

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600

UMI[®]

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MODÉLISATION ET OBSERVATION DES PROCÉDÉS DE BIODÉGRADATION
D'UN POLLUANT DANS UN SOL NON-SATURÉ

OLIVIER SCHOEFS
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)
(GÉNIE CHIMIQUE)
JANVIER 2002

© Olivier Schoefs, 2002.



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-71318-0

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

MODÉLISATION ET OBSERVATION DES PROCÉDÉS DE BIODÉGRADATION
D'UN POLLUANT DANS UN SOL NON-SATURÉ

présentée par : SCHOEFS Olivier

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. KLvana Danilo, Ph.D., président

M. SAMSON Réjean, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. PERRIER Michel, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. AUBERTIN Michel, Ph.D., membre

M. BABARY Jean-Pierre, D.Sc., membre

REMERCIEMENTS

Je remercie le professeur Réjean Samson, mon directeur de recherche, pour m'avoir permis de réaliser ce projet. Je tiens à le remercier particulièrement pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long du projet et pour les conditions matérielles, financières et humaines qu'il a su instaurer et qui ont contribué au succès de cette thèse.

Je remercie également le professeur Michel Perrier, mon codirecteur de recherche, pour sa disponibilité et ses précieux conseils scientifiques. Ses qualités personnelles et sa grande expertise dans le domaine du contrôle des procédés auront laissé une empreinte indélébile sur ma propre personne et sur ma formation.

Je remercie les professeurs Robert Chapuis et Denis Dochain pour leurs précieux conseils dans le domaine des écoulements non-saturés, pour le premier, et dans le domaine des systèmes adaptatifs, pour le second.

Je tiens à témoigner ma profonde gratitude au département de génie chimique qui m'a permis d'acquérir une expérience enrichissante en enseignement et je voudrais en particulier souligner la confiance que m'ont accordée les professeurs Danilo Klvana, Basil Favis et Robert Legros ainsi que Miroslav Grmela, chercheur au département. Ma reconnaissance va aussi à monsieur Richard Prigent pour ses conseils pédagogiques.

Je remercie les partenaires de la Chaire pour leur contribution financière : le CRSNG, Alcan, EDF/GDF, Hydro-Québec, Solvay, le gouvernement du Québec, Total Fina Elf, Bell, Cambior, Petro-Canada, le CEAEQ, la Ville de Montréal et le Chemin de Fer Canadien Pacifique.

Je remercie Manon Leduc pour la gestion et l'encadrement au laboratoire, les techniciens Robert Delisle et Jean Huard pour la qualité de leur travail réalisé sur les montages et Antonio Gatien, technicien au département des génies Civil, Géologique et des Mines, pour les tests de caractérisation du sol et pour ses conseils techniques concernant les tests d'infiltration en colonne. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Lucie Jean pour sa précieuse contribution au développement des protocoles expérimentaux par l'apport de son expertise en microbiologie. Merci également à Andree Ellert, Fadi Nohra, Nadine Nitsche, Rhyzlaine Bouhafs et Cyril Aguilera, qui par leur stage ou projet de fin d'étude ont permis d'améliorer des protocoles ou explorer certaines zones grises du projet.

Je remercie tous les membres, étudiants et personnel, de la Chaire en assainissement et gestion des sites et de l'URCPC. Leur contribution à la qualité du climat de travail se reflète directement sur la qualité des travaux de recherche. Je ne peux omettre la contribution toute particulière de mon ami Yves Dudal : nos réflexions journalières sur les phénomènes de biodégradation dans un milieu saturé ou non ont teinté nos travaux de recherche respectifs. J'ai eu la chance de bénéficier de son exceptionnelle capacité de synthèse, de ses talents pédagogiques et de ses qualités humaines reconnues.

Enfin, je remercie ma famille et celle de ma femme pour leur support et pour avoir accepté les empiétements occasionnels de la thèse sur la vie de famille. En particulier, les encouragements quotidiens de ma femme, Monica, et les sourires de ma fille, Sabrina, ont constitué un support affectif qui représente pour moi une contribution importante dans la réalisation de cette thèse.

RÉSUMÉ

Les procédés de biodégradation d'un polluant dans un sol non-saturé sont actuellement souvent opérés sous des conditions d'opération stationnaires, conduisant à de longues périodes de traitement et à des coûts élevés. De plus, le niveau de dépollution désiré n'est souvent pas atteint. Jusqu'à maintenant, l'implantation de stratégies de contrôle est confrontée aux problèmes de suivi de la pollution et à la complexité des phénomènes hydrodynamiques et biocinétiques mis en jeu. L'objectif de cette étude est d'observer en temps réel le niveau de pollution au cours d'un traitement biologique dans un sol non-saturé de façon à pouvoir envisager l'implantation de stratégies de contrôle avancé. En particulier, la théorie des systèmes adaptatifs sera utilisée afin d'observer les états non-mesurés et estimer les paramètres inconnus impliqués dans les modèles hydrodynamiques et biocinétiques.

La méthodologie générale consiste d'abord à développer un modèle numérique capable de décrire les écoulements simultanés d'air et d'eau et la biodégradation dans un milieu poreux, puis d'identifier les paramètres impliqués à l'aide d'expériences en laboratoire. Alors, en se servant de la structure dynamique du modèle développé, d'une part, et les mesures de variables d'état mesurables en ligne, d'autre part, des capteurs-logiciels peuvent être développés afin d'observer les états non-mesurés et estimer les paramètres inconnus en temps réel. Le sol étudié est un sable silteux avec matière organique et l'hexadécane est choisi comme composé cible d'une pollution aux hydrocarbures pétroliers.

D'un côté, pour calibrer le modèle hydrodynamique, basé sur la loi de Darcy et sur des relations prédictives de la conductivité hydraulique non-saturée, une colonne de 1,5 m de hauteur est utilisée. La colonne est équipée d'un système d'irrigation et d'aération permettant des écoulements d'air et d'eau à co-courant et à contre-courant. Des sondes RDT pour la mesure de l'humidité et des capteurs de pression d'air et d'eau sont placés à six différentes profondeurs dans la colonne.

D'un autre côté, pour calibrer le modèle biocinétique, basé sur le transfert d'oxygène, le transfert de polluant et la biodégradation, une méthodologie en deux étapes a été adoptée. La première étape consiste en des tests de biodégradation dans des bouteilles de 120 mL contenant une solution de biomasse extraite du sol étudié. Deux niveaux de pollution sont testés et de l'hexadécane radio-marqué est introduit dans chaque bouteille. Une trappe à CO₂, consistant en une solution de KOH, permet de suivre la minéralisation globale et celle due à la biodégradation de l'hexadécane. Des bouteilles semblables sont régulièrement sacrifiées afin de suivre l'hexadécane non-dégradé et l'évolution de la biomasse en utilisant un nouveau protocole développé. D'autres bouteilles ne contenant pas de radioactivité sont sacrifiées afin de suivre l'évolution de la biomasse par la technique du Nombre le Plus Probable (NPP). La seconde étape consiste en des tests de biodégradation dans des flacons biométriques de 250 mL contenant 20 g de sol pollué à environ 10 000 mg/kg sol sec en hexadécane. De l'hexadécane radio-marqué est également ajouté. Une trappe à CO₂, consistant en une solution de potasse, permet de suivre la minéralisation globale et celle due à la biodégradation de l'hexadécane. Des flacons biométriques similaires mais ne contenant pas de radioactivité sont régulièrement sacrifiés afin de suivre la disparition du polluant (extraction au Soxtec et analyse au GC-FID) et l'évolution de la biomasse par trois différentes méthodes : la technique du Nombre le Plus Probable, la microscopie à épifluorescence et le dosage quantitatif de l'ADN du sol. Trois contenus en eau du sol sont étudiés.

Les tests hydrodynamiques en colonne montrent que l'aération forcée a une influence significative sur la vitesse de percolation de l'eau. Le modèle, basé sur la loi de Darcy et sur les relations prédictives de van Genuchten-Mualem, décrit correctement le test sans aération, à condition d'ajuster les paramètres de van Genuchten-Mualem pour la conductivité hydraulique. En revanche, en gardant les mêmes paramètres, le modèle ne prédit pas de façon satisfaisante les tests de percolation avec aération. Ces résultats sont attribuables à la sensibilité du modèle à la paramétrisation de la courbe de rétention d'eau et la non-prise en compte des forces de friction appliquées par l'air sur l'eau. Un capteur-logiciel de la conductivité, basé sur la structure d'estimateur/observateur, est

donc développé et confronté aux données expérimentales. Le capteur-logiciel permet d'estimer en temps réel la conductivité hydraulique en régime permanent mais fait face à des oscillations importantes en régime transitoire. L'application d'un filtre du premier ordre permet de réduire les oscillations mais ralentit significativement la convergence de l'estimateur.

Les résultats obtenus par les tests de biodégradation en phase liquide permettent d'identifier un modèle de croissance et de décès microbiens : une cinétique de Haldane et une mortalité du premier ordre se sont avérées être la meilleure formulation pour décrire les résultats expérimentaux. Les résultats des tests de biodégradation en phase solide sont utilisés pour identifier une cinétique de biocontact du polluant. Les résultats montrent que plus le sol est sec, plus la cinétique de biodégradation est rapide. Toutefois, comme il est impossible de mesurer l'oxygène dissous et les différentes fractions de polluant dans un sol non-saturé, aucun modèle phénoménologique prédisant l'influence de l'oxygène et de la biodisponibilité du polluant sur la biodégradation n'est identifiable. Il en résulte qu'une cinétique globale de biocontact, regroupant l'influence de l'oxygène et de la biodisponibilité du polluant, est identifiée. Or, puisque la cinétique de biocontact n'est pas identifiable *a priori*, un capteur-logiciel, basé sur la structure d'estimateur/observateur, est développé afin d'observer la biodégradation du polluant à partir de la mesure en ligne du CO_2 . Les résultats montrent que le capteur-logiciel est performant à condition que la période d'échantillonnage du CO_2 soit inférieure à 6 heures.

L'ensemble des résultats obtenus démontre que la théorie des systèmes adaptatifs peut rendre observable les procédés de biodégradation d'un polluant dans un sol non-saturé. Toutefois, les recherches dans ce domaine doivent se poursuivre afin d'améliorer les capteurs-logiciels et étudier la contrôlabilité de ces procédés.

ABSTRACT

In situ and on-site bioremediation processes used in unsaturated soil are most often employed under steady-state operating conditions, which leads to an increase in the duration of treatment periods and operating costs and sometimes to an unsatisfying level of decontamination. Until now, the lack of reliable biodegradation sensors and the complexity of hydrodynamic and biokinetic phenomena involved in unsaturated soil made the implementation of conventional control strategies quite difficult. The objective of this study is to observe contaminant concentration on-line during bioprocesses in unsaturated soil so that advanced control strategies could be implemented. Namely, the theory of adaptive systems leading to the development of software sensors is investigated to deal with non-measured state variables and unknown parameters involved in hydrodynamic and biokinetic models.

The global methodology first consists in developing a numerical model capable of describing simultaneous water and air flow and biodegradation in porous media and then, in identifying the parameters involved using laboratory experiments. Then, using the dynamic structure model developed and on-line measurement of state variables, software-sensors can be developed to estimate unknown parameters on-line and to observe the non-measured state variables on-line. Soil used for this study was a loamy sand and hexadecane was chosen as a representative compound usually associated with petroleum hydrocarbon pollution.

In order to calibrate the hydrodynamic model which is based on the generalized Darcy's law and predictive relationships for the hydraulic conductivity, a 1.5 m high column of non-contaminated soil was used. The column was equipped with an irrigation and aeration system capable of providing co-current and counter-current water and air flow. TDR probes for water content measurement and tensiometers for water and air pressure measurements were placed at six different depths.

To calibrate the biokinetic model based on oxygen transfer, contaminant transfer and biodegradation rates, a two-step experiment was adopted. The first step consisted in biodegradation tests performed in 120 mL biometric flasks containing 10 mL of a soil biomass extract. Two levels of contamination were tested and radioactive hexadecane was introduced. A CO₂ trap, composed of a KOH solution, allowed to monitor total and hexadecane mineralization. Similar biometric flasks were regularly sacrificed to monitor non-consumed hexadecane and biomass evolution using a new experimental protocol. Other biometric flasks containing no radioactive hexadecane were sacrificed to monitor biomass evolution using the Most Probable Number (MPN) technique. The second step consisted of biodegradation tests performed in 250 mL biometric flasks containing 20 g of a contaminated soil. The soil was artificially contaminated with hexadecane at 10,000 mg/kg dry soil and radioactive hexadecane was also introduced along with a CO₂ trap. Similar biometric flasks containing no radioactive hexadecane were sacrificed to monitor hexadecane consumption (Soxtec extraction + GC/FID analysis) and biomass evolution using three different methods: the Most Probable Number (MPN) technique, the epifluorescence microscopy and the total soil DNA quantification. Three tests with different water contents were studied.

The column hydrodynamic tests show that forced air flow has a significant impact on the water infiltration. The model, based on Darcy's law and the van Genuchten-Mualem relationships, correctly describes water percolation without air convection, provided parameter adjustment of the predictive model of the unsaturated hydraulic conductivity is performed. However, using the parameters identified with percolation data without air convection, the model is not able to correctly predict the influence of air flow onto water infiltration. This result is partially attributed to the model's sensitivity to the parameter identification of the van Genuchten-Mualem relationships and the omission of the friction forces exerted by the air to the water. A software-sensor of the hydraulic conductivity, based on the estimator/observer structure, was developed and applied to the experimental data. The software-sensor was able to estimate on-line the hydraulic

conductivity in steady-state but faced oscillation problems in unsteady-state. A first-order filter allowed to reduce oscillations but also reduced the convergence rate.

Results from the biometric flask experiments in liquid phase allow the identification of a microbial growth and decay-based model: a Haldane kinetic and a first-order decay rate were found to be the best formulation for describing experimental data. Results from biometric flask experiments in solid phase were used to identify a biocontact kinetic model. The results indicate that the higher the water content, the smaller the biodegradation rate. However, as it is not possible to measure dissolved oxygen and the amount of contaminant in biocontact in unsaturated soil, no phenomenological model predicting oxygen and bio-availability influence on biodegradation is identifiable. Therefore, a global biocontact kinetic model was developed to describe experimental data. As this biocontact kinetic model cannot be *a priori* identified, a software-sensor, based on the estimator/observer structure, was developed to observe hexadecane depletion using on-line CO₂ measurements. The results revealed that the software-sensor is efficient provided that the CO₂ sampling period is shorter than 6 hours.

These results demonstrate that the theory of adaptive systems can make biodegradation processes in unsaturated porous media observable. Further studies are required to improve the developed software-sensors and to investigate the controllability of such processes.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	VI
ABSTRACT.....	IX
TABLE DES MATIÈRES.....	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES FIGURES	XVII
LISTE DES ANNEXES.....	XXI
LISTE DES NOTATIONS.....	XXII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE GÉNÉRALE	5
2.1 INTRODUCTION	5
2.2 SUIVI INFORMATISÉ DES BIOPROCÉDÉS DANS UN MILIEU POREUX NON-SATURÉ.....	5
2.2.1 <i>Suivi des phénomènes hydrodynamiques.....</i>	5
2.2.2 <i>Suivi des phénomènes biocinétiques.....</i>	7
2.3 MODÉLISATION ET CONTRÔLE DES PROCÉDÉS DE BIODÉGRADATION DANS UN MILIEU POREUX NON-SATURÉ	10
2.4 CONCLUSION	13
CHAPITRE 3 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE, OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE	15
3.1 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE.....	15
3.2 OBJECTIFS.....	15
3.3 MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE.....	16

CHAPITRE 4	ÉTUDE HYDRODYNAMIQUE	18
4.1	INTRODUCTION	18
4.2	REVUE DE LITTÉRATURE.....	18
4.2.1	<i>Introduction</i>	18
4.2.2	<i>Modélisation de l'écoulement de l'eau</i>	19
4.2.3	<i>Modélisation de l'écoulement de l'air</i>	22
4.2.4	<i>Modélisation des écoulements simultanés d'air et d'eau</i>	24
4.2.5	<i>Conclusion</i>	25
4.3	MATÉRIELS ET MÉTHODES	25
4.3.1	<i>Modélisation physique</i>	25
4.3.1.1	Tests standards pour l'obtention des propriétés hydrogéologiques.....	25
4.3.1.2	Tests de rétention d'eau.....	27
4.3.1.3	Tests de percolation en colonne avec aération forcée	28
4.3.2	<i>Modélisation mathématique</i>	32
4.3.2.1	Écoulement d'eau à travers un milieu poreux sans aération.....	33
4.3.3	<i>Écoulement d'air à travers un milieu poreux</i>	35
4.3.4	<i>Écoulement d'eau avec aération</i>	37
4.3.5	<i>Estimation en temps réel des conductivités non-saturées</i>	38
4.3.5.1	Estimation en temps réel de la conductivité hydraulique non-saturée	38
4.3.5.2	Estimation en temps réel de la conductivité à l'air.....	42
4.4	RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET SIMULATIONS	43
4.4.1	<i>Modélisation de l'influence d'une aération forcée sur la percolation d'eau à travers un sol</i>	43
4.4.1.1	Résultats expérimentaux.....	43
4.4.1.2	Simulations	49
4.4.1.3	Conclusion	59
4.4.2	<i>Développement d'un estimateur de la conductivité hydraulique (domaine continu)</i>	60
4.4.3	<i>Validation de l'estimateur (domaine discrétisé)</i>	63

4.5 DISCUSSION	71
4.6 CONCLUSION	73
CHAPITRE 5 ÉTUDE BIOCINÉTIQUE	74
5.1 INTRODUCTION	74
5.2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	74
5.2.1 <i>Introduction</i>	74
5.2.2 <i>Limitation biocinétique</i>	75
5.2.3 <i>Limitation due au transfert d'oxygène</i>	80
5.2.4 <i>Limitation due à la biodisponibilité du polluant</i>	83
5.2.5 <i>Résumé des modèles de biodégradation dans un sol</i>	86
5.2.6 <i>Conclusion</i>	88
5.3 MATÉRIELS ET MÉTHODES	88
5.3.1 <i>Modélisation physique</i>	88
5.3.1.1 Tests standards pour l'obtention des propriétés physico-chimiques	88
5.3.1.2 Tests de biodégradation en phase liquide.....	89
5.3.1.3 Tests de biodégradation en phase solide.....	92
5.3.2 <i>Modélisation mathématique</i>	95
5.3.2.1 Biodégradation en phase liquide.....	95
5.3.2.2 Biodégradation en phase solide	96
5.3.2.3 Développement d'un estimateur/observateur pour le suivi du polluant..	98
5.4 RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET SIMULATIONS	102
5.4.1 <i>Identification paramétrique d'un modèle biocinétique à partir d'un extrait aqueux de la biomasse d'un sol</i>	102
5.4.1.1 Résultats expérimentaux.....	102
5.4.1.2 Modélisation	106
5.4.2 <i>Modélisation de la biodégradation de l'hexadécane dans un sol non-saturé</i>	111
5.4.2.1 Résultats expérimentaux.....	111
5.4.2.2 Modélisation	120

5.4.3 Développement d'un capteur-logiciel de la biodégradation (domaine continu)	
.....	127
5.4.4 Validation du capteur-logiciel (domaine discrétisé)	132
5.5 DISCUSSION	136
5.6 CONCLUSION	140
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE	141
CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	153
RÉFÉRENCES	156
ANNEXES	167

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 Principales techniques de quantification des micro-organismes : avantages et inconvénients	9
Tableau 4-1 Propriétés hydrogéologiques de base	26
Tableau 4-2 Identification paramétrique des relations de van Genuchten-Mualem.....	52
Tableau 4-3 Estimation de la perméabilité à l'air.....	55
Tableau 5-1 Caractéristiques des modèles de biodégradation des polluants.....	87
Tableau 5-2 Propriétés physico-chimiques du sol.....	89
Tableau 5-3 Description des microcosmes en phase liquide et fin d'utilisation.....	91
Tableau 5-4 Description des microcosmes en phase solide et fin d'utilisation.....	94
Tableau 5-5 Rendements de récupération des flacons abiotiques et des sacrifices.....	103
Tableau 5-6 Résultats de l'identification paramétrique ($S_0 = 19,325$ mg).....	109

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 Représentation schématique d'un traitement en biopile.....	4
Figure 1-2 Représentation schématique d'un traitement par bioventilation <i>in situ</i>	4
Figure 3-1 Vue d'ensemble de la méthodologie générale.....	17
Figure 4-1 Courbe de rétention d'eau (Freeze et Cherry, 1979).....	20
Figure 4-2 Effet de la structure du sol sur la courbe de rétention d'eau (Freeze et Cherry, 1979).....	20
Figure 4-3 Courbes de conductivité hydraulique en fonction de la succion (Freeze et Cherry, 1979).....	21
Figure 4-4 Illustration du phénomène d'hysérésis.....	21
Figure 4-5 Courbe granulométrique.	26
Figure 4-6 Montage pour obtention de la courbe de rétention d'eau.	27
Figure 4-7 Courbe expérimentale de rétention d'eau.	28
Figure 4-8 Colonne expérimentale pour les tests de percolation.....	29
Figure 4-9 Principe de fonctionnement des sondes RDT.....	31
Figure 4-10 Principe de fonctionnement du système de mesure de la succion.....	31
Figure 4-11 Visualisation du suivi et contrôle des paramètres sur LabView (colonne de l'étude hydrodynamique).....	32
Figure 4-12 Évolution des suctions pour les trois tests de percolation.....	46
Figure 4-13 Courbe de rétention d'eau complétée.	47
Figure 4-14 Évolution des volumes d'eau injectée pour les trois tests de percolation....	48
Figure 4-15 Volume d'eau injectée par capteurs.....	48
Figure 4-16 Évolutions des pressions en entrée et sortie de colonne.	49
Figure 4-17 Estimation de la courbe de rétention d'eau par les relations de van Genuchten-Mualem.	52
Figure 4-18 Courbe de conductivité hydraulique relative.....	53

Figure 4-19 Simulation du test de percolation sans aération à partir de la paramétrisation de la courbe de rétention d'eau.....	53
Figure 4-20 Simulation du test de percolation sans aération à partir du calage de courbes.	54
Figure 4-21 Influence des conditions initiales sur la simulation de l'écoulement.	54
Figure 4-22 Simulation du test de percolation avec aération à co-courant.....	57
Figure 4-23 Simulation du test de percolation avec aération à contre-courant.....	58
Figure 4-24 Estimation de la conductivité hydraulique en régime permanent.....	61
Figure 4-25 Estimation de la conductivité hydraulique en régime transitoire (traits discontinus : modèle; points : estimateur/observateur).	62
Figure 4-26 Performance du capteur-logiciel en régime permanent dans le domaine discrétisé.	63
Figure 4-27 Performance du capteur-logiciel appliqué au test de percolation sans aération.	64
Figure 4-28 Performance du capteur-logiciel appliqué au test de percolation sans aération et en présence d'un filtre.....	66
Figure 4-29 Conditions simulées de succion en tête de colonne.....	67
Figure 4-30 Performance du capteur-logiciel en conditions simulées d'assèchement....	68
Figure 4-31 Performance du capteur-logiciel en conditions simulées de mouillage.....	69
Figure 4-32 Performance du capteur-logiciel en conditions simulées de mouillage en présence d'un filtre.	70
Figure 5-1 Métabolisme commun de dégradation d'un hydrocarbure aliphatique (D'après Baker et Herson, 1994).....	76
Figure 5-2 Évolution du taux de transfert d'oxygène en fonction du degré de saturation en eau d'un sol donné (d'après Zhang, 1994).....	82
Figure 5-3 Schéma global de l'expérience en phase liquide.	92
Figure 5-4 Schéma global de l'expérience en phase solide.....	95
Figure 5-5 Répartition du ^{14}C dans les microcosmes en phase aqueuse.....	104

Figure 5-6 Dénombrements NPP de la population hydrocarbonoclaste (phase liquide).	105
Figure 5-7 Évolution du rapport de minéralisation $^{14}\text{CO}_2/\text{CO}_2$.	106
Figure 5-8 Résultats de l'identification paramétrique ($S_0 = 19,325 \text{ mg}$).	108
Figure 5-9 Évolution du taux spécifique de croissance avec la quantité d'hexadécane en biocontact.	109
Figure 5-10 Résultats de simulation ($S_0 = 9,663 \text{ mg}$).	110
Figure 5-11 Évolution des humidités dans les flacons biométriques.	111
Figure 5-12 Évolution de la minéralisation de l'hexadécane dans les flacons biométriques.	112
Figure 5-13 Évolution de la concentration d'hexadécane dans les flacons biométriques.	113
Figure 5-14 Évolution des index NPP dans les flacons biométriques.	116
Figure 5-15 Évolution de la biomasse totale par microscopie à épifluorescence.	117
Figure 5-16 Évolution de l'ADN du sol.	118
Figure 5-17 Rapport de minéralisation dans les flacons biométriques.	119
Figure 5-18 Rapport de minéralisation corrigé dans les flacons biométriques.	120
Figure 5-19 Identification paramétrique de la constante de biodisponibilité.	122
Figure 5-20 Simulation de la biodégradation dans le sol sec.	123
Figure 5-21 Simulation de la biodégradation dans le sol moyen.	125
Figure 5-22 Simulation de la biodégradation dans le sol humide.	126
Figure 5-23 Performance du capteur-logiciel pour le sol sec (données de simulation, domaine continu).	129
Figure 5-24 Performance du capteur-logiciel pour le sol moyennement humide (données de simulation, domaine continu).	130
Figure 5-25 Performance du capteur-logiciel pour le sol humide (données de simulation, domaine continu).	131
Figure 5-26 Performance du capteur-logiciel pour le sol sec (données de simulation, domaine discret).	133

Figure 5-27 Performance du capteur-logiciel pour le sol moyennement humide (données de simulation, système discret).....	134
Figure 5-28 Performance du capteur-logiciel pour le sol humide (données de simulation, domaine discret).....	135
Figure 6-1 Colonne expérimentale pour les tests de biodégradation.....	148
Figure 6-2 Système d'échantillonnage, de déshumidification et d'analyse du gaz interstitiel.	149
Figure 6-3 Visualisation du suivi et contrôle des paramètres sur LabView (colonne de l'étude biodynamique).	150
Figure 6-4 Mesures de l'oxygène et du dioxyde de carbone en sortie de colonne.....	151
Figure 6-5 Gradient de concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone dans la colonne.....	152

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 Détermination du poids sec d'un sol.....	168
Annexe 2 Photos : tests hydrodynamiques en colonne.....	174
Annexe 3 PE-42C Tests de biodégradation en phase liquide.....	178
Annexe 4 Photos : tests de biodégradation en phase liquide.....	191
Annexe 5 PE-42E: Extraction et quantification de l'hexadécane à partir d'un échantillon de sol.....	194
Annexe 6 PSO-A12 Dénombrement des micro-organismes hétérotrophes par la méthode du nombre le plus probable ; PE-42G Dénombrement des micro-organismes hydrocarbonoclastes par la méthode du nombre le plus probable.....	203
Annexe 7 PE-42F : Compte microbien par microscopie à épifluorescence.....	219
Annexe 8 Extraction et quantification de l'ADN à partir d'un échantillon de sol.....	229
Annexe 9 PE-42D : Tests de biodégradation en phase solide	243
Annexe 10 photos : tests de biodégradation en phase solide.....	252

LISTE DES NOTATIONS

A	Surface [L^2]
C	Capacité capillaire [$(L^3.L^{-3}).(L)^{-1}$]
D_{eff}	Coefficient de diffusion effectif [$L^2.T^{-1}$]
D_m	Coefficient de diffusion moléculaire [$L^2.T^{-1}$]
f	Fraction de matière
g	Accélération gravitationnelle [$L.T^{-2}$]
k	Perméabilité du milieu poreux [L^2]
K_{La}	Coefficient de transfert d'oxygène [T^{-1}]
K_{la}	Coefficient de transfert de polluant [T^{-1}]
K	Conductivité du milieu poreux au fluide [$L.T^{-1}$]
K_d	Constante de partition linéaire
K_h	Constante de Henry
K_{oc}	Coefficient de partition sur le carbone organique [$L^3.M$]
K_{ow}	Coefficient de partage octanol-eau [$L^3.L^{-3}$]
K_p	Coefficient de sorption
L	Longueur [L]
P	Pression [$M.L^{-1}.T^{-2}$]
Q	Débit volumique [$L^3.T^{-1}$]
R	rayon [L]
t	Temps [T]
v	Vitesse de Darcy [$L.T^{-1}$]
Y	Coefficient de rendement [$M.M^{-1}$]
z	Profondeur dans la colonne [L]
α, m et n	Paramètre de la relation de van Genuchten-Mualem
ε	Porosité du milieu poreux [$L^3.L^{-3}$]
ϕ	Charge hydraulique [L]

λ	Valeur propre
μ	Viscosité $[M.L^{-1}.T^{-1}]$
μ_c	Taux spécifique de croissance $[T^{-1}]$
μ_d	Taux de mortalité des micro-organismes $[T^{-1}]$
μ_S, K_S et K_I	Constantes de la cinétique de Haldane
Ω et Γ	Gains des estimateurs/observateurs
ψ	Succion $[L]$
ρ	Masse volumique $[M.L^{-3}]$
θ_a	Contenu volumétrique ou massique en air $[L^3.L^{-3}]$ ou $[M.M^{-1}]$
θ_e	Degré de saturation $[L^3.L^{-3}]$
θ_w	Contenu volumétrique en eau $[L^3.L^{-3}]$
θ_{wm}	Contenu massique en eau $[M.M^{-1}]$

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

L'expansion incontrôlée des activités industrielles durant le 20^{ème} siècle a eu des répercussions très néfastes sur l'environnement. Souvent par négligence, les zones vadoses des aquifères de nombreux sites ont subi des pollutions par des composés exogènes au milieu naturel. Depuis les vingt dernières années, des techniques de restauration des sols et des eaux souterraines ont été développées et se classent en trois grandes catégories : les technologies physico-chimiques, thermiques et biologiques (Nyer, 1992; Boulding, 1995; Suthersan, 1997). Les procédés physico-chimiques sont basés sur le concept de lavage où le polluant est retiré du milieu (sol ou eau) par une solution d'extraction. Parmi ces procédés, le lavage de sol, pour les polluants organiques, et l'extraction dans des cellules électrolytiques, pour les métaux, sont les plus répandues. Bien que la rapidité et l'efficacité de traitement fassent des technologies physico-chimiques une solution intéressante, le coût associé aux installations et la production de résidus fortement pollués dont il faut disposer restreignent leur utilisation. Les procédés thermiques, quant à eux, consistent soit à incinérer le polluant organique soit à l'extraire de la matrice à l'aide d'une désorption thermique. Malgré une grande efficacité vis à vis des hydrocarbures, ce type de technologie fait face à des coûts élevés associés aux infrastructures, à une mauvaise perception par le public et à la gestion délicate des émissions gazeuses potentiellement toxiques. Enfin, les procédés biologiques, ou bioprocédés, sont basés sur la capacité du sol à se dépolluer. En effet, le sol abrite une flore microbienne très variée en mesure de décomposer une multitude de produits chimiques. Ce processus est appelé biodégradation : décomposition d'un composé organique par des micro-organismes. Le composé biodégradé est utilisé soit pour la composition cellulaire des micro-organismes soit pour la production d'énergie. La réaction biochimique aérobie associée à la biodégradation d'un composé organique peut être schématisée de la façon suivante :



Les bioprocédés consistent donc à accélérer un phénomène naturel en appliquant des conditions optimales de biodégradation. Ainsi, l'implantation d'un tel procédé permet de traiter un sol en quelques mois alors qu'une re-génération naturelle, sous des conditions environnementales satisfaisantes, nécessiteraient des dizaines voire des centaines d'années d'attente. La simplicité et le faible coût des procédés biologiques constituent leurs principaux avantages. Leurs inconvénients, quant à eux, résident dans la lenteur du traitement comparativement aux autres technologies mentionnées ci-dessus et à la restriction de leur application aux composés biodégradables.

Les travaux présentés dans cette thèse portent sur les procédés de biodégradation qui représentent les techniques les plus utilisées pour la restauration des sols pollués par des composés organiques tels les hydrocarbures. Actuellement, les bioprocédés de traitement des sols sont opérés sous des conditions d'opération stationnaires. Les critères de conception sont souvent imprécis et les paramètres d'opération surestimés. L'optimisation de ces procédés, comme tout procédé biologique, fait face à la difficulté de suivre et de contrôler les phénomènes. Cette difficulté est principalement due à la complexité du comportement des micro-organismes vis-à-vis du milieu dans lequel ils se trouvent. De plus, peu d'outils analytiques sont disponibles pour caractériser les phénomènes mis en jeu, et spécialement dans les sols non-saturés. C'est donc dans une optique de suivi et éventuellement de contrôle que ce projet de modélisation et d'observation des procédés de biodégradation dans un sol non-saturé a été entrepris.

Afin de fixer les idées, l'étude a été restreinte à une pollution aux hydrocarbures pétroliers et l'hexadécane a été choisi comme composé cible typique. L'extension des résultats à tout type de pollution sera traitée lors de la discussion générale. Les procédés de biodégradation dans un milieu poreux non-saturé ont des éléments de conception commun. Tout d'abord, le processus biologique favorisé est la biodégradation aérobie de sorte qu'un système d'aération doit être implanté afin de fournir l'oxygène nécessaire au bon développement des micro-organismes. Ensuite, l'humidité du sol est un paramètre qui peut inhiber la biodégradation de sorte qu'un système d'irrigation doit être envisagé. Le traitement de sol en biopile et le traitement par bioventilation *in situ* sont deux

procédés typiques couramment utilisés. Le traitement en biopile (Figure 1-1) est un traitement *ex situ*, c'est dire que l'on excave le sol pollué qui est traité dans un centre de traitement de sol. Le sol est placé en andain d'environ 1,5 m de hauteur. Un système d'aération permettant à l'air ambiant de traverser le sol est installé et un biofiltre est utilisé pour traiter l'air pouvant contenir des composés volatils. Un système d'irrigation peut être placé à la surface du sol pour ajuster l'humidité et introduire des nutriments sous forme liquide (von Fahnstock et al., 1998).

Le traitement de sol par bioventilation *in situ* (Figure 1-2) est identique au traitement en biopile excepté que le sol reste en place et que les systèmes d'aération et d'irrigation doivent être installés en conséquence. Des puits d'injection et d'extraction d'air permettent l'aération de la zone polluée et un système d'irrigation placé à la surface du sol permet d'ajuster l'humidité et d'introduire des nutriments sous forme liquide.

Le système étudié dans ce projet peut donc être défini comme un élément de volume où a lieu la biodégradation d'un polluant et à travers lequel les écoulements d'air et d'eau peuvent se produire simultanément.

Une revue de littérature générale, permettant de cerner la problématique, nous conduira à l'adoption, d'une part, d'une hypothèse de recherche accompagnée d'objectifs généraux et spécifiques et, d'autre part, d'une méthodologie générale. Les chapitres suivants, comprenant les résultats, seront composés d'une revue de littérature, d'une méthodologie et d'une discussion spécifiques. Ensuite, une discussion générale, au cours de laquelle les résultats seront confrontés à l'hypothèse de recherche et aux objectifs, sera développée. Enfin, une conclusion générale et des recommandations parachèveront cette thèse.

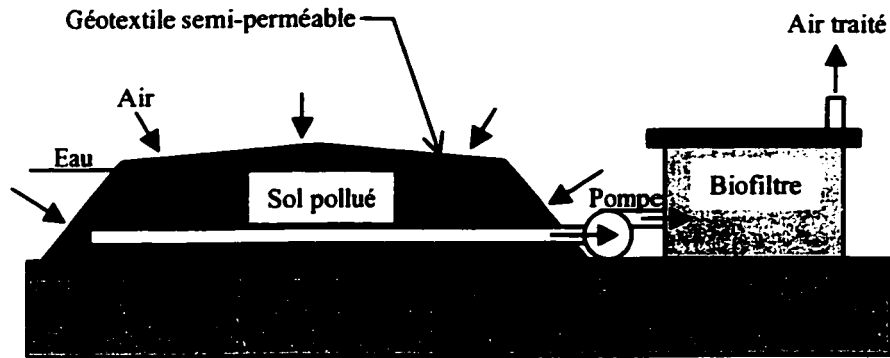


Figure 1-1 Représentation schématique d'un traitement en biopile.

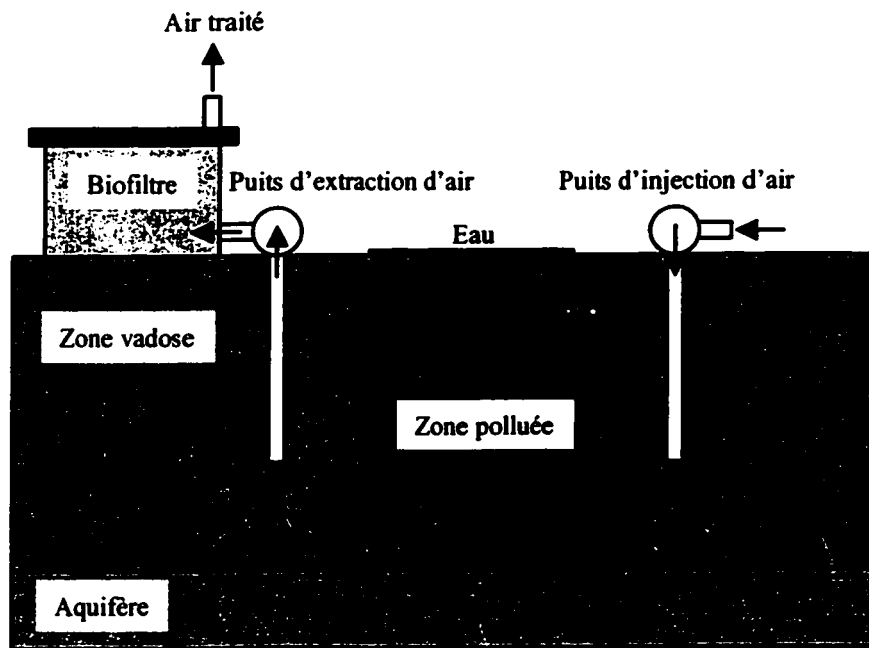


Figure 1-2 Représentation schématique d'un traitement par bioventilation *in situ*.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE GÉNÉRALE

2.1 Introduction

Le cadre de l'étude a été défini comme un élément de volume où a lieu la biodégradation d'un polluant et à travers lequel des écoulements d'air et d'eau peuvent se produire simultanément. Ainsi, deux types de phénomène se dégagent naturellement de cette définition : le phénomène hydrodynamique caractérisant les écoulements d'air et d'eau dans un milieu poreux et le phénomène biocinétique caractérisant la biodégradation du polluant. En suivant le principe bien connu selon lequel on ne peut contrôler que ce que l'on mesure, la revue de littérature suivante débutera par un inventaire des sondes, capteurs et analyseurs disponibles pour le suivi en temps réel des phénomènes hydrodynamiques et biocinétiques mentionnés ci-dessus. Par la suite, le point sera fait sur les travaux de recherche portant sur la modélisation et la commande optimale des bioprocédés. Une conclusion nous conduira alors vers l'adoption d'une hypothèse de recherche.

2.2 Suivi informatisé des bioprocédés dans un milieu poreux non-saturé

2.2.1 Suivi des phénomènes hydrodynamiques

Le suivi des phénomènes hydrodynamiques consistent à suivre les paramètres caractérisant les écoulements d'air et d'eau.

En ce qui concerne l'écoulement d'air, des capteurs de pression d'air peuvent être utilisés. Les capteurs de pression électroniques permettent la mesure de la pression relative d'air par rapport à la pression atmosphérique.

La caractérisation de l'écoulement d'eau peut être effectuée de deux manières différentes : la mesure de l'humidité et la mesure de la pression d'eau ou succion. Plusieurs techniques sont disponibles pour la mesure de l'humidité, les deux principales

étant les sondes électriques et les sondes RDT (Réflectométrie dans le domaine du temps).

Le principe des sondes électriques, composés de plusieurs électrodes, repose sur l'influence de l'eau sur la conductivité électrique du sol.

La technique de réflectométrie dans le domaine du temps (RDT) est une technique rapide et non-destructrice qui permet la mesure indirecte du contenu volumique en eau dans un milieu poreux (O'Connor et Dowding, 1999). Cette technique est basée sur le caractère diélectrique du sol. Une onde électromagnétique de haute fréquence (de l'ordre de 3 GHz) est transmise le long de plusieurs tiges parallèles en contact avec le sol. L'onde est réfléchi au bout des tiges. La vitesse et la fréquence de l'onde sont perturbées par le milieu diélectrique entourant les tiges. En particulier, la constante diélectrique de l'eau est très élevée par rapport à celle des particules de sol et de l'air. Le changement de vitesse et de fréquence de l'onde électromagnétique est ainsi corrélé au contenu volumique en eau. Plusieurs types de sondes se différenciant par le nombre et la géométrie des tiges peuvent être utilisés (Zegelin et al., 1992).

Les sondes RDT sont les sondes les plus utilisées dans l'étude des écoulements étant donné leur niveau de précision supérieur.

La mesure de la pression d'eau est réalisée par des tensiomètres qui quantifient la force de pression avec laquelle l'eau est retenue dans le sol par les particules. Ils sont composés d'une céramique poreuse saturée en eau en contact d'une part avec le milieu poreux et, d'autre part, avec un capteur de pression. De l'eau, supposée non-compressible, est utilisée pour transmettre la pression entre la céramique poreuse et le capteur de pression. Ainsi, l'air présent dans le milieu poreux exerce une succion sur l'eau emprisonnée dans la céramique. Cette succion est transmise au capteur de pression. Plus le milieu poreux est sec, plus la succion est élevée.

Les principaux fournisseurs de sondes en Amérique du Nord sont *Campbell Scientific Corporation* (<http://www.campbellsci.com>), *Soilmoisture Equipment Corporation* (<http://www.soilmoisture.com>) et *Environmental Sensor Inc.* (<http://www.esica.com>).

2.2.2 Suivi des phénomènes biocinétiques

Le suivi des phénomènes biocinétiques consiste en la mesure de réactifs, de produits ou encore de variations de température dues à la chaleur dégagée par les réactions biochimiques.

D'abord, les réactifs associés à la biodégradation d'un polluant en condition aérobie sont le polluant lui-même, l'oxygène et les nutriments. D'une part, parmi ces réactifs, seul l'oxygène est mesurable en temps réel dans la phase gazeuse. L'air interstitiel doit être capté et acheminé à un analyseur d'oxygène. En fait, cette mesure ne permet pas de déterminer précisément la demande en oxygène due à la biodégradation. En effet, la consommation d'oxygène observable est due non seulement à la biodégradation du polluant mais aussi à la respiration naturelle des micro-organismes du sol. D'autre part, le suivi en temps réel des quantités de polluant et de nutriments dans un sol non-saturé est encore de nos jours techniquement impossible et ces quantités ne peuvent être déterminées qu'à partir d'un échantillon de sol prélevé du milieu.

Ensuite, les produits de la réaction de biodégradation en conditions aérobies sont l'eau, la biomasse et le dioxyde de carbone. Bien que mesurable en ligne, la quantité d'eau produite n'est pas suffisante pour affecter l'humidité globale du sol. Ensuite, le dioxyde de carbone est mesurable en temps réel dans la phase gazeuse. À l'instar de l'oxygène, la production de dioxyde de carbone déduite de sa mesure est une valeur qui englobe la minéralisation du polluant et la minéralisation de la matière organique du sol. Enfin, la biomasse ne peut être mesurée qu'à partir d'un échantillon de sol. Les techniques de quantification de la biomasse peuvent être classées en trois catégories : le compte direct au microscope, le dénombrement de micro-organismes cultivables sur des milieux de croissance, et le dénombrement via la quantification de composés intra-cellulaires tels les protéines ou l'ADN (van Elsas et al., 1997; Colwell et Grimes, 2000).

Premièrement, le compte au microscope est une mesure directe qui permet de différencier les cellules viables des cellules non-viables mais constitue un travail fastidieux et statistique. De plus, l'exactitude de cette technique est directement liée à l'étape d'extraction des micro-organismes du sol vers une phase aqueuse. En effet, la

mise en solution des micro-organismes sans affecter leur viabilité constitue un défi en soi. Les principales techniques de décrochage des micro-organismes font appel à des processus mécaniques (utilisation de billes de verres), physiques (utilisation des ultrasons) ou biologiques (utilisation d'enzymes). Enfin, le compte direct au microscope ne permet pas de différencier les populations hétérotrophes des populations hydrocarbonoclastes.

Deuxièmement, le dénombrement des micro-organismes cultivables présente l'avantage de quantifier des populations spécifiques en choisissant le milieu de culture. Ainsi, pour les hétérotrophes, le glucose sera choisi comme source de carbone, tandis que pour les hydrocarbonoclastes, un hydrocarbure, comme l'hexadécane, sera utilisé. Les inconvénients de cette technique résident dans la mise en solution des micro-organismes, comme pour le compte direct par microscopie, et dans la sous-estimation de la population microbienne puisque seuls les micro-organismes cultivables sont quantifiés.

Troisièmement, le dosage de composés intra-cellulaires est une méthode rapide qui ne nécessite pas une mise en solution des micro-organismes, contrairement aux deux techniques décrites précédemment. En effet, les cellules sont brisées *in situ* à l'aide d'une solution aqueuse d'extraction et les composés intra-cellulaires sont ensuite extraits de cette solution puis dosés. La principale difficulté liée à cette méthode réside dans les étapes de purification qui peuvent affecter le rendement d'extraction. De plus, la conversion de la quantité d'un composé intra-cellulaire à un nombre de bactéries repose sur l'hypothèse que la concentration de ce composé dans les cellules est constante.

Les avantages et les inconvénients des techniques décrites ci-dessus sont résumés dans le Tableau 2-1.

Enfin, la mesure de la température constitue en théorie une technique permettant le suivi de la biodégradation. En effet, la réaction de biodégradation étant exothermique, le dégagement d'énergie doit se traduire par une augmentation de température du milieu. Ainsi, des tests de microcalorimétrie ont été mis au point pour le suivi de la biodégradation dans des cellules thermiquement isolées (Fradette et al., 1994). Toutefois, cette technique n'est pas applicable pour le suivi à grande échelle. En effet, la

quantité de chaleur dégagée par la réaction de biodégradation est négligeable par rapport aux échanges thermiques du sol avec le milieu ambiant (Schoefs et al., 1998).

Tableau 2-1 Principales techniques de quantification des micro-organismes : avantages et inconvénients

Technique	Avantages	Inconvénients
Compte direct par microscopie	- Compte direct - Distinction entre les cellules viables et non-viables	- Fastidieux - Nécessite la mise en solution des micro-organismes
Dénombrement des micro-organismes cultivables	- Comptes spécifiques	- Nécessite la mise en solution des micro-organismes - Sous-estimation
Quantification de composés intra-cellulaires	- Pas de mise en solution des micro-organismes - Rapidité	- Étapes de purification - Mesure indirecte

En résumé, le suivi en temps réel des phénomènes biocinétiques se résume donc au suivi de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans la phase gazeuse. Cette mesure, quoi qu'intégrant les processus biologiques globaux du sol, fournit une information précieuse sur la biodégradation du polluant. Car, dans la mesure où le sol ne contient que de la matière organique stable hormis le polluant, la minéralisation de la matière organique pourra être négligée par rapport à la minéralisation du polluant.

2.3 Modélisation et contrôle des procédés de biodégradation dans un milieu poreux non-saturé

La modélisation des procédés de biodégradation dans un milieu poreux non-saturé est clairement divisée en deux dans la littérature : la modélisation hydrodynamique et la modélisation biocinétique.

En ce qui concerne la modélisation hydrodynamique, la littérature est très abondante pour les écoulements de liquides sans aération forcée. Les principaux modèles dynamiques proposés sont basés sur la loi de Darcy généralisée par Richards (Bear, 1972; Hillel, 1980; Kovács, 1981; Fredlund et Rahardjo, 1993) et sur des relations semi-empiriques permettant de prédire la conductivité hydraulique non-saturée (van Genuchten, 1980; Mualem, 1986). En absence d'aération forcée, les modèles numériques, basés sur la loi de Darcy et les relations prédictives de la conductivité hydraulique non-saturée, permettent de décrire de façon satisfaisante la percolation de l'eau dans un sol (Haverkamp et al., 1977; Mc Dougall et Pyrah, 1998). Toutefois, leur utilisation comme outil prédictif est souvent limitée par de nombreux phénomènes comme le phénomène d'hystérésis lors de cycles de mouillage/séchage (Parlange, 1976) et le phénomène de piégeage d'air (Grismer et al., 1994; Latifi et al., 1994; Bicalho et al., 2000). Les modèles pour l'écoulement de l'air sont aussi basés sur l'équation de Darcy pour un fluide compressible et ont fait l'objet de plusieurs études (Felton et Reddell, 1992; Yang et al., 1998). Toutefois, l'identification de la conductivité à l'air est confrontée à des problèmes similaires à ceux rencontrés pour l'identification de la conductivité hydraulique non-saturée. Malgré l'existence de modèles pour les écoulements de l'air d'une part et de l'eau d'autre part, aucun modèle en régime transitoire, à notre connaissance, n'a encore été calibré pour décrire l'infiltration d'eau en présence d'une aération forcée. Or, les modèles d'écoulement complet font intervenir trois variables d'état qu'il est possible de mesurer en temps réel : la pression d'air, la succion et le contenu en eau. Il en résulte que l'existence de modèles phénoménologiques et la possibilité de mesurer les variables d'états impliquées constituent des atouts majeurs pour le suivi et le contrôle des écoulements.

La modélisation de la biodégradation dans un sol non-saturée n'est pas aussi largement traitée que celle dans un milieu saturée. Toutefois, des modèles phénoménologiques basés sur la représentation mathématique du transfert d'oxygène, du transfert de polluant et de la biodégradation ont été développés et calibrés *a posteriori* (Li et al., 1995; Fu et al., 1996; Tabak et al., 1997). Le calibrage des modèles a suivi dans la plupart des cas le principe de découplage des phénomènes en estimant les paramètres à partir de tests simples. À notre connaissance, aucun modèle de biodégradation dans un milieu poreux n'a été validé avec des paramètres déterminés *a priori*.

Le contrôle des procédés de biodégradation de polluants dans un milieu poreux non-saturé est un sujet très peu abordé dans la littérature. Plusieurs études ont porté sur le développement de stratégies de contrôle indirect de la biodégradation. Ainsi, les travaux de (Vanderby, 1998) ont conduit au développement d'un algorithme de contrôle permettant de maintenir une concentration constante d'oxygène à la sortie d'un système d'aération. Cet algorithme permet donc de minimiser le débit d'air insufflé en fonction de la demande en oxygène et donc de réduire les coûts en énergie. D'autres études ont porté sur la conception optimale des procédés de bioventilation en régime permanent (Wilson, 1995; Gerke et al., 1999). Les résultats de ces études permettent principalement l'optimisation des positions des puits d'injection et d'extraction d'air et l'optimisation des débits d'extraction d'air pour la récupération des composés organiques volatils. À notre connaissance, aucune étude ne s'est encore attaquée à l'optimisation directe de la biodégradation dans un milieu poreux non-saturé.

Il existe deux principales approches au contrôle actif des bioprocédés basé sur la théorie des systèmes. Elles se différencient par le type de modélisation du système. La première approche consiste à considérer le système comme une « boîte noire » et à construire une fonction de transfert permettant de relier linéairement les sorties et les entrées du système. Ces modèles comportent un certain nombre de paramètres, sans signification physique, qui sont identifiés à l'aide de données expérimentales. Le calibrage des modèles entrée-sortie et la conception des contrôleurs sont réalisés suivant différentes techniques (Söderström et Stoica, 1989). La seconde approche est basée sur une

modélisation phénoménologique. Le système est alors décrit par un ensemble d'équations différentielles partielles non-linéaires. Ces modèles augmentent le niveau de connaissance des phénomènes impliqués dans le procédé mais font intervenir en général plus de paramètres que les modèles linéaires invariants, ce qui rend le calibrage (identification des paramètres) plus difficile. L'implantation des contrôleurs est également plus délicate et doit souvent faire appel à la théorie de la commande linéarisante (Bastin et Dochain, 1990).

Les contrôleurs appliqués aux modèles de types entrée-sortie sont relativement simples à concevoir et à implanter mais leur limite réside dans la fiabilité puisqu'ils ne sont valides qu'autour des conditions d'opérations pour lesquels ils ont été calibrés. Il est possible d'améliorer la fiabilité des modèles en ayant recours à une modélisation phénoménologique. Basés sur des processus physiques (transfert d'oxygène, transfert de contaminant, biodégradation), les modèles phénoménologiques sont capables théoriquement de décrire le procédé quelles que soient les conditions d'opération. Toutefois, concernant les bioprocédés d'assainissement des sols, les modèles phénoménologiques font intervenir de nombreux paramètres dont certains sont très difficiles à évaluer et des états dont certains ne sont pas mesurés. Plusieurs études ont porté sur l'identification de paramètres à partir de tests élémentaires. Parmi les paramètres difficilement identifiables, on retrouve par exemple les paramètres de transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase aqueuse (Lingineni et Dhir, 1992; Armstrong et al., 1994), les paramètres de transfert de polluant d'une phase ad- ou absorbée à la phase aqueuse (Li et al., 1995) et les paramètres de biodégradation (Hickey, 1995; Li et al., 1995; Nielsen et al., 1996). Malgré l'effort apporté à l'identification des paramètres à l'aide de tests élémentaires, certains paramètres englobent plusieurs phénomènes et ainsi fluctuent avec le temps. Pour pallier ce problème, des algorithmes permettent l'identification de paramètres et l'observation des états non mesurés en temps réel à l'aide de mesures de variables d'opération. Ces algorithmes sont appelés « capteurs-logiciels » et permettent d'ajuster le modèle en temps réel en fonction des conditions *in situ*. Après l'identification complète du modèle, appelé dès lors modèle

adaptatif, les algorithmes de contrôle basés sur la théorie des systèmes adaptatifs peuvent être conçus. Parmi les applications couvertes, on peut mentionner les procédés de culture de cellules (Pomerleau, 1990; Perrier et al., 2000), un procédé d'enlèvement des nitrates par biofiltration (Bourrel, 1996) et d'une façon générale les procédés de traitement des eaux polluées (Perrier et Dochain, 1993; Bourrel, 1996; Julien, 1997). Pour tous ces procédés, des capteurs-logiciels ont permis d'observer des états non-mesurés, telle la concentration en cellule, d'estimer des paramètres inconnus tels les coefficients de rendement et les taux spécifique de croissance.

2.4 Conclusion

Le suivi des procédés de biodégradation dans un sol non-saturé passe par le suivi des écoulements liquides et gazeux et par le suivi de la biodégradation.

En ce qui concerne les écoulements, des capteurs de pression d'air, de succion et des sondes à humidité sont disponibles et, d'après les modèles phénoménologiques existants, constituent *a priori* des outils adéquats pour le suivi des écoulements. Les modèles numériques basés sur la loi de Darcy et les relations permettant la détermination de la conductivité hydraulique non-saturée permettent de décrire de façon satisfaisante l'infiltration d'eau dans un sol non-saturé. Toutefois, la grande variabilité des paramètres vis-à-vis de phénomènes locaux et imprévisibles tels le phénomène d'hystérésis ou de piégeage d'air rend difficile l'utilisation de ces modèles comme outil robuste de prédiction et de contrôle.

Du côté du suivi de la biodégradation, les indicateurs mesurables en temps réel sont peu nombreux et indirects. En effet, la consommation d'oxygène et la production du dioxyde de carbone, dues à l'activité microbienne globale du sol, sont les seuls indicateurs du phénomène de biodégradation. Or, les phénomènes microscopiques qui influencent directement la biodégradation telle la bio-accessibilité du polluant ne peuvent être suivis en ligne. Ainsi, les modèles développés et calibrés *a posteriori* ne constituent pas des outils de prédiction robuste de la biodégradation dans un sol non-saturé. Il en résulte que le suivi des procédés de traitement des polluants dans un sol non-saturé se résume actuellement à une acquisition en temps réel d'information partielle et le contrôle à une

conception optimale et à l'instauration de conditions d'opérations issues de tests de traitabilité en laboratoire.

Or, dans de nombreux procédés biologiques en phase liquide, la théorie des systèmes adaptatifs a permis de pallier les problèmes d'identifiabilité en développant des capteurs-logiciels capables d'observer les états non-mesurés et d'estimer les paramètres inconnus en temps réel à l'aide de mesures en ligne.

La question se pose maintenant de savoir si les outils de la théorie des systèmes adaptatifs sont applicables aux procédés de biodégradation d'un polluant dans un sol non-saturé.

CHAPITRE 3 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE, OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

3.1 Hypothèse de recherche

L'hypothèse de recherche est basée sur plusieurs observations issues de la revue de littérature. Premièrement, des modèles phénoménologiques en régime transitoire ont été développés pour décrire, d'une part, les écoulements d'eau et d'air dans un milieu poreux et, d'autre part, le phénomène de biodégradation dans un milieu poreux non-saturé. Deuxièmement, des paramètres et variables d'état clés, telles la concentration en polluant et les conductivités du milieu poreux, ne sont pas identifiables ou ne peuvent pas être mesurés en temps réel. Or, des techniques d'estimation de paramètres et d'observation des états en temps réel sont des outils qui ont démontré leur efficacité à suivre et contrôler certains bioprocédés de productions et environnementaux. Ainsi, l'hypothèse de recherche s'énonce comme suit :

Le suivi en temps réel, permettant ultérieurement le contrôle, des procédés de biodégradation dans un sol poreux non-saturé peut être assuré par le développement de capteurs-logiciels issus de la théorie des systèmes adaptatifs.

3.2 Objectifs

L'objectif principal lié à l'hypothèse de recherche est de développer un modèle phénoménologique de référence rendant les procédés de biodégradation dans un milieu poreux non-saturé observables en temps réel.

Les objectifs particuliers consistent à développer des capteurs-logiciels nécessaires à l'identification des conductivités du milieu poreux et à l'observation de la biodégradation.

Pour ce faire, une méthodologie générale a été développée.

3.3 Méthodologie générale

Afin de pouvoir caractériser les phénomènes impliqués dans les tests expérimentaux, certains paramètres ont été fixés :

- l'hexadécane a été choisi pour représenter les hydrocarbures pétroliers peu solubles;
- le sol étudié a été choisi pour ses bonnes propriétés hydriques et biologiques;
- le sol étudié a été tamisé préalablement à 2 mm afin de permettre des études en microcosmes et en colonne;
- le sol étudié a été pollué artificiellement pour contrôler les conditions initiales de traitement (pollution connue, répartition uniforme du polluant).

Le modèle phénoménologique de référence comprend un modèle hydrodynamique et un modèle biocinétique. Bien que le modèle biocinétique soit influencé par les écoulements d'air et d'eau, les phénomènes liés à la biodégradation du polluant sont des phénomènes microscopiques et, en conséquence, deux modèles peuvent être développés en parallèle. En revanche, la méthodologie générale est commune aux deux études, hydrodynamique et biocinétique. Ainsi, la première étape consiste à développer un modèle mathématique descriptif en écrivant les équations différentielles basées sur des lois phénoménologiques et sur les équations de continuité. Ensuite, en guise de deuxième étape, le modèle est calibré *a posteriori* à l'aide de données expérimentales. Alors que les tests hydrodynamiques consisteront en des infiltrations d'eau dans des colonnes, les tests biocinétiques seront réalisés dans des microcosmes. Si l'identifiabilité de tous les paramètres n'est pas assurée, alors une réduction du modèle initial doit être entreprise. La réduction du modèle se fait jusqu'à l'obtention d'un modèle identifiable *a posteriori*. La troisième étape consiste à développer les capteurs-logiciels et à les tester sur le modèle calibré *a posteriori*. Si le modèle n'est pas observable (impossibilité structurelle de développer un capteur-logiciel), alors le modèle doit subir une ou plusieurs autres réductions et être re-calibré à partir des données expérimentales. Finalement, la quatrième et dernière étape réside dans la validation des capteurs-logiciels en les

confrontant aux données expérimentales. La méthodologie générale est illustrée à la Figure 3-1.

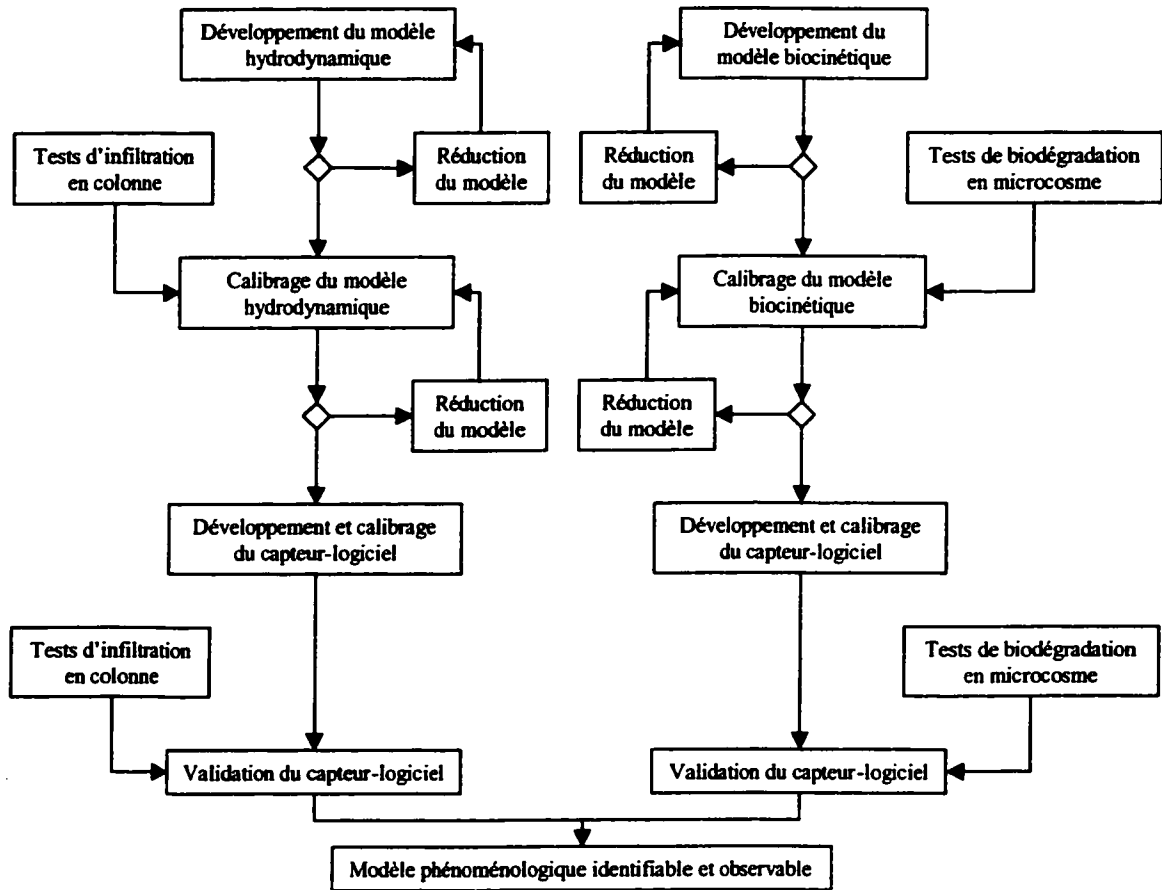


Figure 3-1 Vue d'ensemble de la méthodologie générale.

La présentation de la méthodologie générale a clairement mis en évidence deux études parallèles, l'étude hydrodynamique et l'étude biocinétique, qui feront chacune l'objet d'un chapitre.

CHAPITRE 4 ÉTUDE HYDRODYNAMIQUE

4.1 Introduction

Les bioprocédés de traitement des sols pollués sont caractérisés par des écoulements potentiellement simultanés d'air et d'eau. Il en est ainsi du procédé de traitement en biopile ou encore de la bioventilation *in situ*. L'air et l'eau sont deux éléments indispensables pour de tels procédés. En effet, le rôle de l'air est d'apporter la quantité suffisante d'oxygène au bon développement des micro-organismes et l'eau, indispensable à la survie des micro-organismes, permet la biodisponibilité de la matière organique et du polluant. Ainsi, du point de vue de l'hydrodynamique, le système étudié est un système triphasique (eau-air-sol) dont les concentrations en air et en eau peuvent fluctuer sous l'application de conditions aux frontières données. L'étude hydrodynamique présentée ici consiste donc à prédire les écoulements d'air et d'eau en régime transitoire par une modélisation phénoménologique, comprenant les volets de calibrage et de validation à l'aide de données expérimentales. Dans l'éventualité où des états ne seraient pas mesurés ou des paramètres ne pourraient être identifiés *a priori*, des capteurs-logiciels permettant la reconstruction en temps réel des états non-mesurés et l'identification en ligne des paramètres inconnus seront développés.

4.2 Revue de littérature

4.2.1 Introduction

Pour l'écoulement saturé d'un fluide dans un milieu poreux, les équations de continuité et de mouvement sont les suivantes (Bird et al., 1960) :

$$\varepsilon \frac{\partial \rho}{\partial t} = -(\nabla \cdot \rho \mathbf{v}_f) \quad \text{Équation de continuité} \quad \text{Équation 4-1}$$

$$\mathbf{v}_f = -\mathbf{K}_{sat} \cdot \nabla \phi \quad \text{Loi de Darcy} \quad \text{Équation 4-2}$$

où ε est la porosité du milieu, v_f est la vitesse superficielle du fluide appelée également vitesse de Darcy, ρ est la masse volumique du fluide, K_{sat} est la conductivité du milieu saturé au fluide et où ϕ est la charge hydraulique.

Pour un écoulement non-saturé, la loi de Darcy a été généralisée par Richards en s'écrivant sous la forme suivante :

$$q_f = -K(\theta_f) \cdot \nabla \phi \quad \text{Équation 4-3}$$

où K est la conductivité non-saturée du fluide, fonction du contenu en fluide θ_f .

L'équation de continuité devient :

$$\frac{\partial(\rho \cdot \theta_f)}{\partial t} = -\nabla \cdot (\rho v_f) \quad \text{Équation 4-4}$$

La principale difficulté liée à la résolution des équations 4-3 et 4-4 réside dans l'identification de la conductivité du milieu au fluide considéré.

4.2.2 Modélisation de l'écoulement de l'eau

La modélisation de l'écoulement de l'eau dans un milieu poreux non-saturé est un sujet largement abordé dans la littérature (Bear, 1972; Hillel, 1980; Kovács, 1981; Mualem, 1986; Fredlund et Rahardjo, 1993). Contrairement à un sol saturé, où la pression de l'eau est une grandeur positive correspondant à la colonne d'eau présente au dessus du point de mesure, l'eau, dans un sol non saturé, est soumise à une pression négative par rapport à la pression de l'air. Cette pression négative, appelée succion, est attribuable à la tension superficielle entre l'air et l'eau. Les forces associées à cette tension superficielle, appelée forces capillaires, constituent une résistance au mouvement de l'eau. C'est pourquoi la conductivité hydraulique non saturée est plus petite que la conductivité hydraulique saturée. Il en résulte également que plus le sol est sec, plus les forces capillaires sont élevées et plus l'écoulement de l'eau sera difficile. La Figure 4-1 illustre l'influence de la texture du sol sur la courbe de rétention d'eau. On remarque que l'argile est plus apte à retenir l'eau que le silt et le sable.

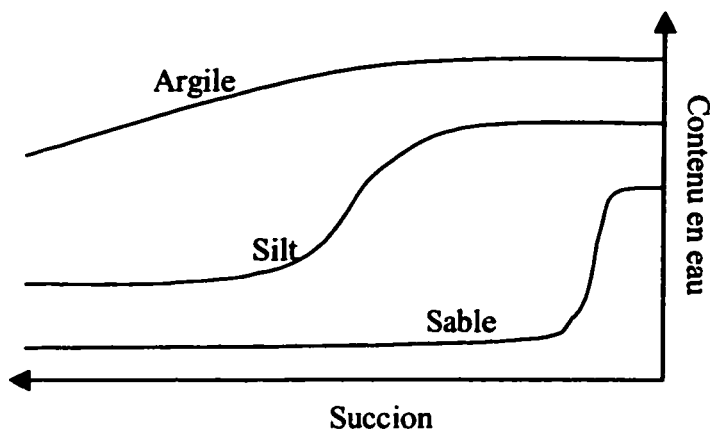


Figure 4-1 Courbe de rétention d'eau (Freeze et Cherry, 1979).

La structure du sol a également une influence importante sur la courbe de rétention d'eau comme le montre la Figure 4-2. En effet, une compaction du sol entraîne une diminution du volume des pores conduisant à une géométrie de pores différente.

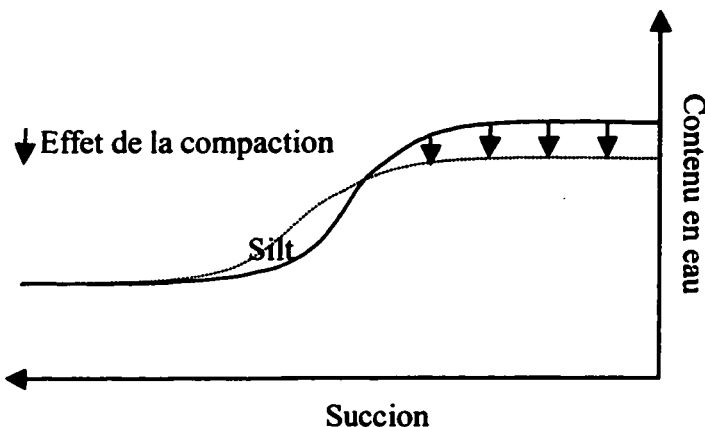


Figure 4-2 Effet de la structure du sol sur la courbe de rétention d'eau (Freeze et Cherry, 1979).

La Figure 4-3 illustre l'influence de la texture sur la conductivité hydraulique. On remarque que le sable est plus perméable que le silt à haut contenu en eau (succion proche de zéro) mais qu'il l'est moins à faible contenu en eau (succion fortement négative). Cette observation illustre bien le pouvoir des forces capillaires à offrir une résistance à l'écoulement.

