus concentrés dans le sol et ceux ayant les positions 2 et 3 libres sur le noyau biphenyle. On met donc en évidence que la composition de la contamination en PCB est un facteur déterminant pour prédire le comportement de la bactérie et ses rendements de dégradation par PCB. Son comportement est difficilement modélisable et extrapolable d'un site à un autre. Cependant, avec un abattement moyen journalier qui atteint plus de  $0,85 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  pour la somme des 7 PCB lors de l'essai de dépollution sur le sol réel, *Burkholderia xenovorans* possède des capacités métaboliques compatibles avec un usage industriel. L'une des perspectives de recherche appliquée serait d'étudier les systèmes de mise en œuvre de cette souche et d'établir l'optimum économique et environnemental entre la production de l'ensemencement (ensemencement liquide, lyophilisat) et les rendements de dégradation associés.

Les résultats présentés dans la deuxième partie de ce chapitre montrent que *Phanerochaete chrysosporium* est un microorganisme d'intérêt dans l'optique de la mise en place d'un procédé de décontamination en milieu aqueux. Il a la capacité de filtrer les PCB de l'eau et de les fixer sur son mycélium, puis d'en dégrader une partie. Les résultats montrent que *Phanerochaete chrysosporium* fixe entre 40 % et 50 % de la concentration initiale et dégrade une fraction comprise entre 30 % et 40 % selon le PCB considéré. Ainsi, un procédé de filtration biologique pourrait être imaginé afin de traiter des eaux saturées en PCB. De plus, l'étude cinétique a permis de déterminer les pas de temps des phénomènes impliqués. Si la sorption est très rapide, entre 24 et 48h, la dégradation de PCB par *Phanerochaete chrysosporium* nécessite plus de temps, de l'ordre de la semaine, tout en restant compatible avec un usage industriel. Un prolongement de ces travaux serait l'étude de la mise en œuvre de ce microorganisme, en culture libre ou fixe, dans le cadre d'un traitement d'appoint des eaux résiduaires d'un traitement de sol ou dans un scénario d'excavation de sédiments de cours d'eau contaminé. En effet, ces épisodes remobilisent les polluants enfouis et engendrent une contamination à l'aval des travaux pouvant avoir des conséquences graves sur les écosystèmes proches.

Pour répondre concrètement à la question posée, les deux microorganismes possèdent un potentiel technologique intéressant dans des domaines différents, l'un dans le traitement des sols (*Burkholderia xenovorans*), l'autre pour le traitement de l'eau (*Phanerochaete chrysosporium*).

# **Chapitre 3 :**

# **Dégradation**

# **anaérobie des PCB**

# **et application en**

# **traitement séquentiel**

# I INTRODUCTION

La dégradation biologique aérobie ne permet pas de métaboliser les PCB les plus chlorés. De fait, pour atteindre des rendements satisfaisants de dégradation de ces PCB fortement chlorés, une phase anaérobie est nécessaire. Cette phase a pour objectif de réduire le nombre d'atomes de chlore sur le noyau biphényle et d'améliorer la dégradabilité aérobie de la molécule. Les microorganismes capables de telles réactions sont peu étudiés. Il est difficile d'isoler et de cultiver ces souches anaérobies qui proviennent pour la plupart de l'Environnement. Les sites pollués de longue date ont la particularité de présenter une microflore adaptée à la pollution. Suite aux études diligentées par l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée & Corse révélant la contamination des sédiments et poissons du Rhône par des PCB, une campagne de prélèvement a été organisée du 30 au 31 Janvier 2008. L'objectif est de trouver une souche ou une communauté microbienne issue de ces sédiments capables de déchlorer les PCB en anaérobiose.

Il existe plusieurs méthodes pour obtenir des microorganismes d'intérêt capable de transformer des PCB. L'ingénierie génétique permet d'importer des gènes d'intérêt dans une bactérie hôte ayant d'autres critères intéressants, comme des conditions de cultures peu sélectives, l'émission de tensioactifs d'origine biologique ou la capacité de métaboliser les tensioactifs (Lajoie *et al.*, 1994). Une autre stratégie consiste à rechercher des microflores ayant été en contact avec des PCB durant plusieurs années (Bedard *et al.*, 2006). C'est cette dernière approche qui a été choisie pour ces travaux. Les bactéries génétiquement modifiées présentent plusieurs inconvénients dans le cadre d'une application industrielle : i) Un cadre législatif contraignant pour la production des bactéries et indéfini pour les usages dispersifs non-agricoles ; ii) un contexte social très sensible autour de la thématique de la bioingénierie ; iii) un atténuation du gène d'intérêt au cours du temps (Imran *et al.*, 2005).

L'objectif de cette partie est de tester l'ensemble de ces communautés sur les capacités à transformer ou biodégrader des PCB. Après une phase sur culture liquide où les communautés d'intérêt sont détectées, le potentiel des communautés sélectionnées est testé en sol. Enfin, les résultats de ces deux premières parties sont utilisés dans un essai de dépollution biologique par traitement séquentiel anaérobie/aérobie à une échelle de 25 kg.

## II EXPERIMENTATION A L'ECHELLE LABORATOIRE

### II.1 *Matériels et méthodes*

#### II.1.1 Expérimentations

##### II.1.1.1 Matériel

###### *II.1.1.1.1 Réactifs et petits matériels*

Les produits chimiques servant à fabriquer les milieux de culture liquides et les PCB utilisés pour ces expérimentations sont définis dans le paragraphe II.1.1.1.1 du chapitre 2.

Les carottages de sédiments ont été réalisés à l'aide d'un multi-échantillonneur manuel (SDEC France, Reignac) (Figure 32).



**Figure 32 : Multi échantillonneur manuel**

Les flacons sérum de 10 mL en borosilicate, les septa en butyle ainsi que les capsules à sceller proviennent de Wheaton (Millville, Etats-Unis). Les expérimentations sont menées dans des flacons verres type ALU210, d'un volume de 250 mL pour une hauteur de 8 cm, fournis par AlControl (Rotterdam, Pays-Bas).

###### *II.1.1.1.2 Sols*

Le sol artificiel et le sol réel utilisés pour la manipulation en milieu solide sont décrits dans le paragraphe II.1.1.1.3 du chapitre 2.

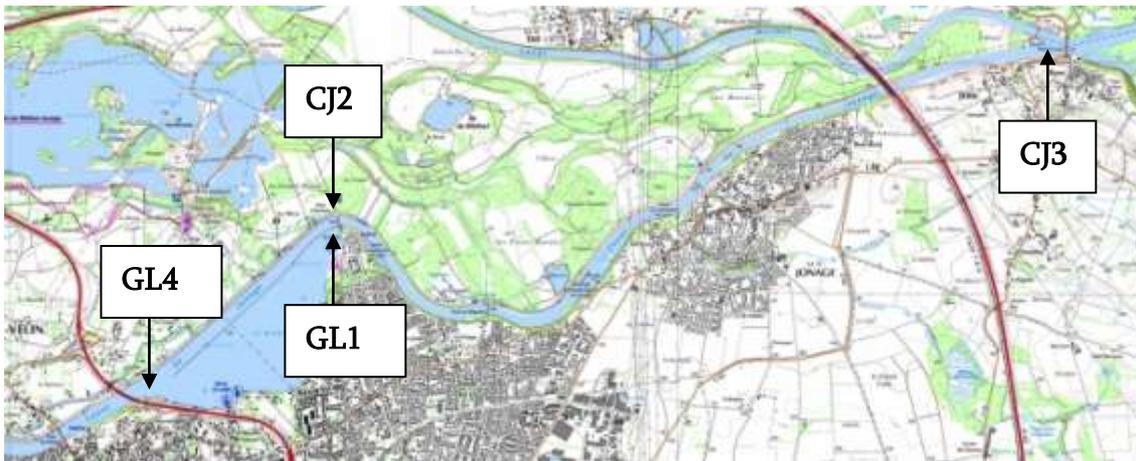
##### II.1.1.2 Méthodes

###### *II.1.1.2.1 Obtention de microflores d'intérêt*

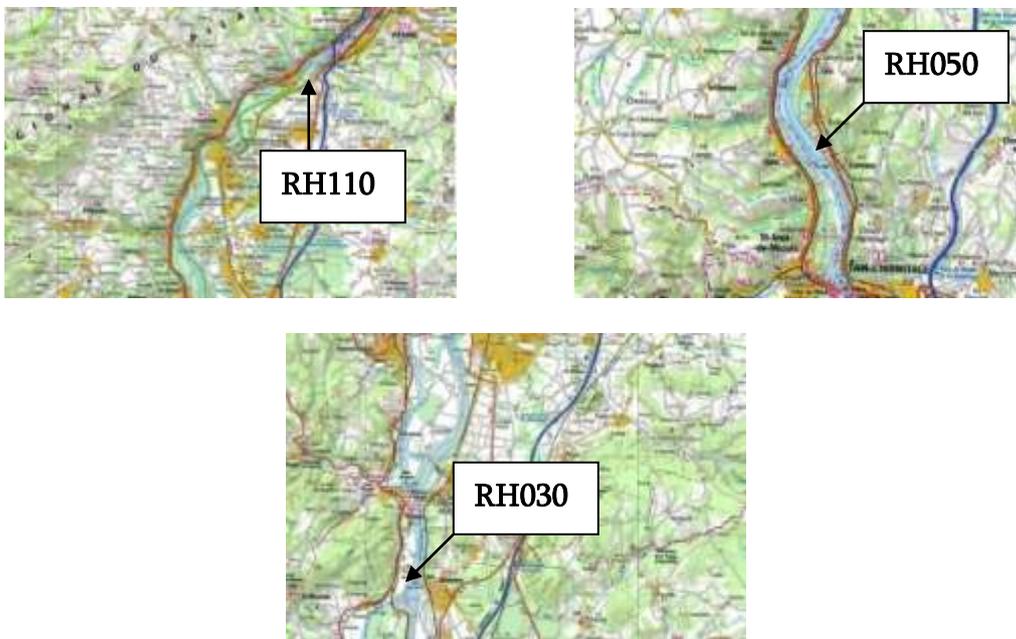
###### II.1.1.2.1.1 Prélèvements

Une campagne de prélèvement a été effectuée afin d'obtenir des communautés microbiennes ayant été en contact avec des PCB. Sept lieux de prélèvement (Figure 33, Figure 34) ont été sélectionnés sur la base du rapport « Contamination des poissons et des sédiments du Rhône par les polychlorobiphényles - Synthèse des données recueillies en 2005-2006 » rédigé par Marc BABUT et Cécile MIEGE du CEMAGREF de Lyon (Babut et Miège, 2007). Les coordonnées des lieux de prélèvement sont données dans le Tableau 15.

**Tableau 15. Référencement des prélèvements. <sup>1</sup>Projection WGS 84, dd°mm'ss.ss''**



**Figure 33 : Zone de prélèvement Grand Large et Canal de Jonage. Source : Géoportail.**



**Figure 34 : Zone de prélèvement Rhône. Source : Géoportail.**

Nomenclature	Description	Coordonnées GPS <sup>1</sup>
GLL1	Zone Grand large Est	45°47'35.28"N 4°59'20.13"E
GL4	Zone Grand large Ouest	45°46'43.43"N 4°58'9.67"E
CJ3	Canal de Jonage - Jons	45°48'36.92"N 5° 4'50.47"E
CJ2	Canal de Jonage – Grand Large	45°47'35.28"N 4°59'20.13"E
RH030	Rhône - Ampuis	45°29'42.03"N 4°49'52.74"E
RH050	Rhône – La Sainte	45° 6'40.94"N 4°49'5.47"E
RH110	Rhône - Donzère	44°26'40.93"N 4°41'30.93"E

Les sédiments sont prélevés à l'aide d'un échantillonneur manuel sur une profondeur d'environ 70 cm. Les carottes de sédiments sont stockées dans des tubes PVC Ø 45 mm bouchés (Figure 35, Figure 36). Afin de maintenir un faible potentiel d'oxydoréduction, un sucre est placé à chaque extrémité du tube. Les prélèvements sont effectués en deux prises, en stockant la partie la plus profonde au centre du tube.



**Figure 35 : Tube de stockage des sédiments collectés**



**Figure 36 : Bouchons assurant la limitation des échanges gazeux**

Les tubes ainsi scellés sont stockés à température ambiante (entre 0°C et 20°C) jusqu'à ouverture.

### II.1.1.2.1.2 Conditionnement des souches

Après ouverture des tubes de stockage des sédiments, 20 g de sédiment sont prélevés. Une culture liquide mère (CLM) est préparée en suspendant environ 1 g de sédiment frais dans 20 mL de Solution Minérale Minimale (SMM) stérile.

Huit mL de SMM sont placés dans un flacon sérum d'une contenance de 10 mL. Les flacons sont scellés à l'aide d'un bouchon butyle maintenu par une capsule en aluminium. Ils sont autoclavés pendant 20 min, sous 1 bar à 120°C. A la sortie de l'autoclave, le glucose (2 g.L<sup>-1</sup>) est ajouté de manière stérile. Le milieu est dopé par un mélange de PCB (IUPAC n°28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180) pour atteindre 10 µg. L<sup>-1</sup>. Les milieux ainsi préparés sont inoculés avec 1 mL de la CLM. Après une semaine de culture, un repiquage dans un milieu neuf (SMM + Glucose 2 g.L<sup>-1</sup> + PCB 10 µg.L<sup>-1</sup>) est effectué en ajoutant 1 mL de la première culture fille. Après 3 repiquages les communautés sont considérées comme adaptées au milieu de culture et donc prêtes à l'emploi.

### II.1.1.2.1.3 Estimation de la dégradation anaérobie

Neuf mL de SMM stérile contenant 2 g.L<sup>-1</sup> de glucose sont disposés dans des flacons sérum d'une contenance de 10 mL. Les flacons sont inoculés avec 1 mL de la culture préparée comme décrit dans le paragraphe précédent. Les flacons sont ensuite dopés à l'aide d'une solution d'Aroclor 1254 Technical Grade pour atteindre une concentration de 100 mg.L<sup>-1</sup>. L'inducteur, du carvone, 10 µL de carvone pur, ou du biphényle, 10 µL d'une solution à 100 g.L<sup>-1</sup> dans l'hexane, est ajouté suivant les modalités indiquées dans le Tableau 16. Ils sont ensuite placés à l'étuve à 35°C pendant 15 jours.

Tableau 16 : Récapitulatif des modalités et du nombre de répétitions de l'expérimentation en milieu liquide.

Inducteur	CJ2	CJ3	GL1	GL4	RH030	RH050	RH110	Aucun
Biphényle	1	1	1	1	1	1	1	
Carvone	1	1	1	1	1	1	1	1

### II.1.1.2.2 Expérimentation anaérobie en sol

#### II.1.1.2.2.1 Sol artificiel

Quatre-vingt grammes de sol artificiel préparé comme décrit dans le paragraphe II.1.1.2.2.1 du chapitre 2, sont placés dans un flacon en verre ambré. Le sol ainsi disposé est ennoyé avec une SMM pour obtenir une distance d'environ 2 cm entre la surface du sol et la surface libre de la solution. Les flacons sont passés à l'autoclave (120°C, 1 bar, 20 min). Le glucose (2g.L<sup>-1</sup>) et l'aroclors 1248 (100 mg.kg<sup>-1</sup>MS) sont ajoutés de manière stérile. Après une agitation manuelle, les flacons sont placés à l'étuve à 35°C pour une incubation de 4 mois. Trois microflores sont testées : GL4, CJ2 et RH050. Les tests sont effectués en triplicata.

#### II.1.1.2.2.2 Sol réel

Quatre-vingt grammes de sol VsL (Villeneuve sur Lot) sont disposés dans un flacon en verre ambré. Le sol subit alors le même traitement que pour l'expérimentation en sol artificiel décrite préalablement. La seule différence introduite est l'ajout de biphényle, 100 µL d'une solution à 100 g.L<sup>-1</sup> dans l'hexane, ou de Tween 80, 1 mL d'une solution à 250 g.L<sup>-1</sup> dans l'eau, suivant les modalités décrites dans le Tableau 17, dans l'objectif de tester l'effet de l'ajout d'un inducteur ou d'un tensioactif.

**Tableau 17 : Récapitulatif des modalités et du nombre de répétitions de l'expérimentation en milieu solide avec un sol réel.**

	CJ2	RH050	GL4
<b>Biphényle</b>	3	3	3
<b>Tween 80</b>	3	3	3

## II.1.2 Analyses

Les PCB sont analysés dans l'expérimentation en milieu liquide par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse suivant la méthodologie décrite dans l'annexe II.1. En milieu solide, les concentrations sont plus élevées. Les PCB ont donc été dosés suivant la méthode utilisée en routine pour le suivi de chantier par la société VALGO. Le dosage est effectué par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse par la société Alcontrol.

## II.2 *Résultats*

### II.2.1 Expérimentation en milieu liquide

#### II.2.1.1 Résultats et interprétation

##### *II.2.1.1.1 Observations macroscopiques*

L'observation macroscopique des cultures anaérobies permet de collecter les premières informations sur les communautés microbiennes mises en cultures. Les cultures issues de la zone Grand Large sont présentées Figure 37. Celles issues du Canal de Jonage sont présentées Figure 38. Enfin, les cultures des microflore issues de la zone Rhône sont présentées Figure 39.



Figure 37 : Aspect des cultures des communautés GL1 (à gauche) et de GL4 (à droite).



Figure 38. Aspect des cultures des communautés CJ2 et CJ3.



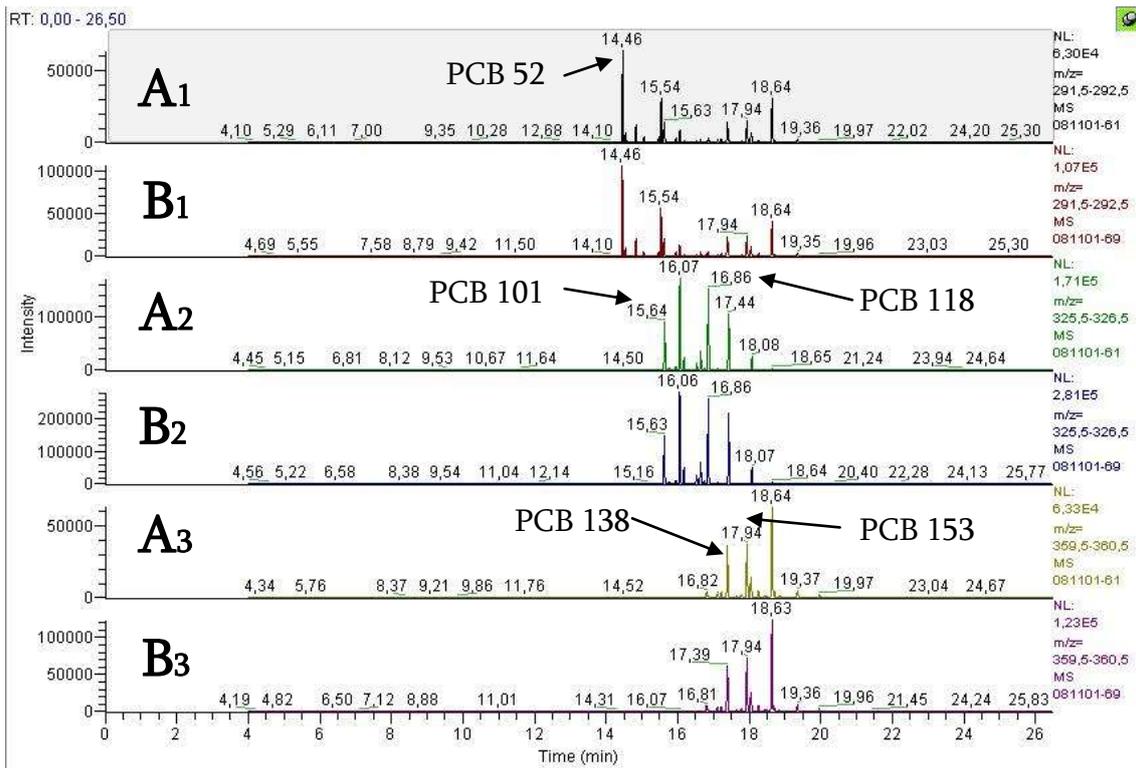
Figure 39 : Aspect des cultures des communautés RH030, RH050, RH110.

Une forte croissance microbienne au bout de 36h d'incubation après repiquage a été observée pour toutes les cultures. La pression exercée sur la capsule en aluminium sur certaines cultures semble indiquer une production de gaz, notamment dans GL1, CJ3 et RH050. Une émulsion persiste après agitation pour GL1. Après agitation des cultures, une émulsion se forme pour toutes les cultures à l'exception de RH110. Cette émulsion persiste pour les communautés GL1, CJ3, RH030 et RH050.

### ***II.2.1.1.2 Estimation de la dégradation anaérobie***

#### **II.2.1.1.2.1 Expérimentation Témoin**

La Figure 40-A présente le profil chromatographique du dopage des milieux réactionnels par l'Aroclor 1254 à l'état initial. Celui présenté dans la Figure 40-B est issu de l'expérimentation stérile témoin après 15 jours.



**Figure 40 : Chromatogrammes issus de l'expérimentation Témoin à t = 0 jour (A) et t = 15 jours (B). 1 correspond aux PCB tétrachlorés ; 2 correspond aux PCB pentachlorés ; 3 correspond aux PCB hexachlorés.**

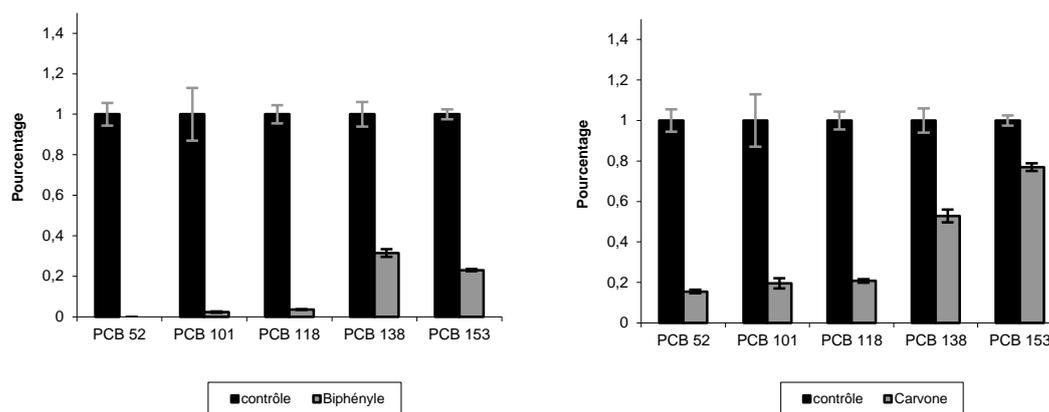
On identifie les 5 pics correspondant aux PCB 52, 101, 118, 138 et 153 de l'Aroclor 1254. Aucune modification du profil de la contamination n'est observée entre  $t_0$  et  $t_{final}$ . Les résultats ne montrent pas de transformation abiotique de PCB en 15 jours.

### II.2.1.1.2.2 Zone Grand Large

Les chromatogrammes issus de l'expérimentation de la zone Grand Large sont présentés dans l'annexe III.2 et III.3. Les teneurs résiduelles de PCB dans l'expérimentation avec la communauté GL1 sont présentées sur la Figure 41. Les pourcentages résiduels sont calculés par rapport au témoin stérile (100%). Ils sont calculés à l'aide de l'Équation 10 :

$$\% \text{ résiduelle}_{PCB} = \frac{\text{Concentration}_{PCB}}{\text{Concentration expérimentation stérile}_{PCB}}$$

**Équation 10 : Calcul de la teneur résiduelle en PCB.**



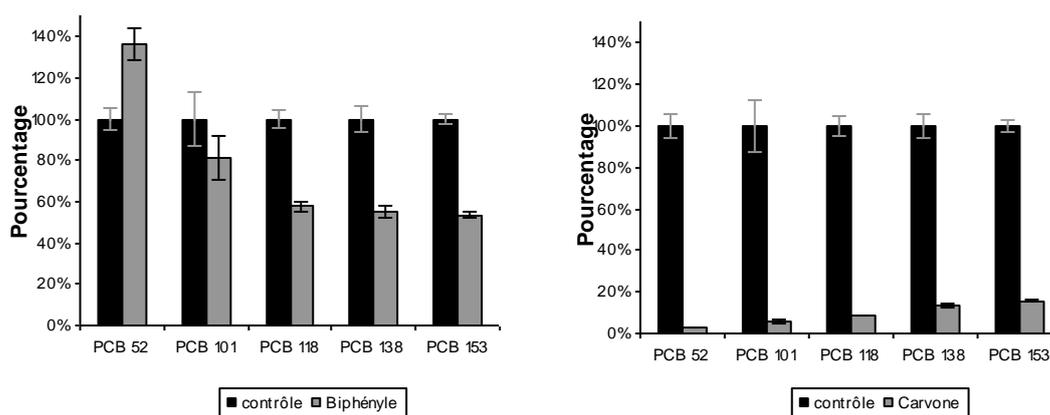
**Figure 41 : Pourcentages résiduels des 5 PCB obtenus après traitement avec communauté GL1 en présence de biphényle et de carvone.**

On remarque qu'après une incubation de 15 jours la communauté GL1 présente des capacités différentes suivant l'inducteur choisi. Le biphényle permet d'obtenir des rendements de dégradation compris entre 68 % et 100 % pour le PCB le moins chloré (PCB 52). En revanche une induction au carvone donne de moins bons résultats notamment sur les PCB fortement chlorés, avec 6 atomes de chlore (PCB 153 et 138).

La communauté GL4 n'a montré aucune activité de dégradation.

### II.2.1.1.2.3 Zone Canal de Jonage (CJ2 et CJ3)

Les chromatogrammes issus de l'expérimentation Canal de Jonage sont présentés en annexe III.4 et II.5. Les résultats des teneurs résiduelles des PCB pour les communautés CJ2 et CJ3 sont présentés respectivement sur la Figure 42 et la Figure 43. Les pourcentages résiduels sont calculés de la manière décrite dans le paragraphe précédent.



**Figure 42 : Pourcentages résiduels des 5 PCB après traitement avec communauté CJ2 en présence de biphényle et de carvone**

On observe qu'en présence de carvone, la communauté CJ2 montre des rendements de dégradation supérieurs à 84 % pour tous les PCB. En revanche, une induction au biphényle ne permet d'obtenir que des rendements allant de

18 % à 46 %. Plus le PCB est chloré, plus le rendement s'améliore. On note un enrichissement de PCB tétrachlorés (PCB 52) de 36 %.

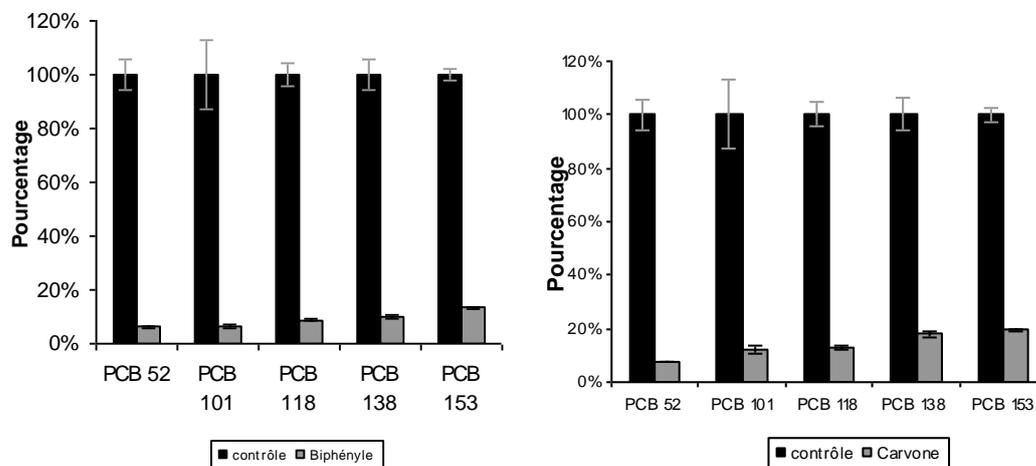


Figure 43 : Pourcentages résiduels des 5 PCB après traitement avec communauté CJ3 en présence de biphenyle et de carvone

La Communauté CJ3 présente de forts rendements de dégradation des 5 PCB quel que soit le mode d'induction avec des rendements allant de 80 % à 94%.

#### II.2.1.1.2.4 Zone Rhône (RH030, RH050 et RH110)

Les chromatogrammes issus de l'expérimentation Rhône sont présentés annexe III.6, III.7 et III.8. La Figure 44 présente les résultats des pourcentages résiduels de PCB pour la communauté RH050 induit par du biphenyle et par du carvone. Les valeurs sont obtenues grâce à l'équation donnée dans le paragraphe II.2.1.1.2.2.

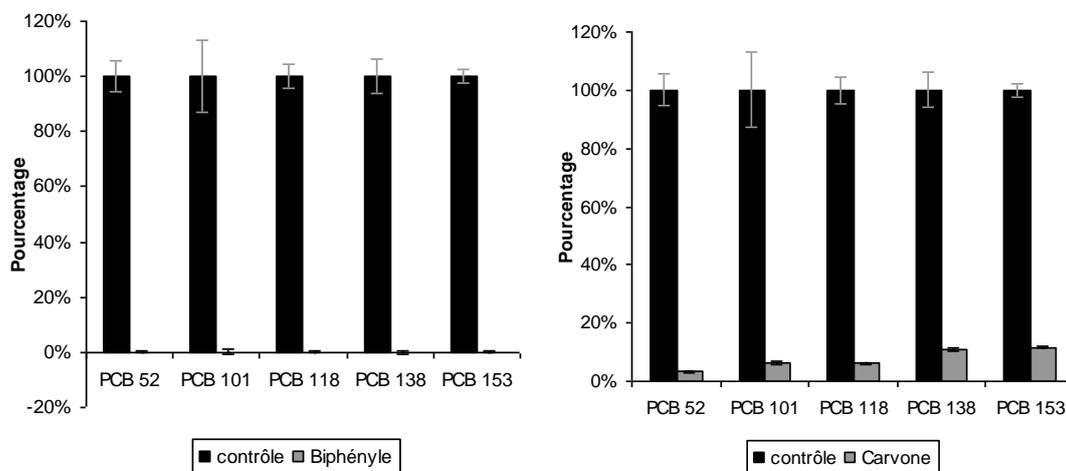


Figure 44 : Pourcentages résiduels des 5 PCB après traitement avec communauté RH050 en présence de biphenyle et de carvone

On observe qu'aucun PCB n'est détectable dans la culture de la communauté RH050 après 15 jours en présence de biphenyle. Il n'y pas de pics sur le chromatogramme qui indiqueraient l'accumulation de métabolites ou la présence de biphenyle résiduel. On observe, en présence de carvone, qu'il n'y a plus de PCB détectables dans la culture. Rien n'indique également l'accumulation de métabolites après 15 jours.

Les calculs effectués à partir des chromatogrammes des extraits issus des communautés RH030 et RH110 n'ont pas permis d'observer des rendements de dégradation.

La technique d'analyse des PCB contenus dans l'Aroclor 1254 ne permet pas une quantification absolue, mais autorise une comparaison avec un témoin stérile. Il n'est ainsi pas possible de calculer avec précision des vitesses de dégradation journalière pour chacune des communautés. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre le  $t = 0$  jour et le témoin stérile après 15 jours. La concentration de départ était de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ . Or on connaît approximativement la concentration des différents congénères dans de l'aroclor 1254 (Tableau 18). On peut ainsi estimer la transformation des PCB.

**Tableau 18 : Concentrations en  $\text{mg.g}^{-1}$  des PCB 52, 101, 118, 138 et 153 dans l'aroclor 1254. (Kodavanti *et al.*, 2001)**

Congénère	Concentration en $\text{mg.g}^{-1}$	Ecart-type
PCB 52	21,4	19,3
PCB 101	66,9	7,6
PCB 118	125,5	2,1
PCB 138	65,3	9,3
PCB 153	32,9	1,5

On peut alors estimer un potentiel théorique d'abattement de PCB. Par exemple pour la communauté CJ2 on obtient une vitesse de disparition moyenne journalière respectivement pour le biphenyle et pour le carvone de  $10,2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  et de  $28,3 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . Ces résultats confirment le bon potentiel technologique de certaines des communautés étudiées.

### II.2.1.2 Discussion

Ces expérimentations en milieu liquide ont permis d'estimer le potentiel de 7 communautés microbiennes issues d'un environnement anthropisé. Les observations macroscopiques ont permis de vérifier que le milieu de culture sélectionné était compatible avec une croissance en condition anaérobie pour toutes les communautés étudiées. Certaines bactéries sont capables de synthétiser des tensioactifs. Ces rhamnolipides peuvent avoir un intérêt technologique (Mulligan, 2009). Dans une communauté microbienne complexe issue de l'environnement, il n'est pas rare de retrouver une espèce productrice de tensioactifs. Pour cette fonction, la bioingénierie n'est donc pas indispensable. C'est un argument de plus pour l'utilisation de la sélection naturelle pour l'obtention de microorganismes d'intérêt technologique.

Les résultats des dosages des PCB ont permis d'évaluer le potentiel technologique en milieu liquide des 7 communautés prélevées. Les communautés GL4, RH030 et RH110 ne présentent pas d'intérêt dans les conditions de cultures choisies. Pour les cultures CJ2, CJ3, GL1 et RH050 des rendements de dégradation ont pu être calculés par rapport à un témoin stérile. Les communautés CJ3 et RH050 présentent des rendements de dégradation proches de 100 % quel que soit l'inducteur choisi. Or, Wu *et al.* (Wu *et al.*, 1998) ont observé des rendements de dégradation de 66% pour les PCB hexachlorés après une période de 181 jours avec une communauté microbienne

issue de sédiments prélevés dans la Baie de Baltimore. Des résultats similaires ont été obtenus par Bedard *et al.*, (Bedard *et al.*, 2006) avec une communauté issue de la Rivière Housatonic. En 152 jours, respectivement 16,5 % et 81,8 % des PCB pentachlorés et hexachlorés ont été dégradés. Pour ces deux études, ces dégradations de PCB fortement chlorés s'accompagnent d'une accumulation du PCB 52, entre 31 et 37 fois la concentration initiale dans le sédiment.

L'originalité des résultats présentés est que, pour certaines communautés, des rendements de dégradation satisfaisants ont été obtenus en milieu liquide sans accumulation de PCB ortho-substitués et dans un pas de temps très court. Le travail effectué avec les communautés issues de la zone Canal de Jonage a fait l'objet d'une publication scientifique (Sangely *et al.*, 2009a). La technique de l'induction, utilisée pour favoriser les réactions enzymatiques aboutissant à l'ouverture des cycles, semble jouer un rôle intéressant dans l'optimisation de la dégradation anaérobie.

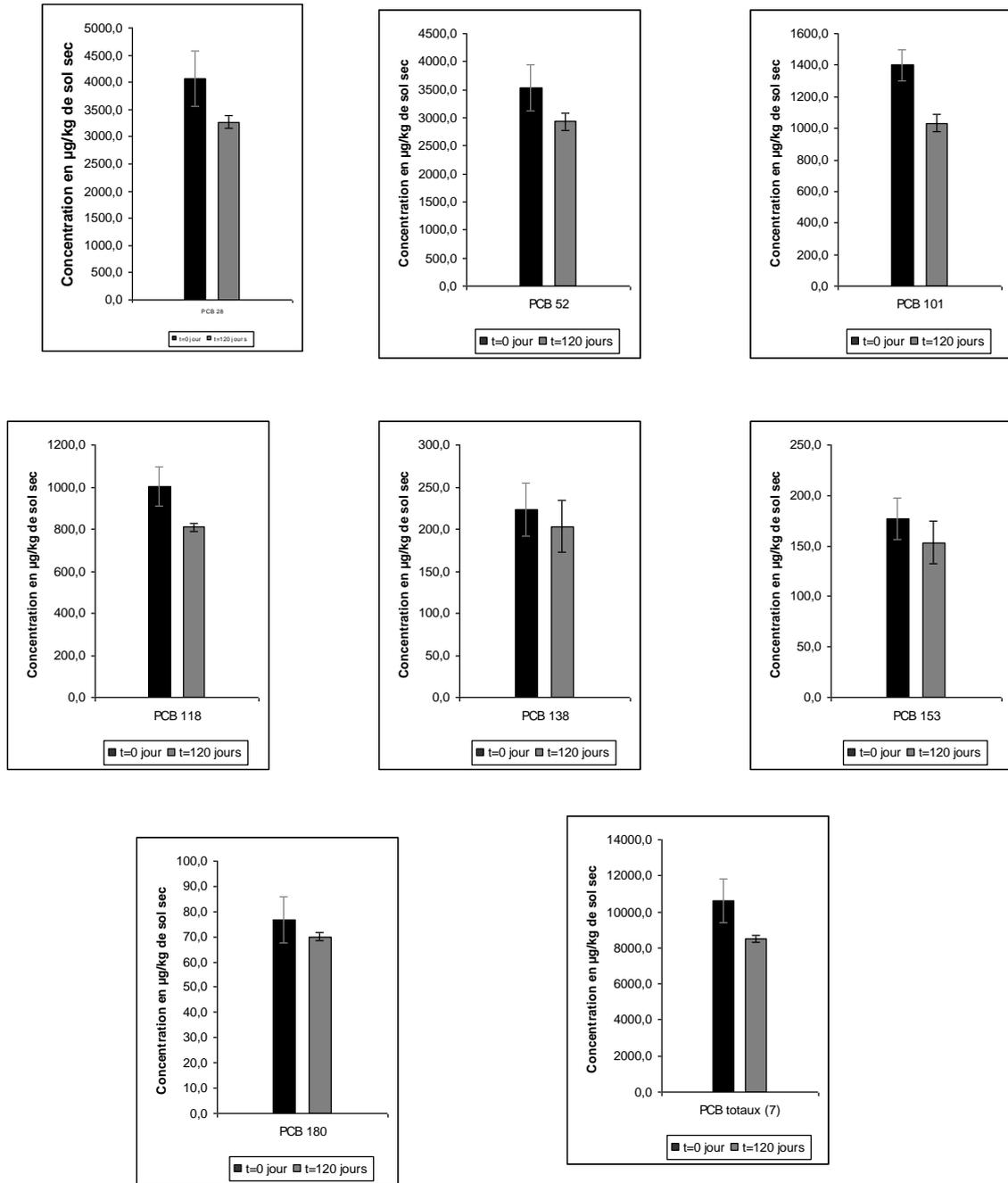
**Les résultats en milieu liquide ont permis d'identifier 4 communautés ayant des capacités de métabolisation des PCB avec de bons rendements pour un pas de temps assez court. Les communautés issues des sédiments RH030 et RH110 sont écartées de l'étude. Par la suite, en milieu solide artificiel, les microflores RH050 et CJ2 seront étudiées. RH050 présente l'un des meilleurs potentiels technologiques. CJ2 est conservé afin de confirmer ou infirmer le phénomène d'accumulation de PCB 52 par cette microflore dans le sol. Enfin, la communauté GL4 est conservée comme témoin négatif.**

## II.2.2 Expérimentation en sols

### II.2.2.1 Résultats

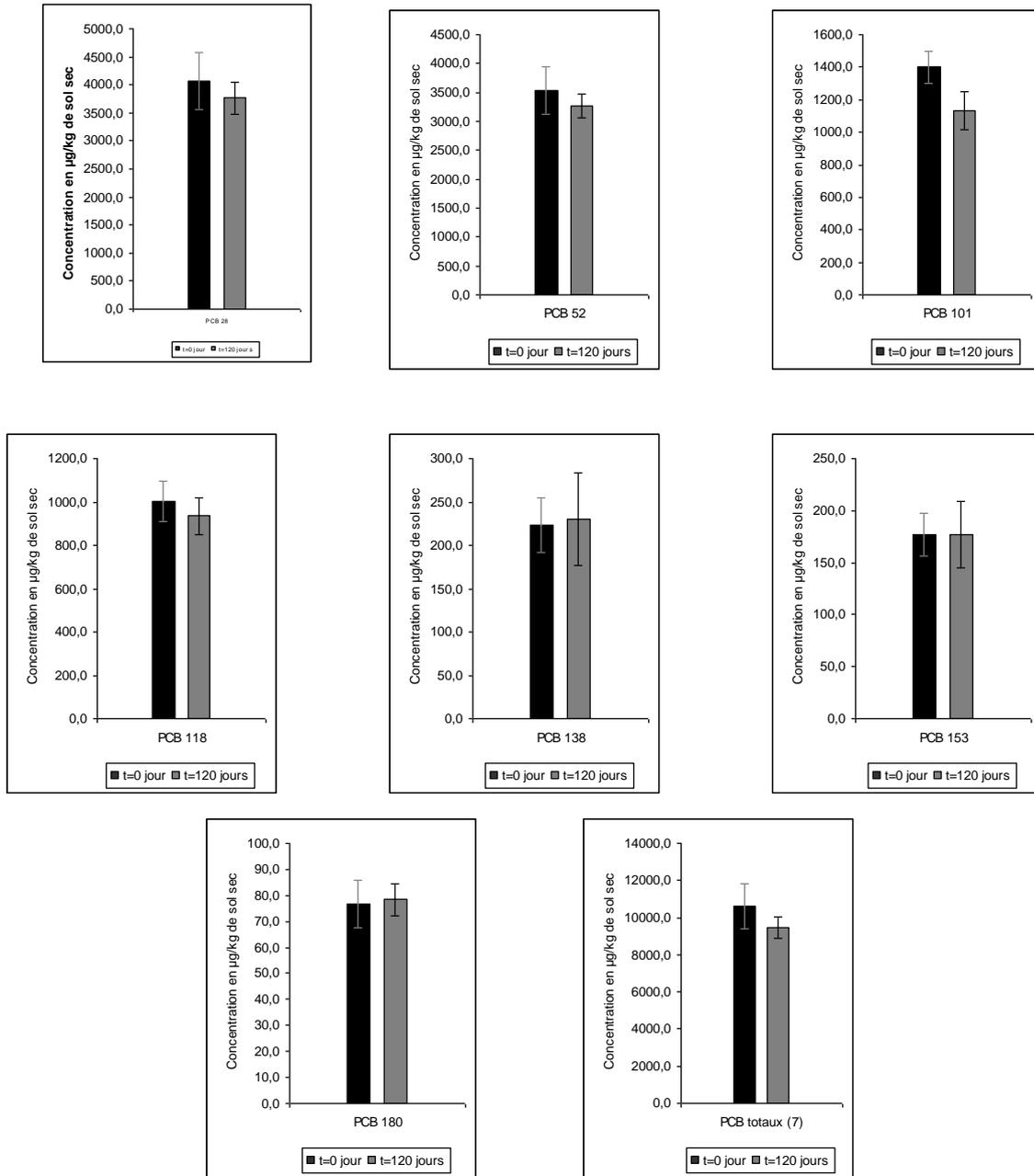
#### *II.2.2.1.1 Expérimentations en sols artificiels*

Les résultats relatifs aux capacités de transformation des 3 microflores sélectionnées, CJ2, RH050 et GL4 sont présentés sur la Figure 45 pour la communauté CJ2, la Figure 46 pour la communauté RH050 et la Figure 47 pour la communauté GL4.



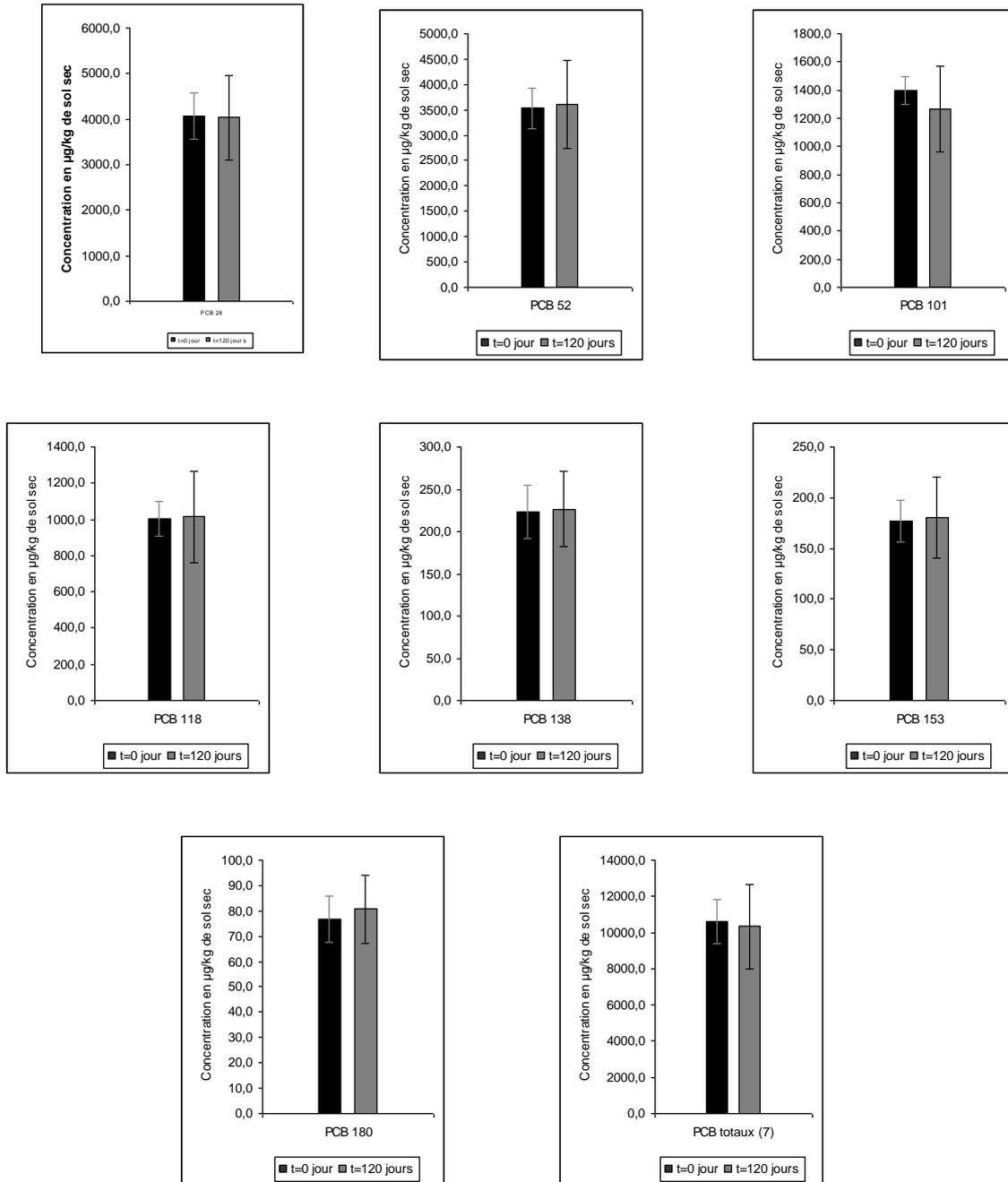
**Figure 45 : Concentration en  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de PCB dans les sols ensemencés par la microflore CJ2 après 4 mois d'incubation.**

Une diminution de la concentration en PCB est observée pour chaque PCB analysé entre t = 0 jour et t = 120 jours.



**Figure 46 : Concentration en  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de PCB dans les sols ensemencés par la microflore RH050 après 4 mois d'incubation.**

Les résultats des concentrations mesurées ne permettent pas de mettre en évidence de dégradation significative sauf dans le cas du PCB 101.



**Figure 47 : Concentration en  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de PCB dans les sols ensemencés par la microflore GL4 après 4 mois d'incubation.**

Pour cette communauté, aucune dégradation n'est observée quel que soit le PCB considéré.

Afin d'affiner les résultats précédents, les pourcentages de dégradation sont calculés selon l'Équation 11 :

$$\% \text{ Dégradation} = \frac{\text{Concentration}_{\text{Initiale}} - \text{Concentration}_{\text{Finale}}}{\text{Concentration}_{\text{Initiale}}}$$

**Équation 11 : Calcul des rendements de dégradation de PCB.**

Les résultats sont regroupés dans le Tableau 19.

**Tableau 19 : Pourcentages de dégradation pour les expérimentations en sol artificiel.**

	Communauté CJ2		Communauté RH050		Communauté GL4	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
PCB 28	19,7%	2,8%	7,4%	7,1%	0,8%	22,8%
PCB 52	17,0%	4,3%	7,5%	5,9%	-1,9%	24,5%
PCB 101	26,2%	4,1%	19,0%	8,2%	9,5%	21,8%
PCB 118	19,3%	2,0%	6,6%	8,5%	-1,0%	24,9%
PCB 138	9,0%	13,7%	-3,0%	23,7%	-1,5%	20,2%
PCB 153	13,2%	11,8%	0,0%	18,2%	-1,9%	22,6%
PCB 180	8,7%	2,3%	-2,2%	7,9%	-5,2%	17,8%
PCB Totaux	19,8%	1,9%	10,7%	5,2%	2,5%	21,8%

Les pourcentages de dégradation pour l'expérimentation avec CJ2 varient entre 8,7 % et 26,2 %. Le PCB le plus facilement dégradé est le PCB 101. Pour la somme des 7 PCB, le pourcentage de dégradation est de 19,8 %.

Pour la communauté RH050, ces pourcentages varient entre 0% et 19,0 %. Le PCB le plus facilement dégradé est également le PCB 101. Certains PCB (PCB 138, 153 et 180) ne sont pas dégradés. Sur le total des 7 PCB, le taux de dégradation est de 11 %.

Enfin, pour la communauté GL4, le pourcentage total de dégradation n'est que 2,5 % soit 8 fois moindre que celui de la communauté CJ2. Le PCB le plus facilement transformable, le PCB 101, n'est dégradé qu'à 10 %.

Pour prendre en compte l'effet de la concentration initiale en PCB sur les pourcentages de dégradation, les vitesses moyennes journalières de consommation sont calculées grâce à l'Équation 12 :

$$VMJ_{Consommation} = \frac{Concentration_{Initiale} - Concentration_{Finale}}{Temps}$$

**Équation 12 : Calcul des vitesses moyennes journalières de consommation.**

Ces résultats sont présentés dans le Tableau 20.

**Tableau 20 : Vitesses moyennes journalières de dégradation pour les expérimentations en sol artificiel.**

	Communauté CJ2		Communauté RH050		Communauté GL4	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
PCB 28	6,7	1,0	2,5	2,4	0,3	7,7
PCB 52	5,0	1,3	2,2	1,7	-0,6	7,2
PCB 101	3,1	0,5	2,2	1,0	1,1	2,5
PCB 118	1,6	0,2	0,6	0,7	-0,1	2,1
PCB 138	0,2	0,3	-0,1	0,4	0,0	0,4
PCB 153	0,2	0,2	0,0	0,3	0,0	0,3
PCB 180	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
PCB Totaux	17,5	1,7	9,4	4,6	2,2	19,3

La dégradation journalière la plus forte est obtenue pour le PCB 28 quelle que soit la communauté. Le PCB 28 représente à lui seul près de 40 % de la contamination totale en PCB quand le PCB 101, qui présente le pourcentage de dégradation le plus fort, n'en représente que 13 %.

Les communautés CJ2 et RH050 présentent les meilleurs résultats avec des vitesses journalières de dégradation de 17,5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  et de 9,2  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  respectivement. Pour la communauté GL4 qui obtient les moins bons résultats, la dégradation journalière n'est que de 2,2  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  sur le total des 7 PCB.