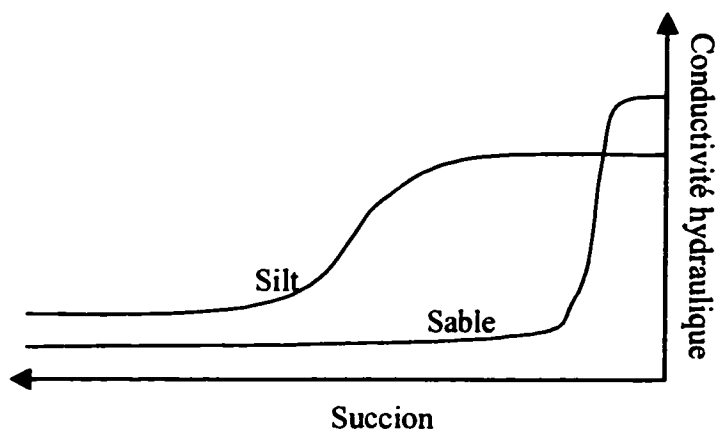


Figure 4-3 Courbes de conductivité hydraulique en fonction de la succion (Freeze et Cherry, 1979).

Théoriquement, la relation entre la succion et la teneur en eau est univoque. Dans la pratique, ce n'est pas le cas. En effet, pour une succion donnée, le contenu en eau sera plus grand lors du séchage que pendant le mouillage comme l'illustre la Figure 4-4. Ce phénomène d'hystérésis a fait l'objet de nombreuses études et la non-univocité de la relation succion-contenu en eau rend difficile la modélisation des écoulements (Topp, 1971; Vachaud et Thony, 1971; Mualem, 1974; Parlange, 1976). Toutefois, la courbe de la conductivité hydraulique en fonction de l'humidité n'est pas affectée par le phénomène d'hystérésis.

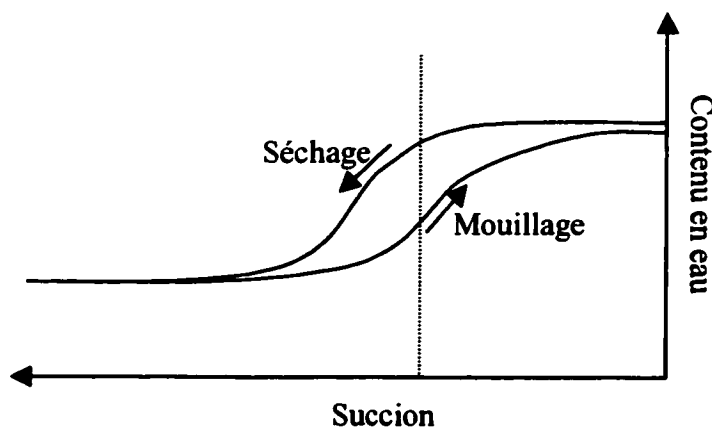


Figure 4-4 Illustration du phénomène d'hysérésis.

L'influence du contenu en eau sur la conductivité hydraulique a fait l'objet de nombreuses études qui ont porté principalement sur le développement de modèles

prédictifs (Mualem, 1976; van Genuchten, 1980; Brutsaert, 2000; Schaap et Leij, 2000). Mualem (1986) constitue une large revue des principaux modèles prédictifs existants. Ces modèles sont basés sur la paramétrisation de la courbe de rétention d'eau à partir de laquelle la formulation de la conductivité hydraulique non-saturée est déduite. Le modèle le plus utilisé, en raison de son applicabilité à différentes textures de sol, est le modèle de van Genuchten-Mualem, dont les équations seront présentées dans la partie *Matériels et méthodes*. Plus récemment, les efforts ont porté sur la paramétrisation de la courbe de rétention d'eau directement à partir de la granulométrie, propriété caractéristique de la texture du sol, et de la porosité, propriété caractéristique de la structure du sol (Aubertin et al., 1998; Arya et al., 1999; Poulsen et al., 1999). Les modèles développés ont été calibrés à partir de nombreux tests de laboratoire mais leur validation demeure toujours un sujet d'étude.

Plusieurs études expérimentales ont permis de calibrer *a posteriori* des modèles prédictifs (Haverkamp et al., 1977; Mc Dougall et Pyrah, 1998). Toutefois, la grande sensibilité de la courbe de rétention d'eau à des facteurs tels la compaction et le phénomène d'hystérésis rendent, encore de nos jours, très compliquée la simulation *a priori* de l'écoulement de l'eau dans un milieu poreux non-saturé.

4.2.3 Modélisation de l'écoulement de l'air

La modélisation de l'écoulement de l'air à travers un milieu poreux en régime transitoire a reçu moins d'égards dans la littérature que celle de l'écoulement de l'eau. Ceci s'explique aisément par le fait que l'écoulement forcé d'air à travers un milieu poreux était impliqué dans peu de phénomènes naturels ou de procédés avant le développement des procédés de restauration biologique des sols pollués. Ces derniers, qui nécessitent l'apport d'oxygène pour les micro-organismes, et le séchage des solides poreux constituent les principales motivations à la modélisation de l'écoulement d'air. De plus, aux débits d'air utilisés, la dynamique est si rapide que l'étude de l'écoulement en régime permanent suffit généralement pour les différents besoins de conception. Toutefois, dans le contexte de l'optimisation des bioprocédés de restauration, l'étude dynamique de l'écoulement de l'air est nécessaire.

Tout comme pour l'écoulement de l'eau, la difficulté à résoudre les équations d'écoulement formées de l'équation de continuité et de la loi de Darcy réside dans l'identification de la conductivité du milieu à l'air, fonction du contenu en eau. D'une part, des protocoles expérimentaux ont été développés afin de mesurer la perméabilité à l'air (Smith et al., 1998; Springer et al., 1998). La relation de base utilisée à l'identification expérimentale de la perméabilité à l'air est la suivante (Corey, 1986):

$$k = \frac{Q \cdot L \cdot \mu_a}{A \cdot \Delta P \cdot \rho_a \cdot g} \quad \text{Équation 4-5}$$

où Q est le débit volumique d'air traversant une colonne de section A et de longueur L , ΔP est la perte de charge à travers la colonne, μ_a et ρ_a sont respectivement la viscosité et la masse volumique de l'air, et g est la constante d'accélération gravitationnelle.

D'autre part, des études ont porté sur le développement de modèles prédictifs. La première approche est basée sur la perméabilité du milieu, reliée à la conductivité par la relation suivante :

$$k = K_f \frac{\mu_f}{\rho_f g} \quad \text{Équation 4-6}$$

où k est la perméabilité du milieu, K_f est la conductivité du milieu au fluide considéré, μ_f et ρ_f sont respectivement la viscosité et la masse volumique du fluide, et g est la constante d'accélération gravitationnelle. Dans la mesure où le fluide et la matrice solide n'interagissent pas de façon à modifier les propriétés de chacun, la perméabilité est une caractéristique du milieu indépendante de la nature du fluide. Cette hypothèse n'est rigoureusement pas valide pour l'eau puisque le caractère polaire de l'eau indique l'existence potentielle d'interaction entre l'eau et la matrice solide (Moldrup et al., 1998). Toutefois, les travaux de Loll et son équipe ont mené à une relation empirique reliant la conductivité hydraulique saturée, K_s ($\text{m} \cdot \text{j}^{-1}$), et la perméabilité mesurée à l'air à une succion de -100 cm d'eau, k_a (m^2) (Loll et al., 1999). Cette relation, calibrée à partir de 1614 échantillons, est la suivante :

$$\log(K_s) = 1,27 \log(k_a) + 14,11 \quad \text{Équation 4-7}$$

Bien que cette étude ne permette pas de relier la conductivité hydraulique non-saturée à la perméabilité à l'air pour tout contenu en eau, elle demeure un point de départ intéressant pour le développement d'une relation généralisée.

À l'instar de la conductivité hydraulique non saturée, d'autres études ont porté sur le développement de modèles paramétriques prédictifs utilisant la granulométrie du sol et la porosité. (Stylianou et DeVantier, 1995) et (Poulsen et al., 1999) constituent deux bonnes références présentant les principales relations développées jusqu'à ce jour. Aussi, ces modèles prédictifs, quoique très utiles, présentent une grande sensibilité à la porosité et, à ce jour, aucune relation ne peut encore être utilisée de façon universelle.

4.2.4 Modélisation des écoulements simultanés d'air et d'eau

La littérature est relativement pauvre en ce qui concerne la modélisation des écoulements d'eau avec aération forcée en régime transitoire dans un milieu poreux. Même si les équations de base ont été posées depuis longtemps (Bear, 1972; Parker et al., 1987), aucune étude, à notre connaissance, n'a été en mesure de calibrer et valider un modèle. Les études les plus proches ont porté sur l'effet de la compression d'air et de son écoulement à contre-courant sur l'infiltration d'eau à travers une couche confinée (Felton et Reddell, 1992; Grismer et al., 1994; Latifi et al., 1994; Bicalho et al., 2000). Grismer et al. (1994) ont adapté les équations de Green et Ampt (Green et Ampt, 1911), modèle analytique simple prédisant l'infiltration d'eau dans un sol non-saturé, pour tenir compte de l'écoulement d'air à contre-courant induit par sa compression dans une couche confinée. La loi de Darcy et les relations de van Genuchten-Mualem ont été utilisées et deux paramètres ont été introduits afin de tenir compte des forces de frottement dues à l'écoulement de l'air. Le nouveau modèle analytique, a été confronté à des données expérimentales obtenues sur 9 types de sol. Les résultats ont montré que l'écoulement de l'air à contre-courant pouvait influencer significativement l'infiltration de l'eau mais l'identification des paramètres liés aux forces visqueuses appliquées par l'air sur l'eau est demeurée délicate étant donnée les phénomènes d'hystérésis et de chemins préférentiels observés.

4.2.5 Conclusion

La modélisation des écoulements d'air et d'eau a fait l'objet de nombreuses études qui ont porté principalement sur le développement de modèles prédictifs des conductivités du milieu poreux au fluide considéré. Ces études ont conduit au calibrage de modèles dont l'applicabilité demeure souvent restreinte. En effet, les modèles ont toujours été calibrés *a posteriori* et aucun modèle entièrement prédictif n'a encore la prétention de pouvoir s'appliquer à toute texture et structure de sol. La connaissance des conductivités demeure donc de nos jours un enjeu important. Pour pallier ce problème, une voie parallèle peut être envisagée, à savoir l'estimation *in situ* et en temps réel de la conductivité. Le développement de tels algorithmes, connus sous le nom de capteurs-logiciels et utilisés avec succès sur les modèles de bioréacteurs (Bastin et Dochain, 1990), nécessitent un modèle dynamique et la mesure d'une ou plusieurs variables d'état. Dans les milieux poreux non-saturés, l'équation de continuité et la loi de Darcy conduisent à un modèle dynamique des écoulements d'air et d'eau, et les variables d'état, que sont la succion, la pression d'air et le contenu en eau, peuvent être mesurées *in situ* et en temps réel à l'aide de sondes et/ou capteurs. Il en résulte que l'estimation *in situ* et en temps réel des conductivités est une voie qui sera explorée au cours de cette étude hydrodynamique.

4.3 Matériels et méthodes

4.3.1 Modélisation physique

4.3.1.1 Tests standards pour l'obtention des propriétés hydrogéologiques

Le sol choisi provient d'une pépinière où il y est utilisé comme composante d'un sol destiné au jardinage. Quelques propriétés hydrogéologiques de base ont été déterminées expérimentalement. Les tests ont été réalisés dans le département des génies Civil, Géologique et des Mines. Le Tableau 4-1 présente les résultats des tests en précisant les protocoles utilisés.

Tableau 4-1 Propriétés hydrogéologiques de base

Propriété	Protocole(s) utilisé(s)	Résultat
Analyse granulométrique	ASTM : D421, D422, D1140,	Voir Figure 4-5
Densité relative des grains	D2217, E11	2,622
Conductivité hydraulique saturée	ASTM D2434-68 (74)	$2,60 \cdot 10^{-3}$ cm/s
Carbone organique total	SM5310C, TRAACS800 860-87T	2,2 %

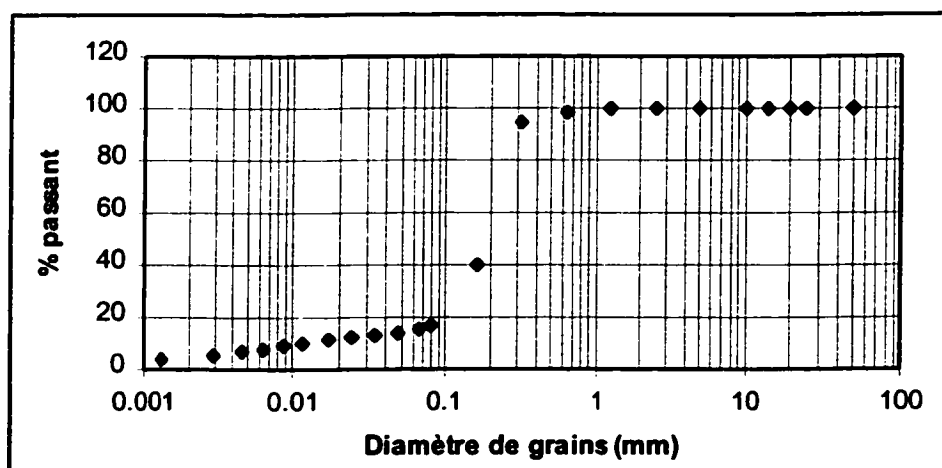


Figure 4-5 Courbe granulométrique.

D'après l'analyse granulométrique et le système de classification USDA, le sol contient 4,9% d'argile, 9,4% de silt et 85,7% de sable et s'inscrit donc dans la catégorie des sables silteux avec matière organique (*loamy sand*) (Gee et Bauder, 1986). Il s'agit donc d'un sable contenant une quantité non négligeable de matière organique comme en témoigne l'analyse du carbone organique total qui s'élève à 2,2%. Cette teneur en matière organique aura pour conséquence de diminuer significativement la conductivité hydraulique non-saturée. Cette observation est confirmée par la mesure de la conductivité hydraulique saturée s'élevant à $2,6 \cdot 10^{-3}$ cm/s pour une porosité, η , de 0,5195, ce qui correspond à un sable peu perméable (Klute et Dirksen, 1986). La densité relative de grains, égale à 2,622, est une grandeur qui sert au calcul de la porosité du sol en place et donc de la valeur théorique du contenu en eau à saturation. La porosité totale du sol, maintenue constante pour tous les tests hydrodynamiques, s'élève à 0,5195.

4.3.1.2 Tests de rétention d'eau

La courbe de rétention d'eau a été obtenue à l'aide de colonnes de 20 cm de hauteur et 10 cm de diamètre (Figure 4-6). À mi-hauteur a été placée une céramique poreuse (#0652X11-B01M3, SoilMoisture Equipment Corp., Goleta, CA, USA) reliée à un capteur de pression (PX243-2.5BG5V, Omega Engineering Inc., Stamford, CT, USA). La colonne a été remplie du sol étudié à une densité en place donnée. Des disques poreux ont été placés aux extrémités de la colonne afin de maintenir le sol en place. L'installation terminée, la succion a été suivie à l'aide d'un système d'acquisition de données. Lorsque la succion atteint un plateau, typiquement après 24 heures, la céramique poreuse a été retirée et un poids sec a immédiatement été réalisé sur trois échantillons de sol prélevés dans le voisinage de la bougie (PSO-A7, Annexe 1). Le contenu en eau déduit du poids sec et la succion correspondante fournissent un point de la courbe de rétention d'eau. Le test a été répété sur des échantillons de sol différents correspondant à plusieurs humidités. Ce protocole permet la construction point par point de la courbe de rétention d'eau.

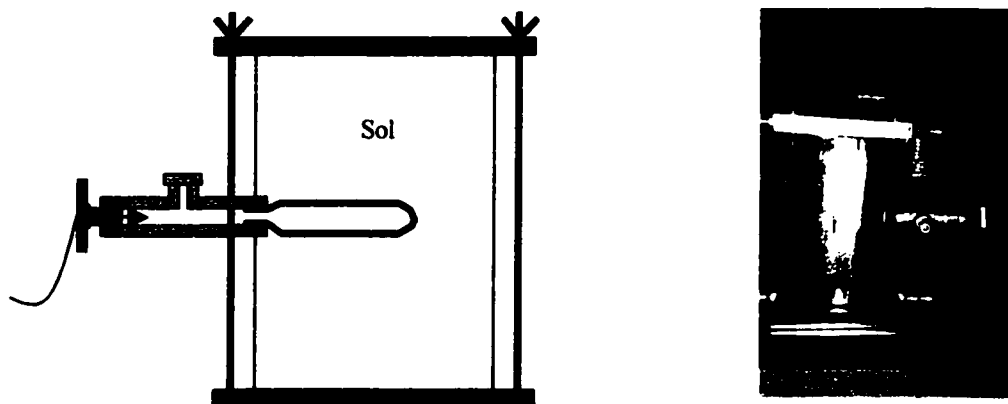


Figure 4-6 Montage pour obtention de la courbe de rétention d'eau.

Pour une densité en place de 1,26 kg sol sec/L, la courbe de rétention d'eau est représentée à la Figure 4-7. D'une part, les capteurs de pression ne permettant pas de mesure une succion inférieure à -250 cm d'eau, le point correspondant à l'humidité la plus faible est erroné. D'autre part, le point correspondant à la saturation (succion nulle) est très difficile d'accès expérimentalement (Chapuis et al., 1988). Il a donc été choisi

d'en calculer la valeur théorique à l'aide de la densité en place et de la densité relative des grains. Ainsi, à l'aide de la densité en place, 1,26 kg sol sec/L, et de la densité des grains, 2,622 kg/L, le contenu en eau à saturation a été estimé à 0,5195 vol./vol., soit encore à 0,4124 g eau/g sol sec.

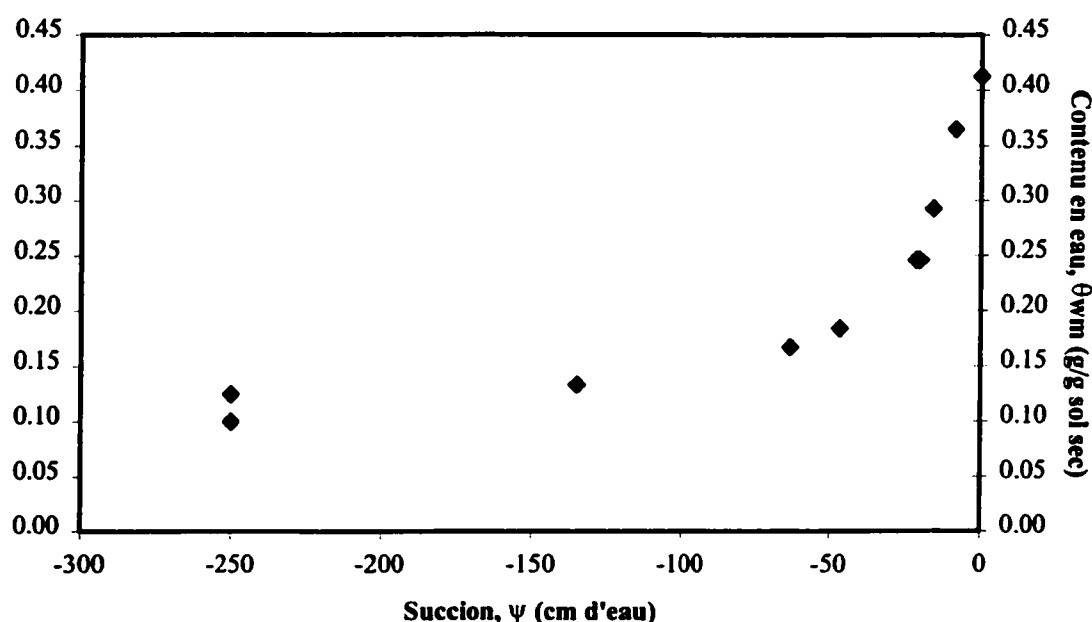


Figure 4-7 Courbe expérimentale de rétention d'eau.

4.3.1.3 Tests de percolation en colonne avec aération forcée

Les tests de percolation ont été réalisés en colonne. Le montage expérimental a initialement été conçu au sein du département des génies Civil, Géologique et des Mines par l'équipe du professeur Michel Aubertin (Aubertin, 1995; Aachib, 1997). La colonne est constituée de 3 sections en *plexiglass* de 50 cm de hauteur et 15 cm de diamètre (Figure 4-8). Les sections ont été rendues solidaires les unes des autres à l'aide de vis et écrous, l'étanchéité entre elles étant assurée par un joint annulaire traité à la graisse à vide. Au fond de la colonne, du sable a été déposé sur une hauteur de 10 cm. Le sol étudié a ensuite été placé kilogramme par kilogramme afin d'obtenir une densité en place la plus constante possible sur toute la hauteur de colonne de sol. Ainsi, 27,2 kg de sol sec ont été introduits sur une hauteur de 130 cm et la densité en place a donc été

évaluée à 1,26 kg sol sec/L. Le sol étudié et le sable ont été séparés physiquement par une grille rigide supportant une papier-filtre en acier de 30 μm (Spectra/Mesh®, Spectrum, Laguna Hills, CA, USA). À la surface du sol, une grille rigide à maillage grossier (0,5 cm) a été placée afin de réduire les éclaboussures de sol lors des arrosages et permettre une meilleure stabilité de la surface. Le système d'aération, conçu pour un écoulement ascendant ou descendant, a utilisé l'air comprimé du bâtiment (P). Le débit d'air a été contrôlé à l'aide d'un contrôleur (FC) de débit massique (FC 260V, 5 SLPM, Tylan Corp., San Diego, CA, USA).

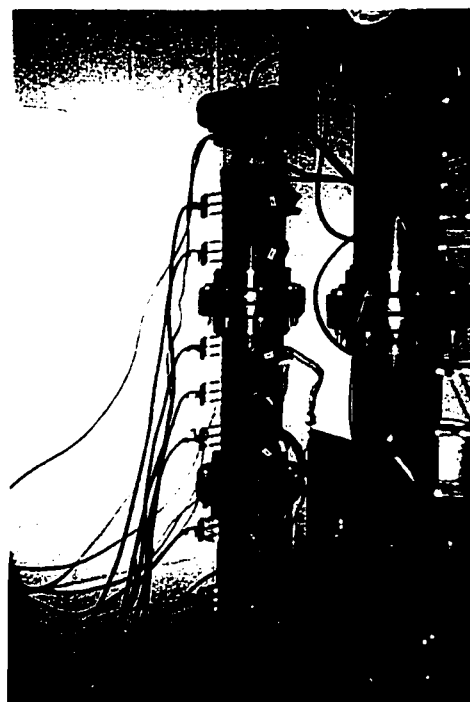
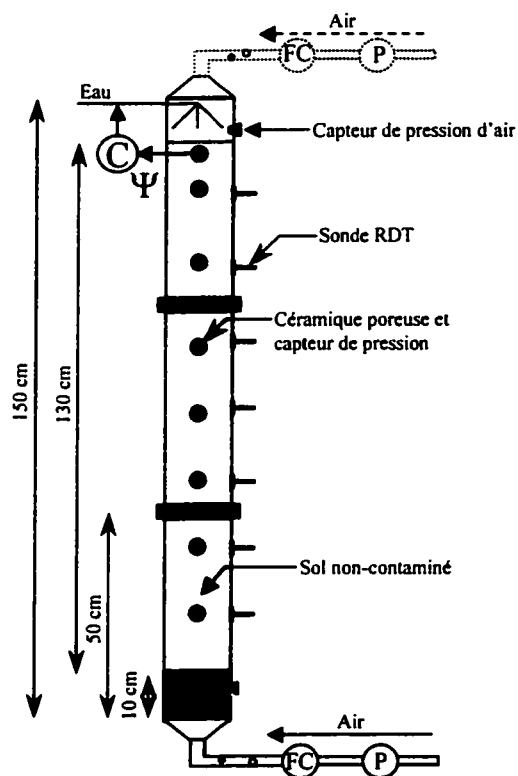


Figure 4-8 Colonne expérimentale pour les tests de percolation.

Le système d'irrigation, utilisant l'eau de la robinetterie du bâtiment, a été conçu de façon à permettre une irrigation par jets, l'irrigation en continu étant techniquement impossible aux débits d'eau envisagés. Ainsi, une buse permettant un jet conique a été installée au sommet sur une plaque en *plexiglass* servant de couvercle étanche à la colonne et une électrovanne a été placée en amont de la buse afin de contrôler la durée du jet. Le calibrage du système d'irrigation a permis de déterminer le volume d'eau injectée

par impulsion. Afin de se rapprocher le plus possible à une infiltration en continu, la durée de l'impulsion a été minimisée en considérant la qualité du jet obtenu. En effet, il était important que le jet soit conique et mouille de façon la plus homogène possible toute la surface du sol. Le plus petit volume d'eau injectée permettant d'obtenir un jet de qualité a été estimé à 7mL/jet. Deux capteurs de pression (PX243-2.5BG5V, Omega Engineering Inc., Stamford, CT, USA) ont été placés l'un en haut de colonne, l'autre en bas de colonne, au niveau de la couche de sable. Des sondes RDT (6005L2, SoilMoisture Equipment Corp., Goleta, CA, USA) et des céramiques poreuses reliées à des capteurs de pression (PX243-2.5BG5V, Omega Engineering Inc., Stamford, CT, USA) ont été placées à différentes profondeurs : 10 cm, 22,5 cm, 48 cm, 60,5 cm, 73 cm, 98,5 cm et 118 cm. Une céramique poreuse a été rajoutée à une profondeur de 2,5 cm afin de permettre un contrôle de la succion en tête de colonne. Le système de contrôle choisi est un contrôleur de base régi par la commande suivante : si la succion mesurée est inférieure à la succion de consigne, alors effectuer un jet. La commande est évaluée toutes les minutes. Les sondes RDT (réflectométrie dans le domaine du temps) sont composées de 3 tiges de 20 cm le long desquelles est propagée une onde électromagnétique de haute fréquence. La fréquence de l'onde est modifiée par le milieu diélectrique entourant les tiges. Or la constante diélectrique de l'eau étant beaucoup plus élevée que celle de l'air et du sol, il en résulte qu'il est possible de déduire du changement de fréquence le contenu en eau du sol. L'émission de l'onde et le traitement du signal ont été élaborés au sein même du département de génie chimique. Le principe de fonctionnement de la sonde RDT est illustré à la Figure 4-9.

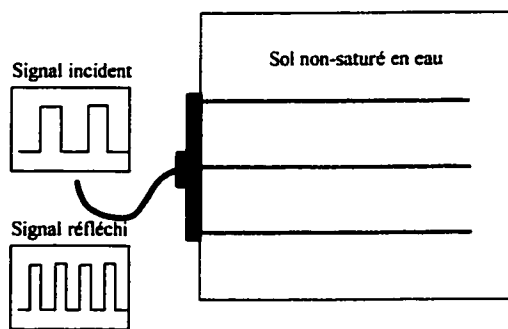


Figure 4-9 Principe de fonctionnement des sondes RDT.

Les céramiques poreuses reliées à des capteurs de pression permettent la mesure de la succion. La céramique ainsi que la partie tubulaire la reliant au capteur de pression sont saturées en eau. Si le sol entourant la céramique n'est pas saturé en eau, l'eau sera attirée hors de la céramique. La pression de succion correspondante est alors transmise au capteur de pression. La mesure sera valide tant que la succion ne sera pas suffisante pour désaturer la céramique poreuse. Le principe de fonctionnement des céramiques poreuses est illustré à la Figure 4-10.

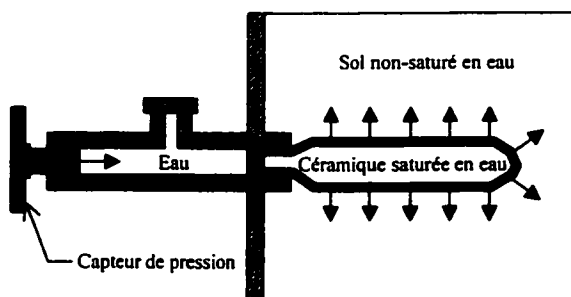


Figure 4-10 Principe de fonctionnement du système de mesure de la succion.

Le système d'acquisition de données est constitué d'une carte d'acquisition installée sur un ordinateur de bureau. Le logiciel LabView a été utilisé pour gérer le suivi et le contrôle des paramètres et pour leur visualisation sur l'écran (Figure 4-11).

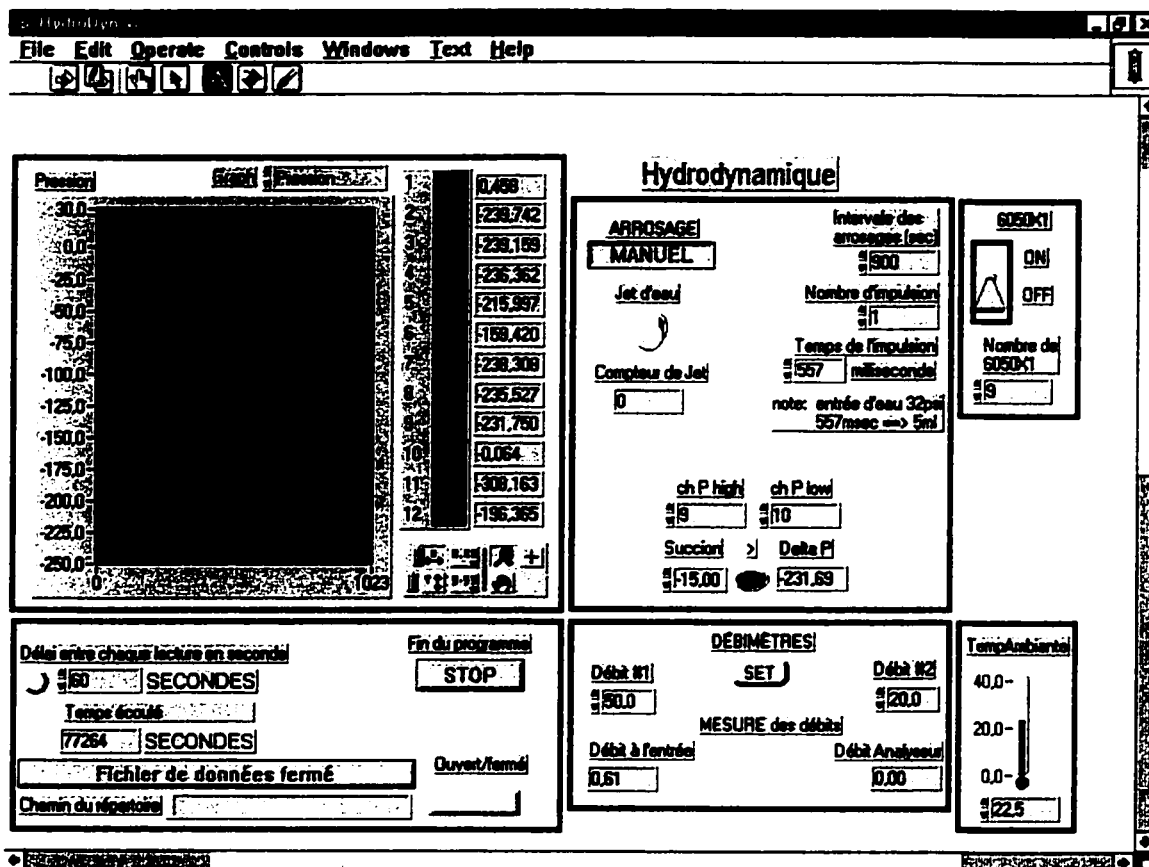


Figure 4-11 Visualisation du suivi et contrôle des paramètres sur LabView (colonne de l'étude hydrodynamique).

Les photos du montage et des phases de préparation sont présentées à l'Annexe 2.

4.3.2 Modélisation mathématique

Le système à modéliser consiste en un écoulement de deux fluides (l'air et l'eau) à travers un milieu poreux sous certaines conditions de pression et de succion. Le milieu poreux étudié est un sol et les hypothèses de l'étude sont les suivantes :

- le sol est assimilé à un milieu indéformable, homogène et isotrope;
- l'écoulement de l'eau est incompressible, unidirectionnel et isotherme;
- le phénomène d'évaporation est négligé.

4.3.2.1 Écoulement d'eau à travers un milieu poreux sans aération

En supposant l'eau incompressible dans les conditions d'écoulement envisagées, l'équation de continuité s'écrit de la façon suivante:

$$\frac{\partial \theta_w}{\partial t} = -\nabla \cdot v_w \quad \text{Équation 4-8}$$

où θ_w est la teneur en eau volumique (m^3/m^3) et v_w est le flux ou vitesse de Darcy (m/s).

La loi de Darcy peut être utilisée dans un milieu non-saturé et s'écrit de la façon suivante:

$$q_w = -K_w(\theta_w) \cdot \nabla \phi \quad \text{Équation 4-9}$$

où ϕ est la charge hydraulique (m) et $K_w(\theta_w)$ est le tenseur des conductivités hydrauliques (m/s).

Les équations 4-8 et 4-9 conduisent à la relation suivante:

$$\frac{\partial \theta_w}{\partial t} = \nabla \cdot (K_w(\theta_w) \cdot \nabla \phi) \quad \text{Équation 4-10}$$

Pour un écoulement unidirectionnel vertical, la charge hydraulique ϕ est définie par :

$$\phi = \psi - z \quad \text{Équation 4-11}$$

où ψ est la charge de pression qui est équivalente à la succion dans un milieu non saturé, et z est la cote prise positivement vers le bas à partir de la surface du sol.

L' équation 4-10 devient alors:

$$\frac{\partial \theta_w}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[K_w(\theta_w) \left(\frac{\partial \psi}{\partial z} - 1 \right) \right] \quad \text{Équation 4-12}$$

où

$$\psi = \frac{P_w + P}{\gamma_w} \quad \text{Équation 4-13}$$

avec $\gamma_w = \rho_w g$ = poids volumique de l'eau ($\text{kg/m}^2 \cdot \text{s}^2$), où ρ_w est la masse volumique de l'eau (kg/m^3). P_w est la pression de l'eau prise négativement et P est la pression de l'air prise positivement.

Si la pression atmosphérique est prise comme référence, alors $P = 0$ et :

$$\psi = \frac{P_w + P}{\gamma_w} = \frac{P_w}{\gamma_w} = \psi_w \quad \text{Équation 4-14}$$

L'équation 4-12 peut encore s'écrire sous la forme suivante, appelée équation de Richards :

$$C(\psi_w) \frac{\partial \psi_w}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[K_w(\theta_w) \left(\frac{\partial \psi_w}{\partial z} - 1 \right) \right] \quad \text{Équation 4-15}$$

$C(\psi_w)$ est la capacité capillaire et est définie de la façon suivante :

$$C(\psi_w) = \frac{d\theta_w}{d\psi_w} \quad \text{Équation 4-16}$$

Les fonctions $C(\psi_w)$ et $K_w(\psi_w)$ peuvent être identifiées à partir de tests de rétention d'eau et de modèles de régression. van Genuchten (1980) a proposé les formulations suivantes (relations de van Genuchten-Mualem) :

$$\theta_e = \left[\frac{1}{1 + |\alpha \psi_w|^n} \right]^m \quad \text{Équation 4-17}$$

où α , m et n sont des constantes (m étant généralement relié à n par la relation suivante :

$m = 1 - \frac{1}{n}$ (van Genuchten, 1980)) et θ_e est le degré de saturation relative défini de la façon suivante :

$$\theta_e = \frac{\theta_w - \theta_r}{\theta_s - \theta_r} \quad \text{Équation 4-18}$$

où θ_r est la teneur en eau résiduelle et θ_s est la teneur en eau à saturation.

Il en résulte que la capacité capillaire peut s'écrire sous la forme suivante :

$$\frac{d\theta_w}{d\psi_w} = -\text{signe}(\psi_w) (\theta_s - \theta_r) \frac{\alpha m n |\alpha \psi_w|^{n-1}}{(1 + |\alpha \psi_w|^n)^{m+1}} \quad \text{Équation 4-19}$$

$$K_w = K_{sat} \sqrt{\theta_e} \left[1 - \left(1 - \theta_e^{1/m} \right)^m \right]^2 \quad \text{Équation 4-20}$$

où K_{sat} est la conductivité hydraulique à saturation.

L'équation de Richards est une équation différentielle du premier ordre par rapport au temps et du deuxième ordre par rapport à l'espace. Sa résolution nécessite donc une condition initiale et deux conditions aux frontières. La condition initiale est facilement accessible. En effet, l'irrigation commence 24 heures après le montage de la colonne de façon à permettre aux capteurs de succion de s'équilibrer. Puisque le sol est sec, le système est en pseudo-équilibre de sorte que l'humidité du sol est uniforme dans la colonne, et donc les succions sont toutes égales. La première condition spatiale, en haut de colonne, est une condition fixe : une succion donnée est maintenue constante. Les conditions de Danckwerts ont été choisies pour la deuxième condition spatiale, à savoir que le flux est nul quand z tend vers l'infini : $h = \text{constante}$. Puisque le sol est sec et que le système est en pseudo-équilibre, il est acceptable de considérer que la succion demeure constante lorsque z tend vers l'infini. Dans les simulations, l'infini sera considéré comme étant à 200 cm de la surface du sol. Ainsi, les conditions initiales et limites de l'équation de Richards peuvent être représentées par le système suivant :

$$\psi_w(0, z) = \psi_w^i(z) \text{ connus;}$$

$$\psi_w(t, 0) = \psi_w^c \text{ fixée;}$$

$$\frac{d\psi_w}{dz}(t, 200) = 0.$$

Enfin, le débit d'eau injectée en tête de colonne, Q_w , est donné directement par la loi de Darcy et s'écrit de la façon suivante :

$$Q_w = -A \cdot \theta_w|_{z=0} \cdot K_w(\theta_w|_{z=0}) \cdot \left(\frac{\partial \psi_w}{\partial z} \Big|_{z=0} - 1 \right) \quad \text{Équation 4-21}$$

où A est l'aire de la section de la colonne.

4.3.3 Écoulement d'air à travers un milieu poreux

L'écoulement d'un gaz à travers un milieu poreux peut être décrit par la loi de Darcy :

$$v = -K_a(\theta_w) \nabla P \quad \text{Équation 4-22}$$

où v est la vitesse de Darcy du gaz, m/s, $K_a(\theta_w)$ est le tenseur des constantes de Darcy, $m^2/\text{Pa.s}$, et P est la pression, Pa.

L'équation de continuité de l'écoulement d'un gaz dans un milieu poreux s'écrit:

$$\theta_a \frac{\partial c}{\partial t} = -(\nabla \cdot vc) \quad \text{Équation 4-23}$$

où θ_a est le contenu volumique en air, m^3/m^3 , et c est la concentration de l'air, mol/m^3 .

La pression et la concentration du gaz peuvent être reliées par la loi des gaz parfaits:

$$P = c R T \quad \text{Équation 4-24}$$

où R est la constante des gaz parfaits, 8.314 J/mol.K , et T est la température, K.

En considérant les équations 4-22 et 4-24, l'équation 4-23 devient:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = -\frac{1}{2 \cdot \theta_a} \times \nabla \cdot [K_a(\theta_w) \cdot \nabla P^2] \quad \text{Équation 4-25}$$

Pour un écoulement unidirectionnel, l'équation 4-25 s'écrit de la façon suivante :

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{1}{2 \cdot \theta_a} \frac{\partial}{\partial z} \left[K_a(\theta_w) \frac{\partial P^2}{\partial z} \right] \quad \text{Équation 4-26}$$

La fonction $K_a(\theta_w)$ peut être déterminée expérimentalement à partir de tests de perméation (Springer et al., 1998).

L'équation différentielle 4-26 est une équation du premier ordre par rapport au temps et du deuxième ordre par rapport à l'espace. Sa résolution nécessite donc une condition initiale et deux conditions aux frontières. Les conditions initiales correspondent à un état sans aération, c'est dire que les pressions d'air en tout point de la colonne sont égales à la pression atmosphérique. Suivant que l'aération soit ascendante ou descendante les conditions aux frontières sont différentes en haut et en bas de colonne. Une condition fixe existe en sortie de colonne, à savoir que la pression est égale à la pression atmosphérique. En entrée de colonne, une condition de Danckwerts est choisie traduisant la continuité du flux. Ainsi, les conditions initiales et limites de l'équation 4-26 peuvent être représentées par le système suivant :

$P(0,z) = 0$ (pression atmosphérique prise comme référence);

et $P(t,0) = 0$ et $v = -K_a(\theta_w) \frac{\partial P}{\partial z}(t, 128\text{cm})$, v fixée (aération ascendante);

ou $v = -K_a(\theta_w) \frac{\partial P}{\partial z}(t, 0)$, v fixée et $P(t, 128\text{cm}) = 0$ (aération descendante).

4.3.4 Écoulement d'eau avec aération

La modélisation mathématique des écoulements simultanés d'air et d'eau consiste en un système d'équations différentielles couplées. La dynamique d'écoulement d'air étant beaucoup plus rapide que la dynamique d'écoulement d'eau, on peut considérer l'écoulement de l'eau comme quasi-stationnaire par rapport à celui de l'air, de sorte que l'équation aux dérivées partielles concernant l'air demeure inchangée :

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{1}{2 \cdot \theta_a} \frac{\partial}{\partial z} \left[K_a(\theta_w) \frac{\partial P^2}{\partial z} \right] \quad \text{Équation 4-26}$$

En revanche, l'équation différentielle décrivant l'écoulement de l'eau doit prendre en compte les changements rapides de la pression d'air puisque la succion mesurée en un point prennent en considération la pression d'air comme nous le montrent les équations 4-12 et 4-13. De plus, en supposant un écoulement d'air continu et en négligeant l'influence des forces de friction appliquées par l'air sur l'eau, l'équation 4-12 demeure inchangée :

$$\frac{\partial \theta_w}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[K_w(\theta_w) \left(\frac{\partial \psi}{\partial z} - 1 \right) \right] \quad \text{Équation 4-12}$$

où

$$\psi = \frac{P_w + P}{\gamma_w} \quad \text{Équation 4-13}$$

En définissant la capacité capillaire de la façon suivante :

$$C(\psi) = \frac{\partial \psi}{\partial \theta_w} \quad \text{Équation 4-27}$$

l'équation 4-12 devient :

$$C(\psi) \frac{\partial \psi}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[K_w(\theta_w) \left(\frac{\partial \psi}{\partial z} - 1 \right) \right] \quad \text{Équation 4-28}$$

A ce stade du développement des équations, quelques remarques doivent être mentionnées. Tout d'abord, la capacité capillaire ne peut plus être déterminée *a priori* à partir des relations de van Genuchten-Mualem puisque la pression d'air intervient dans sa définition. Toutefois, dans la pratique, la capacité capillaire peut être estimée si la succion totale et le contenu en eau sont mesurés simultanément et au même point. Ensuite, la description mathématique de la conductivité hydraulique non-saturée demeure *a priori* inchangée puisqu'elle constitue une propriété caractéristique du sol. Enfin, le système d'équations différentielles constitué des équations d'écoulements de l'air et de l'eau peut être résolu en utilisant les mêmes conditions initiales et aux frontières précisées précédemment.

4.3.5 Estimation en temps réel des conductivités non-saturées

Au cours de la revue de la littérature, il a été remarqué que les conductivités à l'air et à l'eau dans un milieu non-saturé étaient des paramètres difficile d'accès *a priori* malgré l'existence de plusieurs modèles prédictifs pour la conductivité hydraulique. Il serait donc intéressant de pouvoir estimer ces paramètres en temps réel en utilisant les mesures *in situ*.

4.3.5.1 Estimation en temps réel de la conductivité hydraulique non-saturée

Soit l'équation Richards développée précédemment pour l'écoulement de l'eau sans aération:

$$C(\psi_w) \frac{\partial \psi_w}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[K_w(\theta_w) \left(\frac{\partial \psi_w}{\partial z} - 1 \right) \right] \quad \text{Équation 4-29}$$

La capacité capillaire, qui peut être déduite de la courbe de rétention d'eau, peut également être estimée en temps réel à condition de mesurer *in situ* la succion et le contenu en eau :

$$C(\psi_w) = \frac{\partial \theta_w}{\partial \psi_w} = \frac{\theta_w|_{z+1} - \theta_w|_z}{\psi_w|_{z+1} - \psi_w|_z} \quad \text{Équation 4-30}$$

Il en résulte que l'estimation de la capacité capillaire sera d'autant plus exacte que les mesures seront rapprochées dans l'espace. Dès lors, le seul paramètre inconnu de l'équation est la conductivité hydraulique non-saturée, K_w .

Après discrétisation spatiale suivant la méthode des différences finies, l'équation de Richards peut s'écrire sous la forme suivante :

$$\frac{d\psi_w(t, z)}{dt} = D(t, z) [K_w(t, z) \cdot H(t, z+1) - K_w(t, z-1) \cdot H(t, z)] \quad \text{Équation 4-31}$$

avec

$$D(t, z) = \frac{1}{dz} \cdot \frac{\psi_w(t, z) - \psi_w(t, z-1)}{\theta_w(t, z) - \theta_w(t, z-1)} \quad \text{Équation 4-32}$$

et

$$H(t, z) = \frac{\psi_w(t, z) - \psi_w(t, z-1)}{dz} - 1 \quad \text{Équation 4-33}$$

Il résulte de la forme discrétisée de l'équation de Richards que la succion au temps t et au point z dépend de la conductivité hydraulique au point z et $z-1$. Notons que le groupe H peut être estimé en temps réel si la succion est mesurée.

En utilisant la structure des estimateurs/observateurs développés par Bastin et Dochain (1990), les équations permettant d'estimer en temps réel la conductivité hydraulique non-saturée sont les suivantes :

$$\frac{d\psi_w(t, z)}{dt} = D(t, z) [K_w(t, z) \cdot H(t, z+1) - K_w(t, z-1) \cdot H(t, z)] \quad \text{Équation 4-31}$$

$$\frac{d\hat{\psi}_w(t, z)}{dt} = D(t, z) [\hat{K}_w(t, z) \cdot H(t, z+1) - \hat{K}_w(t, z-1) \cdot H(t, z)] + \Omega(\psi_w(t, z) - \hat{\psi}_w(t, z)) \quad \text{Équation 4-34}$$

$$\frac{d\hat{K}_w(t,z)}{dt} = \Gamma \cdot D(t,z) \cdot H(t,z+1) (\psi_w(t,z) - \hat{\psi}_w(t,z)) \quad \text{Équation 4-35}$$

et où ψ_w est la succion mesurée, $\hat{\psi}_w$ et $\hat{K}_w$ sont respectivement l'observation de la succion et l'estimation de la conductivité hydraulique et Ω et Γ sont des gains.

Les gains Ω et Γ doivent être choisis de telle sorte que les observateurs et les estimateurs convergent. L'analyse de la convergence est basée sur l'étude de la stabilité du système d'erreurs défini comme suit :

$$\begin{cases} e = \psi_w - \hat{\psi}_w \\ \tilde{K}_w = K_w(\psi_w) - \hat{K}_w \end{cases} \quad \text{Équation 4-36}$$

En utilisant les équations 4-31, 4-34 et 4-35, la dynamique du système d'erreurs peut être représentée par l'équation suivante :

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} e \\ \tilde{K}_w \end{bmatrix} = A(\psi_w) \cdot \begin{bmatrix} e \\ \tilde{K}_w \end{bmatrix} + v(\psi_w) \quad \text{Équation 4-37}$$

avec

$$A(\psi_w) = \begin{bmatrix} -\Omega & D(t,z) \cdot H(t,z+1) \\ -\Gamma \cdot D(t,z) \cdot H(t,z+1) & 0 \end{bmatrix} \quad \text{Équation 4-38}$$

et

$$v(\psi_w) = \begin{bmatrix} -D(t,z) \cdot H(t,z) \cdot (K_w(t,z-1) - \hat{K}_w(t,z-1)) \\ \frac{dK_w(t,z)}{dt} \end{bmatrix} \quad \text{Équation 4-39}$$

La fonction $K_w(\psi_w)$ est une fonction continue et différentiable et le produit $-D(t,z) \cdot H(t,z) \cdot (K_w(t,z-1) - \hat{K}_w(t,z-1))$ est borné. Le système dynamique d'erreurs étant équivalent à un système stationnaire stable via une transformation de Lyapunov, il en résulte que le système d'erreurs est stable si :

$$\det[A(\psi_w) - \lambda \cdot I_2] = 0 \quad \text{Équation 4-40}$$

Alors, les gains peuvent être choisis suivant les relations suivantes :

$$\Omega = -(\lambda_1 + \lambda_2) \quad \text{Équation 4-41}$$

$$\Gamma = \frac{\lambda_1 \cdot \lambda_2}{(D(t, z) \cdot H(t, z + 1))^2} \quad \text{Équation 4-42}$$

où

$$\lambda_1 < 0 \text{ et } \lambda_2 < 0.$$

Dans le domaine discrétisé, les équations de l'estimateur/observateur s'écrivent de la façon suivante :

$$\begin{aligned} \hat{\psi}_w(i+1, z) = & \hat{\psi}_w(i, z) + dt(i) \cdot \\ & \dots [D(i, z) [\hat{K}_w(i, z) \cdot H(i, z + 1) - \hat{K}_w(i, z - 1) \cdot H(i, z)] + \Omega(\psi_w(i, z) - \hat{\psi}_w(i, z))] \end{aligned} \quad \text{Équation 4-43}$$

$$\hat{K}_w(i+1, z) = \hat{K}_w(i, z) + dt(i) \cdot \Gamma \cdot D(i, z) \cdot H(i, z + 1) (\psi_w(i, z) - \hat{\psi}_w(i, z)) \quad \text{Équation 4-44}$$

où

$$dt(i) = t(i+1) - t(i)$$

Équation 4-45

L'écriture des ces équations sous forme matricielle conduit à la formulation suivante :

$$\begin{bmatrix} \hat{\psi}_w(i+1, z) \\ \hat{K}_w(i+1, z) \end{bmatrix} = A_\psi(i, z) \cdot \begin{bmatrix} \hat{\psi}_w(i, z) \\ \hat{K}_w(i, z) \end{bmatrix} + B_\psi(i, z) \quad \text{Équation 4-46}$$

où

$$A_\psi(i, z) = \begin{bmatrix} 1 - dt(i) \cdot \Omega_\psi(i, z) & dt(i) \cdot D(i, z) \cdot H(i, z + 1) \\ -dt(i) \cdot \Gamma(i, z) \cdot D(i, z) \cdot H(i, z + 1) & 1 \end{bmatrix} \quad \text{Équation 4-47}$$

$$B_\psi(i, z) = \begin{bmatrix} -dt(i) \cdot D(i, z) \cdot K_w(i, z - 1) \cdot H(i, z) + \Omega_\psi(i, z) \cdot \psi_w(i, z) \\ dt(i) \cdot \Gamma(i, z) \cdot D(i, z) \cdot H(i, z + 1) \cdot \psi_w(i, z) \end{bmatrix} \quad \text{Équation 4-48}$$

Le système discret est alors stable si les valeurs propres de la matrice $A_\psi(i, z)$ sont comprises entre 0 et 1. En imposant arbitrairement l'égalité entre les deux valeurs propres, le réglage des gains suit les relations suivantes :

$$\Omega_\psi(i, z) = \frac{2 \cdot (1 - \lambda_\psi)}{dt(i)} \quad \text{Équation 4-49}$$

$$\Gamma(i, z) = \frac{\lambda_{\psi}^2 - (1 - dt(i) \cdot \Omega_{\psi}(i, z))}{(dt(i) \cdot D(i, z) \cdot H(i, z + 1))^2} \quad \text{Équation 4-50}$$

4.3.5.2 Estimation en temps réel de la conductivité à l'air

L'équation d'écoulement de l'air développée précédemment est la suivante :

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{1}{2 \cdot \theta_a} \frac{\partial}{\partial z} \left[K_a(\theta_w) \frac{\partial P^2}{\partial z} \right] \quad \text{Équation 4-26}$$

Cette équation, après discrétisation spatiale, peut s'écrire sous la forme suivante :

$$\frac{dP}{dt} = K_a(t, z) \cdot G(t, z + 1) - K_a(t, z - 1) \cdot G(t, z) \quad \text{Équation 4-51}$$

avec

$$G(t, z) = \frac{P^2(t, z) - P^2(t, z - 1)}{2 \cdot \theta_a \cdot dz^2} \quad \text{Équation 4-52}$$

En utilisant la structure des estimateurs/observateurs développés par Bastin et Dochain (1990), les équations permettant d'estimer en temps réel la conductivité hydraulique non-saturée sont les suivantes :

$$\frac{dP}{dt} = K_a(t, z) \cdot G(t, z + 1) - K_a(t, z - 1) \cdot G(t, z) \quad \text{Équation 4-51}$$

$$\frac{d\hat{P}(t, z)}{dt} = \hat{K}_a(t, z) \cdot G(t, z + 1) - \hat{K}_a(t, z - 1) \cdot G(t, z) + \Omega(P_a(t, z) - \hat{P}_a(t, z)) \quad \text{Équation 4-53}$$

$$\frac{d\hat{K}_a(t, z)}{dt} = \Gamma \cdot G(t, z + 1) (P_a(t, z) - \hat{P}_a(t, z)) \quad \text{Équation 4-54}$$

En utilisant les équations 4-51, 4-53 et 4-54, la dynamique du système d'erreurs peut être représentée par l'équation suivante :

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} e \\ \tilde{K}_a \end{bmatrix} = A(P_a) \cdot \begin{bmatrix} e \\ \tilde{K}_a \end{bmatrix} + v(P_a) \quad \text{Équation 4-55}$$

avec

$$A(P_a) = \begin{bmatrix} -\Omega & G(t, z+1) \\ -\Gamma \cdot G(t, z+1) & 0 \end{bmatrix} \quad \text{Équation 4-56}$$

et

$$v(P_a) = \begin{bmatrix} -G(t, z) \cdot (K_a(t, z-1) - \hat{K}_a(t, z-1)) \\ \frac{dK_a(t, z)}{dt} \end{bmatrix} \quad \text{Équation 4-57}$$

La fonction $K_a(P_a)$ est une fonction continue et différentiable et le produit $-G(t, z) \cdot (K_a(t, z-1) - \hat{K}_a(t, z-1))$ est borné. Il en résulte, d'après la théorie des systèmes adaptatifs, que le système d'erreurs est stable si :

$$\det[A(P_a) - \lambda \cdot I_2] = 0 \quad \text{Équation 4-58}$$

Alors, les gains peuvent être choisis suivant les relations suivantes :

$$\Omega = -(\lambda_1 + \lambda_2) \quad \text{Équation 4-59}$$

$$\Gamma = \frac{\lambda_1 \cdot \lambda_2}{(G(t, z+1))^2} \quad \text{Équation 4-60}$$

4.4 Résultats expérimentaux et simulations

4.4.1 Modélisation de l'influence d'une aération forcée sur la percolation d'eau à travers un sol

4.4.1.1 Résultats expérimentaux

Trois tests de percolation en colonne ont été réalisés afin d'étudier l'influence de l'aération sur la percolation d'eau. Le premier test a consisté en une percolation sans aération et les deuxième et troisième en une percolation avec aération respectivement à co-courant et à contre-courant. Afin d'obtenir des vitesses de percolation nettement différentes, le débit volumique d'air a été maintenu constant à 5 L/min, soit $14 \text{ m}^3 \text{ air.m}^{-3} \text{ sol.h}^{-1}$. Ce débit est légèrement supérieur à ceux rencontrés généralement dans les procédés de traitement des sols ($1 \text{ m}^3 \text{ air.m}^{-3} \text{ sol.j}^{-1}$ à $1 \text{ m}^3 \text{ air.m}^{-3} \text{ sol.h}^{-1}$). Le sol était initialement sec ($\theta_{wm} = 0,1179 \text{ g eau.g}^{-1} \text{ sol sec} \pm 0,0052$, moyenne prise sur les

conditions initiales des trois tests de percolation) soit à une succion d'environ -250 cm d'eau (la valeur précise n'ayant pu être mesurée par les capteurs utilisés) et la consigne appliquée en tête de colonne était une succion de -15 cm d'eau. Le test de percolation commençait 24 heures après le montage de la colonne de façon à permettre aux capteurs de succion de s'équilibrer. Les résultats des tests de percolation en terme de succion sont présentés à la Figure 4-12, qui montre clairement que l'aération affecte significativement la percolation de l'eau. Le front d'eau atteint le dernier capteur, à une profondeur de 118 cm, au bout de 36 heures sans aération et après seulement 11 heures avec une aération à co-courant. Quant au test avec aération à contre-courant, le front ne touche qu'après 72 heures le capteur situé à 60,5 cm de la surface du sol. Ainsi, comme attendu intuitivement, l'aération à co-courant accélère la percolation tandis que, à contre-courant, elle la freine. À noter que, avec ou sans aération, les mesures de succion semblent indiquer que l'infiltration est caractérisée qualitativement par un écoulement piston avec peu de dispersion. Les données recueillies par les sondes RDT lors des tests de percolation n'ont pu être exploitées car aucun calibrage valide n'a pu être possible. Cette défaillance est attribuable soit au manque de fiabilité du système d'émission et de traitement de l'onde, soit à la trop grande sensibilité des sondes à la compaction, soit encore à des problèmes d'interférences liées au sol. À ce jour, aucune hypothèse n'a pu être validée pour expliquer la défaillance des sondes RDT. Toutefois, lors du démontage des colonnes, des poids secs ont été réalisés au niveau de tous les capteurs, ce qui a permis de compléter la courbe de rétention d'eau. La Figure 4-13 montre la courbe de rétention d'eau obtenue à partir des tests réalisés sur les colonnes de 20 cm (tests de rétention d'eau) et complétée avec les données obtenues lors du démontage des colonnes des tests de percolation. On remarque que les mesures recueillies sur les colonnes des tests de percolation concordent très bien avec les données des tests de rétention d'eau. Il en résulte qu'une bonne paramétrisation de la courbe de rétention d'eau nous permet de déduire des mesures de succion le contenu en eau au niveau de tous les points de mesure de la colonne. Dans le cadre de notre expérience de percolation, la mesure indirecte de

l'humidité à partir des succions permet de nous affranchir de la mesure directe par les sondes RDT.

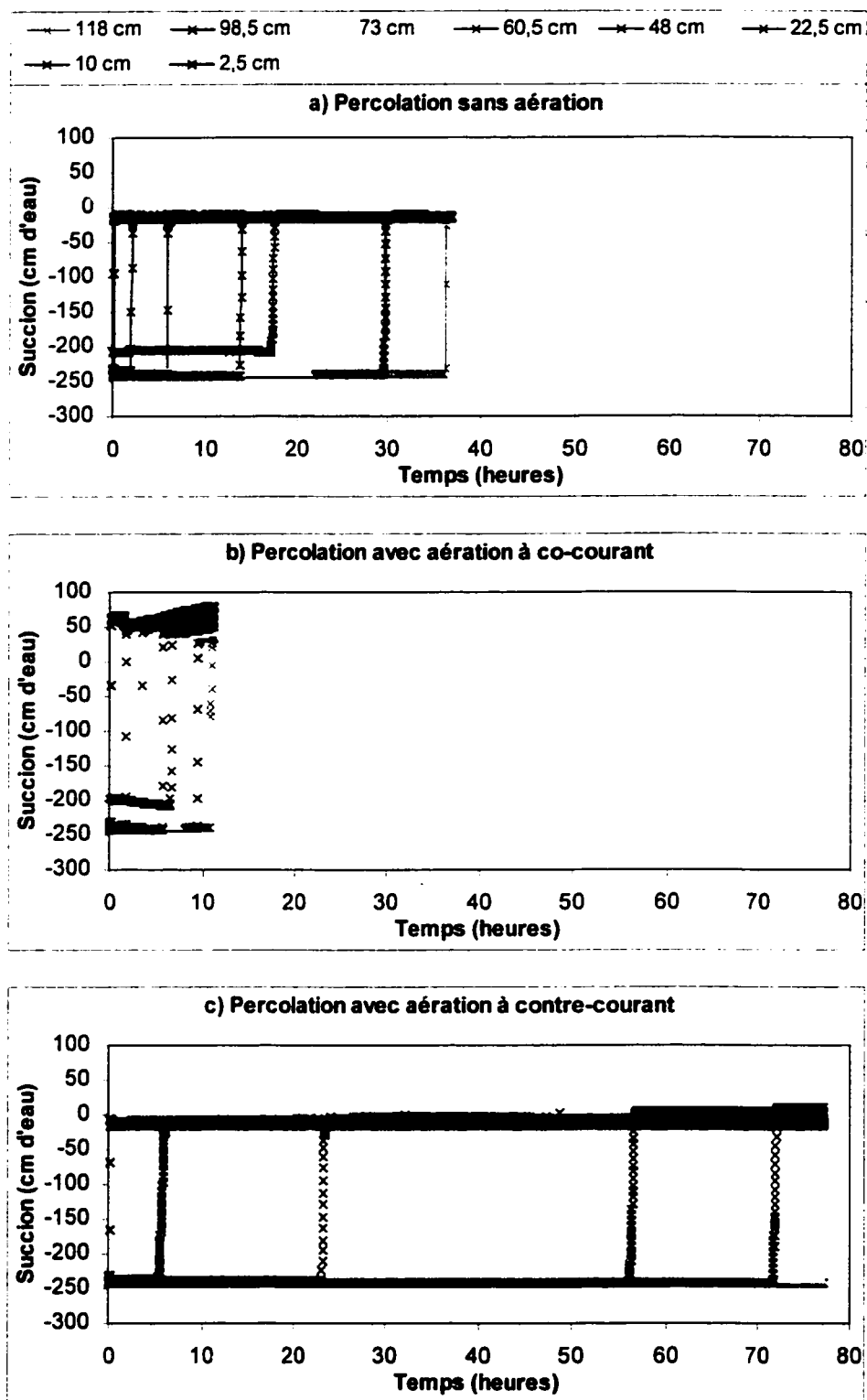


Figure 4-12 Évolution des succions pour les trois tests de percolation.

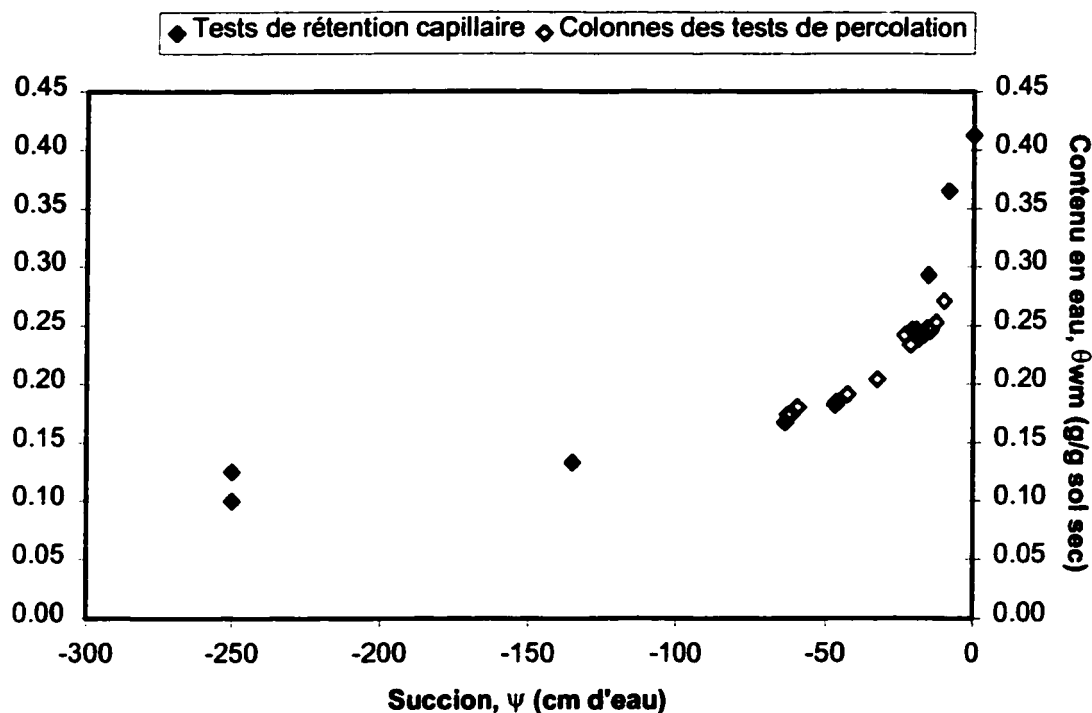


Figure 4-13 Courbe de rétention d'eau complétée.

La Figure 4-14 représente l'évolution au cours du temps du volume cumulatif d'eau ajoutée dans la colonne calculée à l'aide du nombre de jets et du volume d'eau par jets (7 mL/jet). Après un régime transitoire de moins de quatre heures, le débit d'eau injectée en tête de colonne demeure constant pour les trois tests : 89 mL/h sans aération, 406 mL/h avec aération à co-courant et 16 mL/h avec aération à contre-courant. Ainsi, en régime permanent, l'aération à co-courant a multiplié par 4,6 le taux d'infiltration d'eau tandis que, à contre-courant, elle l'a divisé par 5,6. Il est intéressant de noter que les impacts des aérations à co-courant et contre-courant sont quantitativement quasi opposés. La Figure 4-15 présente le volume d'eau injectée lorsque les différents capteurs ont été atteints. On remarque que, quel que soit le capteur, comparativement à la percolation sans aération, plus d'eau a été introduite lors de la percolation avec aération à co-courant et moins d'eau lors de la percolation à contre-courant. Ce phénomène tend à montrer que l'aération à co-courant diminue la dispersion, tandis que l'aération à contre-courant l'augmente. Cette observation montre également qu'après le passage du front, le sol est

plus humide avec une aération à co-courant que celui sans aération, qui est lui-même plus humide que celui avec une aération à contre-courant. Malheureusement, ce résultat n'a pu être corroboré aux données des sondes RDT qui n'ont pu être calibrées pour les tests avec aération. La Figure 4-16 présente les pressions d'air à l'entrée et à la sortie de colonne pour les deux tests avec aération. La perte de charge augmente quasi linéairement au fur et à mesure que l'humidité moyenne dans la colonne augmente.

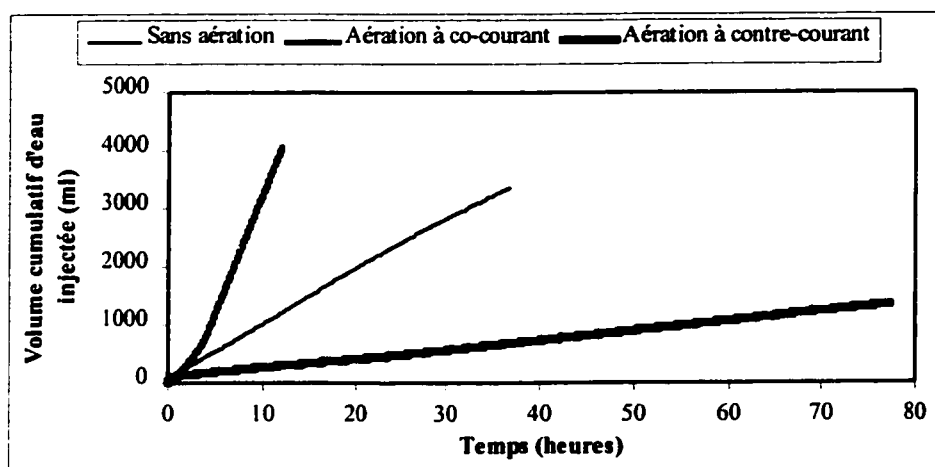


Figure 4-14 Évolution des volumes d'eau injectée pour les trois tests de percolation.

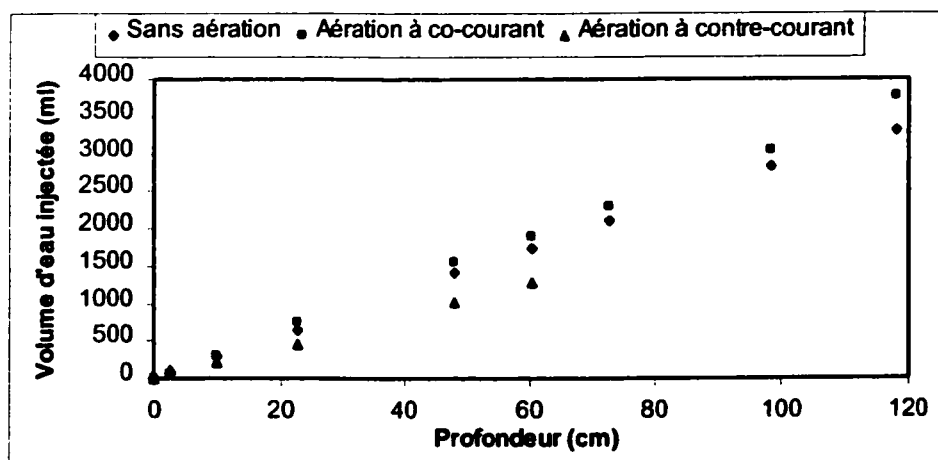


Figure 4-15 Volume d'eau injectée par capteurs.

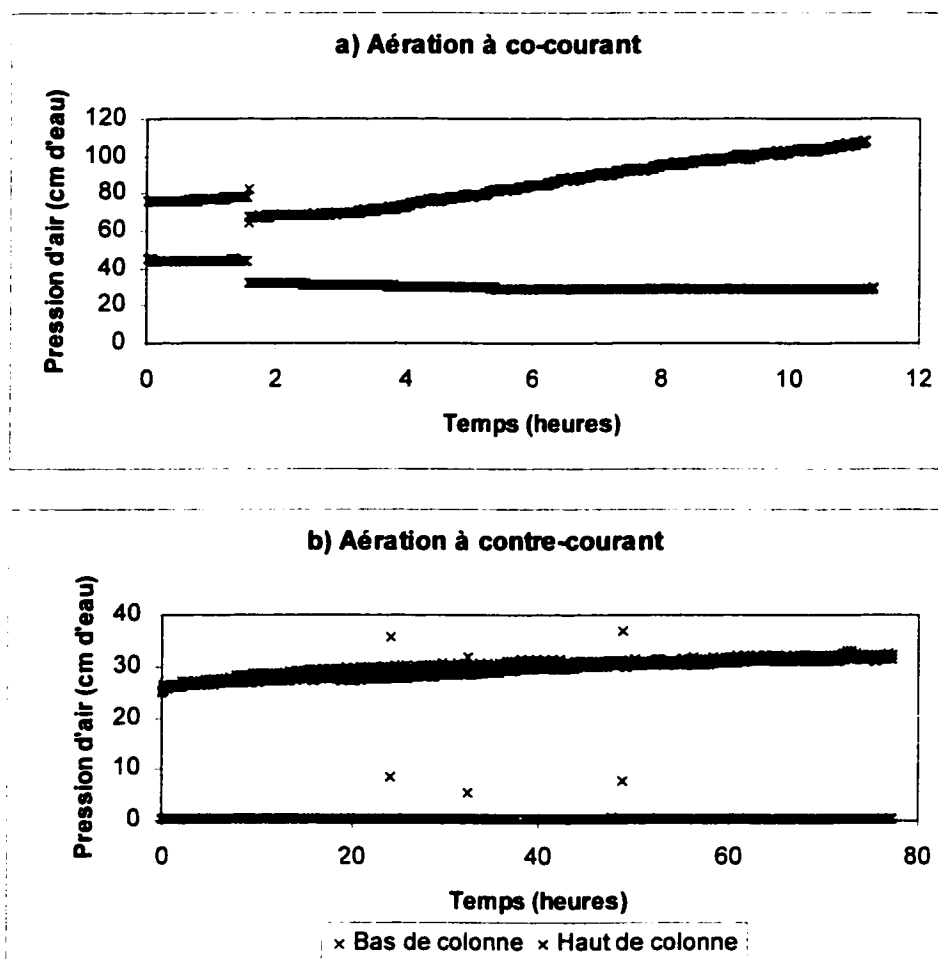


Figure 4-16 Évolutions des pressions en entrée et sortie de colonne.

4.4.1.2 Simulations

Les équations différentielles partielles développées dans la section *Matériels et méthodes* ont été transformées en un système d'équations aux dérivées ordinaires en utilisant une discrétisation spatiale selon la méthode des différences finies. Ce système a été résolu sur Matlab à l'aide d'un programme de résolution d'équations aux dérivées ordinaires d'ordre variable (ode15s sur Matlab). Pour toutes les simulations, la discrétisation spatiale a été réalisée en prenant un maillage de 1 cm.

La première série de simulations porte sur le test de percolation sans aération. La conductivité hydraulique non-saturée a été déterminée par les relations de van Genuchten-Mualem (van Genuchten, 1980). Les paramètres du modèle ont été identifiés

en utilisant un algorithme utilisant la méthode des moindres carrés non-linéaires. Parmi les données expérimentales, le point correspondant à une succion de -250 cm d'eau a été écarté étant donné que ce point est relativement incertain (grande variation de succion pour une petite variation d'humidité). Le résultat de l'identification est illustré par la courbe en continu à la figure Figure 4-17 et les valeurs obtenues pour les paramètres sont présentées dans la deuxième colonne du Tableau 4-2, le coefficient de régression non-linéaire, R^2 , étant égal à 0,9954. La conductivité hydraulique relative correspondante est représentée graphiquement par la courbe en continu à la figure Figure 4-18, la conductivité hydraulique étant égale $9,36$ cm/h par détermination expérimentale. À partir de la conductivité hydraulique non-saturée ainsi identifiée, une simulation a été réalisée dont la figure Figure 4-19 présente graphiquement les résultats. On remarque que le modèle prédictif sous-estime nettement la vitesse de percolation de l'eau. En effet, au niveau du capteur situé $22,5$ cm, le modèle a 2 heures de retard. Par la suite, le retard augmente (environ 15 heures de retard au capteur situé 48 cm) et après 36 heures, le modèle ne prédit toujours pas le passage du front au capteur situé à $60,5$ cm alors qu'en réalité il passe au bout de 17 heures. Par conséquent, dans un deuxième temps, les paramètres du modèle de van Genuchten ont été identifiés par calage des courbes réelles de succion. Les données recueillies toutes les minutes aux profondeurs $12,5$ cm et $98,5$ cm ont été utilisées pour l'identification de K_{sat} , α et n . Les nouvelles valeurs des paramètres obtenues sont présentées au Tableau 4-2 et les nouvelles courbes de rétention d'eau et de conductivité hydraulique relative sont illustrées par les courbes en pointillé à la Figure 4-17 et à la Figure 4-18. La simulation correspondante du test de percolation sans aération est présentée à la Figure 4-20. On remarque un décalage constant entre les courbes réelles et les courbes simulées d'environ deux heures mais la succion de consigne est toujours atteinte au même temps. Ce rattrapage est expliqué par le caractère légèrement plus dispersif du modèle par rapport à la réalité. Si l'on compare les deux courbes de la conductivité hydraulique en fonction de la succion, on remarque que la conductivité issue de l'identification par calage de courbes est inférieure à celle issue de la paramétrisation de la courbe de rétention d'eau pour des succions très fortes et qu'elle

est supérieure pour de faibles suctions (suctions plus faibles que -30 cm d'eau environ). Or l'écoulement simulé en utilisant l'identification par calage de courbes se produit plus rapidement. Il en résulte que la partie de la courbe de la conductivité hydraulique qui régit principalement l'écoulement est la partie correspondant aux faibles suctions. Afin de corroborer ce résultat, une simulation a été réalisée en faisant varier la succion initiale du sol. Ainsi, la Figure 4-21 présente deux simulations correspondant à deux conditions initiales : -250 cm d'eau et -350 cm d'eau sur toute la hauteur de la colonne. Le résultat des simulations montre qu'une différence de -100 cm d'eau sur les conditions initiales de succion a une influence négligeable sur la vitesse de l'écoulement. L'influence sur le volume d'eau infiltrée est également négligeable étant donnée la faible différence d'humidité entre une succion de -250 cm d'eau et -350 cm d'eau (voir courbe de rétention d'eau).

Par conséquent, les deux simulations présentées ci-dessus ont montré que, en prenant les relations de Van Genuchten-Mualem, deux courbes de rétention d'eau légèrement différentes peuvent conduire à deux profils d'infiltration d'eau très différents. Cette sensibilité est très problématique pour un modèle prédictif puisque la confiance accordée à un tel modèle s'en retrouve grandement diminuée. De plus, la partie de la courbe de la conductivité hydraulique qui régit principalement l'écoulement est la partie correspondant aux faibles suctions, partie sur laquelle doivent donc se concentrer les efforts d'identification *a priori*.

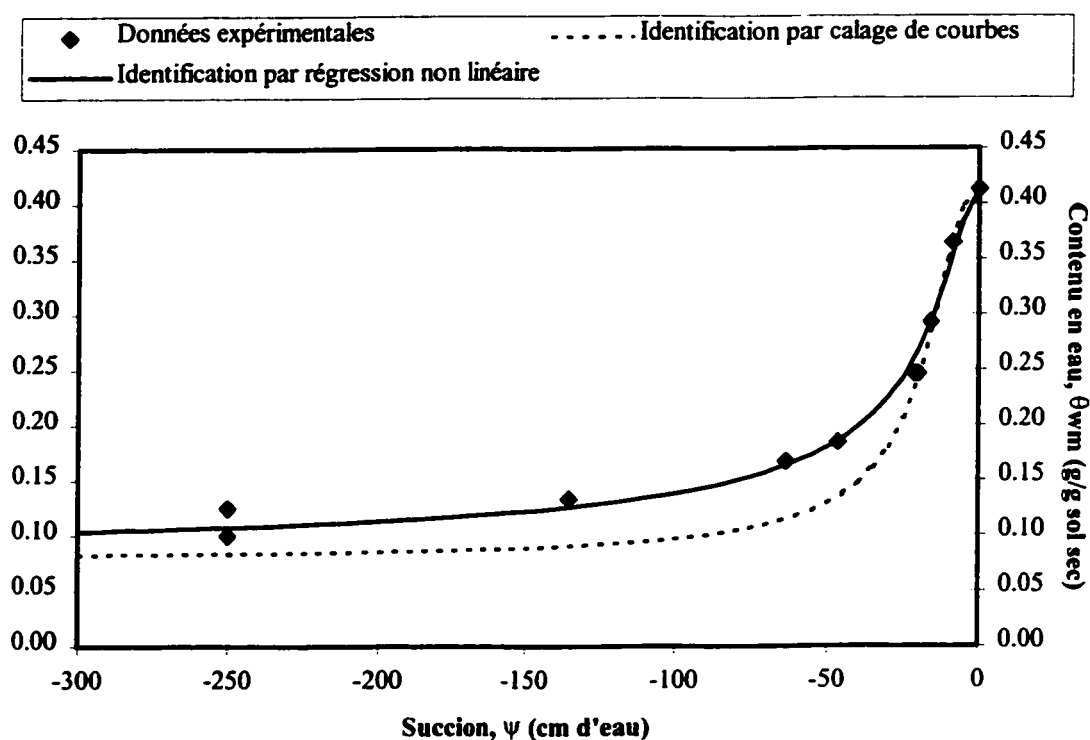


Figure 4-17 Estimation de la courbe de rétention d'eau par les relations de van Genuchten-Mualem.

Tableau 4-2 Identification paramétrique des relations de van Genuchten-Mualem

Paramètre	Identification par courbe de rétention d'eau	Identification par calage de courbe
K_{sat} (cm/h)	9,36 ⁽¹⁾	10
α (1/cm)	0,0853	0,07
n	1,8057	2,5
$m = 1 - 1/n$	0,4462	0,6

⁽¹⁾ Valeur déterminée expérimentalement (voir section 4.2.1.1).

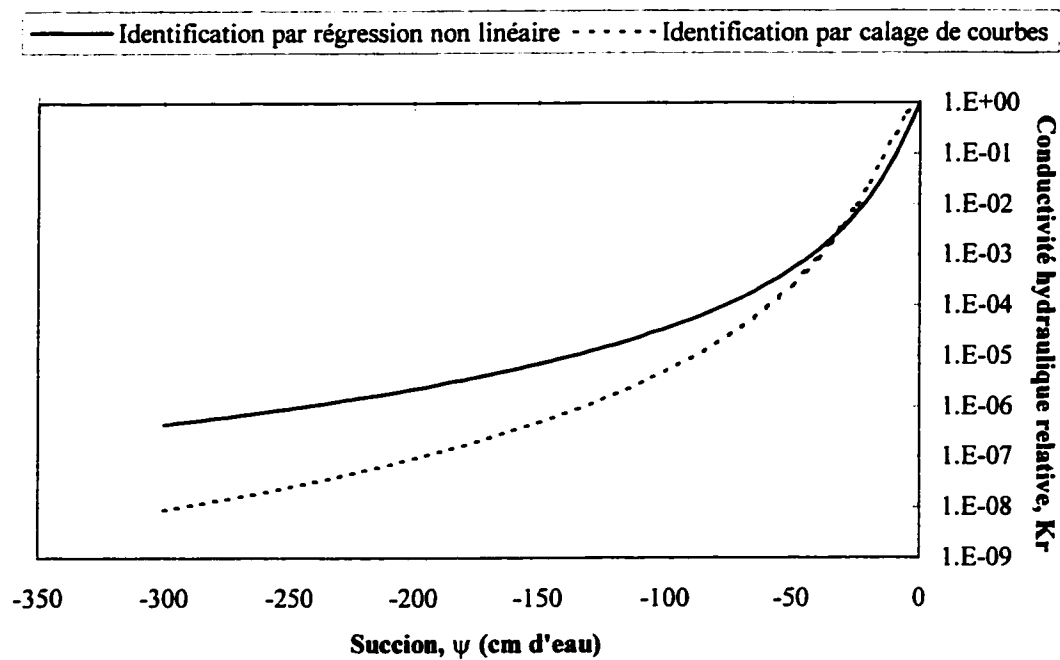


Figure 4-18 Courbe de conductivité hydraulique relative.

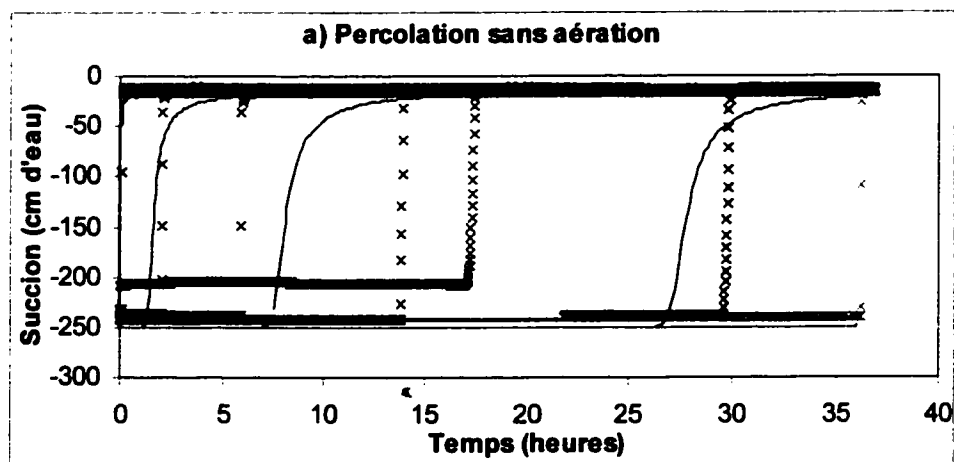


Figure 4-19 Simulation du test de percolation sans aération à partir de la paramétrisation de la courbe de rétention d'eau.

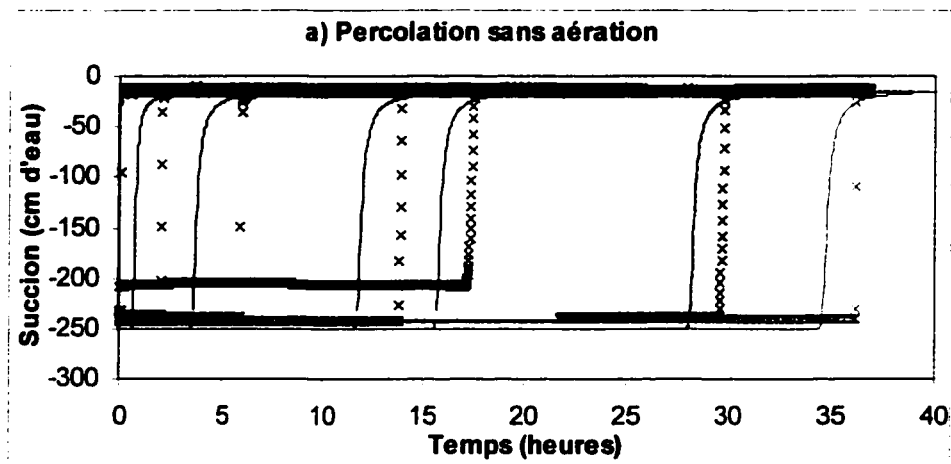


Figure 4-20 Simulation du test de percolation sans aération à partir du calage de courbes.

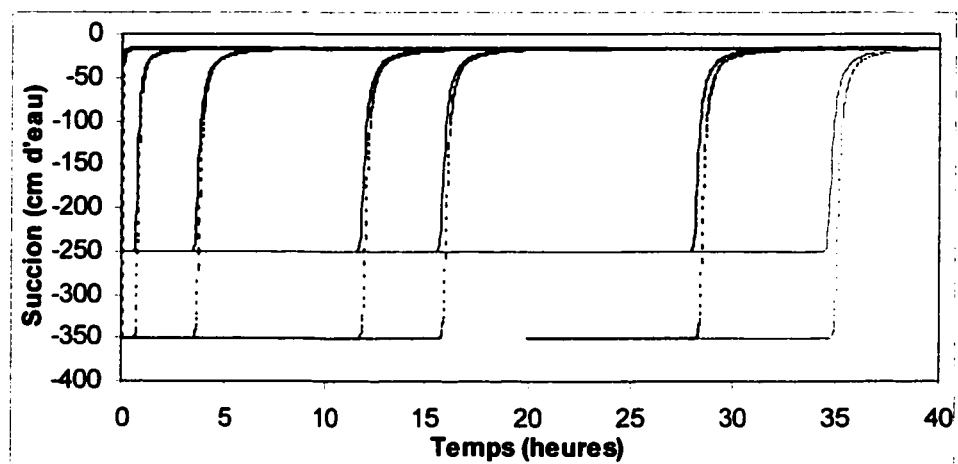


Figure 4-21 Influence des conditions initiales sur la simulation de l'écoulement.

La deuxième série de simulations porte sur les tests de percolation avec aération forcée. Le modèle de van Genuchten a toujours été utilisé et l'ensemble de paramètres ayant conduit au meilleur résultat de simulation sans aération a été retenu ($K_{sat} = 10 \text{ cm/h}$; $\alpha = 0,07$; $n = 2,5$; $m = 1 - 1/n$). Au modèle sans aération ont été ajoutées les équations d'écoulement d'air puisque la pression d'air vient s'ajouter à la succion du sol. La perméabilité à l'air a été estimée à l'aide des tests de percolation et des simulations à humidité constante. La courbe de rétention d'eau entraînant un biais sur l'humidité, le contenu en eau a dû être corrigé en fonction de la courbe de rétention d'eau retenue. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4-3.

Tableau 4-3 Estimation de la perméabilité à l'air

Temps (heures)	Perte de charge (cm d'eau)	Contenu en eau (g eau/g sol sec)	Contenu en eau cor. (g eau/g sol sec)	Perméabilité à l'air (cm ²)
0	25	0,1211 ⁽¹⁾	0,0888	9,040×10 ⁻⁷
77	32	0,1710 ⁽²⁾	0,1214	6,916×10 ⁻⁷
0	31	0,1206 ⁽¹⁾	0,0886	7,182×10 ⁻⁷
11	79	0,2574 ⁽²⁾	0,2255	2,820×10 ⁻⁷

⁽¹⁾ Valeurs déterminées expérimentalement à partir de tests de poids secs.

⁽²⁾ Valeurs estimées à partir du volume d'eau injectée en tête de colonne.

Les simulations ont été réalisées en gardant intacte la relation de van Genuchten pour l'estimation de la conductivité hydraulique non saturée et en prenant des relations linéaires avec les données du Tableau 4-3 pour l'estimation de la perméabilité à l'air. Les simulations n'ayant pas conduit à des résultats satisfaisants, les équations de la perméabilité à l'air ont été modifiées de façon à caler correctement les courbes de pressions d'air à l'entrée et à la sortie de la colonne. Les deux relations retenues pour la perméabilité à l'air et correspondant aux simulations dévoilées ci-après sont les suivantes :

$$k[\text{cm}^2] = (-185,04 \cdot \theta_w + 76,51) \cdot 10^{-8} \quad (\text{co-courant}) \quad \text{Équation 4-61}$$

$$k[\text{cm}^2] = (-295,56 \cdot \theta_w + 79,59) \cdot 10^{-8} \quad (\text{contre-courant}) \quad \text{Équation 4-62}$$

Les résultats des simulations sont présentés à la Figure 4-22 et à la Figure 4-23. Ces figures montrent que le modèle ne décrit pas de façon satisfaisante les percolations avec aération. En effet, bien que les courbes des données réelles et simulées coïncident relativement bien au début du test (3 premières heures pour le test à co-courant et 22 heures pour le test à contre-courant), l'écart entre ces courbes croît par la suite. Tandis que le modèle n'accélère pas assez la percolation à co-courant, il la freine trop à contre-courant. Ces tests de simulations ne peuvent donc pas valider le modèle développé pour décrire les écoulements simultanés d'air et d'eau. Toutefois, étant donnée la grande sensibilité du modèle vis à vis des paramètres des relations de van Genuchten, comme il

a été mis en évidence lors des simulations sans aération, on ne peut écarter la structure du modèle développé dont la sensibilité est étroitement liée à celle du modèle de van Genuchten-Mualem. Cette sensibilité pourrait être la cause des écarts observés. Un moyen de pallier ce problème serait de réaliser des tests de percolation sur des colonnes strictement identiques, ce qui est impossible dans la pratique. Il en résulte que l'étude doit se poursuivre en tenant compte des difficultés techniques soulevées ici. En particulier, la répétabilité des expériences, les mesures précises et exactes de la succion, de la pression d'air et de l'humidité sont autant de facteurs incontournables pour la validation de modèles d'écoulement simultanés d'air et d'eau en régime transitoire.

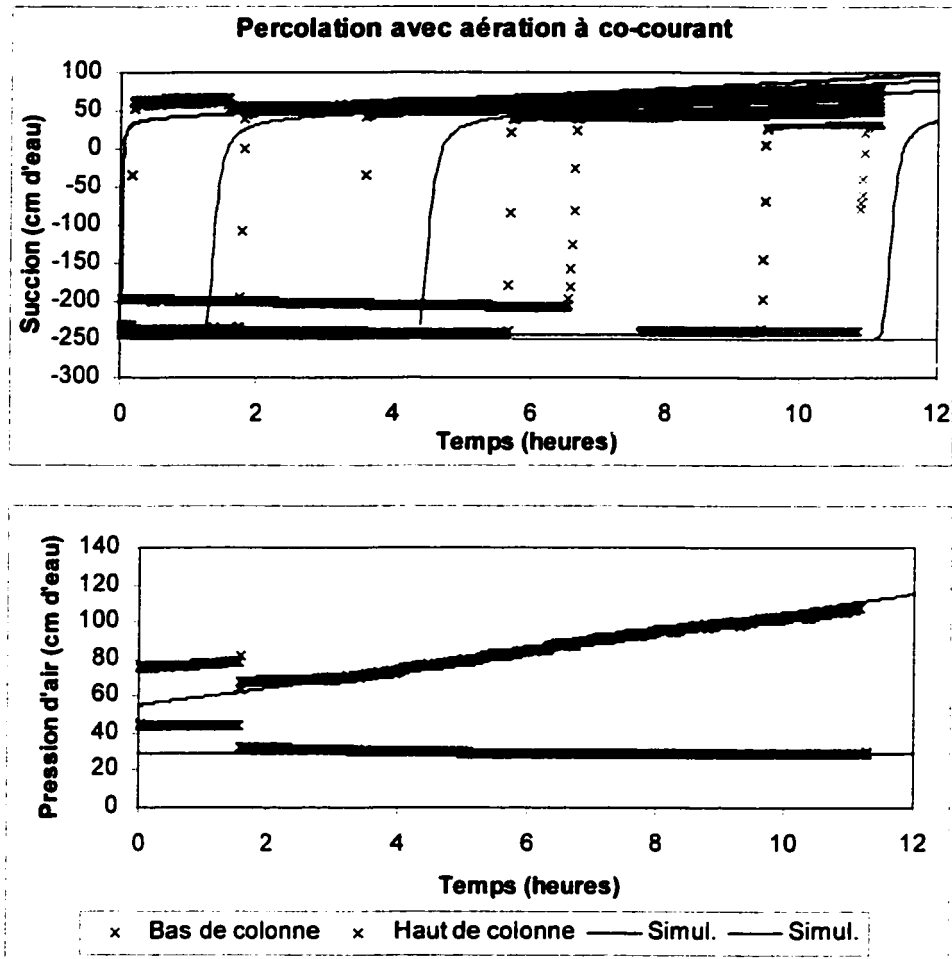


Figure 4-22 Simulation du test de percolation avec aération à co-courant.

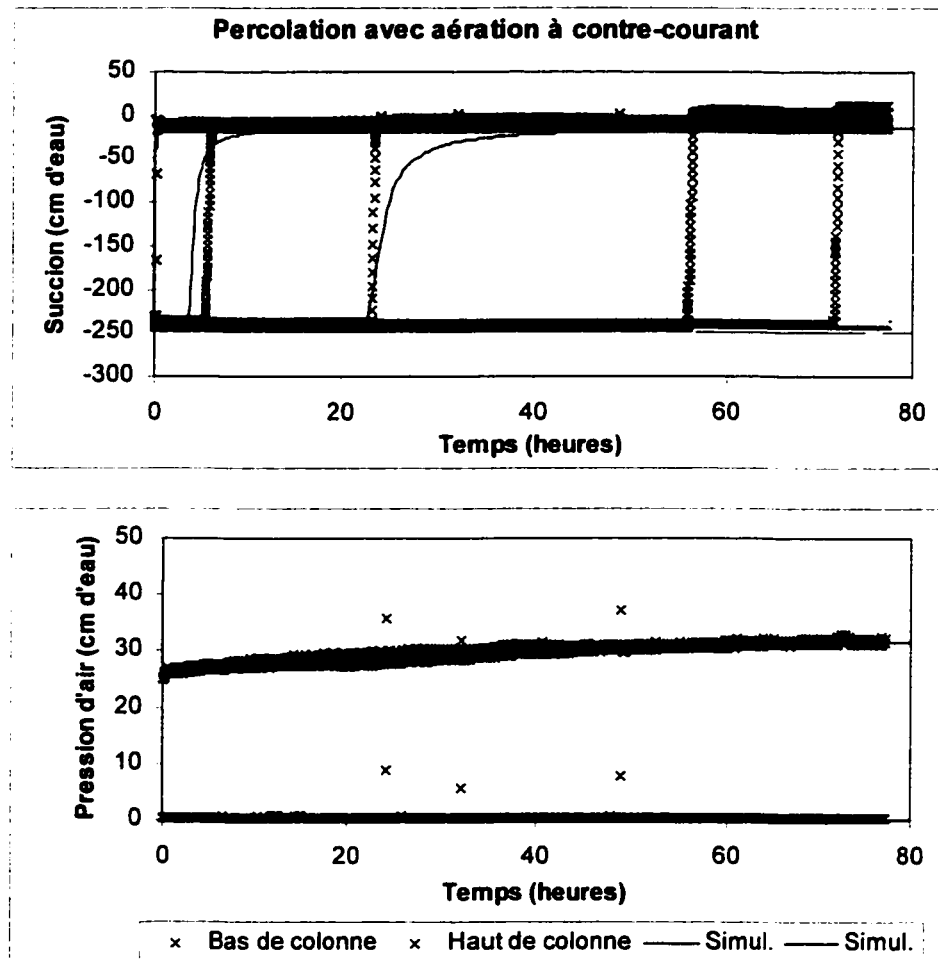


Figure 4-23 Simulation du test de percolation avec aération à contre-courant.

Afin d'augmenter le niveau de connaissance, d'autres simulations ont été réalisées correspondant à des modifications de l'équation d'écoulement de l'eau avec aération. La première modification consiste à ajouter un décalage à la courbe de rétention d'eau d'une certaine pression P_d afin d'augmenter la conductivité hydraulique comme pourrait le faire les forces de friction entre l'air et l'eau. Les équations d'écoulement de l'eau deviennent alors les suivantes :

$$C(\psi) \frac{\partial \psi}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[K_w(\theta_w, P_d) \left(\frac{\partial \psi}{\partial z} - 1 \right) \right] \quad \text{Équation 4-63}$$

$$\theta_e = \left[\frac{1}{1 + |\alpha(\psi_w + P_d)|^n} \right]^m \quad \text{Équation 4-64}$$

$$K_w(\theta_w, P_d) = K_{sat} \sqrt{\theta_e} \left[1 - \left(1 - \theta_e^{1/m} \right)^m \right]^2 \quad \text{Équation 4-65}$$

Quelle que soit la valeur de P_d choisie, cette modification n'a pas conduit à des améliorations. La deuxième modification consiste à introduire une pression de friction constante, correspondant à une force de friction entre l'air et l'eau, de la même façon que les forces de pesanteur ont été introduites. Si l'aération est à co-courant, alors la pression de friction, P_f , est du même signe que la pression de pesanteur. Si l'aération est à contre-courant, alors les forces de friction s'opposent à l'écoulement et le signe de la pression de friction est opposé à celui de la pression de pesanteur. L'équation différentielle d'écoulement de l'eau devient alors :

$$C(\psi) \frac{\partial \psi}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[K_w(\theta_w, P_d) \left(\frac{\partial \psi}{\partial z} - 1 \pm P_f \right) \right] \quad \text{Équation 4-66}$$

Tout comme la première modification, aucune amélioration n'a été observée quelle que soit la valeur de P_f choisie.

4.4.1.3 Conclusion

Un modèle prédictif de l'écoulement d'eau en régime transitoire basé sur la loi de Darcy a été confronté à des données expérimentales. Les relations de van Genuchten-Mualem ont été utilisées pour la détermination de la conductivité hydraulique non-saturée. Les paramètres des relations de van Genuchten-Mualem identifiés à partir de la courbe de rétention d'eau n'ont pas conduit à une description satisfaisante de l'écoulement de l'eau sans aération. L'identification des paramètres a dû être menée en utilisant les courbes réelles de succion. Malgré un caractère légèrement trop dispersif, le modèle basé sur les relations de van Genuchten-Mualem a permis de décrire de façon satisfaisante le test de percolation sans aération. À partir des nouvelles valeurs identifiées des paramètres, le modèle prédictif des écoulements simultanés d'air et d'eau en régime

transitoire a été confronté à des données expérimentales. En gardant la même forme pour la fonction prédictive de la conductivité hydraulique non-saturée avec et sans aération, le modèle n'a pu décrire correctement les écoulements. Ces écarts peuvent être attribués soit à la structure du modèle qui ne décrit pas tous les phénomènes intervenants dans les écoulements, soit à la sensibilité du modèle vis à vis de la paramétrisation de la courbe de rétention d'eau. Cette incertitude n'a pu être effacée, ce qui nécessiterait des expériences complémentaires. Enfin, cette étude a mis en évidence la difficulté d'identifier les modèles prédictifs de la conductivité hydraulique non-saturée. Or sachant que les pressions d'air et de succion peuvent facilement être mesurées *in situ*, il serait intéressant d'utiliser ces informations pour l'estimation en temps réel de la conductivité hydraulique. Cette étude fait l'objet de la section suivante.

4.4.2 Développement d'un estimateur de la conductivité hydraulique (domaine continu)

Le capteur-logiciel, dont les équations ont été développées dans la section *Matériels et méthodes*, a tout d'abord été testé en régime permanent, c'est-à-dire sans infiltration d'eau. Les équations ont été discrétisées dans l'espace selon la méthode des différences finies. La Figure 4-24 présente la performance du capteur logiciel. La succion du sol a été maintenue à -250 cm d'eau, ce qui correspond à une conductivité hydraulique estimée par les relations de van Genuchten-Mualem de $2,3959 \cdot 10^{-7}$ cm/h. La succion étant une variable mesurée, son estimé initial a donc été égal à la valeur réelle, soit -250 cm d'eau. La valeur estimée initiale de la conductivité hydraulique non-saturée a été supposée connue en tête de colonne mais a en revanche été fixée arbitrairement à 10^{-7} cm/h pour tous les autres points de la colonne. Les intervalles spatial et temporel de mesure de la succion ont été fixés respectivement à 25 cm et 1 min. Le système d'équations différentielles a été résolu par un solveur d'ordre variable (ode15s sur Matlab). Les résultats de la Figure 4-24 ont été obtenus en posant $\lambda = -10$.

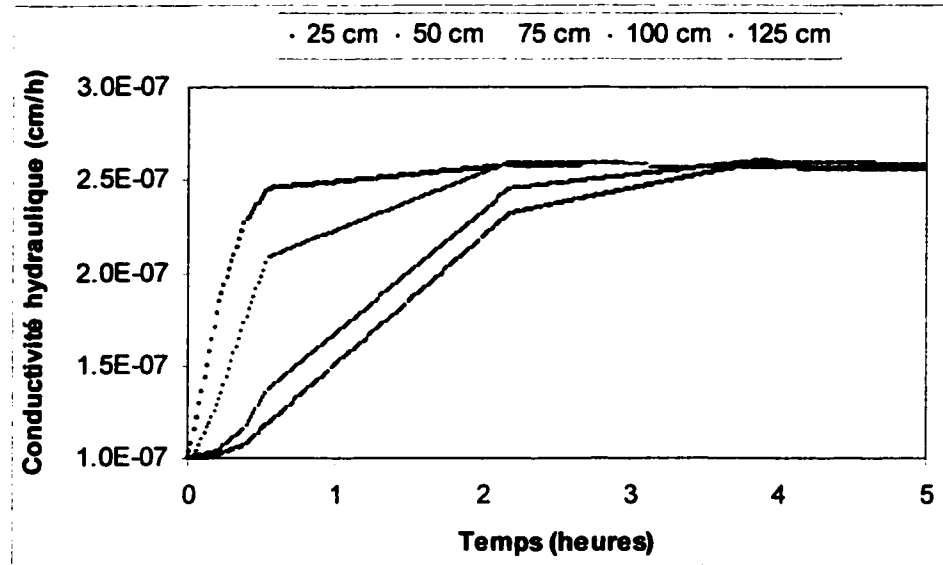


Figure 4-24 Estimation de la conductivité hydraulique en régime permanent.

Il peut être remarqué que la conductivité hydraulique réelle est atteinte successivement pour les différentes profondeurs. Ainsi, à 25 cm, elle est obtenue après environ 2 heures alors qu'à 125 cm, la conductivité réelle n'est atteinte qu'après 4 heures. Ce décalage est attribuable au fait que l'estimation de la conductivité hydraulique à une certaine profondeur dépend de celle obtenue au point de mesure en amont de l'écoulement. L'erreur se propage donc d'un point de mesure à un autre.

Le capteur-logiciel a ensuite été testé sur des données de simulations de percolation. Ainsi, l'équation régissant l'infiltration de l'eau (Équation de Richards) et les deux équations de l'estimateur/observateur ont été résolues simultanément dans les mêmes conditions numériques qu'en régime permanent, excepté pour la condition frontière en tête de colonne qui a maintenant été fixée à -15 cm d'eau. La performance du capteur logiciel en régime transitoire est illustrée à la Figure 4-25.

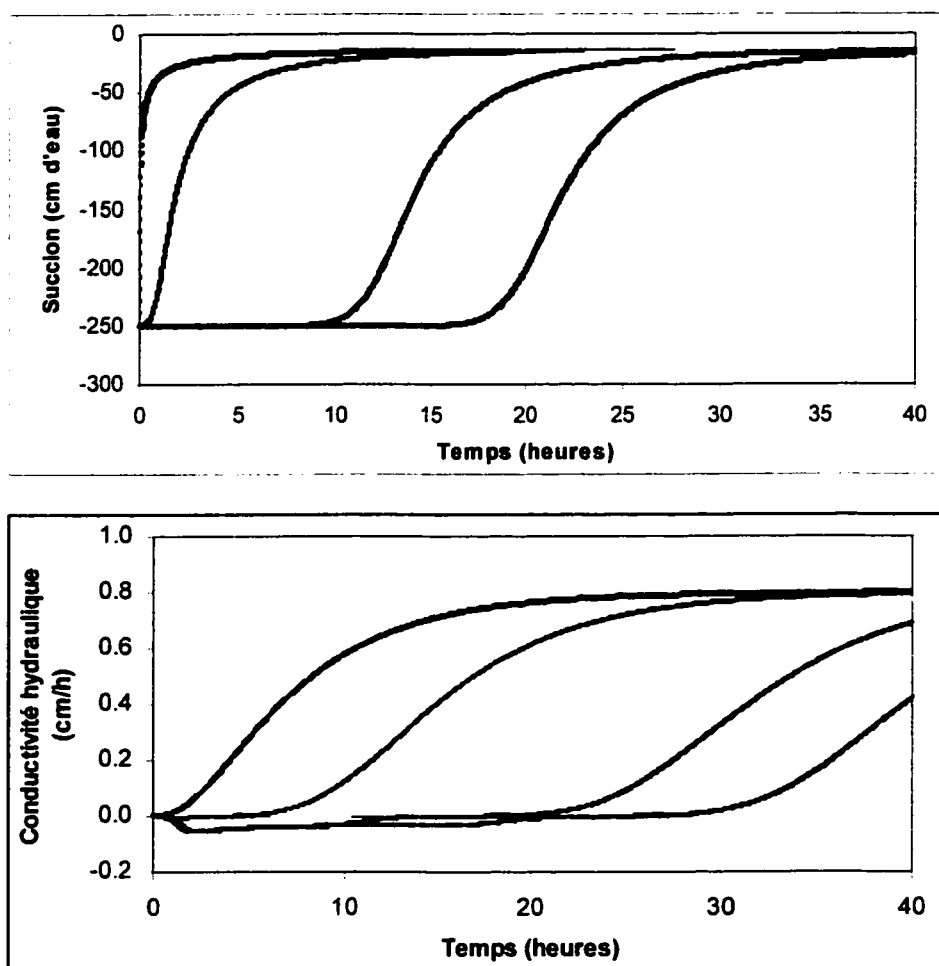


Figure 4-25 Estimation de la conductivité hydraulique en régime transitoire (traits discontinus : modèle; points : estimateur/observateur).

Les courbes de suction fournies par le modèle et celles de l'observateur sont superposées. Il en est de même pour les conductivités hydrauliques après le passage du front d'eau. Avant le passage du front, quelle que soit la profondeur, l'estimateur commence à diverger en attribuant assez rapidement (moins de deux heures) une valeur négative à la conductivité hydraulique. Après cette réponse inverse, l'estimateur se rapproche de la valeur réelle jusqu'à l'atteindre. Par la suite, les courbes du modèle et celles de l'estimateur sont superposées. Toutefois, l'intervalle spatial de 25 cm introduit une dispersion numérique. La performance du capteur-logiciel doit donc être testée sur des données pré-établies dans le domaine discrétisé.

4.4.3 Validation de l'estimateur (domaine discrétisé)

Les données du test de percolation sans aération ont été utilisées pour tester le capteur-logiciel dans le domaine discrétisé. La discrétisation des équations de l'estimateur/observateur a été réalisée en utilisant l'approximation d'Euler. La Figure 4-26 présente la performance du capteur-logiciel en régime permanent en posant $\lambda = 0,95$. La succion, égale à -235 cm d'eau, a été maintenue constante. La conductivité hydraulique a été supposée connue en tête de colonne (2,5 cm de la surface du sol) et a été estimée à $3,6526 \cdot 10^{-7}$ cm/h. En revanche, pour les autres points de la colonne, un biais a volontairement été introduit dans l'estimation initiale de la conductivité hydraulique en leur attribuant une valeur cent fois supérieure ($3,6526 \cdot 10^{-5}$ cm/h).

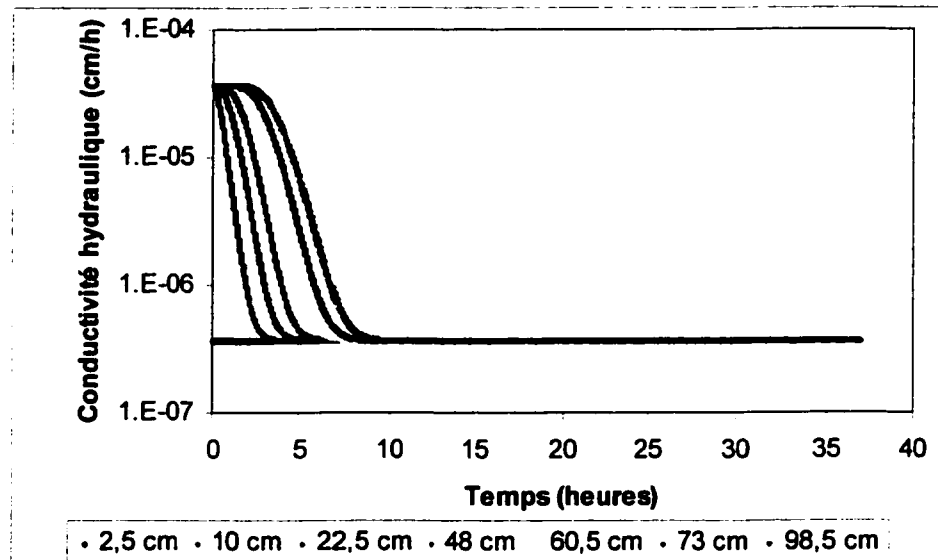


Figure 4-26 Performance du capteur-logiciel en régime permanent dans le domaine discrétisé.

Les résultats montrent que les estimateurs de la conductivité hydraulique convergent successivement vers la même valeur. Cette non-simultanéité de la convergence est due au fait que l'estimation de la conductivité en un point donné dépend des estimations aux points en amont de l'écoulement.

La Figure 4-27 présente la performance du capteur-logiciel appliqué aux données du test de percolation sans aération. Les résultats ont été obtenus en posant $\lambda = 0,95$. Afin de ne

pas surcharger les figures, seules les courbes à 10 cm et 73 cm de la surface du sol ont été représentées. Les courbes des conductivités correspondant aux données expérimentales ont été obtenues en appliquant la relation de van Genuchten-Mualem. Aussi, étant données les fortes amplitudes des oscillations, l'échelle des ordonnées a été ajustée en fonction des données expérimentales. Cet ajustement explique les portions non visibles des courbes estimées de la succion et de la conductivité hydraulique.

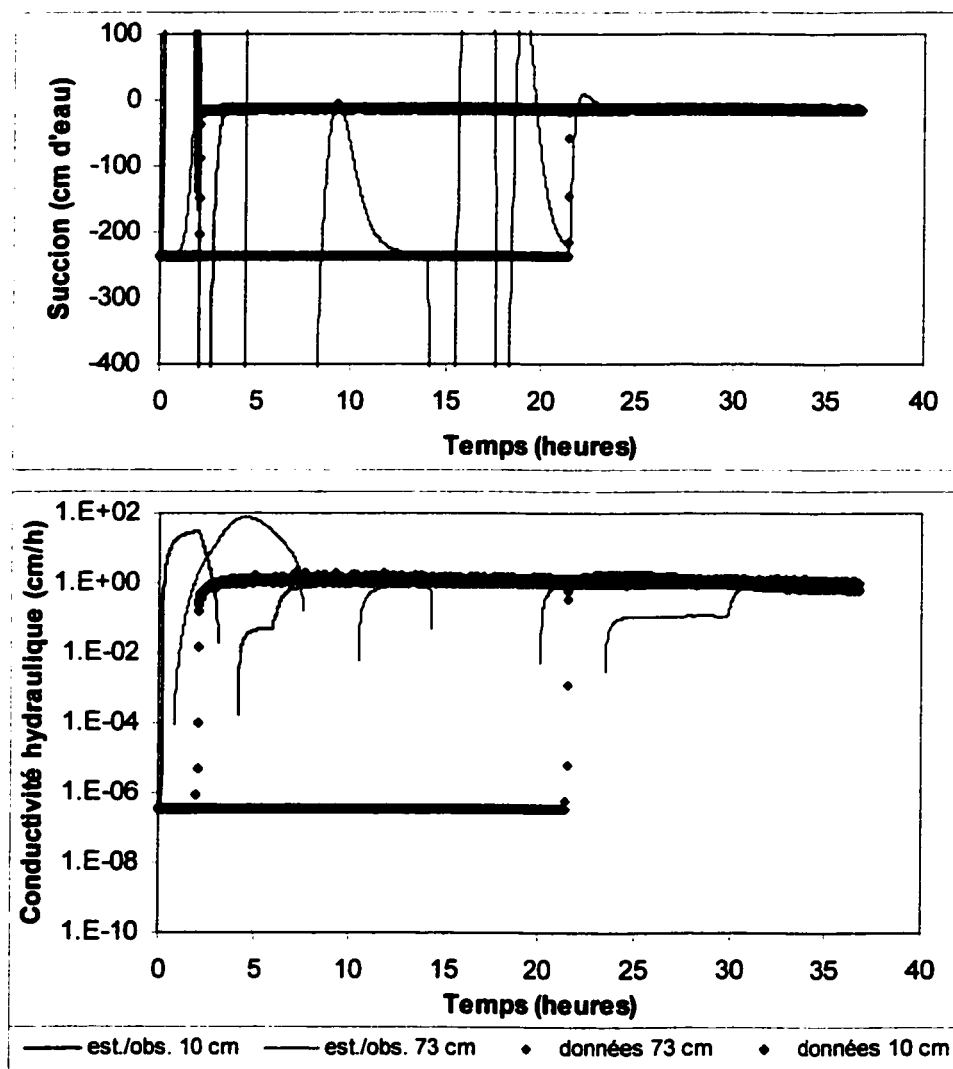


Figure 4-27 Performance du capteur-logiciel appliqué au test de percolation sans aération.

Les résultats montrent que le capteur-logiciel ne parvient pas à se stabiliser avant le passage du front. En revanche, après le passage du front, l'estimateur/observateur converge vers les valeurs simulées. Ces importantes perturbations peuvent être attribuées à des oscillations numériques lors de la résolution des équations dans le domaine discrétisé. En effet, dans les équations de l'estimateur/observateur le facteur D peut atteindre de grande valeur (voir courbe de rétention d'eau) :

$$\frac{d\hat{\psi}_w(t, z)}{dt} = D(t, z) [\hat{K}_w(t, z) \cdot H(t, z+1) - \hat{K}_w(t, z-1) \cdot H(t, z)] + \Omega (\psi_w(t, z) - \hat{\psi}_w(t, z))$$

Équation 4-34

$$\frac{d\hat{K}_w(t, z)}{dt} = \Gamma \cdot D(t, z) \cdot H(t, z+1) (\psi_w(t, z) - \hat{\psi}_w(t, z))$$

Équation 4-35

$$D(t, z) = \frac{1}{dz} \cdot \frac{\psi_w(t, z) - \psi_w(t, z-1)}{\theta_w(t, z) - \theta_w(t, z-1)}$$

Équation 4-32

Il en résulte que la convergence de l'algorithme de résolution des équations est affectée. Ce problème n'est pas apparu dans la résolution des équations dans le domaine continu car le solveur utilisé, ode15s dans Matlab, est conçu pour pallier ce genre de difficulté (résolution des équations fortement non-linéaires).

Afin d'atténuer les oscillations du capteur-logiciel, un filtre du premier ordre a été utilisé pour l'observation de la succion et pour l'estimation de la conductivité hydraulique. La Figure 4-28 présente la performance du capteur-logiciel en présence du filtre et toujours appliqué au test de percolation sans aération. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une constante de temps du filtre de 18 heures.

La présence du filtre a permis d'atténuer significativement les oscillations du capteur-logiciel. Cependant, la convergence s'en est retrouvée grandement ralentie. De plus, le filtre n'a pas pu corriger l'anticipation excessive de l'estimation de la conductivité hydraulique.

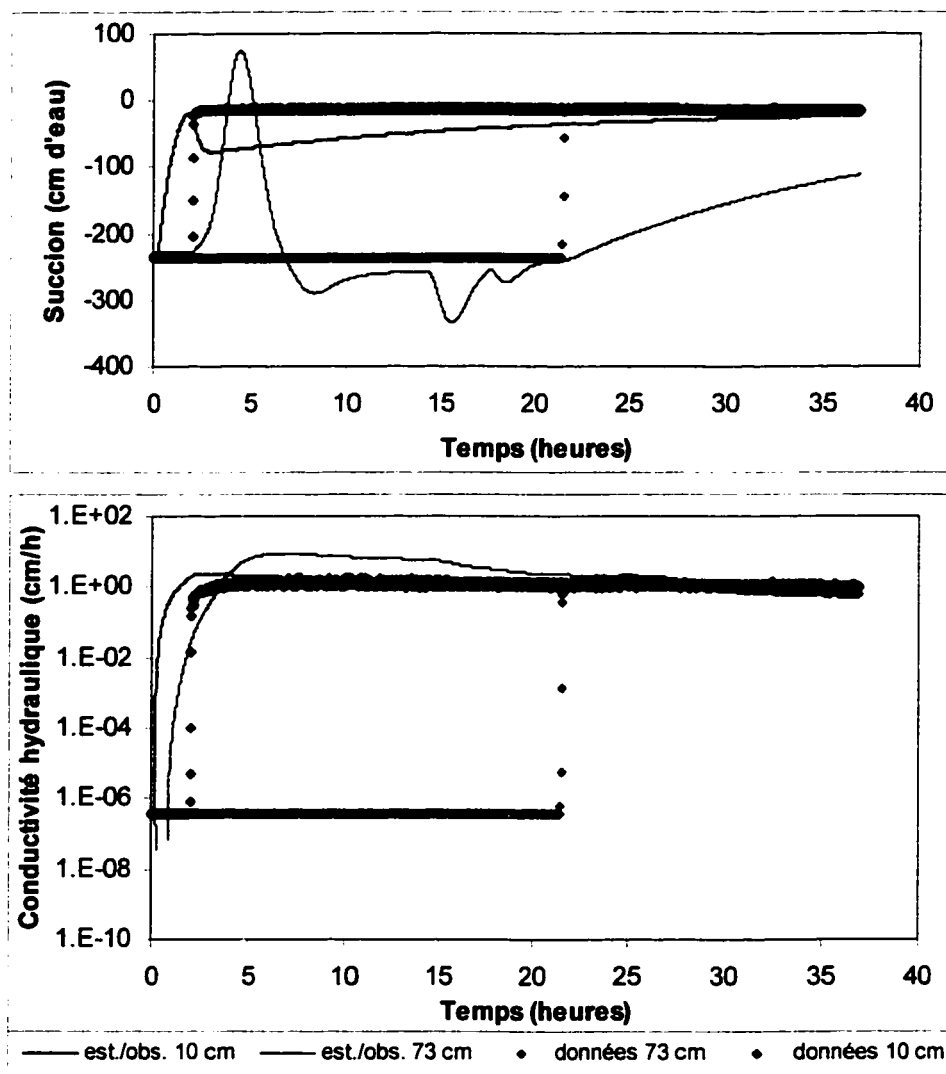


Figure 4-28 Performance du capteur-logiciel appliqué au test de percolation sans aération et en présence d'un filtre.

Les résultats présentés ci-dessus ont montré une bonne aptitude du capteur-logiciel à estimer la conductivité hydraulique en régime permanent et après le passage d'un front. En revanche, avant le passage du front et pendant la période transitoire, l'estimateur/observateur produit de grandes oscillations.

L'imposition brusque d'un échelon de grande amplitude (plus de 200 cm d'eau) peut constituer un changement trop drastique pour le capteur-logiciel. En conséquence, le capteur-logiciel a été testé sur des données établies par le modèle et simulant des

conditions de percolation moins extrêmes. Deux conditions en tête de colonne ont donc été choisies et sont représentées à la Figure 4-29. Ces conditions permettent un échelon non-instantané d'une petite amplitude.

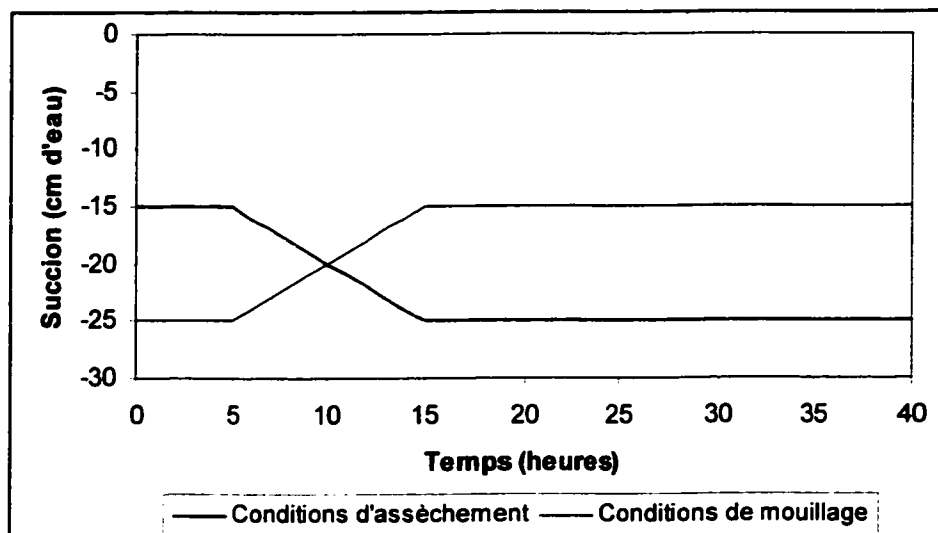


Figure 4-29 Conditions simulées de succion en tête de colonne.

La Figure 4-30 et la Figure 4-31 présentent la performance du capteur-logiciel aux conditions de succion en tête de colonne décrites ci-dessus. Le capteur-logiciel estime de façon satisfaisante la conductivité hydraulique lors des conditions d'assèchement mais fait face à des oscillations en régime transitoire lors des conditions de mouillage. Ces oscillations peuvent être atténuées en utilisant un filtre du premier ordre mais la convergence de l'estimateur/observateur est significativement ralentie (Figure 4-32).

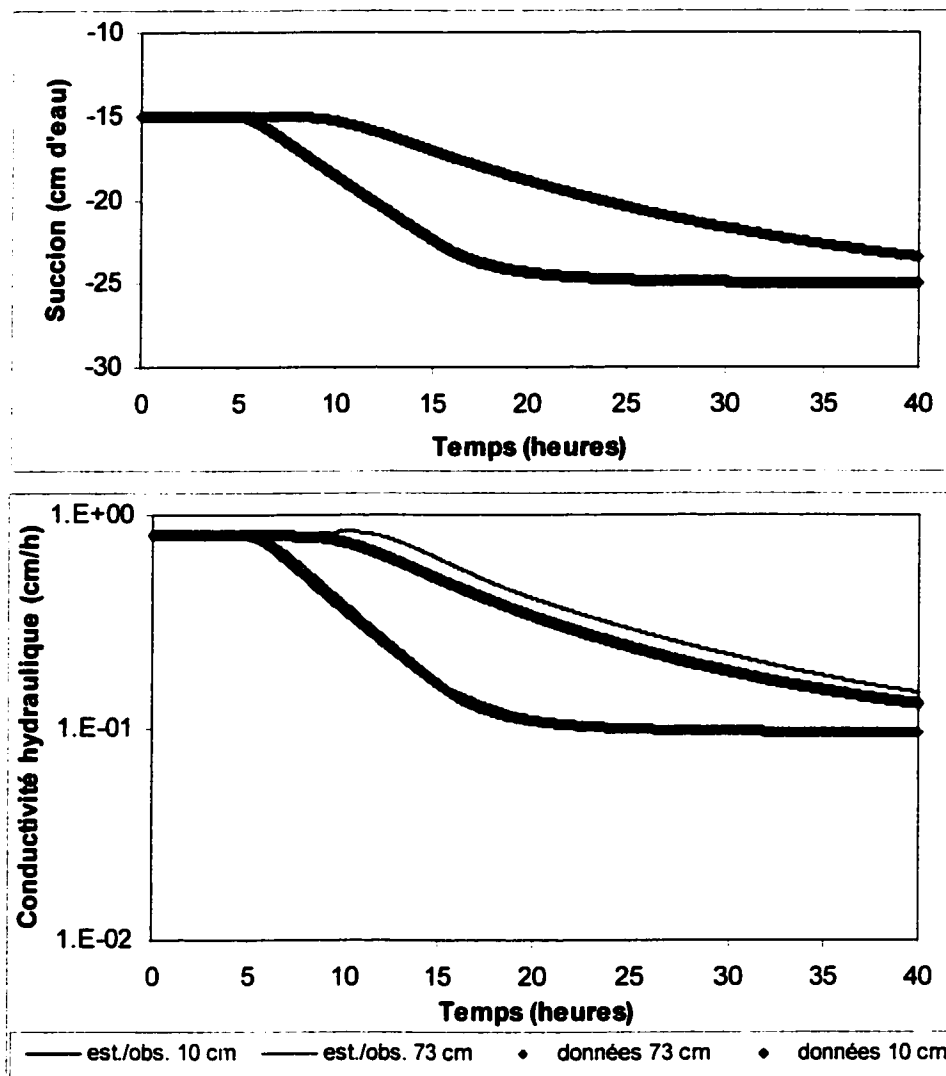


Figure 4-30 Performance du capteur-logiciel en conditions simulées d'assèchement.

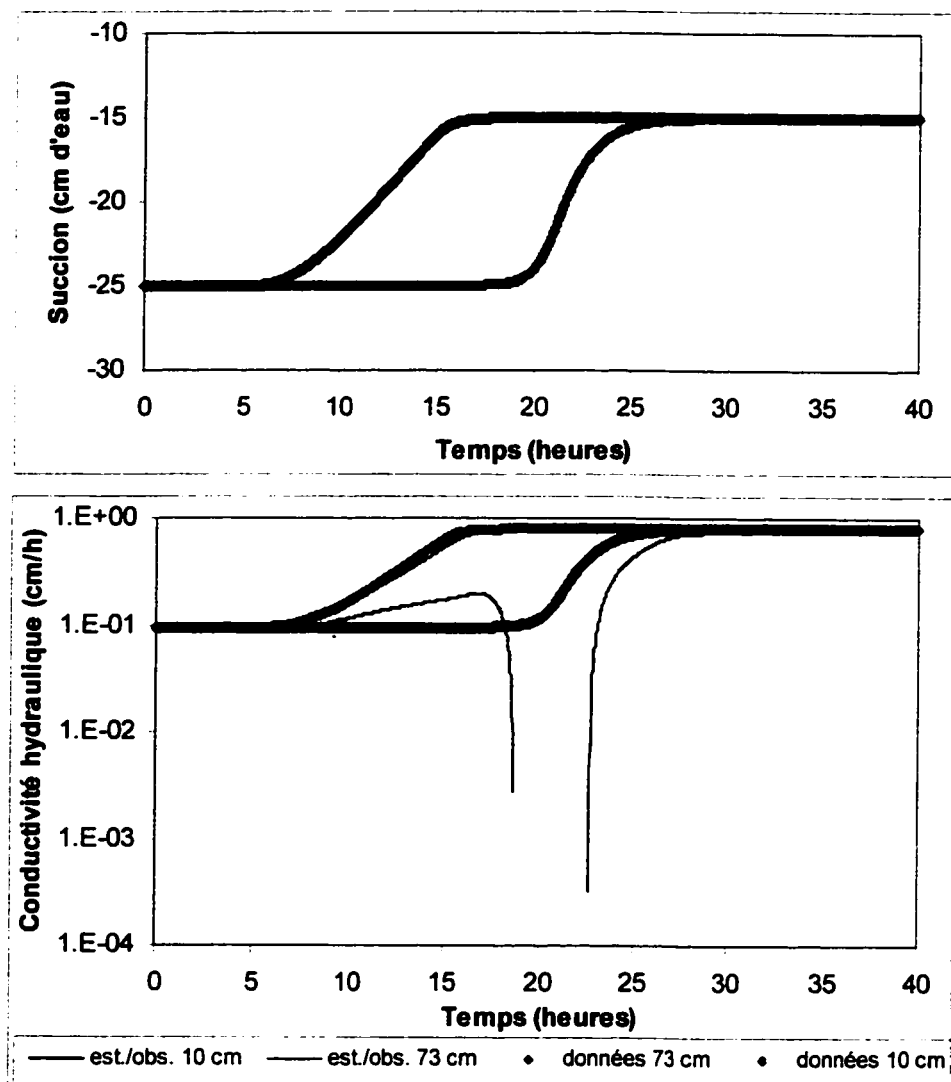


Figure 4-31 Performance du capteur-logiciel en conditions simulées de mouillage.

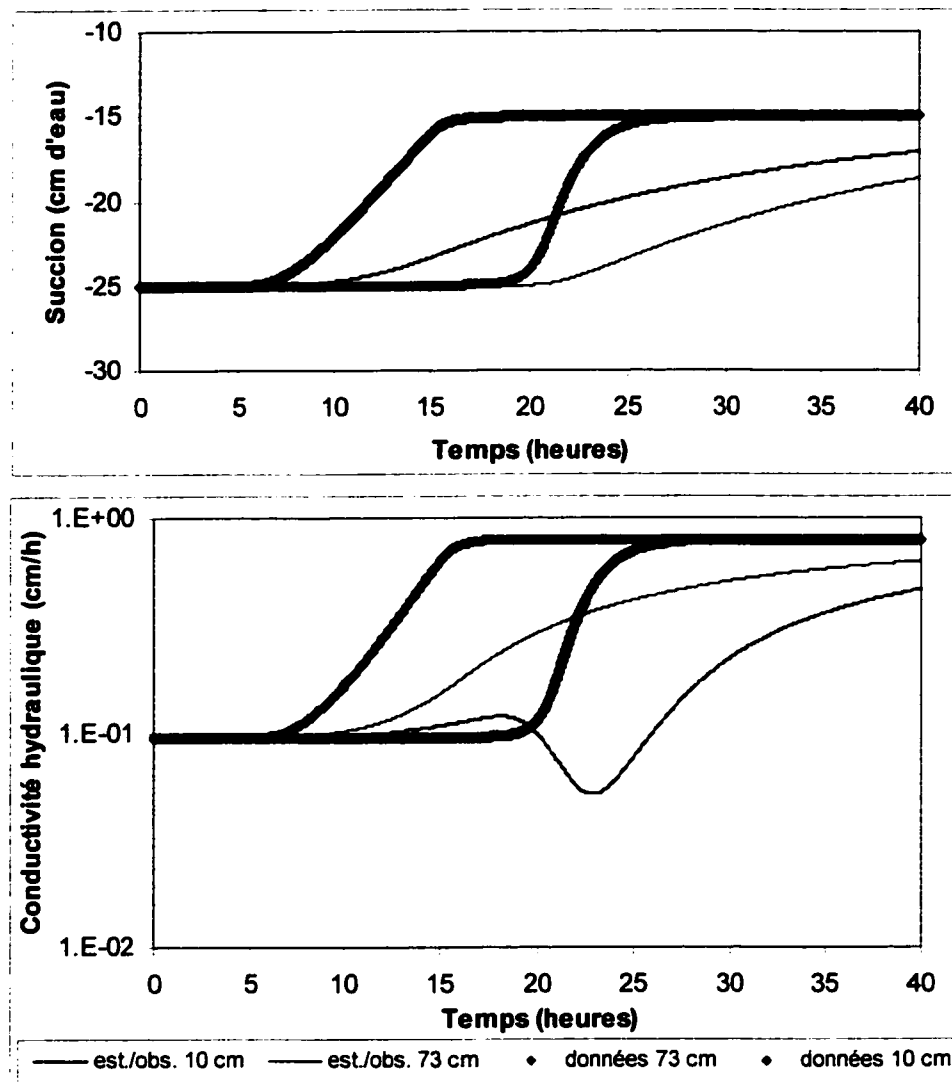


Figure 4-32 Performance du capteur-logiciel en conditions simulées de mouillage en présence d'un filtre.

4.5 Discussion

Au cours de l'étude hydrodynamique, des tests de percolation d'eau en présence ou non d'aération forcée ont été réalisés. Un modèle phénoménologique a été confronté aux données expérimentales. Plusieurs conclusions peuvent être tirées au niveau des expérimentations, au niveau de la modélisation et au niveau des capteurs-logiciels développés.

En ce qui concerne les tests de percolation, les résultats ont permis de mettre en évidence et de caractériser l'influence significative d'une aération forcée sur la vitesse d'infiltration de l'eau, ce qui, à notre connaissance, n'a pas été traité dans la littérature. Les capteurs de pression d'eau ont permis de suivre adéquatement le front d'eau et la mesure de la pression d'air rend possible la détermination du contenu en eau à partir de la mesure de la succion à condition d'avoir accès à la courbe de rétention d'eau. Toutefois, la mesure directe de l'humidité n'a pu être possible, ce qui devrait être corrigé dans les études à venir. De plus, il serait souhaitable d'installer des capteurs de pression d'air à différentes profondeurs dans la colonne.

Concernant la modélisation, le modèle général d'écoulement développé à partir de l'équation de Darcy, de l'équation de continuité, des relations de van Genuchten-Mualem et de la courbe de rétention d'eau n'a pu décrire le test de percolation sans aération qu'après avoir ajusté les paramètres de van Genuchten-Mualem.

D'une part, les résultats ont clairement mis en évidence que la portion de la courbe $K_w = f(\psi_w)$ correspondant à des humidités élevées était en grande partie responsable de la vitesse de percolation. En effet, d'après la figure 4-18, la portion de la courbe qui a permis d'accélérer l'écoulement prédit par la paramétrisation de la courbe de rétention d'eau est celle correspondant à une succion supérieure à -30 cm d'eau. De plus, la courbe de rétention d'eau correspondant à la meilleure description du test de percolation sans aération suit très bien les points expérimentaux correspondant à une succion supérieure à -30 cm d'eau alors que le décalage significatif avec les points expérimentaux n'intervient que pour des succions inférieures à -50 cm d'eau. Il en

résulte que, concernant l'identification des paramètres de la relation de van Genuchten-Mualem, les poids accordés aux points expérimentaux à haut contenu en eau doivent être nettement supérieurs à ceux correspondant à des humidités faibles. Aussi, il est conseillé d'acquérir un maximum de points expérimentaux sur la portion de la courbe correspondant à des humidités élevées.

D'autre part, les résultats ont révélé une grande sensibilité du modèle vis-à-vis de la paramétrisation de la courbe de rétention d'eau. En effet, des courbes de rétention d'eau très proches à des contenus en eau élevés (voir Figure 4-17) peuvent mener à des vitesses de percolation très différentes (voir Figure 4-19 et Figure 4-20).

En utilisant les paramètres de la relation de van Genuchten-Mualem ayant le mieux décrit le test de percolation sans aération, le modèle d'écoulement n'a pu prédire de façon satisfaisante les tests de percolation avec aération. Étant donnée la grande sensibilité du modèle vis-à-vis des paramètres de la relation de van Genuchten-Mualem, il est difficile d'écarter *a priori* la structure du modèle. Des recherches approfondies devront être menées afin de valider ou compléter le modèle d'écoulement en présence d'aération.

Afin de pallier le manque de robustesse du modèle descriptif d'écoulement, les recherches se sont alors tournées vers l'estimation en temps réel de la conductivité hydraulique.

Le développement de capteurs-logiciels pour l'estimation en temps réel de la conductivité hydraulique présente des résultats encourageants. D'une part, il a été démontré la possibilité théorique de développer des capteurs-logiciels permettant l'estimation des conductivités à l'air et à l'eau à partir des mesures de pressions d'air, de succion et d'humidité. D'autre part, la performance du capteur-logiciel pour l'estimation de la conductivité hydraulique en absence d'aération est satisfaisante en régime permanent mais est confrontée à de fortes oscillations en régime transitoire. L'application d'un filtre a permis de réduire les oscillations mais n'a pas conduit à une amélioration de l'estimation de la conductivité en régime transitoire en plus de ralentir la convergence de l'estimateur/observateur. Il a également été montré que les oscillations

lors du régime transitoire se présentent aussi bien lors de l'imposition brusque d'échelons de grande amplitude que lors de l'application progressive d'échelons de petite amplitude. D'une part, ces oscillations sont attribuables à la forme de la courbe de rétention d'eau. En effet, pour des suctions fortes, la pente de la courbe de rétention d'eau est proche de zéro, ce qui crée des oscillations numériques dans le domaine discrétisé. D'autre part, l'espacement relativement grand entre les capteurs nuit à la performance de l'estimateur qui a besoin du point de mesure en amont et en aval du point considéré. Les recherches à venir devront donc se pencher sur la structure même de l'estimateur/observateur afin d'assurer sa convergence sans oscillation et sur les emplacements judicieux des points de mesure.

4.6 Conclusion

Le modèle d'écoulement basé sur la loi de Darcy et sur les relations de van Genuchten-Mualem ne constitue pas, encore de nos jours, un modèle prédictif robuste. En revanche, il s'est avéré être un outil descriptif performant pour l'infiltration d'eau sans aération. Les estimateurs de la conductivité hydraulique non-saturée ont été confrontés à des oscillations importantes liées à la forme de la courbe de rétention d'eau et à la nature même des systèmes à paramètres répartis. Les recherches doivent donc se poursuivre afin d'améliorer, d'une part, les modèles descriptifs et prédictifs des écoulements d'eau en présence d'aération forcée et, d'autre part, la performance des capteurs-logiciels sur laquelle repose le contrôle informatisé et en temps réel des écoulements dans un sol non-saturé.

CHAPITRE 5 ÉTUDE BIOGINÉTIQUE

5.1 Introduction

Le suivi en temps réel de la biodégradation dans les sols non-saturés en eau constitue un défi important. En effet, la mesure en temps réel du polluant est impossible et l'oxygène et/ou le CO_2 dans la phase gazeuse sont les deux principaux indicateurs de la biodégradation via le processus de minéralisation. La description des phénomènes et leur modélisation constituent donc une voie d'intérêt pour le suivi des bioprocédés. Or la biodégradation d'un polluant dans un milieu poreux non-saturé en eau est un processus microscopique faisant intervenir de nombreux phénomènes plus ou moins connus. Sa modélisation est confrontée à de nombreux problèmes tels le comportement des micro-organismes et la biodisponibilité du polluant. Les outils analytiques qui permettraient de décrire avec précision les phénomènes existants font souvent défaut et les modèles descriptifs sont alors basés sur une multitude d'hypothèses simplificatrices. Néanmoins, le suivi et le contrôle de la biodégradation dans un milieu poreux non-saturé nécessitent le développement d'un modèle dynamique. L'objectif de ce chapitre est donc de développer, sur la base d'un modèle phénoménologique dynamique, un capteur-logiciel permettant de suivre en temps réel l'évolution du polluant lors du processus de biodégradation.

5.2 Revue de littérature

5.2.1 Introduction

La biodégradation d'un polluant dans un milieu poreux non-saturé est un processus complexe faisant intervenir de nombreux phénomènes. La revue de littérature suivante est donc basée sur l'explication des phénomènes mis en jeu en insistant sur la modélisation de ces phénomènes et sur l'accessibilité aux variables d'état introduites et sur l'identifiabilité des paramètres impliqués. Les phénomènes pouvant limiter la

biodégradation d'un polluant dans un milieu poreux non-saturé en eau peuvent être classés parmi les trois catégories suivantes :

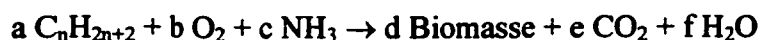
- limitation biocinétique;
- limitation due au transfert d'oxygène;
- limitation due à la bio-disponibilité du polluant.

5.2.2 Limitation biocinétique

Les deux conditions *sine qua non* à la biodégradation d'un polluant dans un milieu est la biodégradabilité du polluant et la présence des dégradeurs dans ce milieu.

La biodégradabilité est un indice de la capacité d'un composé chimique à être décomposé par un micro-organisme (Lyman et al., 1982). D'une part, la biodégradabilité des hydrocarbures aliphatiques peut être séparée en deux classes: celle des C₁₀-C₂₂ et celle des C₂₃-C₅₀. En effet, les hydrocarbures aliphatiques comprenant 10 à 22 carbones sont considérés comme facilement biodégradables alors que ceux comprenant plus de 23 carbones sont considérés comme plus récalcitrants (Atlas, 1987). D'une manière générale, la biodégradabilité des hydrocarbures aliphatiques diminue lorsque le nombre de carbone augmente. Ceci est expliqué par la diminution de la solubilité qui rend la biodégradation difficile (Bartha, 1986; Riser-Roberts, 1992).