### ***II.2.2.1.2 Expérimentations en sol réel***

Ce paragraphe présente les résultats des dosages de PCB dans les expérimentations en sol réel. Seules les deux communautés identifiées comme les plus performantes lors de l'expérimentation en sol artificiel, CJ2 et RH050, ont été testées. Les teneurs de chaque PCB analysé dans les sols par communauté sont présentés Figure 48 (CJ2) et Figure 49 (RH050).

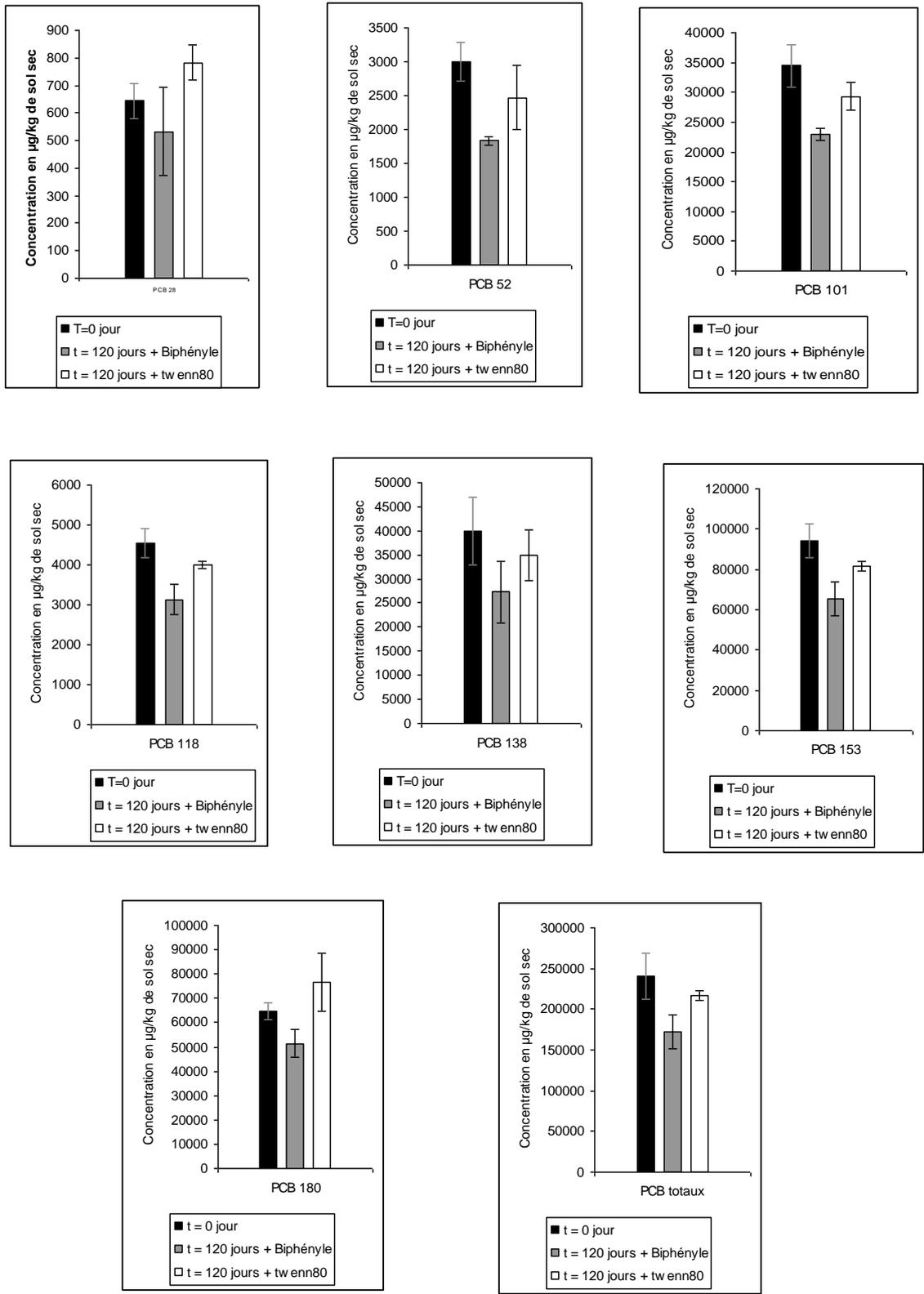


Figure 48 : Résultats des dosages après 4 mois pour la microflore CJ2.

En présence de la communauté CJ2 et pour tous les PCB considérés, l'ajout de biphényle semble avoir un meilleur effet que celui de l'ajout de tween 80. Pour cette dernière modalité, les dosages n'ont pas pu mettre en évidence de

diminution de la concentration en PCB. En présence de biphényle, une diminution de la concentration est observée quel que soit le PCB.

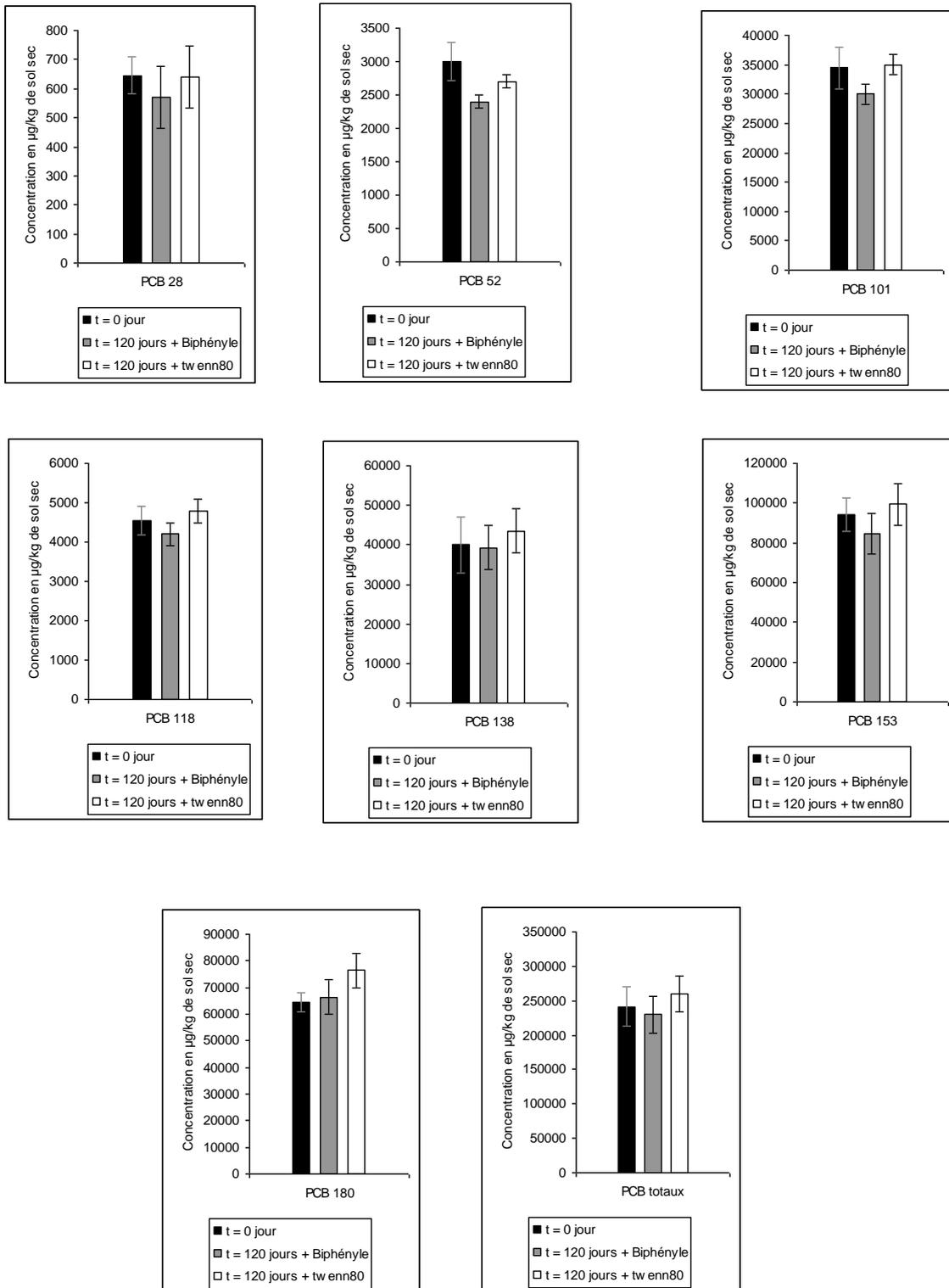


Figure 49 : Résultats des dosages après 4 mois pour la microflore RH050.

Le dosage des PCB dans l'expérimentation avec la communauté RH050 montre également que l'ajout de tween 80 n'a pas d'effet sur la dégradation des PCB. En présence de biphényle, une diminution de la concentration du PCB 52 est observée.

Les pourcentages de dégradation et les consommations journalières sont donnés respectivement dans le Tableau 21 et le Tableau 22. Les pourcentages de dégradation sont calculés à l'aide de l'Équation 13. Les vitesses moyennes journalières de consommation sont calculées grâce à l'Équation 14.

$$\% \text{ Dégradation} = \frac{\text{Concentration}_{\text{Initiale}} - \text{Concentration}_{\text{Finale}}}{\text{Concentration}_{\text{Initiale}}}$$

Équation 13 : Calcul des pourcentages de dégradation.

$$VMJ_{\text{Consommation}} = \frac{\text{Concentration}_{\text{Initiale}} - \text{Concentration}_{\text{Finale}}}{\text{Temps}}$$

Équation 14 : Calcul des vitesses moyennes journalières de consommation.

**Tableau 21 : Récapitulatifs des rendements de dégradation par PCB pour l'expérimentation en sol réel**

	Communauté CJ2				Communauté RH050			
	Biphényle		Tween80		Biphényle		Tween80	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
PCB 28	17,3%	24,7%	-21,4%	10,1%	11,6%	16,4%	0,8%	28,5%
PCB 52	38,9%	1,9%	17,8%	15,8%	20,0%	3,3%	10,0%	18,9%
PCB 101	33,3%	2,9%	15,0%	6,7%	13,0%	5,0%	-1,4%	20,5%
PCB 118	31,1%	8,3%	12,1%	2,2%	7,7%	6,6%	-5,5%	12,4%
PCB 138	31,7%	16,1%	12,5%	13,2%	1,7%	13,8%	-8,8%	8,8%
PCB 153	30,5%	8,9%	13,1%	2,7%	9,9%	11,1%	-5,9%	15,8%
PCB 180	20,4%	8,8%	3,9%	1,6%	-2,8%	10,0%	-18,6%	18,6%
PCB Totaux	28,1%	8,6%	10,2%	2,4%	4,6%	11,0%	-7,8%	17,6%

**Tableau 22 : Récapitulatifs des consommations journalières en  $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  pour l'expérimentation en sol réel**

	Communauté CJ2				Communauté RH050			
	Biphényle		Tween80		Biphényle		Tween80	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
PCB 28	1	1	-1	1	1	1	0	2
PCB 52	10	0	3	4	5	1	3	5
PCB 101	96	8	38	19	38	14	-4	59
PCB 118	12	3	5	1	3	3	-2	5
PCB 138	106	54	50	44	6	46	-29	29
PCB 153	239	69	104	21	78	87	-46	124
PCB 180	110	47	21	8	-15	54	-100	100
PCB Totaux	566	173	218	48	93	220	-157	354

Pour la communauté CJ2, les pourcentages de dégradation en présence de biphényle pour cette modalité varient entre 17 % et 40 %. Le PCB le mieux dégradé est le PCB 52 qui est cependant peu présent dans la contamination. Il ne représente que 1 % de la pollution. La plus grande dégradation journalière est observée pour le PCB 153 qui représente 40 % de la pollution totale. Sur le total des 7 PCB, le pourcentage de dégradation est de 28 % soit une consommation de  $566 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . En présence de Tween80, les pourcentages de dégradation sont compris entre 0 % et 18 %. Les PCB les plus facilement dégradés sont les PCB 52 et 101. La consommation totale de PCB n'est plus que de  $218 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ .

Pour la communauté RH050, les pourcentages de dégradation obtenus avec addition de biphényle varient entre 0 et 20 %. Le PCB le plus facilement dégradé est le PCB 52. Les meilleurs rendements journaliers sont observés pour les PCB 101 et 153. La consommation journalière des 7 PCB n'est que de  $93 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . En présence de Tween 80 les observations faites avec la communauté CJ2 sont confirmées. L'ajout de Tween80 ne semble pas améliorer la dégradation des PCB. Au contraire aucune dégradation n'est mise en évidence.

### II.2.2.2 Discussion

Les résultats obtenus en milieu solide confortent le travail de discrimination des communautés d'intérêt issues de l'environnement. Sur sol artificiel, la communauté ayant le meilleur potentiel est CJ2. GL4 testé en qualité de témoin négatif ne révèle pas de dégradation de PCB. Cela indique que le protocole utilisé n'induit pas de biais abiotique et que les dégradations observées pour les communautés CJ2 et RH050 sont bien le fait des bactéries présentes dans ces microflore. Le fort pourcentage journalier de dégradation du PCB 28 est expliqué par sa concentration relative élevée

On observe que pour la microflore CJ2, les résultats des rendements de dégradation en sol réel sont près de 30 fois supérieurs aux performances observées sur le sol artificiel alors que la concentration initiale n'est que 20 fois supérieure dans le sol réel. On en déduit que les propriétés physico-chimiques du sol sont décisives pour prédire les performances d'un procédé de dégradation. Le sol artificiel choisi selon la littérature est un sol présentant un taux de matière organique très supérieur aux sols naturels, notamment ceux issus d'un environnement industriel. Le caractère hydrophobe des PCB génère une forte affinité de ces molécules pour les composés organiques contenus dans le sol (Sablayrolles, 2004). Ainsi, dans le cadre d'un traitement anaérobie, on peut suggérer que le taux de dégradation des PCB contenus dans le sol serait corrélé négativement au taux de matière organique d'un sol. Cependant, l'ajout d'un tensioactif pour améliorer la biodisponibilité des PCB a un effet inhibiteur sur les rendements des deux communautés testées sur sol réel. Ce point là est donc un point critique dans le raisonnement d'un procédé biologique de traitement des sols contaminés par des PCB.

On note également que durant ces essais, aucune accumulation de PCB tétrachlorés n'a été détecté en présence d'une induction avec du biphényle. Ce phénomène pourtant observé en milieu liquide semble ne pas résister à la complexité d'une contamination réelle à forte concentration. C'est cependant un résultat positif dans l'optique de la mise au point d'un procédé de traitement.

Les résultats en milieu solide ont permis de confirmer le potentiel technologique d'au moins deux microflores collectées dans un milieu aquatique anthropisé. La communauté CJ2 semble être la plus compatible avec la mise au point d'un procédé industriel. Avec un potentiel de dégradation en sol de  $556 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ , elle pourrait en théorie faire passer une concentration en PCB de 200 ppm à 50 ppm en 265 jours, soit un peu moins de 9 mois. Dans les conditions expérimentales testées, l'ajout de tween 80 n'a aucun effet bénéfique par rapport à l'ajout d'un inducteur. La communauté CJ2 est donc sélectionnée pour une expérimentation sur une quantité de sol de 25 kg.

## III TRAITEMENT SEQUENTIEL

### III.1 *Matériels*

#### III.1.1 Réactifs et petits matériels

Le D(+)-glucose monohydraté et le  $\text{KNO}_3$  provient de chez Merk (Darmstadt, Allemagne). Les essais sont conduits dans des seaux de 20 L en polypropylène, isolés de l'atmosphère avec une bâche en polyéthylène. Les piézomètres sont en PVC pression.

#### III.1.2 Sol

Le sol contaminé utilisé provient de l'usine Rio Tinto à Lannemezan (65). Il a été collecté dans une zone de stockage des transformateurs nécessaires au fonctionnement de cette aluminerie. L'échantillon d'environ 50 kg a été prélevé dans la zone la plus polluée par les PCB. Certaines analyses faites par le propriétaire indiquent des concentrations allant jusqu'à  $4000 \text{ mg.kg}^{-1}$  localement. La granulométrie de ce sol est donnée dans le Tableau 23 et le Tableau 24.

**Tableau 23 : Granulométrie du sol total.**

Seuils de coupures	Classes de matériaux	Pourcentage relatif
Fraction > 10 mm	Graviers grossiers + cailloux	30%
Fraction 10 mm - 4 mm	Graviers Moyens	9%
Fraction 4mm - 1,25 mm	Graviers fins	4%
Fraction 1,25 mm - 0,5 mm	Sables grossiers	4%
Fraction 0,5 mm - 0,125 mm	Sables fins	10%
Fraction 0,125 mm - 0,05 mm	Limons	6%
Fraction < 0,05 mm	Fines	38%

La fraction de cailloux et graviers grossiers est de 30 %. La structure granulométrique du prélèvement, issu d'un quartage rigoureux, est tributaire de la présence ou non d'un caillou dont la masse peut-être de plusieurs centaines de grammes par caillou. Pour lever ce biais, les résultats ont été exprimés en ne considérant que les fractions inférieures à 10 mm, ce qui a pour effet d'améliorer la représentativité de l'échantillon. Les résultats granulométriques du sol ne prenant en compte que les fractions inférieures à 10 mm sont présentées Tableau 24. Ses propriétés chimiques sont décrites dans le Tableau 25.

**Tableau 24 : Granulométrie de la fraction inférieure à 4 mm.**

Seuils de coupures	Classes de matériaux	Pourcentage relatif
Fraction 4mm - 1,25 mm	Graviers fins	6%
Fraction 1,25 mm - 0,5 mm	Sables grossiers	6%
Fraction 0,5 mm - 0,125 mm	Sables fins	16%
Fraction 0,125 mm - 0,05 mm	Limons	9%
Fraction < 0,05 mm	Fines	63%

**Tableau 25 : Propriétés physicochimique du sol LAN.**

Paramètre	Valeur
Matière organique (%MS)	5,4
Carbone (indicatif en g/kgMS)	31,3
Azote (NTK) (mg de N/kgMS)	544,0
Phosphore (mg/kgMS)	518,5
Potassium (g/kgMS)	10,7
Calcium (g/kgMS)	0,4

### III.1.3 Microorganismes

La communauté microbienne anaérobie utilisée pour ces essais est celle sélectionnée grâce aux travaux décrits dans le paragraphe précédent portant sur les essais en laboratoire, CJ2. Elle provient du canal de Jonage. Le point de prélèvement est situé en Amont de Lyon (69) et en aval d'une usine de retraitement de déchets contenant des PCB à Saint-Vulbas (01).

## III.2 Méthodes

### III.2.1 Expérimentation

#### III.2.1.1 Mise en place des pilotes

Vingt kilogrammes de sol frais sont disposés dans deux seaux de 20 L où est disposé un piézomètre central. Seize grammes de glucose sont ajoutés au sol. L'expérimentation est nommée LAN2. Dans un autre seau, 4 L d'eau du réseau (commune de Septfonds, 82) sontensemencés avec 200 g de sédiment frais CJ2. Du glucose est ajouté jusqu'à une concentration de 2 g.L<sup>-1</sup>. Du nitrate de potassium (KNO<sub>3</sub>) est ajouté pour obtenir un ratio C/N de 3. Après une incubation de 48 h, 2L de suspension sont ajoutés au seau.

Le seau LAN2 est ennoyé par 8 L d'eau du robinet. L'épaisseur d'eau est d'environ 10 cm au dessus de la surface du sol. Il est ensuite bâché afin de limiter les échanges gazeux avec l'atmosphère.

#### III.2.1.2 Cycle anaérobie/aérobie

Le seau LAN2 est laissé en phase anaérobie pendant 2 mois. Après cette période 5 kg de sol sont prélevés et disposés dans un bac de 5 L nommé LAN2-m. Dans ces bacs, l'aération du sol sera assuré par retournement mécanique afin

de mimer l'effet d'une pelle mécanique en condition de biotertre. Le seau LAN2 est équipé d'un système d'aspersion d'air comprimé. Il est renommé LAN2-a. Cette phase aérobie est mise en place pendant 1 mois. Après cette période, les 2 modalités sont remises en anaérobiose suivant le même procédé que décrit précédemment pour la mise en place du premier cycle ; on ajoute cependant de nouveau du glucose pour atteindre une concentration de  $4 \text{ g.kgMS}^{-1}$ .

### III.2.2 Analyses

La concentration en PCB est déterminée sur les échantillons prélevés à  $t = 0$  jour suivant les méthodologies décrites en annexe III.9. Après 174 jours soit après un cycle complet, la concentration en PCB est de nouveau estimée.

### III.3 Résultats

Les résultats des dosages de PCB pour les modalités LAN2m et LAN2a sont présentés dans la Figure 50.

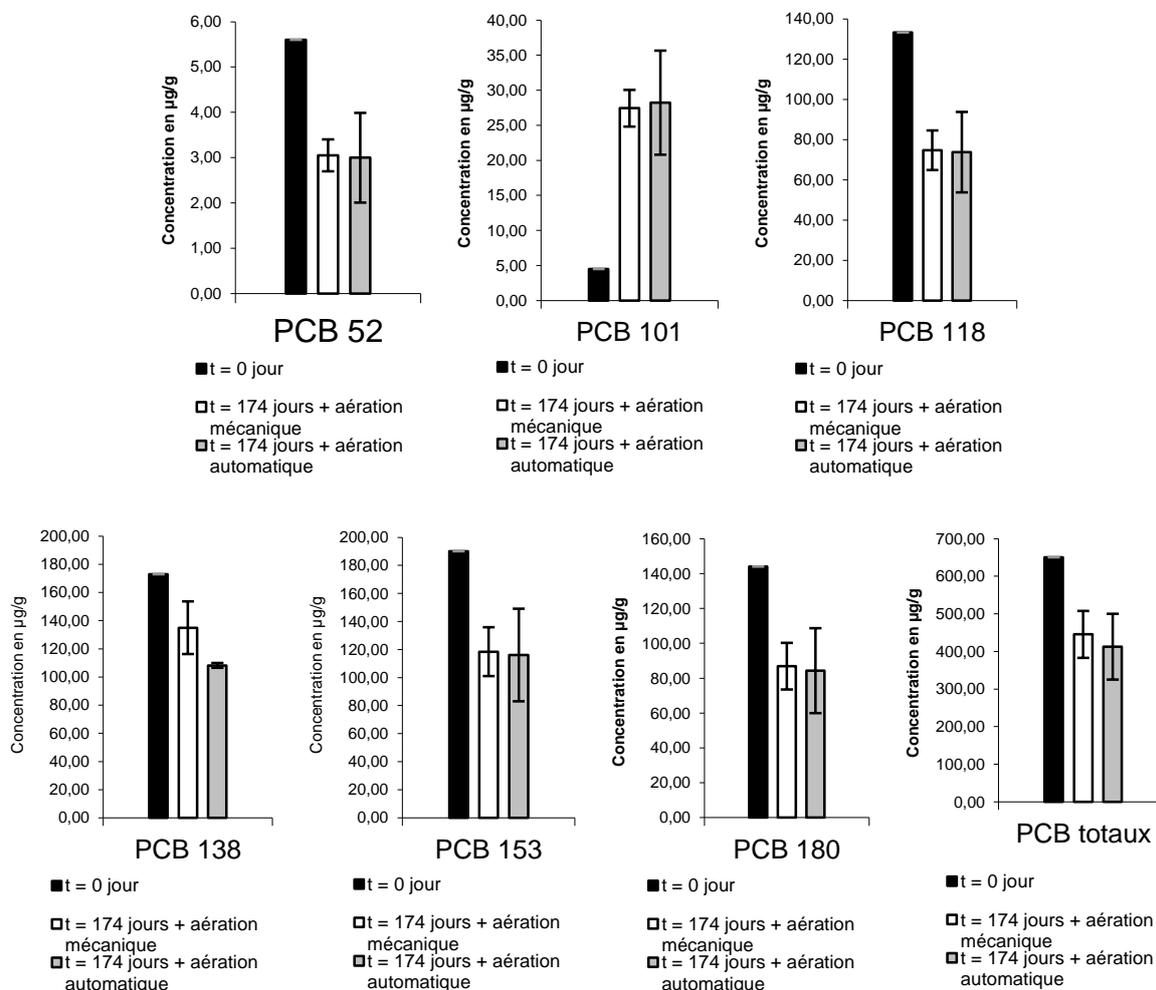


Figure 50 : Concentration des PCB à  $t = 0$  jour et  $t = 174$  jours pour la modalité LAN2m.

Pour la modalité avec aération mécanique, LAN2m, on observe une diminution de la quantité de PCB pour tous les PCB à l'exception du PCB 101 dont la concentration augmente pour atteindre une concentration 5 fois supérieure à sa concentration initiale.

Les résultats sont similaires pour la modalité LAN2a. Une diminution de la quantité de PCB est observée pour tous les PCB à l'exception du PCB 101.

Les rendements de dégradation exprimés en pourcentage et les vitesses journalières moyennes de consommation sont présentés dans le Tableau 26. Ces valeurs sont obtenues grâce aux équations décrites précédemment.

**Tableau 26 : Rendements de dégradation à 174 jours et vitesses moyennes journalières de consommation.**

Amendement	Mode d'aération	PCB	Rendement de dégradation		Vitesse moyenne journalière de consommation en mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	
			Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Glucose	Mécanique	PCB 28	N/A	N/A	N/A	N/A
		PCB 52	46%	6%	0,01	0,00
		PCB 101	-510%	58%	-0,13	0,02
		PCB 118	44%	7%	0,34	0,06
		PCB 138	22%	11%	0,22	0,11
		PCB 153	38%	9%	0,41	0,10
		PCB 180	40%	9%	0,33	0,08
	Bullage	PCB 28	N/A	N/A	N/A	N/A
		PCB 52	46%	18%	0,01	0,01
		PCB 101	-508%	165%	-0,13	0,04
		PCB 118	45%	15%	0,34	0,11
		PCB 138	37%	1%	0,37	0,01
		PCB 153	39%	17%	0,43	0,19
		PCB 180	41%	17%	0,34	0,14

Avec aération mécanique, les rendements de dégradation à 174 jours sont compris entre 46 % pour le PCB 52 et 22 % pour le PCB 138. Pour la somme des 7 PCB, le pourcentage de dégradation est de 31 %. Pour le mode d'aération par aspersion d'air, les rendements de concentration à 174 jours sont compris entre 46 % pour le PCB 52 et 37 % pour le PCB 138. Pour la somme totale, ce taux de dégradation atteint 37 %.

Les résultats des vitesses moyennes journalières de consommation des PCB indiquent que la dégradation touche en premier lieu les 4 PCB les plus chlorés. Ce sont aussi les PCB les plus représentés dans la contamination initiale. Pour la somme totale des PCB, la vitesse de consommation de PCB est de 1,18 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour l'aération mécanique et de 1,37 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour l'aération par insufflation d'air.

### III.4 *Interprétation*

Les résultats de cette expérimentation indiquent que les performances des deux systèmes d'aération sont comparables. La différence de vitesse moyenne journalière est de seulement 190 µg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> en faveur de l'insufflation d'air. On valide également l'efficacité de notre procédé et donc des deux méthodes d'aération pour la dégradation biologique des PCB par la communauté CJ2.

La mesure de la performance de deux techniques différentes d'aération d'un sol dans le cadre d'un procédé biologique de dépollution ne révèle pas d'avantage décisif pour l'une ou l'autre technique. Notre procédé appliqué à plusieurs kilogrammes de sol pollués a de nouveau montré son efficacité. On met ainsi en lumière que l'analyse de cycle de vie doit être utilisée dans une démarche d'éco-conception afin de faire des choix techniques lors de la mise au point d'un procédé.

## IV CONCLUSION

Ce chapitre se proposait de répondre à la question scientifique suivante :

*Quel est le niveau de performance théorique des microorganismes capables de dégrader les PCB par voie anaérobie ? Par traitement séquentiel ?*

On sait que l'absence d'oxygène permet à certaines bactéries de biotransformer des PCB fortement chlorés. Ce phénomène, la déchloration réductive, est complémentaire de la dégradation oxydative. Cependant, ces expérimentations tendent à supposer qu'il existe une possibilité de dégradation anaérobie. En effet, certaines de ces microflore sont capables de dégrader en milieu liquide des PCB issus d'une solution commerciale d'aroclor 1254 en 15 jours sans accumulation de PCB faiblement chlorés ortho-substitués. Ce phénomène et la déchloration réductive agissent probablement de concert en anaérobiose. Les microorganismes agissent d'abord sur le taux d'atomes de chlore. Une fois que le motif biphényle présente deux carbones successifs libres (positions 2,3 ou 3,4) une attaque enzymatique devient possible. Les microorganismes utilisent alors le noyau biphényle devenu accessible comme source de carbone.

Le criblage opéré en milieu liquide a permis de recentrer les travaux sur 2 communautés présentant un potentiel technologique : CJ2F et RH050. La communauté CJ2 est capable de dégrader plus de 500  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  par jour dans le cadre d'un essai de dépollution biologique sur un sol issu d'un environnement fortement impacté par les PCB. A ce titre elle a été sélectionnée pour un essai sur 25 kg de sol mettant en jeu un traitement séquentiel anaérobie/aérobie. Cette expérimentation, si elle a confirmé le potentiel de cette communauté, n'a pas permis de choisir entre deux modes d'aération des sols. Cette question est tranchée à l'aide d'un outil différent de l'expérimentation, l'analyse de cycle de vie.

Ainsi, ce chapitre répond aux questions scientifiques posées. Nous avons obtenu une microflore d'intérêt dont nous connaissons le potentiel technologique.

Cependant, ce potentiel est la seule information qui est connue au sujet de ces microflore. Rien n'est su au sujet de la composition de ces communautés. Or cette connaissance est nécessaire pour mener le plus finement possible un essai de dépollution biologique. Quels sont les microorganismes acteurs de la dépollution, comment améliorer spécifiquement leur croissance ou favoriser leur métabolisme, sont des questions auxquelles il est difficile de répondre sans informations sur l'identité des microorganismes présents. Le chapitre suivant présente le travail d'identification de bactéries qui a été menée sur la communauté CJ2.

# **Chapitre 4 :**

# **Identification de**

# **communautés**

# **microbiennes**

# I INTRODUCTION

L'écologie des milieux anthropisés est un domaine de plus en plus étudié dans le cadre de la dépollution des sols. Connaître la microflore d'un sol est un élément essentiel pour mieux comprendre le fonctionnement d'un scénario de dépollution biologique. La composition de la microflore d'un sol ou d'un essai de dépollution est en interaction étroite avec les propriétés physicochimiques du sol et avec la contamination. Les informations récoltées peuvent permettre un pilotage plus fin de la dépollution. Il est possible de vérifier l'implantation d'une communauté exogène dans le cas d'une bioaugmentation ou le potentiel intrinsèque d'un sol contaminé dans le cas d'une atténuation naturelle contrôlée. Ainsi, le domaine de l'écologie appliquée a fourni un grand nombre de techniques aujourd'hui utilisées sur le terrain.

La biologie moléculaire a bouleversé le domaine de l'écologie en général et en particulier celui de l'écologie des milieux complexes, comme les sols. Jusqu'ici inféodé à la culture et à l'isolement, la microbiologie dispose aujourd'hui d'une puissance d'analyse à la mesure de sa complexité. La génétique a démultiplié les informations récoltables sur une microflore. De plus, les dernières techniques de PCR et de séquençage, permettent une réduction du temps et des coûts d'analyses, démocratisant un peu plus ces outils.

L'utilisation de la biologie moléculaire dans le champ de l'écologie appliquée peut suivre deux approches : i) l'étude des fonctions métaboliques ; ii) l'étude de la composition de la microflore. La première approche a une visée purement technologique et reste soumise à ce qui est déjà su. La deuxième approche, qui a été retenue lors de ce travail de thèse, a un caractère explorateur. Certes il est impossible de faire un lien formel entre la présence d'une bactérie et une réaction métabolique, mais c'est une étape essentielle à une amélioration des connaissances sur les microorganismes qui peut mener au développement de techniques basées sur les fonctions métaboliques plus facilement exploitables sur le chantier.

Ce chapitre présente donc une étude de la microflore de 6 milieux anthropisés sélectionnés lors de cette thèse. L'objectif est de déterminer la composition de ces 6 milieux, puis de chercher les intersections d'intérêt entre les milieux ayant présenté une dégradation de PCB.

## II METHODOLOGIE

### II.1 *Obtention du jeu de données*

#### II.1.1 Echantillons analysés

Six milieux ont été sélectionnés parmi les échantillons produits durant ces 3 années de thèse. Ces communautés ainsi que leur dénomination sont données dans le Tableau 27.

**Tableau 27 : Nom, nature et origine des échantillons analysés.**

Nom	Nature	Informations
CJ2F	Sédiment	Prélevé dans le Canal de Jonage entre 30 et 70 cm de profondeur.
CJ3F	Sédiment	Prélevé dans le Canal de Jonage entre 30 et 70 cm de profondeur.
RH050F	Sédiment	Prélevé dans le Rhône entre 30 et 70 cm de profondeur.
CJ2C	Sédiment	CJ2F mis en condition anaérobie strict et en présence de PCB
RH050SA-T	Sol	Essai de dépollution biologique sur sol Artificiel avec RH050F
CJ2V21	Sol	Essai de dépollution biologique sur sol contaminé issu de l'Environnement avec CJ2F

Les échantillons CJ2F, CJ3F et RH050F sont les 3 milieux dont sont issus les 3 communautés ayant eu les meilleures résultats lors des essais de dépollution en milieu liquide décrits dans le paragraphe I.2.1.1.2 du chapitre 3. De plus, ces trois communautés sont situées sur le continuum fluvial du Rhône à des points stratégiques. CJ3F est le point de prélèvement le plus proche d'une usine de traitement de déchets dangereux de Saint-Vulbas. CJ2F est en aval de CJ3F mais encore en amont de l'agglomération de la ville de Lyon. Enfin, RH050F est encore plus en aval, après la ville de Lyon mais avant celle de Valence. Ainsi, nous pourrions voir si la position du prélèvement à une importance décisive sur la composition de la microflore.

#### II.1.2 Séquençage du gène 16S

##### II.1.2.1 Choix de la zone ciblée

La séquence du gène ADNr 16S est une succession de zones hyperconservées et de zones hypervariables. Les zones hyperconservées servent de supports aux amorces pour l'amplification. C'est l'analyse de la variabilité des régions hypervariables qui permet de discriminer les différentes familles, genres ou espèces. Le gène ADNr 16S possède plusieurs zones éligibles pour la réalisation d'une étude d'identification de microflore. Le choix de la zone du gène ciblée par notre étude doit être un compromis entre les limites introduites par la technologie et les performances intrinsèques de chacune des zones hypervariables. Ainsi, une étude réalisée par Wang et Quian (Wang et Qian, 2009) a précisément étudié ces questions à l'aide de l'outil informatique et de la modélisation. Les régions hypervariables V3 et V6 sont les plus utiles pour l'identification des espèces. Elles sont cependant trop éloignées pour être séquencées lors d'une même manipulation. En revanche, il apparaît que les régions V5 et V6 peuvent être couvertes par une zone d'environ 280 pb. Or ces deux régions permettent selon l'étude de mener une identification.

Grâce à l'amélioration des techniques de pyroséquençage, il est désormais possible de séquencer à haut débit des fragments de plus de 300 pb. Les régions V5 et V6 sont donc compatibles avec les exigences technologiques à condition de disposer de la dernière technologie de pyroséquençage disponible, c'est-à-dire de la technologie 454 GS-FLX Titanium (Rothberg et Leamon, 2008).

### II.1.2.2 Séquençage

L'extraction de l'ADN total, l'amplification des régions V5 et V6 du gène ADNr 16S et le pyroséquençage ont été réalisés par la société DNA Vision (Liège, Belgique). Pour le pyroséquençage, c'est la technologie 454 GS-FLX Titanium de la société Roche Sciences (Branford, Etats-Unis) qui a été utilisée.

Le livrable est un jeu de données au format numérique Standard Flowgram Format (SFF) comprenant un fichier SFF par échantillon. Ce fichier compile les séquences et toutes les informations de qualités sur les lectures optiques ayant permis le séquençage (Roche\_Applied\_Science, 2008). C'est à partir de ce format que commence l'analyse bioinformatique menant à l'identification des microflore des 6 échantillons.

## II.2 *Analyse bioinformatique*

### II.2.1 Moyen de calculs

L'analyse bioinformatique des données issues du séquençage est faite en partenariat avec la Plateforme Bioinformatique de Toulouse (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/index.php/>). Cette plateforme met à disposition des utilisateurs un cluster de calcul. Ce cluster est composé d'un serveur frontal nommé « SNP » permettant l'accès à l'environnement de calcul. L'environnement de calcul proprement dit est composé de 44 nœuds de 4 Go de RAM (Random Access Memory) chacun. La liaison entre le serveur frontal et le cluster de calcul est entièrement gérée par un ordonnanceur qui envoie les différents calculs des différents utilisateurs sur les nœuds de manière optimisée, suivant un principe de « Fair Share », c'est-à-dire, d'utilisation respectueuse d'un espace commun.

Les calculs sont donc lancés depuis le serveur frontal « SNP » sur le cluster par l'ordonnanceur SGE à l'aide de scripts écrits avec le langage SHELL (interpréteur de commande linux). Ces scripts sont composés d'une suite de commandes linux mises à disposition par la Plateforme.

### II.2.2 Outils informatiques

Les lignes de commandes écrites dans les scripts décrits ci-dessus proviennent donc de logiciels installés sur le serveur frontal « SNP ». Il y a aujourd'hui plusieurs outils à la disposition des chercheurs pour mener à bien une analyse bioinformatique de séquences issues du pyroséquençage du gène ADNr 16S. Cependant, chaque logiciel ou suite de logiciels est développé pour un usage bien précis. Or chaque analyse bioinformatique génère des besoins uniques et il est souvent nécessaire de composer avec plusieurs logiciels pour répondre aux exigences de la question scientifique à laquelle il faut répondre. Pour l'analyse des microflore sélectionnées dans cette étude, il a été mis au point un logigramme, pour identifier les besoins et apporter les ressources nécessaires en termes de logiciels. Ce logigramme est présenté dans la Figure 51.

## II.2.2.1 Sélection des résultats

### II.2.2.1.1 Analyse du jeu de données

Pour être sûr que notre jeu de données ait un sens biologique, il faut s'assurer de sa qualité. Lors du protocole de séquençage, plusieurs erreurs peuvent être introduites. Elles aboutissent à des séquences n'ayant pas de sens biologique. Sans tri de ces mauvaises séquences, des erreurs d'interprétation peuvent être faites. L'analyse de qualité du séquençage est effectuée à l'aide de l'application « ReadQualStats » développée par la Plateforme Bioinformatique de Toulouse. Cette application fournit à partir du fichier SFF des informations sur la longueur des séquences et sur la qualité des lectures. Le score de qualité est noté sur une échelle arbitraire allant de 0 pour une faible qualité à 40 pour une très bonne qualité. Le nettoyage des séquences est fait par l'application « Pyrocleaner » toujours développée par la Plateforme Bioinformatique de Toulouse. ([https://mulcyber.toulouse.inra.fr/plugins/mediawiki/index.php?group\\_id=114](https://mulcyber.toulouse.inra.fr/plugins/mediawiki/index.php?group_id=114)). Ce logiciel, sur la base des informations fournies par l'application ReadQualStats, écarte du jeu de données les séquences ne répondant pas aux critères de qualité requis pour la poursuite de l'analyse. Il fournit également les statistiques d'élimination des séquences qui sont de bons outils pour discuter de la qualité du travail de séquençage.

### II.2.2.1.2 Interprétation biologique

Une fois l'analyse de la qualité effectuée, il est acquis que les séquences restantes ont un sens biologique. Un autre type de logiciel prend alors la relève pour mener à l'identification des microflore étudiées. Comme le rappelle le préambule de ce paragraphe, chaque projet nécessite une solution unique.

#### II.2.2.1.2.1 Classification au niveau des familles

La masse de données accumulée est trop importante pour pouvoir interpréter toutes les informations livrées par les séquences. Il est alors primordial de faire un premier tri avec un logiciel adapté aux gros débits de données. Cette étape est faite au niveau hiérarchique de la famille. La suite de logiciels « Ribosomal Database Project » (RDP) (Cole *et al.*, 2007; Cole *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007) est la plus adaptée. Le détail des commandes du script shell utilisé pour cette étape est donné dans l'annexe IV.1.

#### II.2.2.1.2.2 Intersections au niveau des familles

Une fois l'information au niveau des familles récoltées, les intersections sont recherchées par la méthode des diagrammes de Venn. Pour cela, une application Java mise à disposition par l'INRA de Jouy en Josas, est disponible à l'url <http://tomcat.jouy.inra.fr/Venn/showVenn.jsp>. Cette application compare des listes de noms, construit le diagramme de Venn associé et fournit la liste des items dans chaque compartiment du diagramme. Les intersections de familles entre les 3 sédiments frais, entre les 3 échantillons issus de CJ2 et celles entre les 2 essais de dépollution biologique sont déterminées.

#### II.2.2.1.2.3 Intersections des séquences

Après avoir obtenu les informations des intersections au niveau des familles, l'objectif est de mettre en évidence les espèces communes. Pour cela, les communautés sont comparées 2 à 2 à l'aide de la suite d'applications MOTHUR version 1.9.0 (Schloss *et al.*, 2009). MOTHUR dispose en effet d'un ensemble de fonctionnalités permettant de dégager des intersections de séquences. Les communautés comparées sont : CJ2F et CJ3F, CJ2F et RH050F, CJ3F et

RH050F, CJ2F et CJ2C, CJ2F et CJ2V21, CJ2C et CJ2V21, RH050F et RH050\_SAT, CJ2V21 et RH050\_SAT. Le script Shell utilisant les commandes MOTHUR nécessaires à la réalisation de cette étape est détaillé dans l'annexe IV.1.

#### **II.2.2.1.2.4 Identification des séquences sélectionnées**

Les séquences appartenant aux intersections sont connues. Il faut maintenant les identifier. Le logiciel MOTHUR, déjà utilisé pour définir ces séquences, est un logiciel capable d'utiliser une base de données précise à l'espèce tout en étant adapté aux grands débits de données. Le script Shell utilisant les commandes MOTHUR nécessaires à la réalisation de cette étape est détaillé dans l'annexe IV.1. L'identification sera effectuée à l'aide de la base de données taxonomique SILVA version 96 (Pruesse *et al.*, 2007).

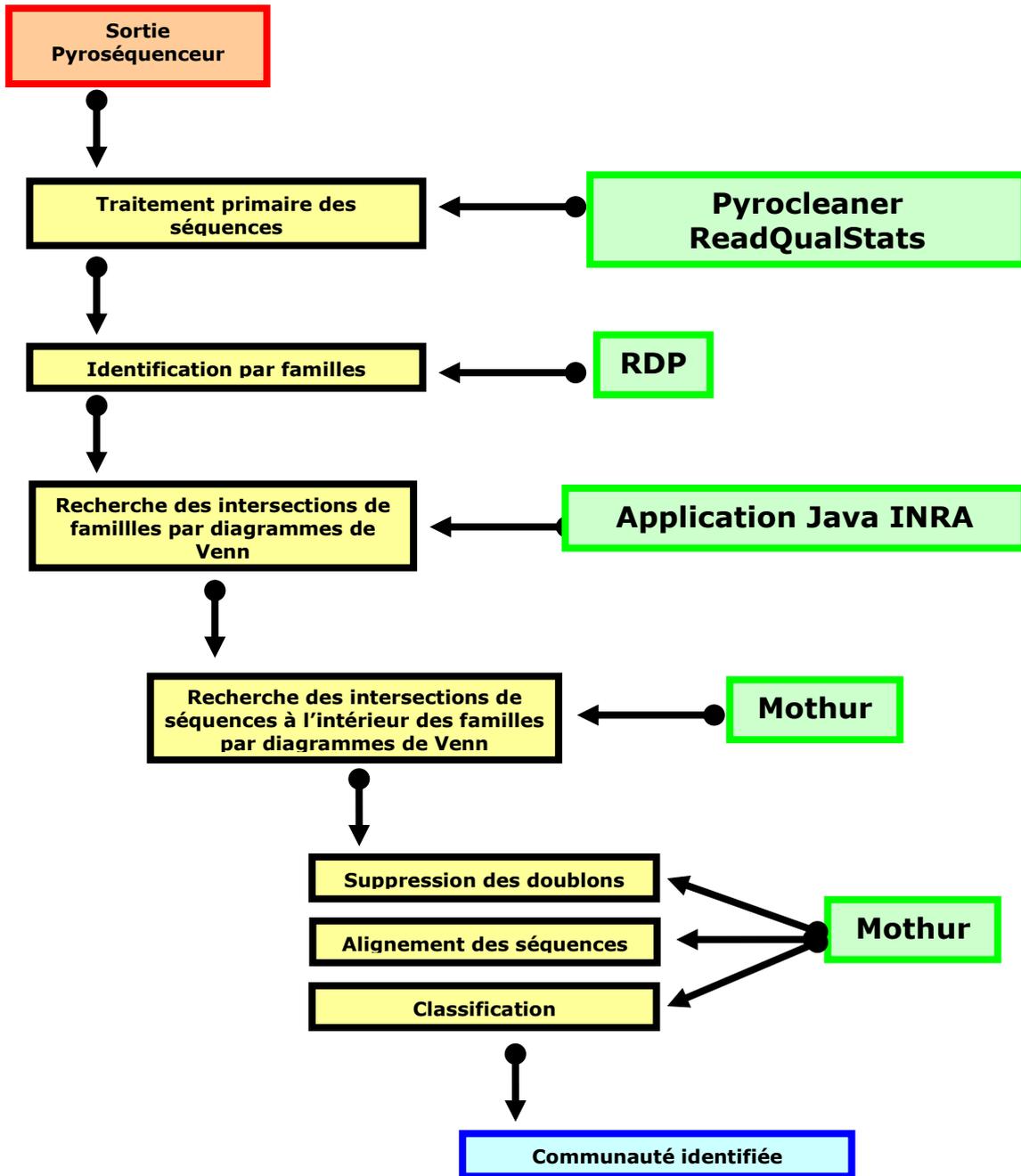


Figure 51 : Logigramme du procédé du traitement des données bioinformatiques.

# III RESULTATS

## III.1 Analyse des données

### III.1.1 ReadQualStats

L'objectif de cette analyse est de vérifier la qualité des lectures issues du séquenceur 454 GS-FLX. Le séquençage se fait par lecture optique d'un signal lumineux émis lors de l'intégration d'une base dans la séquence. La qualité de la lecture est notée par un nombre compris entre 0 et 40 où 40 représente une qualité optimale. La Figure 52 présente les longueurs des séquences obtenues lors du pyroséquençage. La Figure 53 illustre pour chaque lecture la qualité de celles-ci. Ces résultats sont synthétisés dans le Tableau 28.

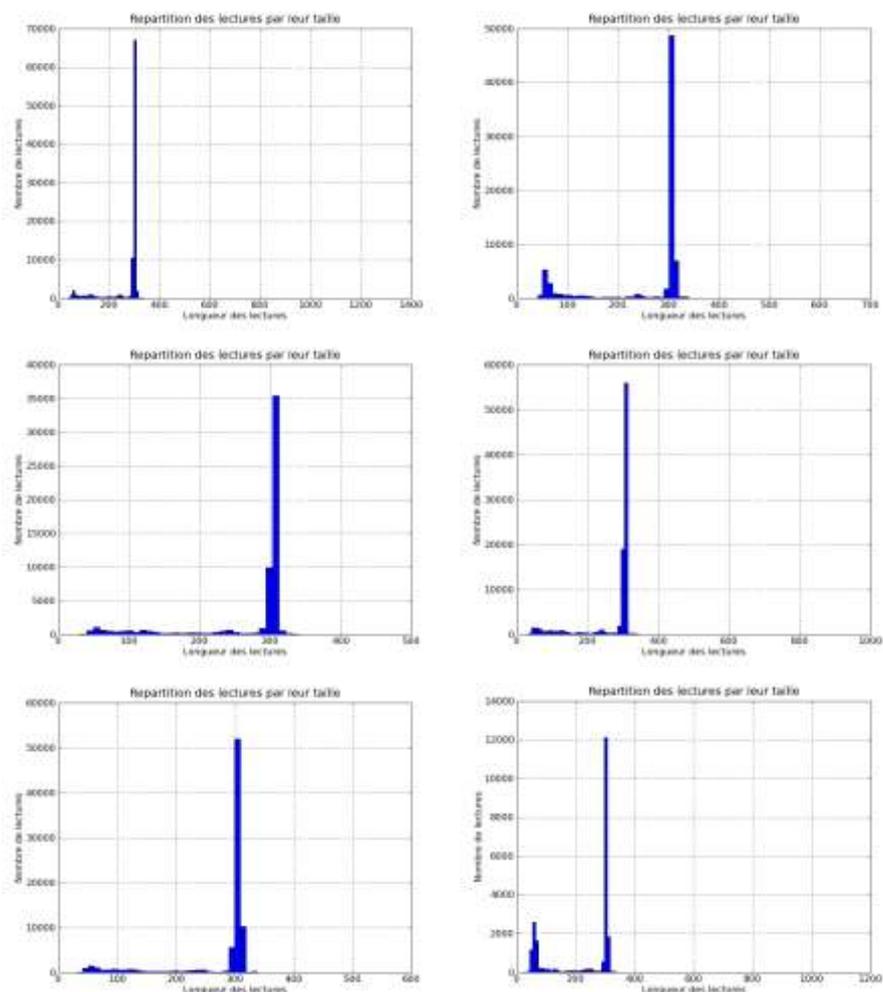
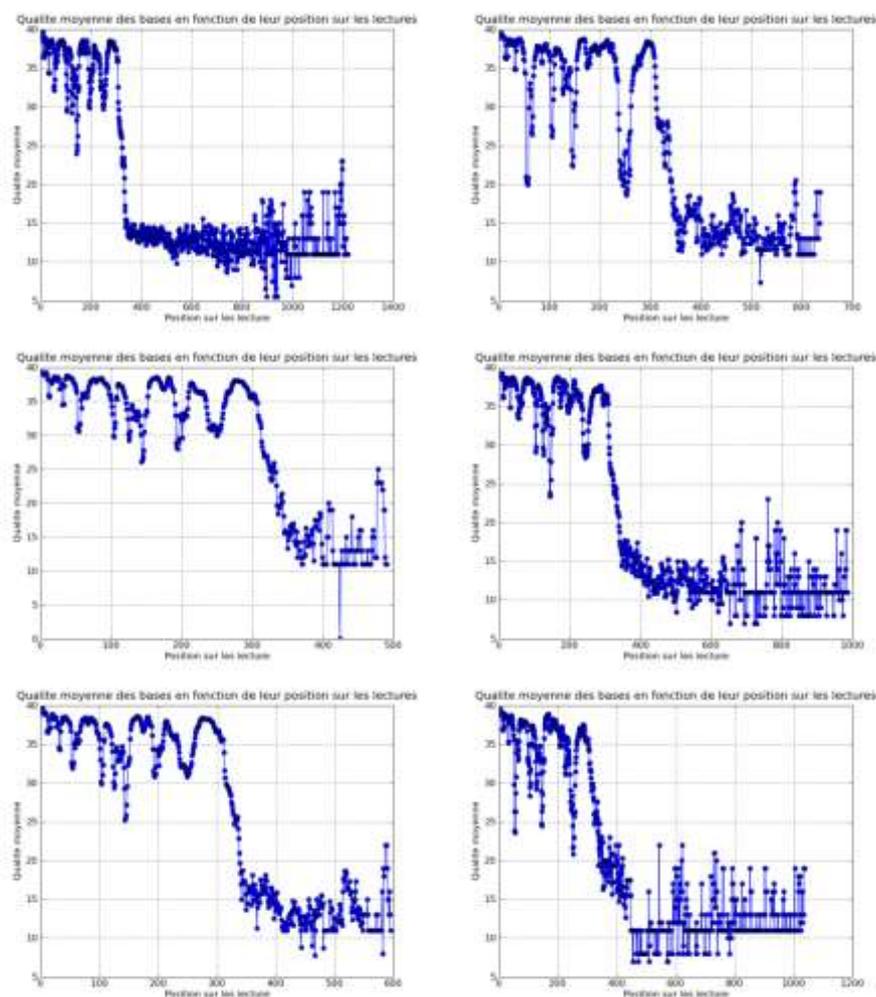


Figure 52 : Histogramme des longueurs des séquences.