Le métabolisme de dégradation des hydrocarbures aliphatiques est basé sur des réactions de β -oxydations en chaîne (Baker et Herson, 1994) pour former des molécules d'acétyl-coA (voir Figure 5-1). La biodégradation des hydrocarbures aliphatiques consiste donc en une perte successive de carbones. Les molécules d'acétyl-coA sont utilisées soit pour la production d'énergie en formant du CO₂ soit pour la synthèse cellulaire. L'équation simplifiée d'oxydation d'un alcane linéaire peut alors s'écrire de la façon suivante:



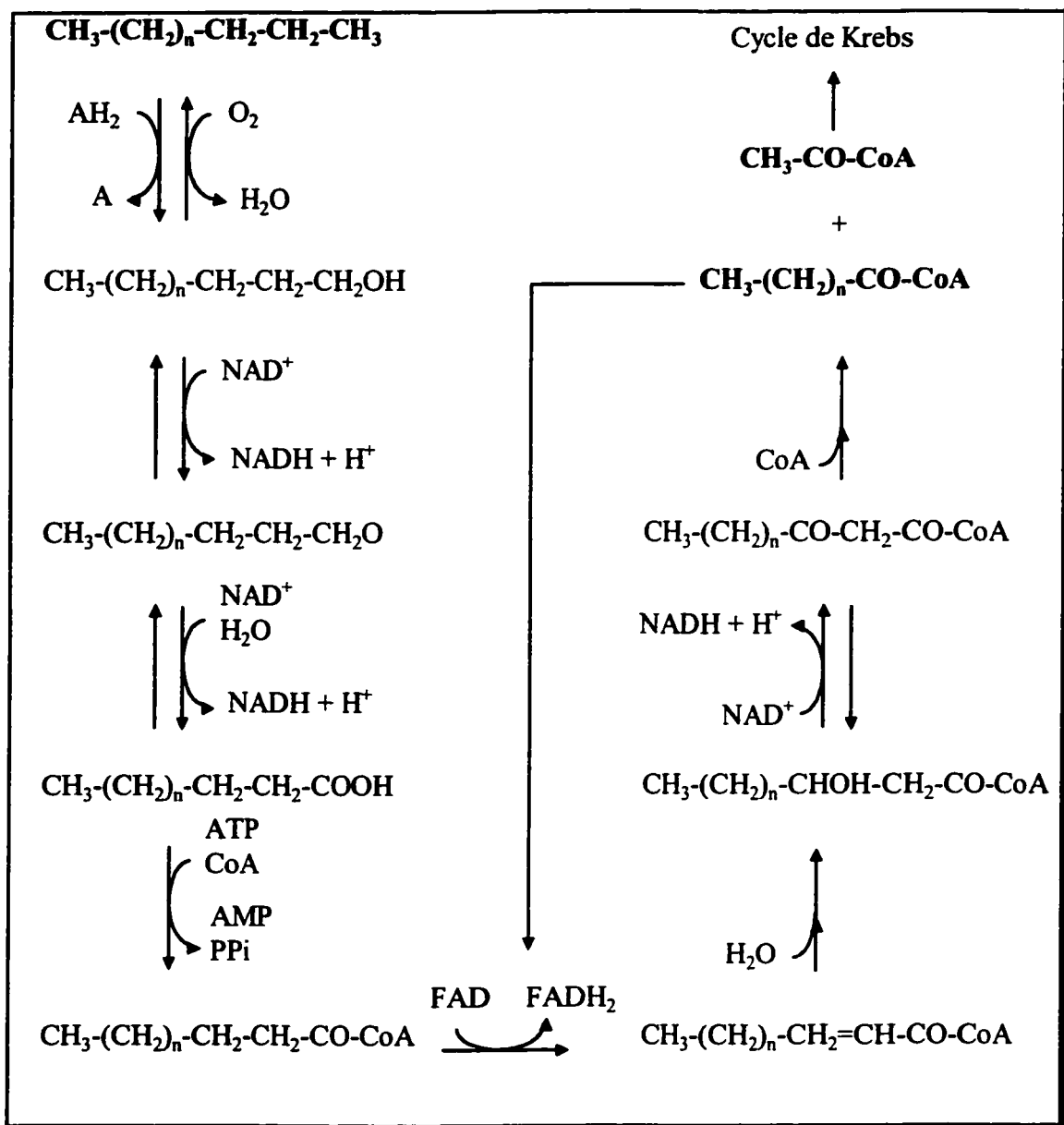


Figure 5-1 Métabolisme commun de dégradation d'un hydrocarbure aliphatique (D'après Baker et Herson, 1994).

Lorsque la biodégradabilité du polluant a été vérifiée, le sol doit ensuite contenir les micro-organismes capables de décomposer ce polluant. En effet, la biodégradation des hydrocarbures est réalisée par des enzymes spécifiques produites par une multitude de micro-organismes appelés hydrocarbonoclastes (Sims et al., 1990). Parmi les dégradeurs des hydrocarbures pétroliers aliphatiques, on retrouve des bactéries, des champignons et

des protozoaires (Alexander, 1994). Toutefois, ce sont principalement les bactéries qui sont responsables de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers (Alexander, 1994) comme, par exemple, les *Nocardia*, les *Acinetobacter*, les *Flavobacterium*, les *Arthrobacter*, les *Corynebacterium*, les *Bacillus*, les *Micrococcus* et les *Pseudomonas* (Riser-Roberts, 1992; Alexander, 1994). Dans un sol, la flore microbienne est rarement un facteur limitant puisque la plupart des sols possèdent, au sein de leur population microbienne indigène, des dégradeurs d'hydrocarbures pétroliers. En effet, un sol non-pollué contient environ 10^7 bactéries par gramme de sol et les dégradeurs représentent environ 1% de la population microbienne. Pour un sol ayant déjà un historique de pollution, ce pourcentage peut s'élever à 10% (Atlas, 1991).

Lorsque les conditions de biodégradabilité et de présence de dégradeurs sont respectées, la biodégradation peut avoir lieu mais des facteurs physico-chimiques peuvent limiter voire inhiber la biodégradation comme la température, la présence d'accepteur d'électrons, l'humidité, le pH et les nutriments.

La température est un des facteurs les plus importants dans le traitement des sols par voie biologique puisqu'elle intervient au niveau de deux phénomènes couplés que sont, d'une part, le transfert du polluant de la phase adsorbée à la phase aqueuse (Lyman et al., 1982) et, d'autre part, la croissance et le métabolisme microbien (Rosso et al., 1995). Ce facteur est d'autant plus important que les conditions météorologiques que subissent les biopiles ou les sols de surface sont très variables et dépendent du lieu de traitement et de la saison. La plage de température optimale pour la biodégradation dépend donc de la solubilité du polluant dans la phase aqueuse et du type de micro-organismes impliqués. D'une part, la solubilité des hydrocarbures pétroliers aliphatiques augmente lorsque la température augmente (Atlas, 1987); il en résulte qu'une température élevée aidera à la mise en solution du polluant. D'autre part, la croissance et le métabolisme microbien sont optimisés lorsque la température est à l'intérieur d'une plage qui dépend du type de micro-organismes présents. Or, les populations microbiennes peuvent changer énormément d'un environnement à un autre à cause de l'historique du site et des conditions météorologiques. En fait des études ont mis en évidence la présence de

micro-organismes hydrocarbonoclates sous des conditions psychrophiles (Atlas, 1987; Wardell, 1995), mésophiles (Dibble et Bartha, 1979; Singleton, 1994) et thermophiles (Merkel et al., 1978). Il n'en demeure pas moins que, sur l'ensemble des études, les plus hauts taux de biodégradation ont été obtenus dans la plage mésophile, soit entre 15°C et 45°C.

La température est donc un paramètre important dont il est difficile de généraliser l'effet sur la biodégradation d'un polluant. Ainsi, pour chaque situation de traitement, il est primordial de se familiariser avec la flore microbienne intrinsèque afin de choisir en conséquence la plage de température optimale pour le traitement.

La présence d'un accepteur d'électron est indispensable à la biodégradation d'un polluant. Les plus hauts taux de biodégradation des hydrocarbures pétroliers sont obtenus sous des conditions aérobies (Cookson, 1995), que l'on rencontre lorsque la concentration en oxygène dissous est supérieure à 0,2 mg/l et lorsque la fraction du volume des pores occupée par l'air est supérieure à 10% afin d'assurer la continuité de l'écoulement de l'air (Bauer et Capone, 1985; Focht, 1987; Sims et al., 1990). Dans un bioprocédé de traitement actif, un système d'aération est nécessaire afin d'assurer un apport suffisant d'oxygène.

L'eau est un facteur également important puisqu'elle constitue le lieu privilégié de la biodégradation du polluant (Focht, 1987). Ainsi, l'accessibilité du polluant à la phase aqueuse ou de la phase aqueuse au polluant est une condition absolue à la biodégradation. Or cette accessibilité est limitée par plusieurs phénomènes. En effet, les hydrocarbures aliphatiques comprenant de 10 à 50 carbones sont caractérisés par une adsorption relativement forte sur les particules de sol et la matière organique ($\log K_{ow} > 2,5$ (Lyman et al., 1982)) et par une faible solubilité dans l'eau (inférieure à 10^{-5} mg/l (Baker et Herson, 1994)). De plus, les micro-organismes ne peuvent se rendre jusqu'à une molécule de polluant située dans un micropore de diamètre inférieur à environ 0,22 μm . La diffusion du polluant au sein du micropore constitue alors un phénomène limitant. Par conséquent, la disponibilité du polluant aux micro-organismes est limitée par les phénomènes de désorption, dissolution et diffusion. Étant donnés les

phénomènes limitants décrits ci-dessus, la quantité d'eau contenue dans le sol a un impact majeur sur la biodisponibilité du polluant. Ainsi l'augmentation du contenu en eau a pour effet d'augmenter la surface mouillée du sol, ce qui contribue à améliorer la disponibilité aqueuse du polluant. Par conséquent, en terme de disponibilité aqueuse, la saturation du sol en eau est souhaitée. L'eau joue un rôle particulièrement important en fin de traitement lorsque la désorption et la diffusion du polluant devient un facteur limitant (De Jonge et al., 1997). Toutefois, une trop grande présence d'un polluant dans la phase aqueuse peut s'avérer néfaste pour des raisons de toxicité pour les micro-organismes (Boethling et Alexander, 1979; Siron et al., 1995). La concentration seuil critique est difficile à déterminer puisqu'elle dépend non seulement du type de polluant mais aussi de la population microbienne présente dans le sol. La biodégradation du polluant dépend aussi de la concentration en oxygène dissous. Or l'oxygène provient de l'air présent dans les pores. Il en résulte que le transfert d'oxygène, directement lié à la surface de contact entre l'air et l'eau, diminue lorsque le contenu en eau augmente. Il résulte donc des observations précédentes que le contenu en eau optimal pour la biodégradation du polluant est un compromis entre la disponibilité aqueuse du polluant et le transfert d'oxygène à partir de la phase gazeuse. La littérature, imprécise à ce sujet, fournit des plages "optimales" tels 25-85% (Sims et al., 1990), 30% à 90% (Dibble et Bartha, 1979), 50% à 70% (Riser-Roberts, 1992) ou encore 40-50% (Cioffi et al., 1993) de la capacité de rétention d'eau au champ. Ces plages sont issues d'observations empiriques et aucune corrélation entre les propriétés physico-chimiques et biologiques, d'une part, et l'humidité optimale, d'autre part, n'a encore été rapportée.

En ce qui concerne le pH, la grande majorité des micro-organismes dégradeurs d'hydrocarbures pétroliers sont des neutrophiles. Le pH doit donc se situer préférentiellement entre 5.5 et 8.5 (Sims et al., 1990; Riser-Roberts, 1992). Le métabolisme commun de dégradation d'un alcane linéaire ne génère pas de sous-produits acidogènes ou alcalinogènes excepté l'ammoniac comme produit de la minéralisation (Baker et Herson, 1994). Bien que l'ammoniac puisse se volatiliser et être directement assimilé par les micro-organismes, une augmentation du pH pourrait avoir lieu lors de la

biodégradation du polluant. En général, le contrôle du pH est assuré au début du traitement par l'ajout de produits de la chaux (Riser-Roberts, 1992).

Enfin, les dégradeurs ont besoin de nutriments. Outre la source de carbone, le métabolisme microbien et la croissance requièrent la présence de macro- et de micro-éléments. Les principaux nutriments pouvant ralentir voire inhiber l'activité microbienne sont l'azote et le phosphore (Alexander, 1994). Le rapport C:N:P est directement lié à la réaction de biodégradation et dépend donc de la nature du polluant et des micro-organismes présents via le métabolisme microbien. Il en résulte qu'il n'existe pas un unique ratio C:N:P optimal. Toutefois, la littérature s'accorde à suggérer un rapport C:N:P autour de 120:10:1 (Sims et al., 1990; Riser-Roberts, 1992). Dans les bioprocédés de traitement actif, il est souvent nécessaire d'ajuster le rapport C:N:P au début du traitement.

Ainsi, de nombreux facteurs peuvent influencer la cinétique de biodégradation d'un polluant. Sa modélisation s'en retrouve ainsi d'autant plus complexe. Les modèles biocinétiques disponibles dans la littérature sont très nombreux et divers, allant d'une simple cinétique réactionnelle d'ordre 0 à une cinétique basée sur la loi de Monod et modifiée pour tenir compte de diverses limitations. Bastin et Dochain (1990) et Simkins et Alexander (1984) constituent deux excellentes références présentant les différents modèles mathématiques disponibles suivant le type de limitation rencontré (Simkins et Alexander, 1984; Bastin et Dochain, 1990).

Dans les modèles de biodégradation d'un polluant dans un sol, deux modèles biocinétiques sont principalement utilisés : une cinétique réactionnelle du premier ordre (Nielsen et al., 1996; Zhao et al., 1999; Park et al., 2001) et une cinétique de Monod (Li et al., 1995; Fu et al., 1996; Zhao et Voice, 2000; Park et al., 2001; Wick et al., 2001) accompagnée éventuellement d'une limitation par l'oxygène (Li et al., 1995; Fu et al., 1996) et/ou d'une cinétique de décès du premier ordre (Wick et al., 2001).

5.2.3 Limitation due au transfert d'oxygène

Dans les bioprocédés de traitement des sols pollués, l'oxygène est fourni sous forme gazeuse par un système d'aération. Ainsi étant donné que le micro-organisme dégradeur

se trouve dans la phase aqueuse, le transfert d'oxygène de la phase gazeuse vers le micro-organisme dégradeur peut s'avérer être le phénomène limitant lors de la biodégradation. Cette limitation est non seulement liée à la solubilité du polluant mais aussi à la diffusion de l'oxygène dans la phase aqueuse.

La formulation mathématique la plus rencontrée dans la littérature est celle basée sur une cinétique de premier ordre limitant la force motrice représentée par le gradient défini par la concentration d'oxygène dans la phase aqueuse et la concentration à saturation (Zhang, 1994; Li et al., 1995; Jacobsen et Arvin, 1996):

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_s - C) \quad \text{Équation 5-1}$$

où C et C_s sont les concentrations dans la phase liquide et à saturation respectivement et où $k_L a$ est le coefficient global de transfert d'oxygène.

La concentration à saturation de l'oxygène dans la phase liquide, C_s , est corrélée à la concentration en oxygène dans la phase gazeuse, C_G , par la loi de Henry:

$$C_G = K_{ho} C_s \quad \text{Équation 5-2}$$

où K_{ho} est la constante de Henry pour le système oxygène/eau. Sa valeur varie en fonction de la température.

Le coefficient de transfert d'oxygène, $k_L a$, quant à lui, témoigne de la facilité pour l'oxygène de passer de la phase gazeuse à la phase liquide. Il dépend par conséquent des caractéristiques géométriques des pores, comme la surface de contact entre les deux phases, gazeuse et liquide. Le $k_L a$ est un paramètre difficile à déterminer expérimentalement étant donnée l'impossibilité de mesurer l'oxygène dissous dans un sol non-saturé. Zhang (1994) a proposé la corrélation suivante entre le taux de transfert d'oxygène et le degré de saturation du sol en eau :

$$k_L a = c_0 + c_1 \left(\frac{\theta_w}{\varepsilon} \right) + c_2 \left(\frac{\theta_w}{\varepsilon} \right)^2 + c_3 \left(\frac{\theta_w}{\varepsilon} \right)^3 + c_4 \left(\frac{\theta_w}{\varepsilon} \right)^4 \quad \text{Équation 5-3}$$

où θ_w est la fraction volumique d'eau dans le sol, ε est la porosité du sol et c_0, c_1, c_2, c_3 et c_4 sont des constantes caractéristiques du sol. Pour un sol donné, Zhang a identifié les constantes suivantes:

$$c_0 = 1.004 \times 10^{-1}$$

$$c_1 = -3.260 \times 10^{-1}$$

$$c_2 = 5.638 \times 10^{-2}$$

$$c_3 = 1.131$$

$$c_4 = -1.192$$

L'évolution du taux de transfert d'oxygène en fonction du degré de saturation en eau, pour le sol considéré par Zhang, est représentée à la Figure 5-2.

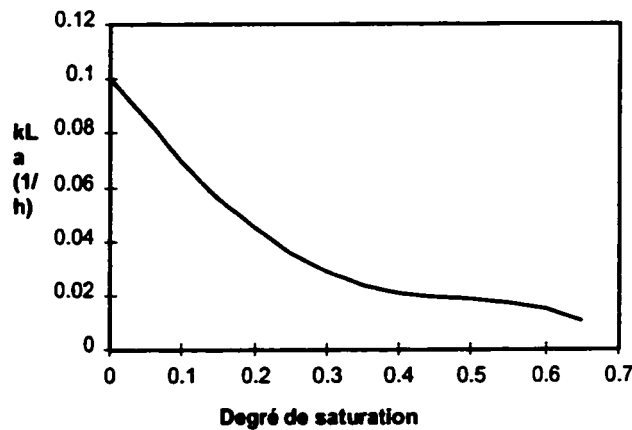


Figure 5-2 Évolution du taux de transfert d'oxygène en fonction du degré de saturation en eau d'un sol donné (d'après Zhang, 1994).

Une autre formulation mathématique consiste à considérer une diffusion de l'oxygène à travers les particules de sol assimilées à des sphères poreuses. Ainsi, la loi de Henry est toujours utilisée pour déterminer la concentration d'oxygène à l'interface air/eau et l'équation différentielle suivante permet de déterminer la concentration en oxygène à l'intérieur des particules de sol (Fu et al., 1996) :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_c \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad \text{Équation 5-4}$$

où D_c est la diffusivité de l'oxygène dans l'eau ($[L^2/T]$) et r est la distance radiale ($[L]$).

Cette formulation nécessite donc la détermination du diamètre moyen des particules et de la diffusivité de l'oxygène dans les sphères poreuses.

Dans un milieu non-saturé, la diffusion de l'oxygène peut être modélisée physiquement par la diffusion d'un fluide virtuel. L'expression de la diffusivité effective du fluide correspondant est représentée par l'équation suivante (Aachib et Aubertin, 2000):

$$D_{\text{eff}} = \frac{1}{\varepsilon^2} \cdot \left[D_a^0 \cdot \theta_a^{3.5} + \frac{1}{K_{ho}} \cdot D_w^0 \cdot \theta_w^{3.5} \right] \quad \text{Équation 5-5}$$

où ε est la porosité, D_a^0 et D_w^0 sont les coefficients de diffusion libre de l'oxygène dans l'air et dans l'eau respectivement et, θ_a et θ_w sont les contenus en air et en eau.

5.2.4 Limitation due à la biodisponibilité du polluant

La biodisponibilité du polluant a fait l'objet ces dernières années de nombreuses études et la définition du mot lui-même ne fait pas encore l'unanimité. Alors que les uns adoptent une approche chimique en définissant la biodisponibilité comme la fraction de polluant dans la phase aqueuse (Cuypers et al., 1999) et la quantifiant par l'intermédiaire de son extractibilité du sol en fonction de divers solvants (Kelsey et al., 1997; Loibner et al., 1999), les autres préfèrent considérer la biodisponibilité comme un taux d'accumulation de polluant par les micro-organismes et la quantifier en terme de taux de biodégradation et taux de toxicité (Landrum et al., 1994; Dudal, 2000). Quelle que soit la définition utilisée, la littérature est unanime quant à sa modélisation phénoménologique. En effet, les modèles mathématiques sont basés sur le principe que le polluant migre d'une position non-accessible à une position accessible par les micro-organismes, de sorte que la biodisponibilité est régie par les équilibres et les cinétiques de sorption.

Le premier schéma conceptuel rencontré dans la littérature est basé sur un équilibre de sorption limité par une diffusion intra-particulaire (Fu et al., 1996; Geerdink et al., 1996; Tabak et al., 1997).

L'équilibre de sorption est le plus souvent représenté par l'équation suivante (Geerdink et al., 1996; Ramaswami et Luthy, 1997; Zhao et al., 1999; Zhao et Voice, 2000):

$$S_s = K_d S_L \quad \text{Équation 5-6}$$

où S_S et S_L sont les concentrations en polluant respectivement adsorbé et dans la phase aqueuse et où K_d est la constante d'équilibre ou constante de partition linéaire.

Cette constante d'équilibre est corrélée à la fraction de carbone organique (f_{oc}) par l'équation suivante:

$$K_d = f_{oc} \cdot K_{oc} \quad \text{Équation 5-7}$$

où K_{oc} est une constante de partition normalisée qui ne dépend théoriquement que du composé organique. Dans la pratique, elle dépend d'autres facteurs tels la fraction de matière inorganique, le degré d'humification de la matière organique et la composition de la solution aqueuse (Fall, 1995).

D'autres études utilisent l'équation de Freundlich, un modèle à deux paramètres permettant d'introduire une intensité non-linéaire d'adsorption (Fu et al., 1996; Tabak et al., 1997). Cette équation s'écrit de la façon suivante:

$$S_S = K_f \cdot S_L^{(1/n)} \quad \text{Équation 5-8}$$

où K_f est la constante de partition de Freundlich et n est un paramètre introduisant la non-linéarité d'adsorption.

Les deux isothermes présentés ci-dessus sont des modèles empiriques et leurs paramètres dépendent des caractéristiques du sol et de la solution aqueuse. Les travaux de Fall (Fall, 1995) ont mis en évidence la difficulté de construire un modèle universel pour les équilibres de sorption de telle sorte qu'ils doivent être caractérisés par des tests de sorption pour chaque sol à l'étude.

La diffusion intra-particulaire est représentée par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{\partial S}{\partial t} = D_s \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial S}{\partial r} \right) \quad \text{Équation 5-9}$$

où D_s est la diffusivité du polluant dans l'eau ($[L^2/T]$) et r est la distance radiale ($[L]$).

Cette formulation nécessite donc la détermination du diamètre moyen des particules et de la diffusivité du polluant dans les sphères poreuses.

Dans un milieu saturé, la diffusivité du polluant est reliée au coefficient de diffusion moléculaire par l'équation suivante (Ramaswami et Luthy, 1997):

$$D_{\text{eff}} = \frac{D_m \varepsilon}{[\varepsilon + K_p \rho_s (1 - \varepsilon)]} \quad \text{Équation 5-10}$$

où D_m est le coefficient de diffusion moléculaire du polluant dans l'eau, ε est la porosité des particules de sol, K_p est le coefficient de sorption et ρ_s est la densité des grains.

Le deuxième schéma conceptuel rencontré dans la littérature est basé sur une cinétique de désorption du premier ordre :

$$\frac{dS_a}{dt} = \alpha \cdot (S^* - S_a) \quad \text{Équation 5-11}$$

où α est la constante cinétique du premier ordre ($[T^{-1}]$), S_a est la concentration de polluant adsorbé et S^* est la concentration maximale de polluant à l'interface de la phase aqueuse et pouvant être définie par un équilibre de sorption (Zhao et al., 1999; Zhao et Voice, 2000; Park et al., 2001).

Enfin, le troisième schéma conceptuel rencontré dans la littérature est basé sur une cinétique de dissolution du premier ordre (Li et al., 1995; Ghoshal et al., 1996; Wick et al., 2001) :

$$\frac{dS}{dt} = k_{sa} \cdot (S_s - S) \quad \text{Équation 5-12}$$

où S est la concentration de polluant dans la phase aqueuse, S_s est la concentration de polluant à saturation et k_{sa} le coefficient global de transfert de polluant.

Récemment, afin de mieux décrire les résultats expérimentaux, des modèles intègrent différents états d'adsorption du polluant aux particules de sol ou à la matière organique de telle sorte que les différentes fractions de polluant répondent à différents équilibres et/ou cinétiques de sorption. Ainsi, Zhao et Voice (2000), Zhao et al. (2001) et Park et al. (2001) considèrent trois sites d'adsorption : le premier site régi par un équilibre de sorption, le deuxième site régi par un équilibre de sorption limité par une cinétique de désorption de premier ordre et le troisième site régi par une adsorption irréversible.

5.2.5 Résumé des modèles de biodégradation dans un sol

Les principaux modèles de la biodégradation d'un polluant dans un sol et leurs caractéristiques sont résumés dans le Tableau 5-1. Plusieurs remarques se dégagent de l'analyse de ce tableau.

Tout d'abord, à l'exception de celle menée par Li et al. (1995), toutes les études se sont concentrées sur un composé modèle et ce, afin de réduire la complexité du système et de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu. Ensuite, même si, de façon générale, les études sont compatibles entre elles dans l'identification des phénomènes mis en jeu, elles ne s'entendent pas sur leur représentation mathématique, que ce soit au niveau de la biodégradation elle-même, du transfert de polluant ou du transfert d'oxygène. Ceci peut être expliqué par les problèmes d'identification des paramètres. En effet, les modèles présentés font intervenir de 6 à 20 paramètres. Or, parmi ceux-ci, très peu (de 0 à 3 paramètres) proviennent de données de la littérature, et à l'inverse, beaucoup d'entre eux (de 2 à 8) sont issus de tests préliminaires (tests de biodégradation en phase liquide, test de sorption abiotique, etc.). Ainsi, le modèle général de biodégradation est étroitement lié à l'efficacité des modèles réduits à décrire les phénomènes biotiques et abiotiques découplés. De plus, dans le souci constant de décrire au mieux la biodégradation du polluant, les auteurs ont été amenés à traduire mathématiquement des phénomènes complexes et souvent méconnus, telle la biodégradation directe du polluant à partir de la phase adsorbée (Fu et al., 1996; Zhao et al., 1999; Zhao et Voice, 2000; Park et al., 2001). Toutefois, ces phénomènes complexes sont traduits mathématiquement par des cinétiques globales dont les paramètres sont identifiés par régression à l'aide des données expérimentales (de 1 à 6), ce qui fait des modèles présentés des outils descriptifs et non prédictifs.

Tableau 5-1 Caractéristiques des modèles de biodégradation des polluants

Référence	Polluant (1)	Configuration	Modélisation de la biodégradation	Modélisation du transfert de polluant	Modélisation du transfert d'oxygène	Nbre de paramètres issus de la littérature	Nbre de paramètres issus de tests préliminaires	Nbre de paramètres identifiés par calage
Li et al. (1995)	HP	Cuvée Non-saturé	Phase liquide : Monod avec limitation par O ₂	Cinétique de dissolution d'ordre 1	Cinétique de dissolution d'ordre 1	3	2	1
Geerdink et al. (1996)	H HCCH	Continu Saturé	Consommation illimitée	Modèle à 2 sites : - Équilibre de sorption - Équilibre de sorption limitée par diffusion intra-particulaire	N/A	3	4	1
Fu et al. (1996)	Phenol	Cuvée Non-saturé	Phase liquide : Monod avec limitation par O ₂ Phase solide : Monod avec limitation par O ₂	Équilibre de sorption limitée par diffusion intra-particulaire	Diffusion intra- particulaire	0	14	6
Zhao et al. (1999)	TCC	Continu Saturé	Phase liquide : ordre 1 Phase solide : ordre 1	Modèle à 2 sites : - Équilibre de sorption - Équilibre de sorption limitée par cinétique de désorption (ordre 1)	N/A	0	7	2
Zhao et Voice (2000)	Naphht.	Continu Saturé	Phase liquide : Monod Phase solide : ordre 1	Modèle à 2 sites : - Équilibre de sorption - Équilibre de sorption limitée par cinétique de désorption (ordre 1)	N/A	0	7	3
Wick et al. (2001)	Anthr.	Cuvée Phases liquide	Phase liquide : Monod avec mortalité	Cinétique de dissolution d'ordre 1	N/A	1	4	2
Park et al. (2001)	Naphht.	Cuvée Saturé	Phase liquide: Monod Phase solide : ordre 1	Modèle à 3 sites : - Équilibre de sorption - Équilibre de sorption limitée par cinétique de désorption (ordre 1) - Adsorption irréversible				

(1) HP : hydrocarbures pétroliers ; H : hexadécane ; HCCH : hexachlorocyclohexane ; TCC : tetrachlorure de carbone ; Naphht. : naphthalène ; Anthr. : anthracène.

Plusieurs études ont porté sur la compréhension de ces nouveaux phénomènes décrits globalement par les modèles mathématiques. Parmi ceux-ci, on peut mentionner l'effet d'agents tensioactifs chimiques ou biologiques sur la biodégradation des hydrocarbures (Déziel et al., 1996; Mulder et al., 1998; Sekelsky et Shreve, 1999; Bardi et al., 2000), l'effet de la formation de biofilm sur la biodisponibilité du polluant (Mulder et al., 1998) ou encore le rôle de composés extracellulaires dans les mécanismes de biodégradation (Guerin et Boyd, 1992; Armenante et al., 1994). Toutefois, les expressions mathématiques de ces phénomènes n'ont pas encore été introduites dans les modèles globaux de biodégradation des polluants dans les sols.

5.2.6 Conclusion

La revue de littérature portant sur les phénomènes impliqués dans la biodégradation d'un polluant dans un sol saturé ou non et leur modélisation a permis de mettre en évidence l'ambivalence entre la caractérisation et la modélisation précise des phénomènes d'une part, et la difficulté liée à l'identification *a priori* des paramètres d'autre part. Il en résulte que les modèles de la littérature ont permis de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu, notamment par l'incorporation de processus de plus en plus complexes, mais demeurent des outils descriptifs qui ne conviennent pas au contrôle des bioprocédés de traitement. L'étude présentée dans ce chapitre a donc comme objectif de développer un modèle adaptatif qui permette le suivi en temps réel de la biodégradation et la possibilité d'envisager le contrôle des bioprocédés de traitement dans un sol non-saturé.

5.3 Matériels et méthodes

5.3.1 Modélisation physique

5.3.1.1 Tests standards pour l'obtention des propriétés physico-chimiques

Le sol étudié est un sable silteux avec matière organique dont la courbe granulométrique a été présentée dans le chapitre 3. Les propriétés physico-chimiques du sol sont présentées au Tableau 5-2. La capacité de rétention d'eau au champ, égale 0,4330 g/g sol sec, est élevée pour un sable. Cette valeur est explicable par la haute teneur en matière

organique (2,1%), qui contribue à l'augmentation de la rétention d'eau. En se basant sur une pollution potentielle de 10 000 mg C/kg sol, un rapport C/N/P de 100 :10 :1 nécessiterait une concentration en azote et phosphore de 1000 et 100 mg/kg sol sec. Or, bien que l'azote total Kjeldahl soit égal à 1000 mg/kg, l'azote ammoniacal est seulement de 48 mg/kg. De plus, les orthophosphates sont négligeables. Il en résulte que le sol doit être amendé en nutriments pour ne pas limiter la biodégradation.

Tableau 5-2 Propriétés physico-chimiques du sol

Propriété	Protocole(s) utilisé(s)	Valeur
Analyse granulométrique	ASTM : D421, D422, D1140, D2217, E11	Sable silteux avec matière organique
Capacité de rétention au champ	ASTM D2980-71	0,4330 g/g sec
Carbone organique total	SM5310C, TRAACS800 860-87T	2,1 %
Azote total Kjeldahl	SM 4500-Norg et 4500-NH3.D	1000 mg/kg
pH	MENVIQ.89.08/113-pH 1.1	7,86
Azote ammoniacal	SM 4500-NH3-D	48 mg/kg
Nitrates solubles	MENVIQ.89.07/303-NO3 1.1	34 mg/kg
Nitrites	MENVIQ.90.05/303-NO2 1.3	< 1 mg/kg
Orthophosphates (solubles)	SM 4500-P E	< 2 mg/kg
Hydrocarbures C ₁₀ -C ₅₀	MEF 400-HYD. 1.0	< 40 mg/kg

5.3.1.2 Tests de biodégradation en phase liquide

Les tests de biodégradation en phase liquide, réalisés dans des bouteilles sérologiques de 120 mL, consistent à mettre en contact une solution aqueuse de la biomasse d'un échantillon de sol et un polluant donné. Cette solution aqueuse contenant la biomasse du sol est obtenue à l'aide de la technique d'extraction de la biomasse utilisée lors du dénombrement bactérien d'un sol par la méthode du nombre le plus probable (NPP). La technique d'extraction consiste à introduire 10 g de sol dans une bouteille contenant 95

mL d'une solution de milieu salin minéral (MSM) stérile (Greer et al. 1990) et trente billes de verre. Après une agitation maximale au Wrist Action pendant 30 min, la solution est centrifugée à 1400 g pendant 30 sec (centrifugeuse IEC-21000R) de façon à plaquer les particules de sol sans plaquer les micro-organismes (van Elsas et al., 1997). Le surnageant, contenant la biomasse du sol, est alors prélevé et prêt à être utilisé pour les tests de biodégradation en phase liquide. Un volume de 10 mL de solution aqueuse de biomasse est introduit dans une bouteille sérologique de 120 mL dans laquelle se trouve un tube contenant 2 mL de KOH. Le polluant, dont une partie est marquée au ^{14}C , est ajouté à l'aide d'une seringue. L'échantillonnage régulier de la solution de KOH permet la quantification du CO_2 total produit et du CO_2 marqué au ^{14}C . Ainsi, il est possible de quantifier la minéralisation totale et la minéralisation du polluant. En parallèle, des microcosmes identiques, contenant la même quantité de polluant mais dont certaines ne contiennent pas de radioactivité, sont sacrifiées à des dates stratégiques afin de suivre d'autres paramètres. Ainsi, à chaque sacrifice, la solution des bouteilles sacrifiées contenant de la radioactivité est centrifugée à 4500 rpm pendant 10 min afin de plaquer la biomasse. Le surnageant et le culot sont analysés séparément au compteur à scintillation, l'hypothèse sous-jacente consistant à supposer que le surnageant contient l'hexadécane n'ayant pas encore été dégradé, et le culot, la biomasse. Afin de valider cette hypothèse, la solution des bouteilles sacrifiées ne contenant pas de radioactivité est utilisée pour le dénombrement bactérien spécifique et total par la méthode du nombre le plus probable (NPP). Deux concentrations en polluant ont été testées soit 1,25 et 2,5 mg/L, ce qui représente un ajout de 12,5 et 25 μL ou encore 9,663 et 19,325 mg d'hexadécane. Des témoins abiotiques (en présence d'azoture de sodium, NaN_3) et non-pollués ont été réalisés.

Le Tableau 5-3 résume la description des microcosmes et leur fin d'utilisation et la Figure 5-3 illustre de façon schématique l'expérience en phase liquide. Le protocole détaillé des tests de biodégradation en phase liquide est disponible à l'Annexe 3 et des photos relatives au protocole sont présentées à l'Annexe 4.

Tableau 5-3 Description des microcosmes en phase liquide et fin d'utilisation

Numéros	Quantité initiale de polluant	Hexadécane froid	Hexadécane chaud (^{14}C)	NaN_3	Paramètres mesurés
1, 2 et 3	9,663 mg	✓	✓	-	CO_2 , $^{14}\text{CO}_2$
4	9,663 mg	✓	✓	✓	CO_2 , $^{14}\text{CO}_2$
5, 6 et 7	19,325 mg	✓	✓	-	CO_2 , $^{14}\text{CO}_2$
8	19,325 mg	✓	✓	✓	CO_2 , $^{14}\text{CO}_2$
9	Non pollué	-	-	-	CO_2
10 à 17	9,663 mg	✓	✓	-	^{14}C -Sacrifice
18 à 25	9,663 mg	✓	✓	✓	^{14}C -Sacrifice
26 à 33	19,325 mg	✓	✓	-	^{14}C -Sacrifice
34 à 41	19,325 mg	✓	✓	✓	^{14}C -Sacrifice
42 à 49	Non pollué	-	-	-	^{14}C -Sacrifice
50 à 57	9,663 mg	✓	-	-	NPP
58 à 65	19,325 mg	✓	-	-	NPP
66 à 73	Non pollué	-	-	-	NPP

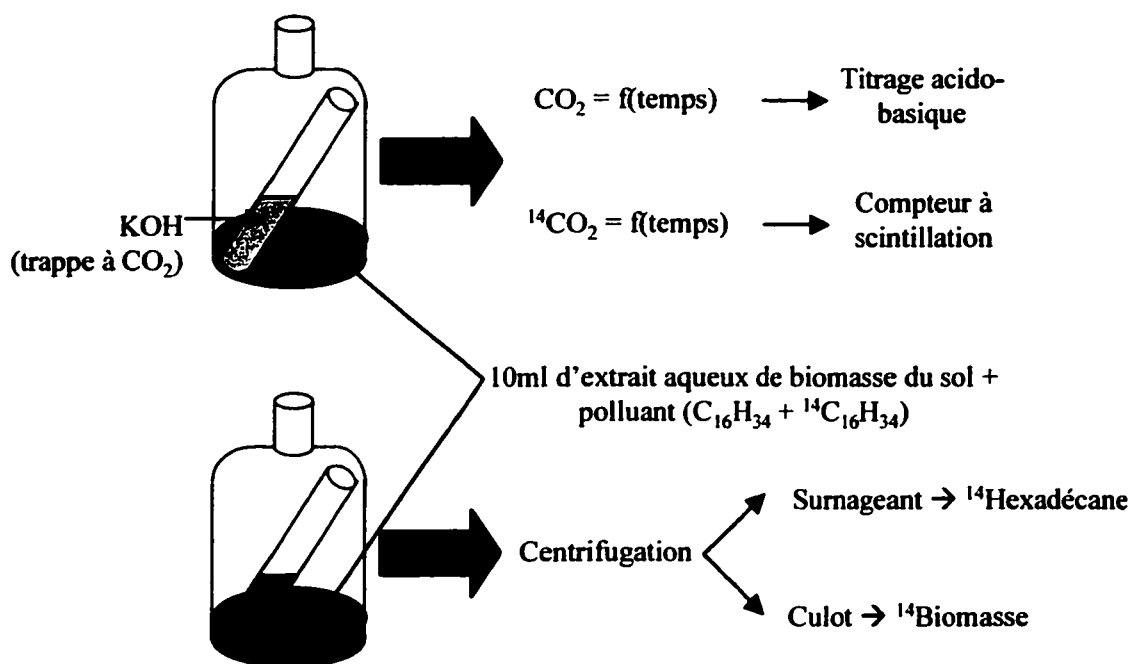


Figure 5-3 Schéma global de l'expérience en phase liquide.

5.3.1.3 Tests de biodégradation en phase solide

Les tests de biodégradation en phase solide sont réalisés directement sur un échantillon de sol. Une masse de 20 g de sol est introduite dans un flacon biométrique. Le polluant, dont une partie est marquée au ¹⁴C, est ajouté goutte à goutte à l'aide d'une seringue jusqu'à un volume total de 250 µL correspondant ainsi à une pollution d'environ 10 000 mg/kg. Un volume de 1 mL de MSM est ajouté afin de s'affranchir des problèmes de limitation en nutriments. L'humidité du sol est ensuite ajustée : trois contenus en eau ont été testés correspondant à environ 20% (sec), 50% (moyen) et 80% (humide) de la capacité de rétention d'eau au champ. Dans la partie tubulaire du flacon biométrique sont introduites 10 mL de KOH. L'échantillonnage régulier de la solution de KOH permet la quantification du CO₂ total produit et du CO₂ marqué au ¹⁴C. Ainsi, il est possible de quantifier la minéralisation totale et la minéralisation du polluant. En parallèle, des microcosmes identiques mais ne contenant pas de radioactivité, sont sacrifiées à des dates stratégiques afin de suivre d'autres paramètres. Ainsi, l'hexadécane qui n'a pas encore réagi est extrait au Soxtec puis dosé au GC-FID. L'analyse est

réalisée en triplicata sur 5 g de sol du même microcosme et le sol restant est utilisé pour une analyse de poids sec. Le protocole détaillé de l'extraction et du dosage de l'hexadécane est présenté à l'Annexe 5. Un autre microcosme est sacrifié pour la quantification de la biomasse. Ainsi, 10 g de sol sont utilisés pour un dénombrement sélectif (dégradeurs d'hexadécane) et total (croissance sur le glucose) selon la méthode du nombre le plus probable (NPP) et pour un compte microbien par épifluorescence au microscope. Enfin, 200 mg de sol sont utilisés pour la quantification de l'ADN du sol. L'ADN est d'abord extrait par une solution tampon contenant un agent tensio-actif, puis, après purification, est dosé à l'aide d'un marqueur fluorescent. La quantification de l'ADN est réalisée sur trois échantillons de 200g (triplicata) et 5g de sol sont utilisés pour un poids sec. Les protocoles détaillés des méthodes de NPP, d'épifluorescence et de quantification de l'ADN sont présentés respectivement aux Annexe 6, Annexe 7 et Annexe 8.

Une seule concentration en polluant et trois humidités ont été testées. Des témoins abiotiques (en présence d'azoture de sodium, NaN_3) et non-pollués ont aussi été réalisés. Le Tableau 5-4 résume les caractéristiques de tous les microcosmes réalisés et leur fin d'utilisation et la Figure 5-4 illustre de façon schématique l'expérience en phase solide. Le protocole détaillé des tests de biodégradation en phase solide est disponible à l'Annexe 9 et des photos relatives au protocole sont présentées à l'Annexe 10.

Tableau 5-4 Description des microcosmes en phase solide et fin d'utilisation

Numéros	Type de contenant	Hexadécane (10 g/kg)	Humidité	NaN ₃	Paramètres mesurés
1, 2 et 3	Fl. biométrique	✓	Sec	-	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
4	Fl. biométrique	✓	Sec	✓	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
5	Fl. biométrique	-	Sec	-	CO ₂
6, 7 et 8	Fl. biométrique	✓	Moyen	-	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
9	Fl. biométrique	✓	Moyen	✓	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
10	Fl. biométrique	-	Moyen	-	CO ₂
11, 12 et 13	Fl. biométrique	✓	Humide	-	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
14	Fl. biométrique	✓	Humide	✓	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
15	Fl. biométrique	-	Humide	-	CO ₂
16 à 31	Erlenmeyer	✓	Sec	-	C ₁₆ H ₃₄ , μO (Sacrifice)
32 à 39	Erlenmeyer	-	Sec	-	C ₁₆ H ₃₄ , μO (Sacrifice)
40 à 55	Erlenmeyer	✓	Moyen	-	C ₁₆ H ₃₄ , μO (Sacrifice)
56 à 63	Erlenmeyer	-	Moyen	-	C ₁₆ H ₃₄ , μO (Sacrifice)
64 à 79	Erlenmeyer	✓	Humide	-	C ₁₆ H ₃₄ , μO (Sacrifice)
80 à 87	Erlenmeyer	-	Humide	-	C ₁₆ H ₃₄ , μO (Sacrifice)

Note : Fl. Biométrique : flacon biométrique;

μO : population microbienne.

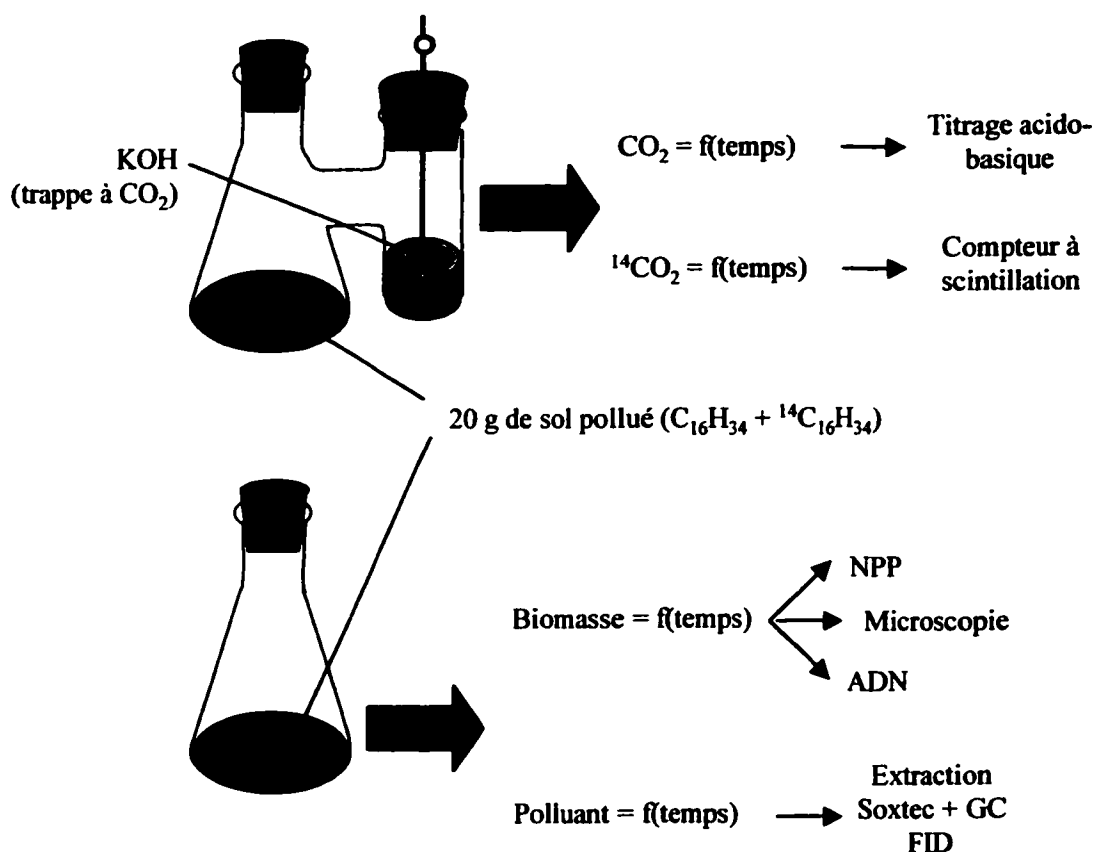


Figure 5-4 Schéma global de l'expérience en phase solide.

5.3.2 Modélisation mathématique

5.3.2.1 Biodégradation en phase liquide

L'hexadécane, étant un composé organique très peu soluble et moins dense que l'eau, devrait se retrouver au dessus de la solution aqueuse. Par conséquent, le développement de la population hydrocarbonoclaste est favorisé à l'interface de la solution aqueuse et de la phase organique que représente l'hexadécane non-solubilisé. Ainsi, sous cette hypothèse, les micro-organismes dégradeurs sont directement en contact avec le polluant qui constitue alors pour eux soit une source de carbone soit une source de toxicité. Enfin, la biodégradation ayant lieu à l'interface entre l'air et la solution aqueuse et les flacons étant agités, la limitation de la biodégradation par transfert d'oxygène peut être négligée.

Sous les hypothèses posées ci-dessus, les phénomènes de biodégradation dans les flacons en phase liquide peuvent être décrits par un modèle biocinétique basé sur la croissance microbienne dont les équations sont les suivantes :

$$\text{Croissance microbienne} \quad \frac{dX}{dt} = \mu_c \cdot X - \mu_d \cdot X \quad \text{Équation 5-13}$$

$$\text{Biodégradation} \quad \frac{dS}{dt} = -Y_{S/X} \cdot \mu_c \cdot X \quad \text{Équation 5-14}$$

$$\text{Minéralisation} \quad \frac{dP}{dt} = Y_{P/X}^c \cdot \mu_c \cdot X + Y_{P/X}^d \cdot \mu_d \cdot X \quad \text{Équation 5-15}$$

où X, S et P sont respectivement la population de dégradeurs, l'hexadécane et le dioxyde de carbone (CO₂), μ_c et μ_d sont les taux spécifiques de croissance et de décès, et où $Y_{S/X}$, $Y_{P/X}^c$, $Y_{P/X}^d$ sont les coefficients de rendement respectivement de l'hexadécane, du CO₂ produit par la croissance et du CO₂ produit par le décès par rapport à la population de dégradeurs.

Alors que le taux spécifique de décès, μ_d , peut être pris égal à une constante, le taux spécifique de croissance, μ_c , suit généralement une cinétique de Haldane (Andrews, 1968):

$$\mu_c = \frac{\mu_s \cdot S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad \text{Équation 5-16}$$

où μ_s est le taux de croissance de Haldane, et où K_s et K_i sont respectivement les constantes d'affinité et d'inhibition.

5.3.2.2 Biodégradation en phase solide

Comme il a été vu lors de la revue de littérature, les phénomènes impliqués dans la biodégradation d'un polluant hydrophobe dans un sol non-saturé sont plus nombreux et plus complexes. En effet, aux phénomènes modélisés en phase liquide s'ajoutent une cinétique de transfert de polluant. De plus, puisque les particules de sol peuvent s'agglomérer, la cinétique de transfert d'oxygène peut être limitante. Or il a été vu que

les modèles de la littérature font face à des problèmes d'identifiabilité. En conséquence, afin de favoriser le développement d'un modèle observable, plusieurs hypothèses permettant la réduction du nombre de paramètres à identifier ont été posées.

D'une part, afin d'englober les phénomènes de transport de polluant ainsi que la capacité intrinsèque des micro-organismes à y accéder (production d'agents tensioactifs, d'enzymes extracellulaire, etc.), un modèle à deux compartiments et une cinétique de désorption d'ordre n ont été considérés :

$$\frac{dS_{nb}}{dt} = -k_n \cdot (S_{nb})^n \quad \text{Équation 5-17}$$

où S_{nb} est la quantité de polluant qui n'est pas en contact avec un dégradeur et k_n est une constante cinétique d'ordre n .

D'autre part, puisqu'il n'est pas possible de mesurer la concentration d'oxygène dans la phase aqueuse et, par conséquent, de connaître le gradient de concentration d'oxygène dans la matrice solide, il est supposé que les hydrocarbonoclastes se développent seulement dans des zones aérobies et que leur croissance n'est pas limitée par la concentration en oxygène. Cette hypothèse permet d'intégrer la limitation par transfert d'oxygène dans la constante de désorption du polluant, k_n . En d'autres termes, la cinétique de désorption du polluant englobe non seulement les phénomènes de diffusion intra-particulaire mais aussi la cinétique de transfert du polluant d'une zone anaérobie à une zone aérobie. La cinétique globale correspondante sera appelée par la suite cinétique de biocontact et la constante cinétique, constante de biocontact.

Sous les deux hypothèses mentionnées ci-dessus, la biodégradation du polluant dans un sol non saturé peut être décrite par le système d'équations différentielles suivant :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_c \cdot X - \mu_d \cdot X \quad \text{Équation 5-18}$$

$$\frac{dS}{dt} = k_n \cdot (S_{nb})^n - Y_{S/X} \cdot \mu_c \cdot X \quad \text{Équation 5-19}$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X}^c \cdot \mu_c \cdot X + Y_{P/X}^d \cdot \mu_d \cdot X \quad \text{Équation 5-20}$$

$$\frac{dS_{nb}}{dt} = -k_n \cdot (S_{nb})^n \quad \text{Équation 5-21}$$

$$\mu_c = \frac{\mu_s \cdot S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad \text{Équation 5-22}$$

Ainsi, le modèle complet de biodégradation fait intervenir 9 paramètres dont 7 peuvent être déterminés à l'aide des tests de biodégradation en phase liquide (coefficients de rendements, constantes de la cinétique de Haldane et taux spécifique de décès). Il reste donc deux paramètres à identifier (k_n , et n) au moyen d'une régression appliquée sur les données expérimentales. On peut également remarquer que les paramètres à identifier appartiennent à la cinétique de biocontact du polluant. Ainsi, l'estimation en temps réel de cette cinétique permettrait de rendre le modèle observable et donc de suivre le niveau de pollution en temps réel. Les sections suivantes portent donc sur l'estimation de la cinétique de biocontact et sur l'observation en temps réel du niveau de pollution.

5.3.2.3 Développement d'un estimateur/observateur pour le suivi du polluant

La principale mesure en ligne disponible comme indicateur de la biodégradation est la mesure du CO_2 , produit de minéralisation. Étant donné que la minéralisation de la matière organique est lente et faible, il est supposé que la production de CO_2 due à la minéralisation de l'hexadécane peut être déduite de la mesure totale de CO_2 produit.

Reprenons le système d'équations développé pour les tests en phase solide. En faisant abstraction de la formulation analytique de la cinétique de biocontact du polluant, le système d'équations différentielles devient le suivant :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_c \cdot X - \mu_d \cdot X \quad \text{Équation 5-19}$$

$$\frac{dS}{dt} = \Phi - Y_{S/X} \cdot \mu_c \cdot X \quad \text{Équation 5-23}$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X}^c \cdot \mu_c \cdot X + Y_{P/X}^d \cdot \mu_d \cdot X \quad \text{Équation 5-21}$$

$$\frac{dS_{nb}}{dt} = -\Phi \quad \text{Équation 5-24}$$

$$\mu_c = \frac{\mu_s \cdot S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad \text{Équation 5-23}$$

où Φ est un paramètre variable dans le temps.

Les variables d'état non-mesurées sont X , S et S_{nb} et Φ est un taux inconnu variable dans le temps. Deux capteurs logiciels en cascade basés sur la structure d'estimateur/observateur sont développés. Le premier consiste à déterminer μ_c d'après la mesure en ligne de P . Ensuite, connaissant la formulation du taux spécifique de croissance, il est possible de déterminer la valeur de S . En réalité, pour une cinétique de Haldane, deux valeurs de S correspondent à la même valeur de μ_c . Or, dans le sol, contrairement aux tests de biodégradation en phase liquide, la quantité d'hexadécane en biocontact est faible et il est donc raisonnable de poser que la valeur réelle de S en biocontact sera la plus petite des deux solutions. En se basant sur cette hypothèse, il est possible de construire un autre capteur-logiciel pour l'estimation de Φ et l'observation de S_{nb} . Si, pendant une certaine période, l'hypothèse mentionnée ci-dessus n'est pas vérifiée, alors le capteur-logiciel devrait introduire un biais qu'il sera possible d'évaluer lors des simulations.

Les équations différentielles et algébriques associées au développement des deux capteurs-logiciels sont les suivantes :

$$\frac{d\hat{X}}{dt} = \hat{\mu}_c \cdot \hat{X} - \mu_d \cdot \hat{X} \quad \text{Équation 5-25}$$

$$\frac{d\hat{P}}{dt} = Y_{P/X}^c \cdot \hat{\mu}_c \cdot \hat{X} + Y_{P/X}^d \cdot \mu_d \cdot \hat{X} + \Omega_p \cdot (P - \hat{P}) \quad \text{Équation 5-26}$$

$$\frac{d\hat{\mu}_c}{dt} = \Gamma_p \cdot Y_{P/X}^c \cdot \hat{X} \cdot (P - \hat{P}) \quad \text{Équation 5-27}$$

$$\hat{\mu}_c = \frac{\mu_s \cdot \hat{S}}{K_s + \hat{S} + \frac{\hat{S}^2}{K_I}} \quad \text{Équation 5-28}$$

$$\frac{d\hat{S}}{dt} = \hat{\Phi} - Y_{s/X} \cdot \hat{\mu}_c \cdot \hat{X} + \Omega_s \cdot (S - \hat{S}) \quad \text{Équation 5-29}$$

$$\frac{d\hat{\Phi}}{dt} = \Gamma_s \cdot (S - \hat{S}) \quad \text{Équation 5-30}$$

$$\frac{d\hat{S}_{nb}}{dt} = -\hat{\Phi} \quad \text{Équation 5-31}$$

L'analyse de la stabilité du système d'erreur conduit au réglage suivant :

$$\Omega_p = -2 \cdot \lambda_p \quad \text{Équation 5-32}$$

$$\Gamma_p = \frac{\lambda_p^2}{(Y_{p/X}^c \cdot \hat{X})} \quad \text{Équation 5-33}$$

$$\Omega_s = -2 \cdot \lambda_s \quad \text{Équation 5-34}$$

$$\Gamma_s = \lambda_s^2 \quad \text{Équation 5-35}$$

où les valeurs de λ_p et λ_s sont strictement négatives.

Dans le domaine discrétisé, les gains doivent être de nouveau réglés pour tenir compte de la stabilité du système discret. Les équations des estimateurs/observateurs dans le domaine discrétisé s'écrivent de la façon suivante :

$$\hat{P}(i+1) = \hat{P}(i) + dt(i) \cdot [Y_{p/X}^c \cdot \hat{\mu}_c(i) \cdot \hat{X}(i) + Y_{p/X}^d \cdot \mu_d \cdot \hat{X}(i) + \Omega_p(i) \cdot (P(i) - \hat{P}(i))] \quad \text{Équation 5-36}$$

$$\hat{\mu}_c(i+1) = \hat{\mu}_c(i) + dt(i) \cdot [\Gamma_p(i) \cdot Y_{p/X}^c \cdot \hat{X}(i) \cdot (P(i) - \hat{P}(i))] \quad \text{Équation 5-37}$$

$$\hat{S}(i+1) = \hat{S}(i) + dt(i) \cdot [\hat{\Phi}(i) - Y_{s/X} \cdot \hat{\mu}_c(i) \cdot \hat{X}(i) + \Omega_s(i) \cdot (S(i) - \hat{S}(i))] \quad \text{Équation 5-38}$$

$$\hat{\Phi}(i+1) = \hat{\Phi}(i) + dt(i) \cdot [\Gamma_s(i) \cdot (S(i) - \hat{S}(i))] \quad \text{Équation 5-39}$$

où

$$dt(i) = t(i+1) - t(i) \quad \text{Équation 5-40}$$

L'écriture sous forme matricielle des ces équations conduit à la formulation suivante :

$$\begin{bmatrix} \hat{P}(i+1) \\ \hat{\mu}_c(i+1) \end{bmatrix} = A_p(i) \cdot \begin{bmatrix} \hat{P}(i) \\ \hat{\mu}_c(i) \end{bmatrix} + B_p(i) \quad \text{Équation 5-41}$$

où

$$A_p(i) = \begin{bmatrix} 1 - dt(i) \cdot \Omega_p(i) & dt(i) \cdot Y_{p/x}^c \cdot \hat{X}(i) \\ -dt(i) \cdot \Gamma_p(i) \cdot Y_{p/x}^c \cdot \hat{X}(i) & 1 \end{bmatrix} \quad \text{Équation 5-42}$$

$$B_p(i) = \begin{bmatrix} dt(i) \cdot [Y_{p/x}^d \cdot \mu_d \cdot \hat{X}(i) + \Omega_p(i) \cdot P(i)] \\ dt(i) \cdot \Gamma_p(i) \cdot Y_{p/x}^c \cdot \hat{X}(i) \cdot P(i) \end{bmatrix} \quad \text{Équation 5-43}$$

et

$$\begin{bmatrix} \hat{S}(i+1) \\ \hat{\Phi}(i+1) \end{bmatrix} = A_s(i) \cdot \begin{bmatrix} \hat{S}(i) \\ \hat{\Phi}(i) \end{bmatrix} + B_s(i) \quad \text{Équation 5-44}$$

où

$$A_s(i) = \begin{bmatrix} 1 - dt(i) \cdot \Omega_s(i) & dt(i) \\ -dt(i) \cdot \Gamma_s(i) & 1 \end{bmatrix} \quad \text{Équation 5-45}$$

$$B_s(i) = \begin{bmatrix} dt(i) \cdot [-Y_{s/x} \cdot \hat{\mu}_c(i) \cdot \hat{X}(i) + \Omega_s(i) \cdot S(i)] \\ dt(i) \cdot \Gamma_s(i) \cdot S(i) \end{bmatrix} \quad \text{Équation 5-46}$$

Le système est alors stable si les valeurs propres des matrices $A_p(i)$ et $A_s(i)$ sont comprises entre 0 et 1. En imposant arbitrairement l'égalité des deux valeurs propres de chaque matrice, le réglage des gains suit les relations suivantes :

$$\Omega_p(i) = \frac{2 \cdot (1 - \lambda_p)}{dt(i)} \quad \text{Équation 5-47}$$

$$\Gamma_p(i) = \frac{\lambda_p^2 - (1 - \Omega_p(i) \cdot dt(i))}{(dt(i) \cdot Y_{p/x}^c \cdot \hat{X}(i))^2} \quad \text{Équation 5-48}$$

$$\Omega_s(i) = \frac{2 \cdot (1 - \lambda_s)}{dt(i)} \quad \text{Équation 5-49}$$

$$\Gamma_s(i) = \frac{\lambda_s^2 - (1 - \Omega_s(i) \cdot dt(i))}{(dt(i))^2} \quad \text{Équation 5-50}$$

où $0 < \lambda_p < 1$ et $0 < \lambda_s < 1$

5.4 Résultats expérimentaux et simulations

5.4.1 Identification paramétrique d'un modèle biocinétique à partir d'un extrait aqueux de la biomasse d'un sol

5.4.1.1 Résultats expérimentaux

Deux tests de biodégradation ont été réalisés dans des flacons contenant 10 mL de solution aqueuse contenant la biomasse extraite du sol. Les deux tests se différencient par la quantité d'hexadécane ajouté : 12,5 µL soit 9,663 mg d'hexadécane pour le premier test et 25 µL soit 19,325 mg d'hexadécane pour le second.

Le protocole a été conçu de façon à récupérer la radioactivité en trois parties : dans la trappe à CO₂, dans le culot et dans le surnageant des solutions centrifugées lors des sacrifices. La première analyse réside dans l'évaluation des rendements de récupération. Ainsi, les rendements de récupération (R_c) ont été calculés lors de chaque sacrifice en appliquant l'équation suivante :

$$R_c(\%) = \frac{{}^{14}\text{C}(\text{KOH}) + {}^{14}\text{C}(\text{Surnageant}) + {}^{14}\text{C}(\text{Culot})}{{}^{14}\text{C}(\text{initial})} \times 100 \quad \text{Équation 5-51}$$

où ${}^{14}\text{C}(\text{initial})$ est la quantité totale de radioactivité introduite dans les microcosmes au début de l'expérience.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 5-5. Les résultats obtenus sur les flacons abiotiques témoignent d'un rendement de récupération élevé (supérieur à 89%) avec un très faible écart type (moins de 3%). Ce résultat montre que la centrifugation permet bien de retrouver l'hexadécane dans le surnageant malgré toute adsorption qui pourrait s'intensifier au cours du temps. Les résultats sur les sacrifices indiquent également un rendement d'extraction légèrement inférieur (supérieur à 80%) avec un écart type plus grand (plus de 6%). L'écart entre les flacons abiotiques et les sacrifices pourrait s'expliquer par le fait que la radioactivité se retrouve au fil des jours de plus en plus dans le culot où le rendement de détection au compteur à scintillation est affecté par la présence d'interférence. Cette hypothèse n'a pu pour l'instant être validée.

La Figure 5-5 détaille la récupération de la radioactivité : surnageant, culot et trappe à CO₂. Les résultats indiquent que la quasi totalité de la radioactivité pour les flacons abiotiques est récupérée dans le surnageant, ce qui est conforme aux résultats attendus puisque que l'hexadécane n'a pas été biodégradé. La quantité de radioactivité dans le surnageant diminue très rapidement et est presque nulle après 10 à 15 jours. Après une phase de latence d'environ 5 jours, la radioactivité dans la trappe à CO₂ augmente très rapidement dans les 10 premiers jours puis l'augmentation fléchit et devient quasi-linéaire par la suite. Enfin, après une phase de latence d'environ 5 jours, la radioactivité dans le culot augmente puis diminue après 10 à 15 jours. Il en résulte que l'augmentation de la radioactivité dans le culot et dans la trappe à CO₂ dans les premiers jours est due à la disparition de l'hexadécane dans le surnageant alors que l'augmentation de la radioactivité dans la trappe à CO₂ par la suite est due à la diminution de la radioactivité dans le culot.

Tableau 5-5 Rendements de récupération des flacons abiotiques et des sacrifices

Jour du sacrifice	Rendements de récupération (%)			
	9,663 mg d'hexadécane ajouté		9,663 mg d'hexadécane ajouté	
	Abiotique	Sacrifice	Abiotique	Sacrifice
0	84,50	94,90	94,93	86,77
5,77	90,31	88,43	95,70	94,09
8,93	91,63	84,23	95,70	85,82
11,95	90,20	84,09	97,25	75,64
13,85	90,23	68,71	96,89	79,06
16,94	88,72	72,05	93,08	78,96
19,90	95,06	77,08	96,21	78,49
22,76	91,24	80,34	95,59	84,38
34,90	87,54	66,14	93,92	73,60
Moyenne	89,94	79,55	95,47	81,87
Écart type	2,91	9,47	1,93	6,42

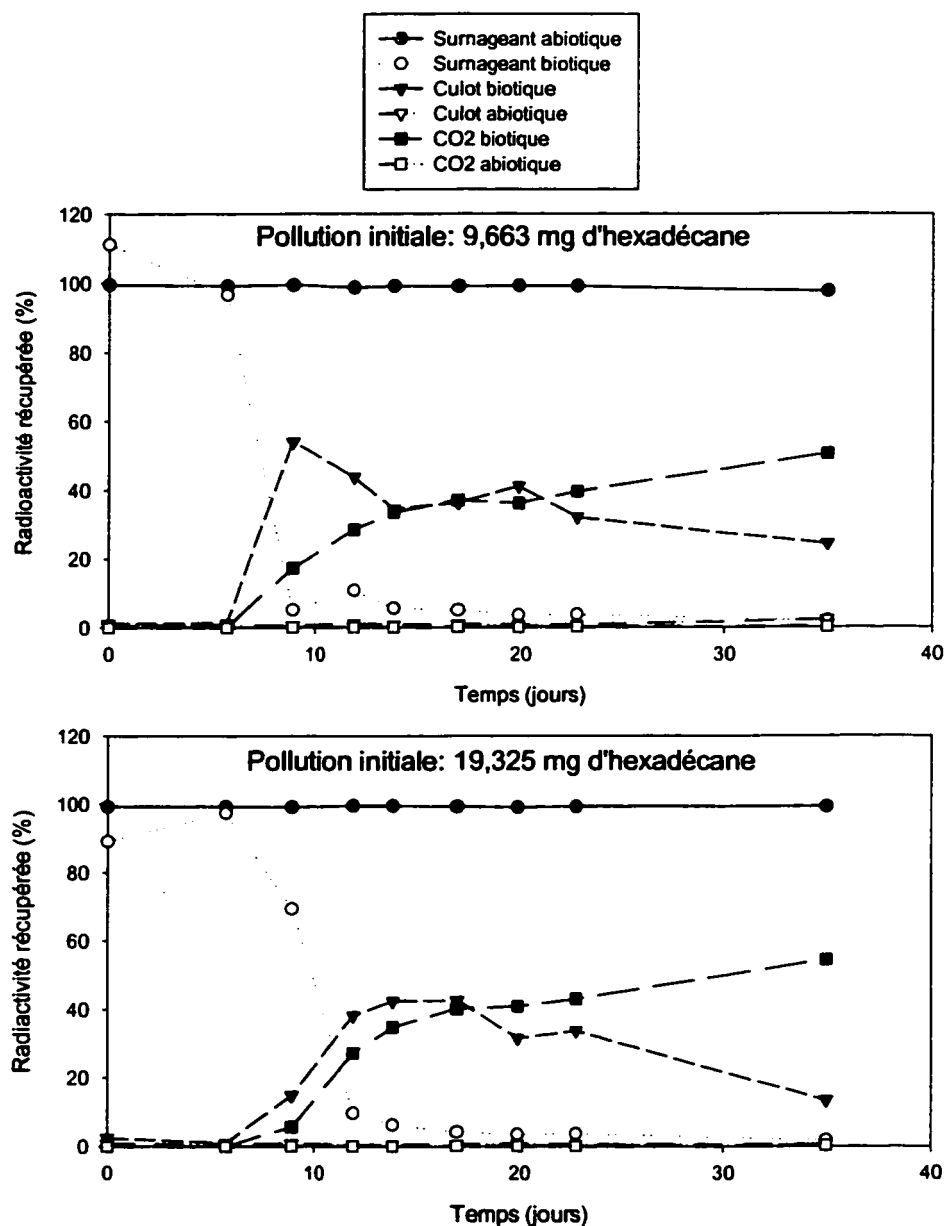


Figure 5-5 Répartition du ^{14}C dans les microcosmes en phase aqueuse.

Ces observations peuvent être expliquées par la biodégradation de l'hexadécane dans les 10 à 15 premiers jours conduisant à la croissance de la population de dégradeurs et à la production de CO_2 et par la mortalité des dégradeurs par la suite menant à une production plus lente de CO_2 . Afin de confirmer cette interprétation, des dénombrements bactériens, suivant la technique du nombre le plus probable, ont été réalisés en parallèle sur des sacrifices non-radioactifs. Les résultats sont présentés à la Figure 5-6 et

corroborent l'interprétation faite à partir du suivi de la radioactivité. En effet, la population des dégradeurs d'hexadécane (hydrocarbonoclastes) pour les sols pollués croît jusqu'à 10 à 15 jours puis décroît, alors qu'elle reste constante pour le témoin contenant un sol non-pollué. Cette évolution est qualitativement semblable à l'évolution observée de la radioactivité dans le culot.