On observe que dans les 6 échantillons, la grande majorité des séquences ont une longueur proche de 300 pb qui est la longueur théorique de notre fragment de gène cible.



**Figure 53 : Qualité des lectures.**

On peut noter que, sur les 300 premières positions, la qualité des lectures est très proche de 40. Après la position 300, la qualité du signal se dégrade. Les fragments synthétisés de taille trop faible ou trop importante correspondent à des artefacts issus d'anomalies lors de la PCR. N'ayant aucun sens biologique, elles sont écartées de l'étude par la suite.

**Tableau 28 :Analyse de la qualité des lectures avec ReadQualStats.**

Echantillon	Nombre total de bases	Nombre de séquences	Longueur moyenne (bp)	Qualité moyenne (max = 40)
CJ2F	26 224 741	95 464	274.71	18.73
CJ3F	15 785 041	57 259	275.68	28.46
RH050F	22 688 370	81 753	277.52	26.03
CJ2C	19 872 591	76 147	260.98	24.58
RH050SA-T	5 158 100	22 625	227.98	19.86
CJ2V21	25 777 466	93 808	274.79	19.97

La qualité des lectures est relativement hétérogène entre nos échantillons. Elle est cependant toujours supérieure en moyenne à 18, ce qui nous permet de valider le jeu de données et de poursuivre les analyses. On observe également que le nombre de séquences par échantillon est très variable, allant de seulement 22 625 séquences pour l'échantillon RH050\_SAT, jusqu'à 95 464 séquences pour l'échantillon CJ2F qui est le mieux doté en profondeur d'analyse.

### III.1.2 Pyrocleaner

L'objectif de cette application est d'éliminer les séquences ayant été identifiées comme peu fiables par l'application précédente. Les statistiques d'élimination de séquences sont également un outil de mesure indirect de la qualité du travail d'amplification et de séquençage. Cette étape permet ainsi de produire le jeu de données nettoyé qui va subir l'analyse bioinformatique. Les résultats de cette étape sont présentés dans le Tableau 29

**Tableau 29 : Principaux résultats de l'application Pyrocleaner.**

Echantillon	Nombre de séquences totales	séquences écartées	
		Nombre	Pourcentage
CJ2F	95464	8705	9,1%
CJ3F	57259	5499	9,6%
RH050F	81753	7938	9,7%
CJ2C	76147	11470	15,1%
RH050SA-T	22625	6056	26,8%
CJ2V21	93808	8802	9,4%

La part des séquences écartées est comprise entre 9 % et 27 %. Sur l'échantillon RH050SA-T près d'un quart des séquences a dû être écarté de l'étude en raison de leur faible complexité. Cette faible complexité peut résulter d'erreur lors de la synthèse de fragments qui ont pour conséquence la répétition anormale de certains nucléotides. Les séquences issues de ces fragments n'ont pas de signification biologique. Cet échantillon possède moins de séquences que les autres, au mieux 3 fois moins. Cependant, avec plus de 16 000 séquences le choix a été fait de le conserver dans l'étude.

Le nombre de séquences restantes pour les autres échantillons est satisfaisant et tout à fait compatible avec la poursuite de l'analyse bioinformatique.

## III.2 Traduction biologique

### III.2.1 Richesse taxonomique au niveau des familles

#### III.2.1.1 Sédiments frais (CJ2F, CJ3F et RH050F)

Cette partie a pour objectif de présenter les résultats de l'analyse des séquences par échantillon avec le logiciel RDPclassifier, s'appuyant sur la base de données RDP. Le Tableau 30 présente le résultat de l'extraction de l'information au niveau des familles pour les 30 familles les plus abondantes. Les familles sont classées par abondance décroissante dans les 3 communautés issues de sédiments du Rhône.

**Tableau 30 : Familles de bactéries présentes dans les 3 sédiments frais classées par abondance sur la somme des trois échantillons.**

Familles	CJ2F	CJ3F	RH050F	Somme
Hydrogenophilaceae	8220	8617	2518	19355
Rhodocyclaceae	7872	5113	4826	17811
Xanthomonadaceae	10931	2770	1289	14990
Diapheromeridae	4874	1284	7060	13218
Comamonadaceae	2404	4286	2586	9276
Flexibacteraceae	3211	198	1660	5069
Flavobacteriaceae	95	3355	965	4415
Acetobacteraceae	3353	124	934	4411
Nitrospiraceae	1278	335	1977	3590
Helicobacteraceae	12	541	2675	3228
Cryomorpaceae	653	658	1664	2975
Oxalobacteraceae	212	904	492	1608
Desulfobulbaceae	0	82	1328	1410
Caulobacteraceae	954	77	258	1289
Clostridiales Family XII. Incertae Sedis	0	1097	33	1130
Syntrophaceae	149	49	789	987
Sphingomonadaceae	332	281	195	808
Pseudomonadaceae	7	509	276	792
Desulfobacteraceae	39	74	623	736
Geobacteraceae	58	253	340	651
Paenibacillaceae	440	153	53	646
Clostridiaceae	29	433	145	607
Bradyrhizobiaceae	467	60	47	574
Syntrophomonadaceae	31	37	471	539
Sphingobacteriaceae	353	89	95	537
Syntrophobacteraceae	97	24	316	437
Moraxellaceae	1	387	0	388
Acidobacteriaceae	131	32	211	374
Nitrosomonadaceae	197	37	106	340
Desulfuromonadaceae	0	17	275	292

On remarque que malgré les précautions prises, cette analyse identifie des séquences en dehors du domaine de bactéries. En effet, la famille des *Diapheromeridae* qui la 4<sup>ème</sup> famille la plus abondante appartient à l'embranchement des arthropodes. Ce résultat peut-être dû à la sélectivité des amorces choisies pour amplifier le gène ADNr 16S. RDP est une base de données qui mélange les données sur le gène ADNr 16S et ADNr 18S. Ainsi, les amorces peuvent aboutir à la synthèse de fragment pouvant être interprétés par le traitement bioinformatique comme un fragment du gène ADNr 18S, présent chez les eucaryotes dont les arthropodes.

La famille de bactérie la plus abondante parmi les échantillons issus directement de l'environnement est la famille des *Hydrogenophilaceae*. On observe également la présence en proportion importante de représentants de *Rhodocyclaceae*, *Xanthomonadaceae* ou *Comamonadaceae*.

### III.2.1.2 Sols et sédiments conditionnés

Le Tableau 31 donne les résultats de l'extraction de l'information au niveau des familles pour les 30 familles les plus abondantes dans les échantillons issus des expérimentations faites durant ce travail de thèse. Les familles sont classées par abondance décroissante dans les 3 échantillons.

**Tableau 31 : Familles de bactéries présentes dans les 3 milieux issus des expérimentations classées par abondance sur la somme des trois échantillons.**

Familles	CJ2C	CJ2V21	RH050SA-T	Somme
Sporolactobacillaceae	50756	1	2110	52867
Enterobacteriaceae	5	12303	196	12504
Xanthomonadaceae	1	9877	0	9878
Ruminococcaceae	3272	4030	0	7302
Micromonosporaceae	0	7	6500	6507
Clostridiaceae	656	2628	123	3407
Graciibacteraceae	0	3084	0	3084
Syntrophomonadaceae	6	3035	0	3041
Paenibacillaceae	1	1127	1862	2990
Diapheromeridae	15	2358	120	2493
Caulobacteraceae	0	2456	0	2456
Rhodospirillaceae	0	2123	0	2123
Alicyclobacillaceae	0	0	1445	1445
Methylobacteriaceae	0	0	1287	1287
Lachnospiraceae	4	573	0	577
Peptococcaceae	0	565	0	565
Bacillidae	0	477	3	480
Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	0	453	0	453
Clostridiales Family XIII. Incertae Sedis	0	396	0	396
Acidobacteriaceae	0	394	0	394
Planococcaceae	0	342	26	368
Microbacteriaceae	0	313	0	313
Hyphomicrobiaceae	0	308	2	310
Bifidobacteriaceae	0	0	258	258
Thermoanaerobacteraceae	0	250	0	250
Cellulomonadaceae	0	124	0	124
Veillonellaceae	0	73	0	73
Moraxellaceae	0	71	0	71
Encyrtidae	0	59	0	59
Bacillaceae	0	45	0	45
Clostridiales Family XVIII. Incertae Sedis	0	36	0	36

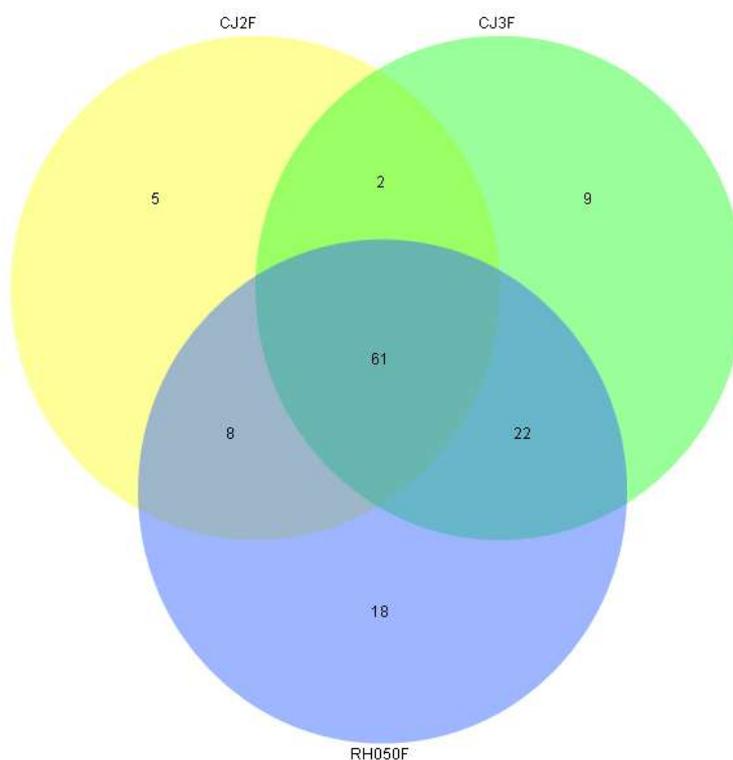
On observe que la composition de la microflore est très hétérogène. L'échantillon CJ2C est essentiellement composé de bactéries issues de la famille des *Sporolactobacillaceae*. La famille la plus abondante dans l'essai de dépollution biologique CJ2V21 est la famille des *Enterobacteriaceae*. Pour l'échantillon RH050\_SAT, qui possède la

profondeur d'analyse la plus faible avec seulement 16 500 séquences analysées, c'est la famille de *Micromonosporaceae* qui est la plus abondante.

## III.2.2 Intersection au niveau des familles

### III.2.2.1 Sédiments frais

La Figure 54 présente sous la forme d'un diagramme de Venn les intersections des familles entre les 3 échantillons issus d'un milieu naturel. Le détail de chacun des compartiments du diagramme est donné dans l'annexe IV.2. L'objectif de cette étape est d'identifier les familles communes à 3 communautés ayant montré un potentiel technologique pour la dégradation biologique des PCB.

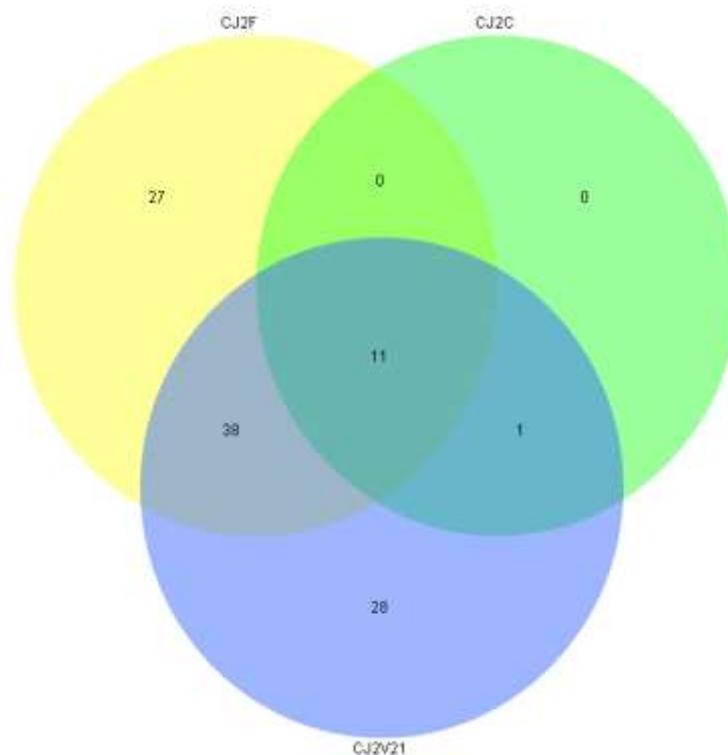


**Figure 54 : Diagramme de Venn pour les sédiments frais.**

On observe une base commune de 61 familles. Parmi ces familles, on retrouve les familles les plus abondantes, comme les *Hydrogenophilaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Xanthomonadaceae* ou *Comamonadaceae*. On note également que la communauté RH050F est celle qui présente le plus de familles particulières avec 18 familles uniquement détectées dans ce milieu.

### III.2.2.2 Communauté CJ2

La Figure 55 présente sous la forme d'un diagramme de Venn les intersections des familles entre les 3 échantillons ayant un lien avec la zone de prélèvement de sédiments CJ2. Le détail de chacun des compartiments du diagramme est donné dans l'annexe IV.2. L'objectif est ici d'identifier les familles communes aux 3 étapes de l'essai de dépollution biologique : sédiment frais (CJ2F), sédiment conditionné (CJ2C) et essai de dépollution en sol réel (CJ2V21).

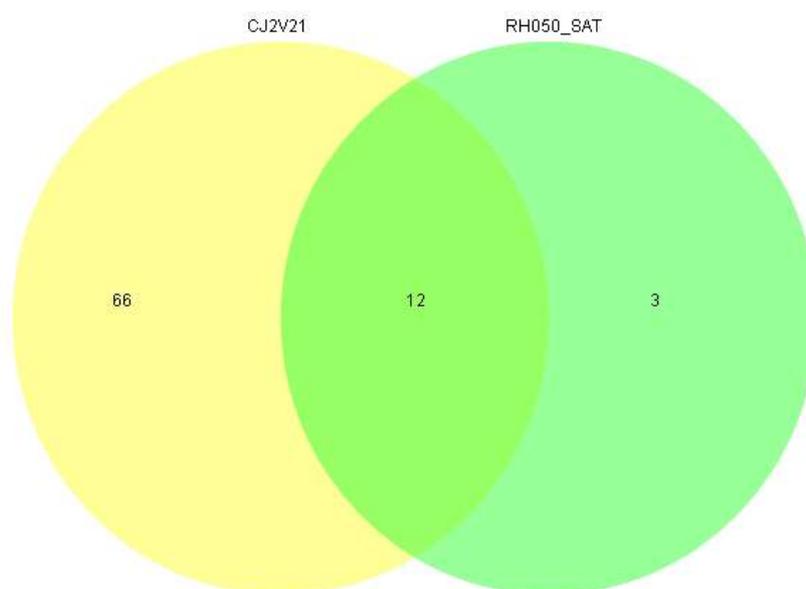


**Figure 55 : Diagramme de Venn pour CJ2F, CJ2C et CJ2V21.**

La recherche des intersections des familles de ces 3 milieux identifie seulement 11 familles communes. Ces familles sont : *Clostridiaceae*, *Comamonadaceae*, *Diapheromeridae*, *Enterobacteriaceae*, *Hydrogenophilaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Ruminococcaceae*, *Sporolactobacillaceae*, *Syntrophomonadaceae* et les *Xanthomonadaceae*. On note que la communauté CJ2C ne présente pas de famille propre.

### III.2.2.3 Essais de dépollution biologique

La Figure 56 présente sous la forme d'un diagramme de Venn les intersections des familles entre les 2 échantillons provenant d'essai de dépollution biologique. Le détail de chacun des compartiments du diagramme est donné dans l'annexe IV.2. L'objectif est de connaître les familles communes à 2 milieux où une dégradation biologique de PCB a été observée.



**Figure 56 : Diagramme de Venn pour les essais de dépollution biologique.**

Il y a 12 familles communes aux essais de dépollution biologique à partir de la communauté CJ2 et à partir de la communauté RH050. On retrouve les familles bactériennes suivantes : *Bacillidae*, *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Sporolactobacillaceae* et *Thermoanaerobacterales*. On note que la communauté CJ2V21 possède une grande part de familles propre.

### III.2.3 Intersection au niveau des séquences

Les résultats de l'identification des séquences présentes à l'intersection de deux échantillons sont présentés dans les annexes IV.3. Le Tableau 32 donne le nombre de séquences communes par couple de communautés.

**Tableau 32 : Nombre de séquences aux intersections analysées.**

Communautés analysées		Nombre de séquences uniques identiques
CJ2F	CJ3F	58
CJ2F	RH050F	89
CJ2F	CJ2C	15
CJ2F	CJ2V21	0
CJ3F	RH050F	34
CJ2C	CJ2V21	0
RH050_SAT	RH050F	0
RH050_SAT	CJ2V21	0

On remarque que la technique utilisée est très sélective. En effet, en travaillant sur les séquences, les intersections sont constituées d'espèces ayant strictement la même séquence avant alignement. Or, deux séquences différentes

peuvent aboutir à l'identification de la même espèce. Les intersections présentées ici sont donc plus petites que les intersections au niveau des espèces. On note que des espèces comme *Thiobacillus denitrificans*, *Azospirillum sp*, *Lysobacter sp* et *Acidovorax delafieldii* sont présentes dans tous les échantillons issus de sédiments frais. Seule *Thiobacillus denitrificans* est présente dans toutes les intersections.

Pour corriger la rigidité de notre méthode, une recherche dirigée d'espèce a été faite dans les 6 échantillons. Pour cela, l'ensemble des communautés a été identifié à l'aide du logiciel MOTHUR, puis les noms de 10 genres abritant des espèces connues pour leur activité sur les PCB (3 en anaérobie, 7 en aérobie), ont été recherchés. Si cette méthode n'est plus exploratrice, elle permet de mettre en évidence des intersections d'espèces d'intérêt entre les différentes communautés. Les résultats de cette recherche sont présentés dans le Tableau 33.

**Tableau 33 : Nombre de séquences par échantillon dont le plus proche parent appartient à un genre abritant des espèces capables de biotransformer des PCB.**

	CJ2F	CJ3F	RH050F	CJ2V21	CJ2C	RH050_SAT
<i>Dehalobacter</i>	1	9	11	395	32	0
<i>Dehalococcoides</i>	33	17	78	4	0	0
<i>Desulfitobacter</i>	1	8	11	94	0	0
<i>Alcaligenes</i>	2	31	5	4	0	0
<i>Sphingomonas</i>	72	167	60	5	0	0
<i>Acinetobacter</i>	6	210	0	12	0	0
<i>Burkholderia</i>	486	870	1112	2	1	2
<i>Comamonas</i>	1316	2210	1155	30	1	2
<i>Rhodococcus</i>	4	2	16	0	0	1
<i>Corynebacterium</i>	0	0	0	4	0	0

On note que les genres *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, *Desulfitobacter*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* sont présents dans toutes les communautés issues directement de l'environnement. Le genre *Dehalobacter* est commun à toutes les communautés à l'exception de CJ2C.

## IV INTERPRETATION

### IV.1 *Composition en famille des microflores*

#### IV.1.1 Familles issues du milieu naturel

La famille la mieux représentée au sein des communautés microbiennes issues de l'environnement est la famille des *Hydrogenophilaceae*. Cette famille comporte seulement deux genres : *Hydrogenophilus* et *Thiobacillus*. Elle est introduite dans le manuel de bactériologie systématique Bergey en 2006 (Validation\_List\_no\_107, 2006). Des membres de cette famille sont couramment détectés dans des études sur la diversité microbienne de sols ou de sédiments. *Thiobacillus* sp. clone EF413894 a été trouvé dans un essai de dépollution biologique in-situ d'un sol contaminé par de l'uranium (Hwang *et al.*, 2009). Une autre espèce non-cultivée a été retrouvée dans une communauté colonisant une membrane d'une usine de traitement d'effluent issu d'une raffinerie de pétrole (Silva *et al.*, 2010). Certains membres de cette famille sont donc susceptibles de s'adapter à un milieu très anthropisé comme un sédiment de rivière pollué ou un essai biologique de dépollution. Cependant, aucune référence faisant état d'un lien entre la famille des *Hydrogenophilaceae* et les PCB n'a été rapportée.

Les *Rhodocyclaceae* sont également régulièrement décrits dans des milieux naturels. Anciennement classée parmi les *Pseudomonadaceae* (Anzai *et al.*, 2000), les membres de cette famille peuvent avoir de propriétés métaboliques d'intérêt. Ainsi, des membres de cette famille ont été étudiés pour leur capacité à dégrader des molécules organiques comme le toluène (Shinoda *et al.*, 2004) ou le 17 $\beta$ -oestradiol (Fahrbach *et al.*, 2006). Certaines espèces sont étudiées pour leur capacité à réduire le perchlorate pour obtenir des ions chlorure (Sun *et al.*, 2009; Thrash *et al.*, ; Wolterink *et al.*, 2005). D'autres bactéries de cette famille, dont certaines du genre *Thauera* sont capables de dégrader des composés aromatiques en condition dénitrifiante. C'est le cas pour des hydrocarbures aromatiques comme le benzoate, le toluène, les phénols ou le phenylacetate (Anders *et al.*, 1995; Song *et al.*, 2001). Des bactéries issues de ce genre ont par ailleurs été décrites dans une communauté capable de déchloration réductive sur des PCB (Bedard *et al.*, 2006). Cette communauté, issue de la rivière Housatonic dans le Massachusetts (EU), a été par ailleurs isolée de son sédiment de départ en vue d'application de dépollution biologique de sols ou sédiments contaminés par des PCB.

Les *Xanthomonadaceae* sont également présent dans des échantillons provenant de l'environnement comme des sédiments de rivière (Jin *et al.*, 2007). Leurs propriétés métaboliques sont également vastes. Cette famille a également recueilli des espèces anciennement classées parmi les *Pseudomonadaceae*. Certaines espèces décrites sont également retrouvées dans des milieux anthropisés, comme un compost (Jin *et al.*, 2007) ou un réacteur de type Upflow Anaerobic Sludge Blanket traitant des effluents de brasserie (Bae *et al.*). Des membres de cette famille ont été identifiés dans un sol contaminé par du pétrole (Chang *et al.*, 2005). Au niveau des propriétés métaboliques sur des polluants aromatiques, certaines *Xanthomonadaceae* sont capables de dégrader des phénols (Jin *et al.*, 2007), du toluène et un large panel d'hydrocarbures toxiques (Palleroni *et al.*, 2004). Enfin, une espèce appartenant à cette famille, *Luteibacter rhizovicina*, a été isolée à partir d'un sol contaminé par des PCB (Leigh *et al.*, 2006). L'étude montre également que cette bactérie est capable de dégrader des PCB en culture isolée.

La famille des *Comamonadaceae* présente également un intérêt technologique. A l'image des familles *Rhodocyclaceae* et *Xanthomonadaceae*, plusieurs de ses membres sont capables de métaboliser certains polluants notamment des PCB. Des membres du genre *Hydrogenophaga* ont été isolés à partir de sols contaminés par des

PCB (Joshi et Walia, 1995; Lambo et Patel, 2006). Ces études montrent par ailleurs que certains isolats classés dans cette famille sont capables de dégrader des PCB à l'aide de la biphényle dioxygénase.

De manière générale, les familles détectées dans les sédiments de rivière sont cohérentes avec leur milieu d'origine. On peut donc conclure que l'analyse bioinformatique donne effectivement des résultats biologiques cohérents.

## IV.1.2 Familles issues des expérimentations

La première remarque à faire lors de l'analyse des familles présentes dans les communautés issues des expérimentations est leur forte hétérogénéité. En effet, la communauté CJ2C est très largement dominée par des membres de la famille des *Sporolactobacillaceae*, la communauté CJ2V21 par les *Enterobacteriaceae* et enfin RH050\_SAT par les *Micromonosporaceae*.

Les *Sporolactobacillaceae* sont des bactéries anaérobies pouvant produire de l'acide lactique. Certaines espèces de cette famille sont retrouvées dans des milieux extrêmes très divers comme des scories volcaniques (Lee et Lee, 2009), un concentrat de saccharose (Justé *et al.*, 2008) ou un marais salant (Tsiamis *et al.*). Cependant, malgré leur apparente capacité d'adaptation à des milieux très différents, cette famille est peu étudiée pour ses capacités métaboliques sur des polluants. Aucune activité sur des PCB n'a été mentionnée.

Les *Enterobacteriaceae*, en revanche, font partie d'une vaste famille présentant des propriétés biologiques très diverses. On les retrouve classiquement dans l'environnement, notamment dans des milieux fortement anthropisés comme des sédiments contaminés par des explosifs de type nitramine et nitroaromatique (Perchet *et al.*, 2008). Des membres de cette famille ont été également impliqués dans la dégradation de polluants organiques notamment de PCB (Adebusoye *et al.*, 2007; Adebusoye *et al.*, 2008; Jia *et al.*, 2008).

Les *Micromonosporaceae* font partie de l'ordre des *Actinomycetales*. A ce titre ce sont des organismes aérobies formant un mycélium vrai. On les retrouve classiquement dans des sols naturels (Ara et Kudo, 2007; Matsumoto *et al.*, 2003). Certaines espèces, notamment appartenant au genre *Micromonospora*, sont capables de dégrader une molécule organochlorée comme Aldrin (Ferguson et Korte, 1977). Cependant aucun lien n'a pu être établi entre cette famille et la dégradation de PCB. On peut également s'interroger sur la prédominance de cette famille dans la communauté RH050\_SAT alors que les conditions de culture sont sensées être anaérobies. L'hypothèse d'une contamination peut être avancée.

## IV.2 Intersections des familles

### IV.2.1 Familles issues du milieu naturel

On note que les 3 sédiments possèdent une majorité de familles communes, ce qui s'explique par la similarité de leur milieu de prélèvement le long du continuum fluvial du Rhône. Parmi ces familles communes, on retrouve d'ailleurs les *Hydrogenophilaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Xanthomonadaceae* et *Comamonadaceae*. Il est à noter que la communauté récoltée le plus au sud, RH050F, est celle qui possède le plus de familles propres. Cette particularité peut s'expliquer notamment par les différences climatiques entre la Drôme (26) et l'Ain (01). De plus, RH050F a été prélevé en aval de la ville de Lyon alors que CJ2F et CJ3F le sont en amont. Ce point peut également expliquer la spécificité de la communauté RH050F.

## IV.2.2 Familles issues des expérimentations avec CJ2

Il n'y a que 11 familles à l'intersection des 3 communautés issues du sédiment CJ2. La modalité CJ2C est un conditionnement de la communauté de départ afin de l'adapter aux conditions de culture et à la présence de PCB. Il est donc logique de réduire le nombre de familles présentes. Le sol Vsl sur lequel a été effectué l'essai de dépollution biologique contenait sa propre microflore native. Ceci explique les 28 familles propres de cette communauté. Parmi ses familles propres, on retrouve notamment la famille des *Corynebacteriaceae* dont le genre *Corynebacteria* présente des capacités métaboliques sur différents polluants intéressantes (Larkin *et al.*, 2006). On note également qu'il n'y a pas de famille propre à la communauté CJ2C. Ceci semble indiquer qu'il n'y a pas eu de contamination importante lors de la manipulation des sédiments frais. Cependant, en analysant la structure de la communauté CJ2C, on peut se demander si le conditionnement très rigoureux subi par la communauté CJ2F est bien judicieux. En effet, ce conditionnement semble sélectionner la famille des *Sporolactobacillaceae* alors que celles-ci est moins bien implantées dans l'essai de dépollution que d'autres espèces adaptées au milieu de culture complexe que représente un sol. Il est toutefois difficile technologiquement de se passer de ce passage en milieu liquide pour multiplier les bactéries avant un ensemencement.

## IV.2.3 Familles issues des essais de dépollution biologique

Les deux essais de dépollution biologique CJ2V21 et RH050\_SAT présentent 12 familles communes. Parmi ses familles on retrouve notamment les *Sporolactobacillaceae* et *Enterobacteriaceae* déjà discutées ici. On trouve également deux autres grandes familles : les *Pseudomonadaceae* et les *Clostridiaceae*.

Les *Pseudomonadaceae* ont longtemps fait office de famille pour ranger les espèces difficiles à classer. Les progrès de la génétique ont permis de réassigner plusieurs genres initialement classés parmi les *Pseudomonadaceae* à de nouvelles familles plus cohérentes. Cependant, cette famille perdure et présente un grand nombre d'espèce d'intérêt technologique. Des isolats classés dans cette famille sont capable de dégrader de nombreux contaminants (Das et Mukherjee, 2007; Fiebich *et al.*, 1995; Perchet *et al.*, 2008) dont les PCB (Nováková *et al.*, 2002; Ohtsubo *et al.*, 2000).

La famille des *Clostridiaceae* est une famille réunissant des bactéries anaérobies. On les retrouve classiquement dans de nombreux milieux anoxiques, dont des milieux anthropisés comme des réacteurs biologiques. A l'image de *Pseudomonadaceae* les possibilités métaboliques des membres de cette famille sont grandes. Il existe par exemple des espèces capables de dégrader des PCB (Hou et Dutta, 2000).

## IV.3 *Intersections des espèces*

### IV.3.1 Recherche exploratrice

Les résultats des intersections au niveau des séquences suivant la démarche exploratrice permet de mettre en évidence peu d'espèces communes. Ces espèces sont communes principalement aux sédiments frais. Parmi celles-ci on note la présence de *Thiobacillus denitrificans*, *Acidovorax delafieldii*, ainsi que d'autres espèces seulement identifier par leur genre, *Azospirillum sp.* et *Lysobacter sp.*

Si rien n'est connu sur la capacité de *Thiobacillus denitrificans* à dégrader les PCB, la particularité de cette bactérie est d'oxyder le soufre inorganique mais aussi de pouvoir réduire les espèces oxydées de l'azote. Ainsi, elle joue

surement un rôle important dans la création des conditions propices à la déchloration réductive des PCB. En effet, en réduisant les nitrates et nitrites en diazote, elles participent à l'appauvrissement du milieu en accepteurs d'électrons, ce qui aurait pour conséquence logique l'augmentation de l'appétence des PCB pour les espèces capables de les utiliser.

Les espèces du genre *Lysobacter* sont classiquement retrouvées dans les sols notamment agricoles (Li *et al.*, 2009). A l'exception de la capacité à consommer les méthyl de bromure ou de chlorure (Madsen, 2006), elles ne sont pas étudiées pour leur capacité à dégrader des polluants organiques.

*Azospirillum* est un genre de bactérie fixatrice d'azote qui colonise la rhizosphère. Certaines bactéries de ce genre ont la particularité de pouvoir synthétiser des enzymes de types laccases (Diamantidis *et al.*, 2000). Or ces enzymes sont connues pour dégrader certains polluants organiques dont les hydroxy-PCB, des métabolites de la dégradation de PCB (Keum et Li, 2004). Cependant aucune liaison n'est établie entre ce genre et la dégradation de PCB.

En revanche, les capacités métaboliques du genre *Acidovorax* dont fait partie *Acidovorax delafieldii* pour la dégradation des PCB ont été étudiées. Ce genre, également extrait des *Pseudomonadaceae*, est très présent dans l'environnement. On le retrouve fréquemment dans des communautés issues de boues de traitement d'eaux usées (Heylen *et al.*, 2008; Schulze *et al.*, 1999). Une étude montre qu'une espèce issue de ce genre possède la biphényle dioxygénase qui permet de dégrader les PCB (Capodicasa *et al.*, 2009; Furukawa et Fujihara, 2008).

### IV.3.2 Recherche dirigée

La recherche dirigée de genres ayant des propriétés connues de dégradation des PCB a permis de mettre en évidence la présence de bon nombre de ces genres dans certaines de nos communautés. Ainsi, on remarque la présence simultanée de genres aérobies et de genres anaérobies ayant une activité enzymatique sur les PCB. Si on s'intéresse à la composition en genres dégradant les PCB de la communauté CJ2V21, on détecte les genres *Burkholderia* et *Comamonas*. On détecte de manière simultanée en proportion plus modeste le genre *Dehalococcoides* très étudié pour ses capacités de déhalogénéisation réductive, notamment sur les PCB. Cette recherche contribue à élargir le faisceau d'indices menant à la formation d'hypothèse sur l'identité des bactéries responsables de la biotransformation des PCB dans les expérimentations présentées dans cette thèse.

## V CONCLUSION

La question scientifique à laquelle se propose de répondre ce chapitre est :

*Comment peut-on améliorer la connaissance des microflores anaérobioses intervenant dans la dégradation des PCB ?*

Ce travail d'analyse bioinformatique prouve que cet outil est une arme supplémentaire pour le microbiologiste face à la grande complexité des systèmes microbiens. Cette étude se proposait d'identifier 6 populations impliquées dans la dégradation biologique des PCB. Elle a révélé la présence de familles de bactéries d'intérêt dans les communautés de départ, comme les *Hydrogenophilaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Xanthomonadaceae* ou *Comamonadaceae*. Sur les essais de dépollution biologique, les structures des microflores sont différentes. Pour CJ2V21, la microflore native du sol introduit des modifications. Pour RH050\_SAT, l'hypothèse a été formulée d'une contamination extérieure à l'expérimentation. Cependant, les intersections des familles, révèlent un certain nombre de familles communes parmi lesquelles se trouvent peut-être les bactéries capables de biotransformer les PCB. Une étude de la présence de certains genres d'intérêt a révélé également que des espèces capables de dégrader des PCB étaient effectivement présentes dans nos communautés.

Il apparaît cependant que cet outil génétique, s'il présente une puissance d'analyse considérable, ne permet pas d'établir de liaison forte entre la présence d'une bactérie et une réaction observée. Ceci est possible uniquement avec les techniques cultures dépendantes. Les conclusions de telles études sont donc toujours un peu fragiles et dépendent de la complexité du faisceau d'indices qui les soutient.

De plus, il a été noté que les bases de données pléthoriques nécessaires à ce genre d'étude sont trop hétérogènes pour pouvoir être mises en perspective avec la rigueur de l'approche biochimique.

# **Chapitre 5 :**

# **Analyses de cycle**

# **de vie**

# I INTRODUCTION

L'analyse de cycle de vie (ACV) est une méthodologie d'évaluation de plus en plus utilisée comme aide à la décision dans de nombreux domaines, dont celui de la réhabilitation de sites et sols pollués. Les critères environnementaux prennent de plus en plus d'importance, aux côtés de critères techniques et économiques, dans les choix technologiques pris lors de la définition d'un plan de gestion de site pollué. Il est donc cohérent, dans un projet de recherche sur la dépollution de sol, de s'intéresser à l'analyse de cycle de vie. Le procédé de mise en place d'un traitement biologique de dépollution d'un sol contaminé par des PCB sélectionné pour cette étude est le biotertre. C'est le procédé polyvalent hors site/sur site le plus classiquement utilisé par les professionnels de la réhabilitation de sites et sols pollués. Il y a plusieurs moyens d'assurer la fourniture en oxygène du biotertre, dont le retournement mécanique et l'aération automatisée par insufflation d'air.

Ainsi, un premier sous-chapitre présente une analyse de cycle de vie comparative entre deux techniques d'aération d'un biotertre : i) retournement mécanique ; ii) insufflation d'air. Elle est construite selon la méthodologie décrite dans notre synthèse bibliographique, c'est-à-dire conformément aux lignes directrices des normes ISO 14040 et ISO 14044. Huit grandes catégories d'impact ont été sélectionnées : i) déplétion des ressources abiotiques ; ii) réchauffement climatique ; iii) déplétion de la couche d'ozone ; iv) toxicité humaine, terrestre et aquatique ; v) oxydation photochimique ; vi) eutrophisation ; vii) acidification ; viii) radiations. Ces catégories couvrent un spectre large d'impacts, elles permettent donc de mesurer les performances environnementales des deux techniques.

Le deuxième sous-chapitre présente une analyse de cycle de vie comparant le procédé de traitement biologique issu des travaux effectués durant cette thèse et la filière de traitement classiquement utilisée pour les sols contaminés par des PCB, l'incinération. Elle reprendra la même méthodologie que celle utilisée dans le premier sous-chapitre. Les catégories d'impacts étudiées seront également conservées.

Ces deux analyses de cycle de vie permettent de déterminer les performances environnementales du procédé de traitement biologique de sols contaminés par des PCB et de les mesurer face à son concurrent sur le terrain, l'incinération. Il est important de noter que ce travail est justifié dans le cas où des travaux de dépollution sont envisagés. Ainsi le scénario « ne rien faire » n'est pas abordé. Il est considéré que cette question est traitée en amont lors du choix du plan de gestion menant à la mise en adéquation du site contaminé avec son usage.

## II PROCESSUS D'AERATION D'UN SOL LORS DU TRAITEMENT BIOLOGIQUE

### II.1 *Définition des objectifs et du champ de l'étude*

#### II.1.1 Objectifs de l'étude

Le procédé de dépollution biologique de sols pollués aux PCB développé dans cette thèse est basé sur une approche séquentielle aérobie/anaérobie. A l'échelle du pilote, il existe deux alternatives pour la méthode d'aération des sols durant la phase aérobie : i) le retournement mécanique ; ii) l'insufflation d'air. L'objectif de l'analyse du cycle de vie développée est de comparer les impacts sur l'environnement de chacune des deux techniques d'aération étudiées. Les résultats de cette étude, confrontés à leurs performances de dégradation, permettent de sélectionner la solution technique la plus performante d'un point de vue environnemental et technique. La solution mise en évidence par cette analyse de cycle de vie sera utilisée pour comparer le traitement biologique des sols pollués par des PCB avec la filière de traitement thermique.

#### II.1.2 Champ de l'étude

##### II.1.2.1 Systèmes comparés

###### *II.1.2.1.1 Aération mécanique par retournement*

La technique d'aération mécanique par retournement s'effectue à l'aide d'une pelleteuse de type cinq tonnes qui retourne le biotertre plusieurs fois pendant la phase de dégradation aérobie. Cette pelleteuse fonctionne au diesel.

###### *II.1.2.1.2 Aération automatique par insufflation d'air*

La technique d'insufflation d'air consiste à injecter de l'air comprimé en continu à l'aide d'un compresseur électrique d'une puissance égale à 11 kilowatts.

##### II.1.2.2 Définition de l'unité fonctionnelle

Les systèmes étudiés ont pour fonction d'aérer le sol pendant la durée nécessaire au traitement de la pollution due aux PCB. Un traitement de sol pollué par des PCB comporte trois cycles. Un cycle comporte deux mois de maintien d'une condition anaérobie et un mois de condition aérobie. Sur un chantier de dépollution, 600 tonnes de sol peuvent être excavées par jour. Les divers résultats seront rapportés au flux de référence de 600 tonnes. L'unité fonctionnelle retenue s'exprime de la façon suivante :

*« Aérer 600 tonnes de sol pollué par des PCB pendant la durée d'un traitement biologique séquentiel anaérobie/aérobie ».*

### II.1.2.3 Frontières du système

Les frontières du système incluent le cycle de vie du Diesel utilisé dans les pelleteuses ainsi que celui de l'électricité utilisée par le compresseur. Ces derniers sont déterminés avec précision et les émissions qui s'y rapportent sont répertoriées dans la base de données Ecoinvent dont les résultats sont issus d'études scientifiques et rassemblés, entre autres, dans le logiciel de calcul d'ACV Simapro version 7 (Frischknecht, 2007a). Les phases de construction du compresseur et de la pelleteuse ne sont pas prises en compte, les horizons temporels à considérer pour la durée de vie de ces matériels étant trop difficiles à évaluer.

Les étapes liées à l'excavation, celles de mise en place et de démantèlement du sol ainsi que les étapes de transports du sol sont strictement identiques. C'est pourquoi elles ne sont pas intégrées dans l'analyse de cycle de vie comparative des deux procédés d'aération du sol. Les frontières des systèmes étudiés sont schématisées dans la Figure 57.

### II.1.2.4 Hypothèses

Les résultats d'une analyse de cycle de vie reposent sur des hypothèses qui permettent de s'affranchir de certaines contraintes. Elles entraînent également des limitations à prendre en compte lors de l'interprétation de l'analyse. Le compresseur et la pelleteuse ne consomment respectivement que de l'électricité et du diesel. Aucun liquide de climatisation, d'huile pour les systèmes hydrauliques, ou de lubrifiants quelconque n'est supposé avoir des impacts significatifs pour pouvoir changer les résultats généraux de l'analyse de cycle de vie. Cette hypothèse est en partie justifiée par un rapport supérieur à 52 entre la quantité de Diesel et la quantité d'huile utilisée pour excaver une quantité donnée de sol (Kellenberger, 2007). Pour appuyer cette hypothèse, il convient également de préciser que les impacts du cycle de vie du Diesel et de l'huile de lubrification sont supposés semblables parce que d'origine fossile. De plus, l'électricité est considérée comme étant issue du réseau basse tension français, tandis que le diesel utilisé dans la pelleteuse est supposé être un diesel désoufré distribué dans un centre de stockage régional européen. Compte tenu des objectifs et des hypothèses, les données reposent sur des moyennes rassemblées dans la base de données Ecoinvent. Quant aux données de chantier, elles sont fournies par les résultats moyennés du pilote et par les estimations moyennes sur les consommations. Enfin, concernant la méthode de calcul d'impacts, c'est CML 2001 qui est utilisée et 13 impacts répartis dans 8 grandes catégories sont évalués. Le détail de ces 13 impacts est donné dans le Tableau 34.

**Tableau 34 : Impacts pris en compte dans l'analyse de cycle de vie.**

Catégorie d'impact		Méthode de calcul
Déplétion des ressources abiotiques		CML 2001
Réchauffement climatique		CML 2001
Déplétion de la couche d'ozone		CML 2001
Toxicité humaine		CML 2001
Ecotoxicité terrestre		CML 2001
Ecotoxicité d'eau douce	Aquatique	CML 2001
	sédiments	CML 2001
Ecotoxicité marine	Aquatique	CML 2001
	sédiments	CML 2001
Oxydation photochimique		CML 2001
Eutrophisation		CML 2001
Acidification		CML 2001
Radiations		CML 2001

## II.2 *Inventaire du Cycle de Vie du procédé*

### II.2.1 Description des étapes du cycle de vie

Le diagramme de flux présentant les procédés comparés ainsi que les principaux intrants et émissions est présenté dans la Figure 57. On compte quatre étapes principales :

- Etape 1 : production d'électricité base tension injectée dans le réseau français (émissions du cycle de vie = émissions dites indirectes)
- Etape 2 : production de diesel désouffré (émissions du cycle de vie = émissions dites indirectes)
- Etape 3 : aération du sol par compresseur (pas d'émissions directes)
- Etape 3 bis : aération du sol par retournement (émissions dues à la combustion du diesel = émissions directes)

N.B. les cycles de vie de production du diesel et de l'électricité ne sont pas détaillés et complet. Ils visent simplement à en montrer les principales étapes. Pour accéder à l'ensemble précis des processus unitaires pris en compte, il convient de se référer aux rapports d'Ecoinvent (Frischknecht, 2007b).

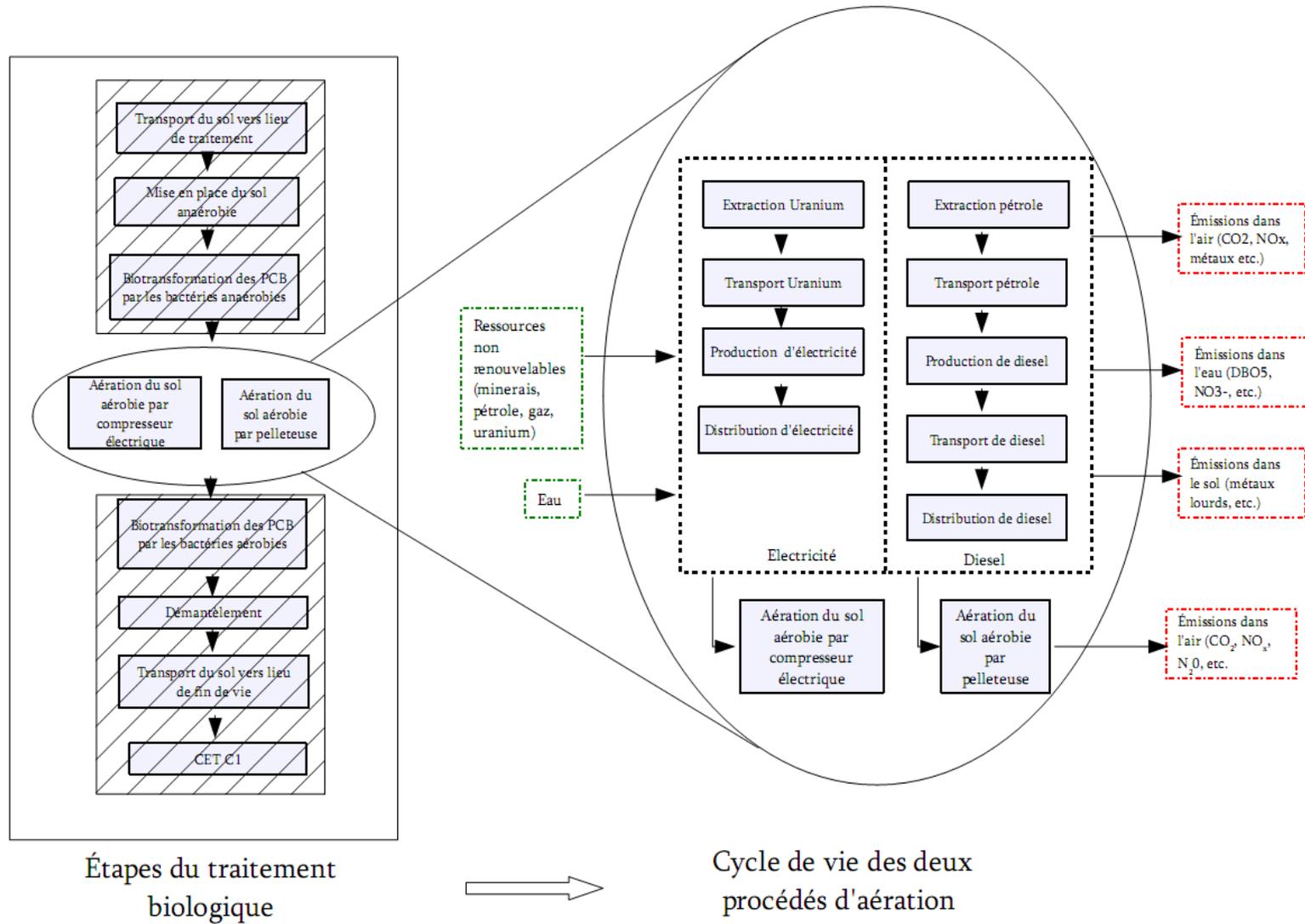


Figure 57: Schéma conceptuel de l'Analyse de cycle de vie de deux techniques d'aération d'un sol.

## II.2.2 Recueil des données

### II.2.2.1 Données d'intrants

L'origine des données pour chacune des étapes est présentée dans le Tableau 35. Les données ont été récoltées auprès du personnel opérationnel de la société VALGO. Elles s'appuient donc sur une longue et solide expérience de terrain. Dans la mesure du possible, les chiffres sont recoupés avec les données « constructeur », notamment pour les valeurs de consommation de diesel ou d'électricité.

**Tableau 35 : Récapitulatif des données brutes nécessaires aux calculs d'ICV.**

Etape	Données	Origine
Aération du sol par pelleteuse	Type de pelleteuse pour l'aération = 5t (exemple Volvo ECR48C)	Valgo (2010)
	Consommation de Diesel de la pelleteuse 5t = 30L pour 200t de sol par jour	Valgo (2010)
	Nombre de retournements pour l'aération mécanique pour 1 cycle = 4	Valgo (2010)
Aération du sol par compresseur	Type de compresseur = souffleuse de puissance électrique 11 kW	Valgo (2010)
	Durée d'utilisation du compresseur = 25% du temps aérobie = 540h	Valgo (2010)

A partir de ces données brutes, les quantités totales de diesel et d'électricité consommées au cours des deux procédés sont calculées. Le Tableau 36 présente ces valeurs.

**Tableau 36 : Quantité d'intrants par unité fonctionnelle (UF).**

Etape	Diesel (kg/UF)	Electricité (kWh/UF)
Aération mécanique	$9,07 \cdot 10^2$	0
Aération automatique	0	$5,9 \cdot 10^3$

### II.2.2.2 Données d'émissions et d'extraction

Après avoir déterminé et rassemblé les intrants de chacun des procédés, les émissions et extractions dans l'environnement qui en découlent sont déterminées. Ces données sont tirées de trois sources différentes rassemblées dans la base de données Ecoinvent. Les émissions et extractions dues à la production et au transport de l'électricité et du diesel sont directement utilisées tandis que les émissions dues au fonctionnement de la pelleteuse sont extrapolées. La pelleteuse évaluée dans la base de données Ecoinvent est une pelleteuse 15 tonnes en moyenne dont les émissions sont rapportées à 1 m<sup>3</sup> de terre excavée. Or les données de terrain récoltées sont exprimées en litre de diesel par tonne de sol mis en place par une pelleteuse de 5 tonnes. L'extrapolation est faite en considérant que les émissions dues au fonctionnement d'une pelleteuse ne sont proportionnelles qu'à la quantité de diesel consommée, indépendamment de la taille de la pelleteuse. L'inventaire des émissions liées à l'aération mécanique est présenté dans le Tableau 37.

Tableau 37 : Inventaire des émissions liées à l'utilisation de pelleteuses.

Substance	Compartiment	Quantité (en kg/kg de diesel)*	Quantité (en kg/unité fonctionnelle)
Diesel	-	1,00	9,07 10 <sup>2</sup>
Ammoniac	air	1,99 10 <sup>-5</sup>	1,81 10 <sup>-2</sup>
Benzo(a)pyrene	air	2,99 10 <sup>-8</sup>	2,71 10 <sup>-5</sup>
Cadmium	air	1,00 10 <sup>-8</sup>	9,07 10 <sup>-6</sup>
Dioxyde de carbone fossile	air	3,11	2,83 10 <sup>3</sup>
Monoxyde de carbone fossile	air	1,14 10 <sup>-2</sup>	1,03 10 <sup>1</sup>
Chrome	air	4,98 10 <sup>-8</sup>	4,52 10 <sup>-5</sup>
Cuivre	air	1,69 10 <sup>-6</sup>	1,54 10 <sup>-3</sup>
Oxyde nitreux	air	1,20 10 <sup>-4</sup>	1,09 10 <sup>-1</sup>
Dioxines, mesurées en tant que 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p- dioxines	air	5,98 10 <sup>-14</sup>	5,43 10 <sup>-11</sup>
Chaleur perdue	air	4,52 10 <sup>1</sup>	4,10 10 <sup>4</sup>
Méthane fossile	air	1,60 10 <sup>-4</sup>	1,45 10 <sup>-1</sup>
Nickel	air	6,97 10 <sup>-8</sup>	6,32 10 <sup>-5</sup>
Oxydes d'azote	air	4,40 10 <sup>-2</sup>	3,10 10 <sup>1</sup>
Composés organiques volatiles non-méthane, origine non spécifiée	air	5,16 10 <sup>-3</sup>	4,68
HAP, hydrocarbures aromatiques polycycliques	air	3,35 10 <sup>-6</sup>	3,04 10 <sup>-3</sup>
Particules, < 2.5 µm	air	4,02 10 <sup>-3</sup>	3,65
Sélénium	air	1,00 10 <sup>-8</sup>	9,07 10 <sup>-6</sup>
Dioxyde de soufre	air	1,01 10 <sup>-3</sup>	9,14 10 <sup>-1</sup>
Zinc	air	1,00 10 <sup>-6</sup>	9,07 10 <sup>-4</sup>
Particules, > 10 µm	air	2,68 10 <sup>-4</sup>	2,43 10 <sup>-1</sup>
Particules, > 2.5 µm, and < 10µm	air	1,79 10 <sup>-4</sup>	1,62 10 <sup>-1</sup>

\*Source: Kellenberger 2007

Les données d'extractions et d'émissions complètes du cycle de vie de la production d'électricité et de la production et du transport de diesel sont disponibles dans les bases de données d'Ecoinvent. Plus d'un millier d'émissions différentes sont prises en compte dans chacun des deux ICV en question.

## II.2.3 Analyse de la qualité des données

L'analyse de la qualité des données permet de déterminer la variabilité des données utilisées. D'après la méthodologie utilisée pour les inventaires de cycle de vie réalisés et rassemblés dans la base de données Ecoinvent, cette analyse comporte deux étapes successives.

i) L'évaluation qualitative des différents paramètres qui constituent la qualité d'une donnée (fiabilité, exhaustivité, corrélation temporelle, corrélation géographique, corrélation technologique, et taille de l'échantillon). Chacun des paramètres reçoit une note allant de 1 à 5. Ainsi, un score de qualité peut être déterminé pour une donnée en additionnant le résultat de chaque paramètre évalué. Plus le score est élevé, moins la qualité de la donnée est bonne. Le Tableau 38 rassemble les différents paramètres de qualité et la signification des notes qui leur correspondent.

ii) L'évaluation quantitative des données s'appuie sur une table de correspondance entre les différentes notes utilisées lors de l'évaluation qualitative et des facteurs d'incertitude. Ces facteurs d'incertitude permettent ensuite de calculer la variance  $V_{95\%}$  (avec un intervalle de confiance de 95%), l'écart-type puis l'incertitude de chacune des données via la formule statistiques suivante (Frischknecht, 2007a) :

$$V_{95\%} = \exp \sqrt{\sum_{n=1}^7 \ln^2 U_n}$$

Où

$U_1$  le facteur d'incertitude pour le paramètre de fiabilité

$U_2$  le facteur d'incertitude pour le paramètre d'exhaustivité

$U_3$  le facteur d'incertitude pour le paramètre de corrélation temporelle

$U_4$  le facteur d'incertitude pour le paramètre de corrélation géographique

$U_5$  le facteur d'incertitude pour le paramètre de corrélation technologique

$U_6$  le facteur d'incertitude pour le paramètre de la taille de l'échantillon

$U_7$  le facteur d'incertitude de base (dépendant des techniques de mesure et des modélisations des émissions).

Tableau 38 : Matrice avec 6 indicateurs de qualité des données récoltées, adapté de Joliet (2005) et de Frischknecht (2007a)

Paramètre	Score de qualité				
	1	2	3	4	5
Fiabilité	Données vérifiées basées sur des mesures ou données qualitatives exactes (exemple: type de camion)	Données vérifiées partiellement basées sur des hypothèses ou données non vérifiées basées sur des mesures	Données vérifiées partiellement basées sur des hypothèses	Estimation qualifiée (ex : Données terrain).	Estimation non qualifiée
Exhaustivité	Données (qualitative ou quantitative) représentatives d'un échantillon suffisant de chantiers de dépollution ex-situ	Données représentatives d'un petit nombre de chantiers de dépollution ex-situ mais pour des périodes adéquates	Données représentatives pour un nombre adéquat de chantiers de dépollution ex-situ mais pour des périodes plus courtes	Données représentatives pour un petit nombre de chantiers de dépollution ex-situ et pour des courtes périodes ou données incomplètes pour un nombre adéquat de périodes et de chantiers de dépollution ex-situ	Représentativité inconnue ou données incomplètes provenant d'un petit nombre de chantiers de dépollution ex-situ et/ou pour des périodes plus courtes
Corrélation temporelle	Moins de 3 ans de différence avec l'année d'étude	Moins de 6 ans de différence	Moins de 10 ans de différence	Moins de 15 ans de différence	Age des données inconnu ou plus de 15 ans de différence
Corrélation géographique	Données de la zone à l'étude	Données moyennes d'une zone plus large dans laquelle la zone à l'étude est incluse	Données d'une zone ayant des conditions similaires		Données d'une zone inconnue ou zone avec des conditions de production très différentes
Corrélation technologique	Données d'entreprises, de processus et de matériaux à l'étude		Données de processus et matériaux à l'étude mais de différentes technologies	Données sur processus ou matériaux relatifs mais de technologies identiques	Données sur processus ou matériaux relatifs mais de technologies différentes
Taille de l'échantillon	> 100 mesures continues	> 20	>10	>= 3	inconnu

Tableau 39 : Facteurs d'incertitude correspondants aux scores de qualité (Joliet, 2005).

Score de qualité	Fiabilité	Exhaustivité	Corrélation temporelle	Corrélation géographique	Corrélation technologique	Taille de l'échantillon
1	1	1	1	1	1	1
2	1,05	1,02	1,03	1,01		1,02
3	1,1	1,05	1,1	1,02	1,2	1,05
4	1,2	1,1	1,2		1,5	1,1
5	1,5	1,2	1,5	1,1	2	1,2

La méthodologie d'analyse de la qualité des données appliquée aux données brutes est détaillée dans le Tableau 52 de l'annexe V.1. Pour les données d'inventaire tirées d'Ecoinvent, la méthodologie d'analyse de la qualité des données utilisée est présentée dans le Tableau 53 de l'annexe V.1. Dans ce dernier cas, c'est la pertinence du choix de l'inventaire dans la base de données qui est évaluée et non les données elles-mêmes. En effet, ces dernières possèdent déjà leurs incertitudes. Néanmoins, dans les calculs ci-après, ces incertitudes ne sont pas considérées. On observe que les scores de qualité sont inférieurs à 15, ce qui permet d'affirmer que la qualité des données est bonne. L'incertitude qui en découle est relativement faible également, inférieure à 50 %.

## II.3 *Analyse des Impacts du Cycle de Vie du procédé*

### II.3.1 Choix de la méthode et des catégories évaluées

Pour le calcul d'impacts, le recours à la méthode CML 2001 (toutes catégories d'impact) V2.04 (d'après la nomenclature du logiciel de calcul d'ACV Simapro version 7) développée par le Centre des Sciences de l'Environnement de l'Université de Leiden (CML) paraît approprié puisqu'elle évalue un grand nombre d'impacts intermédiaires. En outre, elle est issue du guide opérationnel de réalisation d'une analyse de cycle de vie selon les standards ISO 14040 et ISO 14044 (Guinée, 2001). Elle permet ainsi de choisir les impacts les plus pertinents et en accord avec les exigences des normes de management environnemental. Les catégories d'impacts sont retenus (cf Tableau 34) en fonction de leur importance intrinsèque (déplétion des ressources abiotiques, réchauffement climatique, déplétion de la couche d'ozone, toxicité humaine, écotoxicité et eutrophisation) ou de leur particularité à mettre en valeur les différences entre deux sources d'énergies utilisées par deux techniques différentes. Le critère « radiation » rend compte de l'impact de l'énergie nucléaire dans l'offre électrique française, alors que le critère « oxydation photochimique » (formation d'ozone troposphérique provoquant maladie respiratoires) est sensible à la consommation d'énergie fossile carbonée. Ce sont donc en tout 13 impacts différents qui sont retenus. Ils permettront de donner une vue complète des impacts des deux procédés étudiés.

Deux logiciels ont été utilisés pour réaliser les calculs d'impacts : d'une part, Simapro version 7 qui a fourni les différentes bases de données d'Ecoinvent (pour les intrants et les émissions du cycle de vie) et celle de CML 2001 (pour les facteurs d'impacts); d'autre part Excel qui a permis de programmer et de mettre en relation les données d'Ecoinvent et de CML 2001.

### II.3.2 Classification des résultats d'ICV

L'ensemble des données d'extractions et d'émissions est reliée aux différentes catégories d'impact selon leur pouvoir d'action sur lesdites catégories. Le Tableau 57 de l'annexe V.2 présente les associations entre les

substances émises et les catégories d'impact sur lesquelles elles agissent. Ce tableau ne donne que les émissions directes, dues aux activités de dépollution : transport de sol, mise en place, aération. Les émissions indirectes dues au cycle de vie des intrants nécessaires au procédé de dépollution sont trop nombreuses pour être synthétisées ici. Elles sont cependant disponibles dans la base de données Ecoinvent. Ainsi, les catégories d'impact déplétion des ressources abiotiques et radiations ne figurent pas dans la classification qui suit car aucune matière première n'est directement utilisée dans les techniques de dépollution et aucune particule radioactive n'est émise directement. Elles seront cependant évaluées lors du calcul d'impacts.

### **II.3.3 Caractérisation des impacts : résultats**

Les résultats du calcul d'impacts sont présentés de la Figure 58 à la Figure 70. Les incertitudes ne figurent pas sur les graphes mais le paragraphe II.2.3 leur est entièrement consacré.

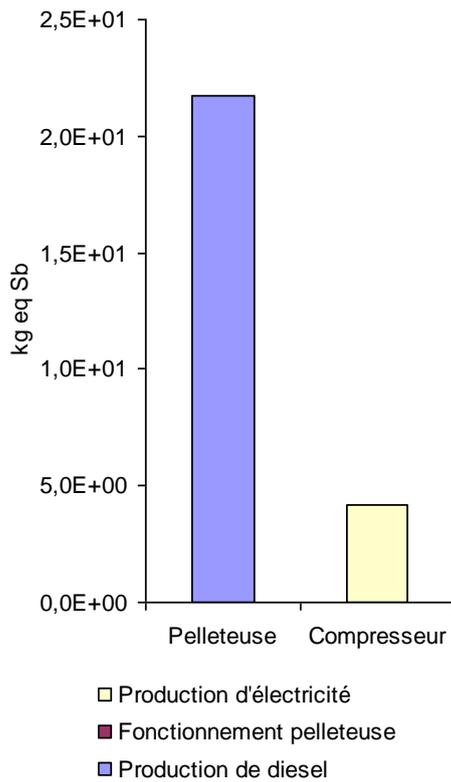


Figure 58 : Déplétion des ressources abiotiques

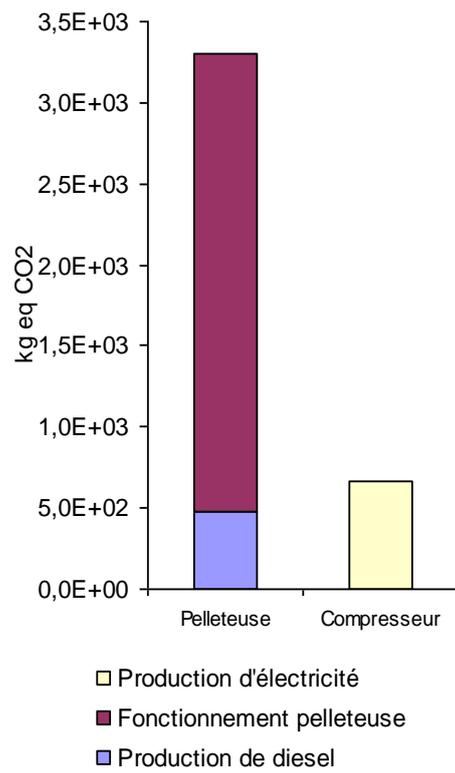


Figure 59 : Réchauffement climatique

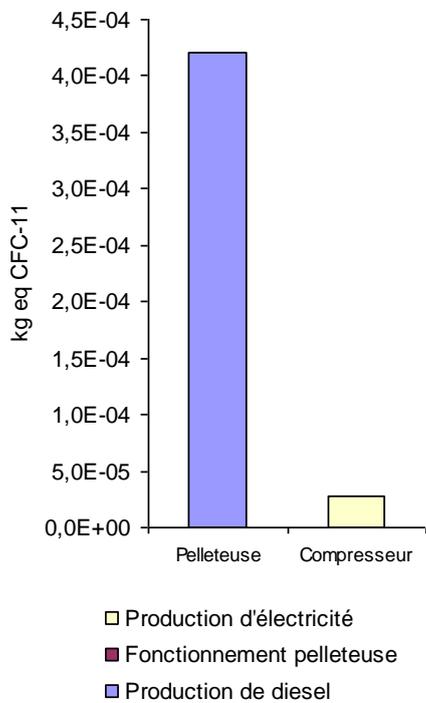


Figure 60 : Déplétion de la couche d'ozone.

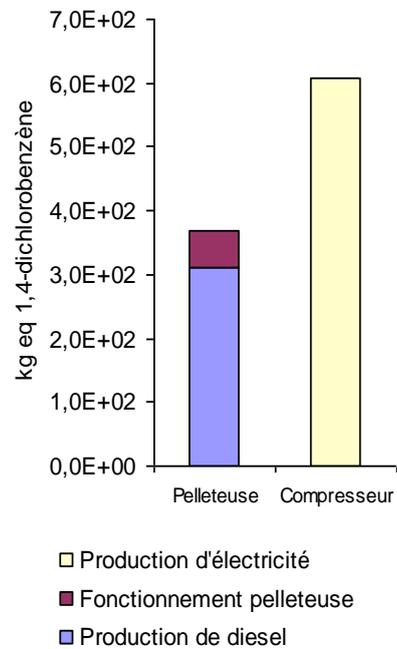


Figure 61 : Toxicité humaine.

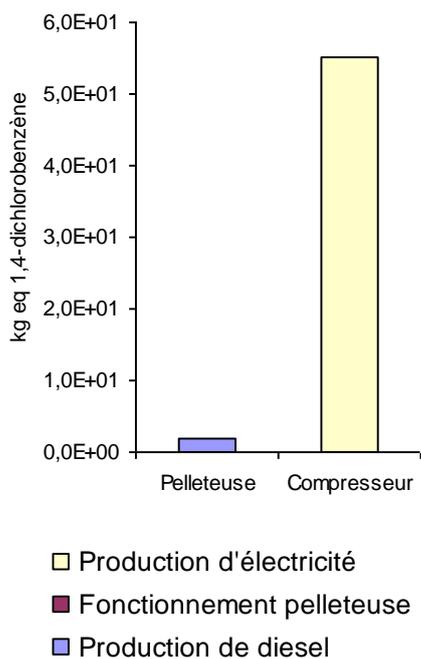


Figure 62 : Ecotoxicité terrestre.

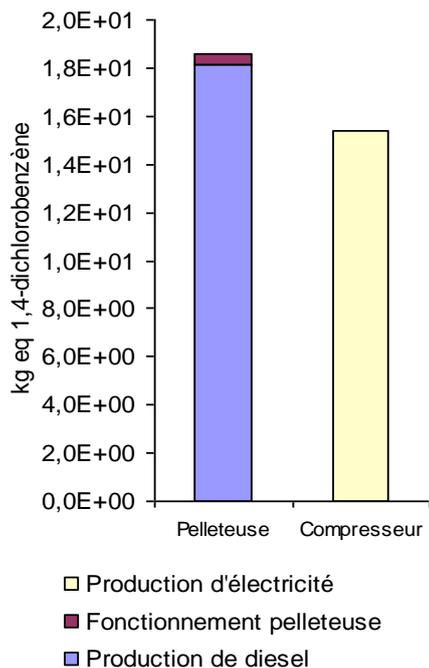


Figure 63 : Ecotoxicité aquatique d'eau douce

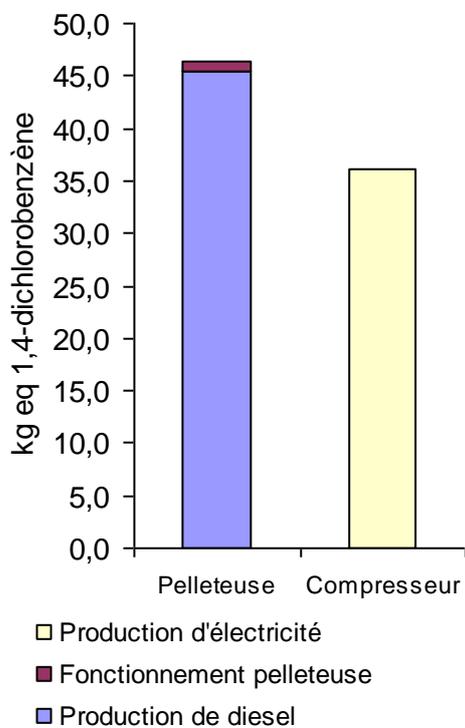


Figure 64 : Ecotoxicité sédimentaire d'eau douce

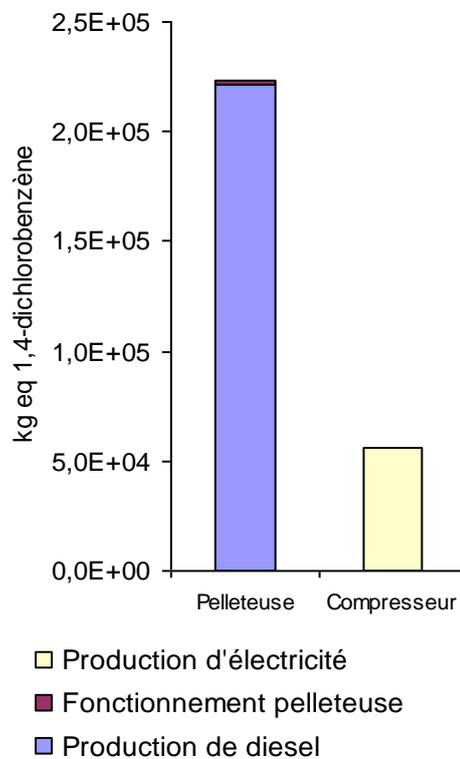


Figure 65 : Ecotoxicité aquatique marine.

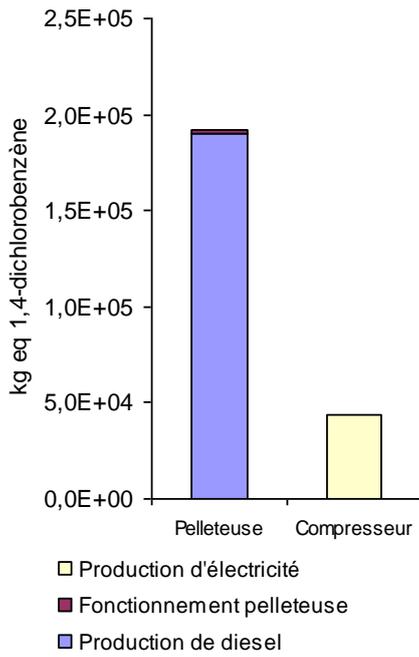


Figure 66 : Ecotoxicité sédimentaire marine

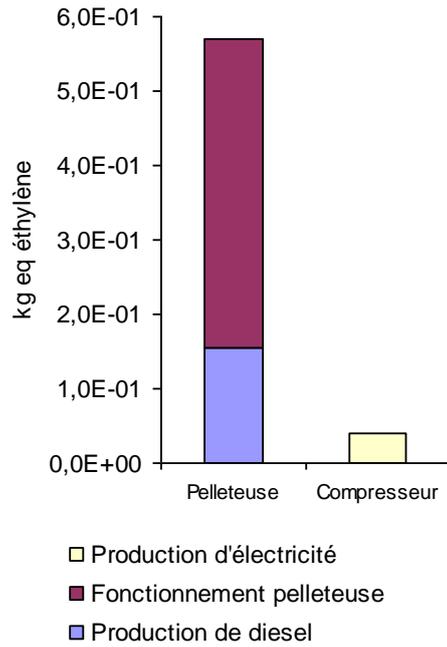


Figure 67 : Oxydation photochimique

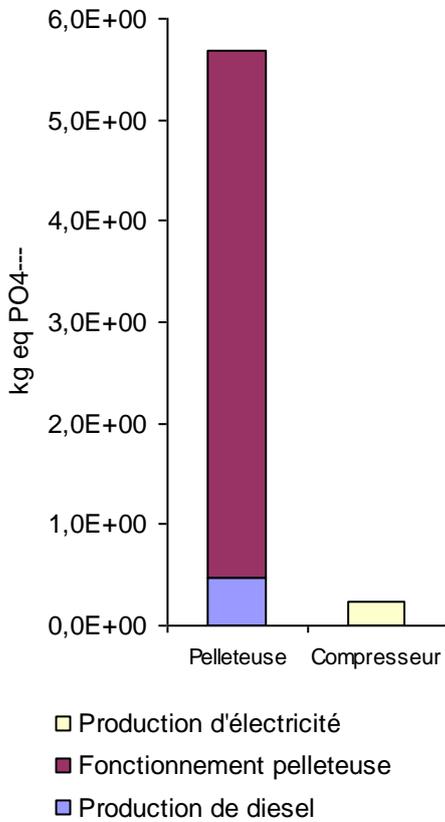


Figure 68 : Eutrophisation

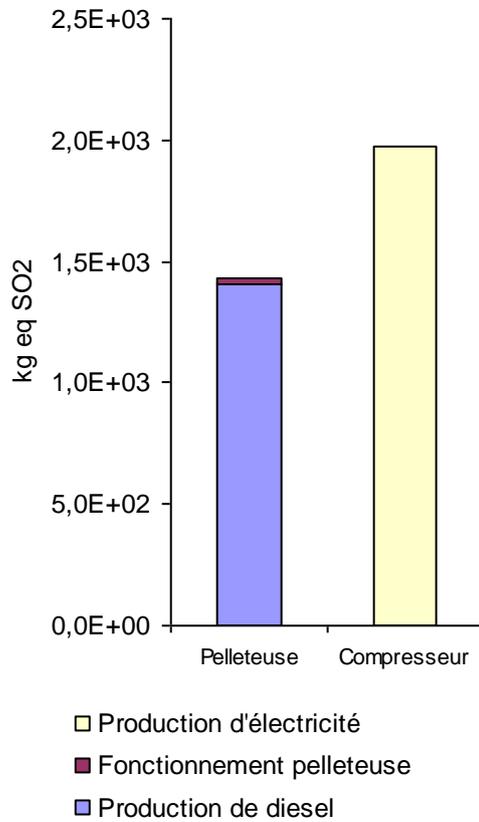
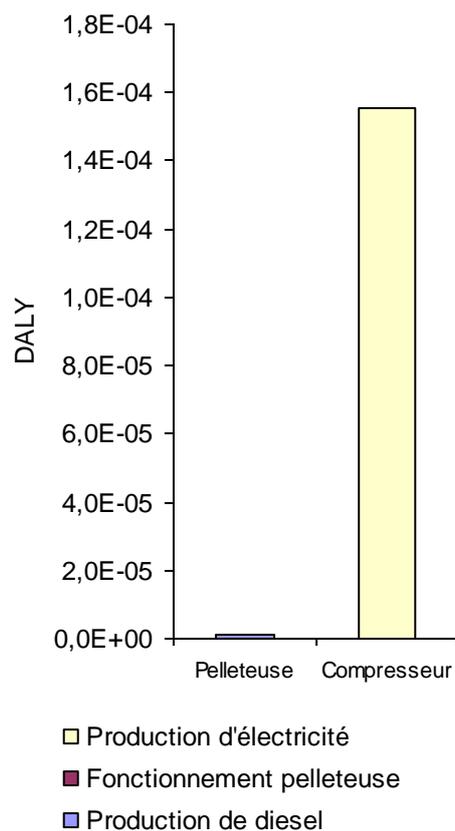


Figure 69 : Acidification



**Figure 70 : Radiations.**

Les résultats mettent en évidence quatre groupes de catégorie d'impact : i) impact très favorable à l'aération par retournement mécanique (RM+++); ii) impact légèrement favorable à l'aération par retournement mécanique (RM+); iii) impact légèrement favorable à l'aération par insufflation d'air (IA+); iv) impact très favorable à l'aération par insufflation d'air (IA+++). Les résultats de cette classification sont donnés dans le Tableau 40.

**Tableau 40 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de cycle de vie par catégorie d'impact.**

Catégorie d'impact	RM+++	RM+	IA+	IA+++
Déplétion des ressources abiotiques				X
Réchauffement climatique				X
Déplétion de la couche d'ozone				X
Toxicité humaine		X		
Ecotoxicité terrestre	X			
Ecotoxicité eau douce - aquatique			X	
Ecotoxicité eau douce - sédiment			X	
Ecotoxicité marine - aquatique				X
Ecotoxicité marine - sédiment				X
Oxydation photochimique				X
Eutrophisation				X
Acidification		X		
Radiations	X			
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>7</b>

On observe qu'il y a une majorité de catégories d'impact qui sont très favorables à l'aération par insufflation d'air. Parmi ces catégories notées IA+++, on trouve notamment 3 catégories importantes : le réchauffement climatique, la déplétion des ressources et la déplétion de la couche d'ozone. On note que 2 catégories sont très favorables au retournement mécanique.

## II.4 *Interprétations*

Les incertitudes relativement faibles permettent de considérer les résultats comme robustes. Ces résultats semblent indiquer que l'aération par insufflation d'air a une meilleure performance technologique qu'une technique d'aération mécanique par pelleuse. Cette conclusion est tirée à partir de résultats non pondérés où chaque catégorie d'impact est supposée avoir la même importance. On observe cependant que pour deux catégories, l'analyse est très favorable au retournement mécanique. La part de l'énergie nucléaire dans l'offre électrique française, si elle a un effet bénéfique pour des catégories d'impacts comme le réchauffement climatique, a un fort effet négatif sur la catégorie radiation. C'est un débat difficile encore très vif dans la sphère publique et scientifique. Ici le choix a été fait de ne pas privilégier un impact plutôt qu'un autre, sans occulter pour autant les impacts corrélés négativement à la conclusion de l'analyse de cycle de vie. Pour la catégorie « toxicité humaine » une analyse plus fine des données indique que 95 % du score obtenu pour la solution par insufflation d'air sont expliqués par les émissions de Chrome VI lors du cycle de vie de la production d'électricité. Cette émission de Chrome VI est également à l'origine du mauvais score de la filière « compresseur » pour la catégorie « acidification ». Il explique à lui seul 99% du score total. Pour le critère « toxicité humaine », l'émission d'arsenic lors du cycle de production de l'électricité représente à elle seule 40 % du score de la filière « compresseur ». Une autre part de 40 % est expliquée par l'émission de cadmium, nickel, dichromate de sodium, chrome VI et de sélénium. Il semble donc que l'émission de métaux lourds lors de la production d'électricité ait une influence particulièrement forte sur le bilan de cette filière.

Pour les catégories très favorables à l'insufflation d'air, le score élevé de la filière « pelleuse » est expliqué à 85 % par le CO<sub>2</sub> émis lors du fonctionnement de la pelleuse. Ce résultat est donc tout à fait logique, au vu de la composition du bouquet énergétique français présentant un faible contenu en équivalent CO<sub>2</sub>. De la même manière, le score de la catégorie « déplétion ressources abiotiques » de la filière « pelleuse » est expliqué à 93 % par le pétrole brut nécessaire à la fabrication du diesel consommé par le moteur de la

pelleteuse. La catégorie « déplétion de la couche d'ozone » est fortement impactée par l'émission de halon 1301 (bromotrifluoromethane) très pernicieux pour la couche d'ozone. Il explique à lui seul 99 % du mauvais score de la filière pelleteuse. Toujours liée à l'utilisation de diesel, la catégorie « eutrophisation » est très influencée par l'émission d'oxydes d'azote (nitrates, nitrites) par la pelleteuse en marche.

Afin de valider ces observations, une étude de sensibilité est menée sur le paramètre le plus incertain d'après l'analyse de la qualité des données : la durée d'utilisation du compresseur (35, 5 % d'incertitude). Pour évaluer l'impact de cette incertitude, il suffit de faire varier la durée d'utilisation du compresseur dans le sens qui lui est défavorable. Une augmentation de 50% de cette durée est appliquée, la faisant passer de 540 h à 810 h de fonctionnement. Le nombre de retournements par pelleteuse est quant à lui maintenu à 12. Le Tableau 41 présente les résultats de l'analyse de sensibilité.

**Tableau 41 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de cycle de vie par catégorie d'impact.**

Catégorie d'impact	RM+++	RM+	IA+	IA+++
Déplétion des ressources abiotiques				X
Réchauffement climatique				X
Déplétion de la couche d'ozone				X
Toxicité humaine	X			
Ecotoxicité terrestre	X			
Ecotoxicité eau douce - aquatique		X		
Ecotoxicité eau douce - sédiment		X		
Ecotoxicité marine - aquatique				X
Ecotoxicité marine - sédiment				X
Oxydation photochimique				X
Eutrophisation				X
Acidification	X			
Radiations	X			
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>7</b>

On observe que la majorité des impacts est toujours très favorables à la solution basée sur l'énergie électrique. Deux catégories qui étaient légèrement favorables au retournement mécanique sont devenues très favorables et deux autres catégories sont passées de légèrement favorables à l'insufflation d'air à légèrement favorables au retournement mécanique. Cette analyse de sensibilité confirme bien la conclusion de l'analyse de cycle de vie et permet même d'estimer la marge d'utilisation de la solution par insufflation d'air.

L'analyse de cycle de vie comparant deux procédés d'aération d'un sol disposé en biotertre en vue de la dégradation biologique de PCB désigne de manière claire l'aération par insufflation d'air comme la solution ayant les meilleures performances environnementales. Il faut cependant garder à l'esprit que la conclusion d'une analyse de cycle de vie peut être sujette à un débat à la fois scientifique et politique. Ainsi les résultats de la catégorie « radiations » renvoient très directement à la question de l'énergie nucléaire dans l'offre énergétique française. Ici le choix a été fait de ne pas pondérer les catégories pour s'affranchir de toute considération autres que scientifique.

# III PROCESSUS DE DEPOLLUTION DE SOLS POLLUES AUX PCB : INCINERATION VS DEPOLLUTION BIOLOGIQUE

## III.1 *Définition des objectifs et du champ de l'étude*

### III.1.1 Objectifs de l'étude

L'analyse de cycle de vie effectuée au paragraphe précédent a permis de sélectionner une technique d'aération pour le procédé biologique de traitement des sols contaminés par les PCB. L'analyse de cycle de vie présentée dans ce nouveau paragraphe compare cette filière biologique avec la filière classique de l'incinération à haute température. Par ailleurs, cette analyse évalue les impacts environnementaux de l'ensemble de la filière biologique et identifie les postes ayant le plus d'impact.

### III.1.2 Champ de l'étude

#### III.1.2.1 **Systemes comparés**

##### *III.1.2.1.1 Incinération*

Le procédé d'incinération est directement inspiré de celui utilisé par l'entreprise Tredi avec son incinérateur agréé pour le traitement des déchets chlorés situé à Saint-Vulbas (01). Le sol pollué est introduit dans un four rotatif. La température peut atteindre jusqu'à 1200°C pour la combustion des gaz afin d'éviter la formation de dioxines et furannes. Ces températures sont atteintes grâce à la combustion d'énergie carbonée fossile. Les PCB sont détruits à plus de 99 %. Les gaz de combustion sont filtrés sur des filtres à charbon actif et traités par un système acide/base. Le mâchefer est envoyé en Centre d'Enfouissement Technique (CET) de classe 1.

##### *III.1.2.1.2 Traitement biologique*

Le traitement biologique de sol pollué par des PCB comporte trois cycles. Un cycle comporte deux mois de maintien d'une condition anaérobie et un mois de condition aérobie. Durant la phase anaérobie, le sol estensemencé avec la communauté microbienne CJ2. Durant la phase aérobie, le sol est aéré par un compresseur. Les résultats présentés dans le chapitre 3 pour la communauté CJ2 sont extrapolés. Neuf mois de traitement permettent de rabattre une concentration initiale de 200 mg.kg<sup>-1</sup> à 50 mg.kg<sup>-1</sup>. A cette concentration le sol est susceptible d'entrer en CET de classe 1. Ainsi les exutoires des deux procédés de traitements utilisés sont identiques.

#### III.1.2.2 **Définition de l'unité fonctionnelle**

Comme pour l'analyse de cycle de vie précédente, l'unité fonctionnelle est définie selon la capacité de traitement journalière sur un chantier de dépollution biologique, c'est-à-dire 600 t de sol. Ainsi, la fonction

principale du système étudié est de diminuer le taux de PCB d'un sol pollué pour qu'il puisse être admissible en CET 1. On en déduit, alors l'unité fonctionnelle :

*« Faire passer la concentration d'un sol pollué par des PCB de 200 mg.kg<sup>-1</sup> à moins de 50 mg.kg<sup>-1</sup>.  
Le flux de référence qui en découle est de 600 tonnes de sol. »*

### III.1.2.3 Frontières du système

Les étapes incluses dans les frontières du système sont schématisées dans la Figure 71 et la Figure 72.

La production du polyéthylène basse densité nécessaire pour la fabrication des bâches, la production et le transport d'électricité utilisée par le compresseur, la production et l'acheminement du gaz naturel utilisé pour l'incinération ainsi que la production et le transport du diesel utilisé dans les différents véhicules et engins sont pris en considération. La phase de traitement et d'acheminement de l'eau du réseau est également prise en compte.

Les phases de construction des infrastructures (plateforme de dépollution biologique, usine d'incinération, véhicules et engins, compresseur) ne sont pas incluses dans les frontières du système. L'incertitude de ces données est trop grande et il est difficile de définir une durée de vie. Les transports de personnel vers leur lieu de travail et les phases d'excavation du sol sont considérés comme équivalents. La règle de coupure permet de s'en affranchir et de les exclure de l'étude comparative (ISO 14044, 2006). Il en est de même pour la phase d'enfouissement en CET1.

### III.1.2.4 Hypothèses

Différentes hypothèses permettent de compléter la précision du champ de l'étude. Le lieu de dépollution biologique se situe à Lacq en Pyrénées Atlantiques (64) et l'incinérateur à Saint-Vulbas dans l'Ain (01). Les centres d'enfouissement technique de catégories 1 correspondants sont situés respectivement à Graulhet dans le Tarn (81) et à Drambon en Côte d'Or (21). Le site pollué à traiter est dans un premier temps supposé se trouver à Lyon dans le Rhône (69). Le CET1 est assimilé à une « boîte noire » n'ayant aucune émission vers l'environnement. Les volumes de sols enfouis sont supposés identiques dans les deux scénarios. Il est important de rappeler que les neuf mois de traitement biologique sont supposés être efficaces et abaisser la concentration en PCB dans le sol sous le seuil réglementaire d'admission en CET 1. En outre, comme les émissions dues à l'activité biologique sont peu connues et non mesurées, il est considéré que les émissions lors des phases de dégradation biologique des PCB se limitent à du dioxyde de carbone et du méthane biogéniques en très petite quantité. Ainsi, ils sont supposés sans impact sur l'environnement. Enfin, il convient de noter que l'eau souterraine directement puisée des réservoirs naturels dans le procédé d'incinération est retournée au milieu sans modification. Les impacts connexes sont donc négligés.

Il a été difficile d'obtenir des données fiables et précises de la part de l'Usine TREDI ainsi que de la part de la DREAL en charge de sa surveillance dans le cadre de la réglementation sur les installations classées pour l'environnement. Les données d'intrants restent donc très sommaires et certaines ont dû être retrouvées à l'aide d'hypothèses fortes.

Les catégories d'impacts sélectionnées sont les mêmes que dans la précédente analyse de cycle de vie (Tableau 34).

## III.2 *Inventaire du Cycle de Vie des procédés*

### III.2.1 Description des étapes du cycle de vie

Le diagramme de flux présentant les procédés comparés ainsi que les principaux intrants et émissions sont présenté dans la Figure 71 et la Figure 72.

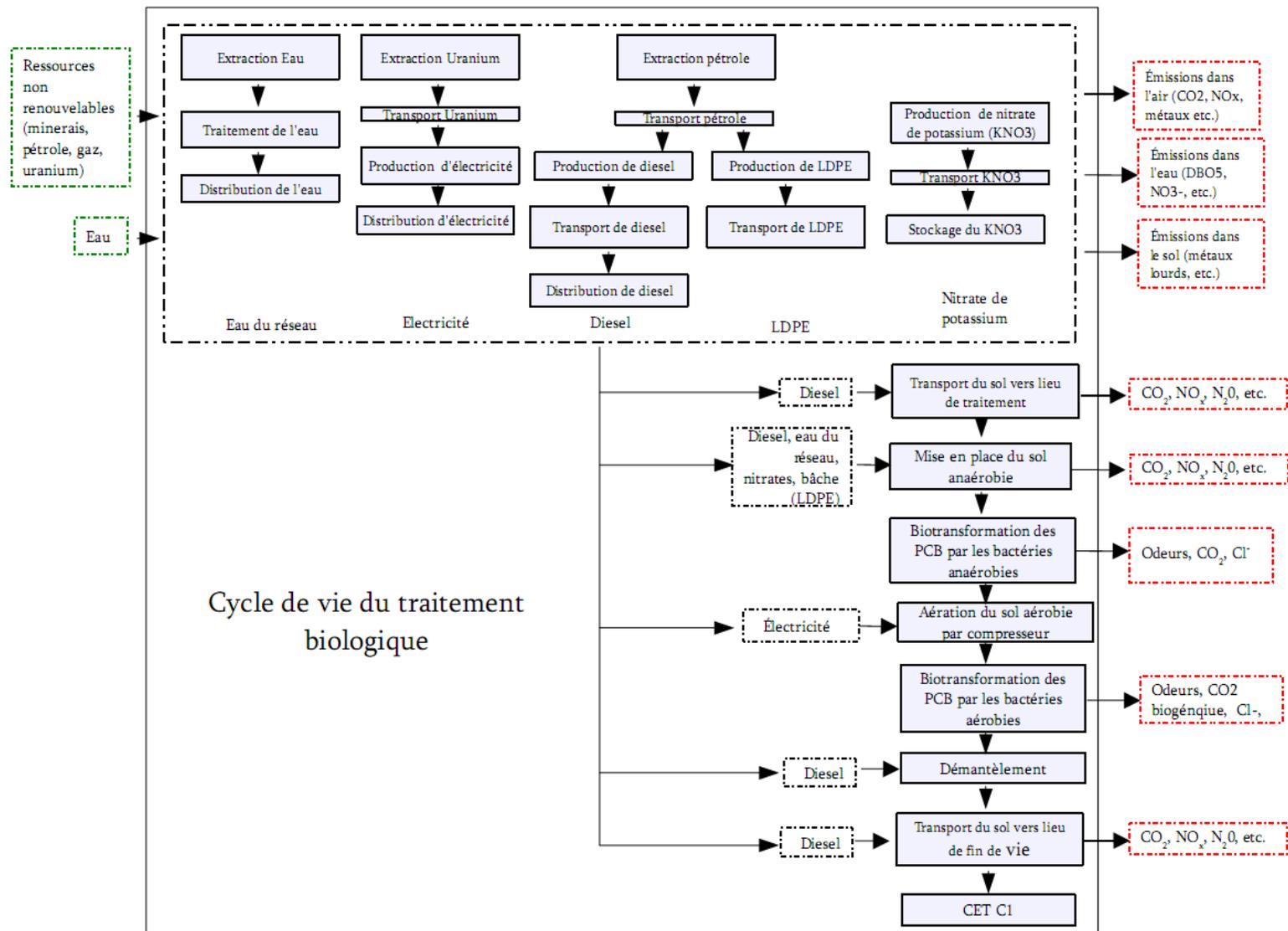
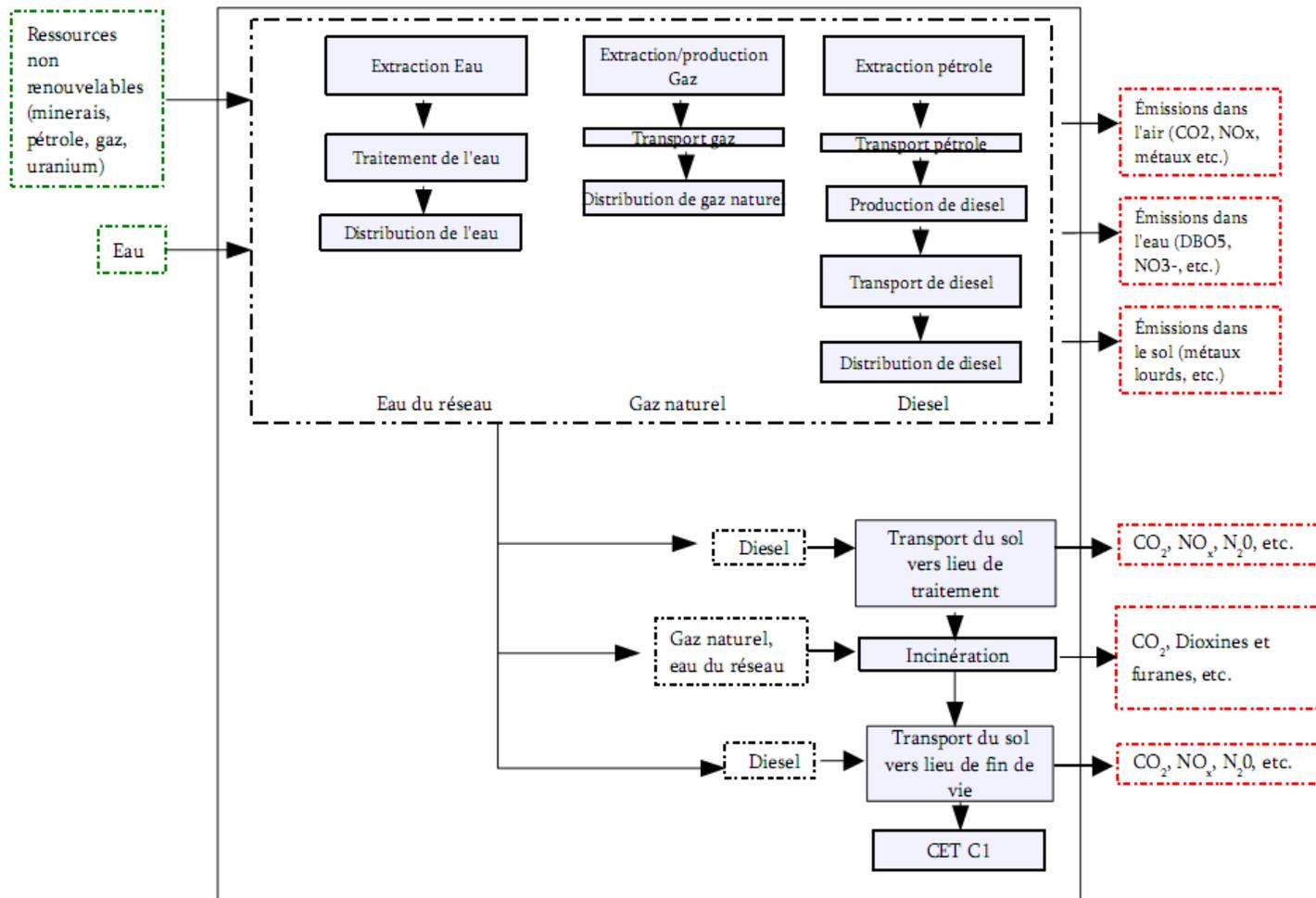


Figure 71 : Schéma conceptuel de l'Analyse de cycle de vie d'un traitement biologique de sol contaminé par des PCB.



### Cycle de vie du traitement thermique

Figure 72 : Schéma conceptuel de l'Analyse de cycle de vie d'un traitement thermique de sol contaminé par des PCB.

## III.2.2 Recueil des données

### III.2.2.1 Données d'intrants

Le Tableau 42 rassemble les données brutes du procédé de traitement biologique nécessaires à la détermination des quantités d'intrants par unité fonctionnelle :

**Tableau 42 : Récapitulatif des données brutes nécessaires aux calculs d'ICV du traitement biologique.**

Étape	Donnée	Origine
Transport sol pollué du site d'excavation vers le site de dépollution biologique	Distance Lyon - Lacq = 450km	Google Map (2010)
	Type de camion benne = 40t (PTRA) (exemple Mercedes Actros 3335 Bi-benne) (15t + 25t charge utile)	Valgo (2010)
Mise en place du sol	Type de pelleteuse pour la mise en place du sol = 20t (exemple Volvo EW180C)	Valgo (2010)
	Consommation de Diesel de la pelleteuse 20t = 80L pour 600t de sol par jour	Valgo (2010)
	Durée de la mise en place du sol = 0,5 jour de mise en place + 0,25 jour de régilage	Valgo (2010)
	Type de bâche = Polyane (polyéthylène basse densité)	Valgo (2010)
	Surface au sol du biotertre = 200 m <sup>2</sup> pour 600t	Valgo (2010)
	Épaisseur de bâche du dessous et bâche du dessus = 3 mm et 1 mm respectivement	Valgo (2010)
	Volume de bâche donc de LDPE = 200m <sup>2</sup> *0,003m + 1,2*200m <sup>2</sup> *0,001m soit 0,84m <sup>3</sup>	Valgo (2010)
	Densité du LPDE = 0,92	
	Quantité d'eau du réseau mélangée au sol = 300L/t	Sangely <i>et al.</i> (2010)
	Quantité d'azote injectée dans le sol = 3g/kg de sol	Sangely <i>et al.</i> (2010)
Aération du sol par compresseur	Type de compresseur = souffleuse de puissance électrique 11 kW	Valgo (2010)
	Durée d'utilisation du compresseur = 25% du temps aérobie = 540h	Sangely <i>et al.</i> (2010)
Démantèlement du sol	Durée du démantèlement par la pelleteuse 20t = 1 jour	Valgo (2010)
Transport du sol dépollué du site de bioremédiation vers le CET 1	Distance Lacq - Graulhet = 290km	Google Map
	Type de camion benne = 40t (PTRA) (exemple Mercedes Actros 3335 Bi-benne) (15t + 25t charge utile)	Valgo (2010)
Généralités	Nombre de cycles de traitement pour une dépollution du sol = 3 soit une durée de 9 mois	Sangely <i>et al.</i> (2010)
	Teneur du sol en PCB avant la dépollution = 200 ppm	Sangely <i>et al.</i> (2010)
	Teneur du sol en PCB après la dépollution < 50ppm	

Les données d'intrants du procédé thermique tel qu'il est conduit à Saint-Vulbas sont peu nombreuses : les déchets dangereux traités, l'eau du réseau et l'eau souterraine. Or le gaz naturel nécessaire à la mise en température du four rotatif est un intrant très important qui contribue à de nombreux impacts. Un calcul appuyé sur quelques hypothèses permet d'estimer cette quantité de gaz à partir des émissions totales de dioxyde de carbone de l'usine qui sont connues de manière fiable. Les différents facteurs nécessaires pour passer du dioxyde de carbone émis au gaz naturel brûlé sont tirés du Guide des facteurs d'émissions de l'ADEME (ADEME, 2007). Ce volume de gaz est obtenu grâce à l'Équation 15 :

$$V_{\text{gnv}} = m_{\text{CO}_2} \cdot I_p / A$$

Où

$V_{\text{gnv}}$  est le volume de gaz naturel supposé être consommé par unité fonctionnelle en m<sup>3</sup>

$m_{\text{CO}_2}$  est la masse de CO<sub>2</sub> émis en kg.UF<sup>-1</sup>

$I_p$  est le pourcentage du CO<sub>2</sub> émis attribué à la combustion de gaz naturel

$A$  est le coefficient de conversion (quantité de CO<sub>2</sub> par m<sup>3</sup> de gaz naturel brûlé)

**Équation 15 : Calcul de l'estimation du volume de gaz naturel de ville utilisé lors de l'incinération.**

Le Tableau 43 rassemble les données brutes du procédé d'incinération nécessaires à la détermination des quantités d'intrants par unité fonctionnelle:

**Tableau 43 : Récapitulatif des données brutes nécessaires aux calculs d'ICV de l'incinération.**

Flux	Donnée	Origine
Intrants	Déchets traités = 39454 t/an	IREP (2008)
	Eau souterraine consommée = 1370000 m <sup>3</sup> /an	IREP (2008)
	Eau du réseau consommée = 72900 m <sup>3</sup> /an	IREP (2008)
	Gaz naturel = 77000 m <sup>3</sup> /unité fonctionnelle	Calculs

A partir de toutes ces données brutes, peuvent être calculés les intrants de matière et d'énergie par unité fonctionnelle. Le Tableau 44 et le Tableau 45, respectivement pour l'incinération et pour la dépollution biologique, synthétisent ces données.

**Tableau 44 : Quantité d'intrants du procédé de traitement biologique (par unité fonctionnelle).**

Étape	Diesel (kg/UF)	Eau (m <sup>3</sup> /UF)	Electricité (kWh/UF)	Polyéthylène basse densité (kg/UF)	Nitrate de potassium (kg/UF)	Quantités transportées (tkm/UF)
Transport du sol pollué par des PCB vers lieu de dépollution biologique	9,56 10 <sup>3</sup>					4,50 10 <sup>5</sup>
Mise en place du sol anaérobie	5,04 10 <sup>1</sup>	1,80 10 <sup>2</sup>		7,73 10 <sup>2</sup>	1,80 10 <sup>3</sup>	
Aération mécanique aérobie 2			5,94 10 <sup>3</sup>			
Démantèlement du matériel temporaire	6,72 10 <sup>1</sup>					
Transport du sol dépollué vers un CET de catégorie 1	4,56 10 <sup>3</sup>					2,14 10 <sup>5</sup>
<b>Total</b>	<b>1,51 10<sup>4</sup></b>	<b>1,80 10<sup>2</sup></b>	<b>5,94 10<sup>3</sup></b>	<b>7,73 10<sup>2</sup></b>	<b>1,80 10<sup>3</sup></b>	<b>6,64 10<sup>5</sup></b>

**Tableau 45 : Quantité d'intrants du procédé d'incinération (par unité fonctionnelle).**

Étape	Diesel	Gaz naturel	Eau du réseau	Tonnes- kilomètres transportées
Transport du sol pollué par des PCB vers lieu d'incinération	5,10 10 <sup>2</sup>			2,40 10 <sup>4</sup>
Incinération du sol pollué par des PCB		7.70 10 <sup>5</sup>	1,11 10 <sup>3</sup>	
Transport du sol incinéré vers un CET de catégorie 1	2,14 10 <sup>3</sup>			1,01 10 <sup>5</sup>
<b>Total</b>	<b>2,65 10<sup>3</sup></b>	<b>7.70 10<sup>5</sup></b>	<b>1,11 10<sup>3</sup></b>	<b>1,25 10<sup>5</sup></b>

### III.2.2.2 Données d'émissions et d'extraction

Les données d'émissions et d'extraction liées aux transports et à la mise en place du sol dans le cadre du procédé biologique sont présentées dans le Tableau 59 et le Tableau 60 de l'annexe V.3. Les données d'émissions et d'extraction liées aux transports et à l'incinération dans le cadre du procédé thermique sont présentées dans le Tableau 61 et le Tableau 62 de l'annexe V.3.