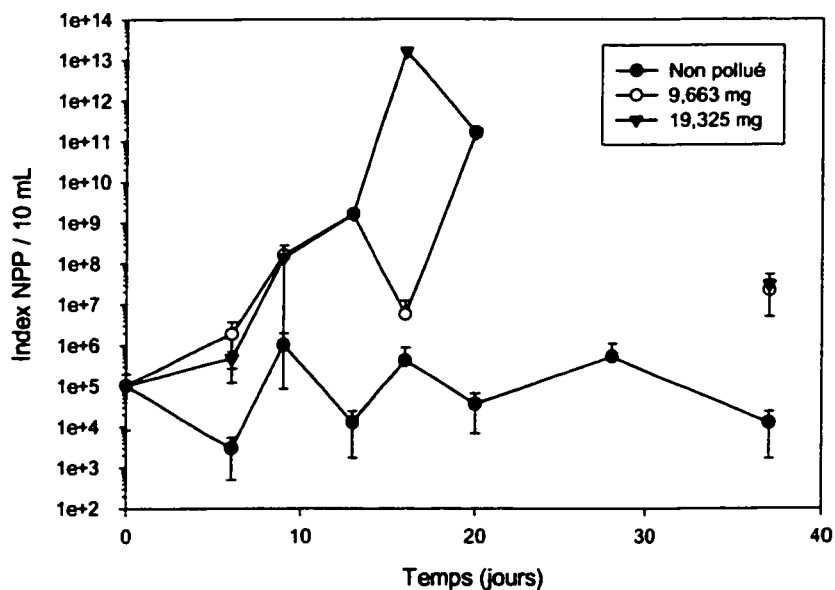


Figure 5-6 Dénombrements NPP de la population hydrocarbonoclaste (phase liquide). Il résulte de ces résultats que le suivi de la radioactivité dans le surnageant, le culot et la trappe à CO₂ permet de suivre l'évolution quantitative de l'hexadécane restant, de la population de dégradeurs et de la minéralisation. L'utilisation d'hexadécane radio-marqué et non-radio-marqué a permis de suivre simultanément le CO₂ radio-marqué et non-radio-marqué, c'est-à-dire la minéralisation de l'hexadécane et celle de la matière organique du milieu. La Figure 5-7 présente le rapport entre ces deux types de minéralisation.

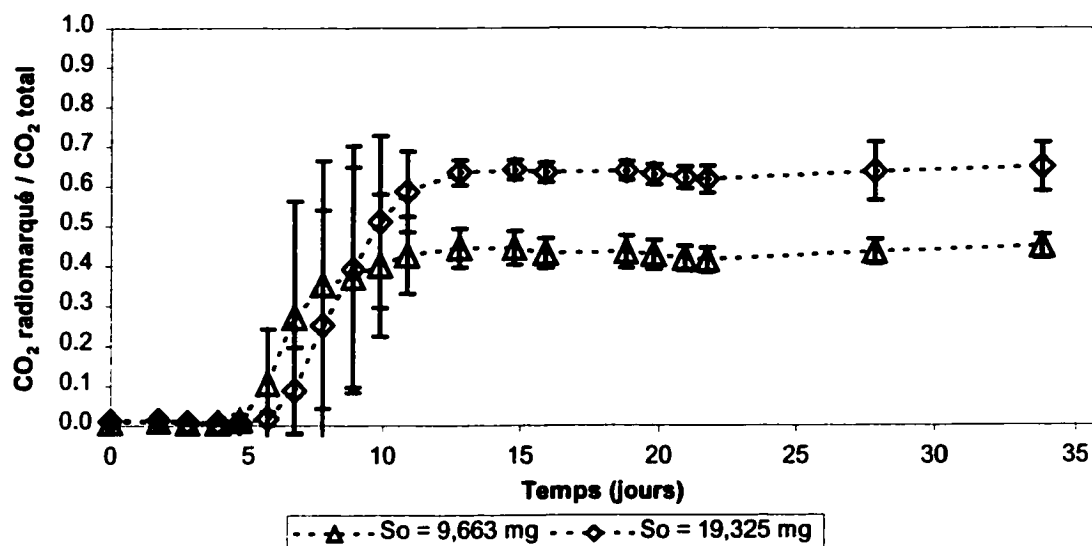


Figure 5-7 Évolution du rapport de minéralisation $^{14}\text{CO}_2/\text{CO}_2$.

De 0 à 5 jours, la minéralisation de l'hexadécane est très faible et le rapport de minéralisation est proche de 0. Ensuite, le rapport augmente jusqu'à l'obtention d'un plateau après 10 à 15 jours, ce qui correspond au moment où l'hexadécane a été complètement biodégradé. On remarque que le rapport de minéralisation est plus élevé lorsque la quantité d'hexadécane est plus forte, ce qui montre que la stimulation des dégradeurs n'entraîne pas une stimulation semblable des hétérotrophes.

5.4.1.2 Modélisation

Pour fin de modélisation les résultats de la Figure 5-5 ont été convertis en masse. Pour ce faire, la formule chimique de la population de dégradeurs étant inconnue, une formule empirique a été développée à partir d'informations sur la composition cellulaire des bactéries (Bailey et Ollis, 1986). Ainsi, la formule chimique empirique $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ a été adoptée pour la population de dégradeurs. La masse initiale de dégradeurs a été fixée à 0,08 mg. Cette valeur a été estimée à partir du poids sec d'un échantillon de biomasse obtenue après centrifugation à 4500 rpm pendant 10 min. À noter que l'erreur faite sur la masse initiale de dégradeurs n'est pas nuisible pour la modélisation et les capteurs-logiciels puisque la biodégradation est basée sur la croissance microbienne et non sur la

quantité de dégradeurs. Plusieurs modèles biocinétiques basés sur la croissance microbienne ont été confrontés aux résultats expérimentaux. Des modèles de plus en plus complexes ont été utilisés afin de décrire au mieux les données expérimentales. Le modèle le plus simple et le plus performant est celui présenté dans la section *Matériels et méthodes*:

$$\text{Croissance microbienne} \quad \frac{dX}{dt} = \mu_c \cdot X - \mu_d \cdot X \quad \text{Équation 4-46}$$

$$\text{Biodégradation} \quad \frac{dS}{dt} = -Y_{S/X} \cdot \mu_c \cdot X \quad \text{Équation 4-47}$$

$$\text{Minéralisation} \quad \frac{dP}{dt} = Y_{P/X}^c \cdot \mu_c \cdot X + Y_{P/X}^d \cdot \mu_d \cdot X \quad \text{Équation 4-48}$$

L'identification paramétrique, basée sur une méthode des moindres carrés non-linéaires d'après les équations de Marquardt-Levenberg (*lsqcurvefit* dans Matlab), a d'abord été réalisée sur la série de données correspondant à l'ajout de 19,325 mg d'hexadécane, cette série offrant qualitativement de meilleures courbes. La performance du modèle est illustrée à la Figure 5-8 qui révèle que le modèle décrit de façon satisfaisante les données expérimentales aussi bien au niveau du CO₂ produit qu'au niveau de la consommation de l'hexadécane et de l'évolution de la population de dégradeurs. Le

Tableau 5-6 présente les valeurs initiales des variables d'état et les valeurs des paramètres obtenues par calage des données expérimentales. La Figure 5-9 présente la courbe du taux spécifique de croissance en fonction de la masse d'hexadécane. Le taux maximum, obtenu lorsque que la quantité d'hexadécane en contact avec les dégradeurs est égale à 12 mg, s'élève à 0,0215 h⁻¹.

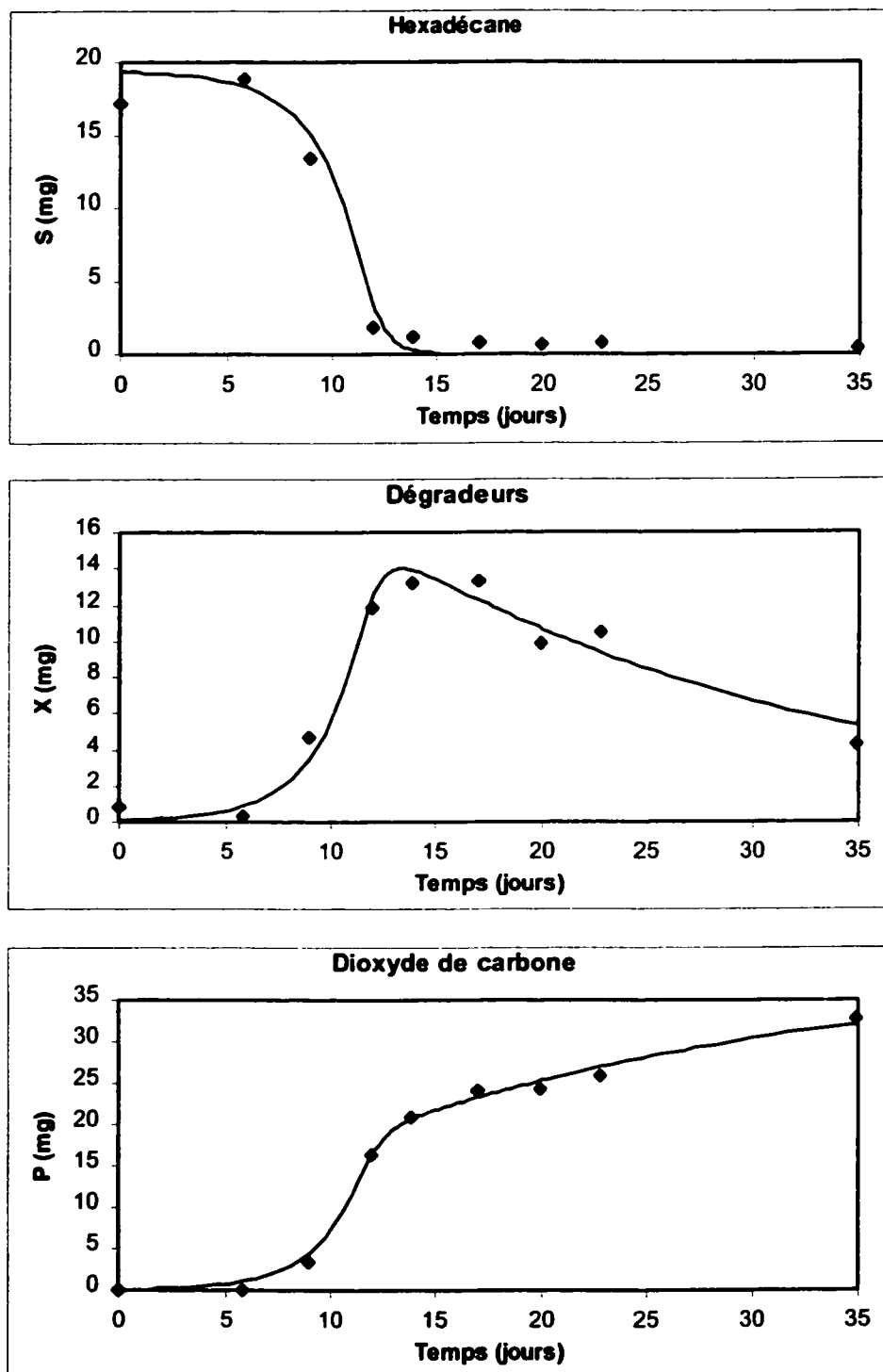


Figure 5-8 Résultats de l'identification paramétrique ($S_0 = 19,325$ mg).

Tableau 5-6 Résultats de l'identification paramétrique ($S_0 = 19,325$ mg)

X_0 (mg)	S_0 (mg)	P_0 (mg)	μ_s (h ⁻¹)	K_s (mg)	K_i (mg)	μ_d (h ⁻¹)	$Y_{S/X}$ (mg/mg)	$Y_{P/X}^c$ (mg/mg)	$Y_{P/X}^d$ (mg/mg)
0,08	19,325	0	15,87	4340,8	0,032	1,11	1,16	1,06	1,27

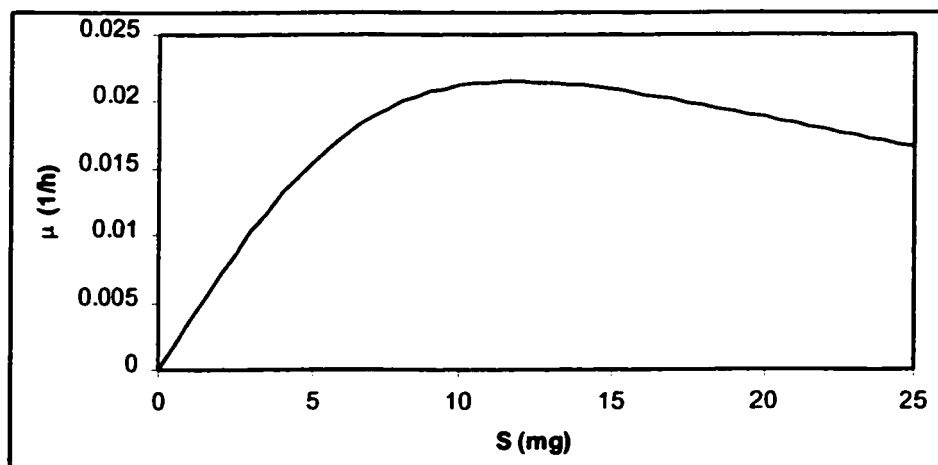


Figure 5-9 Évolution du taux spécifique de croissance avec la quantité d'hexadécane en biocontact.

Le modèle ainsi identifié a été confronté à la deuxième série de données correspondant à une concentration initiale d'hexadécane deux fois plus faible ($S_0 = 9,663$ mg). Une simulation a donc été réalisée en gardant les valeurs du

Tableau 5-6 pour les paramètres du modèle. Les résultats de la simulation sont présentés à la Figure 5-10 qui montre un bon comportement du modèle vis-à-vis des nouvelles données expérimentales. Il en résulte que le modèle biocinétique a pu être identifié à partir des expériences réalisées en phase aqueuse.

Le protocole développé a donc permis de calibrer un modèle biocinétique sur les dégradeurs extraits du sol étudié. En supposant que le comportement métabolique des dégradeurs soit semblable dans la phase aqueuse et dans le sol, le modèle biocinétique sera utilisé pour décrire les données expérimentales obtenues en phase solide en gardant *a priori* les mêmes valeurs de paramètre, c'est-à-dire celles présentées au Tableau 5-6.

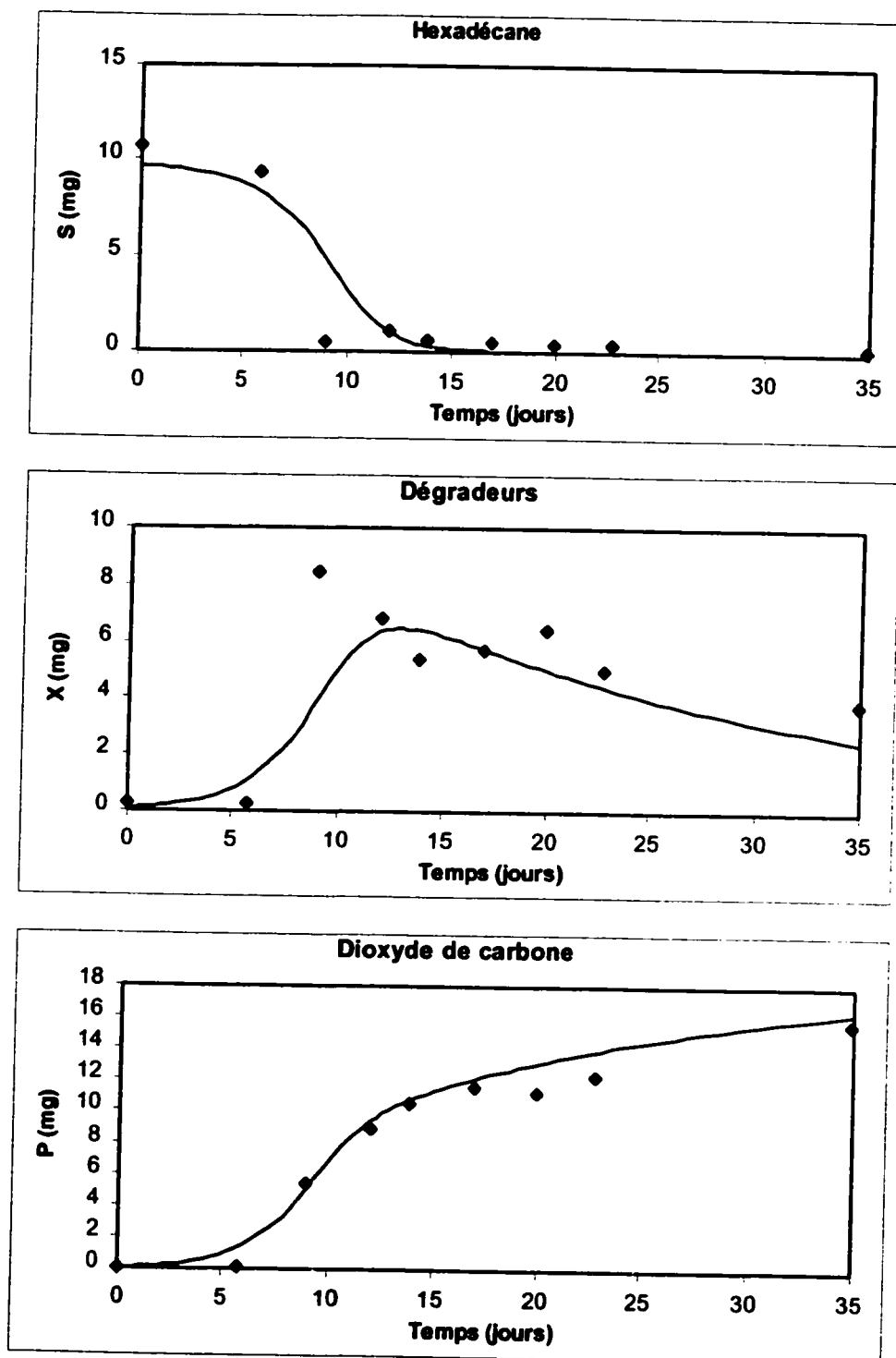


Figure 5-10 Résultats de simulation ($S_0 = 9,663$ mg).

5.4.2 Modélisation de la biodégradation de l'hexadécane dans un sol non-saturé

5.4.2.1 Résultats expérimentaux

La Figure 5-11 représente l'évolution du contenu en eau en fonction du temps correspondant aux trois humidités visées. Des duplicata correspondant aux deux erlenmeyers sacrifiés ont été obtenus. Les courbes montrent qu'aucun assèchement significatif n'a été observé et que l'humidité peut être considérée constante dans les flacons biométriques. Les trois humidités sont en moyenne égales à $0,1558 \pm 0,0046$ g/g sol sec, $0,2378 \pm 0,0019$ g/g sol sec et $0,3150 \pm 0,0058$ g/g sol sec, correspondant aux trois contenus en eau désirés appelés par la suite : sec, moyen et humide.

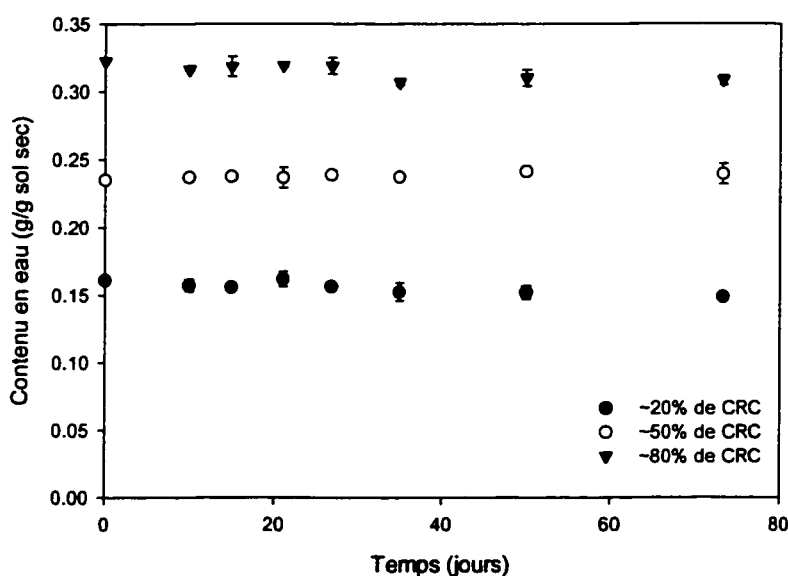


Figure 5-11 Évolution des humidités dans les flacons biométriques.

La Figure 5-12 présente, pour les trois humidités différentes, l'évolution de la minéralisation de l'hexadécane obtenue à l'aide du CO_2 radio-marqué. Les courbes obtenues à partir du témoin abiotique montrent que la production de CO_2 par voie physico-chimique est quasiment nulle, ce qui revient à dire que la minéralisation de l'hexadécane est bien due à sa biodégradation.

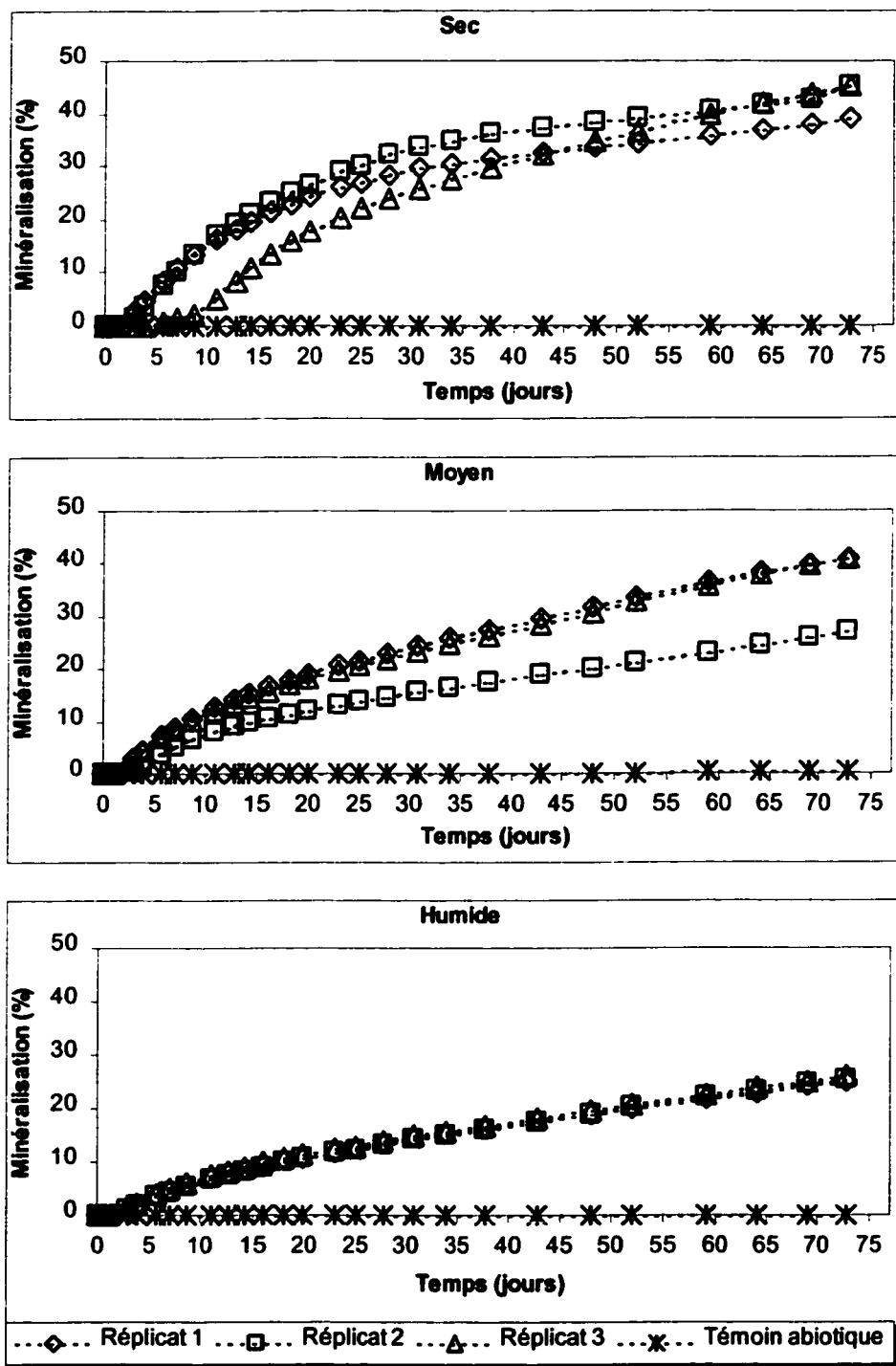


Figure 5-12 Évolution de la minéralisation de l'hexadécane dans les flacons biométriques.

Ensuite, d'une part, l'obtention de triplicata révèle que plus le sol est humide, plus l'hétérogénéité entre les répliques diminue. D'autre part, plus l'humidité est élevée, moins la minéralisation de l'hexadécane est grande. Toutefois, il est intéressant de noter que, si on omet la courbe la plus basse pour le sol d'humidité moyenne, la minéralisation dans les sols sec et moyen est semblable.

La Figure 5-13 présente l'évolution de la concentration en hexadécane en fonction du temps pour les trois humidités différentes. Cette figure montre, en accord avec les courbes de minéralisation, que la biodégradation de l'hexadécane est plus rapide lorsque l'humidité du sol est faible et que la biodégradation des sols sec et moyen est semblable. En effet, après 50 jours de traitement, le niveau de dépollution atteint 6864 mg/kg sol sec pour le sol humide, alors qu'il a atteint 3424 mg/kg sol sec et 3552 mg/kg sol sec pour les sols sec et moyen respectivement. En revanche, contrairement à la minéralisation, l'analyse de triplicata a conduit à de très faibles écart-types pour les trois contenus en eau.

Ces résultats tendent à montrer que, d'une part, une faible humidité peut conduire à des zones difficilement colonisées par les dégradeurs et donc à l'hétérogénéité de la biodégradation dans le sol, mais que, d'autre part, un faible contenu en eau permet une minéralisation et une biodégradation plus rapide.

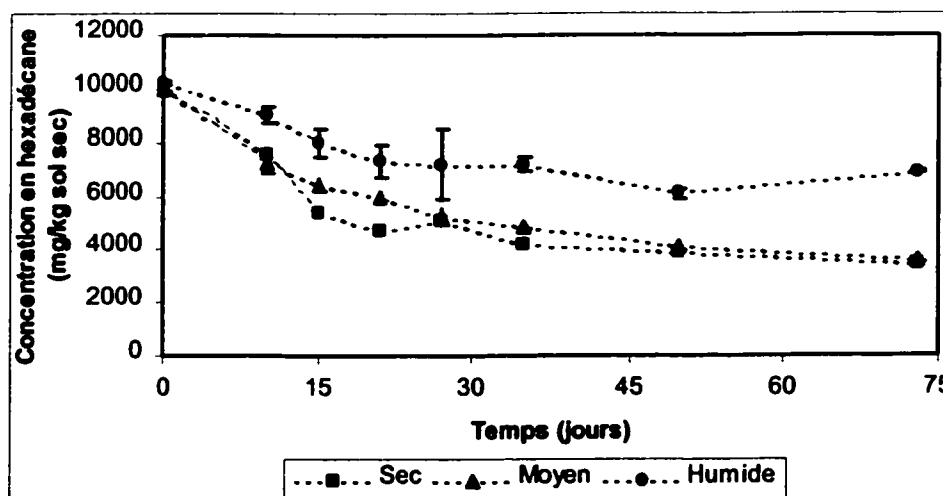


Figure 5-13 Évolution de la concentration d'hexadécane dans les flacons biométriques.

La Figure 5-14 présente l'évolution des populations hétérotrophe et hydrocarbonoclaste pour les trois humidités différentes. Tout d'abord, en ce qui concerne les témoins abiotiques, les populations ont légèrement augmenté passant de 6.10^3 à environ 10^5 index NPP/g sol sec pour les hydrocarbonoclastes et de 6.10^6 à environ 10^8 index NPP/g sol sec pour les hétérotrophes. Cette croissance microbienne peut être attribuée à l'introduction de MSM en début d'expérience.

En ce qui concerne les sols pollués, la population totale a subi une légère augmentation, de 10^7 à 10^8 index NPP/g sol sec. Le plus grand changement a été observé pour la population hydrocarbonoclaste des sols pollués où elle est passée de 10^4 index NPP/g sol sec à environ 10^6 - 10^7 index NPP/g sol sec pour les trois humidités. Il en résulte que la population hydrocarbonoclaste développée ne s'est pas ajoutée aux hétérotrophes mais a remplacé une partie de cette population soit par effet de toxicité du polluant soit par adaptation enzymatique des espèces existantes. On peut également noter que plus le sol est humide et plus la densité maximale de dégradeurs est élevée : $5,77.10^6$ index NPP/g sol sec pour le sol sec, $6,19.10^7$ index NPP/g sol sec pour le sol d'humidité moyenne et $1,19.10^8$ index NPP/g sol sec pour le sol humide. Cette observation est *a priori* surprenante puisque les résultats de minéralisation ont montré que plus le sol était humide, moins élevée était le taux de minéralisation. Toutefois, il faut noter que la minéralisation du polluant a d'abord débuté dans les microcosmes du sol humide et que, après l'accession au maximum de densité microbienne, une cinétique de décès est clairement visible pour le sol humide, alors que la population de dégradeurs est demeurée constante pour le sol sec.

La Figure 5-15 présente les résultats du compte microbien par microscopie à épifluorescence. Les résultats concordent avec ceux obtenus par la méthode NPP. La population microbienne totale est restée presque constante et les populations des sols pollués sont légèrement supérieures à celles des sols non-pollués.

La Figure 5-16 présente les résultats obtenus par dosage de l'ADN. On peut remarquer que, aussi bien pour les sols pollués que pour les sols non-pollués, la quantité d'ADN a

augmenté jusqu'à une valeur maximale puis diminué lentement. Cette observation concorde avec celles obtenues avec la méthode NPP.

De plus, plusieurs similitudes peuvent être observées entre l'évolution de l'ADN total et celle des index NPP des hydrocarbonoclastes. Tout d'abord, le passage par un maximum est commun aux deux courbes. Ensuite le maximum d'ADN extrait a tendance à être plus élevé lorsque l'humidité du sol est importante, comme le nombre de dégradeurs selon la méthode NPP était plus élevé à haut contenu en eau. Enfin, de façon semblable à la méthode NPP, la cinétique de décès est plus prononcée lorsque l'humidité est élevée. Ces résultats nous invitent à penser que le dosage de l'ADN pourrait être un indicateur de l'évolution de la population de dégradeurs. Cependant, étant donnée les faibles variations des index NPP et des quantités d'ADN, aucune relation quantitative entre l'index NPP et la quantité d'ADN n'a pu être calibrée. En conséquence, des études complémentaires doivent être entreprises pour valider le protocole d'estimation de la population microbienne à partir de l'ADN total du sol.

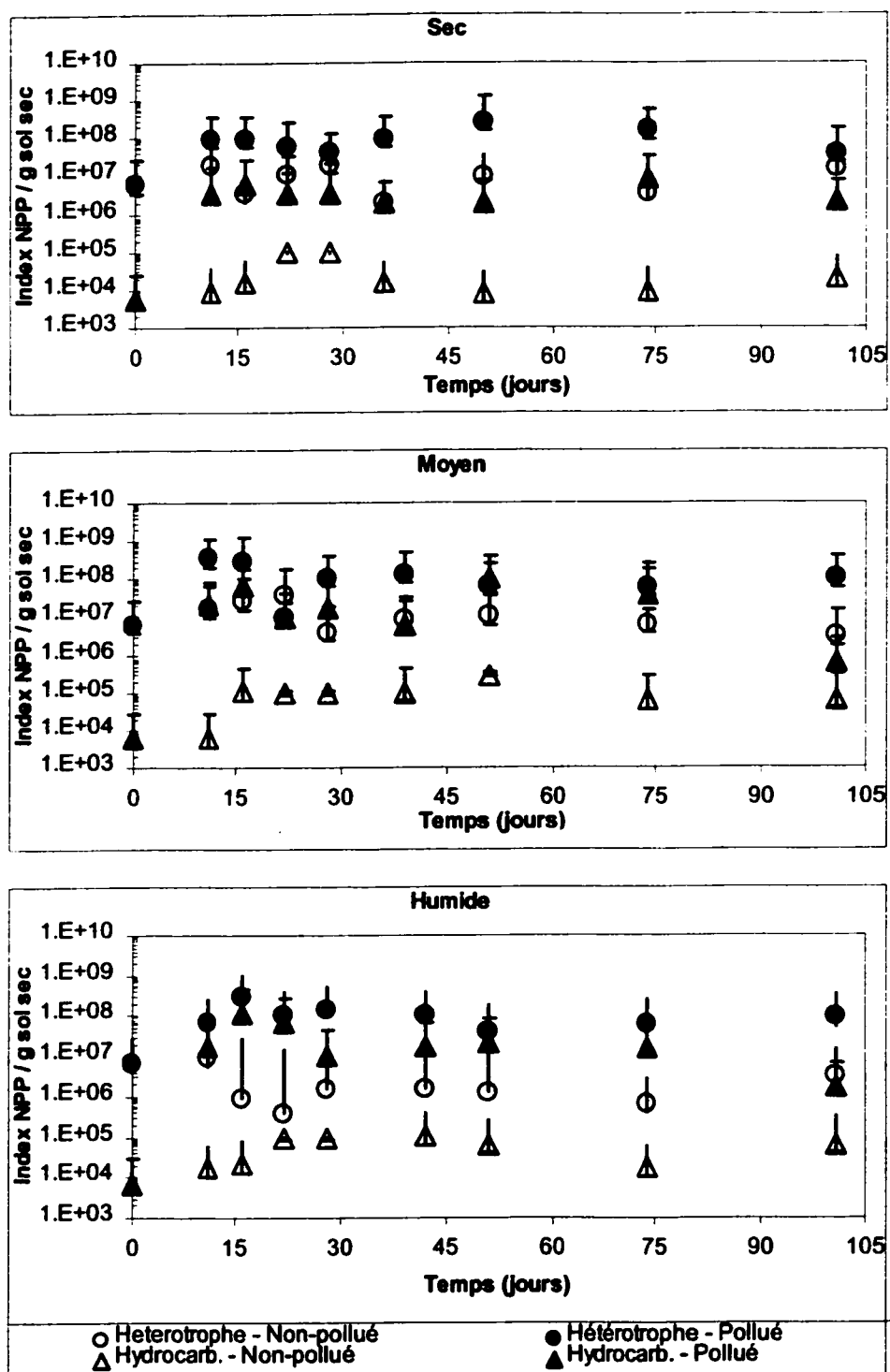


Figure 5-14 Évolution des index NPP dans les flacons biométriques.

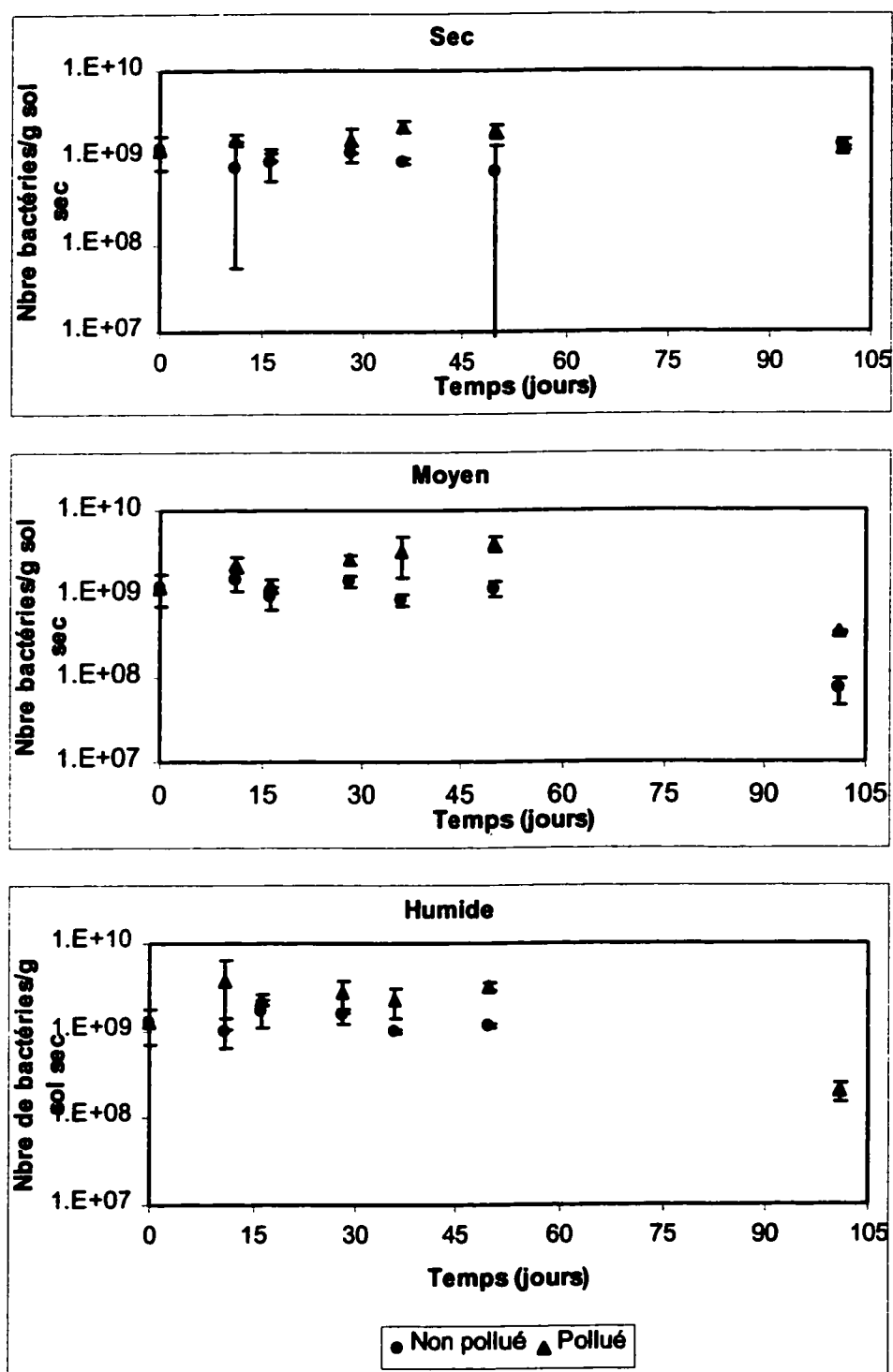


Figure 5-15 Évolution de la biomasse totale par microscopie à épifluorescence.

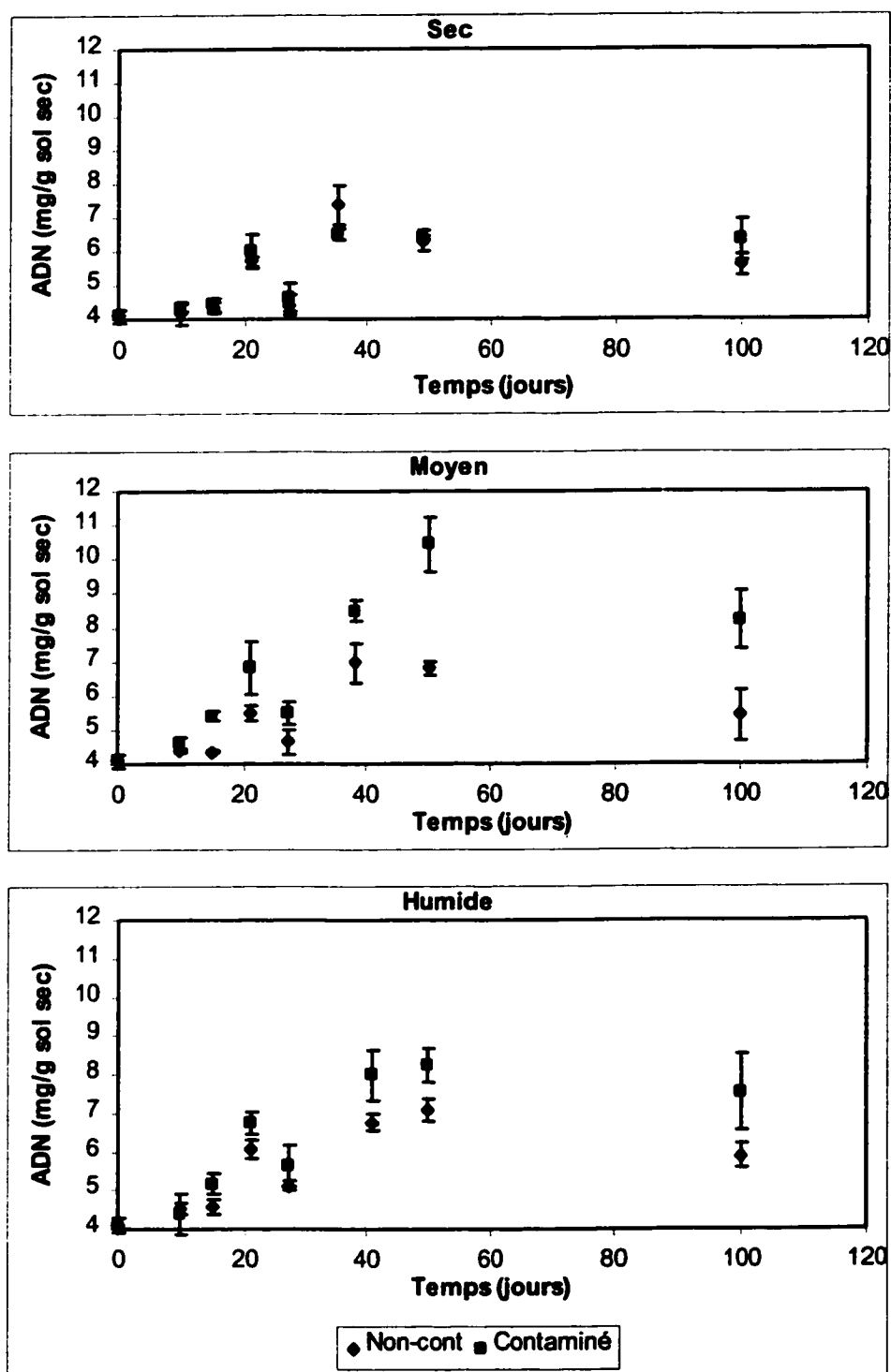


Figure 5-16 Évolution de l'ADN du sol.

La Figure 5-17 présente le rapport de minéralisation $^{14}\text{CO}_2/\text{CO}_2$ pour les trois humidités différentes. Très rapidement, après moins de 15 jours, le rapport de minéralisation atteint un plateau valant environ 88%, 82% et 77% pour les sols sec, moyen et humide respectivement. L'obtention d'un plateau après une brève période transitoire montre que la mesure de la production totale de CO_2 s'avère être une mesure indirecte fiable pour évaluer qualitativement la minéralisation de l'hexadécane.

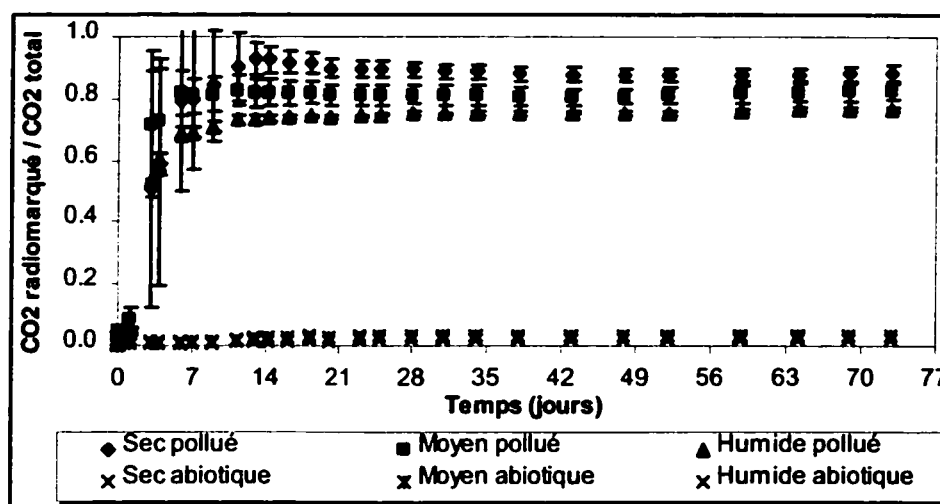


Figure 5-17 Rapport de minéralisation dans les flacons biométriques.

En revanche, il est difficile de quantifier *a priori* ce plateau et donc de quantifier la minéralisation de l'hexadécane à partir de la mesure de la minéralisation totale dans le sol.

Dans le but de contourner cette difficulté, la Figure 5-18 présente le rapport de minéralisation en soustrayant de la quantité totale de CO_2 produit, celle produite par le sol non-pollué, qui représente la respiration intrinsèque du sol. Les valeurs du rapport deviennent 93%, 88% et 84% pour les sols sec, moyen et humide respectivement. Les valeurs des rapports ont donc augmenté mais n'ont pas atteint 100%, ce qui met en évidence qu'une population hétérotrophe mais non-hydrocarbonoclaste s'est développée. Ce pourrait être, par exemple, une population de prédateurs d'hydrocarbonoclastes. Une étude complémentaire doit être réalisée afin de généraliser la détermination de la minéralisation du polluant à partir de la minéralisation totale.

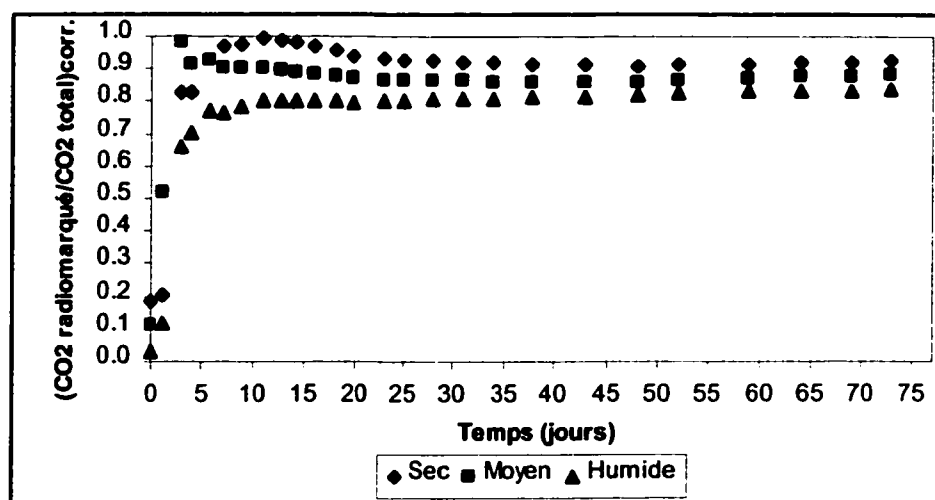


Figure 5-18 Rapport de minéralisation corrigé dans les flacons biométriques.

5.4.2.2 Modélisation

Le modèle développé de la biodégradation dans le sol (phase solide) est représenté par les équations 5-19 à 5-23. En supposant que les paramètres biocinétiques identifiés en phase liquide sont toujours valides, il ne reste qu'un paramètre à identifier à savoir la constante de biodisponibilité d'ordre n . Plusieurs ordres peuvent être envisagés dont les cinétiques d'ordre 0, 1 et 2. D'une part, la quantité initiale de micro-organismes dégradeurs a dû être ajustée. Sachant qu'il a été posé que 10 mL de solution aqueuse de biomasse extraite correspondait à 0,08 mg, des rapports de proportion permettent de déduire la masse de micro-organismes dégradeurs comprise dans le sol de chaque microcosme. En supposant un rendement d'extraction de la biomasse de 100%, la masse initiale de dégradeurs a donc été évaluée à 1,6 mg. D'autre part, la quantité initiale d'hexadécane en biocontact a été supposée nulle. La Figure 5-19 présente le résultat du calage paramétrique effectué sur les données de production de CO_2 radio-marqué pour le sol sec. La cinétique de biodisponibilité d'ordre 2 conduit clairement au meilleur résultat et est choisie pour les simulations des autres données de minéralisation.

La Figure 5-20 présente, pour le sol sec, les courbes réelles et simulées des évolutions de la minéralisation et de la biodégradation de l'hexadécane et la courbe simulée de l'évolution des micro-organismes dégradeurs. Le calage de la courbe de minéralisation a

conduit à une constante d'ordre 2 égale à $3,5688 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Un biais apparaît entre la courbe simulée de la consommation d'hexadécane et les données expérimentales. Après 73 jours de traitement, le modèle prédit une quantité de 32 mg d'hexadécane soit concentration de 1858 mg/kg sol sec, alors que la valeur du point expérimental s'élève à 59 mg d'hexadécane soit une concentration de 3429 mg/kg avec un écart type de seulement 85 mg/kg. L'erreur relative sur le niveau de contamination s'élève à 46% mais l'erreur relative sur la quantité d'hexadécane consommé n'est que de 23%. La courbe de simulation de l'évolution des micro-organismes dégradeurs présente un maximum au bout de 15 jours comme le montraient également les courbes des index NPP sur les hydrocarbonoclastes et celles du dosage de l'ADN. Toutefois, alors que ces dernières ne présentaient un décès prononcé de la biomasse, la courbe de simulation prédit une cinétique rapide de décès ramenant la population à un niveau proche des conditions initiales. Cette observation peut être expliquée par le fait que, dans les microcosmes, les dégradeurs après avoir crû sur l'hexadécane ont été capables de se maintenir en se servant d'une autre source de carbone présente dans la matière organique, ce phénomène n'étant pas pris en compte par le modèle.

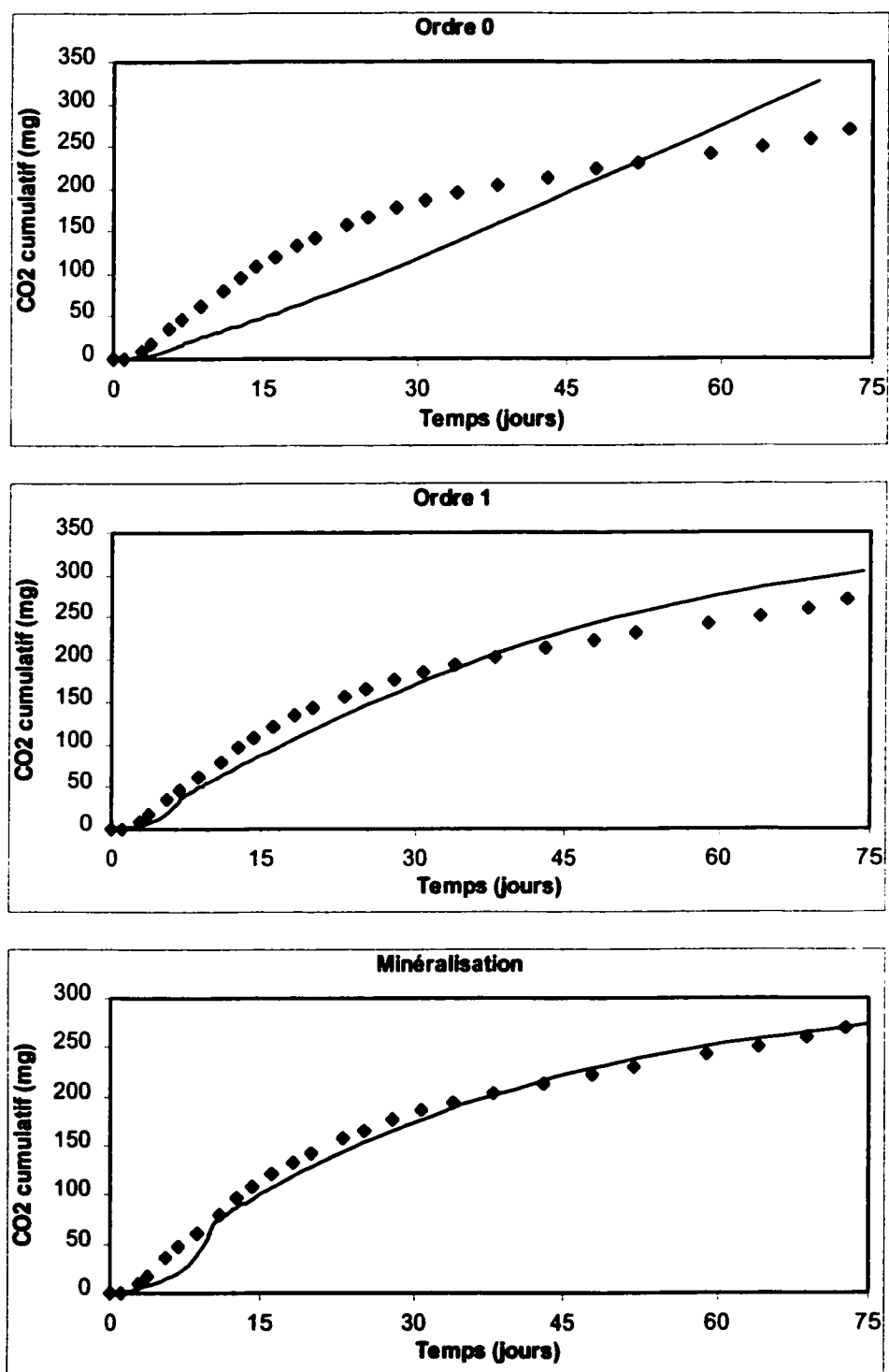


Figure 5-19 Identification paramétrique de la constante de biodisponibilité.

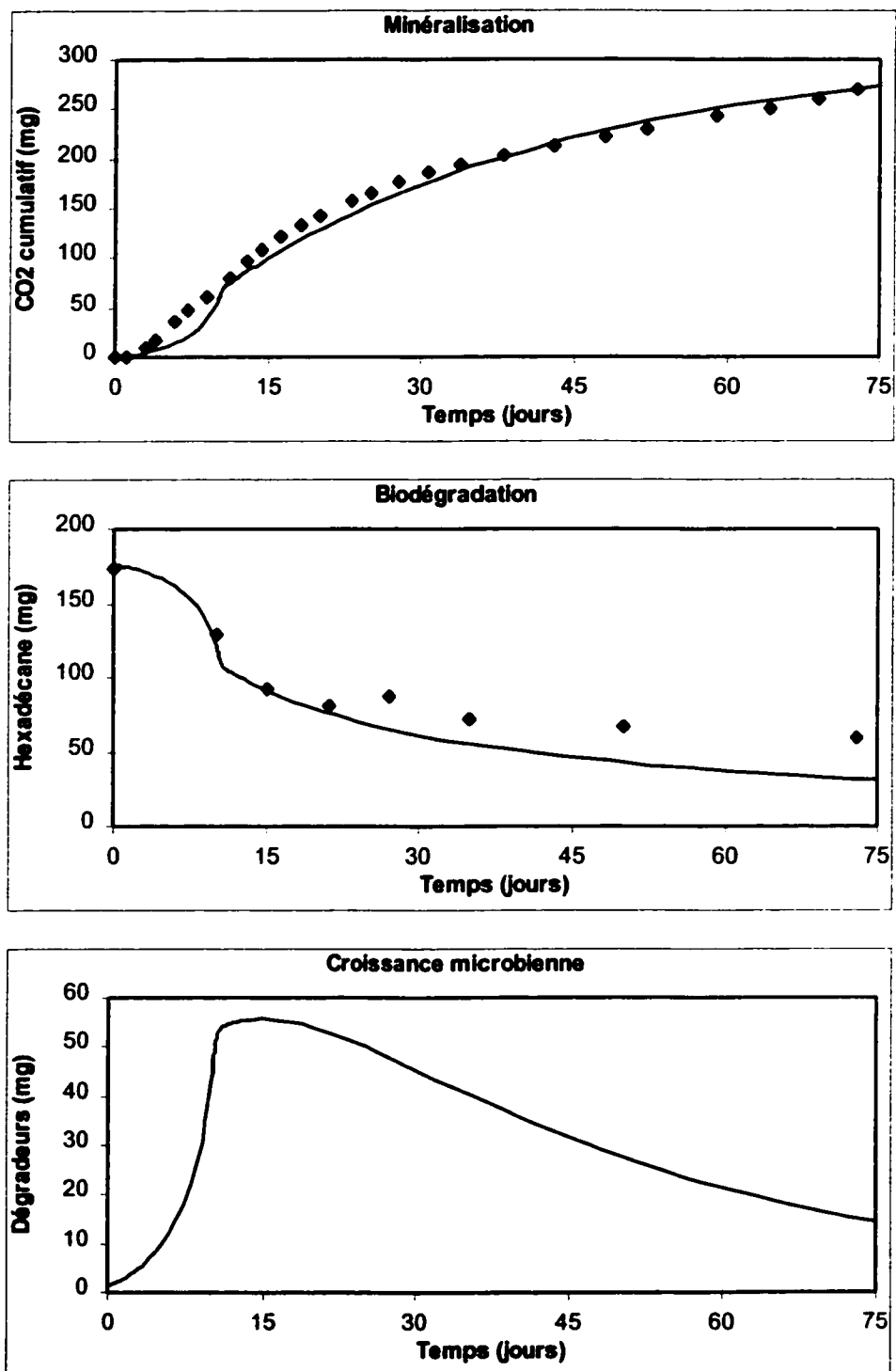


Figure 5-20 Simulation de la biodégradation dans le sol sec.

La Figure 5-21 présente, pour le sol moyennement humide, les courbes réelles et simulées des évolutions de la minéralisation et de la biodégradation de l'hexadécane et la courbe simulée de l'évolution des micro-organismes dégradeurs. Le calage de la courbe de minéralisation a conduit à une constante d'ordre 2 égale à $1,9142 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Le biais entre la prédiction de la biodégradation du polluant et les données expérimentales est beaucoup moins prononcé que pour le sol sec. L'erreur relative sur le niveau de contamination n'est que de 16% et celle sur la quantité biodégradée est de 9%. De plus, l'évolution de la biomasse concorde assez bien avec les données des index NPP pour les hydrocarbonoclastes, en prédisant un maximum de densité microbienne puis une cinétique de décès significative.

La Figure 5-22 présente, pour le sol humide, les courbes réelles et simulées des évolutions de la minéralisation et de la biodégradation de l'hexadécane et la courbe simulée de l'évolution des micro-organismes dégradeurs. Le calage de la courbe de minéralisation a conduit à une constante d'ordre 2 égale à $0,9317 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Malgré une bonne prédiction de la biodégradation de l'hexadécane dans les 50 premiers jours, un biais significatif apparaît au jour 73. L'erreur relative sur le niveau de pollution s'élève à 32% et celle sur la quantité biodégradée s'élève à 67%. Le biais final est difficilement interprétable étant donné le fait que la dernière analyse de l'hexadécane est supérieure à l'avant dernière et que l'écart type des deux dernières analyses étaient seulement de 3,1 et 0,7 mg d'hexadécane. La courbe de prédiction de l'évolution des micro-organismes dégradeurs concorde également avec les index NPP des hydrocarbonoclastes.

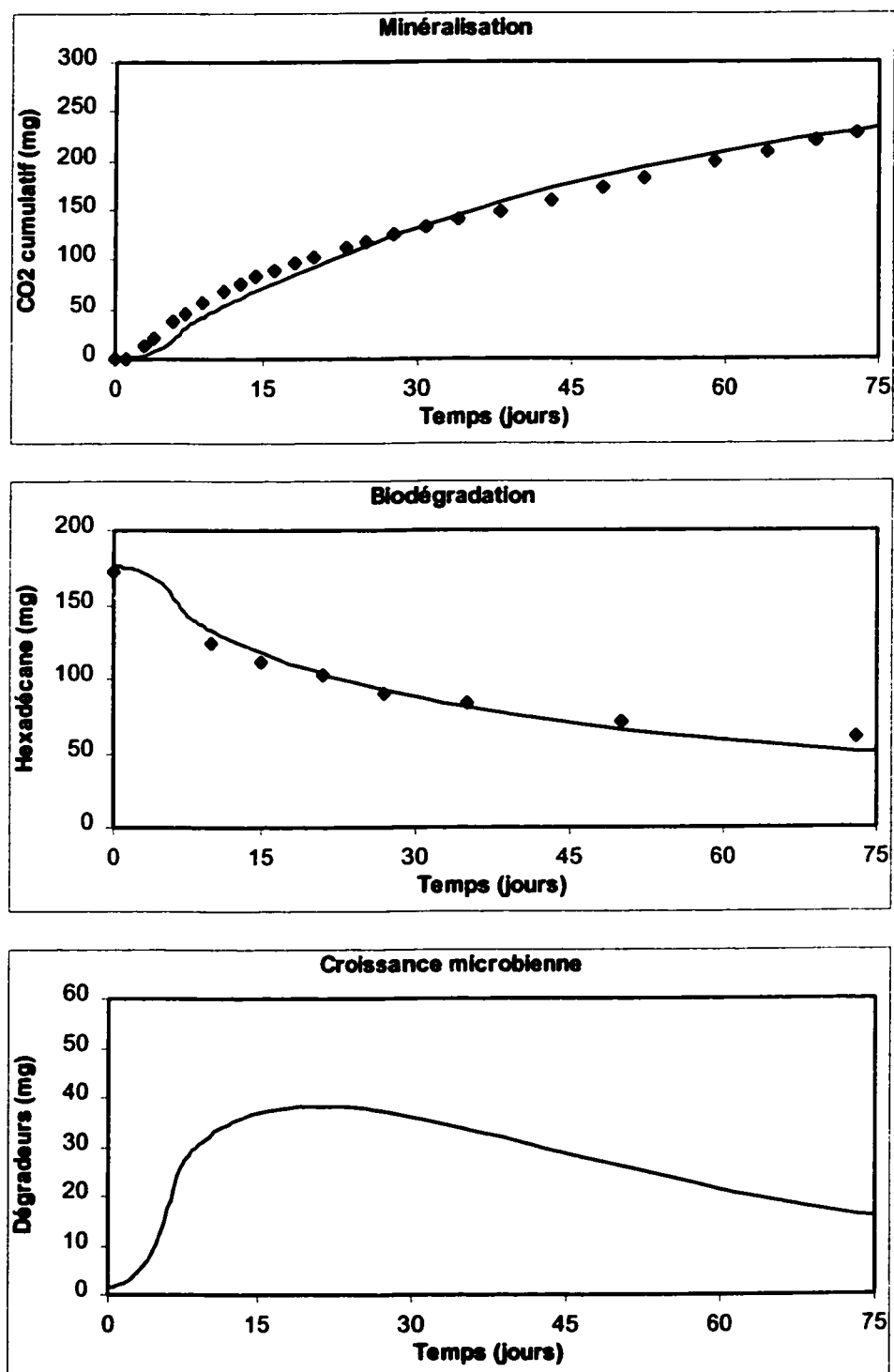


Figure 5-21 Simulation de la biodégradation dans le sol moyen.

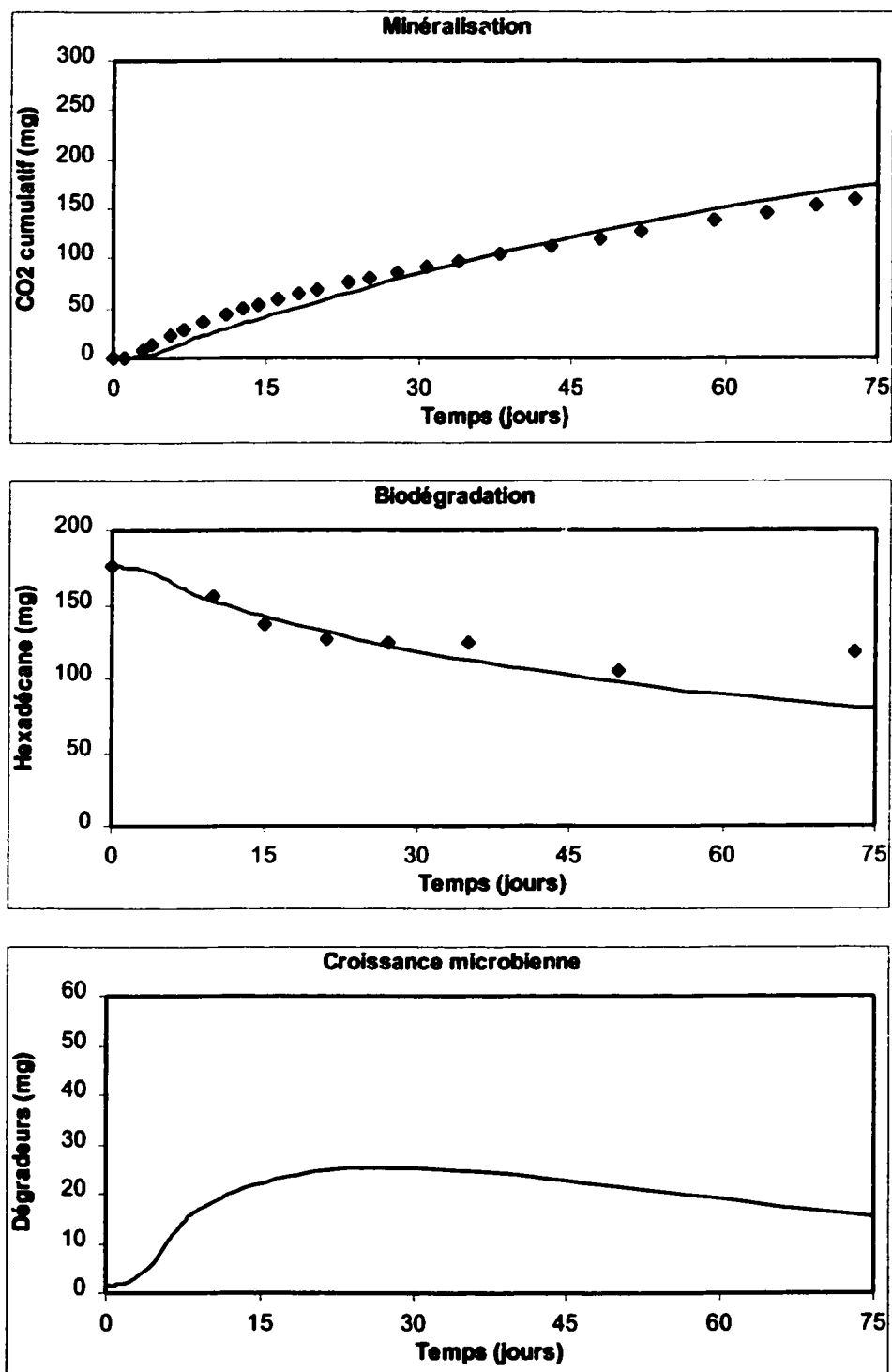


Figure 5-22 Simulation de la biodégradation dans le sol humide.

En conclusion, un modèle descriptif a pu être calibré à partir des tests de biodégradation en phase liquide et en phase solide. Les erreurs sur la quantité biodégradée au bout de 73 jours se sont élevées à 23%, 9% et 67% pour les sols sec, moyennement humide et humide respectivement, ce qui est très satisfaisant étant donné la simplicité du modèle et le nombre réduit de paramètres utilisés (8 paramètres).

Le modèle descriptif développé fait intervenir 6 paramètres liés spécifiquement à la croissance d'hydrocarbonoclastes sur l'hexadécane (2 coefficients de rendement, 3 constantes intervenant dans la relation de Haldane et 1 taux spécifique de décès) et 2 paramètres liés à l'accession des micro-organismes au polluant. Dans sa forme actuelle, ce modèle descriptif ne permet pas de prédire ou de suivre le niveau de pollution au cours d'un procédé de biodégradation. En revanche, puisque les paramètres liés spécifiquement à la cinétique de biodégradation de l'hexadécane par les micro-organismes du sol peuvent être déterminés à partir de tests en phase liquide, et puisque la production de dioxyde de carbone peut être évaluée en temps réel, une estimation en ligne de la cinétique de biocontact peut être envisagée, ce qui ferait du modèle un modèle adaptatif utilisable pour l'implantation de stratégies de contrôle.

5.4.3 Développement d'un capteur-logiciel de la biodégradation (domaine continu)

L'algorithme d'estimation/observation développé dans la section *Matériel et méthode* a tout d'abord été testé sur les données de simulation présentées dans la section précédente. Les paramètres liés aux gains, λ_p et λ_s , ont été fixés à -10 . Tous les estimateurs et observateurs ont été initialisés par les valeurs réelles de simulation. Les figures suivantes (Figure 5-23, Figure 5-24 et Figure 5-25) présentent la performance du capteur-logiciel pour les sols sec, moyennement humide et humide.

On remarque que, si aucun biais n'est introduit au niveau de l'initialisation des estimateurs et des observateurs, le capteur-logiciel permet de prédire de façon satisfaisante les données de simulation. Une légère oscillation est toutefois à noter en ce qui concerne l'estimation du taux de bio-accessibilité (Φ) pour les 15 premiers jours. On

remarque que plus le sol est sec, plus les oscillations sont importantes. Ce résultat est corroboré par l'estimation du taux spécifique de croissance, qui est plus juste lorsque l'humidité est grande. Ce comportement peut être expliqué par l'erreur d'évaluation de la quantité de polluant en biocontact. En effet, la non-univocité de la relation entre le taux spécifique de croissance et la quantité de polluant en biocontact nous a contraint à choisir systématiquement la plus petite valeur de la quantité de polluant. Ce choix a été motivé par le fait que, dans un sol, le polluant est peu biodisponible et que la cinétique de biocontact est limitante. Ainsi, entre les jours 2 et 6 pour le sol moyennement humide et entre les jours 2 et 11 pour le sol sec, la quantité d'hexadécane en biocontact a été sous-estimée. Cette erreur est à la source des oscillations de l'estimateur du taux de bio-accessibilité.

Des simulations ont été réalisées en introduisant volontairement un biais dans l'initialisation des paramètres estimés et des variables d'état observées. Les résultats observés sont les suivants :

- les biais sur l'initialisation de $\hat{\mu}_c$, $\hat{S}$ et $\hat{\Phi}$ introduisent un léger biais sur l'observation du polluant et augmentent les oscillations sur l'estimation de Φ ;
- un biais sur l'initialisation de $\hat{S}_{nb}$ conduit un décalage de courbe constant correspondant à l'erreur d'initialisation;
- enfin, tandis qu'une sous-estimation initiale de $\hat{X}$ conduit à un léger biais sur l'observation du polluant, une sur-estimation entraîne une divergence complète des estimateurs et des observateurs.

En conclusion, le capteur-logiciel développé à partir de la mesure du CO_2 permet en théorie de suivre la pollution dans un sol non-saturé.

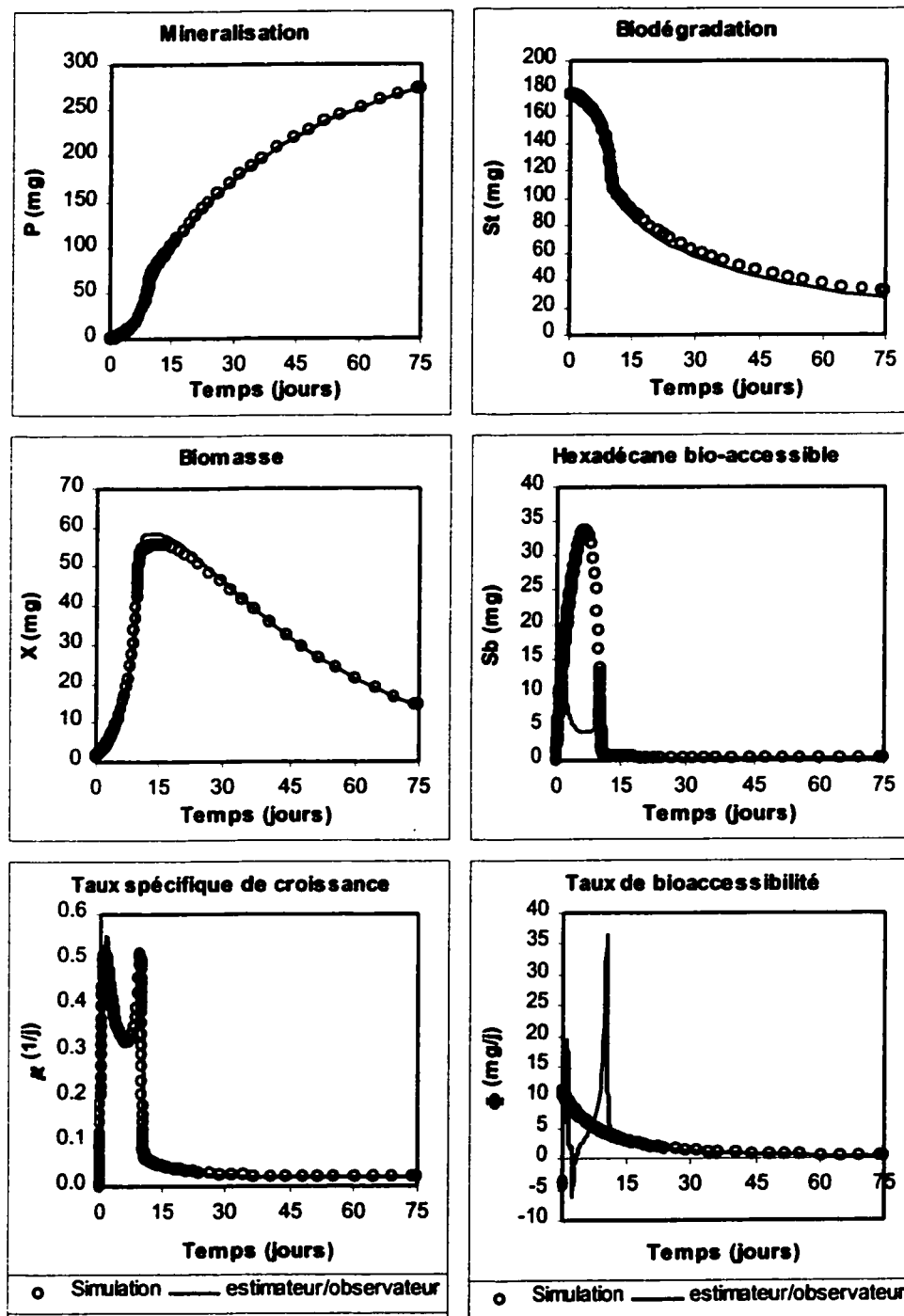


Figure 5-23 Performance du capteur-logiciel pour le sol sec (données de simulation, domaine continu).

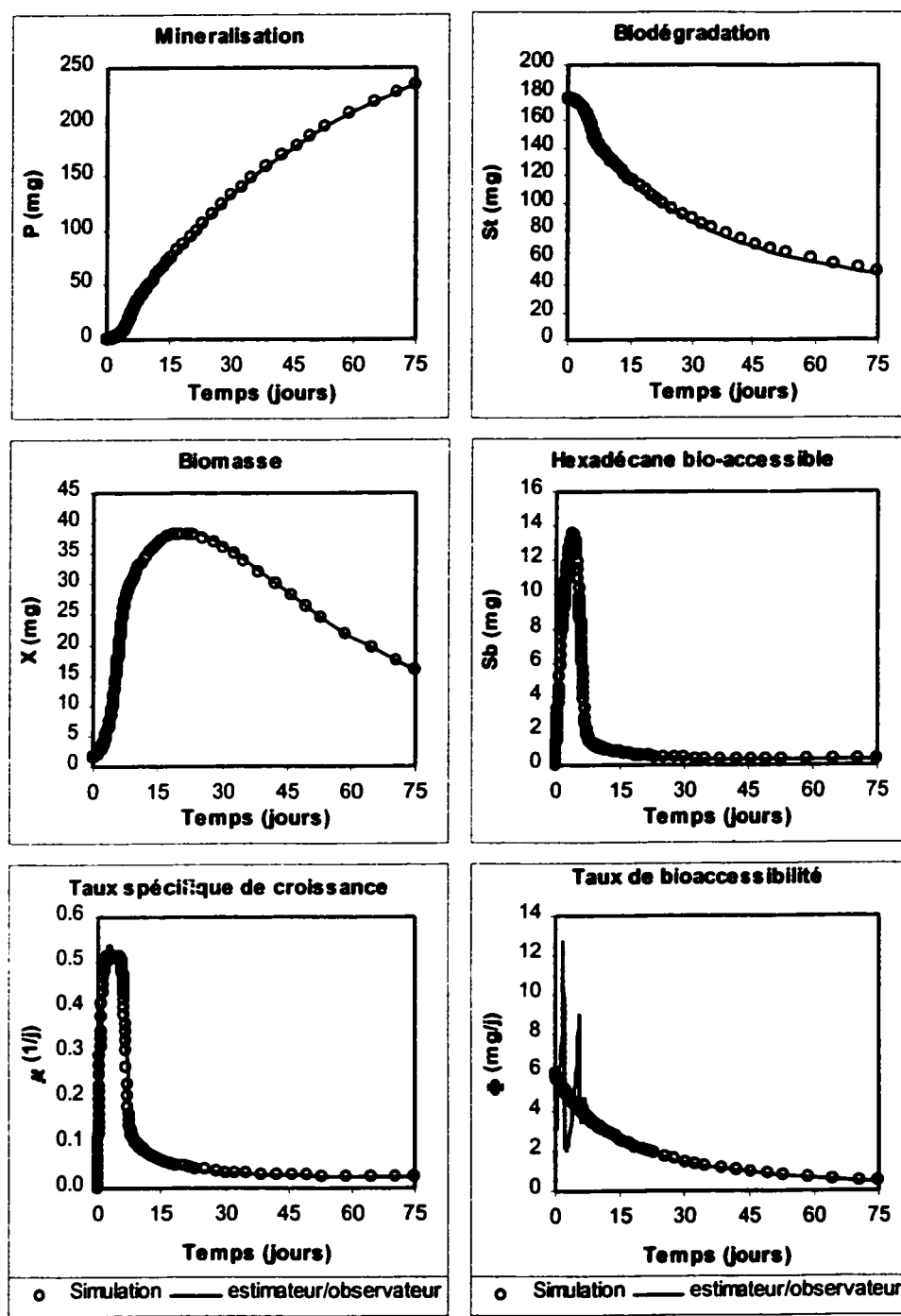


Figure 5-24 Performance du capteur-logiciel pour le sol moyennement humide (données de simulation, domaine continu).

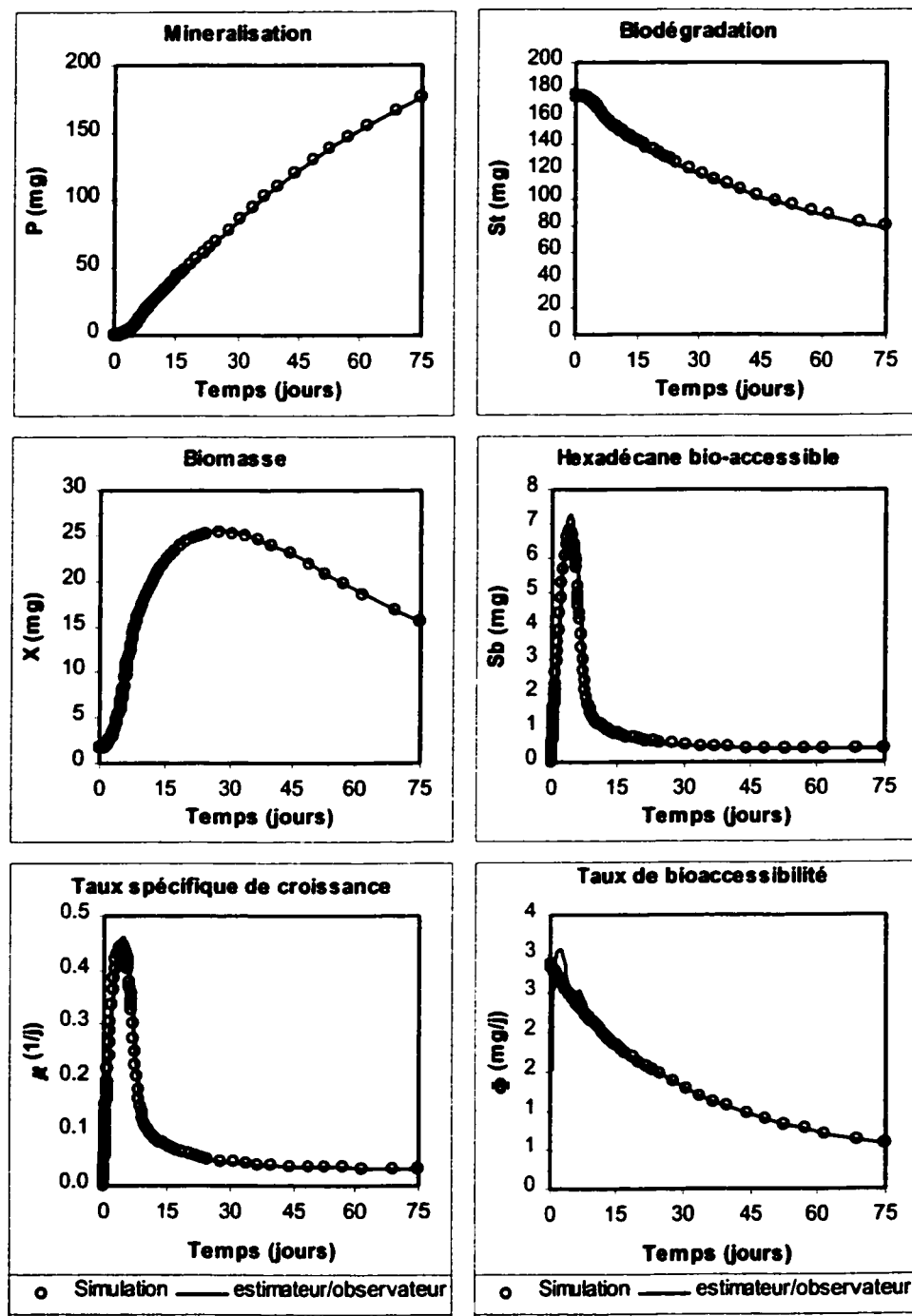


Figure 5-25 Performance du capteur-logiciel pour le sol humide (données de simulation, domaine continu).

5.4.4 Validation du capteur-logiciel (domaine discrétisé)

Le capteur-logiciel développé sur le modèle doit maintenant être validé en vérifiant son efficacité dans le domaine discrétisé.

Les estimateurs/observateurs n'ont pu être réglés sur les données expérimentales. Ceci s'explique par le fait que l'équation sur la biomasse n'est pas intervenue dans le réglage des gains des estimateurs/observateurs, bien que sa stabilité dans le domaine discrétisé influence celle du système complet. En conséquence, la période d'échantillonnage joue un rôle important dans la convergence des estimateurs/observateurs. Afin de confirmer cette explication, le capteur-logiciel, toujours dans le domaine discrétisé, a été testé sur des données établies par le modèle. Plusieurs séries de données ont été construites correspondant à différentes périodes d'échantillonnage.

Les résultats ont montré qu'une période d'échantillonnage supérieure à environ 12 heures ne permet pas la convergence des estimateurs/observateurs. En dessous de 12 heures, la convergence devient possible et il a été observé logiquement que plus la période d'échantillonnage est petite, plus la convergence est rapide. Ces résultats confirment que, lors des tests en phase solide, la période d'échantillonnage, qui variait de 24 heures à plus de 4 jours, n'était pas assez courte pour permettre la convergence du capteur-logiciel. Les figures suivantes (Figure 5-26, Figure 5-27 et Figure 5-28) présentent la performance du capteur-logiciel pour les trois humidités de sol. La période d'échantillonnage a été fixée à 2 heures et les valeurs propres de la matrice d'erreur ont été fixées à 0,85, valeur approximative la plus proche de 1 conduisant aux meilleurs observations. Les valeurs initiales de la biomasse estimée et de la quantité de polluant bio-accessible estimée sont égales aux valeurs correspondantes des données de simulation ($\hat{X}(t=0) = 1,6 \text{ mg}$ et $\hat{S}(t=0) = 0 \text{ mg}$) tandis que le taux initial de bio-accessibilité estimé a été posé à zéro, puisque sa valeur est *a priori* inconnue.

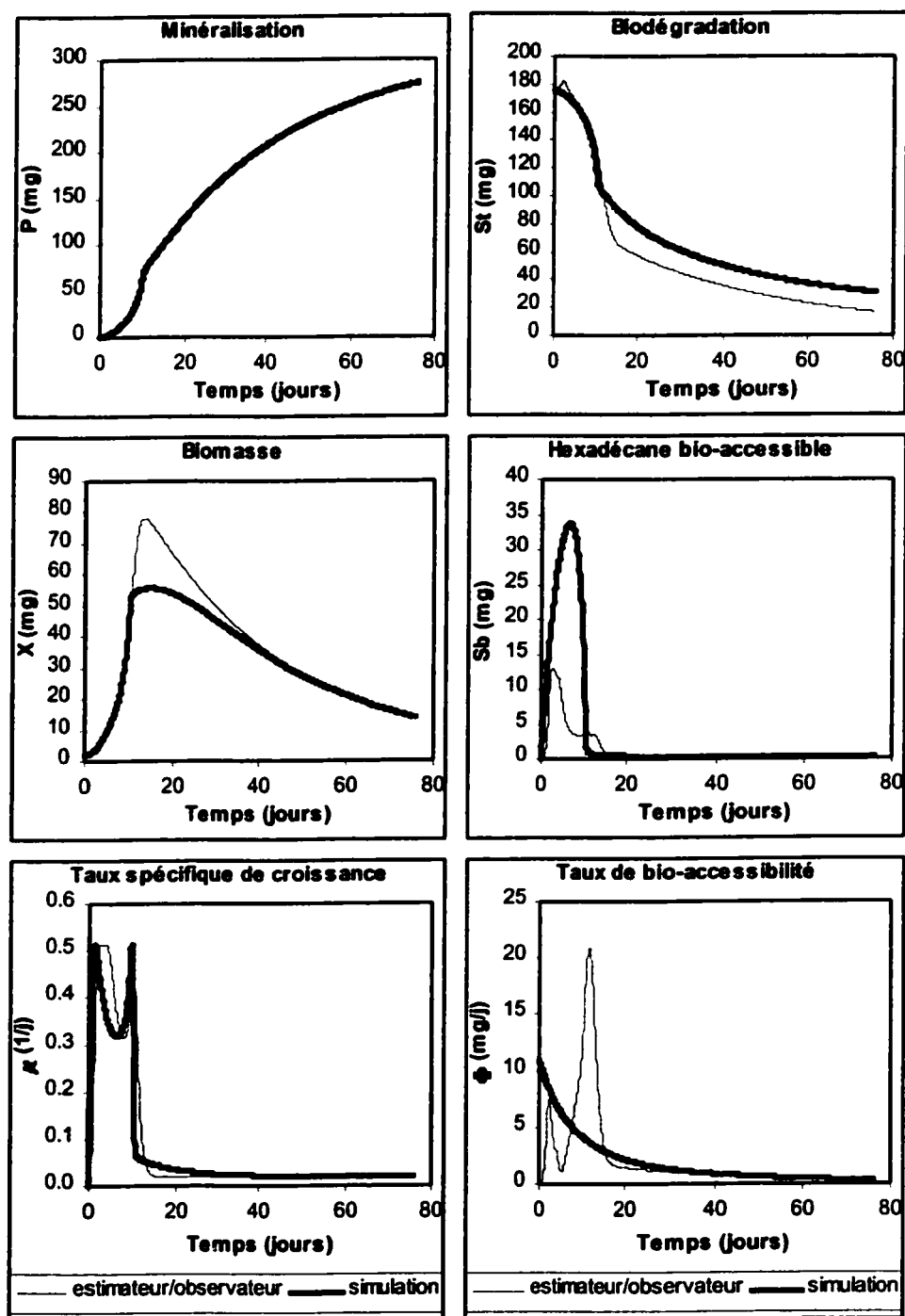


Figure 5-26 Performance du capteur-logiciel pour le sol sec (données de simulation, domaine discret).

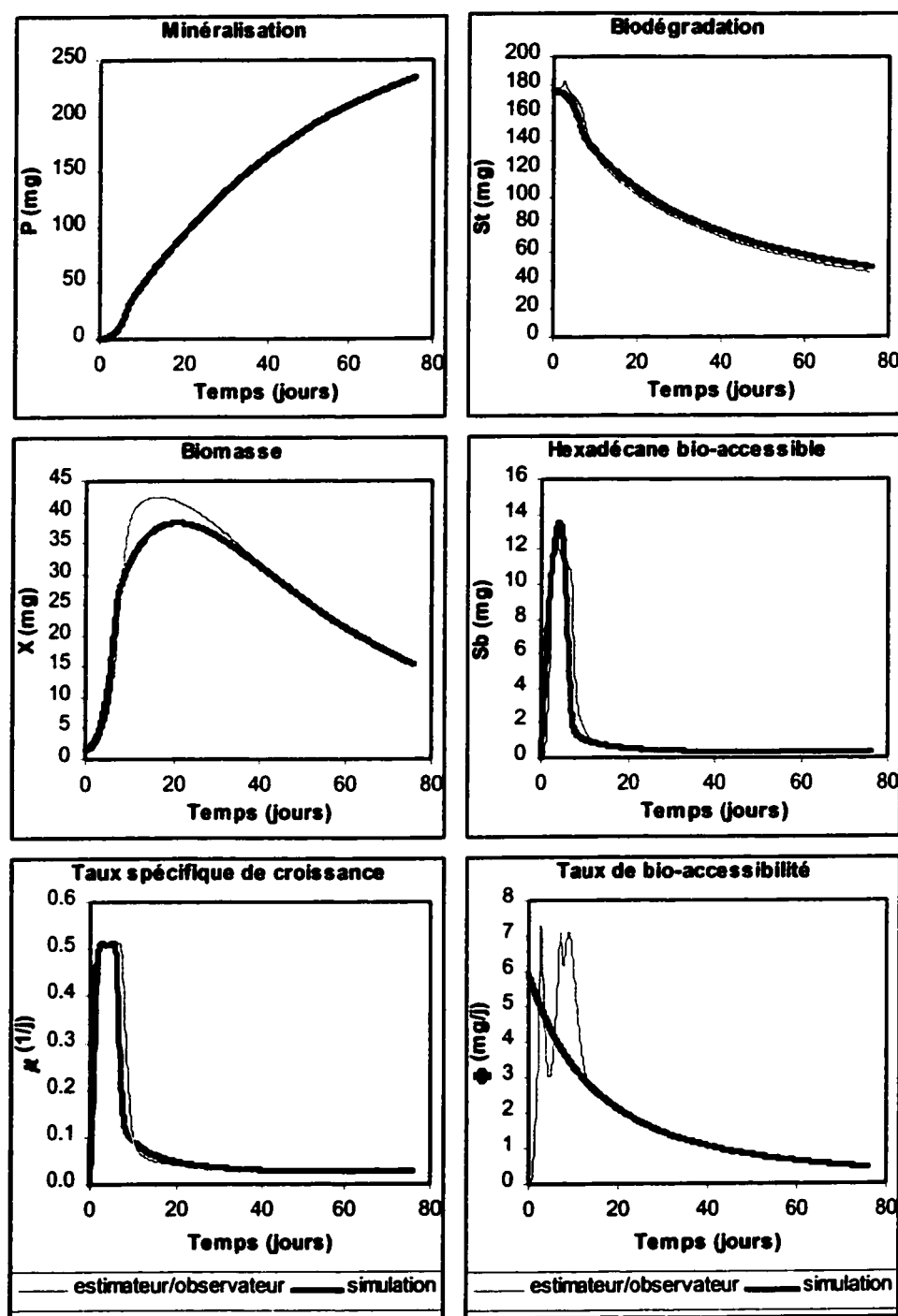


Figure 5-27 Performance du capteur-logiciel pour le sol moyennement humide (données de simulation, système discret).

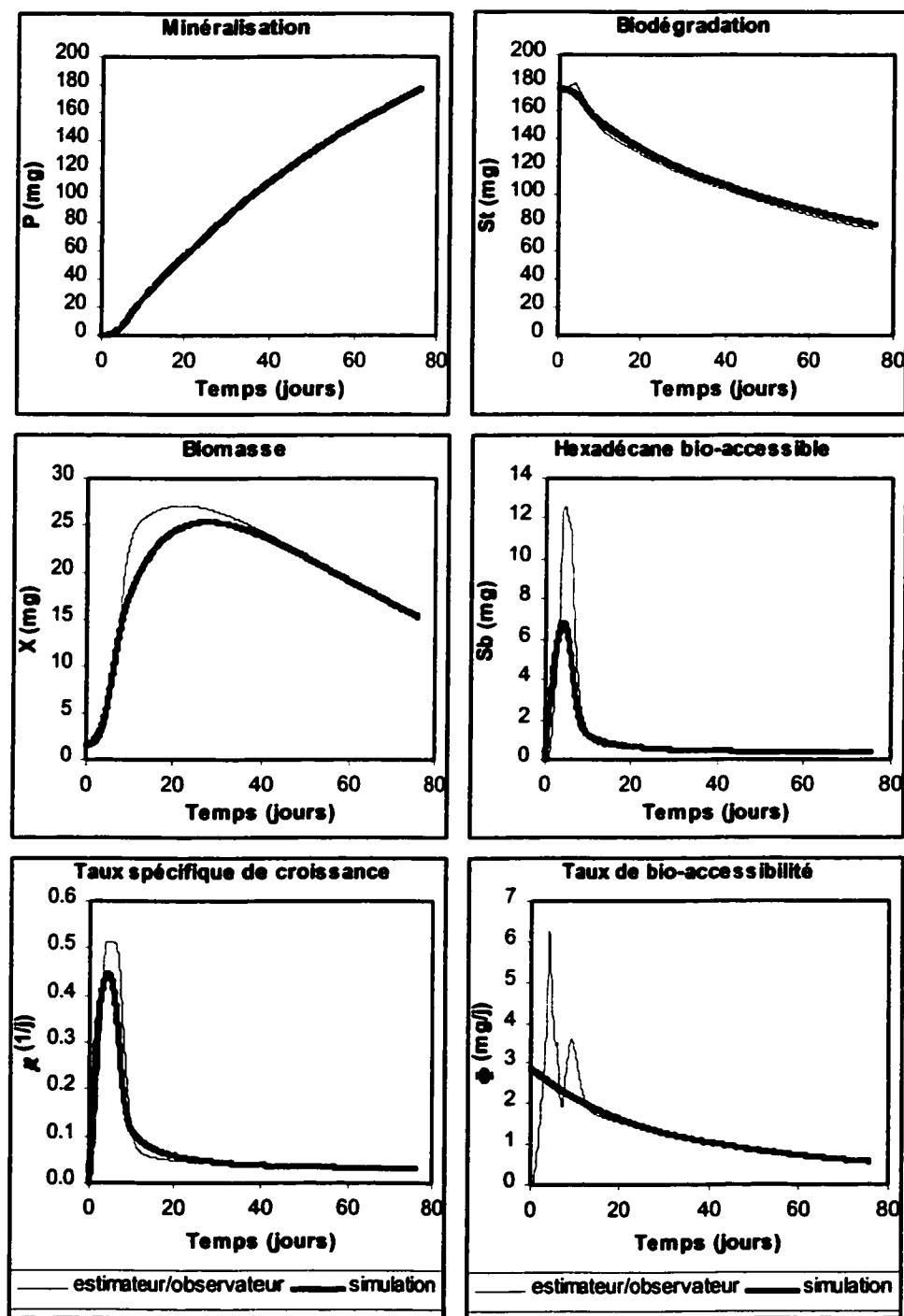


Figure 5-28 Performance du capteur-logiciel pour le sol humide (données de simulation, domaine discret).

Les résultats montrent que le capteur-logiciel permet globalement une bonne approximation du niveau de pollution pour les trois humidités. Toutefois, la performance est sensiblement meilleure pour les sols moyennement humide et humide que pour le sol sec. Le moins bon comportement du capteur-logiciel pour le sol sec s'explique par la valeur bornée de l'estimé de la quantité de polluant bio-accessible, à savoir 12 mg. Or, la quantité de polluant bio-accessible atteint 35 mg pour le sol sec alors qu'elle n'atteint que 14 mg pour le sol moyennement humide et à peine 7 mg pour le sol humide. Cette sous-estimation de la quantité d'hexadécane bio-accessible conduit automatiquement à une sur-estimation du transfert de polluant et donc à une sous-estimation de la quantité totale de polluant restant. Ainsi, la contrainte imposée pour permettre l'évaluation de la quantité bio-accessible à partir du taux spécifique de croissance conduit systématiquement à une sous-estimation de la quantité de polluant restant. Cette sous-estimation sera d'autant plus faible que la pollution sera âgée et que le sol sera humide. Une étude de sensibilité a été menée sur les valeurs initiales des paramètres estimés et variables d'état observées. Ainsi, une erreur de $\pm 50\%$ sur l'estimation initiale de la biomasse n'a pas d'effet significatif sur l'observation du polluant. Une erreur sur l'estimation de la quantité initiale bio-accessible tend à accentuer la sous-estimation du niveau de pollution observé. Il en résulte que, dans toutes les situations, il est préférable de sous-estimer la quantité initiale bio-accessible, en la posant nulle par exemple. Enfin, une erreur de $\pm 50\%$ sur l'estimation initiale du taux de bio-accessibilité n'a pas d'effet significatif sur l'observation du polluant. Plus encore, dans les simulations réalisées, son initialisation à une valeur nulle n'affecte pas significativement la performance du capteur-logiciel.

5.5 Discussion

L'étude biocinétique a été réalisée en trois phases : l'étude en phase liquide, l'étude en phase solide et le développement d'un capteur-logiciel.

L'expérience en phase liquide a été menée à l'aide d'un nouveau protocole, applicable à des polluants peu solubles, permettant le suivi précis et simultané de la minéralisation, de la biodégradation et de l'évolution des dégradeurs à partir de la biomasse extraite

d'un sol. Ce protocole a été validé à partir de deux séries de tests correspondant à deux niveaux de pollution différents. L'utilisation d'un polluant radio-marqué a permis de suivre la minéralisation et la biodégradation du polluant de même que l'évolution des micro-organismes dégradeurs. Cette étude expérimentale a permis de calibrer avec succès un modèle spécifique de biodégradation de l'hexadécane par la biomasse d'un sol. Les valeurs des paramètres identifiés (coefficients de rendement, constantes de la cinétique de Haldane et taux spécifique de mortalité) sont difficilement comparables avec la littérature pour trois raisons. Tout d'abord, les modèles de la littérature n'utilisent pas la cinétique de Haldane, mais plutôt soit une cinétique réactionnelle d'ordre 1 ou une cinétique de Monod (Sekelsky et Shreve, 1999). De plus, la plupart des modèles décrivent la biodégradation à partir d'une phase non-dissoute par une cinétique réactionnelle d'ordre 1; une seule parmi les études citées a utilisé une cinétique de Monod (Fu et al., 1996). Toutefois, le modèle a prédit un coefficient de rendement de CO_2 par rapport à l'hexadécane égal à $0,29 \text{ mg CO}_2\text{-C.mg hexadécane-C}^{-1}$, ce qui est en accord avec les valeurs rapportées par Graham et al. qui s'échelonnent entre 0,18 et 0,52 $\text{mg CO}_2\text{-C.mg hexadécane-C}^{-1}$ (Graham et al., 1999). Enfin, à notre connaissance, aucun protocole n'a encore été développé pour suivre simultanément la production de CO_2 , la consommation d'un polluant hydrophobe et l'évolution des dégradeurs.

L'expérience en phase solide a reposé sur un protocole permettant de suivre simultanément la minéralisation totale et celle du polluant, la biodégradation et l'évolution des micro-organismes hétérotrophes et hydrocarbonoclastes. L'élaboration du protocole a conduit au développement d'une nouvelle méthode d'estimation de la population microbienne par dosage quantitatif de l'ADN du sol. Cette technique, en cours de validation, présente un intérêt majeur pour le suivi des microcosmes en phase solide. En effet, en plus de conduire à de faibles écarts types, l'évaluation de la biomasse d'un sol par dosage de l'ADN total nécessite de petites quantités de sol (200 mg) et fournit des résultats très rapidement (environ 4 heures). Des études complémentaires doivent cependant être menées pour évaluer les corrélations entre la quantité d'ADN dosé et le nombre de micro-organismes présents dans le sol, hétérotrophes ou totaux. Le

suivi de la biomasse par la méthode du nombre le plus probable demeure pour l'instant la méthode la plus efficace pour le suivi des tests de biodégradation étant donnée sa faculté à différencier les hétérotrophes des hydrocarbonoclastes.

Le suivi de la production de CO_2 due à la minéralisation de l'hexadécane et celle due à la minéralisation globale a permis de mettre en évidence que, après une brève période transitoire, le rapport en les deux productions demeure constant. Il en résulte que la mesure du CO_2 total est une mesure adéquate pour le suivi de la minéralisation du polluant.

Les données expérimentales obtenues en phase solide ont conduit au calibrage du modèle complet de biodégradation dans un sol non-saturé. Les modèles phénoménologiques complexes conduisant à des problèmes d'identifiabilité, un modèle réduit a pu être calibré en fusionnant l'effet du transfert d'oxygène et de polluant au sein d'une même cinétique d'ordre n . Parmi les ordres 0, 1 et 2, la cinétique de biocontact d'ordre 2 a conduit à la meilleure description des données expérimentales. Ici encore, la comparaison avec la littérature est difficile puisque les modèles qui y sont développés intègrent une modélisation beaucoup plus complexe du transfert de polluant : équilibre de sorption, diffusion intra-particulaire, cinétique de dissolution et cinétique de désorption. Toutefois, il est possible de comparer la structure du modèle développé dans la présente étude avec celle des modèles de la littérature (voir Tableau 5-1). Le modèle développé possède les caractéristiques suivantes :

- Polluant : Hexadécane;
- Configuration : Cuvée/non saturé;
- Modélisation de la biodégradation : Cinétique de Haldane avec mortalité;
- Modélisation du transfert de polluant : Cinétique d'ordre 2;
- Modélisation du transfert d'oxygène : Influence intégrée dans le transfert du polluant;
- Nombre de paramètres issus de la littérature : 0;
- Nombre de paramètres issus de tests préliminaires : 6
- Nombre de paramètres identifiés par régression : 2

Il en résulte que le modèle présenté dans cette étude fait intervenir moins de paramètres (6) que les modèles présentés dans le Tableau 5-1 (minimum de 6 paramètres). Bien que l'utilisation d'une cinétique globale de biocontact fournisse moins d'information sur les phénomènes mis en jeu que les modèles plus mécanistiques, le modèle développé ici est un modèle à deux compartiments qui présente l'avantage de découpler les phénomènes liés à la limitation microbiologique de la biodégradation (cinétique de biodégradation du polluant en biocontact) et ceux liés à la biodisponibilité du polluant (cinétique de biocontact). L'utilisation généralisée de la méthodologie développée permettrait d'une part de générer des données sur la biodégradation des polluants hydrophobes par les micro-organismes du sol et ainsi d'envisager d'éliminer la nécessité de réaliser les tests en phase liquide. D'autre part, la cinétique de biocontact pourrait être explicitée et intégrer des phénomènes complexes de plus en plus décrits dans la littérature tels l'influence des agents tensioactifs et la production de composés extra-cellulaires favorisant la biodégradation (Guerin et Boyd, 1992; Armenante et al., 1994; Déziel et al., 1996; Mulder et al., 1998; Mulder et al., 1998; Sekelsky et Shreve, 1999; Bardi et al., 2000).

Malgré sa simplicité, le modèle développé dans cette étude est un modèle descriptif qui ne peut être utilisé pour le contrôle des procédés de biodégradation. En revanche, le découplage des phénomènes liés à la limitation microbiologique de la biodégradation et ceux liés à la biodisponibilité du polluant a permis d'envisager le développement de capteurs-logiciels rendant le modèle adaptatif. En effet, moyennant l'identification des paramètres liés à la croissance microbienne sur l'hexadécane à partir de tests en phase liquide, une seule cinétique, celle de biocontact, reste à estimer en temps réel.

À l'aide du modèle de croissance microbienne sur l'hexadécane calibré à partir des tests respirométriques en phase liquide d'une part, et de la mesure en ligne du CO_2 , d'autre part, un capteur-logiciel basé sur la structure d'estimateur/observateur a été développé afin de suivre en temps réel le niveau de pollution dans le sol. Peu sensible à l'initialisation des paramètres et variables d'état, l'algorithme est actuellement performant et robuste. Bien que la cinétique de Haldane ne conduise pas à une relation

univoque entre le taux spécifique de croissance et la quantité de polluant en biocontact, le capteur-logiciel est resté performant en choisissant automatiquement la plus petite quantité de polluant en biocontact correspondant à un taux spécifique de croissance donné. Ceci est dû au fait que la quantité de polluant en biocontact dans le sol des flacons biométriques est beaucoup plus faible que celle rencontrée dans les microcosmes en phase liquide.

Enfin, à notre connaissance, le capteur-logiciel développé constitue la première tentative dans l'observation en temps réel de la pollution dans un sol non-saturé.

5.6 Conclusion

D'une part, les résultats obtenus au cours de cette étude biocinétique ont révélé qu'un modèle simple à deux compartiments pouvait décrire de façon satisfaisante la biodégradation de l'hexadécane dans un sol non-saturé. De plus, la méthodologie développée ici est extensible à tout polluant hydrophobe tels les HAP ou autres hydrocarbures et le modèle, en particulier la cinétique de biocontact, peut être complexifié afin de prendre en compte des phénomènes spécifiques tels l'influence des agents tensioactifs et le rôle des composés extracellulaires lors de la biodégradation du polluant.

D'autre part, les capteurs-logiciels développés basés sur la structure d'estimateur/observateur ont constitué des outils efficaces pour le suivi de la biodégradation dans un sol non-saturé et ont permis de s'affranchir des problèmes d'identification paramétrique des modèles phénoménologiques complexes. L'application des capteurs-logiciels nécessite toutefois une étude préliminaire en phase liquide pour l'identification des paramètres liés à la biodégradation en tant que telle du polluant (constantes de la cinétique de Haldane, taux spécifique de décès et coefficients de rendement).

Enfin, l'observation de la pollution en temps réel ouvre maintenant la voie à l'implantation de stratégies de contrôle pour l'optimisation des procédés de biodégradation dans un sol non-saturé.

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

Le contrôle actif des procédés de biodégradation dans un sol non-saturé est un sujet très peu abordé dans la littérature, se limitant pour l'instant à une conception optimale des procédés (Wilson, 1995; Gerke et al., 1999). En revanche, des modèles phénoménologiques ont été développés aussi bien au niveau des écoulements multiphasiques (Bear, 1972; Hillel, 1980; Kovács, 1981; Fredlund et Rahardjo, 1993) qu'au niveau des phénomènes impliqués dans la biodégradation d'un polluant dans un sol (Li et al., 1995; Fu et al., 1996; Geerdink et al., 1996; Ramaswami et Luthy, 1997; Tabak et al., 1997; Zhao et al., 1999; Zhao et Voice, 2000; Park et al., 2001; Wick et al., 2001). Or le développement de ces modèles dynamiques constitue la pierre angulaire du contrôle robuste des bioprocédés visés. Le calibrage de tels modèles est souvent délicat ce qui en fait plus des outils descriptifs *a posteriori* que des outils prédictifs dont les algorithmes de contrôle ont besoin. À défaut de modèles prédictifs, la théorie des systèmes adaptatifs permet de transformer les modèles descriptifs en modèles adaptatifs par le développement de capteurs-logiciels. Ceux-ci permettent d'estimer les paramètres inconnus et observer les états non-mesurés en utilisant la structure d'un modèle descriptif et des mesures en ligne de variables d'état (Bastin et Dochain, 1990). Le développement de modèles adaptatifs ouvre alors la voie à l'implantation de stratégies de contrôle avancé (Söderström et Stoica, 1989; Bastin et Dochain, 1990). Dans le but d'observer en temps réel le niveau de pollution dans un sol non-saturé au cours d'un procédé de traitement, des modèles phénoménologiques descriptifs propices au développement de capteurs-logiciels ont été développés pour les écoulements d'air et d'eau et pour la biodégradation d'un polluant hydrophobe dans un sol.

Dans un premier temps, une étude hydrodynamique, comprenant des tests de percolation en colonne, a d'abord été menée. D'une part, les variables d'état impliquées dans les phénomènes régissant les écoulements de l'air et de l'eau peuvent être mesurées en ligne : contenu en eau, pression d'air et pression d'eau. Toutefois, la mesure précise de

l'humidité demeure un défi technique encore de nos jours. En effet, la technique de réflectométrie dans le domaine du temps, la plus utilisée pour sa précision et sa souplesse d'utilisation, présente quelques inconvénients notamment pour certains types de sol et en présence de substances interférentes. D'autre part, les modèles basés sur la loi de Darcy ont décrit correctement les données d'infiltration d'eau sans aération obtenues expérimentalement à partir de tests en colonne mais les paramètres du modèle de van Genuchten-Mualem ont dû être ajustés. L'étude hydrodynamique a permis, d'une part, de mettre en évidence la grande sensibilité du modèle d'écoulement vis-à-vis de la courbe de rétention d'eau et, d'autre part, l'importance prédominante de la courbe de rétention d'eau correspondant aux contenus en eau élevés. Les problèmes d'identification *a priori* des modèles prédictifs de la conductivité hydraulique nous ont amenés à envisager le développement de capteurs-logiciels pour son estimation en temps réel.

D'une part, un estimateur, construit sur la structure d'estimateur/observateur, a été développé afin d'estimer en temps réel la conductivité hydraulique non-saturée lors d'une percolation sans aération en se servant de la mesure en ligne de la succion. Le capteur-logiciel a été testé sur des données de simulation puis sur les données expérimentales. Les résultats ont montré que le capteur-logiciel permet d'estimer correctement la conductivité hydraulique non-saturée en régime permanent. En revanche, en régime transitoire, son efficacité est réduite par la présence d'oscillations de grande amplitude. Ces oscillations ont été attribuées à forte non-linéarité des équations différentielles et aux grandes amplitudes parcourues par les paramètres du modèle. En particulier, la pente de la courbe de rétention d'eau peut prendre des valeurs proches de zéro pour des suctions importantes et des valeurs très grandes pour des suctions plus faibles. Une façon de réduire les oscillations est de placer un filtre sur l'estimateur et l'observateur. L'application d'un filtre du premier ordre a permis de réduire les oscillations mais la convergence de l'estimateur s'en est retrouvée grandement ralentie. L'estimateur de la conductivité hydraulique est également confronté aux difficultés liées au système à paramètres répartis. En effet, l'estimateur en

un point donné a besoin des mesures de succion en amont et en aval et de l'estimation de la conductivité hydraulique en amont de l'écoulement. Ainsi, les erreurs d'estimation peuvent se propager et l'espacement des capteurs constitue un paramètre critique. Les recherches doivent donc se poursuivre pour améliorer le capteur-logiciel. En particulier, il serait intéressant de se servir des informations fournies par les modèles prédictifs de la conductivité hydraulique.

D'autre part, bien que l'exercice pratique d'estimation n'ait été mené que sur la conductivité hydraulique sans aération, la mesure en ligne de la pression d'air assure la possibilité théorique de construire un capteur-logiciel de la conductivité hydraulique en présence d'aération. De plus, étant donnée la similarité structurelle des équations d'écoulement de l'air et de l'eau, l'estimateur de la conductivité à l'air, dont les équations ont été développées dans cette thèse devrait mener aux mêmes succès et difficultés.

Enfin, les estimateurs des conductivités constituent des outils intéressants pouvant être utilisés pour valider des modèles prédictifs nouveaux ou existants et envisager des stratégies de contrôle pour l'écoulement de l'eau en présence d'aération forcée. En particulier, dans le contexte des procédés de biodégradation, les séquences et le débit d'arrosage pourraient être contrôlés en fonction des contraintes imposées par les processus de biodégradation du polluant.

Dans un deuxième temps, une étude biocinétique, basée sur des tests de biodégradation en microcosmes, a ensuite été menée. Contrairement au phénomène hydrodynamique, peu de variables d'état caractérisant la biodégradation sont mesurables en ligne. En fait, seules les concentrations en oxygène et dioxyde de carbone, mesurables dans la phase gazeuse, sont des indicateurs indirects de la biodégradation. De plus, autant les mesures en ligne sont peu nombreuses autant le nombre de paramètres impliqués dans les modèles phénoménologiques est élevé (voir Tableau 5-1). On peut les classer en deux catégories : les paramètres liés à la cinétique de croissance ou de décès des micro-organismes et les paramètres liés aux phénomènes de transfert d'oxygène et de polluant. L'antagonisme entre le nombre de mesures en ligne et le nombre de paramètres à

identifier nous a contraint à développer un modèle descriptif en essayant de minimiser le nombre de paramètres impliqués.

La première étape, consistant en des tests de biodégradation en phase liquide à partir de la biomasse extraite du sol, a permis d'identifier les paramètres liés à la cinétique de croissance et de décès. Un nouveau protocole a été mis au point afin de suivre simultanément la consommation de l'hexadécane, sa minéralisation sous forme de CO_2 et l'évolution des dégradeurs d'hexadécane. Les modèles de biodégradation de polluants hydrophobes en phase liquide présentés dans la littérature intègrent une cinétique de dissolution et une cinétique de Monod ou de premier ordre pour la biodégradation du polluant dans la phase aqueuse (Fu et al., 1996; Ghoshal et al., 1996; Sekelsky et Shreve, 1999; Wick et al., 2001). Or plusieurs études ont mis en évidence la capacité des micro-organismes à accéder à une fraction de polluant non-solubilisée (Fu et al., 1996; Zhao et al., 1999; Zhao et Voice, 2000; Park et al., 2001). Donc, une cinétique de biodégradation a été identifiée prenant en compte la quantité de polluant en contact avec la phase aqueuse plutôt que la concentration de polluant en phase aqueuse. Cela revient à considérer la biodégradation de composés hydrophobes comme un phénomène principalement de surface. La meilleure description des données expérimentales a été obtenue en optant pour une cinétique de Haldane avec une cinétique de mortalité du premier ordre.

La deuxième étape, consistant en des tests de biodégradation en phase solide, a permis d'identifier une cinétique de biocontact intégrant les phénomènes de limitation de la biodégradation liés à la matrice de sol. Cette cinétique peut être traduite mathématiquement en une multitude d'expression. Afin de minimiser le nombre de paramètres mis en jeu, des cinétiques, de type réactionnelles, d'ordre 0, 1 et 2 ont été testées et l'ordre 2 a conduit à la meilleure description des données expérimentales.

Le modèle descriptif ainsi développé permet une description satisfaisante de la biodégradation dans un sol non-saturé. Bien que le modèle intègre de nombreux phénomènes au sein de sa cinétique de biocontact, il présente des avantages majeurs. D'une part, le modèle comprend un nombre peu élevé de paramètres comparativement

aux modèles de la littérature. D'autre part, le modèle permet de découpler les limitations dues à la croissance spécifique des micro-organismes sur le polluant et les limitations spécifiques à la matrice du sol. Ainsi, les paramètres de la cinétique de croissance microbienne peuvent être déterminés rapidement à partir de tests en phase liquide. De plus, dans la mesure où le protocole est utilisé de façon systématique, la génération de familles de paramètres peut conduire au développement de modèles prédictifs des cinétiques de croissance microbienne, ce qui réduirait la nécessité de réaliser les tests en phase liquide. Ces avantages ne sont pas rencontrés par les modèles phénoménologiques récents. En effet, ces modèles introduisent une cinétique de biodégradation à partir d'une fraction non-solubilisée du polluant et leur identification paramétrique doit donc être réalisée à l'aide de tests de biodégradation sur la matrice de sol (Fu et al., 1996; Zhao et al., 1999; Zhao et Voice, 2000; Park et al., 2001). Enfin, l'utilisation d'une cinétique globale pour tenir compte des limitations de la biodégradation par les caractéristiques spécifiques de la matrice de sol permet de réduire les paramètres à identifier à un taux variable dans le temps. Un capteur-logiciel a donc été développé afin d'estimer la cinétique de biocontact et d'observer en temps réel le niveau de pollution dans les microcosmes en phase solide. Le capteur-logiciel a été conçu pour estimer ou observer successivement le taux spécifique de croissance, la quantité de polluant en biocontact, la cinétique de biocontact et, enfin, la quantité de polluant non-dégradé. Le capteur-logiciel a démontré une bonne performance pour l'observation du polluant. Quelques précautions doivent toutefois être prises.

La première précaution concerne la période d'échantillonnage qui doit être suffisamment courte afin de garantir la convergence des estimateurs/observateurs dans leur forme actuelle. En effet, l'équation différentielle permettant d'estimer la biomasse est structurellement instable et la période d'échantillonnage doit donc être suffisamment petite pour assurer la convergence de sa résolution. Pour le sol considéré dans cette thèse, la période d'échantillonnage devait être inférieure à 6 heures. La période d'échantillonnage maximale assurant la convergence est liée à la dynamique de la croissance microbienne. Étant donné que les taux spécifiques de croissance sont du

même ordre de grandeur dans un sol, il est raisonnable de penser que la période d'échantillonnage maximale pour la convergence du capteur-logiciel devrait être proche de 6 heures pour tout type de sol. Dans le contexte d'un suivi en temps réel de la biodégradation, cette contrainte est mineure puisque les systèmes d'acquisition de données permettent d'obtenir les informations à de hautes fréquences. En revanche, l'air interstitiel doit au préalable être extrait du sol et acheminé à un analyseur de CO₂. Cette procédure introduit un délai correspondant à la durée d'acheminement de l'air à l'analyseur. Or le capteur-logiciel ne tient pas compte du délai de mesure. Toutefois, la durée du délai (quelques minutes) est très faible par rapport à la dynamique de biodégradation et ne devrait donc pas affecter la performance du capteur-logiciel.

La seconde précaution à prendre est de vérifier les hypothèses intrinsèques à l'utilisation de la cinétique de Haldane. En effet, la cinétique de Haldane n'impliquant pas une relation univoque entre le taux spécifique de croissance et la quantité de polluant en biocontact, il est nécessaire d'œuvrer dans un domaine où cette relation est univoque. En règle générale, la biodégradation du polluant est limitée par sa bio-accessibilité de sorte que la plus petite valeur de la quantité de polluant en biocontact peut être choisie.

Au terme de cette étude biocinétique, deux questions se posent. D'abord, la méthodologie ayant été développée pour une pollution fraîche par un seul composé, est-il possible de la généraliser à une pollution mixte et âgée? Ensuite, la cinétique de bio-accessibilité ne donnant pas d'information précise sur les phénomènes impliqués au niveau des transferts de matière, comment le modèle ainsi identifié peut-il servir au contrôle du bioprocédé?

La méthodologie peut être généralisée à des pollutions mixtes et âgées. Pour les tests en phase liquide, l'extraction de la biomasse du sol suit le protocole développé sans modification. En revanche, plusieurs molécules disponibles sous forme d'isotopes radioactifs et représentant la pollution mixte peuvent être utilisées dans des microcosmes distincts. Les paramètres des cinétiques de croissance et de décès peuvent être comparés. Si les cinétiques sont significativement différentes, alors le modèle doit tenir compte de plusieurs schémas réactionnels. Dans une telle situation, des études complémentaires

doivent être menées sur les métabolismes de dégradation, sur les populations de dégradeurs et sur les interactions entre les dégradeurs et les différents polluants. Le modèle cinétique microbien ainsi identifié peut être utilisé directement sur le site puisque le capteur-logiciel permet d'estimer en temps réel la cinétique de biocontact et ainsi de compléter le modèle de biodégradation dans un sol non-saturé.

Quant à la capacité du modèle réduit à permettre le contrôle du bioprocédé, la méthodologie développée a été conçue pour suivre la pollution. Il en résulte que, après l'identification de fonctions de transfert permettant de quantifier l'influence de l'humidité et du débit d'air sur le taux de biodégradation, des contrôleurs linéaires peuvent être conçus. En revanche, pour l'implantation de contrôleurs non-linéaires basés sur un modèle phénoménologique, il est nécessaire d'intégrer dans le modèle existant l'influence de l'humidité et de l'aération sur la biodégradation du polluant. Il est donc nécessaire de poursuivre les travaux afin d'introduire les influences sus-mentionnées dans le modèle développé dans cette étude. Cela peut se faire soit en explicitant la cinétique de biocontact (Φ), soit en modélisant les phénomènes de transfert d'oxygène et de polluant. Un modèle phénoménologique tenant compte de ces influences n'a pu être calibré à partir des tests en cuvette. En effet, les phénomènes de transfert d'oxygène et de polluant sont des phénomènes couplés qui dépendent de la structure du sol. Or la géométrie des microcosmes ne permet pas de simuler physiquement la structure *in situ* du sol. En conséquence, cette étude doit être réalisée à partir d'expériences en colonne permettant de simuler physiquement les conditions de terrain.

Afin d'analyser la faisabilité d'une telle étude, appelée étude biodynamique, un protocole expérimental a été conçu. Il s'agit d'un test de biodégradation en colonne intégrant les phénomènes hydrodynamiques et biocinétiques. À l'instar de la colonne de l'étude hydrodynamique, une colonne, constituée de 3 sections en *plexiglass* de 50 cm de hauteur et 15 cm de diamètre, a été construite (Figure 6-1). Au fond de la colonne, du sable a été déposé sur une hauteur de 10 cm. Le sol, préalablement pollué à l'hexadécane, a ensuite été placé kilogramme par kilogramme afin d'obtenir une densité en place la plus constante possible sur toute la hauteur de colonne de sol. Les systèmes

d'aération et d'irrigation sont identiques à ceux installés sur la colonne de l'étude hydrodynamique.

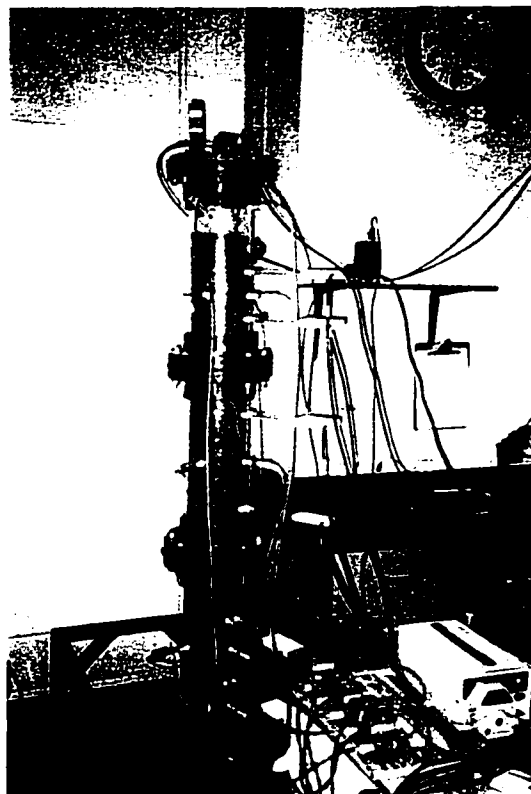
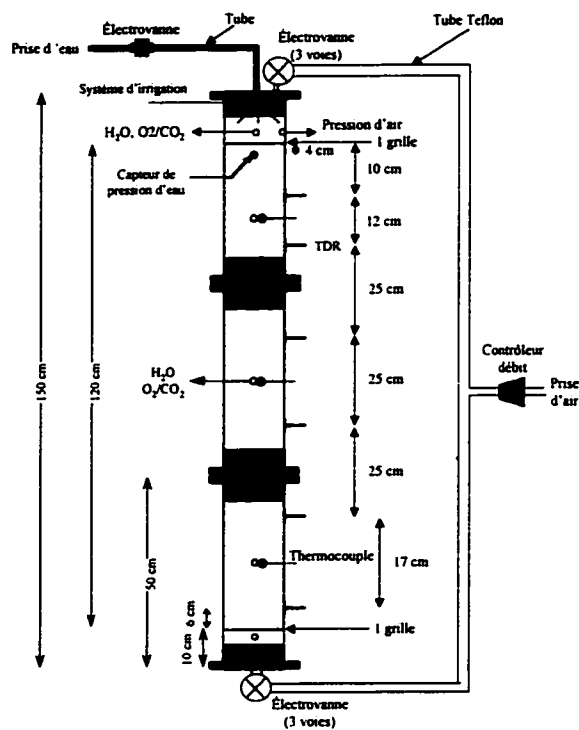


Figure 6-1 Colonne expérimentale pour les tests de biodégradation.

Deux capteurs de pression (PX243-2.5BG5V, Omega Engineering Inc., Stamford, CT, USA) ont été placés l'un en haut de colonne, l'autre en bas de colonne, au niveau de la couche de sable. Des sondes RDT (CS615, Campbell Scientific (Canada) Corp., Edmonton, Alberta, Canada) ont été placées à différentes profondeurs : 10 cm, 22 cm, 47 cm, 72 cm, 97 cm et 114 cm. Une céramique poreuse a été installée à une profondeur de 4 cm afin de permettre un contrôle de la succion en tête de colonne. Le système de contrôle choisi est un contrôleur de base régi par la commande suivante : si la succion mesurée est inférieure à la succion de consigne, alors effectuer un jet. La commande est évaluée toutes les minutes. Des sondes à température ont été installées à 16, 60 et 105 cm de la surface du sol. Un système de captage de gaz interstitiel a été installé de façon à pouvoir échantillonner l'air à différentes profondeurs dans la colonne : au-dessus de la

surface du sol, à 16 cm, à 60 cm, à 105 cm, et dans la couche de sable. Le système de captage de gaz est constitué d'un tube en acier inséré dans le sol dont une extrémité (celle en contact avec le sol) est munie d'un tube poreux en acier inoxydable. À l'autre extrémité, un tube en téflon permet d'acheminer le gaz à un analyseur O_2/CO_2 (Modèle 308BWP, Nova Analytical Systems Inc., Hamilton, Ontario, Canada) via un système d'électrovannes permettant un échantillonnage séquentiel. Une trappe à eau et un dessiccateur (Tube de Drierite, Fisher Scientific, Canada) sont placés en amont de l'analyseur afin de déshumidifier l'air (Figure 6-2).

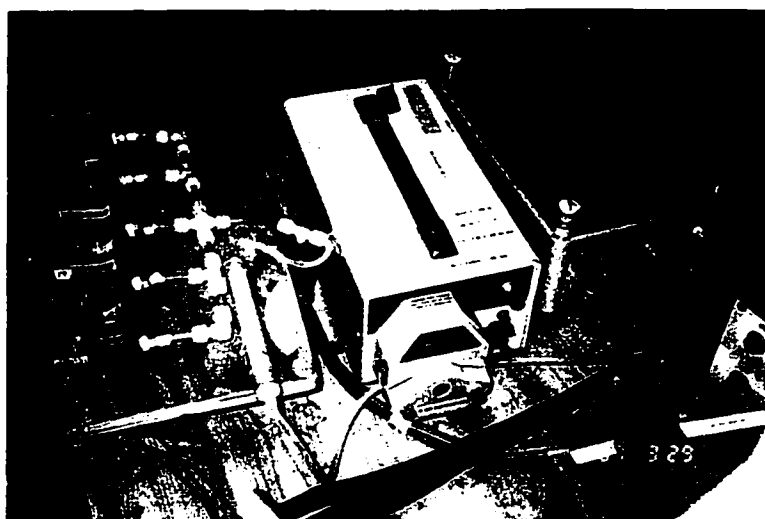


Figure 6-2 Système d'échantillonnage, de déshumidification et d'analyse du gaz interstitiel.

Le système d'acquisition de données est constitué d'une carte d'acquisition installée sur un ordinateur de bureau. Le logiciel LabView a été utilisé pour gérer le suivi et le contrôle des paramètres et pour leur visualisation sur l'écran (Figure 6-3). La période d'acquisition des données a été fixée à une minute pour toutes les mesures instantanées (P, T, ψ , débit) et pour les mesures d'oxygène et de dioxyde de carbone à la sortie de la colonne. L'échantillonnage de l'air interstitiel a en revanche été effectué toutes les 6 heures.

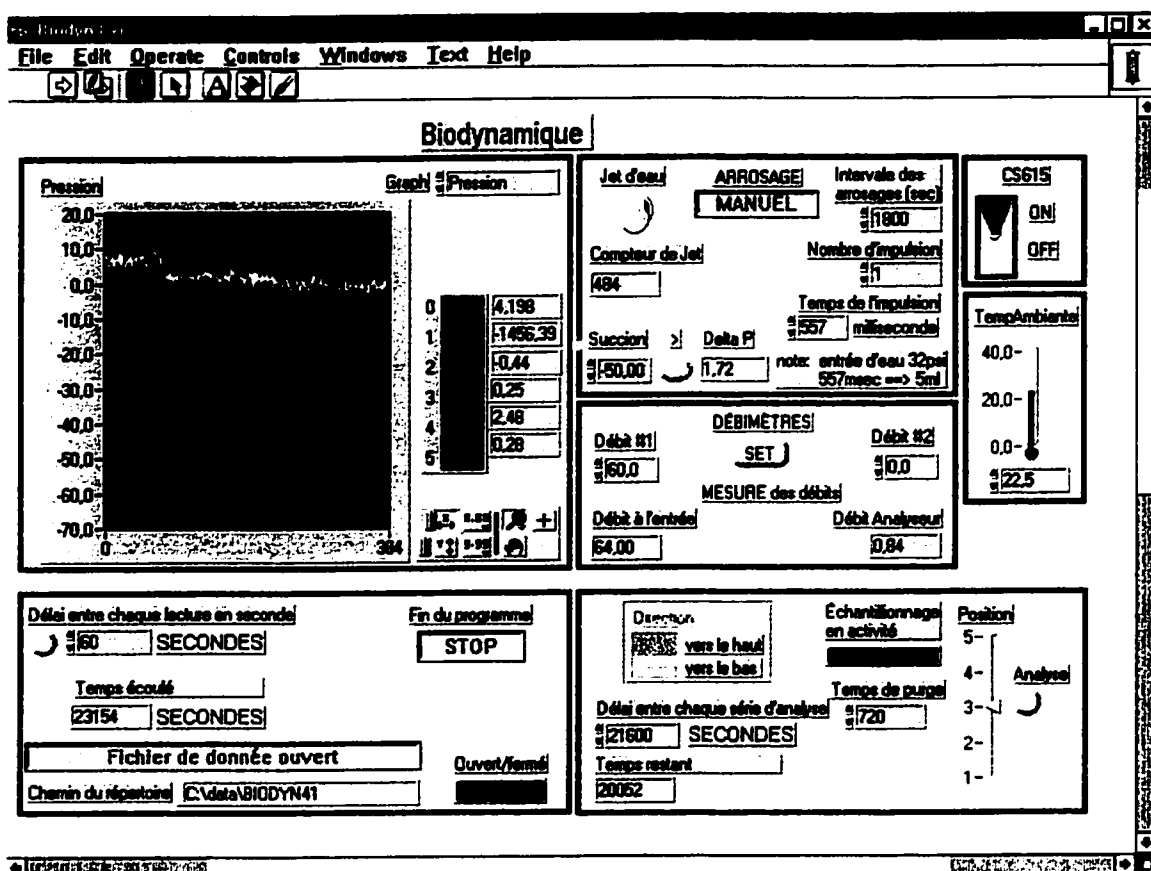


Figure 6-3 Visualisation du suivi et contrôle des paramètres sur LabView (colonne de l'étude biodynamique).

Des tests préliminaires ont permis de mettre à l'épreuve le montage expérimental. La Figure 6-4 présente les courbes typiques de composition de l'air à la sortie de la colonne et la Figure 6-5 présente le gradient de concentration en oxygène et en dioxyde de carbone le long de la colonne. Le débit d'air correspondant aux données présentées ici était maintenu constant à 33 mL/min. Ces données correspondent au début de l'expérience. Ce très faible débit d'air a eu pour conséquence la consommation totale de l'oxygène après environ 55 heures. La saturation observée sur les courbes de dioxyde de carbone est due à la limitation de l'analyseur qui ne peut lire que des concentrations en dioxyde de carbone comprises entre 0 et 10%. La concentration d'oxygène et de dioxyde de carbone à l'entrée de la colonne devrait être constante et correspondre aux concentrations de l'air ambiant soit environ 21% pour l'oxygène et moins de 1% pour le dioxyde de carbone. Or, les concentrations ne sont pas tout à fait constantes. Cette

observation est attribuable au temps de purge insuffisant. En effet, après 15 minutes de purge, les concentrations n'avaient toujours pas atteint un « vrai » plateau. Ce temps de purge élevé est en partie dû à la capacité de la trappe à eau qui s'élève à 20 mL. Il en résulte que l'atteinte d'un plateau devrait être obtenue soit en augmentant le temps de purge soit en diminuant le volume d'air à purger. Malgré les erreurs induites par le temps de purge, le gradient de concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone à travers la colonne peut être observé par le système de captage et d'analyse du gaz interstitiel.

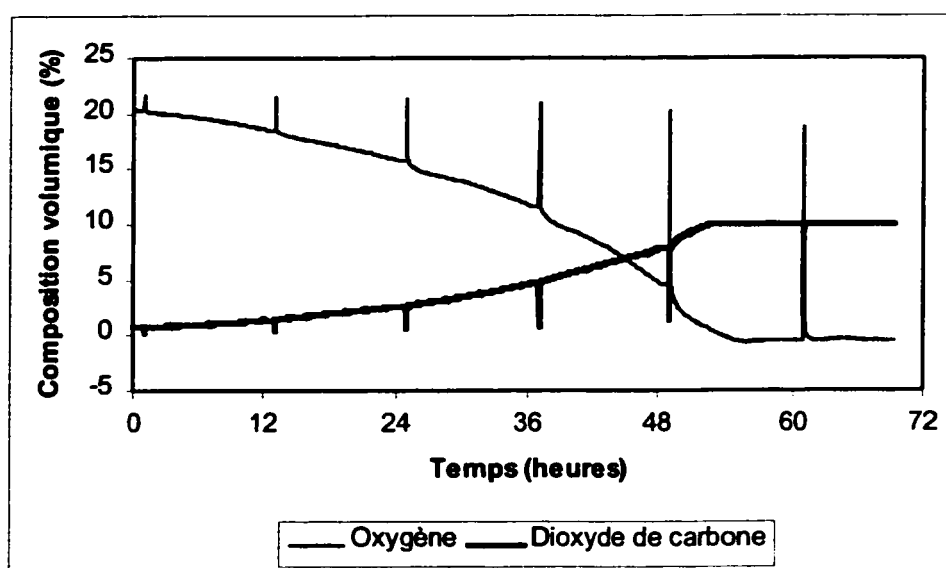


Figure 6-4 Mesures de l'oxygène et du dioxyde de carbone en sortie de colonne.

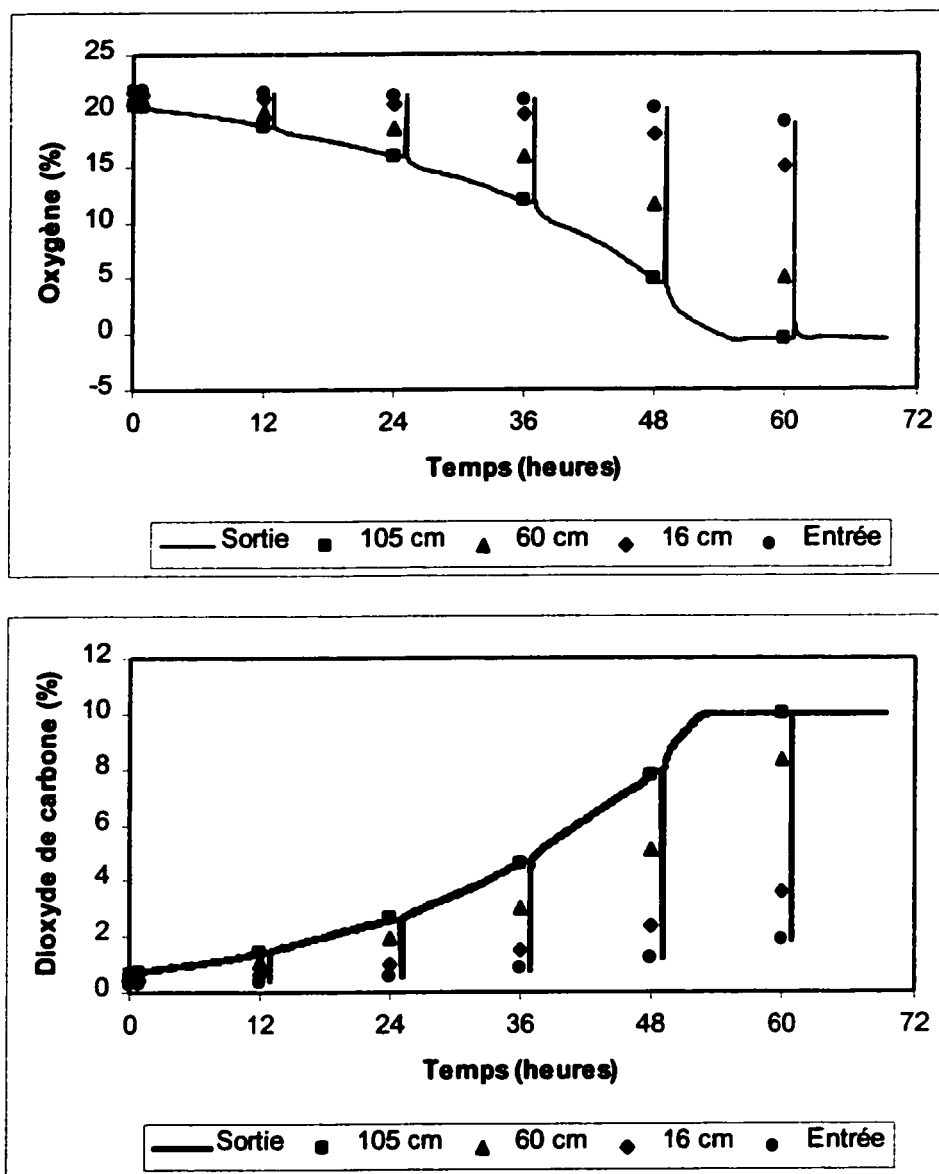


Figure 6-5 Gradient de concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone dans la colonne.

Les mesures locales et simultanées de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans la phase gazeuse, de l'humidité et du débit d'air permettront d'identifier des modèles intégrant les processus de transfert de masse et l'influence de l'aération et de l'humidité sur la biodégradation. De tels modèles subiront des tests d'identifiabilité *a priori* et de nouveaux capteurs-logiciels pourront être développés si nécessaire. Les modèles ainsi identifiés permettront le développement et l'implantation de contrôleurs.

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les procédés de biodégradation dans un sol non-saturé sont confrontés à deux problèmes majeurs. Tout d'abord, la concentration en polluant n'est pas mesurable en ligne ce qui est problématique pour le suivi du procédé et conséquemment sur son optimisation. Ensuite, les modèles phénoménologiques existants permettent une description *a posteriori* des procédés dans le sens où plusieurs paramètres sont difficilement identifiables *a priori*. Il en résulte que l'optimisation des bioprocédés par l'implantation d'une stratégie de contrôle en temps réel n'a pu être réalisée jusqu'à ce jour. La thèse présentée ici s'est donc proposée d'utiliser la théorie des systèmes adaptatifs, déjà éprouvée sur plusieurs bioprocédés en phase liquide, afin d'observer la pollution en temps réel et de permettre l'implantation ultérieure de stratégies de contrôle actif.

La méthodologie adoptée a résidé en deux études parallèles : une étude hydrodynamique et une étude biocinétique. Pour chaque étude, des modèles phénoménologiques ont été développés à partir des travaux présentés dans la littérature. Puis, une méthodologie expérimentale a été conçue afin de calibrer les modèles mathématiques. Enfin, à la lumière des résultats d'identification, des capteurs-logiciels ont été développés afin d'estimer les paramètres inconnus et observer les variables d'état non-mesurées.

D'une part, l'approche méthodologique a conduit à la mise au point de protocoles expérimentaux pour le suivi hydrodynamique et microbiologique des bioprocédés concernés. Premièrement, une colonne expérimentale a été conçue afin de caractériser les écoulements d'air et d'eau dans un sol et une deuxième colonne a permis de suivre simultanément les écoulements et les phénomènes biologiques via le suivi en temps réel du CO₂ produit par les micro-organismes. Deuxièmement, deux nouveaux protocoles expérimentaux en microcosme ont été développés afin de calibrer les modèles phénoménologiques de biodégradation d'un polluant hydrophobe dans un sol non-saturé.

D'autre part, la thèse a conduit aux résultats théoriques suivants.

Premièrement, un capteur-logiciel, basé sur la structure d'estimateur/observateur, a été développé afin d'estimer la conductivité hydraulique non-saturée à partir de la mesure de

la succion. La performance du capteur-logiciel a été réduite par la présence d'importantes oscillations en régime transitoire et son amélioration doit faire l'objet de travaux à venir.

Deuxièmement, un modèle descriptif minimisant le nombre de paramètres à identifier a été développé. Ce modèle, comprenant 8 paramètres, permet de découpler les limitations dues à la cinétique de croissance des micro-organismes sur l'hexadécane et les limitations dues aux propriétés de la matrice de sol.

Troisièmement, des capteurs-logiciels permettant l'observation en temps réel de la concentration en polluant au cours d'un bioprocédé de traitement de sols pollués dans un sol non-saturé ont été développés, calibrés à partir de données de simulation et validés à partir des données expérimentales.