### III.2.3 Analyse de la qualité des données

La méthode d'analyse décrite dans l'analyse de cycle de vie précédente est utilisée pour évaluer la qualité des données de cette analyse de cycle de vie. Les résultats sur les données d'intrants et d'émissions autres que les données standardisées disponibles dans Ecoinvent sont rassemblés dans le Tableau 54, le Tableau 55 et le Tableau 56 de l'annexe V.1.

Les scores de qualité, pour la plupart égaux à 6 (score minimal) sont faibles pour la partie dépollution biologique et la partie données provenant d'Ecoinvent. La qualité de ces données est donc excellente. Néanmoins, l'incertitude de base peut atteindre jusqu'à 33 %. Cette incertitude est en grande partie issue de l'incertitude de mesure et n'entre pas en jeu dans le calcul du score de qualité mais dans le calcul de l'incertitude totale de la donnée considérée. L'incertitude totale sur chaque donnée reste faible et inférieure à 20 % pour la plupart, excepté pour la quantité d'eau du réseau à utiliser pour envoyer le sol et pour la durée d'utilisation du compresseur lors de l'aération (33,3 % d'incertitude). Il est également à noter que les données sur les transports issues de la base de données Ecoinvent sont données avec une incertitude totale de 41,4 %.

Quant aux données sur l'incinération, les scores de qualité sont plus proches de 10 que de 6 et traduisent également une très bonne qualité. En revanche, les incertitudes de base sont plus élevées, particulièrement sur les émissions de métaux lourds (Cadmium, Chrome VI, Cuivre, Mercure, Nickel, Plomb, Zinc) dont les mesures s'accompagnent d'une incertitude estimée à 40 % (Airfobep, 2008). Il en découle des incertitudes totales sur chaque donnée d'émission de métaux lourds comprises entre 40 % et 50 %. Cette incertitude est extrapolée aux autres mesures d'émissions.

Les résultats d'analyse de cycle de vie de la technique de dépollution biologique sont plus fiables que ceux de la technique d'incinération. La comparaison est toutefois possible et pertinente car l'incertitude sur les données de l'incinération restent pour la plupart sous la limite des 50 %. Les résultats d'impacts tiennent compte de ces incertitudes.

## **III.3 *Analyse des Impacts du Cycle de Vie des procédés***

### **III.3.1 Choix de la méthode et des catégories évaluées**

Le choix des catégories d'impacts est motivé par les mêmes considérations que celles de l'analyse de cycle de vie de la partie précédente. Elles sont explicitées au paragraphe II.3.1.

### **III.3.2 Classification des impacts**

Le Tableau 58 de l'annexe V.2 récapitule le lien entre les flux de l'ICV et les catégories d'impact sur lesquelles ils agissent (émissions directes).

### **III.3.3 Caractérisation des impacts : résultats**

Les résultats du calcul d'impact sont présentés de la Figure 73 à la Figure 85. Les incertitudes ne figurent pas sur les graphes mais le paragraphe III.2.3 leur est entièrement consacré.

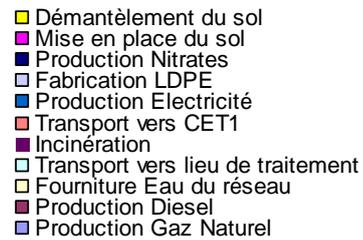
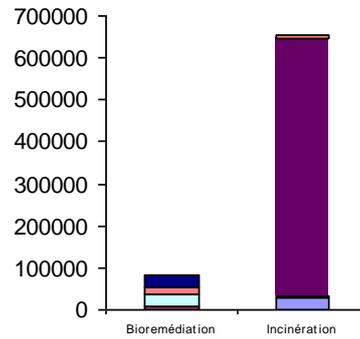
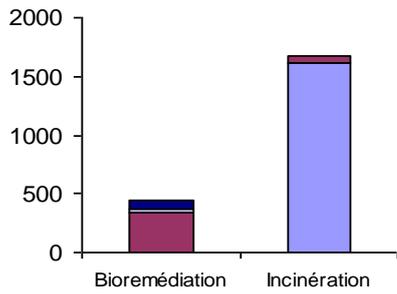


Figure 73 : Déplétion des ressources abiotiques.

Figure 74 : Réchauffement climatique.

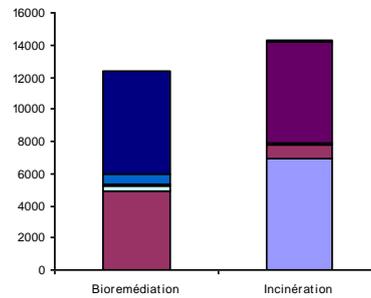
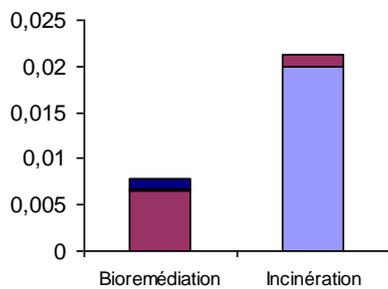


Figure 75 : Déplétion de la couche d'ozone.

Figure 76 : Toxicité humaine.

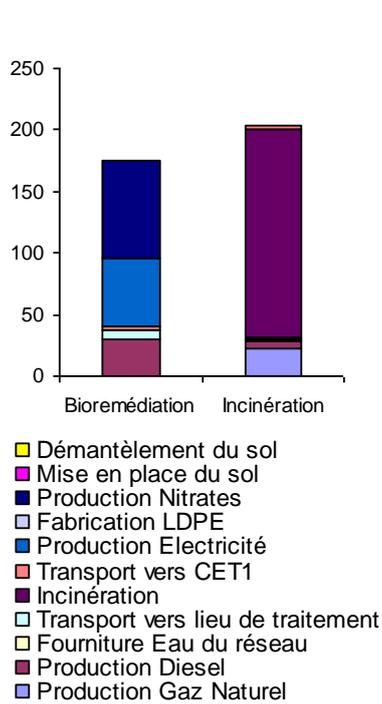


Figure 77 : Ecotoxicité terrestre.

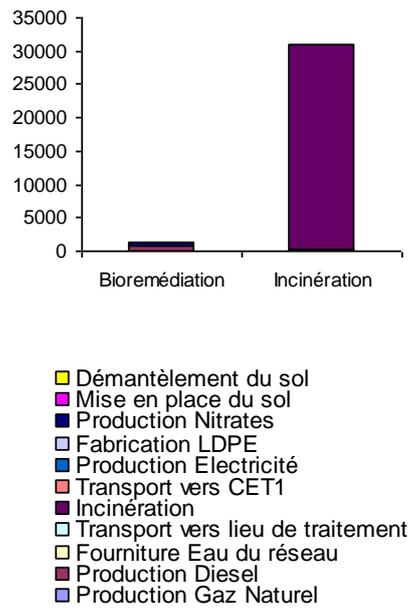


Figure 78 : Ecotoxicité sédimentaire d'eau douce.

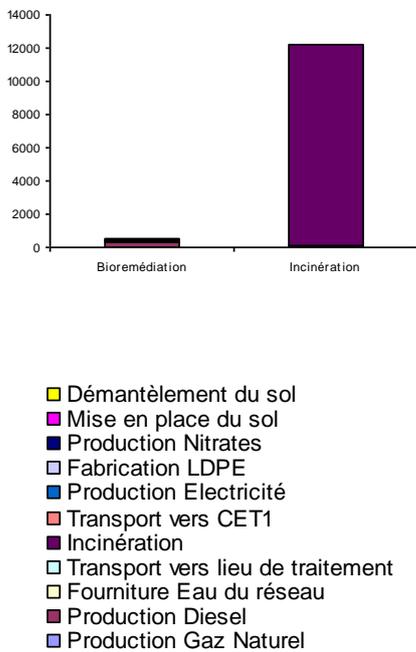


Figure 79 : Ecotoxicité aquatique d'eau douce.

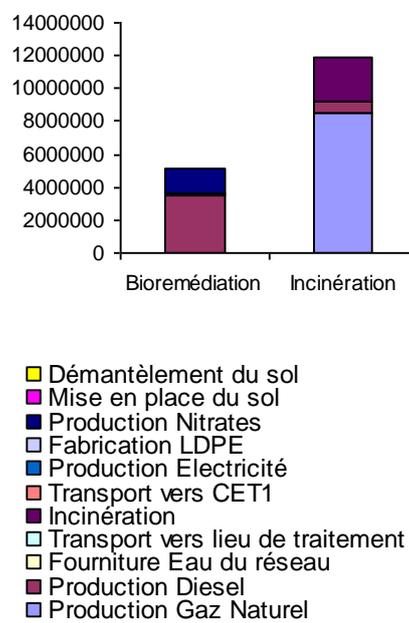
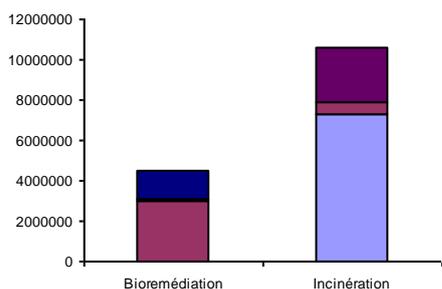
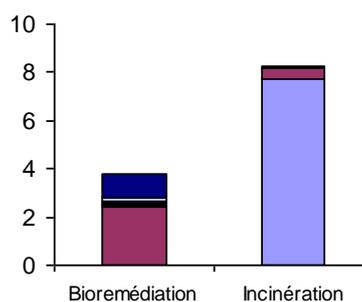


Figure 80 : Ecotoxicité aquatique marine.



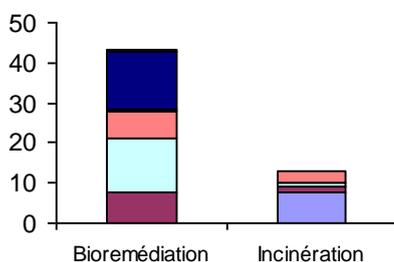
- Démantèlement du sol
- Mise en place du sol
- Production Nitrates
- Fabrication LDPE
- Production Electricité
- Transport vers CET1
- Incinération
- Transport vers lieu de traitement
- Fourniture Eau du réseau
- Production Diesel
- Production Gaz Naturel



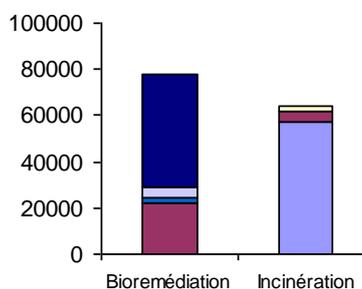
- Démantèlement du sol
- Mise en place du sol
- Production Nitrates
- Fabrication LDPE
- Production Electricité
- Transport vers CET1
- Incinération
- Transport vers lieu de traitement
- Fourniture Eau du réseau
- Production Diesel
- Production Gaz Naturel

Figure 81 : Ecotoxicité sédimentaire marine.

Figure 82 : Oxydation photochimique.



- Démantèlement du sol
- Mise en place du sol
- Production Nitrates
- Fabrication LDPE
- Production Electricité
- Transport vers CET1
- Incinération
- Transport vers lieu de traitement
- Fourniture Eau du réseau
- Production Diesel
- Production Gaz Naturel



- Démantèlement du sol
- Mise en place du sol
- Production Nitrates
- Fabrication LDPE
- Production Electricité
- Transport vers CET1
- Incinération
- Transport vers lieu de traitement
- Fourniture Eau du réseau
- Production Diesel
- Production Gaz Naturel

Figure 83 : Eutrophisation.

Figure 84 : Acidification.

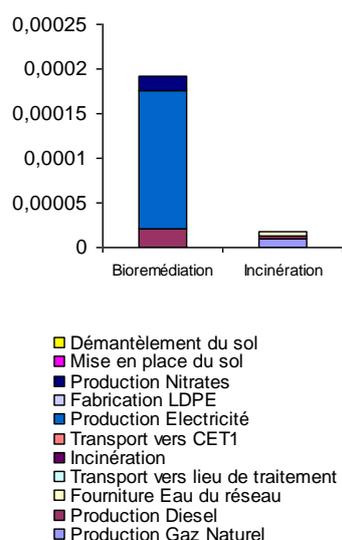


Figure 85 : Radiations.

Les résultats mettent en évidence quatre groupes de catégorie d'impact : i) impact très favorable à l'incinération (Inc+++); ii) impact légèrement favorable à l'incinération (Inc+); iii) impact légèrement favorable à la dépollution biologique (Bio+); iv) impact très favorable à la dépollution biologique (Bio+++). Les résultats de cette classification sont donnés dans le Tableau 41.

Tableau 46 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de cycle de vie par catégorie d'impact.

Catégorie d'impact	Inc+++	Inc+	Bio+	Bio+++
Déplétion des ressources abiotiques				X
Réchauffement climatique				X
Déplétion de la couche d'ozone				X
Toxicité humaine			X	
Ecotoxicité terrestre			X	
Ecotoxicité eau douce - aquatique				X
Ecotoxicité eau douce - sédiment				X
Ecotoxicité marine - aquatique				X
Ecotoxicité marine - sédiment				X
Oxydation photochimique				X
Eutrophisation	X			
Acidification		X		
Radiations	X			
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>9</b>

On observe que 9 catégories d'impact sur 13 sont très favorables à la filière biologique. La très grande majorité des impacts est due à l'utilisation d'énergie fossile pour le transport des terres et pour leur incinération.

## III.4 *Interprétation*

### III.4.1 Analyse de sensibilité

La conclusion de cette analyse de cycle de vie est très claire. Le procédé biologique présente un net avantage sur le plan environnemental par rapport à la filière thermique. Il n'y a que trois catégories qui sont favorables à l'incinération. Pour la catégorie « radiation » c'est évidemment la consommation électrique du compresseur utilisé pour l'aération qui est responsable de l'émission de radioéléments. Pour la catégorie eutrophisation, les transports jouent un rôle important. Le site pollué est plus éloigné du centre biologique de dépollution que de l'incinérateur. De plus l'utilisation de fertilisants pour améliorer la croissance de la microflore a un fort impact sur ce phénomène lié à la surabondance de nutriments dans un milieu naturel. Enfin ce même poste de production de nitrates est responsable du mauvais score pour la catégorie acidification. Pour les autres catégories, les postes incinérations et production de gaz naturel grèvent logiquement le bilan de la filière incinération. Par exemple le cycle de vie de la production de gaz nécessaire au chauffage du four révèle l'émission de halon 1211 (bromochlorodifluorométhane), important gaz nocif pour la couche d'ozone. Pour les catégories du groupe « toxicité eau douce », le groupe des métaux lourds (Hg, As, Ni, Cd, Pb, Zn, et Cu) retrouvés dans les émissions aériennes de l'incinérateur explique 99 % du score de cette filière. Le pourcent restant est attribué à l'émission de dioxines et furannes. Ces deux familles de molécules ont en revanche un fort impact sur la catégorie « toxicité humaine » puisqu'elles expliquent à elles seules 45 % du score. Le groupe des métaux représente lui 55 % du score. L'importance du poste « production de gaz naturel » dans le score de la filière incinération est principalement due à l'émission de barite lors du cycle de vie de production de gaz naturel.

Pour compléter cette conclusion, une analyse de sensibilité est menée. Un paramètre ayant un impact fort pour le bilan de la filière biologique est le transport de terres. Il impacte notamment la catégorie « réchauffement climatique ». Cette catégorie est très défavorable à l'incinération malgré le fait que le site pollué hypothétique se situe à Lyon, soit environ à 40 km du lieu d'incinération et 750 km du site de dépollution biologique. Il peut être intéressant de calculer l'écart de distance à partir duquel la dépollution biologique présente plus d'impact sur le changement climatique que l'incinération. Une augmentation de la distance entre le site pollué et la plateforme de dépollution biologique agit sur deux étapes : le cycle de vie du diesel et le transport. Ainsi, les impacts de toutes les autres étapes sont considérés comme constants vis-à-vis de la distance étudiée et donc leur impact sur le changement climatique est fixé. L'écart de distance est donné par l'Équation 16 :

$$\Delta d \geq \frac{I_{inc} - I_{bio} + I_{dieselinc} - I_{dieselbio}}{I_{transport} + I_{diesel}}$$

Où

$\Delta d$  est l'écart de distance en km

$I_{inc}$  est l'impact sur le changement climatique des autres étapes du cycle de vie du procédé d'incinération

$I_{bio}$  est l'impact sur le changement climatique des autres étapes du cycle de vie du procédé de dépollution biologique

$I_{dieselinc}$  est l'impact sur le changement climatique du diesel qui est consommé dans les autres étapes du cycle de vie de l'incinération

$I_{dieselbio}$  est l'impact sur le changement climatique du diesel qui est consommé dans les autres étapes du cycle de vie de la dépollution biologique

$I_{transport}$  est l'impact sur le changement climatique dû au transport du sol pollué à partir de son site d'excavation vers le lieu de dépollution (incinération et dépollution biologique) sur une distance de 1 km

$I_{diesel}$  est l'impact sur le changement climatique dû au cycle de vie de la quantité de diesel nécessaire au transport du sol pollué à partir de son site d'excavation vers le lieu de dépollution (incinération et dépollution biologique) sur une distance de 1 km.

**Équation 16 : Calcul de l'écart de distance à partir duquel la catégorie d'impact « réchauffement globale » devient favorable à l'incinération.**

Avec les chiffres suivants :  $I_{inc} = 6,50 \cdot 10^5$  kgeqCO<sub>2</sub>;  $I_{bio} = 4,62 \cdot 10^4$  kgeqCO<sub>2</sub>;  $I_{dieselinc} = 1,12 \cdot 10^3$  kgeqCO<sub>2</sub>;  $I_{dieselbio} = 2,45 \cdot 10^3$  kgeqCO<sub>2</sub>;  $I_{transport} = 4,04 \cdot 10^1$  kgeqCO<sub>2</sub>/km;  $I_{diesel} = 6,67$  kgeqCO<sub>2</sub>/km ; l'application numérique donne une distance théorique de 12 800 km. Ce qui nous permet de conclure que pour la catégorie « réchauffement climatique », quel que soit le lieu de traitement du sol, un traitement biologique aura l'avantage environnemental sur une incinération même *in situ*.

### III.4.2 Limites et recommandations

Une des limites importantes de cette analyse est la faiblesse des données concernant les intrants nécessaires à l'incinération d'un sol. Il a été très difficile d'accéder aux données d'intrants, que ce soit auprès de l'entreprise elle-même ou bien d'auprès de la Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Rhône-Alpes en charge de la surveillance de ce site. Par exemple, la consommation électrique de l'usine d'incinération n'est pas connue et donc n'est pas intégrée dans l'étude. Ainsi les résultats de la filière incinération pour la catégorie d'impact « radiation », très sensible à la consommation d'électricité, sont faussés. Notre étude conclut à un net avantage pour l'incinération dans cette catégorie alors que l'électricité utilisée par exemple pour les ponts mobiles et l'éclairage au sein de l'usine doivent avoir un impact certain.

C'est pour cette raison que la quantité de gaz naturel a été estimée. Le calcul présenté au paragraphe III.2.2.1 est sujet à de lourdes imprécisions. Il n'a pas la prétention d'être juste mais il a le mérite de fournir un ordre d'idée de la quantité d'énergie fossile utilisée pour la combustion des PCB.

Les impacts environnementaux liés à la construction des centres de traitement ont été exclus de l'analyse. Or la construction d'un incinérateur demande beaucoup plus de matériaux et de technicité que l'ouverture d'un centre de traitement biologique. Ces données manquent à notre analyse.

Le volet enfouissement en CET1 a également été exclu de l'analyse. On peut se demander si l'enfouissement d'un sol contenant encore  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  de PCB a le même impact que l'enfouissement d'un sol à la sortie de l'incinérateur. Il faudrait mesurer le comportement d'une alvéole de stockage pendant plusieurs centaines d'années et vérifier s'il y a dispersion vers l'environnement.

Enfin, le scénario « Do nothing », c'est-à-dire ne rien faire n'a pas été étudié. Il a été considéré que le débat entre le scénario « Do nothing » et un chantier de dépollution a été tranché lors la phase d'interprétation de l'état du milieu (IEM) préalable à l'établissement d'un plan de gestion d'un site pollué. Mais il serait toutefois intéressant d'appliquer l'outil analyse du cycle de vie lors de l'IEM.

Toutefois, on observe que chacune des remarques faites ici tendent à minimiser l'impact environnemental de la filière incinération. C'est donc une sécurité supplémentaire pour notre conclusion favorable à la filière biologique.

**L'analyse de cycle de vie comparant l'incinération et la dépollution biologique conclut à un net avantage pour la filière biologique. Malgré les limites décrites dans ce paragraphe, l'avantage des solutions biologiques, souvent admis de manière empirique est désormais prouvé rigoureusement. Une analyse de sensibilité sur la distance de transport révèle que pour la catégorie « réchauffement global » la solution biologique sera toujours plus compétitive que l'incinérateur.**

## IV CONCLUSION

La question scientifique principale à laquelle tente de répondre ce chapitre est :

*Quels sont les performances environnementales, réelles d'un traitement biologique par rapport à son concurrent thermique aujourd'hui privilégié ?*

Les résultats de l'analyse de cycle de vie indiquent clairement que le traitement biologique a un réel avantage environnemental par rapport à l'incinération. Cette étude permet de le mesurer précisément et donc de prouver rigoureusement ce qui est généralement admis dans l'opinion publique sans qu'une démonstration n'ait été faite. L'incinération a démontré son efficacité depuis plusieurs années. C'est l'unique solution pour l'élimination des matériels électriques contenant des huiles polluées aux PCB. Cependant, cette étude remet en cause la pertinence de traiter des sols pollués par incinération quand des solutions biologiques sont envisageables.

Dans ce chapitre, l'analyse de cycle de vie a également été utilisée en tant qu'outil d'aide à la décision, sur le modèle de la démarche d'éco-conception. Ainsi, en confrontant les résultats de l'analyse comparative de deux procédés d'aération et leur performance technologique, un choix technique a été fait pour la mise au point d'un procédé de traitement biologique dont l'un des objectifs est de présenter une empreinte environnementale la plus faible possible. Cette démarche réalisée dans le cadre d'un projet de recherche devrait gouverner dans la mesure du possible, la rédaction de plan de gestion lors d'une réhabilitation d'un site ou d'un sol contaminé.

# **Conclusion générale**

La tertiarisation des économies des pays industrialisés induit un besoin de refunctionalisation des espaces autrefois occupés par l'industrie. La réhabilitation des sites et sols contaminés est un secteur d'activité de plus en plus important dans ces zones en conversion. Les PCB font partie de ces molécules à l'origine de progrès techniques industriels, qui représentent aujourd'hui une menace pour la santé publique. Ce travail de thèse concerne la dégradation biologique de PCB dans le contexte de la dépollution de sols contaminés. Répondant à une thématique inscrite dans l'opinion publique, ce sujet est par essence pluridisciplinaire. En effet, afin de répondre aux questions scientifiques qui ont été mises en évidence tout au long de ces travaux, il a été fait appel à la chimie analytique, à la microbiologie, à la génétique, à la bioinformatique et enfin à la chimie de l'environnement. Ces travaux ont permis à une entreprise de dépollution de sols d'estimer le potentiel d'un traitement biologique de dépollution des sols contaminés par des PCB et de l'inscrire dans une démarche d'industrialisation. Cette conclusion reprend point par point les questions scientifiques et les éléments de réponses fournis tout au long de ces trois années de recherche. Ensuite les limites de la démarche choisies sont discutées. Enfin, une réflexion sur les perspectives engendrées par les résultats obtenus clôt ce manuscrit.

## Questionnements scientifiques

*Quel est le niveau de performance théorique des microorganismes capables de dégrader les PCB par voie aérobie (Chapitre 2) ? Par voie anaérobie (chapitre 3) ? Ces potentiels sont-ils exploitables de manière industrielle ?*

La dégradation aérobie des PCB est un phénomène bien documenté dans la littérature scientifique. Les organismes présentant des possibilités métaboliques sont souvent étudiés en condition optimales, c'est-à-dire, en milieu liquide. L'objectif de ces travaux a été de vérifier le potentiel de deux microorganismes, une bactérie et un champignon, en milieu liquide, puis de les tester dans un milieu complexe : le sol.

*Burkholderia xenovorans* est une bactérie de la famille des *Burkholderiaceae* capable de dégrader certains PCB via une enzyme, la 2,3-biphényle dioxygénase. Les premières expérimentations en milieu liquide ont permis de vérifier cette capacité métabolique. En effet, une dégradation comprise entre 100 % et 20 % des PCB faiblement chlorés (entre 3 et 5 atomes de chlore) a été mise en évidence. Lors du passage en sol artificiel, un comportement différent a été observé. Sur la somme des 7 PCB étudiés, aucune dégradation n'a été observée. Cependant, dans le détail, on observe que 3 PCB ont préférentiellement été dégradés avec des rendements allant de 12 % à 19 % en l'espace de 90 jours. En sol réel, des rendements de dégradation entre 0 % et 35 % sont observés. Les PCB les plus dégradés sont ceux qui sont les plus concentrés dans le sol et ceux ayant les positions 2 et 3 libres sur le noyau biphenyle. On montre également que la biphenyle dioxygénase de cet organisme est polyvalente puisqu'elle permet également de dégrader des PCB ayant les positions 2 et 3 libres. Une dégradation moyenne journalière de  $0,85 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  pour la somme des 7 PCB a été calculée. On peut en conclure que *Burkholderia xenovorans* possède un vrai potentiel technologique.

*Phanerochaete chrysosporium* est un basidiomycète bien connu pour sa capacité à dégrader un large éventail de molécules aromatiques. Grâce à ses capacités métaboliques multiples (péroxydases, nitrate réductase) il est capable de dégrader les PCB dont certains ayant jusqu'à 6 atomes de chlore. Cet organisme n'est pas un champignon tellurique. Son implantation dans le sol demande un ajout de matière organique incompatible avec le terrain. En revanche, en milieu liquide, la matière organique constituée par son mycélium se comporte comme un filtre actif permettant la filtration de polluants organiques puis leur dégradation. Le travail de recherche effectué sur cette capacité a permis d'établir le fractionnement des PCB dans l'eau en présence du champignon. Les résultats montrent que *Phanerochaete chrysosporium* fixe entre 40 % et 50 % de la concentration initiale et dégrade

une fraction comprise entre 30 % et 40 % selon le PCB considéré. Le calcul des vitesses de sorption par PCB révèle que les PCB les plus chlorés sont ceux qui se lient le plus vite au champignon. Ainsi, si cet organisme n'a pas paru être adapté à une utilisation en sol, son potentiel technologique en milieu liquide est certain.

Les microorganismes responsables de la transformation biologique des PCB par voie anaérobie sont moins bien connus. Ils sont généralement difficilement cultivables, ce qui rend leur isolement impossible. Il est ainsi difficile d'isoler une espèce capable de transformer les PCB. Il est donc courant de manipuler des communautés entières. Une méthode pour obtenir une telle communauté est de prélever une microflore native dans un milieu naturel impacté par des PCB. Cette démarche a été entreprise lors de cette thèse. Afin de repérer les communautés d'intérêt, un criblage a été effectué d'abord en milieu liquide, puis en milieu solide artificiel. Ces étapes ont permis d'isoler 4 communautés, CJ2, CJ3, GL1 et RH050. L'étape suivante a été le passage en sol réel pour deux d'entre elles : CJ2 et RH050. A ce stade c'est la communauté CJ2 qui s'est montrée la plus efficace avec une dégradation moyenne journalière d'environ 500  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Elle a été sélectionnée pour un essai à une échelle supérieure (25 kg) en traitement séquentiel anaérobie/aérobie. Elle a permis la dégradation d'environ 30 % des PCB contenus dans sol quel que soit le mode d'aération lors de la phase aérobie.

*Comment peut-on améliorer la connaissance des microflores anaérobioses intervenant dans la dégradation des PCB ?*

Les communautés microbiennes capables de transformer les PCB en condition anaérobie sont souvent considérées comme des boîtes noires. Ce manque de connaissance est lié à la difficulté de cultiver puis d'isoler des organismes adaptés à un milieu complexe comme un sol ou un sédiment. Pourtant, ce savoir peut aboutir à un pilotage plus fin du procédé de dépollution et à l'amélioration du suivi de l'implantation d'une microflore exogène lors d'une bioaugmentation. Aujourd'hui, la génétique contourne la problématique de la culture. Les nouveaux outils de séquençage et d'analyse de séquences ont maintenant une puissance suffisante pour faire face à la complexité d'une microflore issue de l'environnement. Lors de ces travaux de recherche, 6 communautés ont été étudiées dans le but d'identifier les espèces présentes. Pour cela, le gène ADNr 16S a été utilisé. La séquence de ce gène est constituée d'une succession de zones conservées et de zones hypervariables. L'étude de la variabilité des zones hypervariables à l'aide de bases de données permet donc d'identifier une bactérie sans avoir à l'isoler. L'étude a donc permis de mettre en évidence les intersections au niveau des familles entre certains des échantillons. Il y a 11 familles communes aux communautés CJ2 sélectionnées (frais, conditionné et essai de dépollution) dont les *Clostridiaceae*, *Hydrogenophilaceae*, *Xanthomonadaceae* ou les *Pseudomonadaceae*. Ceci suggère que les espèces présentes dans cette intersection sont potentiellement impliquées dans la dégradation anaérobie. Sur le plan de l'écologie microbienne, cette étude donne également un éclairage exhaustif sur la composition de la microflore de trois sédiments issus d'un milieu anthropisé impacté par les PCB, le Rhône. Si les trois communautés partagent une base commune de 61 familles, certaines spécificités ont pu être mises en évidence. Enfin, l'un des enseignements principaux de cette partie est la difficulté de manipuler et d'adapter les outils bioinformatiques aux besoins spécifiques définis par les objectifs de l'analyse. L'hétérogénéité des classifications à l'intérieur d'une même base de données de gène ADNr 16S rend difficile les comparaisons et les interprétations.

*Quels sont les performances environnementales réelles d'un traitement biologique par rapport à son concurrent thermique aujourd'hui privilégié ?*

L'analyse de cycle de vie est une méthode aujourd'hui reconnue pour évaluer les impacts potentiels d'un produit ou d'un procédé sur l'environnement. Il est donc pertinent de l'appliquer à un procédé de traitement des sols contaminés. Cette méthode peut avoir plusieurs finalités. Lors de ces travaux de recherche, deux de ces possibilités ont été explorées : i) l'écoconception ; ii) la comparaison de deux procédés concurrents. Ainsi, lorsque les

expérimentations ne désignent pas de solutions techniques évidentes, l'analyse de cycle de vie est un bon complément pour aider à la conception du procédé. Les catégories d'impact étudiées sont la déplétion abiotique, la déplétion de la couche d'ozone, le réchauffement climatique, la toxicité terrestre, toxicité humaine, toxicité pour les milieux aquatiques d'eau douce, pour les sédiments d'eau douce, pour les milieux aquatiques maritimes, pour les sédiments marins, l'eutrophisation, l'acidification, l'oxydation photochimique et la radiation. Une majorité de 7 catégories d'impact est très favorable à l'aération par insufflation d'air. C'est donc cette solution qui a été retenue pour un essai sur site, chez un client potentiel de la société VALGO. La deuxième analyse de cycle de vie a pour objectif de vérifier et d'évaluer l'avantage environnemental d'une solution biologique par rapport à une solution thermique classique. Elle fournit donc les preuves solides de ce qui est couramment sous-entendu. En effet, avec 9 catégories d'impacts très favorables à la solution biologique, le traitement biologique a une empreinte environnementale bien moindre qu'un procédé d'incinération. De plus l'analyse de sensibilité montre que l'avantage est tel que le transport des terres vers un centre de traitement biologique est toujours justifié. Cela relance aussi l'intérêt de ces biocentres dont on peut se demander la pertinence quand des installations sur-site sont possibles. Avec les économies d'échelle et la stabilisation de savoir-faire que permettent ces structures, c'est un argument supplémentaire en leur faveur. Ces deux applications de l'analyse de cycle de vie illustre bien la pertinence de son utilisation dans le domaine de la réhabilitation de sites et sols industriels. De plus, cette démarche pourrait assez facilement s'insérer dans le cadre méthodologique actuel préconisé par les services de l'état pour la gestion des sites et sols pollués. Suite à l'interprétation de l'état des milieux (IEM), l'analyse de cycle de vie serait une méthode adaptée pour guider l'établissement du plan de gestion.

## Limites principales

Tout d'abord, l'accent analytique a été mis sur le suivi des polluants cibles, les PCB. Au nombre de sept suivant la définition de la législation actuelle, leur analyse n'est pas triviale. Il était prévu de s'intéresser aux métabolites des PCB tels les acides chlorobenzoïques. Un phénomène de dégradation est solidement établi par l'observation de la disparition du produit ciblé et par la clôture du bilan de masse entre les métabolites organiques ou inorganiques. C'est pourquoi il est souvent question de « disparition » ou de « transformation ». Cependant, le parti a été pris de travailler sur des pollutions complexes pour se rapprocher au plus près des conditions rencontrées sur les chantiers. Un mélange commercial de PCB contient plusieurs dizaines de PCB différents en proportions très variables. En suivre 7 donne une vision très parcellaire et il est utopique de vouloir effectuer un bilan de masse dans une matrice aussi complexe. Cette complexité de la matrice sol est également un problème difficile à contourner. Bien que des activités microbiennes aient été mises en évidence sur des sols réels, les résultats sont difficilement extrapolables à l'ensemble des sols. Le taux de matière organique, la granulométrie ou la concentration initiale en polluants ont vraisemblablement une importance sur la réussite d'un procédé.

Il est apparu durant cette étude que les nouveaux outils issus de la bioinformatique avaient du mal à s'articuler avec la rigueur des classifications de microorganismes issues notamment de l'observation des caractères biochimiques des espèces. La masse de données accumulées est telle qu'il faut trouver un moyen de lui redonner un sens biologique. Le choix ici a été de rechercher les intersections entre différents milieux d'intérêt. Si cette démarche permet de réduire la masse de données à analyser pour se concentrer sur les séquences potentiellement intéressantes, elle ne permet pas d'établir une liaison formelle entre la présence d'une espèce et la disparition de PCB observée. Ce problème est d'ailleurs en partie insoluble puisqu'il faudrait passer par une culture isolée, ce qui ramène au débat sur les techniques cultures-dépendantes. L'une des solutions est de s'appuyer sur un faisceau d'indices le plus large possible. Il aurait fallu intégrer l'étude d'un témoin négatif : la connaissance des espèces présentes dans un essai non concluant aurait permis de solidifier le faisceau d'indices en écartant de manière certaine les bactéries n'ayant pas d'activité.

Ce travail de thèse s'est arrêté à l'essai pilote. La validation industrielle ne pouvait être intégrée à l'étude malgré tout l'intérêt qu'elle représente. Cette étape reste critique pour de nombreux procédés ayant de bons résultats en laboratoire. Les résultats présentés dans ce manuscrit s'arrêtent donc aux portes du laboratoire de recherche et développement de l'entreprise VALGO.

## Perspectives

Inscrites dans un partenariat industriel fort, les perspectives sont d'ordre scientifique, méthodologique et technologique.

*Burkholderia xenovorans* a montré un potentiel technologique certain mais il est acquis qu'un traitement aérobie seul est limité par le nombre d'atomes de chlore. Il est également technologiquement difficile d'ensemencer par voie liquide une nouvelle bactérie ou communauté à chaque phase d'un traitement séquentiel anaérobie/aérobie. Cela mènerait à une production d'effluent aqueux. C'est pourquoi il n'a pas été choisi d'utiliser *Burkholderia xenovorans* pour la phase aérobie du procédé. Cependant, il existe aujourd'hui des techniques de conditionnement de bactéries pour l'ensemencement. Si la voie de la lyophilisation risque d'être pénalisée par son coût et son empreinte environnementale, la solution de l'encapsulation dans une enveloppe hydrosoluble peut avoir un potentiel technologique. Elle permettrait d'introduire une rémanence de l'ensemencement intéressante dans le cadre d'une utilisation industrielle. En effet, l'une des limites de la bioaugmentation est la non persistance de l'espèce introduite.

*Phanerochaete chrysosporium* présente également des possibilités technologiques. Les capacités de ce champignon en milieu liquide ouvrent la voie à la mise au point d'un procédé de biofiltration. Un des champs d'application visé notamment par l'entreprise VALGO est la protection du milieu aquatique lors du dragage de sédiments de rivière impactés par des polluants organiques. On peut imaginer une culture de ce champignon sur un substrat adéquat riche en lignine afin de garnir un filtre. Ce projet fera vraisemblablement l'objet d'une étude de faisabilité au sein de la société.

Le criblage effectué en milieu liquide sur les 7 communautés récoltées a discriminé 4 communautés. Si CJ2 et RH050 ont été étudiées plus en profondeur, GL1 et CJ3 ont été écartées sur des critères économiques. Il convient d'évaluer leur potentiel en sol et de le comparer à celui de CJ2.

Enfin, la société VALGO est en train d'ouvrir un site pilote en partenariat avec un client potentiel. Les pilotes seront installés dans une aluminerie dont une zone est contaminée par des PCB. Quatre essais de dépollution biologique d'une tonne de terre contenant des PCB seront menés en utilisant les résultats issus de cette thèse.

# Annexes

Annexe I.1 – Statistiques de publications.

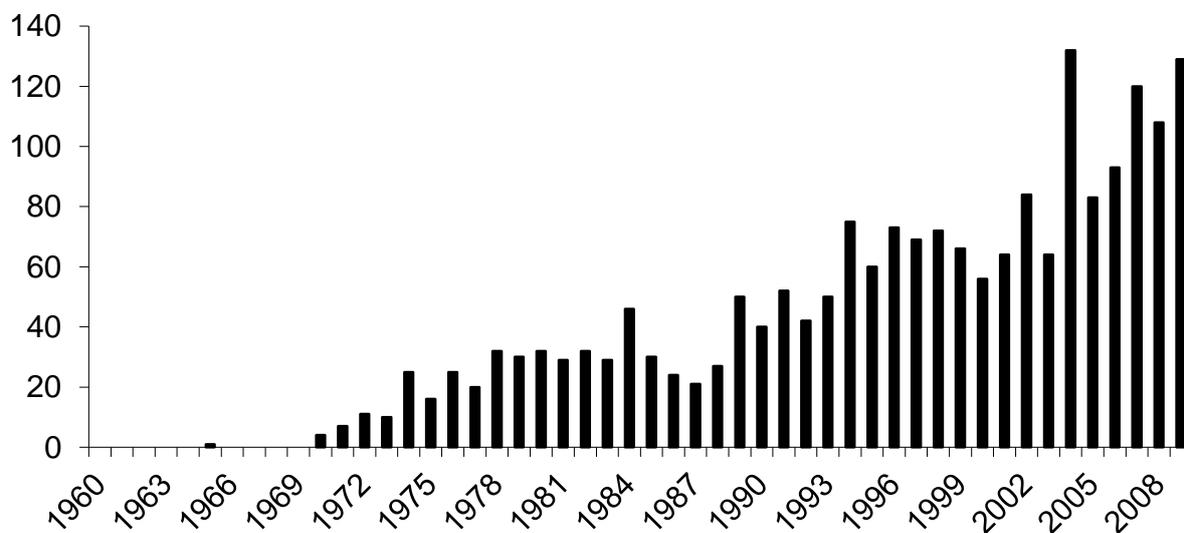


Figure 86 : Nombres de publications répertoriées sur Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>) dont le titre contient « \*chlorinated biphenyls ».

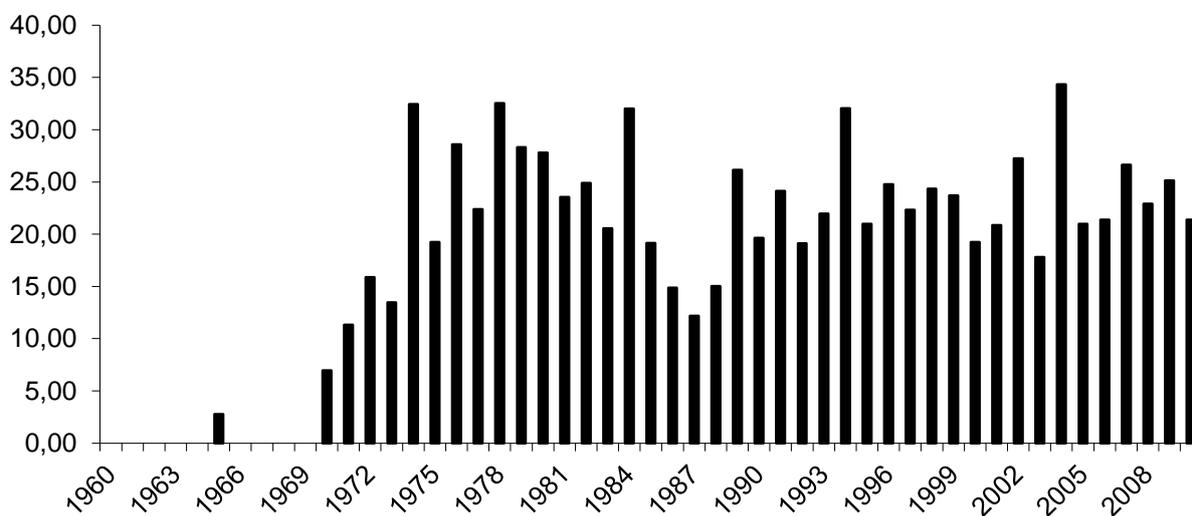


Figure 87 : Nombres de publications répertoriées sur Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>) dont le titre contient « \*chlorinated biphenyls » pondérées par le nombre total de publication et ramené à 100 000 publication annuelle.

## Mesure de la densité optique à 600 nm

### Principe

Le trouble optique d'une suspension de bactéries est proportionnel au nombre de ces organismes. La mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 600 nm permet de mesurer ce trouble optique. Elle permet donc de suivre la croissance d'un microorganisme dans une suspension..

### Matériels

Les cuve optiques de 3 mL sont en polystyrène optique et proviennent de la marque Dispolab Kartell. L'absorbance est mesurée avec un Spectrophotomètre Secoman S.1000 (30319 ALES, France).

### Méthode

Deux millilitres de suspension bactérienne sont prélevés de manière stérile sous un poste de sécurité microbienne. Le prélèvement est disposé dans une cuve optique. L'absorbance est mesuré pour une longueur d'onde de 600 nm. Comptage sur milieu nutritif

## Mesure de la concentration de glucose

### Principe

Les sucres réducteurs réagissent avec l'acide 3,5-dinitrosalicylique en le réduisant en acide 3-amino-5-nitrosalicylique selon la réaction suivante (figure 88).

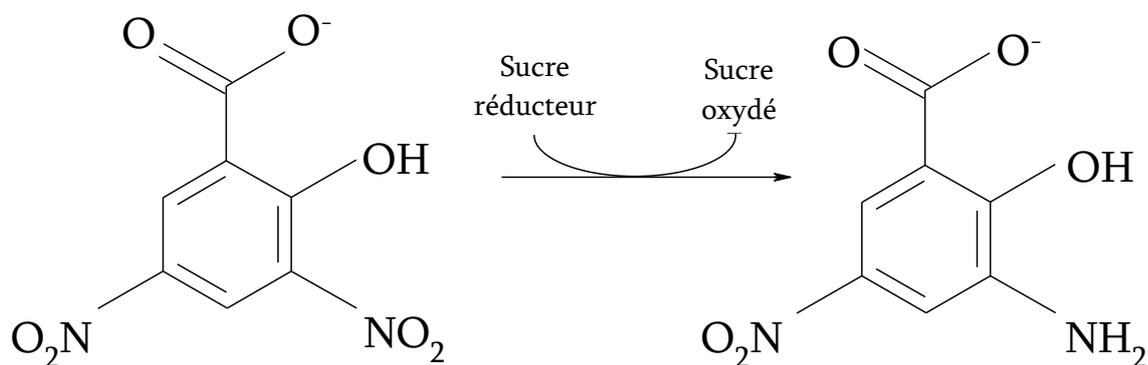


Figure 88 : Réaction entre le DNS et un sucre réducteur type glucose. Source: Protocole n° BIO-04-MTH-018, LGC.

L'acide 3-amino-5-nitrosalicylique a une absorbance maximum pour une longueur d'onde de 540 nm. La quantité de d'acide 3,5-dinitrosalicylique réduit est proportionnelle à la concentration en sucre réducteur. Il est donc possible de mesurer la concentration en glucose en mesurant l'absorbance à 540 nm. (Summer et Sommers, 1944).

Certaines protéines réductrices peuvent interférer dans le dosage du glucose. Il est parfois nécessaire d'effectuer une défécation, lorsque la concentration en protéines est trop forte

## **Matériels**

Les cuve optiques de 3 mL sont en polystyrène optique et proviennent de la marque Dispolab Kartell. L'absorbance est mesurée avec un Spectrophotomètre Secoman S.1000 (30319 ALES, France). La centrifugeuse est fournie par la marque Jouan modèle 4.11 (44805 Saint-Herblain, France).

L'acide 3,5-dinitrosalicylique, les sels NaOH, tartatre double NaK, ZnSO<sub>4</sub> et Ba(OH)<sub>2</sub> proviennent de la société Prolabo et sont purs à 95 %.

## **Méthode**

### Défécation des protéines

Deux millilitres d'échantillon sont prélevés de manière stérile dans un tube à hémolyse. Cinq cents microlitres d'une solution de ZnSO<sub>4</sub> à 5% et 500 µL de Ba(OH)<sub>2</sub> 0,3 N sont ajoutés aux 2mL prélevés. Après 10 min de réaction, le précipité est éliminé par centrifugation pendant 5 min à 3000 tr/min à température ambiante.

### Mesure de l'absorbance à 540 nm

Cinq cents microlitres d'échantillon à doser sont prélevés dans un tube à hémolyse. Cinq cents microlitres de réactif DNS (DNS : 10g.L<sup>-1</sup> ; NaOH : 16 g.L<sup>-1</sup> ; tartrate double Na,K : 300g.L<sup>-1</sup>) sont ajoutés. Les tubes à hémolyses sont mis au bain-marie à 95 °C pendant 5 min. A la sortie du bain-marie, 3 mL d'eau distillée à 4°C sont ajoutés afin de stopper la réaction et diluer l'échantillon pour la mesure d'absorbance.

L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 540 nm. La mesure est répliquée 3 fois par échantillon.

### Calibration

La concentration en glucose est déterminée grâce à l'équation :

$$C_{\text{Glu}} = A_x \times \text{DO540}$$

Le coefficient A est déterminé à l'aide d'une gamme étalon comprenant 6 solutions de glucose à concentration connue : 2 g.L<sup>-1</sup> ; 1 g.L<sup>-1</sup> ; 0,5 g.L<sup>-1</sup> ; 0,250 g.L<sup>-1</sup> ; 0,125 g.L<sup>-1</sup> ; 0 g.L<sup>-1</sup>. Deux coefficients A<sub>x</sub> sont établis, l'un pour le protocole sans défécation des protéines (A<sub>1</sub>) et l'autre pour le protocole avec défécation des protéines (A<sub>2</sub>)

Les figures 89 et 90 présentent la droite de calibration de la méthode de dosage du glucose par la méthode de réduction du DNS avec ou sans défécation des protéines.

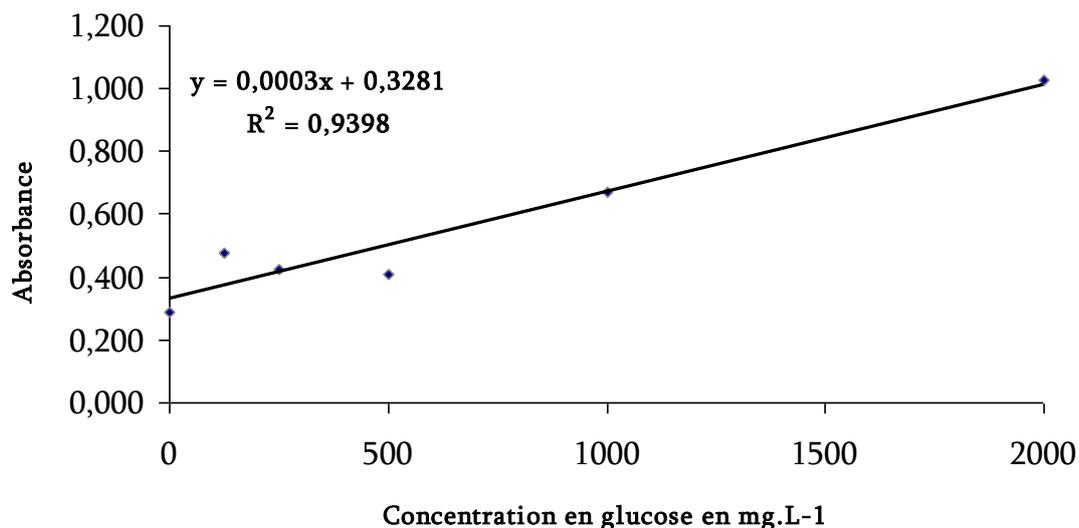


Figure 89 : Droite de régression d'étalonnage pour le dosage du glucose par la méthode du DNS avec défécation des protéines

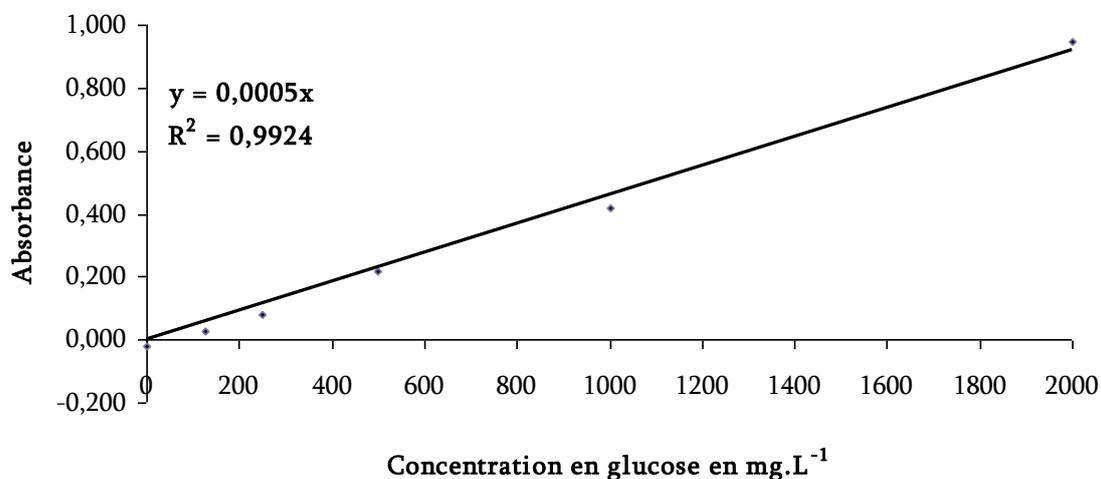


Figure 90 : Droite de régression d'étalonnage pour le dosage du glucose par la méthode du DNS

On remarque que le protocole de défécation perturbe la courbe de calibration. Nous avons donc retenu le protocole sans défécation de protéine pour la suite. L'équation retenue pour le calcul de la concentration en glucose est :

$$C_{\text{Glu}} = 2000 \times \text{DO540}$$

Le coefficient de corrélation  $R^2$  est supérieur à 0,99. Ceci indique que la droite de régression est un bon modèle des points mesurés de la gamme.