Les travaux présentés dans cette thèse ont démontré l'applicabilité de la théorie des systèmes adaptatifs aux procédés de biodégradation d'un polluant dans un sol non-saturé. En particulier, l'estimation en temps réel des conductivités du milieu poreux et l'observation de la biodégradation assurent le suivi de la performance des procédés et permettent d'envisager l'implantation de stratégies de contrôle avancé.

À partir des conclusions tirées, certaines recommandations doivent être proposées afin d'orienter les recherches à venir. Ces recommandations comprennent les points suivants :

- ***Étude hydrodynamique***

- Poursuivre la modélisation descriptive des écoulements d'air et d'eau en régime transitoire afin d'augmenter le niveau de connaissance des phénomènes mis en jeu;
- S'assurer de la robustesse des mesures en ligne de l'humidité;
- Améliorer le capteur-logiciel de la conductivité hydraulique en régime transitoire;
- Développer un capteur-logiciel de la conductivité du milieu à l'air;
- Valider les capteurs-logiciels pour des écoulements simultanés d'air et d'eau.

- ***Étude biocinétique***
 - Développer des modèles prédictifs de la cinétique de croissance microbienne des micro-organismes sur les polluants hydrophobes;
 - Tester la méthodologie développée dans cette thèse à des pollutions mixtes et âgées ;
 - Poursuivre l'analyse numérique des modèles biocinétiques et valider les capteurs-logiciels dans des situations diverses.
- ***Étude biodynamique***
 - Tester les capteurs-logiciels sur des expériences en colonne ;
 - Développer un modèle biodynamique de référence intégrant l'effet du contenu en eau et de l'aération sur la biodégradation ;
 - Développer des stratégies de contrôle.

RÉFÉRENCES

- Aachib, M. (1997). Étude en laboratoire de la performance des barrières de recouvrement constituées des rejets miniers pour limiter le DMA. Thèse de doctorat. Département de génie minéral. Montréal, École Polytechnique de Montréal.
- Aachib, M. et Aubertin, M. (2000). "Gas Diffusion through Variably Saturated Porous Media with an Application to Oxygen Barrier." Soumis pour publication.
- Alexander, M. (1994). Biodegradation and Bioremediation. San Diego, Academic Press.
- Andrews, J. F. (1968). "A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibiting Substrates." Biotechnology and Bioengineering **10**: 707-723.
- Armenante, P. M., Pal, N. et Lewandowski, G. (1994). "Role of Mycelium and Extracellular Protein in the Biodegradation of 2,4,6-Trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*." Applied and Environmental Microbiology **60**(6): 1711-1718.
- Armstrong, J. E., Frind, E. O. et McClellan, R. D. (1994). "Nonequilibrium Mass Transfer Between the Vapor, Aqueous, and Solid Phases in Unsaturated Soils During Vapor Extraction." Water Resources Research **30**(2): 355-368.
- Arya, L. M., Leij, F. J., Van Genuchten, M. T. et Shouse, P. J. (1999). "Scaling Parameter to Predict the Soil Water Characteristic from Particle-Size Distribution Data." Soil Sci. Soc. Am. J. **63**: 510-519.
- Atlas, R. M. (1987). Biodegradation of Hydrocarbons in the Environment, Plenum Press.
- Atlas, R. M. (1991). "Microbial Hydrocarbon Degradation - Bioremediation of Oil Spills." J. Chem. Tech. Biotechnol. **52**: 149-156.
- Aubertin, M. (1995). Évaluation en laboratoire de barrières sèches construites à partir de résidus miniers. Rapport NEDEM. École Polytechnique de Montréal.

- Aubertin, M., Ricard, J.-F. et Chapuis, R. (1998). "A Predictive Model for the Water Retention Curve: Application to Tailings from Hard-Rock Mines." Can. Geotech. J. **35**: 55-69.
- Bailey, J. E. et Ollis, D. F. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. New York, McGraw-Hill.
- Baker, K. H. et Herson, D. S. (1994). Bioremediation, McGraw-Hill.
- Bardi, L., Mattei, A., Steffan, S. et Marzona, M. (2000). "Hydrocarbon Degradation by a Soil Microbial Population with beta-Cyclodextrin as Surfactant to Enhance Bioavailability." Enzyme and Microbial Technology **27**: 709-713.
- Bartha, R. (1986). "Biotechnology of Petroleum Pollutant Biodegradation." Microbiol. Ecology **12**: 155-172.
- Bastin, G. et Dochain, D. (1990). On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors. Amsterdam, Elsevier.
- Bauer, J. E. et Capone, D. G. (1985). "Effects of Four Aromatic Organic Pollutants on Microbial Glucose Metabolism and Thymidine Incorporation in Marine Sediments." Applied and Environmental Microbiology **49**(4): 828-835.
- Bear, J. (1972). Dynamics of Fluids in Porous Media. New York, American Elsevier.
- Bicalho, K. V., Znidarcic, D. et Ko, H.-Y. (2000). "Air Entrapment Effects on Hydraulic Properties." Geotechnical Special Publication **99**: 517-528.
- Bird, R. B., Stewart, W. E. et Lightfoot, E. N. (1960). Transport Phenomena. Singapore, John Wiley & Sons.
- Boethling, R. S. et Alexander, M. (1979). "Effect of Concentration of Organic Chemicals on their Biodegradation by Natural Microbial Communities." Applied and Environmental Microbiology **37**(6): 1211-1216.
- Boulding, J. R. (1995). Practical Handbook of Soil, Vadoze Zone, and Ground-water Contamination - Assessment, Prevention, and Remediation. Boca Raton, CRC Press.

- Bourrel, S. (1996). Estimation et commande d'un procédé à paramètres répartis utilisé pour le traitement biologique de l'eau à potabiliser. Thèse de doctorat. Toulouse (France), Université Paul Sabatier.
- Brutsaert, W. (2000). "A Concise Parametrization of the Hydraulic Conductivity of Unsaturated Soils." Advances in Water Resources **23**: 811-815.
- Chapuis, R., Baass, K. et Davenne, L. (1988). "Granular Soils in Rigid-wall Permeameters: Method for Determining the Degree of Saturation." Can. Geotech. J. **26**: 71-79.
- Cioffi, J. C., Greer, C. W. et Samson, R. (1993). "Role of Inoculum Preparation and Density on the Bioremediation of 2,4-D-contaminated Soil by Bioaugmentation." Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**: 681-687.
- Colwell, R. R. et Grimes, D. J. (2000). Nonculturable Microorganisms in the Environment. Washington, ASM Press.
- Cookson, J. T. (1995). Bioremediation Engineering. New York, McGraw-Hill.
- Corey, A. T. (1986). Air Permeability. Methods of Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods. K. A. Madison, American Society of Agronomy: 1121-1136.
- Cuypers, M. P., Grotenhuis, J. T. C. et Rulkens, W. H. (1999). Prediction of PAH Bioavailability in Soils and Sediments by Persulfateoxidation. The Fifth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, B. C. Alleman and A. Leeson. San Diego, CA, Battelle Press.
- De Jonge, H., Freijer, J. I., Verstraten, J. M. et Westerveld, J. (1997). "Relation Between Bioavailability and Fuel Oil Hydrocarbon Composition in Contaminated Soils." Environ. Sci. Technol. **31**: 771-775.
- Déziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F. et Bisailon, J.-G. (1996). "Biosurfactant Production by a Soil Pseudomonas Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." Applied and Environmental Microbiology **62**(6): 1908-1912.

- Dibble, J. T. et Bartha, R. (1979). "Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge." Applied and Environmental Microbiology **37**(4): 729-739.
- Dudal, Y. (2000). Biodisponibilité du pentachlorophénal durant son transport en milieux poreux saturés. Thèse de Ph. D. Département de génie chimique. Montréal, École Polytechnique de Montréal.
- Fall, C. (1995). Équilibre et cinétique de sorption du PCP et du Phénanthrene dans les sols contaminés. Thèse de Ph.D. Département de génie chimique. Montréal, École Polytechnique de Montréal.
- Felton, G. K. et Reddell, D. L. (1992). "Finite Element Axisymmetrical and Linear Model of Two-phase Flow through Porous Media." Transactions of the ASAE **35**(5): 1419-1429.
- Focht, D. D. (1987). Performance of Biodegradative Microorganisms in Soils: Xenobiotic Chemicals as Unexploited Metabolic Niches, Plenum Press.
- Fradette, S., Rho, D., Samson, R. et LeDuy, A. (1994). "Microcalorimetry as a Diagnostic and Analytical Tool for the Assessment of Biodegradation of 2,4-D in a Liquid Medium and in Soil." Appl. Microbiol. Biotechnol. (42): 432-439.
- Fredlund, D. G. et Rahardjo, H. (1993). Soil Mechanics for Unsaturated Soils. New York, John Wiley & Sons.
- Freeze, R. A. et Cherry, J. A. (1979). Groundwater. Englewood Cliffs, NJ, Prentice-Hall.
- Fu, C., Pfanstiel, S., Gao, C., Yan, X., Govind, R. et Tabak, H. H. (1996). "Studies on Contaminant Biodegradation in Slurry, Wafer, and Compacted Soil Tube Reactors." Environ. Sci. Technol. **30**(3): 743-750.
- Gee, G. W. et Bauder, J. W. (1986). Particule-size Analysis. Methods of Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods. K. A. Madison, American Society of Agronomy: 383-411.
- Geerdink, M. J., Van Loosdrecht, M. C. M. et Luyben, K. C. A. (1996). "Model for Microbial Degradation of Nonpolar Organic Contaminants in a Slurry Reactor." Environ. Sci. Technol. **30**(3): 779-786.

- Gerke, H. H., Hornung, U., Kelanemer, Y., Slodicka, M. et Schumacher, S. (1999). Optimal Control of Soil Venting: Mathematical Modeling and Applications. Basel, Birkhauser Verlag.
- Ghoshal, S., Ramaswami, A. et Luthy, R. G. (1996). "Biodegradation of Naphtalene from Coal Tar and Heptamethylnonane in Mixed Batch Systems." Environ. Sci. Technol. **30**(4): 1282-1291.
- Graham, D. W., Smith, V. H., Cleland, D. L. et Law, K. P. (1999). "Effects of Nitrogen and Phosphorus Supply on Hexadecane Biodegradation in Soil Systems." Water, Air, and Soil Pollution **111**: 1-18.
- Green, W. H. et Ampt, C. A. (1911). "Flow of Air and Water through Soils." J. Agric. Sci. **4**: 1-24.
- Grismer, M. E., Orang, M. N., Clausnitzer, V. et Kinney, K. (1994). "Effects of Air Compression and Counterflow on Infiltration into Soils." Journal of Irrigation and Drainage **120**(4): 775-795.
- Guerin, W. F. et Boyd, S. A. (1992). "Differential Bioavailability of Soil-Sorbed Naphtalene to Two Bacterial Species." Appl. Environ. Microbiol. **58**(4): 1142-1152.
- Haverkamp, R., Vauclin, M., Touma, J., Wierenga, P. J. et Vachaud, G. (1977). "A Comparison of Numerical Simulation Models For One-Dimensional Infiltration." Soil Sci. Soc. Am. J. **41**: 285-294.
- Hickey, W. J. (1995). "In Situ Respirometry: Field Methods and Implications for Hydrocarbon Biodegradation in Subsurface Soils." J. Environ. Qual. **24**: 583-588.
- Hillel, D., Ed. (1980). Fundamentals of Soil Physics. New York, Academic Press.
- Jacobsen, B. N. et Arvin, E. (1996). "Biodegradation Kinetics and Fate Modelling of Pentachlorophenol in Bioaugmented Activated Sludge Reactors." Wat. Res. **30**(5): 1184-1194.
- Julien, S. (1997). Modélisation et estimation pour le contrôle d'un procédé de boues activées éliminant l'azote des eaux résiduaires urbaines. Thèse de doctorat.

Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes. Toulouse (France),
Université Paul Sabatier.

- Kelsey, J. W., Kottler, B. D. et Alexander, M. (1997). "Selective Chemicals Extractants to Predict Bioavailability of Soil-aged Organic Chemicals." Environ. Sci. Technol. **31**: 214-217.
- Klute, A. et Dirksen, C. (1986). Hydraulic Conductivity and Diffusivity: Laboratory Methods. Methods of Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods. K. A. Madison, American Society of Agronomy: 687-734.
- Kovács, G. (1981). Seepage Hydraulics. New York, Elsevier.
- Landrum, P. F., Hayton, W. L., Lee, I. I., McCarty, L. S., Mackay, D. et McKim, J. M. (1994). Synopsis of Discussion Session on the Kinetics behind Environmental Bioavailability. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Latifi, H., Prasad, S. N. et Helweg, O. J. (1994). "Air Entrapment and Water Infiltration in Two-layer Soil Column." Journal of Irrigation and Drainage Engineering **120**(5): 871-891.
- Li, K. Y., Zhang, Y. et Xu, T. (1995). "Bioremediation of Oil-Contaminated Soil - A rate Model." Waste Management **15**(5/6): 335-338.
- Lingineni, S. et Dhir, V. K. (1992). "Modeling of Soil Venting Processes to Remediate Unsaturated Soils." Journal of Environmental Engineering **118**(1): 135-152.
- Loibner, A. P., Holzer, M., Szolar, O., Boller, V. et Braun, R. (1999). Sequential Supercritical Fluid Extraction for Predicting Biodegradation Rates and Ecotoxicological Impact of PAHs in Soil. The Fifth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, B. C. Alleman and A. Leeson. San Diego, CA, Battelle Press.
- Loll, P., Moldrup, P., Schonning, P. et Riley, H. (1999). "Predicting Saturated Hydraulic Conductivity from Air Permeability: Application in Stochastic Water Infiltration Modeling." Water Resources Research **35**(8): 2387-2400.
- Lyman, W. J., Reehl, W. F. et Rosenblatt, D. H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

- Mc Dougall, J. R. et Pyrah, I. C. (1998). "Simulating Transient Infiltration in Unsaturated Soils." Can. Geotech. J. **35**: 1093-1100.
- Merkel, G. J., Stapleton, S. S. et Perry, J. J. (1978). "Isolation and Peptidoglycan of Gram-negative Hydrocarbon-utilizing Thermophilic Bacteria." Journal of General Microbiology **109**: 141-148.
- Moldrup, P., Poulsen, T. G., Schonning, P., Olesen, T. et Yamaguchi, T. (1998). "Gas Permeability in Undisturbed Soils: Measurements and Predictive Models." Soil Science **163**(3): 180-189.
- Mualem, Y. (1974). "A Conceptual Model of Hysteresis." Water Resources Research **10**: 514-520.
- Mualem, Y. (1976). "A New Model for Predicting the Hydraulic Conductivity of Unsaturated Porous Media." Water Resources Research **12**: 513-522.
- Mualem, Y. (1986). Hydraulic Conductivity of Unsaturated Soils: Prediction and Formulas. Methods of Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods. K. A. Madison, American Society of Agronomy: 799-823.
- Mulder, H., Breure, A. M., van Honschooten, D., Grotenhuis, J. T. C., van Andel, J. G. et Rulkens, W. H. (1998). "Effect of Biofilm Formation by Pseudomonas 8909N on the Bioavailability of Solid Naphtalene." Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**: 277-283.
- Mulder, H., Wassink, G. R., Breure, A. M., van Andel, J. G. et Rulkens, W. H. (1998). "Effect of Nonionic Surfactants on Naphtalene Dissolution and Biodegradation." Biotechnology and Bioengineering **60**(4): 397-407.
- Nielsen, P. H., Bjerg, P. L., Nielsen, P., Smith, P. et Christensen, T. H. (1996). "In Situ and Laboratory Determined First Order Degradation Rate Constants of Specific Organic Compounds in an Aerobic Aquifer." Environ. Sci. Technol. **30**(1): 31-37.
- Nyer, E. K. (1992). Practical Techniques for Groundwater and Soil Remediation. Boca Raton, CRC Press.

- O'Connor, K. M. et Dowding, C. H. (1999). Geomeasurements by Pulsing TDR Cables and Probes. New York, CRC Press.
- Park, J.-H., Zhao, X. et Voice, T. C. (2001). "Biodegradation of Non-desorbable Naphtalene in Soils." Environ. Sci. Technol. **35**(13): 2734-2740.
- Parker, J. C., Lenhard, R. J. et Kuppusamy, T. (1987). "A Parametric Model for Constitutive Properties Governing Multiphase Flow in Porous Media." Water Resources Research **23**(4): 618-624.
- Parlange, J. Y. (1976). "Capillary Hysteresis and Relationship Between Drying and Wetting Curves." Water Resources Research **12**: 224-228.
- Perrier, M. et Dochain, D. (1993). "Evaluation of Control Strategies for Anaerobic Digestion Processes." International Journal of Adaptive Control and Signal Processing **7**: 309-321.
- Perrier, M., Feye de Azevedo, S., Ferreira, E. C. et Dochain, D. (2000). "Tuning of Observer-based Estimators: Theory and Application to the On-line Estimation of Kinetic Parameters." Control Engineering Practice **8**: 377-388.
- Pomerleau, Y. (1990). Modélisation et contrôle d'un procédé fed-batch de culture des levures à pain *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat. Département de génie chimique. Montréal, École Polytechnique de Montréal.
- Poulsen, T. G., Moldrup, P., Yamaguchi, T. et Jacobsen, O. H. (1999). "Predicting Saturated and Unsaturated Hydraulic Conductivity in Undisturbed Soils from Soil Water Characteristics." Soil Science **164**(12): 877-887.
- Poulsen, T. G., Moldrup, P., Yamaguchi, T., Schonning, P. et Hansen, J. A. (1999). "Predicting Soil-Water and Soil-Air Transport Properties and Their Effects on Soil-Vapor Extraction Efficiency." Ground Water Monitoring and Remediation **19**(3): 61-70.
- Ramaswami, A. et Luthy, R. G. (1997). Measuring and Modeling Physicochemical Limitations to Bioavailability and Biodegradation. Manual of Environmental Microbiology. J. H. Hurst. Washington, D.C., ASM Press: 721-729.

- Riser-Roberts, E. (1992). Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites. Boca Raton, CRC Press.
- Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S. et Flandrois, J. P. (1995). "Convenient Model to Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth." Applied and Environmental Microbiology **61**(2): 610-616.
- Schaap, M. G. et Leij, F. J. (2000). "Improved Prediction of Unsaturated Hydraulic Conductivity with the Mualem-van Genuchten Model." Soil Sci. Soc. Am. J. **64**: 843-851.
- Schoefs, O., Deschênes, L. et Samson, R. (1998). "Efficiency of a New Covering System for the Environmental Control of Biopiles Used for the Treatment of Contaminated Soils." Journal of Soil Contamination **7**(6): 753-771.
- Sekelsky, A. M. et Shreve, G. S. (1999). "Kinetic Model of Biosurfactant-Enhanced Hexadecane Biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*." Biotechnology and Bioengineering **63**(4): 401-409.
- Simkins, S. et Alexander, M. (1984). "Models for Mineralization Kinetics with the Variables of Substrate Concentration and Population Density." Applied and Environmental Microbiology **47**(6): 1299-1306.
- Sims, J. L., Sims, R. C. et Matthews, J. E. (1990). "Approach to Bioremediation of Contaminated Soil." Hazardous Waste and Hazardous Materials **7**(2): 117-149.
- Singleton, I. (1994). "Microbial Metabolism of Xenobiotics: Fundamental and Applied Research." J. Chem. Tech. Biotechnol. **59**: 9-23.
- Siron, R., Pelletier, E. et Brochu, C. (1995). "Environmental Factors Influencing the Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Cold Seawater." Arch. of Environ. Contam. and Toxicol. **28**: 406-416.
- Smith, J. E., Robin, M. J. L. et Elrick, D. E. (1998). "Improved Transient-Flow Air Permeameter Design: Dampening the Temperature Effects." Soil Sci. Soc. Am. J. **62**: 1220-1227.
- Söderström, T. et Stoica, P. (1989). System Identification. New York, Prentice Hall.

- Springer, D. S., Loaiciga, H. A., Cullen, S. J. et Everett, L. G. (1998). "Air Permeability of Porous Materials Under Controlled Laboratory Conditions." Ground Water **36**(4): 558-565.
- Stylianou, C. et DeVantier, B. R. (1995). "Relative Air Permeability as Function of Saturation in Soil Venting." Journal of Environmental Engineering **121**(4): 337-347.
- Suthersan, S. S. (1997). Remediation Engineering: Design Concepts. Boca Raton, CRC Press.
- Tabak, H. H., Govind, R., Fu, C., Yan, X., Gao, C. et Pfanstiel, S. (1997). "Development of Bioavailability and Biokinetics Determination Methods for Organic Pollutants in Soil to Enhance In-Situ and On-Site Bioremediation." Biotechnol. Prog. **13**(1): 43-52.
- Topp, G. C. (1971). "Soil-water Hysteresis: the Domain Theory Extended to Pore Interaction Conditions." Soil Sci. Soc. Amer. Proc. **35**: 219-235.
- Vachaud, G. et Thony, J. L. (1971). "Hysteresis During Infiltration and Redistribution in a Soil Column at Different Initial Water Contents." Water Resources Research **7**: 111-127.
- van Elsas, J. D., Trevors, J. T. et Wellington, E. M. H. (1997). Modern Soil Microbiology. New York, Marcel Dekker.
- van Genuchten, M. T. (1980). "A Closed-form Equation for Predicting the Hydraulic Conductivity of Unsaturated Soils." Soil Sci. Soc. Am. J. **44**: 892-898.
- Vanderby, P. (1998). Développement d'une stratégie de contrôle pour le procédé de bioventilation in situ. Mémoire de M.Sc.A. Département de génie chimique. Montréal, École Polytechnique de Montréal.
- von Fahnestock, F. M., Wickramanayake, G. B., Kratzke, R. J. et Major, W. R. (1998). Biopile Design, Operation, and Maintenance Handbook for Treating Hydrocarbon-Contaminated Soils. Columbus, Ohio, Batelle Press.
- Wardell, L. J. (1995). "Potential for Bioremediation of Fuel-Contaminated Soil in Antarctica." Journal of Soil Contamination **4**(2): 111-121.

- Wick, L. Y., Colangelo, T. et Harms, H. (2001). "Kinetics of Mass Transfer-Limited Bacterial Growth on Solid PAHs." Environ. Sci. Technol. **35**(2): 354-361.
- Wilson, D. J. (1995). Modeling of In Situ Techniques for Treatment of Contaminated Soils: Soil Vapor Extraction, Sparging and Bioventing. Lancaster, Technomic.
- Yang, D. Q., Rahardjo, H., Leong, E. C. et Choa, V. (1998). "Coupled Model for Heat, Moisture, Air Flow, and Deformation Problems in Unsaturated Soils." Journal of Engineering Mechanics **124**(12): 1331-1338.
- Zegelin, S. J., White, I. et Russel, G. F. (1992). A Critique of the Time Domain Reflectometry Technique for Determining Field Soil-water Content. Advances in Measurement of Soil Physical Properties: Bringing Theory into Practice, SSSA. **30**: 1-25.
- Zhang, Y. (1994). Oxygen Transfer in Soil Matrices. Doctoral Dissertation. Ann Arbor, Lamar University.
- Zhao, X., Szafranski, M. J., Maraqa, M. A. et Voice, T. C. (1999). "Sorption and Bioavailability of Carbon Tetrachloride in a Low Organic Content Sandy Soil." Environ. Toxicol. Chem. **18**(8): 1755-1762.
- Zhao, X. et Voice, T. C. (2000). "Assessment of Bioavailability Using a Multicolumn System." Environ. Sci. Technol. **34**(8): 1506-1512.

ANNEXES

Annexe 1 Détermination du poids sec d'un sol

 PROTOCOLE STANDARD D'OPÉRATION													
Protocole # : A7	Nombres de pages :5												
Version :2	Date : 05-04-00												
Auteur(s): <u>Sandra Estrela</u>													
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <th style="width: 50%;">Approuvé par :</th> <th style="width: 25%;">Signatures :</th> <th style="width: 25%;">Date :</th> </tr> <tr> <td><u>Manon Leduc</u></td> <td>☒</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>☐</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>☐</td> <td></td> </tr> </table>		Approuvé par :	Signatures :	Date :	<u>Manon Leduc</u>	☒			☐			☐	
Approuvé par :	Signatures :	Date :											
<u>Manon Leduc</u>	☒												
	☐												
	☐												

Titre : Détermination du poids sec d'un sol
Mots clés : poids sec, pourcentage ou taux d'humidité, pourcentage ou taux d'eau, sol, caractérisation physique

1. DOMAINE D'APPLICATION

Ce protocole s'applique aux sols organiques et inorganiques, roches et matériaux similiaires.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le poids sec (aussi nommé % d'eau ou d'humidité) est déterminé par séchage à 105 (sols organiques et tourbe) ou 110°C (autres sols et roches), jusqu'à l'obtention d'une masse constante de l'échantillon. Le contenu en eau de l'échantillon à l'étude est alors considéré comme étant le ratio, exprimé en pourcentage, de la masse d'eau « libre » ou « contenue dans les pores » sur la masse d'échantillon original.

3. MATÉRIEL

1. Four réglable à une température constante et uniforme de 105 et 110 ± 5 ° C;
2. Balance analytique de précision de 0.0001 g;
3. Coupelles d'aluminium;
4. Dessicateur;
5. Dessicant (drierite = sulfate de calcium anhydre);
6. Gants ou pinces propres (pour manipuler les coupelles);
7. Matériel de prélèvement des échantillons (spatule, cuillère ou couteau selon les besoins).

4. MODE OPÉRATOIRE

Il est fortement recommandé d'effectuer au moins des duplicatas lors de l'analyse du taux d'humidité de chacun des échantillons.

1. La pesée d'échantillon doit se faire dans une coupelle préalablement séchée. Pour ce faire, 2 options sont possibles : 1) Déposer les coupelles vides préalablement identifiées (initiales, date et numéro d'échantillon) dans le dessicateur suffisamment longtemps (la nuit) afin de les sécher ou 2) Déposer les coupelles préalablement identifiées au four à 105°C (apporter le dessicateur près des balances pour éviter d'humidifier les coupelles). Dans ce cas, la coupelle

doit être ramenée à la température de la pièce avant la pesée de l'échantillon (1 heure dans le dessicateur);

2. Calibrer la balance selon le PSO E2;
3. Déposer la coupelle sèche sur la balance et noter le poids (PC);
4. Bien homogénéiser l'échantillon de sol à l'étude;
5. Sans remettre la balance à 0, ajouter environ 5 g de l'échantillon humide à l'étude dans la coupelle en prenant soin de prendre un échantillon représentatif (voir section NOTES pour les recommandations concernant les prélèvements) et noter le poids (PH);
6. Mettre au four la coupelle contenant l'échantillon humide et sécher au four à 105°C (sol organique ou tourbe) ou 110 °C (autre type de sol ou roches) pendant environ 16 h (minimum) ou jusqu'à ce que la masse soit constante (attendre au moins 1 h entre chaque pesée);
7. Refroidir au dessicateur à température ambiante, en s'assurant de ne pas réhumidifier l'échantillon (apporter le dessicateur près du four);
8. Calibrer à nouveau la balance selon le PSOE2;
9. Peser la coupelle contenant l'échantillon maintenant sec (apporter de nouveau le dessicateur près des balances) et noter le poids (PS);
10. Disposer des échantillons.

5. CALCULS

L'humidité (base sèche) de l'échantillon est calculé selon l'équation suivante :

$$I_{\text{humidité}} \left[\frac{\text{g eau}}{\text{g sol sec}} \right] = \frac{(PH - PC) - (PS - PC)}{PS - PC}$$

où PC: poids coupelle sèche (g)

PH: poids coupelle + échantillon humide (g)

PS: poids coupelle + échantillon sec (g)

L'équation 1.0 est couramment utilisée en environnement. Elle indique le % d'humidité de l'échantillon en fonction du poids humide alors que la seconde indique le % d'humidité de l'échantillon en fonction du poids sec de ce dernier (plus utilisée dans le domaine géotechnique). Il faut toujours indiquer clairement si vous utilisez le % par rapport au poids sec ou au poids humide.

Pour un même utilisateur, les duplicatas d'échantillon ne devraient pas différer de plus de 7.8% de la moyenne des échantillons.

6. LIMITE(S) DE LA MÉTHODE

Cette méthode s'applique aux échantillons de moins de 200 g.

7. RÉFÉRENCE(S)

ASTM D2216-92, ASTM D2974-87

8. NOTE(S)

8.1 Prélèvement d'un échantillon représentatif

- Pour favoriser l'homogénéisation de l'échantillon, bien mélanger ce dernier avant le prélèvement et prélever environ 5 portions réparties en différents endroits de l'échantillon;
- Éviter de prélever des portions en contact avec les parois du contenant où se trouve l'échantillon car ces portions risquent d'être plus humides étant donné la condensation sur les parois;

8.2 Pesée de l'échantillon

- Les balances analytiques sont très sensibles aux courants de convection générés par la chaleur. Toujours vous assurer que l'échantillon à peser est à température de la pièce;

- Dans les méthodes ASTM, on recommande de prendre un minimum de 20 g d'échantillon toutefois, ceci peut être compensé par l'utilisation de duplicatas et triplicatas. Toujours prendre en note la quantité d'échantillon pesée;
- Pour un échantillon de roches, une quantité d'au moins 500 g est recommandée par l'ASTM;

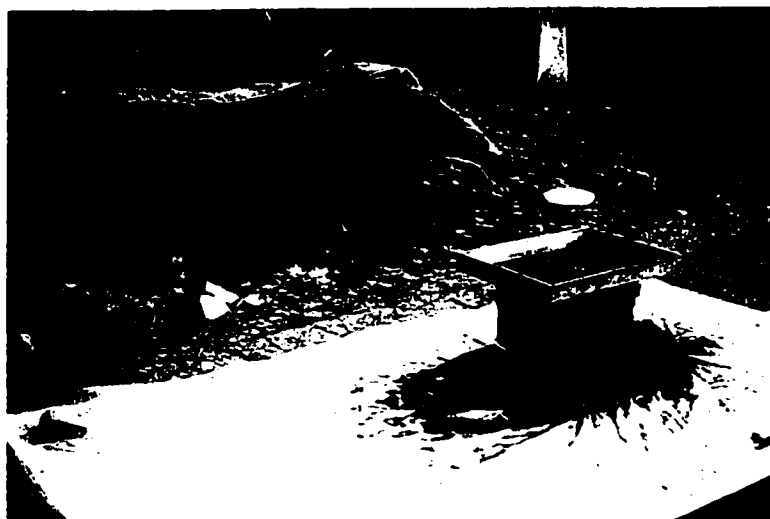
8.3 Séchage de l'échantillon au four

- Attention lors du séchage de sol contaminé au four. Assurez-vous qu'il n'y a pas de dégagement gazeux néfaste pour la santé;
- La température de 105°C est très importante en ce qui a trait aux sols organiques. En effet, une température plus élevée pourrait entraîner une décomposition de l'échantillon. Si le contenu en matière organique de votre échantillon n'est pas connu, effectuer le séchage à 105 °C;
- Les matériaux contenant du gypse (sulfate de calcium dihydraté) ou un très haut taux de matière organique peuvent être problématiques lors de la détermination du taux d'humidité. En effet, ces matériaux ont tendance à se dessécher au four ou à des % d'humidité très faibles telles que les conditions d'un dessiccateur. Pour ce genre de matériau, il serait préférable de sécher préalablement l'échantillon à 60°C avant la pesée (ne pas oublier de ramener l'échantillon à température de la pièce). Prendre en note toute modification à la méthode standard dans ce cas;
- Si après une nuit au four l'échantillon semble toujours humide, prolonger la période de chauffage;

8.4 Utilisation du dessiccateur

- Deux dessiccateurs sont à votre disponibilité. Lorsque vous devez déplacer le dessiccateur (lorsque vous allez chercher vos échantillons au four, par exemple), veuillez utiliser le dessiccateur noté MOBILE;
- Il est possible de laisser refroidir les échantillons secs sur le comptoir si on utilise des couvercles étanches;
- Toujours s'assurer que le dessiccant est sec avant d'utiliser le dessiccateur, en cas de doute, faire sécher au four le dessiccant sur un plateau.

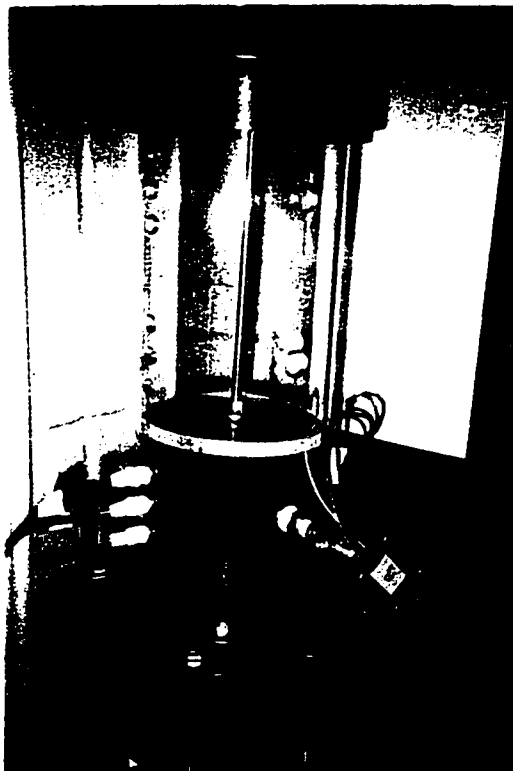
Annexe 2 Photos : tests hydrodynamiques en colonne



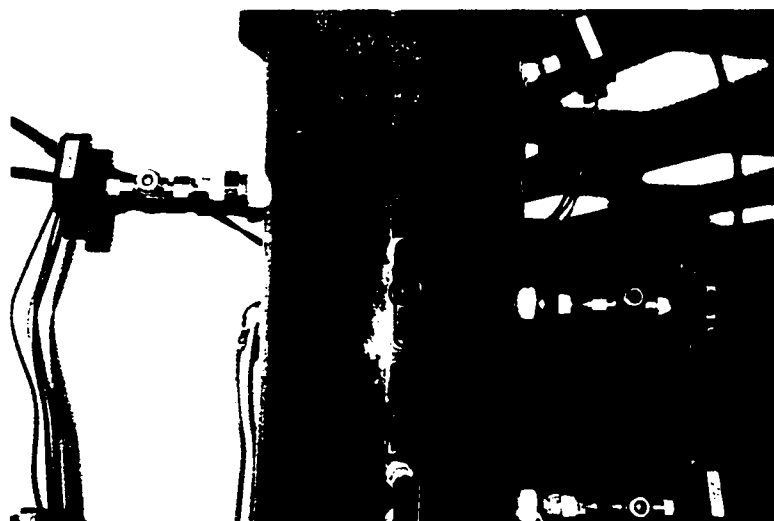
Tamissage du sol



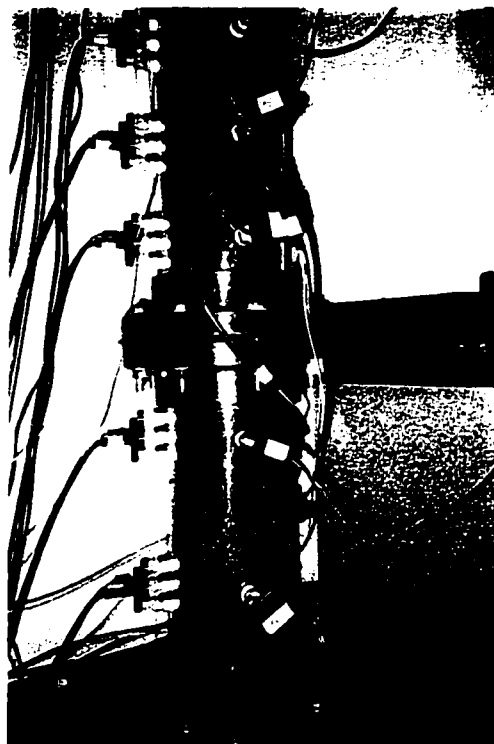
Montage d'une colonne



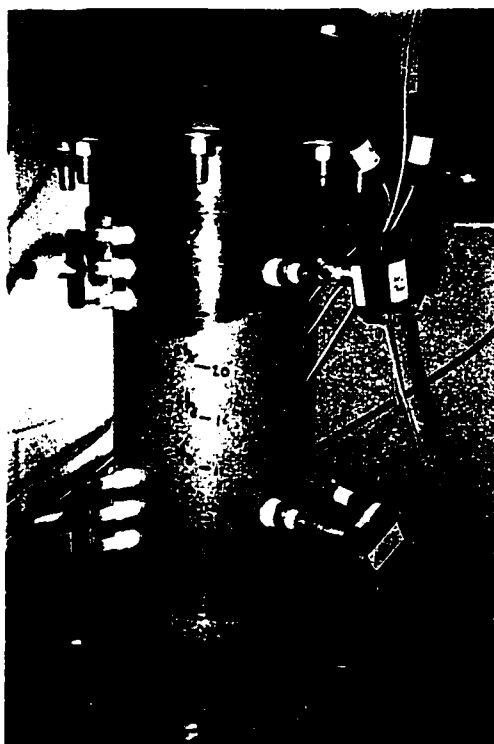
Compactage du sol



Tête de colonne (Système de contrôle de la succion)



Corps de la colonne



Passage du front

Annexe 3 PE-42C Tests de biodégradation en phase liquide

		PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole # :P42C		Nombres de pages :10	
Version :1		Date :13-03-01	
Auteur(s): <u>Lucie Jean</u> <u>Oliviers Schoefs</u>			
Approuvé par : <u>Manon Leduc</u> <u>Réjean Sansom</u> _____		Signatures : Date : ☒ _____ ☒ _____ ☐ _____	

Titre : Test de biodégradation d'hexadécane en microcosme à partir de la biomasse extraite d'un sol.
Mots clés : Biodégradation, minéralisation, radioactivité, microcosmes, micro-organismes, biomasse, dpm

1. OBJECTIF

Les tests de biodégradation de l'hexadécane en microcosmes à partir de la biomasse extraite d'un sol visent à réaliser le suivi des variables d'états nécessaires à l'identification des paramètres biocinétiques de modèles phénoménologiques.

2. MATÉRIEL

Réactifs

- 1 litre d'eau saline stérile 0,85 % (m/v) (Anachemia, AC-8304);
- 66 µl d'hexadécane radioactif (Sigma, lot :048H9430);
- 780 µl d'hexadécane filtré(Sigma, H-0255);
- 1 l de la solution de KOH 1 N filtrée(Anachemia);
- 1 l d'une solution standard de HCl 0,1 N (Anachemia, lot 70505)
- 9 x 95 mL de la solution minérale stérile + 30 billes de verre contenue dans une bouteille de lait de 150 mL (selon le protocole P8A);
- Azoture de sodium (Anachemia);
- Toluène (Anachemia);
- Hexane (Anachemia);
- Cocktail à scintillation OptiPhase Hisafe 3 (Fisher Scientific).

Équipements

- 1 bouteille stérile de 1 litre;
- 73 bouteilles sérologiques de 120 mL autoclavées (Fisher Scientific) contenant des tubes stériles en verre de 5 mL (diamètre de 10 mm) (Fisher Scientific);
- 73 septa (Supelco) avec anneaux métalliques;
- 100 g de sol;
- Balance analytique avec une précision de $\pm 0,002$ g (Mettler Toledo AB204 ou PB302, Switzerland);
- Compteur à scintillation Wallac 1409 avec unité de disquette 3,5 et imprimante Epson LX300 (Fisher Scientific);
- Vials à scintillation en verre de 20 mL avec bouchons(Fisher Scientific);
- Seringues en verre Gastight de 25, 50 et 250 µl;
- Seringue en verre Luer-Lock de 2,5 mL;
- Seringues en plastique de 5 et 30 mL (B-D);
- Aiguille en acier inoxydable de 6 pouces;

- 3 vials ambrés de 1,8 mL avec bouchon contenant un septum;
- Agitateur Wrist Action (labo A-682);
- Centrifugeuse IEC (21000R, Needham Heights, U.S.A.);
- 16 tubes à centrifugation stériles jetables de 50 mL (Fisher Brand, no 05-539-6);
- 16? tubes à centrifugation stériles en corex de 25 mL (Fisher Brand, no 05-539-6);
- Pipettes automatiques de 1 et 10 mL (Gilson);
- Embouts à pipettes de 1 et 10 mL stériles (Fisher Brand);
- 2 spatules;
- 1 bécher de 10 mL et 50 mL;
- Hotte biologique.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1. Isolation de la biomasse d'un sol

Travailler sous la hotte biologique avec le brûleur allumé

1. Ouvrir la bouteille de lait stérile de 150 mL contenant la solution minérale et passer son goulot à la flamme;
2. Peser directement 10 g de sol dans la bouteille et prendre en note la masse précise insérée;
3. Passer de nouveau le goulot à la flamme et refermer la bouteille;
4. Répéter les étapes 1 à 3 inclusivement avec les cinq autres bouteilles de lait;
5. À l'aide de l'agitateur Wrist Action, agiter les six bouteilles de lait préparées aux étapes précédentes pendant 30 minutes à vitesse maximale (position 10);
6. Identifier les tubes à centrifugation jetables stériles de 50 mL (2 tubes par bouteille de lait);
7. Ouvrir la bouteille de lait de 150 mL contenant la solution MSM et le sol et passer le goulot à la flamme;
8. Transvider cette solution dans deux tubes à centrifugation identifiés et fermer les tubes;
9. Répéter l'étape 7 et 8 avec toutes les bouteilles de lait de 150 mL;

10. Centrifuger 8 tubes à la fois dans la centrifugeuse IEC21000R à 1400 g pendant 30 sec (voir PSO E4 pour la mise en marche de la centrifugeuse);
11. À l'aide de la pipette automatique P10 mL, pipetter lentement le surnageant de chaque tube de manière à éviter de recueillir toute particule de sol et déposer tous les surnageants dans une même bouteille stérile de 1 litre;
12. Refermer la bouteille de 1 litre et agiter manuellement pour homogénéiser la solution de biomasse extraite.

3.2. Préparation des microcosmes

3.2.1. Identification des microcosmes

L'identification des microcosmes s'effectue selon le tableau A3.1.

Chaque microcosme doit porter l'identification suivante :

- Numéro;
- Niveau de contamination;
- Type de contamination (chaud et/ou froid);
- Présence de NaN_3 le cas échéant;
- Utilisation (CO_2 ou sacrifice).

Tableau A3.1 Description des 73 microcosmes

Numéros	Niveau de la contamination	Hexadécane froid	Hexadécane chaud	NaN ₃	Utilisation
1, 2 et 3	1,25 mg/l	✓	✓	-	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
4	1,25 mg/l	✓	✓	✓	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
5, 6 et 7	2,5 mg/l	✓	✓	-	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
8	2,5 mg/l	✓	✓	✓	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
9	Non contaminé	-	-	-	CO ₂
10 à 17	1,25 mg/l	✓	✓	-	Sacrifice ¹⁴ C
18 à 25	1,25 mg/l	✓	✓	✓	Sacrifice ¹⁴ C
26 à 33	2,5 mg/l	✓	✓	-	Sacrifice ¹⁴ C
34 à 41	2,5 mg/l	✓	✓	✓	Sacrifice ¹⁴ C
42 à 49	Non contaminé	-	-	-	Sacrifice ¹⁴ C
50 à 57	1,25 mg/l	✓	-	-	NPP
58 à 65	2,5 mg/l	✓	-	-	NPP
66 à 73	Non contaminé	-	-	-	NPP

3.2.2. Répartition de la solution de biomasse extraite

1. À l'aide d'une pipette automatique P10 mL, prélever 10 mL de la solution de biomasse extraite et verser-les dans une bouteille sérologique de 120 mL stérile;
2. Répéter l'étape 1 pour toutes les bouteilles sérologiques;
3. A l'aide de la seringue de 2,5 mL, ajouter 2 mL de la solution de KOH (1N) aux tubes de verre de 5 mL présents dans les bouteilles sérologiques;

4. Insérer environ 0,2 g de NaN_3 dans les bouteilles sérologiques spécialement identifiées;
5. Refermer les bouteilles sérologiques avec les septa et les anneaux métalliques.
6. Sertir toutes les bouteilles sérologiques à l'aide de la pince à sertir.

3.3. Préparation des solutions radioactives d'hexadécane

Travailler sous la hotte chimique réservée pour la manipulation de la radioactivité

La préparation de la solution d'hexadécane tient compte de deux facteurs :

- La concentration totale d'hexadécane dans chaque microcosme doit être de 1,25 mg/l et 2,5 mg/l de la biomasse extraite (voir l'exemple de calcul dans l'annexe 1);
- L'activité totale d'hexadécane en DPM par microcosme doit être de 200 000 DPM (voir l'exemple de calcul dans l'annexe 2).

3.3.1. Préparation de la solution radioactive d'hexadécane 1,25 mg/l

1. Sortir la solution radioactive d'hexadécane du réfrigérateur à 4 °C au moins une heure avant son utilisation;
2. Rincer à trois reprises la seringue de 1000 µl avec la solution d'hexadécane filtrée;
3. À l'aide de la seringue de 1000 µl, déposer 390 µl d'hexadécane froid filtrée dans un vial ambré de 1,8 mL et le bouchonner;
4. Préparer un bécher de 10 mL contenant du toluène;
5. Rincer à trois reprises une seringue de 50 µl avec le solvant de toluène;
6. Rincer de nouveau à trois reprises la seringue de 50 µl dans la solution d'hexadécane radiomarquée;
7. À l'aide de la seringue de 50 µl, prélever 33 µl de la solution d'hexadécane radiomarquée et la déposer dans le vial ambré de 1.8 mL préparé à l'étape 3;
8. Homogénéiser la solution d'hexadécane en effectuant treize inversions du vial ambré de 1.8 mL;
9. Identifier cette solution d'hexadécane en notant sa concentration de 1,25 mg/l;

10. À l'aide de la seringue de 25 μ l, prélever 12,5 μ l de la solution d'hexadécane 1,25 mg/l et l'injecter dans un vial à scintillation contenant 10 mL de cocktail. Analyser au compteur en prenant le soin d'inclure un blanc (liquide à scintillation seulement). On devrait obtenir un compte de 200 000 DPM.

3.3.2. Préparation de la solution radioactive d'hexadécane 2,5 mg/l

1. Sortir la solution d'hexadécane du réfrigérateur à 4 °C au moins une heure avant son utilisation;
2. Rincer à trois reprises la seringue de 1000 μ l avec la solution d'hexadécane filtrée;
3. À l'aide de la seringue de 1000 μ l, déposer 780 μ l d'hexadécane froid filtrée dans un vial ambré de 1.8 mL et le bouchonner;
4. Préparer un bécher de 10 mL contenant du solvant de toluène;
5. Rincer à trois reprises une seringue de 50 μ l avec le solvant de toluène;
6. Rincer de nouveau à trois reprises la seringue de 50 μ l dans la solution d'hexadécane radiomarquée;
7. À l'aide de la seringue de 50 μ l, prélever 33 μ l de la solution d'hexadécane radiomarquée et la déposer dans le vial ambré de 1.8 mL préparé à l'étape 3;
8. Homogénéiser la solution d'hexadécane en effectuant treize inversions du vial ambré de 1.8 mL;
9. Identifier cette solution d'hexadécane en notant sa concentration de 2,5 mg/l;
10. À l'aide de la seringue de 25 μ l, prélever 25 μ l de la solution d'hexadécane 2,5 mg/l et l'injecter dans un vial à scintillation contenant 10 mL de cocktail. Analyser au compteur en prenant le soin d'inclure un blanc (liquide à scintillation seulement). On devrait obtenir un compte de 200 000 DPM.

3.4. Ajout de la solution d'hexadécane aux microcosmes

1. Préparer un bécher de 10 mL contenant de l'hexadécane froid;
2. Rincer à trois reprises une seringue de 25 μ l dans l'hexadécane;

3. Rincer à trois reprises la seringue de 25 μ l dans la solution d'hexadécane radiomarquée de 1,25mg/l;
4. À l'aide de cette seringue, prélever 12,5 μ l et l'injecter dans un microcosme identifié *1,25 mg/l et hexadécane chaud*;
5. Répéter l'étape 4 pour tous les microcosmes portant la même identification (20 microcosmes en tout);
6. Répéter les étapes 2, 3, 4 et 5 pour la solution d'hexadécane radiomarquée de 2,5 mg/l, mais en prélevant et injectant cette fois 25 μ l de cette solution dans chaque microcosmes identifiés *2,5 mg/l et hexadécane chaud*;
7. À l'aide de la seringue de 25 μ l, ajouter 12,5 μ l d'hexadécane froid dans les microcosmes portant l'identification *1,25 mg/l et hexadécane froid* (8 microcosmes en tout);
8. À l'aide de la seringue de 25 μ l, ajouter 25 μ l d'hexadécane froid dans les microcosmes portant l'identification *2,5 mg/l et hexadécane froid* (8 microcosmes en tout).

3.5. Échantillonnage et titration des solutions de KOH

Consulter le PSO A10 pour la procédure d'échantillonnage des microcosmes.

Consulter le PE 42A pour la procédure de titrage.

On échantillonne **seulement** les 10 micocosmes spécialement identifiés pour la mesure du CO₂ on remplace simplement le KOH dans les autres microcosmes.

1. À l'aide de la seringue en verre de 2,5 mL, prélever précisément 1 mL de KOH que l'on place dans un vial à scintillation contenant 10 mL de cocktail à scintillation. Un vial contenant 1mL de KOH et 10 mL de cocktail servira de blanc;
2. Toujours à l'aide de la seringue en verre de 2,5 mL, prélever le reste de la solution de KOH pour la titration. Pour chaque microcosme, noter le volume précis de la solution de KOH prélevée.

3.6 Procédure pour le sacrifice des microcosmes contenant les solutions d'hexadécane chaud

Chaque sacrifice comprendra 5 bouteilles sérologiques dont une bouteille non-contaminée qui servira de blanc pour les différentes analyses au compteur à scintillation. L'identification des vials à scintillation est présentée dans le tableau suivant.

Tableau A3.2 Identification des vials à scintillation

Identification	Description du contenu du vial
LB#	Solution de lavage par l'hexane de la bouteille sérologique #
S#a	Portion du surnageant contenant la phase organique du tube en corex #
S#b	Première moitié de la portion du surnageant contenant la phase aqueuse du tube en corex #
S#c	Seconde moitié de la portion du surnageant contenant la phase aqueuse du tube en corex #
C#a	Première moitié du culot solubilisé du tube #
C#b	Seconde moitié du culot solubilisé du tube #
LC#	Solution de lavage par l'eau saline 8,5 % du tube en corex #

Note : # est le numéro inscrit sur le microcosme.

3.6.1 Centrifugation des surnageants et extraction liquide-liquide de l'hexadécane résiduel dans les microcosmes

1. Dans un bécher de 50 mL, ajouter environ 30 mL d'hexane;
2. À l'aide d'une pince à désertir, désertir les microcosmes;
3. Identifier 5 tubes en corex de 25 mL de la même façon que les microcosmes;
4. À l'aide d'une pince, retirer les tubes de 5 mL et rincer l'extérieur de chaque tube avec 1 mL d'hexane directement au dessus du vial à scintillation identifié « LB# »;
5. Vider le contenu de chacun des microcosmes dans le tube en corex de 25 mL correspondant et le fermer;

6. Centrifuger les tubes à 4500 RPM pendant 10 minutes à la température ambiante;
Les étapes 5 à 10 peuvent être réalisées pendant la centrifugation.
7. À l'aide d'une pipette automatique de 5 mL, prélever 5 mL d'hexane à verser dans chaque bouteille sérologique de 120 mL de manière à rincer entièrement la paroi interne (cette étape permet de solubiliser l'hexadécane résiduel du microcosme) et jeter l'embout de la pipette;
8. Vider le contenu de la bouteille sérologique dans le même vial à scintillation utilisée à l'étape 4 identifié « LB# », y ajouter 10 mL de cocktail à scintillation, fermer le vial et agiter vigoureusement pour bien mélanger les solutions;
9. Se servir du vial correspondant au microcosme non contaminé comme blanc;
10. Placer les vials à scintillation en commençant par le blanc sur le support adapté et lancer l'analyse au compteur à scintillation.

3.6.2. Récupération du surnageant des tubes en corex de 25 mL

1. Prendre les 14 vials à scintillation identifiés par la lettre S;
2. Récupérer les tubes en corex de 25 mL de la centrifugeuse, les poser délicatement sur un support à tubes de 24 places et ouvrir les tubes;
3. À l'aide d'une pipette automatique de 5 mL, verser lentement 2 mL d'hexane dans le tube en corex de 25 mL de manière à rincer entièrement la paroi interne du tube (cette étape permet de solubiliser l'hexadécane à la surface du surnageant) et jeter l'embout de la pipette;
4. Centrifuger de nouveau à 4500 RPM pendant 10 min. à la température ambiante;
5. À l'aide d'une pipette graduée en verre de 10 mL, récupérer la phase organique et le surnageant en prélevant par le dessus *Attention de ne pas entraîner des particules du culot et conserver la pipette de verre pour la récupération du culot au point 3.6.3.;*
6. Verser la phase aqueuse à partager également dans les vials S#b et S#c;
7. Verser la phase organique dans le vial S#a;

8. Ajouter aux vials S#a et S#b et S#c 10 mL de cocktail à scintillation, fermer et agiter vigoureusement;
9. Se servir des vials correspondants au microcosme non contaminé comme blanc;
10. Prendre deux supports adaptés, placer les vials à scintillation identifiés S#a sur le support adapté et les vials à scintillation identifiés S#b et S#c sur l'autre support adapté. Lancer l'analyse au compteur à scintillation.

3.6.3. Récupération du culot des tubes de corex de 25 mL

1. Prendre les 18 vials à scintillation identifiés par la lettre C;
2. À l'aide d'une pipette automatique de 10 mL, prélever 10 mL de solution saline 8,5 % (p/v) et les verser dans chaque tube en corex de 25 mL, fermer et vortexer les tubes pendant 10 secondes afin de resolubiliser le culot;
3. Verser également le contenu des tubes en corex dans les vials C#a et C#b;
4. À l'aide d'une pipette automatique P5000, verser 5 mL de la solution saline 8,5 % dans les tubes en corex de 25 mL de manière à rincer entièrement la paroi interne du tube (cette étape permet de solubiliser l'hexadécane restant adsorbé à la paroi des tubes en corex) et jeter l'embout de la pipette;
5. Vider le contenu du tube en corex un vial à scintillation identifié LC#a;
6. Répéter deux fois l'étape 4 et vider le contenu du tube en corex dans les vials identifiés. LC#b et LC#c;
7. Ajouter à tous les vials préparés précédemment 10 mL de cocktail à scintillation, fermer et agiter vigoureusement;
8. Se servir du vial provenant du tube en corex non contaminé comme blanc;
9. Prendre deux supports adaptés dont l'un servira pour les vials identifiés C#a et C#b et l'autre pour les vials identifiés LC#a, LC#b et LC#c. Placer les vials à scintillation sur les supports adaptés et lancer l'analyse au compteur à scintillation.

4. RÉFÉRENCE(S)

1. René P. Schwarzenbach, Philip M. Gschwend, Dieter M. Imboden.(1993)
Environmental Organic Chemistry. John Wiley & Sons Inc., New York, USA, 681p.
2. Jan D. Van Elsas, Jack T. Trevors and Elizabeth M. H. Wellington (1997)
Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 664p.

5. RECOMMANDATION(S)

- Voir le protocole PSO A10 pour la préparation des microcosmes.
- Voir le protocole PSO S2 pour la décontamination des microcosmes.

Annexe 4 Photos : tests de biodégradation en phase liquide

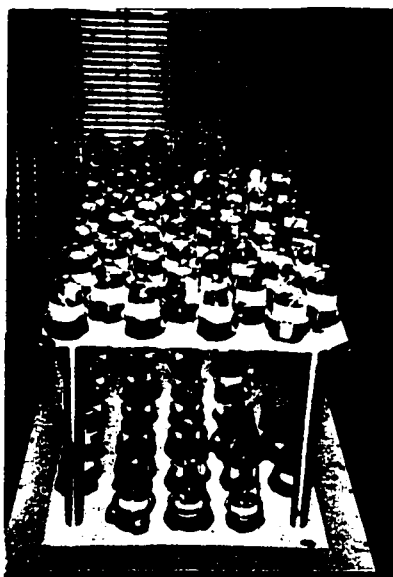
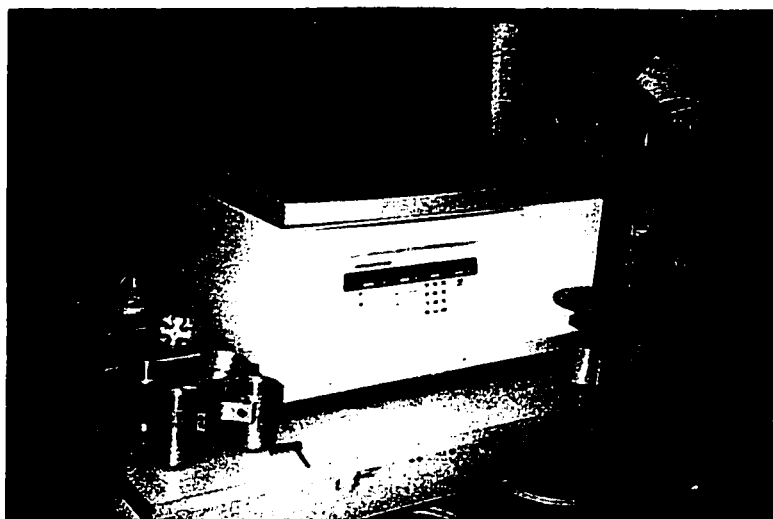


Table d'agitation des microcosmes



Tube à centrifugation



Centrifugeuse



Homogénéiseur (Extraction d'ADN du sol)

**Annexe 5 PE-42E: Extraction et quantification de l'hexadécane à partir d'un échantillon
de sol**

		PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole # :PE42E		Nombres de pages :	
Version :1		Date :29 avril 2001	
Auteur(s): <u>Olivier Schoefs</u> <u>Lucie Jean</u>			
Approuvé par : <u>Manon Leduc</u> <u>Réjean Sansom</u> _____		Signatures : Date : ☒ _____ ☒ _____ ☐ _____	

Titre : Extraction au Soxtec et quantification au GC-FID de l'hexadécane à partir d'un échantillon de sol.
Mots clés : Extraction, Soxtec, GC.

1. OBJECTIF

L'objectif de cette expérience est d'extraire et de quantifier l'hexadécane d'un échantillon de sol.

2. MATÉRIEL

- GC-FID (modèle CP-3380, Varian, USA);
 - Colonne capillaire CP-SIL 8 CB Low Bleed/MS, 25m x 0,32 mm;
 - Ferrules pour colonnes (28-694581-01, Varian, USA);
 - Septum pour injecteur (Thermogreen™, 11,5 mm, Supelco, USA);
 - Seringue d'injection avec trou latéral (03-91898700, Varian, USA);
- Auto-échantillonneur pour le GC (modèle CP-8200 autosampler, Varian, USA)
- Four réfractaire permettant d'atteindre 650°C;
- Unité d'extraction Soxtec (modèle 1043 Etraction Unit, Tecator);
- Pierres à ébullition;
- Hotte chimique;
- Tubes d'extraction en cellulose (ID :26 mm - EL : 60 mm, Whatman);
- 6 fioles jaugées de 25 mL avec bouchon;
- Pipettes Pasteur;
- 1 bécher de 500 mL pour stocker de l'hexane;
- 1 bécher de 10 mL pour stocker de l'hexadécane;
- pince;
- Vials à GC de 1,8 mL;
- Seringues de 10, 50 et 100 µl;
- Pipette automatique P10 mL (Gilson);
- Sulfate de magnésium (Anachemia)
- Hexadécane (Sigma, H-0255);
- Hexane (Anachemia);
- Acétone (lavage);
- Balance analytique avec une précision de ± 0.002 g (Mettler Toledo AB204 ou PB302, Switzerland);

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Manipulations requises 48 heures avant...

3.1.1 Conditionnement du GC-FID

*La mise en opération du GC-FID requiert d'abord un premier temps l'ouverture des gaz. Pour ce faire, on doit ouvrir **seulement** la valve fixée au cylindre. **On ne doit jamais toucher au régulateur des gaz***

1. Ouvrir la valve du cylindre de l'hélium ($P_{\text{hél.}} = 60 \text{ psi}$);
2. Ouvrir le GC en appuyant sur la touche située vers l'arrière du GC ;
3. Au niveau de l'injecteur, dévisser le module contenant le septum avec l'outil approprié;
4. Retirer le septum et le jeter;
5. À l'aide d'une pince, placer un septum neuf (rincé préalablement à l'hexane) au niveau de l'injecteur;
6. Revisser le module **sans forcer**;
7. Programmer le GC (méthode 4 actuellement) :
 - Température initiale : 90°C pendant 2 min;
 - Température finale : 200°C;
 - Rampe : 20°C/min;
 - Température de l'injecteur : 320°C;
 - Température du détecteur : 300°C.
8. Programmer l'auto-échantillonneur :
 - Méthode « single » (lumière orange allumée);
 - Volume d'injection : 1 µL;
 - Vitesse d'injection : 10 µL/s;
 - Solvant : Hexane.

3.1.2 Conditionnement du four servant comme dessiccateur

Ce four est situé au 5^{ième} étage. Allumer le four et le régler à 650°C;

3.2 Manipulations requises 12 heures avant l'expérience

1. À trois reprises, ajouter environ 20 g de sulfate de magnésium dans un coupelle en céramique;
2. À l'aide d'une pince, déposer les coupelles dans le four en prenant soin de ne pas se brûler et de les déposer délicatement (la plateforme n'est pas uniforme);
3. Pour le GC, ouvrir la valve du cylindre contenant l'air ($P_{\text{air}} = 60 \text{ psi}$) et l'hydrogène ($P_{\text{hyd.}} 40 \text{ psi}$);
4. Allumer le détecteur;
5. Après quelques minutes, vérifier les débits avec le débitmètre :
 - Détecteur : 360 mL/min ;
 - Purge injecteur : 2-3 mL/min;
 - Split : 50 à 80 mL/min.

À noter qu'une variation au détecteur de $\pm 5 \text{ mL/min}$ nous indique qu'il y a un problème au niveau des gaz. On doit corriger l'erreur, car les analyses seront erronées.

3.3 En arrivant « tôt » le matin...

1. Retirer le sulfate de magnésium du four et le laisser refroidir dans le dessicateur;
2. Allumer l'unité de réfrigération du Soxtec (température de consigne -12°C) en allumant d'abord la pompe;
3. Allumer l'unité chauffante du Soxtec (température de consigne 140°C);
4. Vérifier les débits du GC comme à l'étape 3 du point 3.2;
5. Si les débits ne sont pas corrects, faire un RESET du GC en le fermant, puis fermer et réouvrir tous les gaz.

3.4 Extraction de l'hexadécane

3.4.1 Préparation des échantillons de sol

L'unité d'extraction Soxtec permet l'analyse de 6 échantillons à la fois. Or, on débute la préparation des échantillons de sol pour 20 % CRC et 50 % CRC, puis on termine avec l'échantillon de 80 % CRC.

1. Placer les tubes poreux dans les adaptateurs métalliques en prenant soin de mettre en contact le bord des tubes et les butoirs des adaptateurs; puis placer les tubes sur le support approprié;
2. Écraser le sol à analyser dans un mortier afin d'obtenir une texture homogène;
3. Peser directement dans chaque tube 5 g ($\pm 0,01$ g) de sol à analyser;
 - a. 3 fois 5g de l'échantillon à 20% de la CRC;
 - b. 3 fois 5g de l'échantillon à 50% de la CRC;
 - c. 3 fois 5 g de l'échantillon à 80 % de la CRC
 - d. Utiliser le reste du sol pour faire un poids sec.
4. Peser dans chaque tube environ 5g de sulfate de magnésium;
5. À l'aide d'une spatule en métal, mélanger le sol et le sulfate de magnésium;
6. À l'aide d'une pipette pasteur, bien rincer la spatule avec de l'hexane directement au dessus du tube poreux.

3.4.2 Extraction au Soxtec

1. À l'aide d'un cylindre gradué de 50 mL, verser environ 30 mL d'hexane dans les béchers en aluminium contenant quelques pierres à ébullition;
2. Placer les tubes poreux dans l'extracteur en position rinçage;
3. Placer les béchers en aluminium et sceller l'extracteur;
4. Placer les tubes poreux en position d'ébullition (« boiling ») et les laisser dans cette position pendant 20 min; pendant ce temps, commencer la préparation des échantillons standards (point 3.5);
5. Placer ensuite les tubes en position de rinçage (« rinsing ») et les laisser dans cette position pendant 30 min;
6. Éteindre l'unité chauffante du Soxtec et attendre 5 min.

3.4.3 Identification des vials à GC

Identifier les vials d'après le tableau A5.1.

Tableau A5.1 Identification des vials

Indentification	Description du contenu
Std05	Standard 5µl dans 25 mL
Std20	
Std35	
Std50	
Std75	
20a-1	Echantillon 1ère extraction
20b-1	
20c-1	
50a-1	
50b-1	
50c-1	
80a-1	
80b-1	
80c-1	
20a-2	Echantillon 2ème extraction
20b-2	
20c-2	
50a-2	
50b-2	
50c-2	
80a-2	
80b-2	
80c-2	

3.4.4 Préparation des échantillons à injecter au GC

1. À l'aide de la pipette automatique P10 mL, pipetter le contenu des béchers en aluminium et transférer dans des fioles jaugées de 25 mL préalablement identifiées;
2. Remettre environ 30 mL d'hexane propre dans chaque bécher et faire subir aux mêmes tubes poreux une deuxième extraction (point 3.4.2);
3. À l'aide d'une pipette pasteur, compléter le volume avec de l'hexane jusqu'au trait jauge;
4. Bouchonner la fiole jaugé de 25 mL et bien mélanger en inversant à plusieurs reprises;
5. À l'aide d'une pipette Pasteur, pipetter la solution contenue dans chaque ballon dans un vial à GC pour remplir le vial à GC de 1,8 mL à environ 3/4 de sa capacité; fermer aussitôt le vial afin d'éviter toute évaporation; préparer des vials en duplicata;
6. Répéter le point 3.4.3 pour la deuxième extraction.

Répéter toute la section 3.4 pour le sol à 80% de la CRC.

3.5 Préparation des échantillons standards

1. Identifier 5 fioles jaugées de 25 mL de la façon suivante : 5 μ l, 20 μ l, 35 μ l, 50 μ l, 75 μ l;
2. À l'aide de la pipette automatique P10 mL, disposer 10 mL d'hexane dans chaque fiole;
3. À l'aide de la seringue 50 μ l, disposer 5, 20, 35 et 50 μ l d'hexadécane dans les fioles correspondantes;
4. À l'aide de la seringue 100 μ l, disposer 75 μ l d'hexadécane dans la fiole correspondante;
5. Agiter manuellement les fioles;

6. À l'aide d'une pipette pasteur, compléter le volume jusqu'au trait jauge avec de l'hexane;
7. Bouchonner les fioles et agiter en effectuant des inversions;
8. À l'aide d'une pipette Pasteur, pipetter la solution contenue dans chaque ballon dans un vial à GC pour remplir le vial à environ 3/4 de sa capacité; fermer aussitôt le vial afin d'éviter toute évaporation; préparer des vials en duplicata.

3.6 Analyse de l'hexadécane au GC

Voir instructions d'utilisation du GC.

**Annexe 6 PSO-A12 Dénombrement des micro-organismes hétérotrophes par la méthode
du nombre le plus probable ; PE-42G Dénombrement des micro-organismes
hydrocarbonoclastes par la méthode du nombre le plus probable**

		PROTOCOLE STANDARD D'OPÉRATION	
Protocole # : PSO-A12		Nombres de pages : 8	
Version : 1		Date : 28 août 1996	
AUTEUR(S): PASCALE PICARD 			
Approuvé par : Manon Leduc 		Signatures : Date : ☐ _____ ☐ _____ ☐ _____	

Titre : Dénombrement des micro-organismes hétérotrophes par la méthode du nombre le plus probable (NPP).
Mots clés : Dénombrement, NPP, hétérotrophes.

1. Domaine d'application

Cette méthode de dénombrement s'applique à toute substance pouvant contenir des micro-organismes (ex. échantillons de sols et d'eaux).

2. Principes de la méthode

Il s'agit d'une estimation de la densité moyenne de micro-organismes hétérotrophes dans un échantillon donné, par un test statistique. L'échantillon est dilué en série, et des aliquots de chaque dilution sont incubés dans un milieu de croissance dans des tubes. Il y a croissance dans les tubes d'incubation lorsqu'un organisme ou plus sont présents. Le nombre de micro-organismes hétérotrophes dans l'échantillon est déterminé d'après le nombre de tubes où il y a eu croissance pour chaque dilution et en se servant des tables de l'index NPP.

3. Matériel

- solution saline 0.85 % dans l'eau distillée, soit NaCl 8.5 g/L
- Nutrient Broth (Becton Dickinson, MD, USA)
- eau distillée (pH 7)
- bouteilles à dilution de 150 mL (1 par dilution), et bouchons
- tubes de verre à bouchon vissé de 15 mL (5 par dilution + 2 pour les contrôles), et bouchons
- pipettes stériles de 10 mL
- vortex
- dispensettes 10 et 25 mL (dispensette 25 mL à emprunter au local A-660.1)
- micropipette 1000 μ L
- embouts à micropipette stériles

Pour un dénombrement sur un échantillon de sol, il faut en plus :

- matériel pour déterminer le taux d'humidité (pso A7)
- 30 billes de verre de 3 mm de diamètre (glass beads solids, Fisher) par échantillon
- une cupule en aluminium et deux spatules par échantillon
- agitateur Wrist Action (Burrel, PA, USA)

- balance (Mettler Toledo PB302)
- éthanol 70%

4. Mode Opérateur

Un schéma opératoire est présenté en annexe.

4.1 Choix du nombre de dilutions

Si la densité de micro-organismes dans l'échantillon est inconnue, il faudra effectuer 7 dilutions de la suspension primaire (donc 8 bouteilles à dilution identifiées 10^0 à 10^{-7} , et 5x8 tubes identifiés de 10^{-1} à 10^{-8} plus 2 tubes de contrôle).

Si la plage de densité microbienne est connue, il est possible de n'effectuer que trois dilutions pour obtenir le NPP. Le tableau 4.1 indique quelles dilutions effectuer dans les tubes suivant la densité prévue. Mais il faudra quand même préparer toutes les dilutions successives dans les bouteilles (3e colonne du tableau A6.1).

Tableau A6.1 dilutions à effectuer suivant la plage de densité microbienne lorsqu'elle est connue

densité de micro-organismes prévue/100 mL ou/10 g de sol	dilution dans les tubes	bouteilles à préparer
20 à 16 090	10^{-1} - 10^{-2} - 10^{-3}	10^0 à 10^{-2}
200 à 160 900	10^{-2} - 10^{-3} - 10^{-4}	10^0 à 10^{-3}
2000 à 1 609 000	10^{-3} - 10^{-4} - 10^{-5}	10^0 à 10^{-4}

4.2 Préparation des tubes

- 1- prendre 5 tubes par dilution souhaitée plus 2 tubes pour les contrôles
- 2- préparer une solution de Nutrient Broth 8 g/L dans de l'eau distillée
- 3- placer 9 mL de cette solution dans chaque tube à l'aide de la dispensette de 10 mL.
Calibrer avant la dispensette avec un cylindre de 10 mL.
- 4- ajouter 1 mL de solution saline 0.85% dans chacun des 2 tubes de contrôle
- 5- vérifier le pH dans les tubes de contrôle, il doit être de 7.0 ± 0.2
- 6- fermer les tubes, les autoclaver 20 minutes (121 °C, 103.4 kPa) et les laisser refroidir
- 7- identifier les tubes (on peut identifier avant autoclavage mais le feutre s'efface)

4.3 Préparation des dilutions en série

Pour un échantillon de sol

- 1- déterminer le taux d'humidité du sol (voir pso A7)
- 2- préparer la bouteille pour la suspension primaire (dilution 10^0): mettre 95 mL de solution saline avec la dispensette 25 mL dans la bouteille identifiée 10^0 , et ajouter 30 billes de verre. On peut aussi mettre les 95 mL en remplissant un ballon jaugé de 100 mL et en enlevant 5 mL à la pipette.
- 3- mettre 90 mL de solution saline dans chaque autre bouteille.
- 4- fermer et autoclaver toutes les bouteilles 20 minutes (121 °C, 103.4 kPa); les laisser refroidir
- 5- identifier les bouteilles (10^0 , 10^{-1} , ...)

travailler dès maintenant en conditions stériles- passer les goulots des tubes et des bouteilles à la flamme après ouverture et avant fermeture

- 6- stérilisation du matériel : placer une cupule en aluminium et deux spatules sous la hotte laminaire, et actionner la lumière UV pendant 10 minutes
- 7- mettre en place la balance sous la hotte (lumière normale), ajuster son niveau et la calibrer (voir pso E1). Nettoyer le plateau de la balance avec de l'éthanol 70%
- 8- peser approximativement 10 g de sol (noter le poids exact) dans la cupule
- 9- ajouter tout le contenu de la cupule dans la bouteille de dilution 10^0 avec l'autre spatule. Si le sol est difficile à décoller de la cupule et de la spatule, rincer la cupule et la spatule avec un peu de solution de la bouteille
- 10- agiter la bouteille au Wrist Action pendant 30 minutes
- 11- préparer les dilutions successives :
 - ouvrir la bouteille identifiée 10^{-1} et passer le goulot à la flamme
 - brasser manuellement la bouteille 10^0 pendant 10 secondes, ouvrir, passer le goulot à la flamme
 - rebrasser, pipeter 10 mL avec une pipette neuve et les placer dans la bouteille identifiée 10^{-1}
 - passer les goulots à la flamme et fermer. La bouteille 10^{-1} est préparée
 - répéter le point 11 en utilisant la nouvelle dilution préparée comme inoculum, jusqu'à la dernière dilution voulue

Pour un échantillon aqueux

- 1- mettre 90 mL de solution saline dans chaque bouteille de 150 mL avec la dispensette 25 mL, ou bien avec un ballon jaugé à 100 mL auquel on aura enlevé 10 mL à la pipette
- 2- fermer, autoclaver 20 minutes (121 °C, 103.4 kPa) et laisser refroidir
- 3- identifier les bouteilles de 150 mL (10^{-1} , 10^{-2} , ...). La suspension primaire, soit la dilution 10^0 , correspond à l'échantillon initial à tester

Travailler dès maintenant en conditions stériles- passer les goulots des tubes et des bouteilles à la flamme après ouverture et avant fermeture

4- préparer les dilutions successives:

- ouvrir la bouteille identifiée 10^{-1} et passer le goulot à la flamme
- brasser manuellement la bouteille 10^0 pendant 10 secondes, ouvrir, passer le goulot à la flamme
- rebrasser, pipeter 10 mL avec une pipette neuve et les placer dans la bouteille identifiée 10^{-1}
- passer les goulots à la flamme et fermer. La bouteille 10^{-1} est préparée
- répéter le point 4 en utilisant la nouvelle dilution préparée comme inoculum, jusqu'à la dernière dilution voulue

4.4 Inoculation des tubes

Toujours travailler en conditions stériles- passer les goulots à la flamme

1- brasser la bouteille 10^0 pendant 10 secondes

- pipeter 1 mL à la micropipette, en continuant de brasser
- placer dans un tube identifié 10^{-1}

Répéter cette opération dans les quatre autres tubes identifiés $10^{-1} \Rightarrow$ on obtient les 5 aliquots de la dilution 10^{-1} .

Évidemment, si la plage de densité de micro-organismes est connue et qu'on n'a pas besoin des tubes 10^{-1} , on ne les fait pas!

2- reboucher les tubes, et les agiter 3 secondes au vortex

3- changer d'embout et répéter les points 1 et 2 avec chaque autre bouteille à dilution : avec la bouteille 10^{-1} on obtient les 5 tubes 10^{-2} , et ainsi de suite

4- incuber tous les tubes à 30°C , y compris les deux contrôles, pendant 7 jours ou jusqu'à ce que les résultats ne changent plus avec le temps

4.5 Décontamination des tubes après lecture des résultats

Cette étape est obligatoire afin de ne pas infecter le réseau d'égout. Tous les tubes doivent être autoclavés 20 minutes (121°C, 103.4 kPa). Leur contenu refroidi est ensuite jeté à l'évier.

5. Calculs

1- après la période d'incubation, observer chaque tube (l'inverser 2 fois pour mieux observer la présence de turbidité). Si une turbidité est notée, le tube est compté positif, si il est resté limpide, comme les contrôles, il est compté négatif. Noter pour chaque dilution le nombre de tubes positifs sur les 5 incubés, sur un tableau récapitulatif (exemple au tableau 5.1).

2- sélectionner la combinaison de positifs : trois dilutions successives sont choisies pour déterminer l'index NPP, de la manière suivante : choisir la plus grande dilution qui donne un résultat positif maximum (5/5 est le maximum, 0/5 le minimum) et les deux dilutions suivantes. Les nombres de tubes positifs pour chacune de ces trois dilutions constituent la combinaison de positifs (voir l'*exemple a*).

exception 1: il y a un résultat positif à une dilution plus grande que la dernière choisie par la règle précédente : additionner ce résultat à la dernière dilution, ce qui donne la même combinaison que l'*exemple c*.

exception 2 : choisir les trois dilutions de manière à retrouver le résultat positif "maximum" au centre des trois dilutions.

Tableau A6.2 Exemple de tableau de résultats

<i>exemples</i>	dilution dans les tubes				combinaison de positifs	Index NPP	cellules/100 mL ou /10 g sol
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}			
<i>A</i>	5/5*	5/5	2/5	0/5	5-2-0	50	$50 \cdot 10^2 = 5000$
<i>B</i>	5/5	4/5	2/5	0/5	5-4-2	220	$220 \cdot 10^1 = 2200$
<i>C</i>	5/5	3/5	2/5	0/5	5-3-2	140	$140 \cdot 10^1 = 1400$
<i>exception 1</i>	5/5	3/5	1/5	1/5	5-3-2	140	$140 \cdot 10^1 = 1400$
<i>exception 2</i>	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0	2	$2 \cdot 10^1 = 20$

* (nombre de tubes positifs)/(nombre de tubes ensemencés)

3- noter l'index NPP correspondant à cette combinaison à l'aide du tableau A6.3.

4- Multiplier l'index NPP par 10^x , la plus petite dilution de la combinaison de positifs étant 10^{-x} .

exemple a : les dilutions de la combinaison sont 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} . La plus petite dilution est donc 10^{-2} , il faut alors multiplier l'index NPP par 10^{-2} , soit $50 \cdot 10^2 = 5000$.

Ce résultat correspond au nombre de micro-organismes hétérotrophes par 100 mL d'échantillon liquide, ou par 10 g de sol pesé (soit le poids exact pesé).

5- On exprime les résultats en fait en nombre de micro-organismes par mL de liquide, ou par g SEC de sol, connaissant le taux d'humidité du sol déterminé en début d'expérience.

Tableau A6.3 Index NPP avec une limite de confiance de 95% selon les combinaisons de résultats positifs, lorsque 5 tubes par dilution sont utilisés

Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits		Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper			Lower	Upper
0-0-0	< 2	—	—	4-2-0	22	9.0	56
0-0-1	2	1.0	10	4-2-1	26	12	65
0-1-0	2	1.0	10	4-3-0	27	12	67
0-2-0	4	1.0	13	4-3-1	33	15	77
				4-4-0	34	16	80
1-0-0	2	1.0	11	5-0-0	23	9.0	86
1-0-1	4	1.0	15	5-0-1	30	10	110
1-1-0	4	1.0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-1	6	2.0	18	5-1-0	30	10	120
1-2-0	6	2.0	18	5-1-1	50	20	150
				5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1.0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2.0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2.0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3.0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3.0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5.0	29	5-3-2	140	60	360
3-0-0	8	3.0	24	5-3-3	170	80	410
3-0-1	11	4.0	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4.0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6.0	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6.0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7.0	40	5-4-4	350	160	820
4-0-0	13	5.0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7.0	45	5-5-1	300	100	1300
4-1-0	17	7.0	46	5-5-2	500	200	2000
4-1-1	21	9.0	55	5-5-3	900	300	2900
4-1-2	26	12	65	5-5-4	1600	600	5300
				5-5-5	≥ 1600	—	—

(source : Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, APHA, AWWA, WEF, ed., 18th edition, 1992)

6. Limites de la méthode

La précision de la méthode est assez faible, mais elle a l'avantage d'être une méthode statistique. Si un échantillon contient 100 micro-organismes/100 mL, la probabilité que les cinq tubes de dilution 10^{-1} donnent tous des résultats négatifs (*i.e.* aucune croissance) est de 1%.

Cette méthode tend à surestimer la densité bactérienne réelle.

Il y aura sous-estimation du nombre de micro-organismes si certains facteurs inhibant la croissance de la biomasse sont présents, ou encore si les bouteilles ne sont pas suffisamment brassées pour homogénéiser les différentes dilutions avant l'inoculation dans les tubes.

7. Références

APHA, AWWA, WEF, ed., 1992. Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 18th edition.

Cochran W. G., 1950. Estimation of bacterial density by means of the «most probable number», *Biometrics*, june 1950.

8. Notes

Autoclavage des tubes et des bouteilles : on peut ne pas visser complètement les bouchons et les fermer correctement à la sortie de l'autoclave, mais il y a un risque d'évaporation durant l'autoclavage. Si au contraire les bouchons sont bien fermés, il y a un risque de bris. Le mieux est de choisir une fois pour toutes une des 2 méthodes et de l'appliquer constamment. Une méthode encore meilleure serait d'autoclaver les tubes et bouteilles vides et de les remplir stérilement avec les solutions autoclavées à par. Cependant, la dispensette ne s'autoclave pas, ce qui rend le remplissage à la pipette fastidieux!

Le délai standard entre le recueillement d'un échantillon aqueux sur le site et l'analyse est idéalement inférieur à 30 heures, en conservant l'échantillon à 4°C.

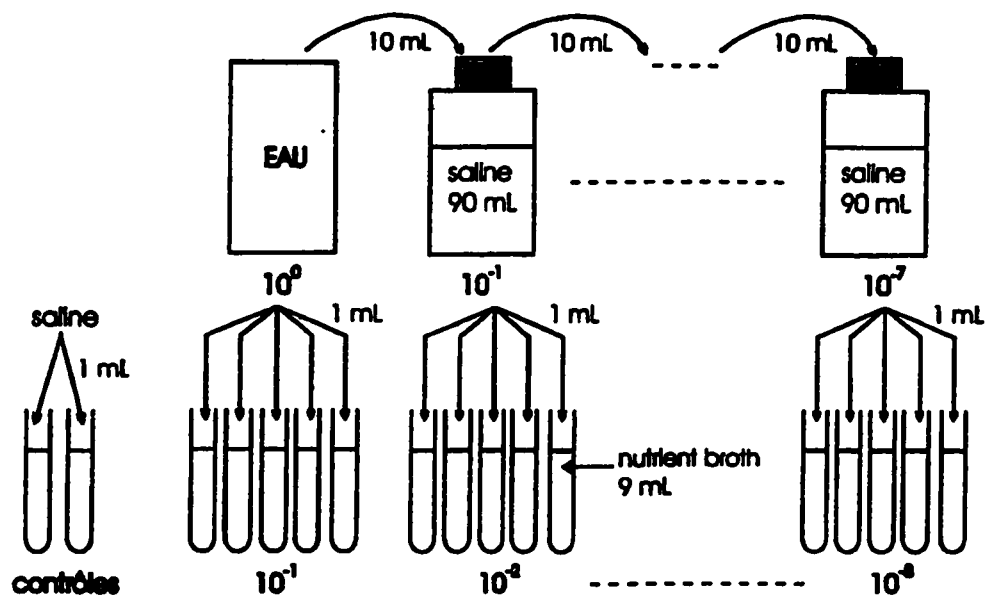
L'extraction des micro-organismes du sol dans la suspension primaire peut nécessiter un temps d'agitation supérieur à 30 minutes si les micro-organismes sont très attachés (par ex. sur un sol argileux).

Il arrive que la croissance soit rapide et qu'une lecture puisse s'effectuer après 48 heures d'incubation. Cependant, il est préférable de confirmer ce résultat en faisant une nouvelle lecture après les 7 jours d'incubation.

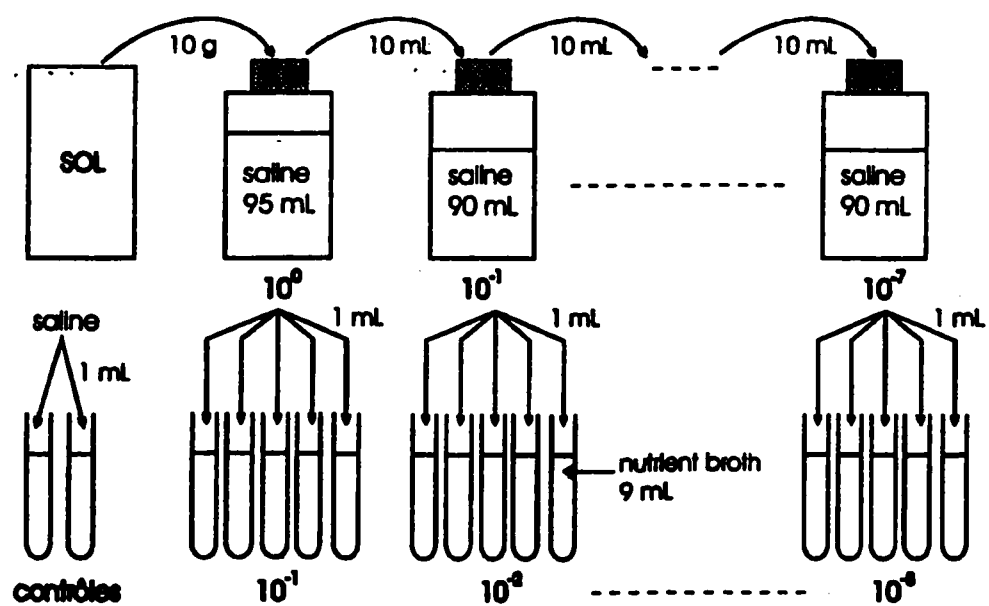
La méthode est réalisable avec 3 tubes par dilution au lieu de 5, mais la précision en est affectée (voir pour plus de détails «Standard Methods for the examination of Water and Wastewater»). De plus la table d'index est différente de celle indiquée dans ce protocole.

Schéma opératoire

Échantillon d'eau



Échantillon de sol



		PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole # :PE-42G		Nombres de pages :	
Version :1		Date :15-03-01	
AUTEUR(S):<u>OLIVIER SCHOEFS</u> _____			
Approuvé par : Manon Leduc _____ _____ _____		Signatures : Date : ☐ _____ ☐ _____ ☐ _____	

Titre : Dénombrement des micro-organismes hétérotrophes et hydrocarbonoclastes dans des sols pollués aux hydrocarbures pétroliers par la méthode du nombre le plus probable (NPP).
Mots clés : Dénombrement, NPP hétérotrophes, hydrocarbonoclastes, hexadécane

1. Objectif(s)

L'objectif est d'évaluer, d'une part, le nombre total d'hétérotrophes et, d'autre part, le nombre de micro-organismes pouvant dégrader les hydrocarbures (hydrocarbonoclastes) dans un sol.

2. Matériels et méthodes

2.1 Matériel

- Matériel du PSO-A12.

Il faut en plus pour le dénombrement sélectif des hydrocarbonoclastes :

- micropipette 200µL et un embout approprié;
- n-hexadécane (Sigma) filtré à 0,45 µm;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Anachemia);
- KCl (Anachemia);
- KH_2PO_4 (Anachemia);
- K_2HPO_4 (Anachemia);
- NH_4NO_3 (Anachemia);
- Eau pure (résistivité 18,2 MΩ/cm).

2.2 Méthode

La méthode est semblable à celle du PSO-A12 à ceci près :

- Extraction des micro-organismes des sols : les bouteilles de 150 mL ont été agitées environ 30 min au Wrist Action. Ces suspensions primaires servent à inoculer les tubes pour les deux types de dénombrement.
- Méthode de dilution : Les dilutions sont réalisées en utilisant les bouteilles de 150 mL. La bouteille-mère, identifiée 10^0 , contient 10 g de sol, 95 mL d'eau saline et une trentaine de billes de verre. Les autres bouteilles, identifiées de 10^{-1} à 10^{-7} , contiennent 90 mL d'eau saline et une trentaine de billes de verre. Les dilutions ont lieu sous la hotte biologique et proche d'une flamme. Après agitation manuelle, un volume de 10 mL est successivement prélevé d'une bouteille à une autre de dilution plus élevée.
- Dénombrement sélectif des hydrocarbonoclastes : le milieu d'incubation est différent du milieu utilisé pour le dénombrement des hétérotrophes. Les tubes contiennent donc une solution minérale à un pH de 7 ayant la composition

suivante : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g/L), KCl (0,7 g/L), KH_2PO_4 (2 g/L), K_2HPO_4 (3,7 g/L), NH_4NO_3 (1 g/L), Mills et al., 1978 (milieu MMC sans NaCl). Sous la hotte, 75 μL d'hexadécane filtré sont introduit dans tous les tubes sauf 2 tubes témoin.

3. Références

Mills, A. L., Breuil, C. et Colwell, R. R. (1978) Enumeration of Petroleum-degrading Marine and Estuarine Microorganisms by the Most Probable Number Method. *Can. J. Microbiol.*, 24, 552-557.

Zajic, J. E., Supplisson, B. et Volesky, B. (1974). Bacterial Degradation and Emulsification of No 6 Fuel Oil. *Env. Sci. & Technol.*, 8(7), 664-668.

Annexe 7 PE-42F : Compte microbien par microscopie à épifluorescence

		PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole # :PE-42F		Nombres de pages : 11	
Version :1		Date :25-07-00	
Auteur(s): <u>Françoise Castegnier</u> <u>Lucie Jean</u> <u>Olivier Schoefs</u>			
Approuvé par : <u>Manon Leduc</u> <u>Réjean Samson</u> _____		Signatures : Date : ☐ _____ ☐ _____ ☐ _____	

Titre : Énumération directe des bactéries viables et totales par microscopie à épifluorescence à partir d'un échantillon de sol
Mots clés : Compte direct, bactéries viables et totales, <i>BacLight</i> [™] , échantillon de sol, microscopie à épifluorescence

1. OBJECTIF(S)

La méthode *BacLight*[™] est une méthode de coloration visant à estimer directement par épifluorescence le nombre de bactéries totales et viables d'un échantillon d'eau ou de sol. Cette méthode se distingue des méthodes conventionnelles par sa capacité à identifier un large spectre de types bactériens, et son insensibilité aux conditions de croissance et de coloration [1]. La plupart des méthodes de microscopie directe qui ont

été proposées comme alternatives aux méthodes de décompte sur gélose manquant de spécificité, et requièrent une période d'incubation ou de préparation [3].

Le *kit* de détermination de la viabilité bactérienne LIVE/DEAD *BacLight*™ développé par Molecular Probes Inc. utilise des mélanges de deux marqueurs d'ADN fluorescents: le SYTO® 9 et l'iodure de propidium. Ces deux réactifs sont préparés dans une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO).

Le SYTO® 9 et l'iodure de propidium diffèrent aussi bien par leur caractéristique spectrale que par leur capacité à pénétrer les cellules bactériennes viables. En effet, le réactif SYTO® 9 pénètre toutes les membranes bactériennes et les colore en vert fluorescent, tandis que l'iodure de propidium pénètre seulement les cellules des membranes endommagées. La combinaison des deux marqueurs produit des cellules fluorescentes rouges.

Le dénombrement des bactéries viables et totales est simple, rapide et fiable, et peut être obtenu en une seule étape de coloration. L'intensité de la fluorescence est élevée, avec un contraste très fort entre les cellules vertes et rouges, et n'affecte pas le fond qui demeure non-fluorescent [3].

2. MATÉRIEL

- Échantillon de sol prélevé depuis moins de 30 heures;
- *Kit* L-7007 LIVE/DEAD *BacLight*™ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) pour détermination de la viabilité bactérienne par microscopie à épifluorescence. Ce *kit* contient:
 - 2 solutions constituées des réactifs A et B déjà mélangés dans des proportions différentes:

Tableau A7.1 Description des 2 solutions du *kit L-7007*

# Solution	Volume réactif A ^a	Volume réactif B ^b	Volume de solvant
1	1.67 mM	1.67 mM	300 µL de diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO)
2	1.67 mM	18.3 mM	

^a réactif A: colorant SYTO® 9

^b réactif B: iodure de propidium

- Huile à montage pour lames (*mounting oil*) *BacLight™*
- Huile à immersion
- Solution saline (0.085% NaCl) stérilisée et filtrée sur 0.2 µm;
- 10 mL d'eau distillée stérile;
- Tubes Eppendorff 1.5 mL à microcentrifuger préalablement stérilisés;
- Montage de filtration Millipore pour analyse biologique:
 - Rampe à filtration multiple;
 - Support-entonnoir en verre de 15 mL;
 - Support de base en verre fritté;
 - Pince à ressort en aluminium anodisé;
 - Bouchon de silicone perforé;
 - Erlenmeyer de filtration;
 - Tubing de vacuum pour acheminement des liquides de filtration;
- Filtres Millipore noirs en polycarbonate, 0.2 µm Ø pores, 25 mm Ø (Millipore, # GTBP02500);
- Filtres Millipore blanc en cellulose, 0.8 µm Ø pores, 25 mm Ø (Millipore # AAWP02500);
- Petites pinces stériles;
- Lames et lamelles;
- Tige en verre stérile;
- Chronomètre;
- Pipettman de 1000 µl;
- Pipettman de 200 µl.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Préparation de la solution aqueuse

Avant de colorer les bactéries, il est nécessaire de les transférer du sol à une solution aqueuse. La technique d'extraction de la biomasse est la technique utilisée pour le dénombrement par la méthode du nombre le plus probable (NPP). En fonction de la densité microbienne, la bouteille de dilution sera judicieusement choisie pour le compte direct au microscope.

3.2 Préparation de la solution de coloration

1. À l'aide d'un pipettman de 1000 µl, combiner des volumes égaux de 500 µl des solutions 1 et 2 dans un tube Eppendorff à microcentrifuger stérile de 1.5 mL. Homogénéiser le mélange en microcentrifugeant [1];
2. À l'aide du pipettman de 200 µl, transférer 100 µl de la solution préparée en 1 dans un Eppendorff stérile, et ajouter 900 µl d'eau distillée stérile à l'aide du pipettman de 1000 µl afin d'obtenir une dilution de 1:10;
3. Refermer les deux Eppendorff, et entreposer jusqu'à leur utilisation tel qu'indiqué à la section 3.2.

3.3 Entreposage

- La solution de coloration peut durer jusqu'à un an lorsque conservée selon les procédures suivantes:
 - Conserver les tubes Eppendorff à -20°C et à la noirceur;
 - Avant l'ouverture des tubes Eppendorff, laisser décongeler le contenu à la température ambiante, et microcentrifuger brièvement afin de recueillir tout le liquide au fond de l'Eppendorff. Avant de recongeler, refermer le tube hermétiquement;
 - L'huile à montage *BacLight™* reste stable indéfiniment lorsque conservée à la température ambiante.

3.4 Manutention et sécurité

Les solutions 1 et 2 (voir tableau 1 ci-dessus) doivent être utilisées avec précaution, car:

1. le colorant SYTO® 9 et l'iodure de propidium se fixent aux acides nucléiques;

2. la capacité mutagène de l'iodure de potassium est reconnue;
3. aucune donnée n'est disponible sur la toxicité ou la capacité mutagène du réactif SYTO[®] 9;
4. le DMSO facilite la pénétration des molécules organiques dans les tissus.

Le port de deux paires de gants est donc fortement recommandé pour la manutention des réactifs dans le DMSO. Les solutions contenant les réactifs A et B devront être filtrées sur du charbon activé après usage, et les grains de charbon devront être incinérés.

3.5 Filtration de l'échantillon

1. Établir au moyen du tableau A7.2 ci-dessous le volume adéquat d'échantillon d'eau à prélever pour filtration. Les quantités d'eau et/ou de sol à prélever sont déterminées en fonction de la densité microbienne de l'échantillon, qui elle-même dépend de la nature de l'eau étudiée.

Tableau A7.2 Volumes d'eau ou de solution à filtrer selon la nature de l'échantillon

Nature de l'échantillon	Volume de filtration suggéré (mL)
<i>Eau de rivière</i>	1
<i>Eau de réseau de distribution</i>	5-10
<i>Eau souterraine de très bonne qualité</i>	20
<i>Sol</i>	1 mL de solution saline ^a pour 10 g de sol

^a la dilution de la solution saline est déterminée au préalable par des tests NPP

Un volume de 10 mL est suggéré pour une eau souterraine de qualité moyenne.

2. Rincer le support de base en verre fritté (#3; voir figures 1 et 2) avec de l'eau saline stérile en utilisant une micropipette;
3. Déposer au moyen des pinces stériles le filtre en cellulose (blanc) (#7) sur la goutte de solution saline afin de l'humidifier;

4. Ajouter le filtre en polycarbonate (noir) (#6) sur le filtre en cellulose. Le but du filtre en cellulose est d'assurer une distribution uniforme des bactéries sur la surface du filtre de polycarbonate;
5. Installer le support-entonnoir de 15 mL (#2) sur le support de base (#3) au moyen des pinces en alu (#8);
6. Prélever stérilement (près de la flamme) au moyen d'un pipetman ou d'une pipette volumétrique le volume d'eau déterminé au point 1;
7. Déposer l'échantillon d'eau dans le support-entonnoir de 15 mL vertical, au dessus de la surface des filtres, en évitant de toucher aux parois du support;
8. Filtrer l'échantillon d'eau:
 - Ouvrir la valve de la rampe de filtration (#10) située vis-à vis du support de filtration utilisé (ouverture en position verticale);
 - Ouvrir légèrement le robinet d'eau (robinet vert indiqué *EF*) (#11) afin de faire le vide;
 - Vérifier que le niveau d'eau dans l'erlenmeyer (#9) n'atteint pas le tube d'entrée des liquides filtrés;
9. Après la filtration:
 - Fermer le robinet d'eau;
 - Fermer la valve de la rampe de filtration;
 - Équilibrer les pressions en enlevant la succion exercée par l'erlenmeyer sur le bouchon de silicone perforé (#4).

3.6 Coloration des bactéries immobilisées sur une membrane

- Ajouter 1 mL d'eau saline stérile, ainsi que 30 µl du mélange préparé en 3.1. directement sur les filtres montés sur les supports de filtration;
- Déconnecter de la rampe à filtration multiple le bouchon de silicone perforé fixé au support de base, et laisser incuber la partie détachée 15 minutes à la température ambiante et à la noirceur;

- Après les 15 minutes d'incubation, replacer sur la rampe à filtration le bouchon de silicone perforé fixé aux supports de filtration. Filtrer sous-vide afin d'éliminer la solution saline et les colorants.

3.7 Préparation de la lame

- Déposer au moyen d'une micropipette une goutte d'eau stérile sur une lame à microscope;
- Retirer le filtre de polycarbonate noir du support de base en le drainant, c'est à dire en le laissant se dégorger d'eau, et déposer sur la goutte d'eau en conservant le côté du filtre où les bactéries sont vers le haut;
- Ajouter une goutte d'huile à montage *BacLight*TM sur le dessus du filtre;
- Déposer une lamelle de 22 mm sur l'huile à immersion sans appliquer de pression afin de laisser disperser l'huile dans le filtre par capillarité;
- Ajouter une goutte d'huile à immersion sur la lamelle.

3.8 Dénombrement

- Mettre le microscope à épifluorescence NIKON à "ON" en appuyant sur le bouton blanc: la lumière verte s'allume;
- Attendre la stabilisation de l'appareil indiquée par la lumière rouge;
- Vérifier la présence de la lentille B2A sur un des deux côtés, à l'emplacement des lentilles;
- Utiliser l'objectif 100x;
- Mettre la lame en place. Coller l'objectif à la lame, puis trouver le champ voulu en éloignant graduellement l'objectif de la lame;
- Observer la lame au microscope: les bactéries dont les membranes sont intactes apparaîtront en vert, tandis que les bactéries altérées apparaîtront en rouge;
- Compter le nombre de bactéries vertes, puis rouges, contenues dans la grille pour au moins une dizaine de champs différents. Le compteur manuel double peut être utilisé afin de compter les bactéries vertes et rouges séparément;

- Calculer le nombre de bactéries viables et non-viables à l'aide de la formule suivante [2]:

$$\# \text{ bactéries/ml eau filtrée} = \frac{31809 \times \# \text{ total bactéries}}{\# \text{ champs} \times \text{volume filtré}}$$

Noter que cette formule n'est valable que si:

- la filtration a été effectuée sur un support de la rampe multiple,
- le microscope utilisé est le Nikon,
- Les décomptes bactériens ont été effectués sur la surface délimitée par la grille du champs.

4. RÉFÉRENCE(S)

- [1]. **Molecular Probes.** L-7007 LIVE/DEAD® *BacLight*™ Viability Kit for microscopy. www.probes.com
- [2]. **Laurent, P.** (2000). Communication personnelle.
- [3]. **Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., Desjardins, R.** (1999). LIVE/DEAD *BacLight*™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 77-86.

5. RECOMMANDATION(S)

5.1 Manipulation des réactifs

Le port de deux paires de gants est fortement recommandé pour la manutention des réactifs dans le DMSO: la capacité mutagène de l'iodure de potassium a été démontrée, et aucune donnée n'est disponible sur la toxicité ou la capacité mutagène du réactif SYTO® 9.

5.2 Préparation de la solution de coloration

Il a été recommandé de préparer une solution des réactifs A et B diluée de 30 μ l plutôt que dans 3 μ l afin d'économiser les réactifs.

5.3 Dénombrement

Sous l'effet de la lampe du microscope, certains échantillons peuvent perdre leur fluorescence au bout de quelques secondes (phénomène de *fading*), et il peut être difficile de distinguer les bactéries. Il est recommandé d'effectuer les décomptes le plus rapidement possible et d'utiliser un compteur manuel. Également, on effectuera les décomptes dans la grille seulement, étant donné que le *fading* est plus accentué sur les bords du champs observé.

Annexe 8 Extraction et quantification de l'ADN à partir d'un échantillon de sol

		PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole # :PE-42B		Nombre de pages : 26	
Version :2		Date :01-01-23	
Auteur(s): <u>Lucie Jean</u> <u>Olivier Schoefs</u>			
Approuvé par : <u>Réjean Samson</u> <u>Manon Leduc</u> <u>Sandra Estrela</u>		Signatures : Date : ☒ _____ ☒ _____ ☒ _____	

Titre : Extraction et quantification de l'ADN à partir d'un échantillon de sol non-saturé
Mots clés : Homogénéisation, purification de l'ADN, ADN, sol non-saturé, extraction liquide-liquide au 2-butanol, fluorométrie.

1. OBJECTIF

La méthode d'extraction d'ADN vise à purifier l'ADN d'un échantillon de sol, afin d'éliminer toutes composantes organiques pouvant nuire à la quantification de l'ADN des micro-organismes se trouvant dans le sol à l'étude.

2. MATÉRIEL

2.1. Réactifs

- 10 mL de 2-butanol (Laboratoire MAT, 8041AN);
- 10 mL de HCl (Aldrich);
- 3 mL de DNase (Sigma, D4527);
- 10 mL d'eau stérile;
- 300 µl de la solution Chloroforme-alcool isoamyl : 24 : 1. Chloroforme (Fisher Scientific, lot no 943500, HPLC grade). Alcool isoamyl (Aldrich, AS 00337AS, grade ACS);
- 300 µl de la solution tampon phosphate – 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Anachemia, lot 690727-Y6, grade ACS), pH 8;
- 300 µl de la solution SDS – 100 mM NaCl (Anachemia, lot no 990426-9A, grade ACS), 500 mM Tris pH 8 (Anachemia, lot no 891216-S9, réactif pour biotechnologie), 10% SDS (Fluka Chemika, 71726, puriss.p.a);
- 25 mL de la solution TEN 10X – 10 mM Tris (Anachemia, lot no 891216-S9, réactif pour biotechnologie), 1 mM EDTA (Anachemia, Lot no 990426-A9, grade ACS), 100 mM NaCl (Anachemia, lot no 990527-A9, grade ACS), pH 8;
- 25 µl de solution Hoechst 33258 à 2 mg/mL (Sigma, no 33258);
- 2.15 mL de solution standard d'ADN 10 µg/mL;
- 100 µl de solutions standards d'ADN (0.5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 µg/mL) solubilisés dans du tampon TEN 1X.

2.2. Équipements

- 2 g de billes zirconium-silice 0.1mm de diamètre autoclavables (Biospec product, no 11079101Z);
- Mini BeadBeater 8TM (Biospec Products, modèle 693, Bartlesville, Oklahoma);
- Fluoromètre (Molecular Devices, Spectra MAX GEMINI XS, Sunnyval);
- Évaporateur Speed Vac (Savant, modèle SC 110, Holbrook, NY)
- Tubes microcentrifuges autoclavables 1,5 mL (Fisher Brand, no 05-669-30) et 2 mL (Fisher Scientific, no 05-407-25A);

- Tubes en polypropylène avec bouchon vissable 2 mL pour Mini BeadBeater (autoclavable);
- Centrifugeuse IEC (21000R, Needham Heights, USA);
- Micropipettes P1000, P200, P20 et P10mL (Gilson);
- Embouts à micropipettes stériles jaunes (Fisher Brand, no 21-197-8G) et bleus (Fisher Brand, no 21-197-8F);
- Dispenseur à huit canaux (Nichiryo, modèle 8800);
- Microplaque à 96 puits;
- Seringue de plastique 1 mL avec aiguille 27.5G (B-D, no 309623);
- Colonnes Sephacryl S-200 HR (Amersham Pharmacia Biotech, no 27-5120-01);
- Tubes à centrifuge stériles jetables de 15 mL (Fisher Brand, no 05-539-5) et 50 mL (Fisher Brand, no 05-539-6);
- Vortexeur (Fisher Scientific, vortex, modèle génie 2, no 12-812, N.-Y., USA);
- pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ion meter);
- Électrode (Orion Research Inc., Ross Sure-flow, Beverly, U.S.A.);
- Spatules;
- Ballons de 100 mL et 500 mL;
- Cylindre gradué de 10 mL et 100 mL;
- Pipette jaugée de 4 mL;
- Pipette graduée de 25 mL;
- Seringue de 50 µl et 1000 µl;
- Balance avec une précision de $\pm 0,0001$ (Mettler Toledo, AB204, Switzerland);
- Papier aluminium;
- Bec brûleur;
- Pince;
- Bain-marie à 37 °C;
- Glace;
- Hotte chimique.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Préparation des solutions

3.1.1 Préparation de 10 mL de la solution SDS 10%

1. Peser 58,44 mg de NaCl directement dans un bécher de 25 mL;
2. Peser 605,7 mg de TRIS dans une coupelle et transférer dans le bécher de 25 mL;
3. Peser 1 g de SDS dans une coupelle et le transférer dans le bécher de 25 mL;
4. Mesurer 10 mL d'eau distillée dans un cylindre gradué de 10 mL et le transférer dans le bécher de 25 mL;
5. Ajouter un barreau magnétique et agiter sur une plaque magnétique jusqu'à dissolution complète des solides;
6. Ajuster le pH à 8 à l'aide du pH-mètre avec une solution de HCl 10 M. Voir le PSO E3 pour l'utilisation du pH-mètre.

3.1.2 Préparer une solution de 100 mL de PB (Tampon phosphate : 100 mM

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 8)

1. Peser 1,3799 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et le transférer dans un ballon de 100 mL;
2. Ajouter environ 80 mL H_2O , ajouter une barreau magnétique et agiter sur une plaque magnétique;
3. Ajuster le pH à 8 à l'aide du pH-mètre avec une solution de HCl 10 M;
4. Compléter jusqu'au trait jauge avec de l'eau distillée.

3.1.3 Préparer une solution de chloroforme-alcool isoamyl (24 : 1)

Travailler sous la hotte chimique pour la préparation de cette solution

1. À l'aide d'une pipette jaugée 4 mL, mettre 4 mL d'alcool isoamyl dans une ballon de 100 mL;
2. À l'aide d'un cylindre gradué 100 mL, mesurer 96 mL de chloroforme et le transférer dans le ballon de 100 mL;
3. Bouchonner le ballon de 100 mL et l'inverser à treize reprises.

3.1.4 Préparation de 500 mL de la solution TEN 10X (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8)

1. Peser 605,7 mg de TRIS et le transférer dans un ballon de 500 mL;
2. Peser 186,12 mg d'EDTA et le transférer dans ce même ballon de 500 mL;
3. Peser 29,22 mg de NaCl et le transférer dans ce même ballon de 500 mL;
4. Ajouter de l'eau distillée et compléter jusqu'au trait jauge;
5. Ajouter un barreau magnétique et agiter jusqu'à dissolution complète;
6. Préparer une solution de 100 mL de TEN 1X :
 - À l'aide de la pipette automatique P10 mL, prendre 10 mL de la solution TEN 10X et la transférer dans un ballon de 100 mL;
 - Ajouter de l'eau distillée jusqu'au trait jauge;
 - Bouchonner le ballon de 100 mL et l'inverser à treize reprises.

3.1.5 Préparation de 20 mL d'une solution Hoechst (0.8 µg/mL)

On effectue une dilution sérielle à partir de trois tubes : 2 tubes de 15 mL et 1 tube de 50 mL

1. À l'aide de la micropipette P200, prélever 25 µl de la solution Hoechst concentrée (2 mg/mL) et le transférer dans un tube à centrifugeuse jetable de 15 mL;
2. À l'aide de la pipette automatique P5000, ajouter 2.5 mL de solution TEN 1X;
3. Boucher le tube et vortexer 10 secondes;
4. À l'aide de la pipette automatique P5000, prélever 1 mL de la solution vortexée et la transférer dans un nouveau tube à centrifugeuse jetable de 15 mL;
5. À l'aide de la pipette automatique P5000, lui ajouter 4 mL de TEN 1X;
6. Boucher le tube et vortexer de nouveau pendant 10 secondes;
7. À l'aide de la pipette P5000, prélever 4 mL de la solution obtenue à l'étape 5 et la transférer dans un nouveau tube à centrifugeuse jetable de 50 mL;
8. À l'aide d'une pipette graduée de 25 mL, lui ajouter 16 mL de TEN 1X;
9. Boucher et recouvrir le tube de 50 mL contenant la solution Hoechst (0.8 µg/mL) d'un papier aluminium, car cette solution réagit à la lumière et perd sa fluorescence.

3.2 Procédure de l'extraction de l'ADN (1)

1. Peser 2 g de billes Biospec de 0.1 mm de diamètre dans un tube adapté de 2 mL pour la machine Mini BeadBeater et bouchonner;
2. Autoclaver ce tube pendant 15 minutes à 120 °C en position "SOLIDS";

Travailler en mode aseptique (le rayon d'une flamme suffit)

3. Peser directement 200 mg de sol de jardin dans le tube adapté pour la machine Mini BeadBeater contenant 2 g de billes Biospec de 0.1 mm de diamètre préalablement autoclavées. (Voir les recommandations pour les différents types de sol);
4. À l'aide d'une pipette automatique P1000, ajouter 300 µl de tampon phosphate, 300 µl de solution SDS et 300 µl de solution chloroforme-alcool isoamyl (24 : 1) dans le tube contenant le sol et les billes;
5. Introduire le tube dans la machine Mini BeadBeater et homogénéiser à vitesse maximale pendant 2 minutes (2). Déposer l'échantillon sur de la glace jusqu'au moment de la centrifugation;
6. Récupérer le surnageant en plusieurs étapes :
 - a. Centrifuger le tube adapté Mini BeadBeater à 10 000 g pendant 30 secondes;
 - b. Récupérer le surnageant à l'aide d'une pipette automatique P1000 et le transférer dans un tube microcentrifuge de 2 mL préalablement autoclavé;
 - c. Afin de récupérer le liquide résiduel dans le tube adapté Mini BeadBeater, perforer la base à l'aide d'une aiguille stérile de 27,5 gauge. Placer le tube perforé dans un tube de 15 mL contenant un tube microcentrifuge 1,5 mL dépourvu de son bouchon (Voir figure 1);
 - d. Centrifuger à 1400 g pendant 15 minutes;
 - e. Ajouter 500 µl d'eau stérile au tube adapté Mini BeadBeater perforé contenant l'échantillon de sol;

- f. Centrifuger de nouveau à 1400 g pendant 15 minutes;
- g. À l'aide d'une pince, retirer et jeter le tube adapté Mini BeadBeater;
- h. À l'aide d'une pipette automatique P1000, récolter le surnageant du tube inférieur et l'ajouter au tube microcentrifuge de 2 mL de l'étape b;
- i. Déposer l'échantillon sur de la glace jusqu'au moment de l'extraction liquide-liquide (section 3.3).

3.3 Extraction liquide-liquide au 2-butanol

Cette étape est limitante lorsqu'on veut quantifier l'ADN par fluorométrie. L'extraction liquide-liquide au 2-butanol permet d'une part de diminuer le volume de l'échantillon et d'autre part d'éliminer la solution de SDS contenue dans l'échantillon. La solution de SDS représente une interférence importante lors de la quantification par fluorométrie. De plus, sa présence dans l'échantillon inhibe l'action de la DNase qui s'avère très utile comme contrôle lors de cette analyse.

Travailler sous la hotte chimique

1. Régler la température de la centrifugeuse IEC 21000R à 4°C;
2. Dans le tube microcentrifuge de 2 mL de l'étape 3.2.i, ajouter avec une pipette automatique P1000 un volume 1 : 1 de 2-butanol (un volume 1 : 1 signifie qu'on doit ajouter un volume équivalent de 2-butanol au volume de l'échantillon contenu dans le tube microcentrifuge de 2 mL);
3. Vortexer pendant 10 secondes;
4. Laisser reposer 5 minutes à température ambiante;
5. Centrifuger le tube à 12 000 g pendant 5 minutes à 4°C (à noter que la centrifugeuse doit préalablement être réglée à 4°C avant son utilisation);
6. Éliminer la phase supérieure, la phase organique, sans chercher l'interphase à l'aide d'une pipette automatique P1000;

7. Répéter les étapes précédentes encore 4 fois de manière à obtenir un volume final d'environ 150 µl;
8. Évaporer l'échantillon au Speed Vac pendant 1 heure à température Medium. Cet appareil se situe dans le laboratoire de Bio-Med au local A-677. Les informations concernant l'utilisation de cet appareil sont inscrites sur ce dernier.

3.4 Préparation des colonnes Sephacryl S-200 HR

Les colonnes sont conservées au réfrigérateur à 4°C

1. Vortexer pendant 10 secondes une colonne Sephacryl S-200 de manière à resuspendre la résine;
2. Dévisser d'un quart de tour le bouchon rouge de la colonne;
3. Céder la partie inférieure de la colonne au niveau de la jonction (voir la figure 2);
4. Placer la colonne dans un tube microcentrifuge de 1.5 mL dépourvu de son bouchon (bouchon qu'on a coupé) pour servir de support à la colonne;
5. Centrifuger la colonne à 735 g (3000 rpm pour le modèle Eppendorf 5415C à vitesse variable avec rotor à angle fixe possédant 18 positions) pendant 1 minute;
6. Placer la colonne dans un nouveau tube microcentrifuge 1.5 mL. Conserver la colonne pour l'étape de purification de l'ADN.

3.5 Purification de l'ADN

1. À l'aide d'une micropipette P200, prélever 120 µl de solution TEN 1X et resuspendre l'échantillon évaporé au Speed Vac;
2. Centrifuger le tube microcentrifuge 2 mL à 10 000 g pendant 30 secondes;
3. À l'aide de la micropipette P200, récupérer le surnageant **seulement** et le déposer **lentement** au-dessus de la colonne Sephacryl S-200 HR, et ce de façon centrée à la colonne;
4. Centrifuger de nouveau la colonne à 735 g mais cette fois pendant 2 minutes;

5. Jeter la colonne et récolter l'échantillon purifié dans le tube microcentrifuge 1.5 mL. Le volume récolté se situe entre 100 et 130 μ L;
6. À l'aide d'une micropipette P200, prélever 50 μ L de cet échantillon et le déposer dans un tube microcentrifuge de 1.5 mL. Cet échantillon sera analysé par fluorométrie;
7. À l'aide de la micropipette P200, prélever 50 μ L de cet échantillon et le déposer dans un nouveau tube microcentrifuge de 1.5 mL identifié d'un numéro plus DNase. Cet échantillon servira de contrôle lors de l'analyse par fluorométrie.

3.6 Préparation d'une solution de DNase et traitement à la DNase

1. Prendre un tube microcentrifuge de 1.5 mL contenant 30 μ L de la DNase (l'enzyme). La DNase est conservée au congélateur à -20°C ;
2. À l'aide d'une pipette automatique P1000, ajouter **lentement** (on manipule très lentement pour ne pas dénaturer l'enzyme) à ce tube 970 μ L de la solution à DNase. Cette solution est conservée au réfrigérateur à 4°C ;
3. Mélanger **lentement** en effectuant trois inversions de ce tube;
4. À l'aide d'une micropipette P200, ajouter 120 μ L de la solution de DNase préparée ci-dessus aux 50 μ L d'ADN servant de contrôle préparer au point 3.5;
5. Incuber cet échantillon dans un bain-marie à 37°C pendant 30 minutes.

3.7 Préparation des standards d'ADN

On établit la courbe standard D'ADN à partir de concentrations connues d'ADN (voir l'exemple d'une courbe standard en annexe)

1. À partir d'un standard d'ADN de 10 $\mu\text{g/mL}$, effectuer les concentrations suivantes : 8 $\mu\text{g/mL}$, 6 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ et 0.5 $\mu\text{g/mL}$;
2. Effectuer la dilution 8 $\mu\text{g/mL}$:

- à l'aide d'une seringue de 1000 μ l, prélever 800 μ l de la solution d'ADN 10 μ g/mL et le transférer dans un tube microcentrifuge de 1,5 mL;
- à l'aide d'une seringue de 1000 μ l, y ajouter 200 μ l de solution TEN 1X.

3. Effectuer la dilution 6 μ g/mL :

- à l'aide d'une seringue de 1000 μ l, prélever 600 μ l de la solution d'ADN 10 μ g/mL et le transférer dans un tube microcentrifuge de 1,5 mL;
- à l'aide d'une seringue de 1000 μ l, y ajouter 400 μ l de solution TEN 1X.

4. Effectuer la dilution 4 μ g/mL :

- à l'aide d'une seringue de 1000 μ l, prélever 400 μ l de la solution d'ADN 10 μ g/mL et le transférer dans un tube microcentrifuge de 1,5 mL;
- à l'aide d'une seringue de 1000 μ l, y ajouter 600 μ l de solution TEN 1X.

5. Effectuer la dilution 2 μ g/mL :

- à l'aide d'une seringue de 1000 μ l, prélever 200 μ l de la solution d'ADN 10 μ g/mL et le transférer dans un tube microcentrifuge de 1,5 mL;
- à l'aide d'une seringue de 1000 μ l, y ajouter 800 μ l de solution TEN 1X.

6. Effectuer la dilution 1 μ g/mL :

- à l'aide d'une seringue de 1000 μ l, prélever 100 μ l de la solution d'ADN 10 μ g/mL et le transférer dans un tube microcentrifuge de 1,5 mL;
- à l'aide d'une seringue de 1000 μ l, y ajouter 900 μ l de solution TEN 1X.

7. Effectuer la dilution 0.5 µg/mL :

- à l'aide d'une seringue de 50 µl, prélever 50 µl de la solution d'ADN 10 µg/mL et le transférer dans un tube microcentrifuge de 1,5 mL;
- à l'aide d'une seringue de 1000 µl, y ajouter 950 µl de solution TEN 1X

8. Vortexer les solutions standards et les déposer sur de la glace jusqu'à leur utilisation.
Conserver les standards au congélateur à -20°C après leur utilisation.

3.8 Quantification de l'ADN

Lecture au fluoromètre

On procède à l'analyse de l'ADN par fluorométrie en utilisant une microplaque de 96 puits dans laquelle on introduit des quantités fixes d'ADN (50 µl) et de solution Hoechst (250 µl) #33258 à 0.8 µg/mL. On dépose ensuite la microplaque dans le lecteur à microplaque. On configure les paramètres du logiciel SPF. Les paramètres à modifier sont la longueur d'onde d'excitation (360 nm), la longueur d'onde d'émission (460 nm) et l'autocutoff (420 nm). On doit également mettre le brassage de la microplaque à ON.

1. À l'aide d'une micropipette P200, prélever à deux reprises (duplicata) 50 µl de la solution TEN 1X et déposer l'échantillon dans les puits (section A1, A2) de la microplaque. Ces échantillons serviront de blanc pour définir la courbe standard;
2. À l'aide d'une micropipette P200, prélever à deux reprises (duplicata) 50 µl de la solution standard d'ADN 0,5 µg/mL et déposer l'échantillon dans les puits (section B1, B2) de la microplaque;
3. Répéter l'étape précédente pour toutes les solutions standards d'ADN en les déposant dans les puits C1, C2 jusqu'à G1, G2;
4. À l'aide de la micropipette P200, prélever 50 µl de l'échantillon d'ADN et le déposer dans le puits A3 de la microplaque;

5. À l'aide de la micropipette P200, prélever 50 µl de l'échantillon d'ADN ayant été traité à la DNase et le déposer dans le puits B3 de la microplaque;
6. À l'aide du distributeur à 8 canaux (modèle 8800), on ajoute 250 µl de solution Hoechst 0.8 µg/mL dans les puits contenant 50 µl d'ADN. La microplaque est lue directement par le lecteur à microplaque;
7. Convertir les valeurs de fluorescence obtenues à partir de la courbe standard d'ADN.

4. RÉFÉRENCE(S)

1. **Herrick, J. B., D. N. Miller, E. L. Madsen, and W. C. Ghiorse.** 1996. Extraction, purification, and amplification of microbial DNA from sediments and soils, p.130-133. *In* J. F. Burke (ed.), *PCR :essential techniques*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.11 :4715-4724
2. **D.N. Miller, J. E. Bryant, E. L. Madsen, and W.C. Ghiorse.** Nov. 1996. Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Applied and Environmental Microbiology*.

5. RECOMMANDATION(S)

- L'utilisation du 2-butanol doit se faire sous la hotte chimique. Ce réactif engendre des irritations respiratoires.
- Le port de gants est recommandé pour la manipulation de la solution Hoechst. Ce réactif possède des pouvoirs mutagènes.
- Le type de sol est un paramètre important lors de l'extraction de l'ADN. La quantité de sol à analyser doit être évaluée expérimentalement pour chaque type de sol utilisé. On peut faire varier la quantité de sol de 100 à 500 mg seulement.

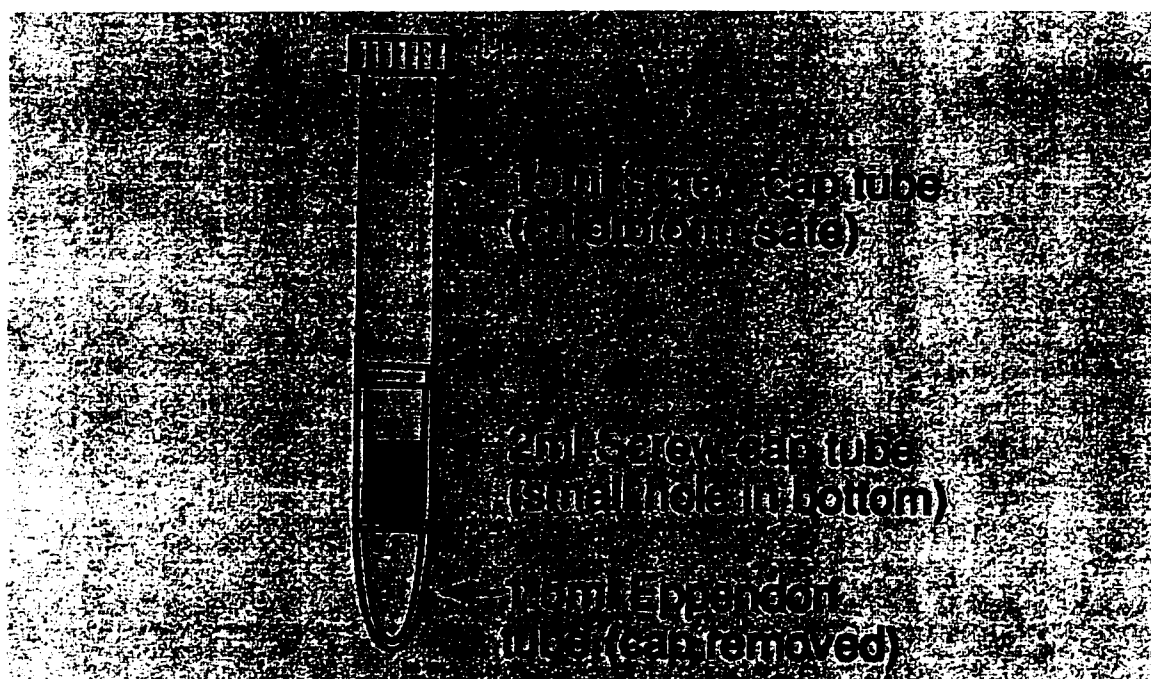


Figure 1 Schéma du montage du tube 15 mL.

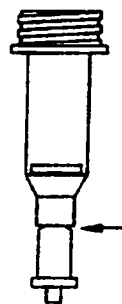


Figure 2 Schéma d'une colonne Sephadryl S200.

Annexe 9 PE-42D : Tests de biodégradation en phase solide

		PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole # :PE42D		Nombres de pages :	
Version :1		Date :15-03-01	
Auteur(s): <u>Lucie Jean</u> <u>Olivier Schoefs</u>			
Approuvé par : <u>Manon Leduc</u> <u>Réjean Sansom</u> _____		Signatures : Date : ☐ _____ ☐ _____ ☐ _____	

Titre : Essais de minéralisation de l'hexadécane radiomarqué dans un sol non saturé par respirométrie à partir de flacons biométriques - Étude de l'influence du contenu en eau.
Mots clés : Respirométrie, milieu non saturé

1. OBJECTIF

L'objectif de cette étude est d'obtenir des courbes de minéralisation totale et de minéralisation de l'hexadécane radiomarqué dans un sol non saturé à partir de flacons biométriques, et ce pour trois contenus en eau différents.

2. MATÉRIEL

2 kg de sol;

2 plats en Pyrex

500 mL de la solution de $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Anachemia, Lot 990630-Y9)

1 l de la solution de KOH 1 N filtrée (Anachemia, Lot 791223-J8);

1 l d'une solution standard de HCl 0.1 N (Anachemia, lot 70505);

1 l de la solution MSM

16.5 μl d'hexadécane radioactif (Sigma, lot :048H9430);

3.9 mL d'hexadécane (Sigma, H-0255);

Azoture de sodium (Anachemia);

Toluène (Anachemia);

Hexane (Anachemia);

Éthanol (Anachemia, lot 000919)

Cocktail à scintillation OptiPhase Hisafe 3 (Fisher Scientific).

Équipements

15 flacons biométriques;

72 erlenmeyers;

Ballons de 100 mL, 500 mL et 1 l;

Balance analytique avec une précision de ± 0.002 g (Mettler Toledo AB204 ou PB302, Switzerland);

Compteur à scintillation Wallac 1409 avec unité de disquette 3.5 et imprimante Epson LX300 (Fisher Scientific);

Vials à scintillation en verre de 20 mL avec bouchons (Fisher Scientific);

Seringues en verre Gastight de 25 et 500 μl ;

Seringue en verre Luer-Lock de 2,5 mL;

Seringues en plastique de 5 et 30 mL (B-D);

Aiguille en acier inoxydable de 6 pouces;

1 vials ambrés de 1.8 mL avec bouchon contenant un septum;

Spatules;

1 bécher de 10 mL et 50 mL;
Hotte chimique.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Préparation des solutions

3.1.1 Préparation d'une solution de phénolphtaléine 1 % (p/v)

- Peser 1 g de phénolphthaléine directement dans un ballon de 100 mL;
- Ajouter de l'éthanol jusqu'au trait jauge;
- Bouchonner et agiter légèrement le ballon.

3.1.2 Préparation d'une solution de chlorure de baryum 1 N

- Peser 122.13 g de $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dans une coupelle et transférer dans un ballon de 500 mL;
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'au trait jauge;
- Ajouter un barreau magnétique et agiter sur une plaque agitatrice jusqu'à dissolution complète.

3.1.3 Préparation d'une solution de KOH 0.1 N

- Peser 5.611 g de KOH dans une coupelle et transférer dans un ballon de 1 l;
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'au trait jauge;
- Ajouter un barreau magnétique et agiter sur une plaque agitatrice jusqu'à dissolution complète.

3.1.4 Préparation de la solution radioactive

Travailler sous la hotte chimique réservée pour la manipulation de la radioactivité. La solution radioactive préparée permettra de contaminer 12 flacons biométriques, chacun contenant 260 μl d'hexadécane froid et 200 000 dpm d'hexadécane chaud.

- Sortir la solution radioactive d'hexadécane du réfrigérateur à 4°C au moins une heure avant son utilisation;
- Rincer à trois reprises la seringue de 5 mL avec la solution d'hexadécane filtrée;
- À l'aide de la seringue de 5 mL, prélever 3.9 mL d'hexadécane et déposer dans un vial de 10 mL;
- Préparer un bécher de 10 mL contenant du toluène;
- Rincer à trois reprises une seringue de 25 µl avec le solvant de toluène;
- Rincer de nouveau à trois reprises la seringue de 25 µl dans la solution d'hexadécane radioactive;
- À l'aide de la seringue de 25 µl, prélever 11 µl de la solution d'hexadécane radioactive et la déposer dans le vial de 10 mL préparé à l'étape 3;
- Ajouter une valve mininert et homogénéiser la solution en effectuant des inversions;
- À l'aide de la seringue de 25 µl, prélever 25 µl de la solution préparée et l'injecter dans un vial à scintillation contenant 10 mL de cocktail. Analyser au compteur en prenant le soin d'inclure un blanc (liquide à scintillation seulement).

3.2 Préparation du sol

- Dans deux plats en Pyrex, peser environ 1 kg sol/plat et le laisser sécher pendant quelques heures jusqu'à l'obtention d'un matériel relativement sec (~ 0,05 g eau/g sol sec);
- Faire un poids sec du sol à l'étude (voir protocole A7) et garder le sol dans un contenant fermé.

3.2 Préparation des flacons biométriques et des erlenmeyers

3.3.1 Identification des flacons biométriques et des erlenmeyers

L'identification des facons biométriques et des erlenmeyers s'effectue selon le tableau A9.1.

Tableau A9.1 Description des 73 microcosmes

Numéros	Type de contenant	Hexadécane (10 g/kg)	Humidité (% CRC)	NaN ₃	Utilisation
1, 2 et 3	Fl. biométrique	✓	20%	-	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
4	Fl. biométrique	✓	20%	✓	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
5	Fl. biométrique	-	20%	-	CO ₂
6, 7 et 8	Fl. biométrique	✓	50%	-	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
9	Fl. biométrique	✓	50%	✓	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
10	Fl. biométrique	-	50%	-	CO ₂
11, 12 et 13	Fl. biométrique	✓	80%	-	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
14	Fl. biométrique	✓	80%	✓	CO ₂ , ¹⁴ CO ₂
15	Fl. biométrique	-	20%	-	CO ₂
16 à 31	Erlenmeyer	✓	20%	-	Sacrifice
32 à 39	Erlenmeyer	-	20%	-	Sacrifice
40 à 55	Erlenmeyer	✓	50%	-	Sacrifice
56 à 63	Erlenmeyer	-	50%	-	Sacrifice
64 à 79	Erlenmeyer	✓	80%	-	Sacrifice
80 à 87	Erlenmeyer	-	80%	-	Sacrifice

Chaque microcosme doit porter l'identification suivante :

- Numéro;
- Présence ou non de la contamination;
- Niveau d'humidité;
- Présence de NaN_3 le cas échéant;
- Utilisation (CO_2 ou sacrifice).

Tous les flacons biométriques contenant de la contamination contiennent également du ^{14}C . Tous les erlenmeyers contenant de la contamination ne contiennent pas de ^{14}C .

3.3.2 Répartition du sol dans les flacons biométriques et dans les erlenmeyers

- À la balance, peser 20 g de sol précisément ($\pm 0,01\text{g}$) et directement dans chaque flacon et erlenmeyer;
- À l'aide d'une pipette automatique P1000, prélever 1 mL de solution MSM et l'injecter uniformément dans chaque flacon et erlenmeyer;
- À l'aide d'une seringue de 500 μl , ajouter goutte à goutte 260 μl de la solution radioactive d'hexadécane préparée au point 3.1.4;
- Agiter le flacon légèrement de façon à homogénéiser la répartition du contaminant avec le sol;
- Ajuster le contenu en eau au niveau désiré à l'aide d'eau stérile (20 % CRC, 50 %CRC et 80 %CRC); Ici, ne pas ajouter d'eau dans les contenants identifiés 20%, ajouter 1,5 mL d'eau stérile dans les contenants identifiés 50% et ajouter 3 mL d'eau stérile dans les contenants identifiés 80%.
- Ajouter 10 mL de la solution de KOH 0,1N dans la partie tubulaire des flacons biométriques et fermer les flacons à l'aide des bouchons;
- Dans les erlenmeyers, insérer un tube à NPP et y introduire 10 mL de la solution de KOH 0,1N; fermer les flacons à l'aide des bouchons.

3.4 Échantillonnage des flacons biométriques

La fréquence d'échantillonnage dépend de l'activité de minéralisation. L'échantillonnage comporte deux volets : une analyse au compteur à scintillation et un titrage acido-basique.

3.4.1 L'analyse au compteur à scintillation

- Préparer et identifier 12 vials à scintillation;
- À l'aide d'une pipette automatique P5000, prélever 5 mL de la solution de KOH 0.1N de chaque flacon biométrique et les déposer dans un vial à scintillation contenant 10 mL de cocktail à scintillation;
- Mettre les vials sur un support adapté et lancer l'analyse au compteur à scintillation. Il est à noter que le blanc contient 5 mL de la solution de KOH 1N et 10 mL de cocktail;

3.4.2 Le titrage acido-basique

- À la burette de 25 mL, ajouter 25 mL de la solution de HCl standardisée 0,1N
- À l'aide d'une pipette automatique, prélever les 5 mL restant de la solution de KOH 0,1N de chaque flacon biométrique et les déposer dans un bécher de 50 mL; Si le volume restant n'est pas constant, prélever la solution à l'aide d'une pipette de verre et noter le volume prélevé;
- Agiter le flacon biométrique et introduire 10 mL de KOH propre;
- À ce bécher, y ajouter 1 mL de la solution de $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, trois gouttes de la solution de phénolphtaléine et un barreau magnétique;
- Agiter légèrement sur une plaque agitatrice
- Procéder au titrage en laissant écouler goutte à goutte la solution de HCl contenu dans la burette;
- Répéter ces étapes pour tous les flacons biométriques.

3.4.3 Renouvellement des solutions de KOH dans les erlenmeyers

- Dans chaque erlenmeyer, prélever la solution de KOH;
- Agiter l'erlenmeyer;
- Introduire 10 mL de KOH propre dans le tube à NPP.

3.5 Sacrifices des erlenmeyers

Deux erlenmeyers par niveau d'humidité seront utilisés pour chaque sacrifice. La date du sacrifice dépendra de l'allure des courbes de minéralisation.

Le premier erlenmeyer servira à l'analyse de l'hexadécane (3 fois 5g) et à un poids sec (1 fois 5g).

Le second erlenmeyer servira à la méthode NPP (1 fois 10g), au dosage de l'ADN (1 fois 5g) et à un poids sec (1 fois 5 g).

4. RÉFÉRENCE(S)

Strotzky, G. (1965) Microbial Respiration. Methods of Soils Analysis. American Society of Agronomy, p. 1550-1572.

Alef, K. et Nannipieri, P. (1995) Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. P.214-217.

5. RECOMMANDATION(S)

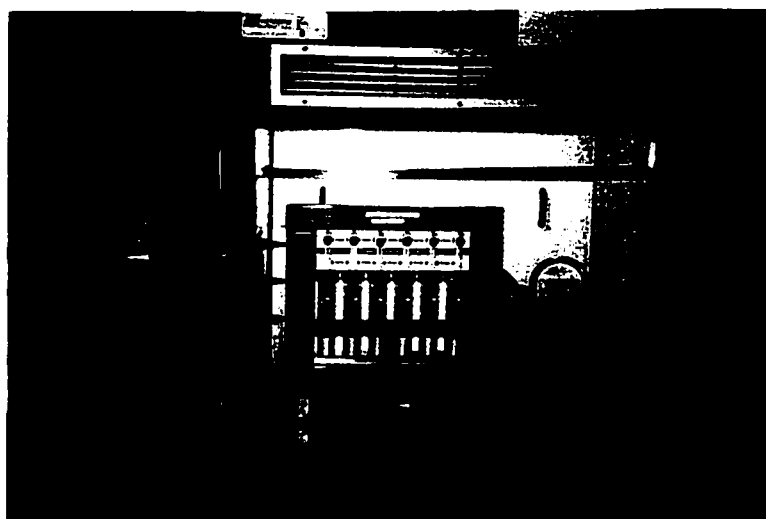
Le titrage doit être effectué dans un endroit alloué à la radioactivité.

Les flacons biométriques devront être entreposés dans le cabinet gris.

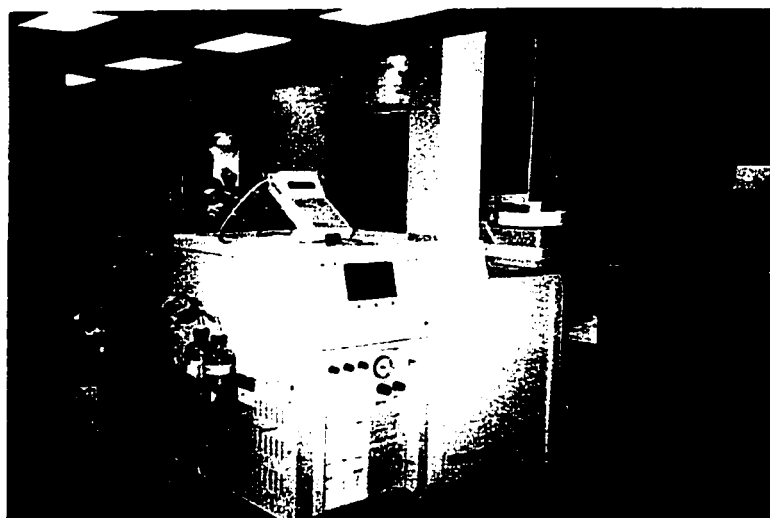
Annexe 10 photos : tests de biodégradation en phase solide



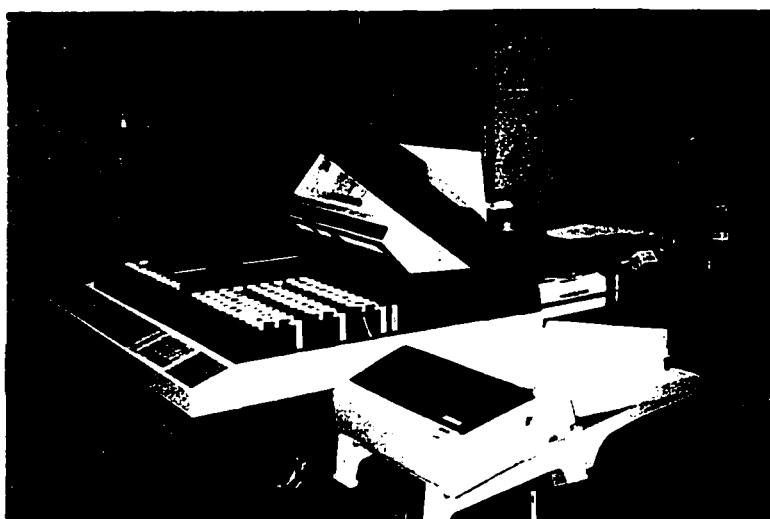
Erlenmeyer pour sacrifice (gauche) et flacon biométrique (droite)



Unité d'extraction Soxtec



GC-FID



Compteur à Scintillation