## Annexe II.2 – Méthode analytique de mesure de la concentration en PCB dans l'eau.

### Matériels

Le chromatographe en phase gazeuse est un Finnigan Trace 2000 séries couplé à un spectromètre de masse Finnigan Trace MS de type quadropole. La colonne est une Restek RTX – 5MS (Crossbond, 5% diphényl – 95 % diméthylpoysiloxane) de 30 m de long, de 0,25 µm de diamètre et de 0,25 µm d'épaisseur de film. Le gaz vecteur est de l'hélium Alpha2 (Air Liquide, France).

Les 7 PCB, n°IUPAC 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180, sont issus du PCB-Mix 3 fourni par Cluzeau Info Labo (France). Ce mix contient 10 mg.L-1 dans du cyclohexane de chacun des 7 PCB. L'Aroclor 1254 et 1248 sont de grade Technique et proviennent d'Ultra Scientific (North Kingstown, RI, USA). Le solvant d'extraction est du *n*-hexane suprasolv (VWR, Merk, France). Le 2,4,5,6-tetrachlorometaxylene (TCMX) à 10 mg.L-1 dans du cyclohexane provient de Cluzeau Info Labo (France).

### Méthodes

#### Extractions liquide-liquide

##### *Expérimentations volume 100 mL*

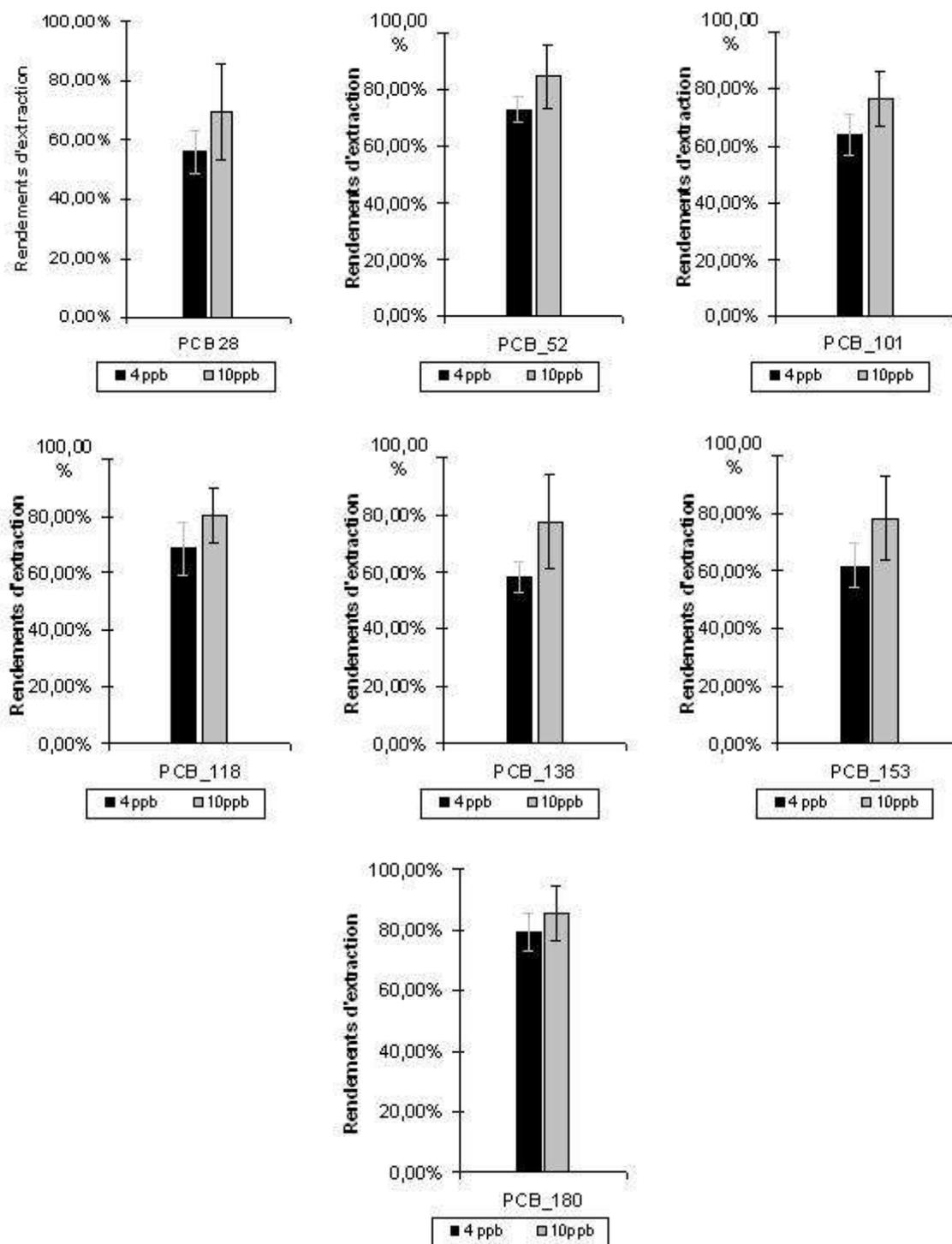
Les échantillons sont extraits par une extraction liquide-liquide à l'aide d'ampoules à décanter de 100 mL. Trois séquences d'agitation manuelle de 5 min avec 20 mL de *n*-hexane sont effectuées. L'extrait est séché par congélation puis concentré avec un évaporateur rotatif (90 tr/min à 50°C) sous pression réduite jusqu'à environ 2 mL. Une deuxième concentration est effectuée sous azote jusqu'à exactement 1 mL. Cinquante µL de l'étalon interne, TCMX à 10 mg.L<sup>-1</sup> dans du *n*-hexane, sont ajoutés avant injection en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM). Les extractions de validation sont répétées 3 fois.

##### *Expérimentations volume 500 mL*

L'échantillon est extrait par 3 séquences de 10 min d'une extraction liquide-liquide avec 150 mL de *n*-hexane sous agitation manuelle dans des ampoules à décanter de 2 L. L'extrait est reconcentré sous évaporateur rotatif puis sous flux d'azote à 1 mL. Cinquante µL de l'étalon interne, TCMX à 10 mg.L-1 dans du *n*-hexane, sont ajoutés avant injection en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM).

##### *Validation de l'extraction*

La méthode d'extraction est validée à l'aide de triplicats d'extraction effectués sur des solutions de concentrations connues de 4 µg.L-1 puis de 10 µg.L-1. Les extractions sont effectuées selon la méthode décrite dans le paragraphe I.3.3.1.1.1. Les résultats de cette expérimentations de validation sont présentés Figure 91.



**Figure 91 : Rendements d'extraction de la méthode Liquide-liquide.**

Analyse par CPG-SM

Un microlitre de l'extrait purifié est injecté à 250 °C en mode splitless pendant 1 min, puis en mode split un débit de split de 50 mL.min<sup>-1</sup>.

Le débit du gaz vecteur est constant et est égal à 1,2 mL.min<sup>-1</sup>. La température initiale du four est de 50°C pendant 2 min. Puis la température atteint 230 °C à la vitesse de 16°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 282 °C à raison de 5°C.min<sup>-1</sup>. La température reste à 282°C pendant 1 min.

La détection est activée après un délai de 10,5 min. L'énergie de l'impact électronique est de 70 eV. La température de la source est de 200°C. Le courant d'émission est de 150 µA. La vitesse de balayage est de 4 m.s-1. La tension du détecteur est de 350 V. L'acquisition se fait en mode Multiple Ions Monitoring (MIM) suivant les paramètres donnés dans le Tableau 47.

Fenêtre de temps	Temps (min)	Composés	Masses caractéristiques en MIM (m/z)
1	10,50-12,5	TCMX	136 ; 171 ; 244
2	12,50-14,5	PCB 28 PCB 52	150 ; 186 ; 258 ; 292
4	14,5-15,65	PCB 101	184 ; 254 ; 326
5	15,65-18,0	PCB 118 PCB 138 PCB 153	184 ; 218 ; 254 ; 290 ; 326 ; 360
6	18,0-20,0	PCB 180	162 ; 252 ; 324 ; 394

**Tableau 47. Fenêtre de temps pour l'acquisition en mode MIM**

La concentration des 7 PCB est déduite par l'intermédiaire de cette équation :

$$C_{\text{PCB}} = A_{\text{PCB}} \times \text{Aire}_{\text{PCB}} / V_{\text{échantillon}}$$

Le coefficient  $A_{\text{PCB}}$  est donné par une courbe d'étalonnage dont l'unité est le mg.m<sup>-2</sup>. L' $\text{Aire}_{\text{PCB}}$  est l'aire du pic du PCB dosé, corrigé par l'étalon interne en m<sup>2</sup>.  $V_{\text{échantillon}}$  est le volume de l'échantillon extrait en L.

Les droites d'étalonnages utilisés pour l'expérimentation grand volume sont présentées Figure 92.

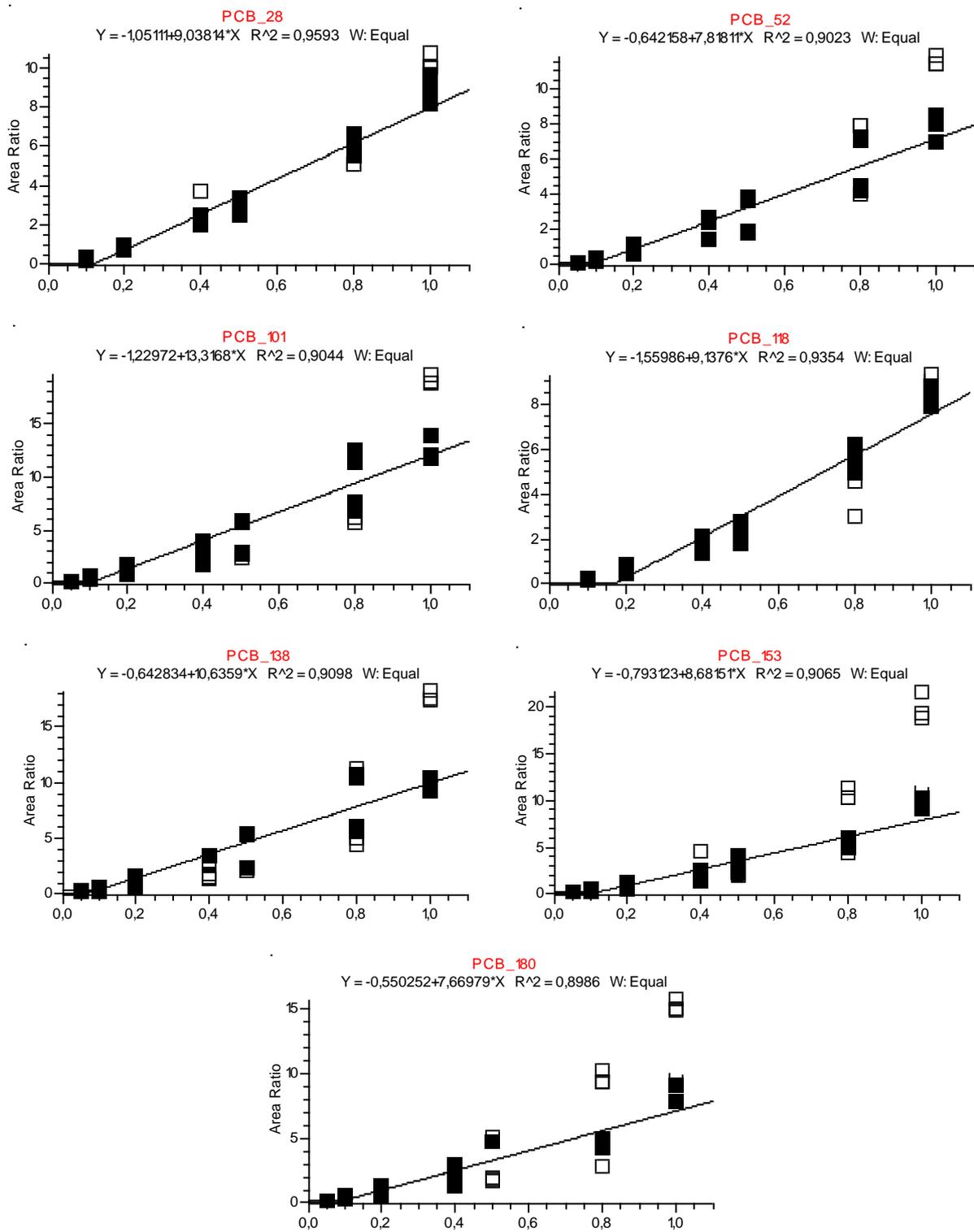


Figure 92 : Droites d'étalonnages pour les 7 PCB.

*Répétabilité et domaine de validité*

Le domaine de validité est compris entre 0,5 mg.L<sup>-1</sup> et 1 mg.L<sup>-1</sup> pour les PCB 52, 101, 138, 153, 180 et entre 0,1 mg.L<sup>-1</sup> et 1 mg.L<sup>-1</sup> pour les PCB 28 et 118.

## Annexe II.3 – Méthode analytique de mesure de la concentration en PCB liés au mycélium de *Phanerochaete chrysosporium*.

### Matériels

Les réactifs utilisés pour ce dosage sont les mêmes que ceux présentés dans l'annexe II.1.

Le papier filtre en cellulose de porosité de 11  $\mu\text{m}$  est un filtre Whatman (France). Les cartouches SPE (Extraction Phase Solide) de 1 g de florisil proviennent de Supelco (Etats-Unis). Elles sont utilisées à l'aide du Manifold Preppy© (Supelco, Etats-Unis).

### Méthodes

La matière organique récupérée sur le papier filtre est séchée sous hotte à température ambiante durant une nuit. La masse fongique et le filtre sec subissent alors une extraction par 3 séquences de 5 min d'agitation manuelle au contact de 50 mL de *n*-hexane dans des flacons en verre de 250 mL. L'extrait est concentré sous évaporateur rotatif puis sous flux d'azote jusqu'à un volume de 1 mL. Cinquante  $\mu\text{L}$  d'étalon interne, TCMX à 10 mg.L<sup>-1</sup> dans du *n*-hexane, sont ajoutés avant injection en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM). Les extractions de validation sont répétées 3 fois.

Les extraits hexaniques concentrés présentent une intense coloration jaune ou orangé (figure 93 et 94). Une purification est donc nécessaire.



Figure 93 : Extraits reconcentrés des matières organiques



Figure 94 : Extraits reconcentrés des filtrats

La purification est réalisée à l'aide de cartouches SPE (Extraction Phase Solide) de florisil conditionnée par 10 mL de *n*-hexane. L'extrait à purifier est alors placé en tête de colonne. L'élution se fait avec 8 mL de *n*-hexane à un débit de 1 à 2 gouttes par seconde, réglé à l'aide d'une pompe à vide et du Manifold Preppy (figure 95). L'extrait purifié est alors concentré sous flux d'azote jusqu'à 1 mL.



**Figure 95 : Manifold Preppy© pour SPE**

La matière organique récupérée sur le papier filtre est séchée sous hotte à température ambiante durant une nuit. La masse fongique et le filtre sec subissent alors une extraction par 3 séquences de 5 min d'agitation manuelle au contact de 50 mL de n-hexane dans des flacons en verre de 250 mL. L'extrait est concentré sous évaporateur rotatif puis sous flux d'azote jusqu'à un volume de 1 mL. Cinquante  $\mu\text{L}$  d'étalon interne, TCMX à 10 mg.L<sup>-1</sup> dans du n-hexane, sont ajoutés avant injection en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM) selon la méthode décrite dans l'annexe II.1.

## Annexe III.1 – Analyses de l'Aroclor 1254 en milieu liquide.

### Matériels

Les matériels utilisés pour l'analyse de l'Aroclor 1254 en milieu liquide sont les mêmes que ceux décrits dans l'annexe II.1.

### Méthodes

#### Extractions liquide-liquide

Les échantillons sont extraits par une extraction liquide-liquide à l'aide d'ampoules à décanter de 50 mL. Trois séquences d'agitation manuelle de 5 min avec 10 mL de *n*-hexane sont effectuées. L'extrait est séché par congélation puis concentré avec un évaporateur rotatif (90 tr/min à 50°C) sous pression réduite jusqu'à environ 2 mL. Une deuxième concentration est effectuée sous azote jusqu'à exactement 1 mL. Cinquante µL de l'étalon interne, TCMX à 10 mg.L<sup>-1</sup> dans du *n*-hexane, sont ajoutés avant injection en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM).

#### Analyse par CPG-SM

La méthode de chromatographie utilisée pour obtenir les chromatogrammes est identique que celle utilisée pour le dosage des 7 PCB en milieu liquide décrite dans l'annexe II.1. L'acquisition par spectrométrie de masse est effectuée en mode SCAN.

Chaque PCB est caractérisé par un rapport donné par l'équation suivante :

$$Valeur\_référence_{PCB} = \frac{Aire_{PCB}}{Aire_{TCMX}}$$

Où Aire<sub>PCB</sub> et Aire<sub>TCMX</sub> sont déterminés à partir des chromatogrammes en mode SCAN en utilisant la méthode décrite dans le

**Tableau 48: Fenêtre d'analyse et temps de rétention pour les 5 PCB analysés de l'Aroclor 1254.**

PCB analysé	Appel de masse en m/z	Temps de rétention en min
TCMX	243,5 – 244,5	12,10 – 12,20
PCB 52	291,5 – 292,5	14,40 – 14,50
PCB 101	324,5 – 325,5	15,60 – 15,70
PCB 118	324,5 – 325,5	16,80 – 16,90
PCB 138	359,5 – 360,5	17,30 – 17,40
PCB 153	359,5 – 360,5	17,90 – 18,0

Annexe III.2 – Chromatogramme de l'expérimentation en milieu liquide pour la communauté GL1.

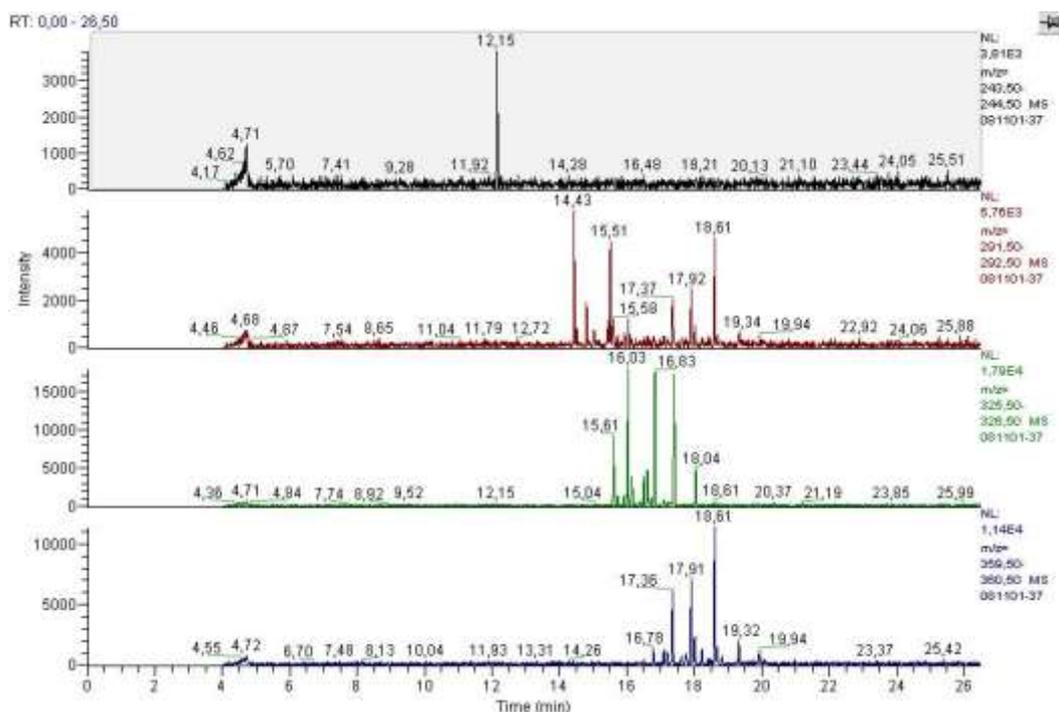


Figure 96: Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté GL1. Expérimentation biphenyle.

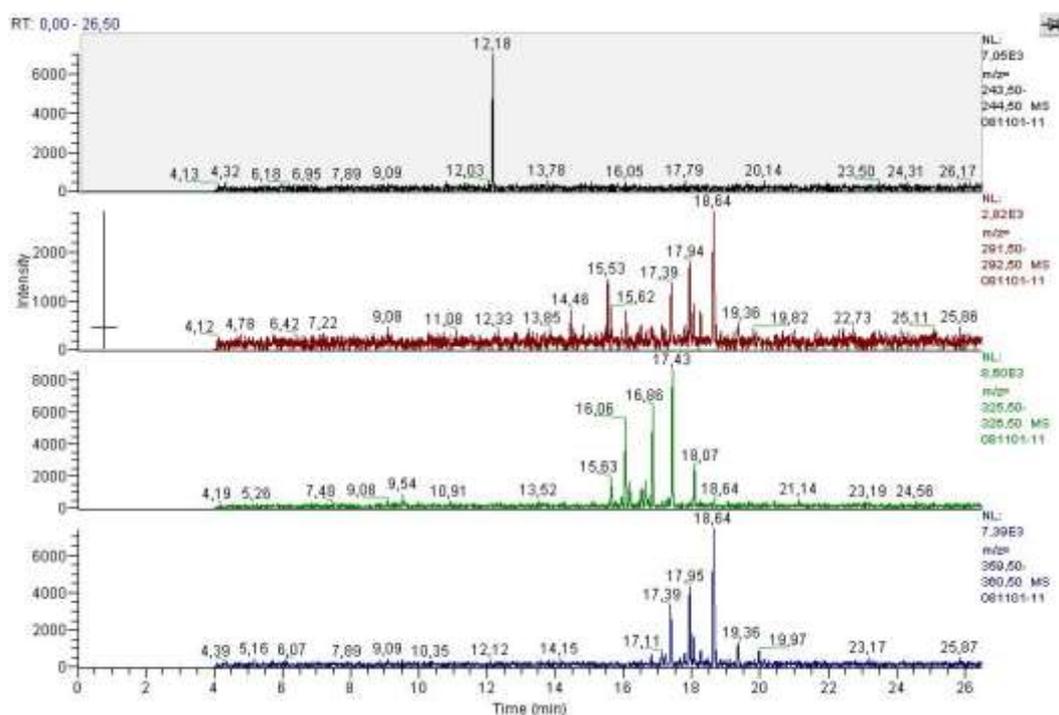


Figure 97 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté GL1. Expérimentation carvone.

Annexe III.3 – Chromatogramme de l'expérimentation en milieu liquide pour la communauté GL4.

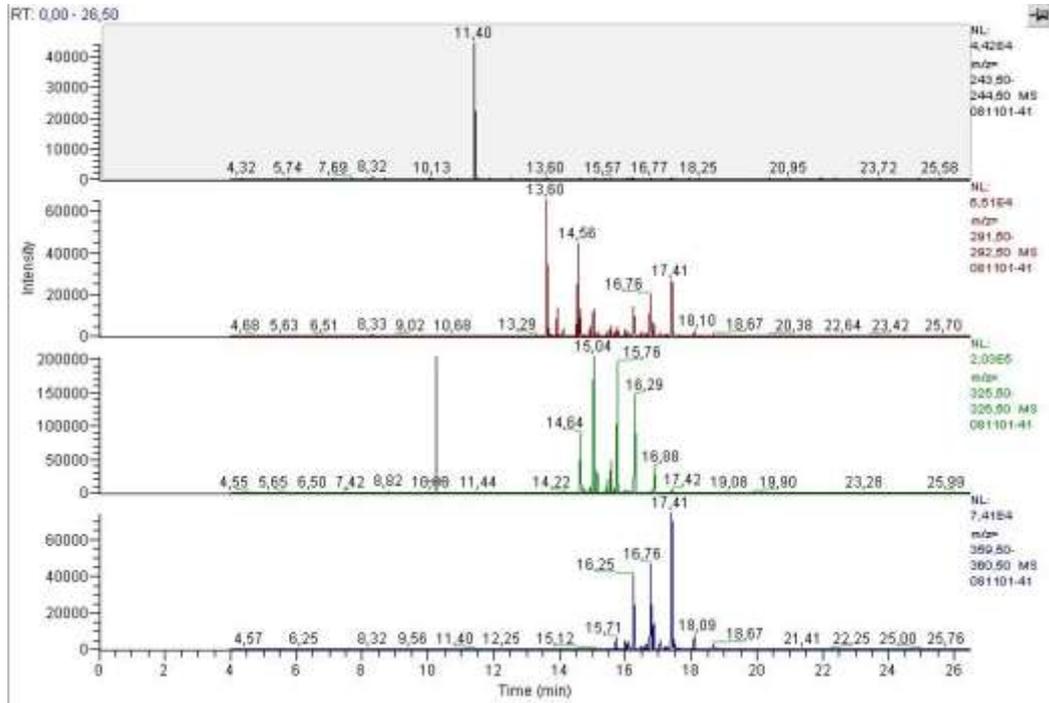


Figure 98 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté GL4. Expérimentation biphényle.

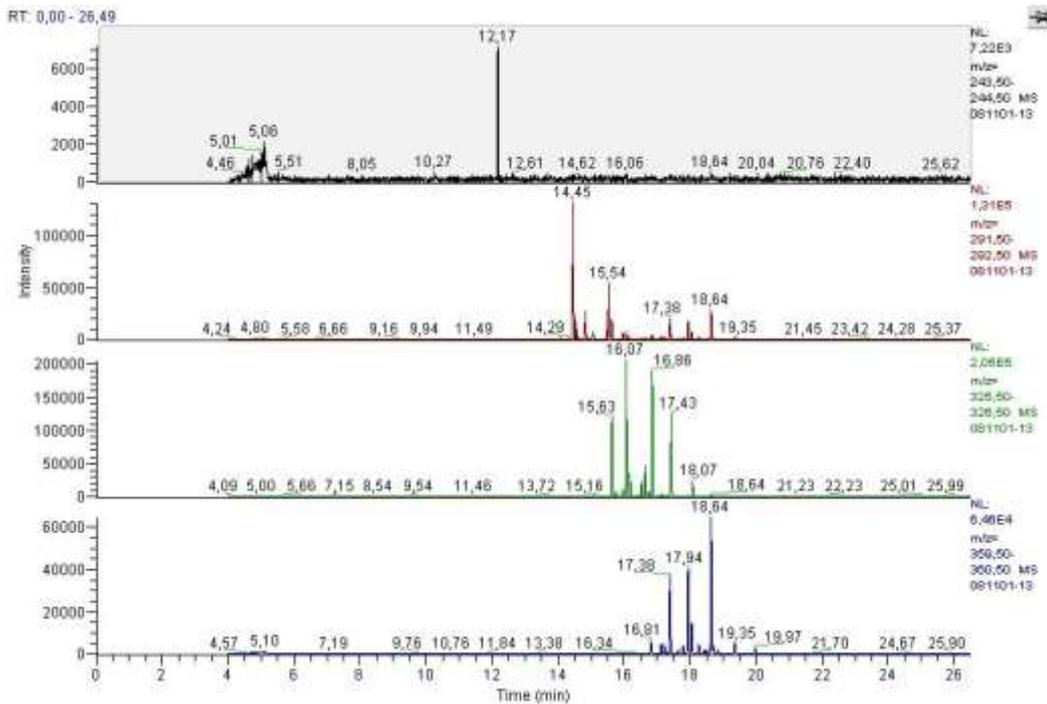


Figure 99 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté GL1. Expérimentation carvone.

Annexe III.4 – Chromatogramme de l'expérimentation en milieu liquide pour la communauté CJ2.

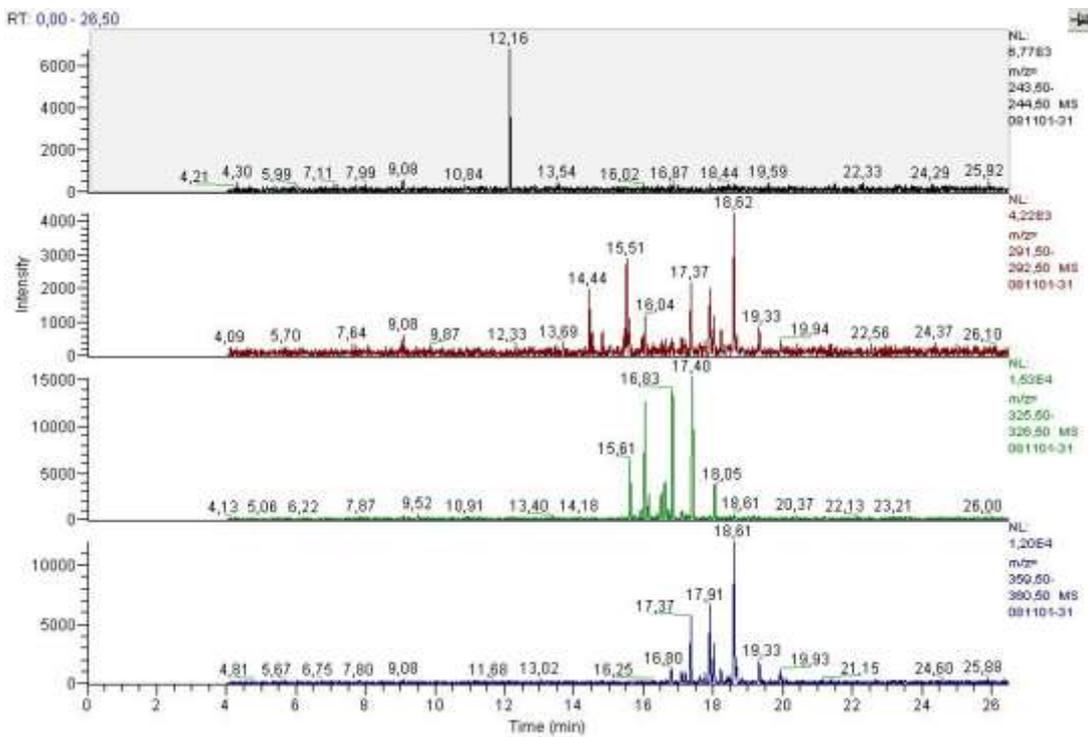


Figure 100 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté CJ2. Expérimentation biphényle.

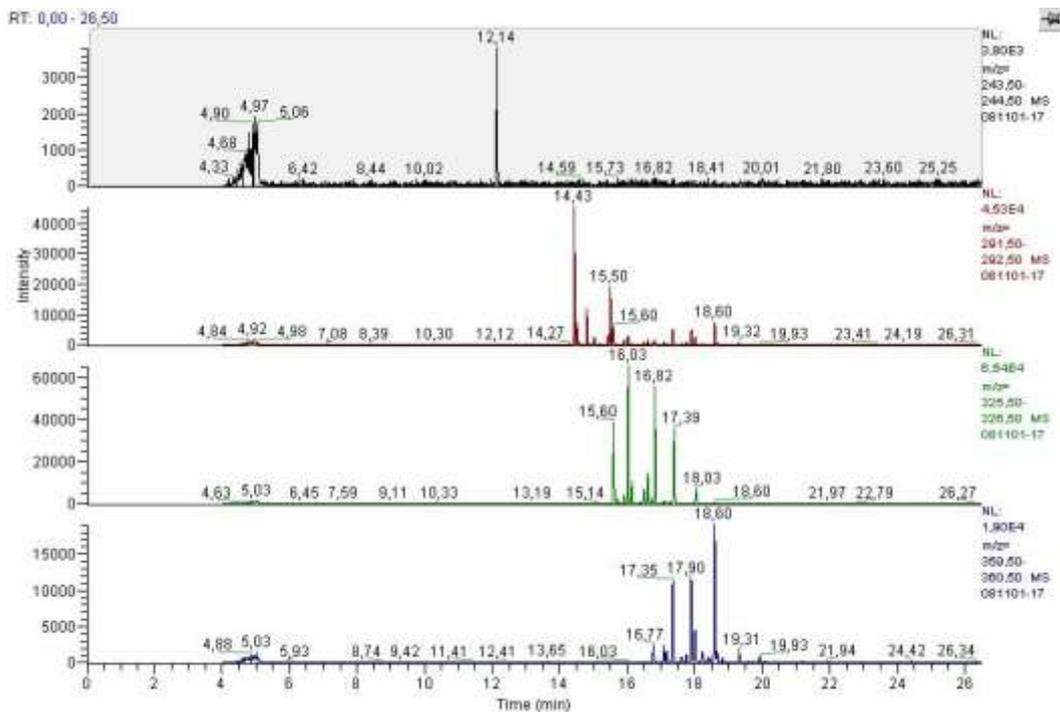


Figure 101 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté CJ2. Expérimentation carvone.

Annexe III.5 – Chromatogramme de l'expérimentation en milieu liquide pour la communauté CJ3.

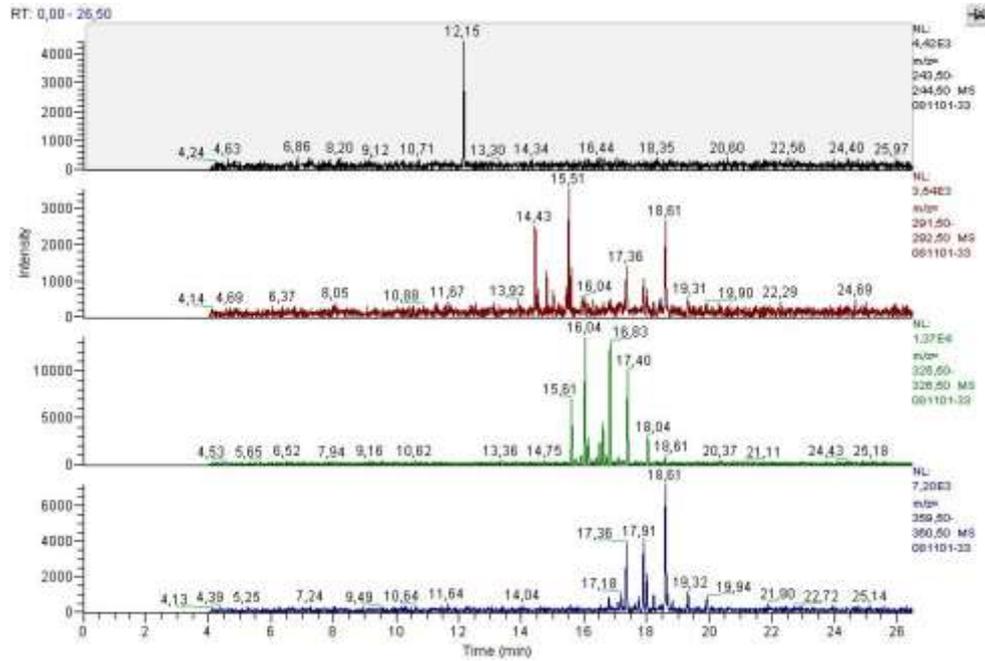


Figure 102 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté CJ3. Expérimentation biphényle.

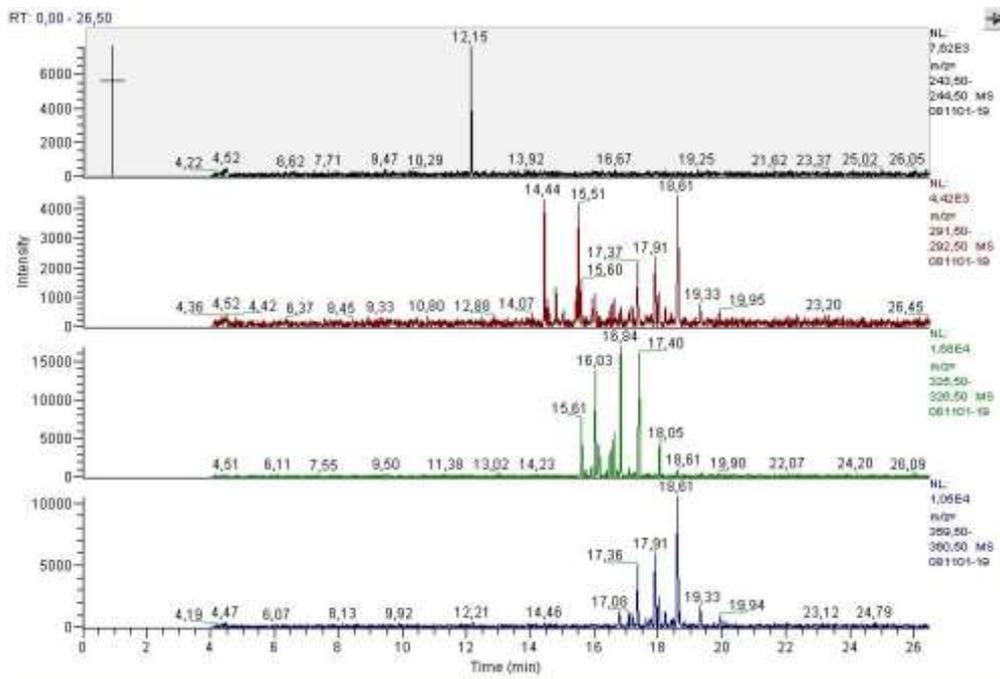
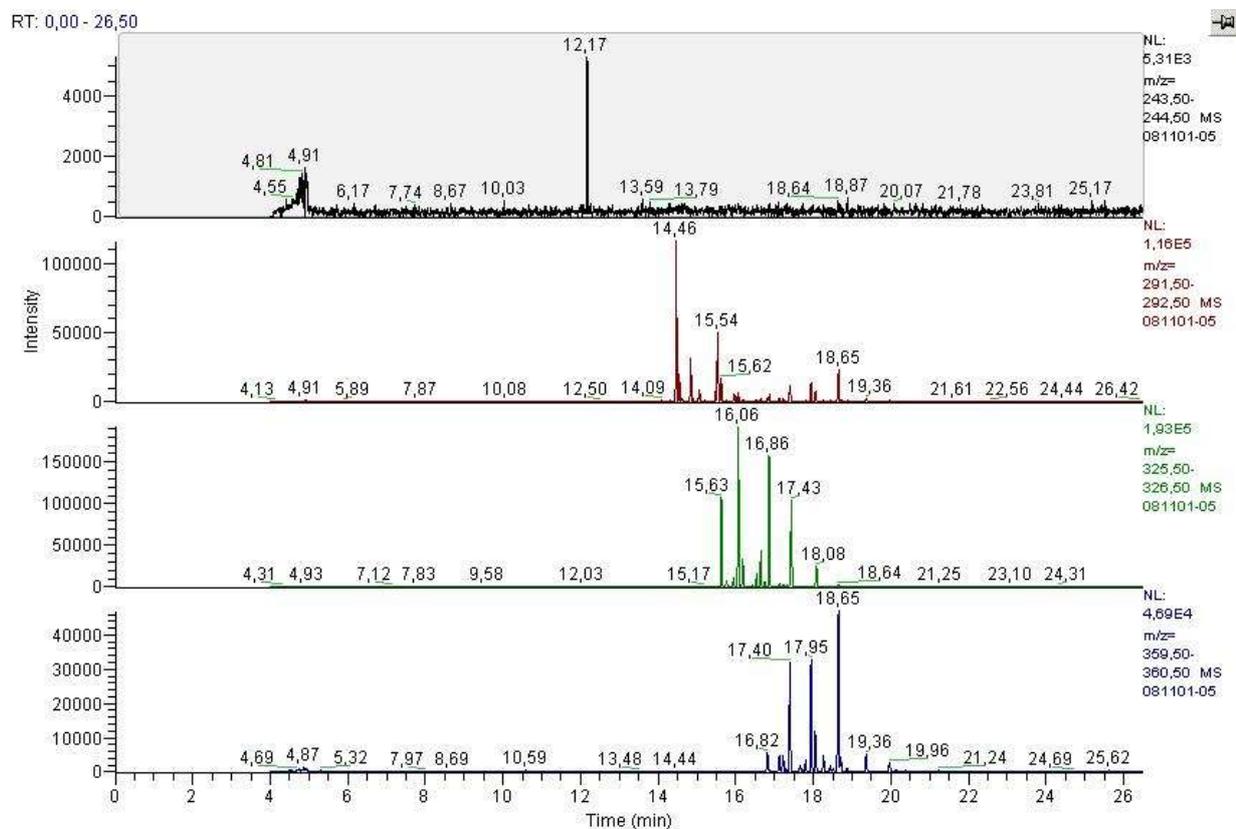


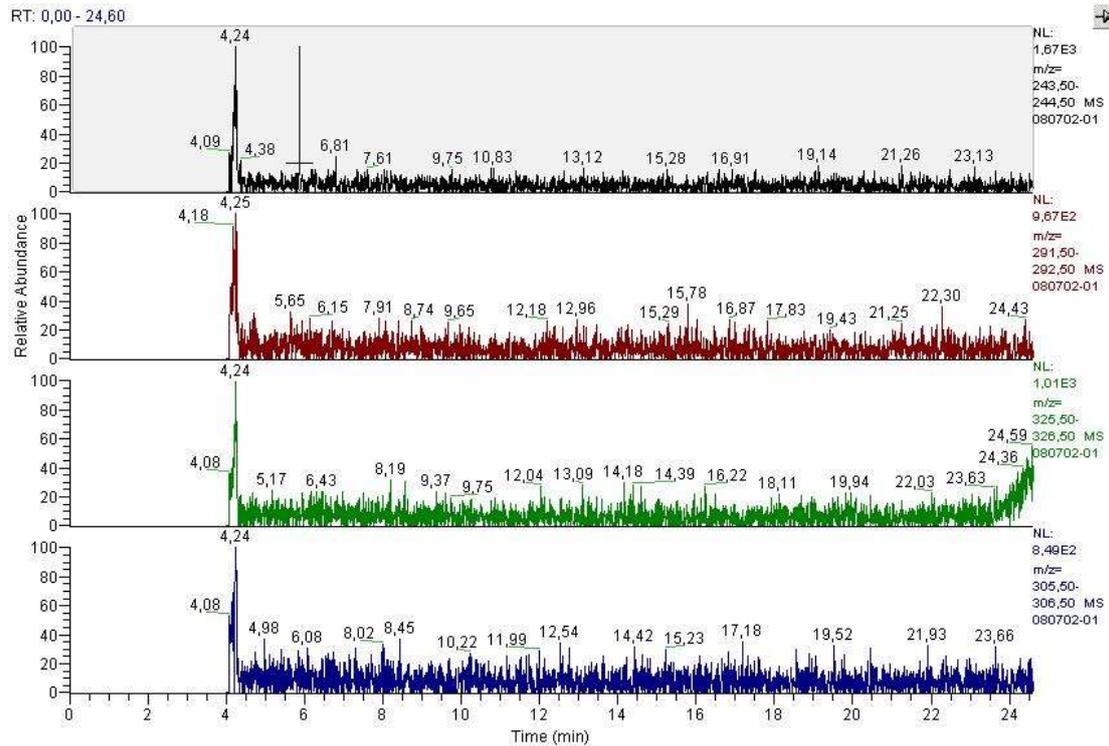
Figure 103 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté CJ3. Expérimentation carbone.

# Annexe III.6 – Chromatogramme de l'expérimentation en milieu liquide pour la communauté RH030.

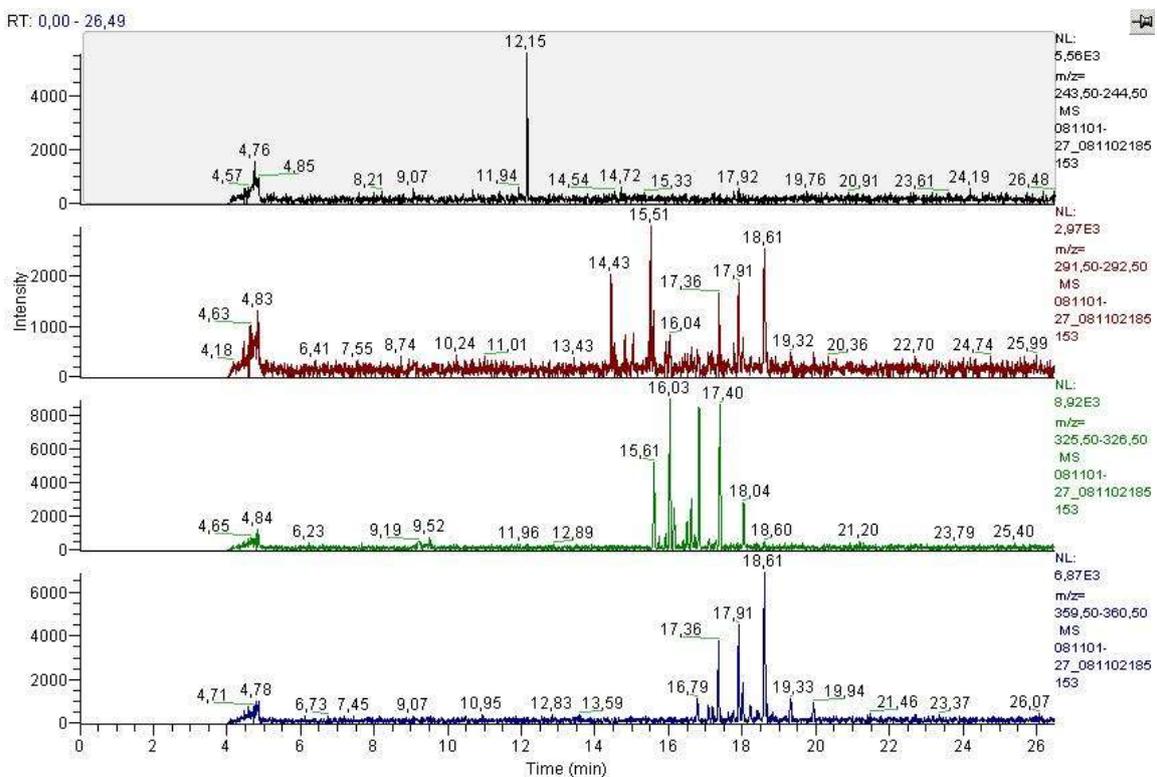


**Figure 104 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté RH030. Expérimentation biphenyle.**

# Annexe III.7 – Chromatogramme de l'expérimentation en milieu liquide pour la communauté RH050.

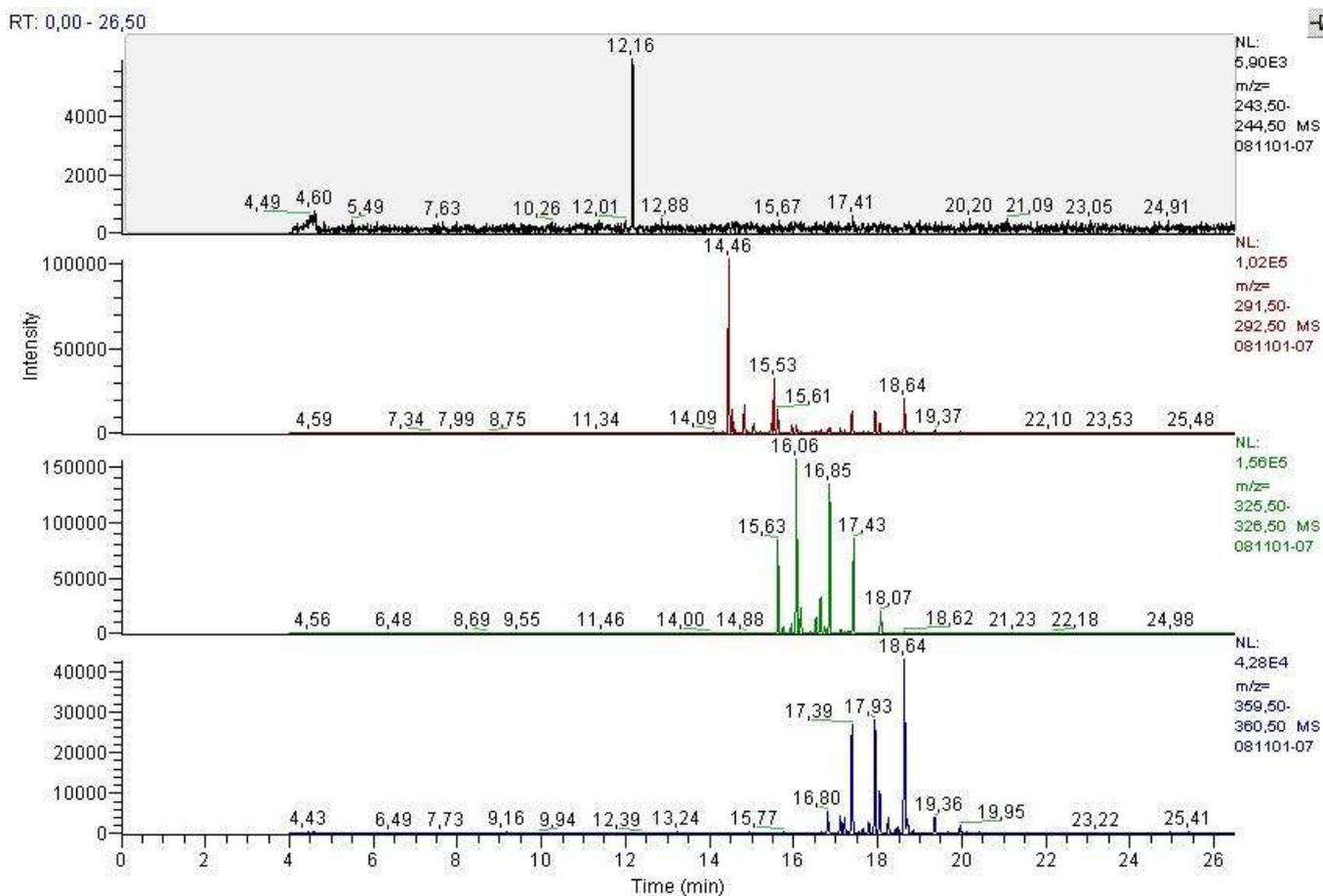


**Figure 105 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté RH050. Expérimentation biphenyle.**



**Figure 106 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté RH050. Expérimentation carvone.**

# Annexe III.8 – Chromatogramme de l'expérimentation en milieu liquide pour la communauté RH110.



**Figure 107 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté RH110. Expérimentation biphenyle.**

## Annexe III.9 – Dosage des PCB dans l'expérimentation de traitement séquentiel.

### **Matériels**

Les réactifs utilisés pour ce dosage sont les mêmes que ceux présentés dans l'annexe II.2.

### **Méthodes**

#### Extraction liquide – solide

Sur les échantillons de sol, 20 g de sol sec sont pesés précisément et disposés dans un tube à centrifugation en verre de 100 mL. Quinze mL d'eau distillée et quinze mL d'acétone sont ajoutés. Les tubes sont agités manuellement vigoureusement pendant 5 min afin de désolidariser les agrégats. Trente mL d'hexane sont ajoutés. Les tubes sont placés sur une table d'agitation va et vient à 230 mouvements par min pendant 30 min. Ils sont ensuite centrifugés à température ambiante, à 4200 rotations par min pendant 5 min. La phase hexanique est pipetée avec précaution. L'échantillon subit 3 rinçages similaires pour un volume final d'extrait de 90 mL. Cet extrait est reconcentré par un évaporateur rotatif puis sous un flux d'air jusqu'à un volume de 1 mL. Cent  $\mu\text{L}$  d'une solution de biphenyle à  $1\text{g.L}^{-1}$  dans l'hexane est ajouté comme étalon interne.

#### Analyses

Les extraits hexaniques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse par le laboratoire R&D de l'entreprise Adventus (Ontario, Canada), partenaire de VALGO sur ce projet.

## Annexe IV.1 – Scripts SHELL utilisés par l'ordonnanceur SGE.

```
#!/bin/sh
#$ -M matthieu.sangely@ensiacet.fr
#$ -m abe
#$ -q workq
#$ -l pri_work=1

# Début du programme

rdp_classifier -o 'Nom_du_fichier_de_sortie' -i 'Nom_du_fichier_fasta_de_depart'

#Fin du programme
```

**Figure 108 :** Script SHELL utilisé pour obtenir les classifications par familles avec l'application RDP\_classifier..

```

#!/bin/sh
#$ -M matthieu.sangely@ensiacet.fr
#$ -m e
#$ -q workq
#$ -l pri_work=1
# Début du programme

#Uniformisation des longueurs des séquences
mothur "#screen.seqs(fasta='Nom_du_fichier_fasta_de_depart_1', minlength=280,
maxlength=320)"
mothur "#screen.seqs(fasta='Nom_du_fichier_fasta_de_depart_2', minlength=280,
maxlength=320)"

#Suppression des doublons
mothur "#unique.seqs(fasta='Nom_du_fichier_fasta_épuré_1')"
mothur "#unique.seqs(fasta='Nom_du_fichier_fasta_épuré_2')"

#Fusion des fichiers fasta générés
cat *.good.unique.fasta > jonction.fasta

#Suppression des doublons et genèse d'une liste des doublons.
mothur "#unique.seqs(fasta=jonction.fasta)"

#Extraction des noms originaux des séquences doublons
grep "," jonction.names > jonction.inter
awk -F " " '{print $1}' jonction.inter > jonction.inter.names

#Extraction des séquences correspondantes aux noms des séquences doublons
mothur "#get.seqs(accnos=jonction.inter.names,
fasta='Nom_du_fichier_fasta_de_depart_1')"

#Nettoyage et rangement des fichiers générés
mkdir log
mkdir resultats
mv *log* log/
mv *good* resultats/
mv *pick* resultats/
mv *jonction* resultats/
mv *8mer* resultats/
mv *sh.* log/
rm *bad*

#Fin du programme

```

**Figure 109 : Script SHELL utilisé pour obtenir les intersections de séquences avec le logiciel MOTHUR.**

```

#!/bin/sh
#$ -M matthieu.sangely@ensiacet.fr
#$ -m e
#$ -q workq
#$ -l pri_work=1
# Début du programme

#Alignement des séquences
mothur "#align.seqs(candidate='Nom_du_fichier_fasta_préparé') "

#Filtration des gaps de l'alignement
mothur "#filter.seqs(fasta='Nom_du_fichier_fasta_aligné') "

#Classification avec la base de données SILVA
mothur "#classify.seqs(fasta='Nom_du_fichier_fasta_aligné_filtre',
template=silva.bacteria.fasta, taxonomy=silva.slv.taxonomy) "

#Nettoyage et rangement des fichiers générés
mkdir log
mkdir resultats
mv *log* log/
mv *sh.* log/
mv *8mer* resultats/
mv 'Nom_du_fichier_taxonomie' resultats/
mv 'Nom_du_fichier_taxonomie_résumé' resultats/

#Fin du programme

```

**Figure 110 : Script SHELL utilisé pour identifier des séquences avec le logiciel MOTHUR.**

## Annexe IV.2 – Résultats complets des intersections au niveau des familles.

**Tableau 49 : Intersections des familles entre CJ2F, CJ3F et RH050F.**

Familles communes à CJ2F, CJ3F et RH050F	Familles communes à CJ2F, CJ3F	Familles communes à CJ2F et RH050F	Familles communes à CJ3F et RH050F	Familles propres à CJ2F	Familles propres à CJ3F	Familles propres à RH050F
Acetobacteraceae	Moraxellaceae	Anaerolinaceae	Bacillidae	Cyclobacteriaceae	Amaranthaceae	Alcanivoracaceae
Acidobacteriaceae	Pseudococcidae	Caldilineaceae	Bacteroidaceae	Desulfurococcaceae	Bacillaceae	Dietziaceae
Alcaligenaceae		Legionellaceae	Clostridiales I	Kineosporiaceae	Carnobacteriaceae	Fusobacteriaceae
Bacteriovoracaceae		Methanomicrobiaceae	Clostridiales II	Peptostreptococcaceae	Cellulomonadaceae	Marinilabiaceae
Bdellovibrionaceae		Oceanospirillaceae	Clostridiales III	Rhodobiaceae	Hahellaceae	Mycobacteriaceae
Beijerinckiaceae		Parachlamydiaceae	Coriobacteriaceae		Methanosarcinaceae	Nannocystaceae
Bradyrhizobiaceae		Sinobacteraceae	Desulfobulbaceae		Pelobacteraceae	Nocardiaceae
Burkholderiaceae		Solirubrobacteraceae	Desulfuromonadaceae		Saprosiraceae	Oleiphilaceae
Caulobacteraceae			Erysipelotrichaceae		Sporichthyaceae	Patulibacteraceae
Chromatiaceae			Eubacteriaceae			Phyllanthaceae
Clostridiaceae			Intrasporangiaceae			Prevotellaceae
Comamonadaceae			Lachnospiraceae			Pseudonocardiaceae
Conexibacteraceae			Leptospiraceae			Streptomycetaceae
Coxiellaceae			Methylobacteriaceae			Streptosporangiaceae
Crenotrichaceae			Methylocystaceae			Theaceae
Cryomorphaceae			Micrococaceae			Thermoactinomycetaceae
Cystobacteraceae			Nocardiodaceae			Williamsiaceae
Desulfobacteraceae			Peptococcaceae			Xanthobacteraceae
Diapheromeridae			Porphyromonadaceae			
Ectothiorhodospiraceae			Rhizobiaceae			
Enterobacteriaceae			Simkaniaceae			
Flavobacteriaceae			Spirochaetaceae			
Flexibacteraceae						
Gallionellaceae						
Gemmatimonadaceae						
Geobacteraceae						
Gracilibacteraceae						
Haliangiaceae						
Helicobacteraceae						
Hydrogenophilaceae						
Hyphomicrobiaceae						
Methylococcaceae						
Methylophilaceae						
Microbacteriaceae						
Micromonosporaceae						
Myxococcaceae						
Neisseriaceae						
Nitrosomonadaceae						
Nitrospiraceae						
Oxalobacteraceae						
Paenibacillaceae						
Phyllobacteriaceae						
Planctomycetaceae						
Planococcaceae						
Polyangiaceae						
Pseudomonadaceae						
Rhodobacteraceae						
Rhodocyclaceae						
Rhodospirillaceae						
Rikenellaceae						
Rubrobacteraceae						
Ruminococcaceae						
Sphingobacteriaceae						
Sphingomonadaceae						
Sporolactobacillaceae						
Syntrophaceae						
Syntrophobacteraceae						
Syntrophomonadaceae						
Thermofilaceae						
Veillonellaceae						
Xanthomonadaceae						

**Tableau 50 : Intersection des familles entre CJ2F, CJ2C et CJ2V21.**

Familles communes à CJ2F, CJ2C et CJ2V21	Familles communes à CJ2F, CJ2C	Familles communes à CJ2F et CJ2V21	Familles communes à CJ2C et CJ2V21	Familles propres à CJ2F	Familles propres à CJ2C	Familles propres à CJ2V21
Clostridiaceae	(-)	Acetobacteraceae	Lachnospiraceae	Anaerolinaceae	(-)	Aerococcaceae
Comamonadaceae		Acidobacteriaceae		Bdellovibrionaceae		Bacillaceae
Diapheromeridae		Alcaligenaceae		Beijerinckiaceae		Bacillidae
Enterobacteriaceae		Bacteriovoraceae		Caldilineaceae		Bogoriellaceae
Hydrogenophilaceae		Bradyrhizobiaceae		Chromatiaceae		Brevibacteriaceae
Paenibacillaceae		Burkholderiaceae		Cryomorphaceae		Brucellaceae
Pseudomonadaceae		Caulobacteraceae		Cyclobacteriaceae		Cellulomonadaceae
Ruminococcaceae		Conexibacteraceae		Cystobacteraceae		Clostridiales I
Sporolactobacillaceae		Coxiellaceae		Desulfobacteraceae		Clostridiales II
Syntrophomonadaceae		Crenotrichaceae		Desulfurococcaceae		Clostridiales III
Xanthomonadaceae		Flavobacteriaceae		Ectothiorhodospiraceae		Coriobacteriaceae
		Flexibacteraceae		Gallionellaceae		Corynebacteriaceae
		Geobacteraceae		Gemmatimonadaceae		Encyrtidae
		Graciobacteraceae		Helicobacteraceae		Geodermatophilaceae
		Haliangiaceae		Kineosporiaceae		Intrasporangiaceae
		Hyphomicrobiaceae		Methanomicrobiaceae		Lactobacillaceae
		Legionellaceae		Myxococcaceae		Micrococcaceae
		Methylococcaceae		Neisseriaceae		Mycobacteriaceae
		Methylophilaceae		Nitrosomonadaceae		Nocardioideae
		Microbacteriaceae		Nitrospiraceae		Peptococcaceae
		Micromonosporaceae		Peptostreptococcaceae		Procabacteriaceae
		Moraxellaceae		Planctomycetaceae		Pseudonocardiaceae
		Oceanospirillaceae		Rikenellaceae		Staphylococcaceae
		Oxalobacteraceae		Solirubrobacteraceae		Streptomycetaceae
		Parachlamydiaceae		Syntrophaceae		Streptosporangiaceae
		Phyllobacteriaceae		Syntrophobacteraceae		Thermoanaerobacteraceae
		Planococcaceae		Thermofilaceae		Thermoanaerobacterales
		Polyangiaceae				Vibrionaceae
		Pseudococcidae				
		Rhodobacteraceae				
		Rhodobiaceae				
		Rhodocyclaceae				
		Rhodospirillaceae				
		Rubrobacteraceae				
		Sinobacteraceae				
		Sphingobacteriaceae				
		Sphingomonadaceae				
		Veillonellaceae				

Tableau 51 : Intersection des familles entre CJ2V21 et RH050\_SAT.

Familles communes à CJ2V21 et RH050_SAT	Familles propres à CJ2V21	Familles propres à RH050_SAT
Bacillidae	Acetobacteraceae	Alicyclobacillaceae
Clostridiaceae	Acidobacteriaceae	Bifidobacteriaceae
Diapheromeridae	Aerococcaceae	Methylobacteriaceae
Enterobacteriaceae	Alcaligenaceae	
Flavobacteriaceae	Bacillaceae	
Hyphomicrobiaceae	Bacteriovoraceae	
Micromonosporaceae	Bogoriellaceae	
Paenibacillaceae	Bradyrhizobiaceae	
Planococcaceae	Brevibacteriaceae	
Pseudomonadaceae	Brucellaceae	
Sporolactobacillaceae	Burkholderiaceae	
Thermoanaerobacterales	Caulobacteraceae	
	Cellulomonadaceae	
	Clostridiales I	
	Clostridiales II	
	Clostridiales III	
	Comamonadaceae	
	Conexibacteraceae	
	Coriobacteriaceae	
	Corynebacteriaceae	
	Coxiellaceae	
	Crenotrichaceae	
	Encyrtidae	
	Flexibacteraceae	
	Geobacteraceae	
	Geodermatophilaceae	
	Graciibacteraceae	
	Haliangiaceae	
	Hydrogenophilaceae	
	Intrasporangiaceae	
	Lachnospiraceae	
	Lactobacillaceae	
	Legionellaceae	
	Methylococcaceae	
	Methylophilaceae	
	Microbacteriaceae	
	Micrococcaceae	
	Moraxellaceae	
	Mycobacteriaceae	
	Nocardiodaceae	
	Oceanospirillaceae	
	Oxalobacteraceae	
	Parachlamydiaceae	
	Peptococcaceae	
	Phyllobacteriaceae	
	Polyangiaceae	
	Procabacteriaceae	
	Pseudococcidae	
	Pseudonocardaceae	
	Rhodobacteraceae	
	Rhodobiaceae	
	Rhodocyclaceae	
	Rhodospirillaceae	
	Rubrobacteraceae	
	Ruminococcaceae	
	Sinobacteraceae	
	Sphingobacteriaceae	
	Sphingomonadaceae	
	Staphylococcaceae	
	Streptomycetaceae	
	Streptosporangiaceae	
	Syntrophomonadaceae	
	Thermoanaerobacteraceae	
	Veillonellaceae	
	Vibrionaceae	
	Xanthomonadaceae	

## Intersection CJ2F et CJ3F

### **F3RVOPM02HMX09**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(63);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02HVHZQ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(91);Thiobacillus\_denitrificans(91);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GZAOX**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(71);Thiobacillus\_denitrificans(71);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02HR9NY**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(89);uncultured(85);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02FQINN**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(92);uncultured(91);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GEC65**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(93);uncultured(92);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02H3K0B**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(78);Douganella(75);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02F7QNK**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Azospirillum\_et\_rel.(92);Stella(63);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GMHWI**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(60);Douganella(45);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GNYVR**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(57);Douganella(51);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02H88R4**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(99);Burkholderiales(62);Burkholderia(60);Limnobacter(60);uncultured(59);unclassified;

### **F3RVOPM02IMRW2**

Bacteria(100);Bacteroidetes-Chlorobi(100);Bacteroidetes(100);Flavobacteriaceae\_1(100);Flavobacterium(100);Flavobacterium\_limicola\_et\_rel.(98);unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02HTRSV**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(90);uncultured(89);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02F824M**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(95);uncultured(92);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02FRON0**

Bacteria(100);Nitrospirae(97);Magnetobacterium(97);uncultured(97);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02HB8ZX**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(64);Douganella(64);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02J0UB4**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(67);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02G3TQX**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Acidovorax(73);Acidovorax\_delafieldii(73);

### **F3RVOPM02GJZZ6**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(71);Thiobacillus\_denitrificans(71);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02FPEQJ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(99);Spirillum\_et\_rel.(70);Thiobacillus\_denitrificans(70);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GD XEP**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(74);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02FOTCO**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(99);Gallionella(58);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GY5Z9**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(65);Douganella(61);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JC16A**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(99);Betaproteobacteria(99);Spirillum\_et\_rel.(75);Thiobacillus\_denitrificans(75);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02FW9JA**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(89);Thiobacillus\_denitrificans(89);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02I8XE8**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(88);Thiobacillus\_denitrificans(88);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JBEP3**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(68);Douganella(61);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HY2EH**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Azospirillum\_et\_rel.(91);Stella(52);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HU3U0**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(96);Thiobacillus\_denitrificans(96);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HVSFO**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(97);Thiobacillus\_denitrificans(97);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GU5HW**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(99);Azospirillum\_et\_rel.(86);Stella(57);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02F3OD3**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(72);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HHTQ4**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(89);Thiobacillus\_denitrificans(89);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IPQNG**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(93);uncultured(91);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IHE98**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(94);uncultured(93);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02H20XQ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(68);Douganella(65);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HTA29**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(71);Thiobacillus\_denitrificans(71);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JIGT3**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(88);Thiobacillus\_denitrificans(88);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IGZ69**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(93);uncultured(92);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JMJGL**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(95);Thiobacillus\_denitrificans(95);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02F5QMC**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Azospirillum\_et\_rel.(89);Stella(59);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02G9FFR**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Variovorax(43);unclassified;

**F3RVOPM02FTGKV**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(23);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02J4G5I**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(98);Azospirillum\_et\_rel.(90);Stella(57);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02G91IB**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(72);Douganella(62);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GWJSR**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(89);Thiobacillus\_denitrificans(89);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02FUICJ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(93);uncultured(90);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02H6OQG**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(66);Douganella(62);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JDNEJ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(92);uncultured(88);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JNNGU**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(77);Thiobacillus\_denitrificans(77);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HUNP8**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);uncultured\_Betaproteobacteria(44);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GGWJX**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(93);uncultured(91);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GV9YC**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Sterolibacterium(57);uncultured(58);uncultured(60);unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GSF1O**

Bacteria(100);Bacteroidetes-Chlorobi(100);Bacteroidetes(100);Sphingobacteriaceae(100);uncultured(100);uncultured(100);unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02FXX5H**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(70);Thiobacillus\_denitrificans(70);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02H9CPM**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(94);uncultured(94);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HT64D**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(90);Thiobacillus\_denitrificans(90);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JRR5M**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Variovorax(33);unclassified;

## Intersection CJ2F et RH050F

### **F3RVOPM02I7PI9**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(77);Thiobacillus\_denitrificans(77);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GUF8L**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(30);Thiobacillus\_denitrificans(30);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02HCNIZ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(99);Spirillum\_et\_rel.(75);Thiobacillus\_denitrificans(75);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02I013C**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Azospirillum\_et\_rel.(89);Stella(71);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GZAOX**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(99);Spirillum\_et\_rel.(72);Thiobacillus\_denitrificans(72);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02H7WED**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(99);Spirillum\_et\_rel.(71);Thiobacillus\_denitrificans(71);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02ID56U**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Methylophilaceae(43);uncultured(51);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02JC1SI**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Methylophilaceae(37);uncultured(39);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02JJ1C7**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(88);uncultured(87);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02HT006**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Methylophilaceae(44);uncultured(43);uncultured(32);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02I5CJY**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Methylophilaceae(40);uncultured(39);uncultured(33);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02IK9S5**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(81);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GIC69**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganelia(59);uncultured(53);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02JCSXJ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(33);Thiobacillus\_denitrificans(33);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02FYRUB**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Azospirillum\_et\_rel.(95);Stella(72);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02H3K0B**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganelia(66);Douganelia(64);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02F7QNK**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(98);Azospirillum\_et\_rel.(88);Stella(61);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02H2QG4**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(96);uncultured(96);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02I0KIE**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Azospirillum\_et\_rel.(92);Stella(70);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GQPQG**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Lysobacter\_et\_rel.(100);uncultured(100);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02HZZA5**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadaceae(62);Sandaracinobacter(26);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02ITQJZ**

Bacteria(100);Bacteroidetes-Chlorobi(100);Bacteroidetes(100);Chitinophaga-Flavobacterium-Flexibacter(100);uncultured(46);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GNYVR**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(65);Douganella(56);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02I878E**

Bacteria(100);Gemmatimonadetes(75);Gemmatimonas(74);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IC3L9**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Methylophilaceae(40);uncultured(44);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02FZTIIH**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Azospirillum\_et\_rel.(88);Stella(61);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HNVIO**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Gammaproteobacteria\_2(100);Nevskia-Hydrogenophaga(100);uncultured(95);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HGFFS**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(99);Spirillum\_et\_rel.(73);Thiobacillus\_denitrificans(73);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HRXYM**

Bacteria(100);Nitrospirae(99);Magnetobacterium(99);uncultured(98);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JIFJ**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadaceae(53);Sandaracinobacter(22);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02G3TQX**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Acidovorax(80);Acidovorax\_delafieldii(80);unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02F3GF6**

Bacteria(100);Bacteroidetes-Chlorobi(100);Bacteroidetes(100);Flexibacter\_flexilis(100);uncultured(100);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02H1GH8**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(67);Douganella(65);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GJZZ6**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(99);Spirillum\_et\_rel.(71);Thiobacillus\_denitrificans(71);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02I3VPE**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(74);Thiobacillus\_denitrificans(74);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02FPEQJ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(71);Thiobacillus\_denitrificans(71);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02J1NTX**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Azospirillum\_et\_rel.(91);Stella(67);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JKOKS**

Bacteria(100);Epsilonproteobacteria(100);Helicobacteraceae(100);Sulfurimonas-Thiomicrospira(100);uncultured(100);uncultured(100);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GBRGX**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(77);Thiobacillus\_denitrificans(77);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JC16A**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(75);Thiobacillus\_denitrificans(75);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02H8FDW**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Azospirillum\_et\_rel.(87);Stella(68);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HWPBF**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(98);Spirillum\_et\_rel.(67);Thiobacillus\_denitrificans(67);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02I4V05**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(73);Thiobacillus\_denitrificans(73);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02H63GC**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(74);Thiobacillus\_denitrificans(74);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GK4EX**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Methylophilaceae(42);uncultured(47);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02FYVT8**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(77);Gammaproteobacteria\_2(60);Nitrosococcus\_et\_rel.(48);uncultured(32);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IQGK**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(71);Thiobacillus\_denitrificans(71);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JM3IR**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(99);Betaproteobacteria(99);Douganelia(54);uncultured(50);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HWTDK**

Bacteria(100);Deltaproteobacteria(93);Desulfobacterium\_anilini(78);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IH6HS**

Bacteria(100);Nitrospirae(100);Magnetobacterium(100);uncultured(97);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HWNTY**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(70);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02F3XWW**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganelia(69);Douganelia(67);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JBEP3**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganelia(73);Douganelia(65);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02H7F9A**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Gammaproteobacteria\_1(78);Pseudomonadales\_4(61);Pseudomonas\_fluorescens\_et\_rel.(61);Pseudomonas\_tolaasii\_et\_rel.(61);Pseudomonas\_putida\_et\_rel.(61);Pseudomonas\_aeruginosa\_et\_rel.(61);Pseudomonas\_indica\_et\_rel.(49);uncultured(47);

**F3RVOPM02GTZLM**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Methylophilaceae(38);uncultured(42);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GU5HW**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Azospirillum\_et\_rel.(91);Stella(60);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IP3OA**

Bacteria(100);Epsilonproteobacteria(100);Helicobacteraceae(100);Sulfurimonas-Thiomicrospira(100);uncultured(100);uncultured(100);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02F0QWF**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(66);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IU5Q1**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(61);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02G6ZJM**

Bacteria(100);Actinobacteria(100);Sporichthya(96);uncultured(96);uncultured(96);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JU9RJ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(68);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02J4I4M**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(92);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02I25UK**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);uncultured\_Betaproteobacteria(97);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02FQC4T**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(89);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GCUK3**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(73);Thiobacillus\_denitrificans(73);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HDH7O**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(77);Gammaproteobacteria\_2(65);Nitrosococcus\_et\_rel.(53);uncultured(29);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JATDM**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(74);Douganella(62);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GOQ20**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(77);Douganella(70);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IC3PI**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Acidovorax(67);Acidovorax\_delafieldii(67);unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02FUMYS**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(36);Thiobacillus\_denitrificans(36);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HB9O5**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Azospirillum\_et\_rel.(88);Stella(56);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GGL63**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(88);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GG48J**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(51);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GWJSR**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(91);Thiobacillus\_denitrificans(91);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IEL0S**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(28);Thiobacillus\_denitrificans(28);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HL6XX**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(72);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IHWY5**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(65);Douganella(63);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02I8Z33**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(33);Thiobacillus\_denitrificans(33);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GWRKC**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(80);Gammaproteobacteria\_2(55);Nitrosococcus\_et\_rel.(26);uncultured(47);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GIRIG**

Bacteria(100);Bacteroidetes-Chlorobi(100);Bacteroidetes(100);Felixbacter\_flexilis(99);uncultured(99);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GAPSQ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(63);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JQNV1**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(41);Thiobacillus\_denitrificans(41);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02H9CRJ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(61);Douganella(54);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02F6RM2**

Bacteria(100);Deltaproteobacteria(94);Desulfobacterium\_anilini(78);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02I7CQ9**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Acidovorax(46);Acidovorax\_delafieldii(45);unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HNCWU**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(86);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IIX8P**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(98);Azospirillum\_et\_rel.(83);Stella(55);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GNJZU**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(98);Azospirillum\_et\_rel.(87);Stella(64);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02I85LN**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Methylophilaceae(45);uncultured(47);uncultured(36);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

## Intersections CJ2F et CJ2C

### **F3RVOPM02GGUPY**

Bacteria(100);Firmicutes(97);Bacillales\_Mollicutes(95);Bacillus\_alcalophilues\_et\_rel.(63);Sporolactobacillus\_et\_rel.(54);unclassified;

### **F3RVOPM02F2EFY**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(72);Thiobacillus\_denitrificans(72);unclassified;

### **F3RVOPM02JBNFY**

Bacteria(100);Firmicutes(98);Bacillales\_Mollicutes(95);Bacillus\_alcalophilues\_et\_rel.(49);Sporolactobacillus\_et\_rel.(45);unclassified;

### **F3RVOPM02HSO61**

Bacteria(100);Firmicutes(97);Bacillales\_Mollicutes(95);Bacillus\_alcalophilues\_et\_rel.(69);Sporolactobacillus\_et\_rel.(61);unclassified;

### **F3RVOPM02F82LL**

Bacteria(100);Firmicutes(99);Bacillales\_Mollicutes(95);Bacillus\_alcalophilues\_et\_rel.(71);Sporolactobacillus\_et\_rel.(59);unclassified;

### **F3RVOPM02GU5FL**

Bacteria(100);Firmicutes(99);Bacillales\_Mollicutes(98);Bacillus\_alcalophilues\_et\_rel.(66);Sporolactobacillus\_et\_rel.(58);unclassified;

### **F3RVOPM02JBKOS**

Bacteria(100);Firmicutes(99);Bacillales\_Mollicutes(98);Bacillus\_alcalophilues\_et\_rel.(61);Sporolactobacillus\_et\_rel.(54);unclassified;

### **F3RVOPM02GOVJN**

Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacillales\_Mollicutes(99);Bacillus\_alcalophilues\_et\_rel.(68);Sporolactobacillus\_et\_rel.(61);unclassified;

### **F3RVOPM02JYFY8**

Bacteria(100);Firmicutes(99);Bacillales\_Mollicutes(99);Bacillus\_alcalophilues\_et\_rel.(68);Sporolactobacillus\_et\_rel.(56);unclassified;

### **F3RVOPM02HHZE4**

Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacillales\_Mollicutes(96);Bacillus\_alcalophilues\_et\_rel.(62);Sporolactobacillus\_et\_rel.(52);unclassified;

### **F3RVOPM02ISMWT**

Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridiales(98);Ruminococcus\_et\_rel.(98);Ruminococcus\_bromii\_et\_rel.(55);Clostridium\_leptum(55);

### **F3RVOPM02IMWFA**

Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacillales\_Mollicutes(99);Bacillus\_alcalophilues\_et\_rel.(71);Sporolactobacillus\_et\_rel.(66);unclassified;

### **F3RVOPM02F88BT**

Bacteria(100);Firmicutes(94);Bacillales\_Mollicutes(82);Paenibacillus(15);Paenibacillus\_sp(3);unclassified;

### **F3RVOPM02HFSYZ**

Bacteria(100);Firmicutes(99);Bacillales\_Mollicutes(98);Bacillus\_alcalophilues\_et\_rel.(61);Sporolactobacillus\_et\_rel.(51);unclassified;

### **F3RVOPM02J47WW**

Bacteria(100);Firmicutes(95);Bacillales\_Mollicutes(92);Bacillus\_alcalophilues\_et\_rel.(70);Sporolactobacillus\_et\_rel.(62);unclassified;

## Intersections CJ3F et RH050F

### **F3RVOPM02G5OMZ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(99);Thiobacillus\_denitrificans(99);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02IOQTS**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(94);Thiobacillus\_denitrificans(94);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GYIXK**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(97);Thiobacillus\_denitrificans(97);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02I5CKE**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(73);Burkholderia(73);Limnobacter(73);uncultured(70);unclassified;

### **F3RVOPM02JUXY0**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(63);Douganella(54);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02HT62O**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(49);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GLX92**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(90);Thiobacillus\_denitrificans(90);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02H26IH**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(60);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02JTS47**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(72);Thiobacillus\_denitrificans(72);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02J2TCF**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Comamonas\_et\_rel.(100);Acidovorax(79);Acidovorax\_delafieldii(79);

### **F3RVOPM02JGD1Q**

Bacteria(100);Bacteroidetes-Chlorobi(100);Bacteroidetes(100);Flavobacteriaceae\_1(100);Flavobacterium(100);Flavobacterium\_limicola\_et\_rel.(100);unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GXM7L**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(88);Thiobacillus\_denitrificans(88);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02H7NQQ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(96);Thiobacillus\_denitrificans(96);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02JH4TB**

Bacteria(100);Deltaproteobacteria(99);Desulfobacterium\_anilini(83);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02FLFHH**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(94);Thiobacillus\_denitrificans(94);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02JNU7T**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(67);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02HF2ER**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(74);Burkholderia(74);Limnobacter(74);uncultured(74);unclassified;

### **F3RVOPM02IJG15**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(74);Thiobacillus\_denitrificans(74);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02GY3D5**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(99);Thiobacillus\_denitrificans(99);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02JHPQ5**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(75);Douganella(70);unclassified;unclassified;unclassified;

### **F3RVOPM02JHZNP**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(64);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02JNYZN**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(57);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02H7OL5**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Leucothrix-Methylococcaceae(100);Methylococcaceae\_2(100);Methylobacter-Methylomicrobium(100);Methylobacter\_psychrophilus(99);unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02HYY4T**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Spirillum\_et\_rel.(95);Thiobacillus\_denitrificans(95);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02I7GNV**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(60);Douganella(53);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GUZIX**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(58);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GZ4G6**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(97);Spirillum\_et\_rel.(65);Thiobacillus\_denitrificans(65);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02H4YNW**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(98);Spirillum\_et\_rel.(66);Thiobacillus\_denitrificans(66);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02FMYXN**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(100);Azospirillum\_et\_rel.(91);Stella(62);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02IPNGJ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(61);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02FYS3X**

Bacteria(100);Alphaproteobacteria(97);Azospirillum\_et\_rel.(83);Stella(56);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02H5P1K**

Bacteria(100);Epsilonproteobacteria(100);Helicobacteraceae(100);Sulfurimonas-Thiomicrospira(100);uncultured(100);uncultured(100);unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02FYK3A**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Douganella(67);Douganella(57);unclassified;unclassified;unclassified;

**F3RVOPM02GMGBZ**

Bacteria(100);Beta\_Gammaproteobacteria(100);Betaproteobacteria(100);Gallionella(66);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;

Tableau 52 : Résultats d'analyse de la qualité des données brutes de l'analyse de cycle de vie comparant les deux procédés d'aération.

Etape	Donnée	Origine	Fiabilité	Exhaustivité	Corrélation temporelle	Corrélation géographique	Corrélation technologique	Taille de l'échantillon	Incertitude relative de base en % de la valeur	Commentaires	Incertitude relative en % de la valeur	Score de qualité
Aération du sol par pelleteuse	Type de pelleteuse pour l'aération = 5t (exemple Volvo ECR48C)	Valgo (2010)	1	1	1	1	1	1	0,0%	Pelleteuses déjà utilisées par Valgo pour ce genre de chantier donc qualité de la donnée maximale	0,0%	6
	Consommation de Diesel de la pelleteuse 5t = 30L pour 200t de sol par jour	Valgo (2010)	1	1	1	1	1	1	10,0%	Consommation moyenne réelle pour ce type chantier donc qualité de la donnée maximale	10,0%	6
	Nombre de retournements pour l'aération mécanique pour 1 cycle = 4	Sangely <i>et al.</i> (2010)	2	1	1	1	1	1	10,0%	Nombre de retournements prévus par Valgo donc la qualité de la donnée est très bonne	10,3%	7
Aération du sol par compresseur	Type de compresseur = souffleuse de puissance électrique 11 kW	Valgo (2010)	2	2	1	1	1	4	10,0%	La puissance du compresseur correspond au type de compresseur qui sera probablement commandé par Valgo, donc la qualité de la donnée est moyenne	11,6%	11
	Durée d'utilisation du compresseur = 25% du temps aérobie = 540h	Sangely <i>et al.</i> (2010)	2	5	1	1	1	4	33,0%	La durée d'utilisation devra être ajustée en fonction du réel fonctionnement du pilote car elle reste basée sur des hypothèses, donc la qualité de la donnée est moyenne	35,5%	14

Tableau 53 : Résultats d'analyse de la qualité du choix des données d'inventaire d'Ecoinvent de l'analyse de cycle de vie comparant les deux procédés d'aération.

Etape	Donnée	Origine	Fiabilité	Exhaustivité	Corrélation temporelle	Corrélation géographique	Corrélation technologique	Taille de l'échantillon	Incertitude de base	Commentaires	Incertitude relative en % de la valeur	Score de qualité
Production Diesel	intrants et émissions de l'ICV	Jungbluth (2007)	1	1	1	1	1	1	nc	La production de diesel distribué en France est connue donc la qualité de la donnée est supposée maximale	2,5%	6
Emissions directes de la phase d'opération d'une pelleteuse	intrants et émissions de l'ICV	Kellenberger (2007)	1	1	1	1	4	1	nc	Les données correspondent à une pelleteuse de 15 tonnes et non 5 tonnes donc la qualité des données est bonne mais pas maximale	22,7%	9
Production d'électricité basse tension en France	intrants et émissions de l'ICV	Frischknecht (2007b)	1	1	1	1	1	1	nc	L'électricité utilisée est connue et provient du réseau français dont les émissions sont connues donc la qualité de la donnée est maximale	2,5%	6

**Tableau 54 : Résultats d'analyse de la qualité des données brutes de l'analyse de cycle de vie comparant deux procédés de dépollution de sol contaminé par des PCB. Procédé de dépollution biologique.**

Etape	Donnée	Origine	Fiabilité	Exhaustivité	Corrélation temporelle	Corrélation géographique	Corrélation technologique	Taille de l'échantillon	Incertitude de base en % de la valeur	Commentaires	Score de qualité	Incertitude totale sur les données en % de la valeur
Transport sol pollué du site d'excavation vers le site de dépollution biologique	Distance Lyon - Lacq = 450km	Google Map	1	1	1	1	1	1	0,1%	Distance variable selon l'emplacement du site, mais très précise avec n'importe quelle carte, donc la qualité de la donnée est maximale	6	0,1%
	Type de camion benne = 40t (PTRA) (exemple Mercedes Actros 3335 Bi-benne) (15t + 25t charge utile)	Valgo (2010)	1	1	1	1	1	1	0,0%	Camions déjà utilisés par Valgo pour ce genre de chantier donc qualité de la donnée maximale	6	0,0%
Mise en place du sol	Type de pelleteuse pour la mise en place du sol = 20t (exemple Volvo EW180C)	Valgo (2010)	1	1	1	1	1	1	0,0%	Pelleteuses déjà utilisées par Valgo pour ce genre de chantier donc qualité de la donnée maximale	6	0,0%
	Consommation de Diesel de la pelleteuse 20t = 80L pour 600t de sol par jour	Valgo (2010)	1	1	1	1	1	1	10,0%	Consommation moyenne réelle pour ce type de chantier donc qualité de la donnée maximale	6	10,0%
	Durée de la mise en place du sol = 0,5 jour de mise en place + 0,25 jour de régalage	Valgo (2010)	1	1	1	1	1	1	10,0%	Durée moyenne réellement rencontrée par Valgo pour ce type de chantier donc la qualité de la donnée est maximale	6	10,0%
	Type de bâche = Polyane (polyéthylène basse densité)	Valgo (2010)	1	1	1	1	1	1	0,0%	Bâche déjà utilisée par Valgo sur ce type de chantier donc qualité de la donnée maximale	6	0,0%
	Surface au sol du biotertre = 200 m <sup>2</sup> pour 600t	Valgo (2010)	1	1	1	1	1	1	2,5%	Surface mesurée précisément par Valgo, donc qualité de la donnée maximale	6	2,5%
	Epaisseur de bâche du dessous et bâche du dessus = 3 mm et 1 mm respectivement	Valgo (2010)	1	1	1	1	1	1	2,5%	Epaisseur donnée par l'industriel qui produit la bâche donc donnée de qualité maximale	6	2,5%
	Volume de bâche donc de LDPE = 200m <sup>2</sup> *0,003m + 1,2*200m <sup>2</sup> *0,001m soit 0,84m <sup>3</sup>	Valgo (2010)	2	1	1	1	1	1	18,0%	Un coefficient de majoration de 1,2 estimé par des experts de Valgo tient compte du surplus de bâche du dessus nécessaire pour entourer le biotertre; les autres données sont des données techniques et réelles donc quasiment exactes; ainsi la qualité de cette donnée de volume est très bonne	7	18,2%
	Densité du LDPE = 0,92			1	1	1	1	1	1	0,1%	La densité de ce corps pur est une donnée technique précise donc la qualité de la donnée est maximale	6
Quantité d'eau du réseau mélangée au sol = 300L/t	Sangely <i>et al.</i> (2010)	2	2	1	3	1	1	33,3%	La teneur en eau d'un sol étant variable, la donnée est une moyenne empirique établie par Valgo donc la qualité de la donnée est bonne	10	33,5%	

**Tableau 3 : Résultats d'analyse de la qualité des données brutes de l'analyse de cycle de vie comparant deux procédés de dépollution de sol contaminé par des PCB. Procédé de dépollution biologique (suite).**

Etape	Donnée	Origine	Fiabilité	Exhaustivité	Corrélation temporelle	Corrélation géographique	Corrélation technologique	Taille de l'échantillon	Incertitude de base en % de la valeur	Commentaires	Score de qualité	Incertitude totale sur les données en % de la valeur
Aération du sol par compresseur	Quantité d'azote injectée dans le sol = 3g/kg de sol	Sangely <i>et al.</i> (2010)	2	1	1	1	1	10,0%		La valeur moyenne d'azote à ajouter est presque toujours la même d'après l'expérience de Valgo donc la qualité de la donnée est très bonne	7	10,3%
	Type de compresseur = souffleuse de puissance électrique 11 kW	Valgo (2010)	2	2	1	1	1	4	10,0%	La puissance du compresseur correspond au type de compresseur qui sera probablement commandé par Valgo, donc la qualité de la donnée est moyenne	11	11,6%
Démantèlement du sol	Durée d'utilisation du compresseur = 25% du temps aérobic = 540h	Sangely <i>et al.</i> (2010)	2	5	1	1	1	4	33,0%	La durée d'utilisation devra être ajustée en fonction du réel fonctionnement du pilote car elle reste basée sur des hypothèses, donc la qualité de la donnée est moyenne	14	35,5%
	Durée du démantèlement par la pelleuse 20t = 1 jour	Valgo (2010)	1	1	1	1	1	1	5,0%	Durée moyenne réellement rencontrée par Valgo pour ce type de chantier donc la qualité de la donnée est maximale	6	5,0%
Transport du sol dépollué du site de bioremédiation vers le CET 1	Distance Lacq - Graulhet = 290km	Google Map	1	1	1	1	1	1	0,1%	Distance très précise avec n'importe quelle carte, donc la qualité de la donnée est maximale	6	0,1%
Généralités	Type de camion benne = 40t (PTRA) (exemple Mercedes Actros 3335 Bi-benne) (15t + 25t charge utile)	Valgo (2010)	1	1	1	1	1	1	0,0%	Camions déjà utilisés par Valgo pour ce genre de chantier donc qualité de la donnée maximale	6	0,0%
	Nombre de cycle de traitement pour une dépollution du sol = 3 soit une durée de 9 mois	Sangely <i>et al.</i> (2010)	3	4	1	1	3	4	0,0%	Le nombre de cycles nécessaires pour atteindre les objectifs de dépollution sont hypothétique en fonction des résultats de laboratoires, donc la qualité de la donnée est moyenne	16	13,1%
	Teneur du sol en PCB avant la dépollution = 200 ppm	Sangely <i>et al.</i> (2010)	2	2	1	2	1	1	10,0%	La teneur moyenne en PCB d'un sol pollué est variable mais la moyenne est calculée sur un ensemble de sol donc la qualité de la donnée est bonne	9	10,4%
	Teneur du sol en PCB après la dépollution < 50ppm		1	1	1	1	1	1	0,0%	La valeur limite à ne pas dépasser pour qu'un sol pollué aux PCB soit admis est de 50 ppm donc la qualité de la donnée est maximale	6	0,0%

**Tableau 55 : Résultats d'analyse de la qualité des données brutes de l'analyse de cycle de vie comparant deux procédés de dépollution de sol contaminé par des PCB. Procédé d'incinération.**

Etape	Donnée	Origine	Fiabilité	Exhaustivité	Corrélation temporelle	Corrélation géographique	Corrélation temporelle géographique	Taille de l'échantillon	Incertitude de base en % de la valeur	Score de qualité	Incertitude totale sur les données en % de la valeur
Intrants	Déchets traités = 39454 t/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	1,0%	10	3,7%
	Eau souterraine consommée = 1370000 m3/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	1,0%	10	3,7%
	Eau du réseau consommée = 72900 m3/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	1,0%	10	3,7%
Autres	Quantité de CO <sub>2</sub> émise par la combustion d'un mètre cube de gaz naturel = 1,995 kg	ADEME (2007)	1	1	1	1	1	nc	5,0%	5	5,0%
	Dioxines et furanes = 96,2 mg/an	DRIRE Rhône-Alpes 2003	2	3	1	1	1	nc	22,5%	10	40,2%
Emissions dans l'air	Biphényles polychlorés (dans l'air) (PCB) = 0,2 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	22,5%	10	40,2%
	CO <sub>2</sub> Total = 40400 t/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	2,5%	10	4,3%
	Arsenic et ses composés (As) = 33 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	40,0%	10	40,2%
	Biphényles polychlorés (dans l'eau) (PCB) = 0,14 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	22,5%	10	40,2%
	Cadmium et ses composés (Cd) = 26 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	40,0%	10	40,2%
	Chlorures (Cl total) = 3570000 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	22,5%	10	40,2%
	Composés organohalogénés (AOX) = 2930 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	22,5%	10	40,2%
	Cuivre et ses composés (Cu) = 113 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	40,0%	10	40,2%
	Fluorures (F total) = 6590 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	22,5%	10	40,2%
	Mercure et ses composés (Hg) = 12 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	40,0%	10	40,2%
	Nickel et ses composés (Ni) = 33 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	40,0%	10	40,2%
	Plomb et ses composés (Pb) = 33 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	40,0%	10	40,2%
	Trichlorobenzènes (TCB) = 0,2 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	22,5%	10	40,2%
	Tétrachloroéthylène (PER - perchloroéthylène) = 10 kg/an	IREP (2008)	2	3	1	1	1	nc	22,5%	10	40,2%
	Zinc et ses composés (Zn) = 405 kg/an	IREP (2007)	5	3	1	1	1	nc	40,0%	13	48,2%

**Tableau 56 : Résultats d'analyse de la qualité du choix des données d'inventaire d'Ecoinvent de l'analyse de cycle de vie comparant deux procédés de dépollution de sol contaminé par des PCB. Ensemble des procédés.**

Etape	Donnée	Origine	Fiabilité	Exhaustivité	Corrélation temporelle	Corrélation géographique	Corrélation technologique	Taille de l'échantillon	Incertitude de base en % de la valeur	Commentaires	Score de qualité	Incertitude totale sur les données en % de la valeur
Production Diesel	intrants et émissions de l'ICV	Jungbluth (2007)	1	1	1	1	1	1	nc	La production de diesel distribué en France est connue donc la qualité de la donnée est supposée maximale	6	2,5%
Emissions directes de la phase d'opération d'une pelleteuse	intrants et émissions de l'ICV	Kellenberger (2007)	1	1	1	1	4	1	nc	Les données correspondent à une pelleteuse de 15 tonnes et non 5 tonnes donc la qualité des données est bonne mais pas maximale	9	22,7%
Production d'électricité basse tension en France	intrants et émissions de l'ICV	Frischknecht (2007b)	1	1	1	1	1	1	nc	L'électricité utilisée est connue et provient du réseau français dont les émissions sont connues donc la qualité de la donnée est maximale	6	2,5%
Production de gaz naturel	intrants et émissions de l'ICV	Faist Emmenegger (2007)	1	1	1	1	1	1	nc	La production et l'acheminement du gaz naturel en France sont assimilés aux moyennes européennes	6	2,5%
Production d'eau potable au robinet	intrants et émissions de l'ICV	Althaus (2007)	1	1	1	1	1	1	nc	La production est basée sur la situation Suisse. Le processus de potabilisation est donc semblable	6	2,5%
Production Polyéthylène basse densité	intrants et émissions de l'ICV	Hischier (2007)	1	1	1	1	1	1	nc	Production de LDPE moyenne en Europe donc connue donc la qualité de la donnée est maximale	6	2,5%
Production Nitrate de potassium	intrants et émissions de l'ICV	Nemecek (2007)	1	1	1	1	1	1	nc	Idem	6	2,5%
Emissions directes de la phase d'opération d'un camion	intrants et émissions de l'ICV	Spielmann (2007)	1	1	1	1	1	1	nc	idem	6	41,4%

## Annexe V.2 – Classification des impacts pour les émissions directes.

**Tableau 57 : Classification des impacts des émissions directes pour l'analyse de cycle de vie comparant deux procédés d'aération de sol.**

Substance émise	Catégorie d'impact	Unité de référence
Dioxyde de carbone d'origine fossile, méthane d'origine fossile	Réchauffement global	kg équivalent CO <sub>2</sub>
Ammoniac, Cadmium, Cuivre, dioxines, Nickel, oxydes d'azote, Sélénium, dioxyde de soufre, Zinc, particules fines (> 10 µm)	Toxicité humaine	kg équivalent 1.4-dichlorobenzène
Benzo(a)pyrène, Cadmium, Cuivre, dioxines, Nickel, Sélénium, Zinc	Ecotoxicité terrestre	kg équivalent 1.4-dichlorobenzène
Benzo(a)pyrène, Cadmium, Cuivre, dioxines, Nickel, Sélénium, Zinc	Ecotoxicité aquatique d'eau douce	kg équivalent 1.4-dichlorobenzène
Benzo(a)pyrène, Cadmium, Cuivre, dioxines, Nickel, Sélénium, Zinc	Ecotoxicité aquatique sédimentaire	kg équivalent 1.4-dichlorobenzène
Benzo(a)pyrène, Cadmium, Cuivre, dioxines, Nickel, Sélénium, Zinc	Ecotoxicité aquatique marine	kg équivalent 1.4-dichlorobenzène
Benzo(a)pyrène, Cadmium, Cuivre, dioxines, Nickel, Sélénium, Zinc	Ecotoxicité sédimentaire marine	kg équivalent 1.4-dichlorobenzène
Monoxyde de carbone, méthane	Oxydation photochimique	kg équivalent éthylène
Ammoniac, monoxyde d'azote, oxydes d'azote	Eutrophisation	kg équivalent PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
Ammoniac, monoxyde d'azote, oxydes d'azote, dioxyde de soufre	Acidification	kg équivalent SO <sub>2</sub>

**Tableau 58 : Classification des impacts des émissions directes de l'analyse de cycle de vie comparant deux procédés de dépollution biologique de sol contaminé par des PCB.**

Catégorie d'impact	Substances	Unité de référence
Réchauffement global	Dioxyde de carbone d'origine fossile, méthane d'origine fossile	kg équivalent CO <sub>2</sub>
Toxicité humaine	Ammoniac, Cadmium, Cuivre Chrome, dioxines, Nickel, Zinc, Plomb, Sélénium, Mercure, Chrome VI, oxydes d'azote, dioxyde de soufre, particules fines (> 10 µm), benzène, toluène, formaldéhydes, Ions métalliques (Cadmium, Cuivre, Zinc, Nickel), trichlorobenzène	kg équivalent 1.4-dichlorobenzène
Ecotoxicité terrestre	Cadmium, Cuivre Chrome, dioxines, Nickel, Zinc, Plomb, Sélénium, Mercure, Chrome VI, benzène, toluène, formaldéhydes, Ions métalliques (Cadmium, Cuivre, Zinc, Nickel), trichlorobenzène, tetrachloroéthylène	kg équivalent 1.4-dichlorobenzène
Ecotoxicité aquatique d'eau douce	Cadmium, Cuivre Chrome, dioxines, Nickel, Zinc, Plomb, Sélénium, Mercure, Chrome VI, benzène, toluène, formaldéhydes, Ions métalliques (Cadmium, Cuivre, Zinc, Nickel), trichlorobenzène, tetrachloroéthylène	kg équivalent 1.4-dichlorobenzène
Ecotoxicité aquatique sédimentaire	Cadmium, Cuivre Chrome, dioxines, Nickel, Zinc, Plomb, Sélénium, Mercure, Chrome VI, benzène, toluène, formaldéhydes, Ions métalliques (Cadmium, Cuivre, Zinc, Nickel), trichlorobenzène, tetrachloroéthylène	kg équivalent 1.4-dichlorobenzène
Ecotoxicité aquatique marine	Cadmium, Cuivre Chrome, dioxines, Nickel, Zinc, Plomb, Sélénium, Mercure, Chrome VI, benzène, toluène, formaldéhydes, Ions métalliques (Cadmium, Cuivre, Zinc, Nickel), trichlorobenzène, tetrachloroéthylène	kg équivalent 1.4-dichlorobenzène
Ecotoxicité sédimentaire marine	Cadmium, Cuivre Chrome, dioxines, Nickel, Zinc, Plomb, Sélénium, Mercure, Chrome VI, benzène, toluène, formaldéhydes, Ions métalliques (Cadmium, Cuivre, Zinc, Nickel), trichlorobenzène, tetrachloroéthylène	kg équivalent 1.4-dichlorobenzène
Oxydation photochimique	Monoxyde de carbone d'origine fossile, méthane d'origine fossile, benzène, toluène, formaldéhydes, acétaldéhyde	kg équivalent éthylène
Eutrophisation	Ammoniac, oxyde nitreux, oxydes d'azote	kg équivalent PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
Acidification	Ammoniac, oxydes d'azote, dioxyde de soufre, oxyde nitreux	kg équivalent SO <sub>2</sub>

## Annexe V.3 – Données d'émissions.

**Tableau 59 : Données d'émissions du procédé de dépollution biologique liées à la mise en place du sol sur le site de traitement.**

Substance	Compartment d'émission	quantité (en kg/kg de diesel)*	Mise en place quantité (en kg/unité fonctionnelle)	Démantèlement quantité (en kg/unité fonctionnelle)
Diesel	-	1,0000E+00	5,0400E+01	6,7200E+01
Ammonia	air	1,99E-05	1,0042E-03	1,3389E-03
Benzo(a)pyrene	air	2,99E-08	1,5082E-06	2,0109E-06
Cadmium	air	1,00E-08	5,0400E-07	6,7200E-07
Carbon dioxide, fossil	air	3,11E+00	1,5697E+02	2,0929E+02
Carbon monoxide, fossil	air	1,14E-02	5,7325E-01	7,6434E-01
Chromium	air	4,98E-08	2,5123E-06	3,3497E-06
Copper	air	1,69E-06	8,5411E-05	1,1388E-04
Dinitrogen monoxide	air	1,20E-04	6,0403E-03	8,0537E-03
Dioxins, measured as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	air	5,98E-14	3,0163E-12	4,0217E-12
Heat, waste	air	4,52E+01	2,2776E+03	3,0368E+03
Methane, fossil	air	1,60E-04	8,0409E-03	1,0721E-02
Nickel	air	6,97E-08	3,5126E-06	4,6835E-06
Nitrogen oxides	air	4,40E-02	2,2161E+00	2,9547E+00
NMVOC, non-methane volatile organic compounds, unspecified origin	air	5,16E-03	2,6008E-01	3,4677E-01
PAH, polycyclic aromatic hydrocarbons	air	3,35E-06	1,6890E-04	2,2520E-04
Particulates, < 2.5 um	air	4,02E-03	2,0275E-01	2,7034E-01
Selenium	air	1,00E-08	5,0400E-07	6,7200E-07
Sulfur dioxide	air	1,01E-03	5,0785E-02	6,7713E-02
Zinc	air	1,00E-06	5,0400E-05	6,7200E-05
Particulates, > 10 um	air	2,68E-04	1,3504E-02	1,8005E-02
Particulates, > 2.5 um, and < 10um	air	1,79E-04	9,0027E-03	1,2004E-02

\*Source: Kellenberger 2007

Tableau 60 : Données d'émissions du procédé de dépollution biologique liées aux transports.

Substance	Compartiment d'émission	quantité par tkm	Site pollué vers site de traitement quantité en kg par unité fonctionnelle	Site de traitement vers CET1 quantité en kg par unité fonctionnelle
Diesel		2,1238E-02	9,5572E+03	4,5546E+03
CO2, fossile	air	6,7360E-02	3,0312E+04	1,4446E+04
SO2	air	2,1238E-06	9,5572E-01	4,5546E-01
Cd	air	2,3088E-10	1,0389E-04	4,9513E-05
Cu	air	6,9598E-08	3,1319E-02	1,4926E-02
Cr	air	1,5585E-09	7,0134E-04	3,3423E-04
Ni	air	1,9134E-09	8,6105E-04	4,1035E-04
Zn	air	5,5102E-08	2,4796E-02	1,1817E-02
Pb	air	2,4197E-09	1,0889E-03	5,1892E-04
Se	air	2,1238E-10	9,5572E-05	4,5546E-05
Hg	air	4,2476E-13	1,9114E-07	9,1093E-08
Cr VI	air	2,1238E-12	9,5572E-07	4,5546E-07
CO, fossile	air	4,7382E-06	2,1322E+00	1,0161E+00
Nox	air	2,2988E-04	1,0345E+02	4,9300E+01
Particules < 2,5 µm	air	5,2185E-06	2,3483E+00	1,1191E+00
Particules > 10 µm	air	4,8497E-06	2,1824E+00	1,0401E+00
Particules > 2,5 µm et < 10 µm	air	5,2735E-06	2,3731E+00	1,1309E+00
NMVOC	air	2,7127E-08	1,2207E-02	5,8176E-03
Methane	air	3,9573E-07	1,7808E-01	8,4866E-02
Benzene	air	3,1518E-12	1,4183E-06	6,7592E-07
Toluene	air	2,2063E-11	9,9282E-06	4,7315E-06
Xylène	air	2,7736E-10	1,2481E-04	5,9482E-05
Formaldéhyde	air	2,6475E-09	1,1914E-03	5,6777E-04
Acétaldéhyde	air	1,4404E-09	6,4817E-04	3,0889E-04
NH3	air	4,2812E-07	1,9265E-01	9,1812E-02
N2O	air	2,5704E-06	1,1567E+00	5,5124E-01
HAPs	air	8,5624E-11	3,8531E-05	1,8362E-05
Zn, ion	eau	4,2974E-07	1,9338E-01	9,2160E-02
Cu, ion	eau	1,0183E-08	4,5825E-03	2,1839E-03
Cd, ion	eau	1,5216E-10	6,8473E-05	3,2632E-05
Cr, ion	eau	7,2570E-10	3,2656E-04	1,5563E-04
Ni, ion	eau	1,9664E-09	8,8490E-04	4,2171E-04
Pb	eau	6,2621E-09	2,8180E-03	1,3429E-03
Zn	sol	4,2974E-07	1,9338E-01	9,2160E-02
Cu	sol	1,0183E-08	4,5825E-03	2,1839E-03
Cd	sol	1,5216E-10	6,8473E-05	3,2632E-05
Cr	sol	7,2570E-10	3,2656E-04	1,5563E-04
Ni	sol	1,9664E-09	8,8490E-04	4,2171E-04
Pb	sol	6,2621E-09	2,8180E-03	1,3429E-03

\*Source: Spielmann et al. 2007 (Ecoinvent)

**Tableau 61 : Données d'émissions du traitement thermique liées à l'incinération.**

Substance	Compartiment d'émission	Quantité émise par an en kg*	Quantité émise par unité fonctionnelle en kg
Dioxines et furanes (DRIRE Rhône-Alpes 2003)	air	9,6200E-05	1,4630E-06
Biphényles polychlorés (PCB)	air	2,0000E-01	3,0415E-03
Chlore	air	0,0000E+00	0,0000E+00
CO2 Total	air	4,0400E+07	6,1439E+05
Cuivre et ses composés (Cu)	air	0,0000E+00	0,0000E+00
Fluor et ses composés (F)	air	0,0000E+00	0,0000E+00
Acide cyanhydrique (HCN)	eau	0,0000E+00	0,0000E+00
Arsenic et ses composés (As)	eau	3,3000E+01	5,0185E-01
Benzène	eau	0,0000E+00	0,0000E+00
Biphényles polychlorés (PCB)	eau	1,4000E-01	2,1291E-03
Cadmium et ses composés (Cd)	eau	2,6000E+01	3,9540E-01
Chlore	eau	0,0000E+00	0,0000E+00
Chlorures (Cl total)	eau	3,5700E+06	5,4291E+04
Composés organohalogénés (AOX)	eau	2,9300E+03	4,4558E+01
Cuivre et ses composés (Cu)	eau	1,1300E+02	1,7185E+00
Fluor et ses composés (F)	eau	0,0000E+00	0,0000E+00
Fluorures (F total)	eau	6,5900E+03	1,0022E+02
Manganèse et ses composés (Mn)	eau	0,0000E+00	0,0000E+00
Mercurure et ses composés (Hg)	eau	1,2000E+01	1,8249E-01
Nickel et ses composés (Ni)	eau	3,3000E+01	5,0185E-01
Phénols (Ctotal)	eau	0,0000E+00	0,0000E+00
Plomb et ses composés (Pb)	eau	3,3000E+01	5,0185E-01
Trichlorobenzènes (TCB)	eau	2,0000E-01	3,0415E-03
Tétrachloroéthylène (PER - perchloroéthylène)	eau	1,0000E+01	1,5208E-01
Zinc et ses composés (Zn) (IREP 2007)	eau	4,0500E+02	6,1591E+00

\*source: IREP 2008 (sauf indication contraire)

Tableau 62 : Données d'émissions du traitement thermique liées aux transports.

Substance	Compartiment d'émission	quantité par tkm	Site pollué vers l'incinérateur quantité en kg par unité fonctionnelle	Incinérateur vers CET1 quantité en kg par unité fonctionnelle
Diesel		2,1238E-02	5,0972E+02	2,1408E+03
CO2, fossile	air	6,7360E-02	1,6166E+03	6,7898E+03
SO2	air	2,1238E-06	5,0972E-02	2,1408E-01
Cd	air	2,3088E-10	5,5410E-06	2,3272E-05
Cu	air	6,9598E-08	1,6703E-03	7,0155E-03
Cr	air	1,5585E-09	3,7405E-05	1,5710E-04
Ni	air	1,9134E-09	4,5923E-05	1,9287E-04
Zn	air	5,5102E-08	1,3225E-03	5,5543E-03
Pb	air	2,4197E-09	5,8074E-05	2,4391E-04
Se	air	2,1238E-10	5,0972E-06	2,1408E-05
Hg	air	4,2476E-13	1,0194E-08	4,2816E-08
Cr VI	air	2,1238E-12	5,0972E-08	2,1408E-07
CO, fossile	air	4,7382E-06	1,1372E-01	4,7761E-01
Nox	air	2,2988E-04	5,5172E+00	2,3172E+01
Particules < 2,5 µm	air	5,2185E-06	1,2524E-01	5,2603E-01
Particules > 10 µm	air	4,8497E-06	1,1639E-01	4,8885E-01
Particules > 2,5 µm et < 10 µm	air	5,2735E-06	1,2656E-01	5,3157E-01
NMVOC	air	2,7127E-08	6,5106E-04	2,7344E-03
Methane	air	3,9573E-07	9,4975E-03	3,9889E-02
Benzene	air	3,1518E-12	7,5644E-08	3,1770E-07
Toluene	air	2,2063E-11	5,2951E-07	2,2239E-06
Xylène	air	2,7736E-10	6,6567E-06	2,7958E-05
Formaldéhyde	air	2,6475E-09	6,3540E-05	2,6687E-04
Acétaldéhyde	air	1,4404E-09	3,4569E-05	1,4519E-04
NH3	air	4,2812E-07	1,0275E-02	4,3154E-02
N2O	air	2,5704E-06	6,1690E-02	2,5910E-01
HAPs	air	8,5624E-11	2,0550E-06	8,6309E-06
Zn, ion	eau	4,2974E-07	1,0314E-02	4,3318E-02
Cu, ion	eau	1,0183E-08	2,4440E-04	1,0265E-03
Cd, ion	eau	1,5216E-10	3,6519E-06	1,5338E-05
Cr, ion	eau	7,2570E-10	1,7417E-05	7,3150E-05
Ni, ion	eau	1,9664E-09	4,7195E-05	1,9822E-04
Pb	eau	6,2621E-09	1,5029E-04	6,3122E-04
Zn	sol	4,2974E-07	1,0314E-02	4,3318E-02
Cu	sol	1,0183E-08	2,4440E-04	1,0265E-03
Cd	sol	1,5216E-10	3,6519E-06	1,5338E-05
Cr	sol	7,2570E-10	1,7417E-05	7,3150E-05
Ni	sol	1,9664E-09	4,7195E-05	1,9822E-04
Pb	sol	6,2621E-09	1,5029E-04	6,3122E-04

\*Source: Spielmann et al. 2007 (Ecoinvent)

# **Références bibliographiques**

- Adebusoye, S., Picardal, F., Ilori, M., Amund, O. and Fuqua, C., 2007. Characterization of multiple novel aerobic polychlorinated biphenyl (PCB)-utilizing bacterial strains indigenous to contaminated tropical African soils. *Biodegradation*.
- Adebusoye, S.A., Ilori, M.O., Picardal, F.W. and Amund, O.O., 2008. Extensive biodegradation of polychlorinated biphenyls in Aroclor 1242 and electrical transformer fluid (Askarel) by natural strains of microorganisms indigenous to contaminated African systems. *Chemosphere*.
- ADEME, 2009a. Le guide méthodologique "traitabilité des sols pollués".
- ADEME, 2009b. Taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines pollués en France. Synthèse des données 2006.
- Anders, H.-J., Kaetzke, A., Kampfer, P., Ludwig, W. and Fuchs, G., 1995. Taxonomic Position of Aromatic-Degrading Denitrifying Pseudomonad Strains K 172 and KB 740 and Their Description as New Members of the Genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., Respectively, Members of the Beta Subclass of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol*, 45(2): 327-333.
- Anex, R., 2009. Life Cycle Assessment (LCA) and Environmental Impacts, Intensive program in Biorenewables., Ames, IA.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J.-Y., Wakabayashi, H. and Oyaizu, H., 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1563–1589.
- Aoki, Y., 2001. Polychlorinated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzop-dioxins, and Polychlorinated Dibenzofurans as Endocrine Disrupters--What We Have Learned from Yusho Disease. *Environmental Research*, 86(1): 2-11.
- Ara, I. and Kudo, T., 2007. *Luedemannella* gen. nov., a new member of the family Micromonosporaceae and description of *Luedemannella helvata* sp. nov. and *Luedemannella flava* sp. nov. *J Gen Appl Microbiol*, 53(1): 39-51.
- Babut, M. and Miège, C., 2007. Contamination des poissons et des sédiments du Rhône par les Polychlorobiphényles. Synthèse des données recueillies en 2005-2006. In: P.d.R.-D.d.c.e.d. l'environnement (Editor). CEMAGREF Lyon
- Bae, H., Im, W. and Lee, S., *Lysobacter concretionis* sp. nov., isolated from anaerobic granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor.
- Bartels, F., Backhaus, S., Moore, E.R.B., Timmis, K.N. and Hofer, B., 1999. Occurrence and expression of glutathione-S-transferase encoding *bphK* genes in *Burkholderia* sp. strain LB400 and other biphenyl-utilizing bacteria. *Microbiology*, 145: 2821–2834.
- Baxter, R.A., Gilbert, P.E., Lidgett, R.A., Mainprize, J.H. and Vodden, H.A., 1975. The degradation of polychlorinated biphenyls by micro-organisms. *Science of The Total Environment*, 4(1): 53-61.
- Bedard, D.L., Bailey, J.J., Reiss, B.L. and Van Slyke Jerzak, G., 2006. Development and Characterization of Stable Sediment-Free Anaerobic Bacterial Enrichment Cultures That Dechlorinate Aroclor 1260 Applied and *Environmental Microbiology*, 72(4): 2460–2470.
- Beiles, N., 2000. What monsanto knew., *The Nation*.

- Bender, A. et al., 1998. Life Cycle Assessment for Remedial Action Techniques: Methodology and Application. In: Contaminated Soil 6th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, Edinburgh, pp. 367-376.
- Bernard, A. et al., 2002. The Belgian PCB/Dioxin Incident: Analysis of the Food Chain Contamination and Health Risk Evaluation. *Environmental Research*, 88(1): 1-18.
- Blanc, A., Metivier-Pignon, H., Gourdon, R. and Rousseaux, P., 2004. Life cycle assessment as a tool for controlling the development of technical activities: application to the remediation of a site contaminated by sulfur. *Advances in Environmental Research* 8(3): 613-627.
- Bopp, L.H., 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *Journal of Industrial Microbiology* 1: 23-29.
- Bopp, L.H., 1989. *Pseudomonas putida* capable of degrading PCBs. In: G.E. Company (Editor), USA.
- Borja, J., Taleon, D.M., Auresenia, J. and Gallardo, S., 2005. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochemistry*, 40(6): 1999-2013.
- Brown, J.F. et al., 1987. Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments. *Science*, 236: 709-712.
- Burdsall, H., 1974. *Mycotaxon* 1: 124.
- Burdsall, H., 1985. *Mycologia Memoir* 10: 61-63.
- Cadotte, M., Deschênes, L. and Samson, R., 2007. Selection of a Remediation Scenario for a Diesel-Contaminated Site Using LCA. *International Journal of Life Cycle Assessment*, 12(4): 239 – 251.
- Capodicasa, S. et al., 2009. Terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of biphenyl dioxygenase genes from a polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Research in Microbiology*, 160(10): 742-750.
- Chang, J., Chou, C., Lin, G., Sheu, S. and Chen, W., 2005. *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis*, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity. *Syst Appl Microbiol*, 28(2): 137-44.
- Cole, J.R. et al., 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic acids research*, 35(Database issue): D169-D172.
- Cole, J.R. et al., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research Advance*, 37(Database issue): D141-D145.
- Das, K. and Mukherjee, A.K., 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7): 1339-1345.
- De, S., Perkins, M. and Dutta, S.K., 2006a. Nitrate reductase gene involvement in hexachlorobiphenyl dechlorination by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials*, 135(1-3): 350-354.
- De, S., Perkins, M. and Dutta, S.K., 2006b. Nitrate reductase gene involvement in hexachlorobiphenyl dechlorination by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials B* 135: 350-354.

- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P. and Bally, R., 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(7): 919-927.
- Diamond, M.L., Page, C.A., Campbell, M., McKenna, S. and Lall, R., 1999. Life-cycle framework for assessment of site remediation options: method and generic survey. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(4): 788-800.
- Dietrich, D., Hickey, W.J. and Lamar, R., 1995. Degradation of 4,4'-Dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11): 3904-3909
- Dokoutchaïev, V.V., 1883. Russian Chernozem, Selected Works of V.V. Dokuchaev. Israel Program for Scientific Translations Ltd., pp. 14-419.
- Drinker, C.K., Warren, M.F. and Bennet, G.A., 1937. The problem of possible systemic effects from certain chlorinated hydrocarbons. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology*, 19: 283-311.
- EFSA, 2005. Avis du groupe scientifique CONTAM relatif à la présence de polychlorobiphényles (PCB) autres que ceux de type dioxine dans l'alimentation humaine et les aliments pour animaux. *The EFSA Journal* 284: 1 - 137.
- Environnement-Canada, 1988. La maîtrise des PCB contenus dans le matériel électrique. Centre d'édition du gouvernement canadien, 3ème édition.
- Erickson, B.D. and Mondello, F.J., 1993. Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11): 3858-3862.
- Fahrbach, M., Kuever, J., Meinke, R., Kampfer, P. and Hollender, J., 2006. *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17 $\beta$ -oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(7): 1547-1552.
- Fain, M.G. and Haddock, J.D., 2001. Phenotypic and phylogenetic characterization of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) sp. strain LB400. *Current microbiology*, 42: 269-275.
- Fava and Ciccotosto, 2002. Effects of randomly methylated- $\beta$ -cyclodextrins (RAMEB) on the bioavailability and aerobic biodegradation of PCBs in the pristine soils spiked with a transformer oil. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58: 393-399.
- Fava and Gioia, D., 2000. Soya lecithin effects on the aerobic biodegradation of PCBs in an artificially contaminated soil. *Biotechnology and bioengineering*, 72(2): 177-184.
- Ferguson, J.A. and Korte, F., 1977. Epoxidation of aldrin to exo-dieldrin by soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 34(1): 7-13.
- Fiebich, K., Thumm, W. and Kettrup, A., 1995. Degradation of naphthalene by *Pseudomonas* sp. strain KR3 investigated by flow calorimetry. *Thermochimica Acta*, 251: 29-36.
- Fish, K.M. and Principe, J.M., 1994. Biotransformations of Arochlor 1242 in Hudson River test tube microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 4289-4296.

- Furukawa, K. and Fujihara, H., 2008. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: Biochemical and molecular features. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(5): 433-449.
- Furukawa, K. and Fujihara, H., 2008. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: Biochemical and molecular features *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(5): 433-449
- Goris, J. et al., 2004. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1677-1681.
- Haddock, J.D., Horton, J.R. and Gibson, D.T., 1995. Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain LB400. *Journal of Bacteriology*, 177(1): 20-26.
- Hellweg, S., Hofstetter, T.B. and Hungerbühle, K., 2004. Time-dependent life-cycle assessment of slag landfills with the help of scenario analysis: the example of Cd and Cu. *Journal of Cleaner Production*, 13(3): 301-320.
- Heylen, K., Lebbe, L. and De Vos, P., 2008. *Acidovorax caeni* sp. nov., a denitrifying species with genetically diverse isolates from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(Pt 1): 73-7.
- Hou, L. and Dutta, S.K., 2000. Phylogenetic characterization of several para- and meta-PCB dechlorinating *Clostridium* species: 16s rDNA sequence analyses. *Lett Appl Microbiol*, 30(3): 238-43.
- Hsu, S.-T. et al., 1985. Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: A four-year followup. *Environmental Health Perspectives*, 59: 5-10.
- Hwang, C. et al., 2009. Bacterial community succession during in situ uranium bioremediation: spatial similarities along controlled flow paths. *The International Society of Microbial Ecology Journal*, 3: 47-64.
- Ikeda, M., Kuratsune, M., Nakamura, Y. and Hirohata, T., 1987. A cohort study on mortality of Yusho patients—a preliminary report. *Fukuoka Acta Medica*, 78: 297-300.
- Imran, M., Jones, D. and Smith, H., 2005. Biofilms and the plasmid maintenance question. *Mathematical Biosciences*, 193(2): 183-204.
- INERIS, 2005. Polychlorobiphényles.
- ISO14040, 2006. Management environnemental -- Analyse du cycle de vie -- Principes et cadre. International Organization for Standardization
- Jensen, S., 1966. Report of a new chemical hazard. *New Scientist* 32: 612.
- Jia, L. et al., 2008. Isolation and Characterization of Comprehensive Polychlorinated Biphenyldegrading Bacterium, *Enterobacter* sp. LY402. *J Microbiol Biotechnol*, 18(5): 952-7.
- Jin, L., Kim, K.K., Im, W., Yang, H. and Lee, S., 2007. *Aspromonas composti* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Xanthomonadaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 8): 1876-80.
- Jolliet, O., Saadé, M. and Crettaz, P., 2005. Analyse du cycle de vie - Comprendre et réaliser un écobilan. Gérer l'Environnement. Presses Polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.

- Jorge, L.M. et al., 2006. Degradation of Aroclor 1242 Dechlorination Products in Sediments by *Burkholderia xenovorans* LB400(ohb) and *Rhodococcus* sp. Strain RHA1(fcb). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4): 2476–2482
- Joshi, B. and Walia, S., 1995. Characterization by arbitrary primer polymerase chain reaction of polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading strains of *Comamonas testosteroni* isolated from PCB-contaminated soil. *Can J Microbiol*, 41(7): 612-9.
- Joshi, D.K. and Gold, M.H., 1993. **Degradation of 2,4,5-Trichlorophenol by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium***. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1779-1785.
- Justé, A. et al., 2008. Present knowledge of the bacterial microflora in the extreme environment of sugar thick juice. *Food Microbiology*, 25(6): 831-836.
- Kamei, I., Kogura, R. and Kondo, R., 2006. Metabolism of 4,4'-dichlorobiphenyl by white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete* sp. MZ142. *Applied microbial and cell physiology*, 72: 566–575.
- Keum, Y.S. and Li, Q.X., 2004. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*, 56(1): 23-30.
- Kodavanti, P.R.S. et al., 2001. Differential effects of two lots of aroclor 1254: congener-specific analysis and neurochemical end points. *Environmental Health Perspectives*, 109(11): 1153-1161.
- Kumamaru, T., Suenaga, H., Mitsuoka, M., Watanabe, T. and Furukawa, K., 1998. Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. *Nature Biotechnology*, 16: 663–666.
- Kuratsune, M., Yoshimura, T., Matsuzaka, J. and Yamaguchi, A., 1972. Epidemiologic study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environmental Health Perspectives*: 119-128.
- L'Abbée, J.B., Barriault, D. and Sylvestre, M., 2004. Metabolism of dibenzofuran and dibenzo-p-dioxin by the biphenyl dioxygenase of *Burkholderia xenovorans* LB400 and *Comamonas testosteroni* B-356. *Applied Microbiology Biotechnology*, 67: 506–514.
- Lajoie, C.A., Layton, A.C. and Satler, G.S., 1994. Cometabolic oxidation of polychlorinated biphenyls in soil with a surfactant-based field application vector. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8): 2826-2833.
- Lambo, A.J. and Patel, T.R., 2006. Isolation and characterization of a biphenyl-utilizing psychrotrophic bacterium, *Hydrogenophaga taeniospiralis* IA3-A, that cometabolize dichlorobiphenyls and polychlorinated biphenyl congeners in Aroclor 1221. *J Basic Microbiol*, 46(2): 94-107.
- Larkin, M.J., Kulakov, L.A., Allen, C.C.R. and Allen I. Larkin, S.S.a.G.M.G., 2006. Biodegradation by Members of the Genus *Rhodococcus*: Biochemistry, Physiology, and Genetic Adaptation, *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 1-29.
- Lee, S.D. and Lee, D.W., 2009. *Scopulibacillus darangshiensis* gen. nov., sp. nov., isolated from rock. *J Microbiol*, 47(6): 710-5.

- Leigh, M.B. et al., 2006. Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB-contaminated site. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4): 2331–2342.
- Lesage, P., Ekvall, T., Deschênes, L. and Samson, R., 2007a. Environmental Assessment of Brownfield Rehabilitation Using Two Different Life Cycle Inventory Models Part 1: Methodological Approach. *International Journal of Life Cycle Assessment* 12(6): 391 – 398
- Lesage, P., Ekvall, T., Deschênes, L. and Samson, R., 2007b. Environmental Assessment of Brownfield Rehabilitation Using Two Different Life Cycle Inventory Models Part 2 : case studies. *International Journal of Life Cycle Assessment* 12(7): 497 – 513.
- Li, H. et al., 2009. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for fingerprinting of microbial communities in paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(5): 954-968.
- Liu, Z., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L. and Knight, R., 2008. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencing. *Nucleic acids research* 36(18): e120.
- Madsen, E.L., 2006. The use of stable isotope probing techniques in bioreactor and field studies on bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(1): 92-97.
- Margulies, M. et al., 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437: 376-380.
- Master, Lai, Kuipers, Cullen and Mohn, 2002. Sequential anaerobic-aerobic treatment of soil contaminated with weathered Aroclor 1260. *Environmental Science and Technology*, 36: 100-103.
- Matsumoto, A. et al., 2003. *Longispora albida* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Micromonosporaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53(Pt 5): 1553-9.
- Maugh II, T.H., 1973. DDT: An Unrecognized Source of Polychlorinated Biphenyls. *Science*, 180(4086): 578-579.
- Meijer, S.N. et al., 2003. Global Distribution and Budget of PCBs and HCB in Background Surface Soils: Implications for Sources and Environmental Processes. *Environmental Science & Technology*, 37(4): 667-672.
- Meyer, A., Deiana, J. and Leclerc, H., 1997. *Cours de microbiologie générale*. Doin Editeurs, Paris.
- Mhiri, C. and de Marsac, N.T., 1997. Réhabilitation par les microorganismes de sites contenant du pyralène: problématique et perspectives d'étude. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 95(1): 3-28.
- Morais, S.A. and Delerue-Matos, C., 2009. A perspective on LCA application in site remediation services: Critical review of challenges. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3): 12-22.
- Morel, J.L., 2009. Allocution de clôture, IIème Rencontres Recherche et Industrie sur les sites et sols pollués, Paris.
- Mulligan, C.N., 2009. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(5): 372-378.
- NICNAS, 2002. Polychlorinated Naphtalenes. In: N.I.C.N.a.A. Scheme (Editor).
- Nováková, H. et al., 2002. PCB metabolism by *Pseudomonas* sp. P2. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(1): 47-54.

- Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Kimbara, K., Takagi, M. and Ohta, A., 2000. Expression of the bph genes involved in biphenyl/PCB degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102 induced by the biphenyl degradation intermediate, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid. *Gene*, 256(1-2): 223-228.
- Palleroni, N.J., Port, A.M., Chang, H. and Zylstra, G.J., 2004. *Hydrocarboniphaga effusa* gen. nov., sp. nov., a novel member of the gamma-Proteobacteria active in alkane and aromatic hydrocarbon degradation. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(Pt 4): 1203-7.
- Perchet, G. et al., 2008. Microbial population changes during bioremediation of nitroaromatic- and nitramine-contaminated lagoon. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(4): 304-312.
- Perke, J.M., 2003. *Microbiology Vigil: Probing What's Out There*. *The Scientist* 17(9): 40.
- PNUE, 2004. *Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistents*.
- Pruesse, E. et al., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic acids research*, 35(21): 7188-7196.
- Quensen, Boyd and Tiedje, 1990. Dechlorination of four commercial PCB mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2360-2369.
- Roche\_Applied\_Science, 2008. *Genome Sequencer. Data Analysis Software Manual*. Roche Diagnostics GmbH.
- Rodrigues, J.L.M. et al., 2006. Degradation of aroclor 1242 dechlorination products in sediments by *Burkholderia xenovorans* LB400(ohb) and *Rhodococcus* sp. Strain RHA1(fcb). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4): 2476-2482.
- Rogan, W.J. et al., 1988. Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science*, 241(4863): 334-336.
- Rothberg, J.M. and Leamon, J.H., 2008. The development and impact of 454 sequencing. *Nat Biotech*, 26(10): 1117-1124.
- Ruiz-Aguilar, G.M.L., Fernández-Sánchez, J.M., Rodríguez-Vázquez, R. and Poggi-Varaldo, H., 2002. Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Advances in Environmental Research*, 6(4): 559-568.
- Rysavy, Yan and Novak, 2005. Enrichment of anaerobic PCB dechlorinators from sediment with iron as a hydrogen source. *Water Research* 39: 569-578.
- Sablayrolles, C., 2004. *Etude fondamentale des transferts des composés traces organiques aux plantes. Cas des systèmes amendés par des boues d'épuration*. .
- Sangely, M., SABLAYROLLES, C., STREHAIANO, P., THANNBERGER, L. and MONTREJAUD-VIGNOLES, M., 2009a. Anaerobic process for Aroclor 1254 degradation in aqueous bioremediation assay. . *Progrés en Génie des Procédés*, 98: s.
- Sangely, M. et al., 2009b. Polychlorinated biphenyls fractioning in aqueous bioremediation assay with *Phanerochaete chrysosporium*. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 89(8): 849 - 856.

- Schloss, P.D. et al., 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23): 7537-7541.
- Schulze, R. et al., 1999. Genotypic diversity of *Acidovorax* strains isolated from activated sludge and description of *Acidovorax defluvii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*, 22(2): 205-14.
- Shinoda, Y. et al., 2004. Aerobic and Anaerobic Toluene Degradation by a Newly Isolated Denitrifying Bacterium, *Thauera* sp. Strain DNT-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(3): 1385-1392.
- Silva, C.C. et al., 2010. Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches. *Journal of Microbiology and biotechnology*, 20(3): 447–459.
- Simonnot, M.-O., 2009. Conférence introductive, Congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Marseille.
- Simonnot, M.-O. and Croze, V., 2008. Procédés de traitements physiques et chimiques des sols pollués. *Techniques de l'Ingénieurs, Référence J3981*.
- Song, B., Palleroni, N.J., Kerkhof, L.J. and Haggblom, M.M., 2001. Characterization of halobenzoate-degrading, denitrifying *Azoarcus* and *Thauera* isolates and description of *Thauera chlorobenzoica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(2): 589-602.
- Suèr, P., Nilsson-Päledal, S. and Norrman, J., 2004. LCA for site remediation: a literature review. *Soil and Sediment Contamination*, 13(4): 415 – 425.
- Sun, Y. et al., 2009. Behavioral response of dissimilatory perchlorate-reducing bacteria to different electron acceptors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(5): 955-963.
- Tandlich, R., Brezná, B. and Dercová, K., 2001. The effect of terpenes on the biodegradation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas stutzeri*. *Chemosphere*, 44(7): 1547-1555.
- Thrash, J., Pollock, J., Torok, T. and Coates, J., Description of the novel perchlorate-reducing bacteria *Dechlorobacter hydrogenophilus* gen. nov., sp. nov. and *Propionivibrio militaris*, sp. nov. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(1): 335-343.
- Toffoletto, L., Deschênes, L. and Samson, R., 2007. LCA of Ex-Situ Bioremediation of Diesel-Contaminated Soil. *International Journal of Life Cycle Assessment*, 10(6): 406 – 416.
- Tsiamis, G. et al., Prokaryotic community profiles at different operational stages of a Greek solar saltern. *Research in Microbiology*, 159(9-10): 609-627.
- US-EPA, 2007. Toxic Substances Control Act. In: U.S.E.P. Agency (Editor).
- Validation\_List\_no\_107, 2006. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(1): 1-6.
- Valli, K., Brock, B.J., Joshi, D.K. and Gold, M.H., 1992. **Degradation of 2,4-Dinitrotoluene by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium***. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 221-228.

- Valli, K. and Gold, M.H., 1991. Degradation of 2,4-Dichlorophenol by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of bacteriology* 173: 345-352.
- Voet, D. and Voet, J.G., 2005. *Biochimie*. Boeck Université, Paris.
- Volkwein, S., Hurtig, H.W. and Klopffer, W., 1999. Life cycle assessment of contaminated sites remediation. *International Journal of Life Cycle Assessment*, 4(5): 263–274.
- Voogt, P.D. and Brinkman, U.A.T., 1989. Production, properties and usage of PCBs. Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. Kimbrough and Jensen Elsevier Science Publishers: 3-69.
- Waid, J.S., 1986. PCBs and the environment, 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, 215 pp.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. and Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16): 5261-5267.
- Wang, Y. and Qian, P.-Y., 2009. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS ONE*, 4(10): e7401.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J., 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology* 173(2): 697-703.
- Wiegel, J. and Wu, Q., 2000. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 1–15.
- Winneke, G., Walkowiak, J. and Lilienthal, H., 2002. PCB-induced neurodevelopmental toxicity in human infants and its potential mediation by endocrine dysfunction. *Toxicology*, 181-182: 161-165.
- Wolterink, A. et al., 2005. *Dechloromonas hortensis* sp. nov. and strain ASK-1, two novel (per)chlorate-reducing bacteria, and taxonomic description of strain GR-1. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(5): 2063-2068.
- Wu, Q., Sowers, K.R. and May, H.D., 1998. Microbial reductive dechlorination of Aroclor 1260 in anaerobic slurries of estuarine sediments *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3): 1052 - 1058.

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Techniques de dépollution agissant sur le vecteur et sur la cible. _____	8
Tableau 2 : Condition d'admission des sols contaminés par des PCB en centre d'enfouissement technique. _____	11
Tableau 3 : Nomenclature, nombre de congénères, masses moléculaires et taux de chlore des différents isomères de PCB (Mhiri et de Marsac, 1997). Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre de congénères réellement synthétisables. _____	13
Tableau 4 : Aspects et toxicologie des différentes formulations de PCB type Aroclor (Waid, 1986). _____	15
Tableau 5 : Classification de <i>Burkholderia xenovorans</i> _____	28
Tableau 6 : Classification de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> _____	30
Tableau 7 : Exemple d'une classification évolutive : <i>Burkholderia xenovorans</i> . _____	32
Tableau 8 : Exemples de critères morphologiques. _____	33
Tableau 9 : Exemples de critères biochimiques. _____	33
Tableau 10 : Propriétés physicochimique du sol V <sub>s</sub> L. _____	46
Tableau 11 : Rendements de dégradation et vitesses journalières moyennes de dégradation de PCB par <i>Burkholderia xenovorans</i> en sol artificiel. _____	52
Tableau 12 : Rendements de dégradation et dégradation moyenne des PCB par <i>Burkholderia xenovorans</i> dans un sol contaminé. _____	55
Tableau 13 : Vitesse de disparition dans la phase aqueuse. _____	65
Tableau 14 : Vitesse de sorption par PCB sur <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . _____	67
Tableau 15. Référencement des prélèvements. <sup>1</sup> Projection WGS 84, dd°mm'ss.ss'' _____	78
Tableau 16 : Récapitulatif des modalités et du nombre de répétitions de l'expérimentation en milieu liquide. _____	80
Tableau 17 : Récapitulatif des modalités et du nombre de répétitions de l'expérimentation en milieu solide avec un sol réel. _____	81
Tableau 18 : Concentrations en mg.g <sup>-1</sup> des PCB 52, 101, 118, 138 et 153 dans l'aroclor 1254. (Kodavanti et al., 2001) _____	86
Tableau 19 : Pourcentages de dégradation pour les expérimentations en sol artificiel. _____	91
Tableau 20 : Vitesses moyennes journalières de dégradation pour les expérimentations en sol artificiel. _____	92
Tableau 21 : Récapitulatifs des rendements de dégradation par PCB pour l'expérimentation en sol réel _____	95
Tableau 22 : Récapitulatifs des consommations journalières en µg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> pour l'expérimentation en sol réel _____	95
Tableau 23 : Granulométrie du sol total. _____	98
Tableau 24 : Granulométrie de la fraction inférieure à 4 mm. _____	99
Tableau 25 : Propriétés physicochimique du sol LAN. _____	99
Tableau 26 : Rendements de dégradation à 174 jours et vitesses moyennes journalières de consommation. _____	101
Tableau 27 : Nom, nature et origine des échantillons analysés. _____	106
Tableau 28 : Analyse de la qualité des lectures avec ReadQualStats. _____	112
Tableau 29 : Principaux résultats de l'application Pyrocleaner. _____	113
Tableau 30 : Familles de bactéries présentes dans les 3 sédiments frais classées par abondance sur la somme des trois échantillons. _____	114
Tableau 31 : Familles de bactéries présentes dans les 3 milieux issus des expérimentations classées par abondance sur la somme des trois échantillons. _____	115
Tableau 32 : Nombre de séquences aux intersections analysées. _____	118
Tableau 33 : Nombre de séquences par échantillon dont le plus proche parent appartient à un genre abritant des espèces capables de biotransformer des PCB. _____	119
Tableau 34 : Impacts pris en compte dans l'analyse de cycle de vie. _____	129
Tableau 35 : Récapitulatif des données brutes nécessaires aux calculs d'ICV. _____	131
Tableau 36 : Quantité d'intrants par unité fonctionnelle (UF). _____	131
Tableau 37 : Inventaire des émissions liées à l'utilisation de pelleteuses. _____	132
Tableau 38 : Matrice avec 6 indicateurs de qualité des données récoltées, adapté de Jolliet (2005) et de Frischknecht (2007a) _____	134
Tableau 39 : Facteurs d'incertitude correspondants aux scores de qualité (Jolliet, 2005). _____	135
Tableau 40 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de cycle de vie par catégorie d'impact. _____	141
Tableau 41 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de cycle de vie par catégorie d'impact. _____	142

Tableau 42 : Récapitulatif des données brutes nécessaires aux calculs d'ICV du traitement biologique.	148
Tableau 43 : Récapitulatif des données brutes nécessaires aux calculs d'ICV de l'incinération.	149
Tableau 44 : Quantité d'intrants du procédé de traitement biologique (par unité fonctionnelle).	150
Tableau 45 : Quantité d'intrants du procédé d'incinération (par unité fonctionnelle).	150
Tableau 46 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de cycle de vie par catégorie d'impact.	156
Tableau 47. Fenêtre de temps pour l'acquisition en mode MIM	VIII
Tableau 48: Fenêtre d'analyse et temps de rétention pour les 5 PCB analysés de l'Aroclor 1254.	XII
Tableau 49 : Intersections des familles entre CJ2F, CJ3F et RH050F.	XXIV
Tableau 50 : Intersection des familles entre CJ2F, CJ2C et CJ2V21.	XXV
Tableau 51 : Intersection des familles entre CJ2V21 et RH050_SAT.	XXVI
Tableau 52 : Résultats d'analyse de la qualité des données brutes de l'analyse de cycle de vie comparant les deux procédés d'aération.	XXXVIII
Tableau 53 : Résultats d'analyse de la qualité du choix des données d'inventaire d'Ecoinvent de l'analyse de cycle de vie comparant les deux procédés d'aération.	XXXIX
Tableau 54 : Résultats d'analyse de la qualité des données brutes de l'analyse de cycle de vie comparant deux procédés de dépollution de sol contaminé par des PCB. Procédé de dépollution biologique.	XL
Tableau 55 : Résultats d'analyse de la qualité des données brutes de l'analyse de cycle de vie comparant deux procédés de dépollution de sol contaminé par des PCB. Procédé d'incinération.	XLII
Tableau 56 : Résultats d'analyse de la qualité du choix des données d'inventaire d'Ecoinvent de l'analyse de cycle de vie comparant deux procédés de dépollution de sol contaminé par des PCB. Ensemble des procédés.	XLIII
Tableau 57 : Classification des impacts des émissions directes pour l'analyse de cycle de vie comparant deux procédés d'aération de sol.	XLIV
Tableau 58 : Classification des impacts des émissions directes de l'analyse de cycle de vie comparant deux procédés de dépollution biologique de sol contaminé par des PCB.	XLV
Tableau 59 : Données d'émissions du procédé de dépollution biologique liées à la mise en place du sol sur le site de traitement.	XLVI
Tableau 60 : Données d'émissions du procédé de dépollution biologique liées aux transports.	XLVII
Tableau 61 : Données d'émissions du traitement thermique liées à l'incinération.	XLVIII
Tableau 62 : Données d'émissions du traitement thermique liées aux transports.	XLIX

# Listes des figures

Figure 1 : Structure générale des Polychlorobiphényles.	12
Figure 2 : Synthèse du biphényle.	13
Figure 3 : Synthèse des PCB.	13
Figure 4 : Dégradation des PCB par voie aérobie (Mhiri et de Marsac, 1997).	20
Figure 5 : Dégradation des PCB par voie aérobie (suite) (Mhiri et de Marsac, 1997).	21
Figure 6 : La déchloration réductive (Mhiri et de Marsac, 1997).	23
Figure 7 : Proposition de déchloration réductive du 2,3,4,6-tetrachlorobiphényle (Wiegel et Wu, 2000).	24
Figure 8 : Proposition de déchloration réductive du 2,2',4,4',5-pentachlorobiphényle (Fish et Principe, 1994).	25
Figure 9 : Proposition de déchloration réductive de deux heptachlorobiphényles (Bedard et al., 2006).	26
Figure 10 : Proposition de déchloration réductive de quatre heptachlorobiphényles (Bedard et al., 2006).	26
Figure 11 : Voie métabolique de la biphényle dioxygénase (Borja et al., 2005).	29
Figure 12 : Structure en 2 dimensions de l'ARNr 16S (Perke, 2003).	34
Figure 13 : Etape de l'ACV (ISO14040, 2006)	38
Figure 14 : Cinétique des paramètres de croissance. A : Densité Optique à 600 nm ; B : Concentration en glucose	48
Figure 15 : Comparaison de la quantité de PCB entre t = 0 jour et t = 16 jours en présence de <i>Burkholderia xenovorans</i> par PCB en fonction du nombre d'atomes de chlore.	49
Figure 16 : Formules développées des PCB 28 (A), PCB 52 (B) et PCB 101 (C).	50
Figure 17 : Comparaison de l'évolution après 90 jours de la quantité de PCB entre l'expérimentation stérile et l'expérimentation en présence de <i>Burkholderia xenovorans</i> .	51
Figure 18 : Evolution de la composition de la contamination en PCB entre t=0 jour et t=90 jours.	53
Figure 19 : Concentrations de PCB en sol réel contaminé par <i>Burkholderia xenovorans</i> après 60 jours d'expérimentation.	54
Figure 20 : Evolution de la composition de la contamination en PCB entre t=0 jour et t=60 jours.	56
Figure 21 : Chromatogramme des extractions à T= 6 jours pour un témoin et pour <i>P.chrysosporium</i> .	60
Figure 22 : Chromatogrammes issus du rinçage au n-hexane du mycélium de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	61
Figure 23 : Chromatogrammes issus des extractions menées sur la phase aqueuse à t = 0 jour (A), sur le mycélium de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> à t = 7 jours (B) et sur la phase aqueuse à t = 7 jours (C).	61
Figure 24 : Fractionnement des 7 PCB.	62
Figure 25 : Masse de mycélium de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> récoltée dans les 6 expérimentations de la cinétique.	63
Figure 26 : Cinétique de la concentration des PCB dans la phase aqueuse.	64
<b>Figure 27 : Cinétique de sorption sur le mycélium de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>.</b>	66
<b>Figure 28 : Régression linéaire de la vitesse d'adsorption en fonction du nombre de chlore des PCB.</b>	67
<b>Figure 29 : Cinétique de la concentration en PCB sur le mycélium.</b>	68
Figure 30 : Résultats de la cinétique de dégradation des PCB (somme des 7 PCB) en sol en présence de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . T : Témoin ; PC : <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .	70
Figure 31 : Résultats par PCB de l'essai de dépollution biologique de sol artificiel par <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . Valeurs normalisées par les résultats de l'expérimentation témoin.	71
Figure 32 : Multi échantillonneur manuel	77
Figure 33 : Zone de prélèvement Grand Large et Canal de Jonage. Source : Géoportail.	78
Figure 34 : Zone de prélèvement Rhône. Source : Géoportail.	78
Figure 35 : Tube de stockage des sédiments collectés	79
Figure 36 : Bouchons assurant la limitation des échanges gazeux	79
<b>Figure 37 : Aspect des cultures des communautés GL1 (à gauche) et de GL4 (à droite).</b>	82
<b>Figure 38. Aspect des cultures des communautés CJ2 et CJ3.</b>	82
Figure 39 : Aspect des cultures des communautés RH030, RH050, RH110.	82
Figure 40 : Chromatogrammes issus de l'expérimentation Témoin à t = 0 jour (A) et t = 15 jours (B). <sub>1</sub> correspond aux PCB tétrachlorés ; <sub>2</sub> correspond aux PCB pentachlorés ; <sub>3</sub> correspond aux PCB hexachlorés.	83

Figure 41 : Pourcentages résiduels des 5 PCB obtenus après traitement avec communauté GL1 en présence de biphenyle et de carvone.	84
Figure 42 : Pourcentages résiduels des 5 PCB après traitement avec communauté CJ2 en présence de biphenyle et de carvone	84
Figure 43 : Pourcentages résiduels des 5 PCB après traitement avec communauté CJ3 en présence de biphenyle et de carvone	85
Figure 44 : Pourcentages résiduels des 5 PCB après traitement avec communauté RH050 en présence de biphenyle et de carvone	85
Figure 45 : Concentration en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de PCB dans les solsensemencés par la microflore CJ2 après 4 mois d'incubation.	88
Figure 46 : Concentration en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de PCB dans les solsensemencés par la microflore RH050 après 4 mois d'incubation.	89
Figure 47 : Concentration en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de PCB dans les solsensemencés par la microflore GL4 après 4 mois d'incubation.	90
Figure 48 : Résultats des dosages après 4 mois pour la microflore CJ2.	93
Figure 49 : Résultats des dosages après 4 mois pour la microflore RH050 en présence de Biphenyle.	94
Figure 50 : Concentration des PCB à $t = 0$ jour et $t = 174$ jours pour la modalité LAN2m.	100
Figure 51 : Logigramme du procédé du traitement des données bioinformatiques.	110
Figure 52 : Histogramme des longueurs des séquences.	111
Figure 53 : Qualité des lectures.	112
Figure 54 : Diagramme de Venn pour les sédiments frais.	116
Figure 55 : Diagramme de Venn pour CJ2F, CJ2C et CJ2V21.	117
Figure 56 : Diagramme de Venn pour les essais de dépollution biologique.	118
Figure 57 : Schema conceptuel de l'Analyse de cycle de vie de deux techniques d'aération d'un sol.	130
Figure 58 : Déplétion des ressources abiotiques	137
Figure 59 : Réchauffement climatique	137
Figure 60 : Déplétion de la couche d'ozone.	137
Figure 61 : Toxicité humaine.	137
Figure 62 : Ecotoxicité terrestre.	138
Figure 63 : Ecotoxicité aquatique d'eau douce	138
Figure 64 : Ecotoxicité sédimentaire d'eau douce	138
Figure 65 : Ecotoxicité aquatique marine.	138
Figure 66 : Ecotoxicité sédimentaire marine	139
Figure 67 : Oxydation photochimique	139
Figure 68 : Eutrophisation	139
Figure 69 : Acidification	139
Figure 70 : Radiations.	140
Figure 71 : Schéma conceptuel de l'Analyse de cycle de vie d'un traitement biologique de sol contaminé par des PCB.	146
Figure 72 : Schéma conceptuel de l'Analyse de cycle de vie d'un traitement thermique de sol contaminé par des PCB.	147
Figure 73 : Déplétion des ressources abiotiques.	153
<b>Figure 74 : Réchauffement climatique.</b>	153
Figure 75 : Déplétion de la couche d'ozone.	153
Figure 76 : Toxicité humaine.	153
Figure 77 : Ecotoxicité terrestre.	154
Figure 78 : Ecotoxicité sédimentaire d'eau douce.	154
Figure 79 : Ecotoxicité aquatique d'eau douce.	154
Figure 80 : Ecotoxicité aquatique marine.	154
Figure 81 : Ecotoxicité sédimentaire marine.	155

Figure 82 : Oxydation photochimique. _____	155
Figure 83 : Eutrophisation. _____	155
Figure 84 : Acidification. _____	155
Figure 85 : Radiations. _____	156
Figure 86 : Nombres de publications répertoriées sur Science Direct ( <a href="http://www.sciencedirect.com/">http://www.sciencedirect.com/</a> ) dont le titre contient « *chlorinated biphenyls ». _____	II
Figure 87 : Nombres de publications répertoriées sur Science Direct ( <a href="http://www.sciencedirect.com/">http://www.sciencedirect.com/</a> ) dont le titre contient « *chlorinated biphenyls » pondérées par le nombre total de publication et ramené à 100 000 publication annuelle. _____	II
Figure 88 : Réaction entre le DNS et un sucre réducteur type glucose. Source: Protocole n° BIO-04-MTH-018, LGC. ____	III
Figure 89 : Droite de régression d'étalonnage pour le dosage du glucose par la méthode du DNS avec défécation des protéines _____	V
Figure 90 : Droite de régression d'étalonnage pour le dosage du glucose par la méthode du DNS _____	V
Figure 91 : Rendements d'extraction de la méthode Liquide-liquide. _____	VII
Figure 92 : Droites d'étalonnages pour les 7 PCB. _____	IX
Figure 93 : Extraits reconcentrés des matières organiques _____	X
Figure 94 : Extraits reconcentrés des filtrats _____	X
Figure 95 : Manifold Preppy© pour SPE _____	XI
Figure 96: Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté GL1. Expérimentation biphényle. _____	XIII
Figure 97 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté GL1. Expérimentation carvone. _____	XIII
Figure 98 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté GL4. Expérimentation biphényle. _____	XIV
Figure 99 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté GL1. Expérimentation carvone. _____	XIV
Figure 100 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté CJ2. Expérimentation biphényle. _____	XV
Figure 101 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté CJ2. Expérimentation carvone. _____	XV
Figure 102 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté CJ3. Expérimentation biphényle. _____	XVI
Figure 103 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté CJ3. Expérimentation carvone. _____	XVI
Figure 104 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté RH030. Expérimentation biphényle. _____	XVII
Figure 105 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté RH050. Expérimentation biphényle. _____	XVIII
Figure 106 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté RH050. Expérimentation carvone. _____	XVIII
Figure 107 : Appel d'ions sur chromatogrammes acquis en mode SCAN pour la communauté RH110. Expérimentation biphényle. _____	XIX
Figure 108 : Script SHELL utilisé pour obtenir les classifications par familles avec l'application RDP_classifier.. _____	XXI
Figure 109 : Script SHELL utilisé pour obtenir les intersections de séquences avec le logiciel MOTHUR. _____	XXII
Figure 110 : Script SHELL utilisé pour identifier des séquences avec le logiciel MOTHUR. _____	XXIII

# Liste des équations

Équation 1 : Calcul de la teneur résiduelle en PCB.	49
Équation 2 : Calcul des concentrations normalisées.	50
Équation 3 : Calcul du rendement de dégradation de PCB.	52
Équation 4 : Calcul de la vitesse moyenne journalière de dégradation de PCB.	52
Équation 5 : Calcul de la composition de la contamination en PCB.	53
Équation 6 : Calcul du rendement de dégradation de PCB.	55
Équation 7 : Calcul de la vitesse moyenne journalière de dégradation de PCB.	55
Équation 8 : Calcul de la fraction dégradée.	61
Équation 9 : Calcul des concentrations normalisées.	71
Équation 10 : Calcul de la teneur résiduelle en PCB.	83
Équation 11 : Calcul des rendements de dégradation de PCB.	90
Équation 12 : Calcul des vitesses moyennes journalières de consommation.	91
Équation 13 : Calcul des pourcentages de dégradation.	95
Équation 14 : Calcul des vitesses moyennes journalières de consommation.	95
Équation 15 : Calcul de l'estimation du volume de gaz naturel de ville utilisé lors de l'incinération.	149
Équation 16 : Calcul de l'écart de distance à partir duquel la catégorie d'impact « réchauffement globale » devient favorable à l'incinération.	158