UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

STABILITÉ D'UN BIOFILM FORMÉ DANS UNE FRACTURE DE CALCAIRE ET SOUMIS À UNE FAMINE PROLONGÉE

FRANÇOISE CASTEGNIER

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

(GÉNIE CHIMIQUE)

AVRIL 2004

©Françoise Castegnier, 2004.

National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisisitons et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 0-612-91935-8
Our file Notre référence
ISBN: 0-612-91935-8

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.

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 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.

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 aturement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

STABILITÉ D'UN BIOFILM FORMÉ DANS UNE FRACTURE DE CALCAIRE ET SOUMIS À UNE FAMINE PROLONGÉE

présenté par: CASTEGNIER Françoise

en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès sciences appliquées

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

M. LEGROS Robert, Ph.D., président

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

Mme DESCHÊNES Louise, Ph.D., membre et codirectrice de recherche

Mme MILLETTE Louise, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Ce mémoire représente de nombreux mois de travail, durant lesquels l'appui et l'aide de nombreuses personnes ont été cruciaux.

J'exprime ma grande reconnaissance à mon directeur, Réjean Samson, ainsi qu'à ma codirectrice, Louise Deschênes, pour leurs conseils scientifiques judicieux, leur soutien pendant les moments difficiles, leur patience, leur appui financier et la liberté d'action qu'ils m'ont laissée tout au long de ce projet. Un grand remerciement à Nathalie Ross pour avoir été exceptionnellement disponible, s'être impliquée tout au long du projet, m'avoir communiqué ses connaissances et ses suggestions pertinentes, m'avoir soutenue moralement et s'être grandement impliquée dans la rédaction de l'article. Un grand remerciement également à Robert Chapuis pour m'avoir prodigué ses connaissances et judicieux conseils en hydraulique et s'être déplacé à plusieurs reprises jusque dans la chambre froide à 10°C pour évaluer la qualité du montage hydraulique.

J'aimerais également souligner la qualité de la formation et de l'aide reçues par les associées de recherche Manon Leduc, Lucie Jean et Sandra Estrela qui m'ont tour à tour initiée à la vie parfois ardue mais très gratifiante en laboratoire. Merci de votre extrême patience et de m'avoir aidée à découvrir une nouvelle passion. Je remercie également l'aide apportée par les techniciens du département de génie chimique, Daniel Dumas, Carol Painchaud, Jean Huard, Robert Delisle et Gino Robin ainsi que celle apportée par Denis Bouchard, technicien au département de génie civil, géologique et des mines. Merci également à Jacinthe Mailly et à Josée Coallier de la chaire en eau potable pour m'avoir laissé utiliser leur microscope.

Merci à mon conjoint, Christian Legault pour m'avoir appuyée tout au long de ce projet, à mon frère Pierre qui a révisé une partie du texte de ce mémoire, et qui, depuis lors, m'appelle curieusement par le nom de *Francescus Bacillus*. Merci aussi au reste de ma famille et de ma belle-famille pour leur appui inconditionnel. Enfin, merci à tous mes collègues étudiants de la Chaire et du Ciraig qui se sont succédés pendant mon séjour!

RÉSUMÉ

Depuis les vingt dernières années, la découverte de plus en plus fréquente de cas de contamination dans les environnements fracturés a entraîné une prise de conscience de la très grande vulnérabilité des eaux souterraines des aquifères de rocs fracturés aux risques de pollution. Jusqu'à très récemment, le confinement ou la restauration des milieux fracturés a été réalisé selon des méthodes conventionnelles de confinement ou de traitement adoptées des méthodes de restauration des milieux poreux. L'application de ces technologies aux milieux fracturés comporte toutefois de nombreux inconvénients, dont: les coûts élevés de pompage associés à un traitement *ex-situ* par pompage-et-traitement, la difficulté d'atteindre et de pomper les contaminants migrés dans les fractures profondes des rocs, et la toxicité de certains matériaux (coulis) utilisés pour l'édification de barrières physiques de confinement. Conséquemment, les efforts s'orientent de plus en plus vers l'utilisation de procédés biotechnologiques.

Le concept novateur des barrières biologiques ou biobarrières a récemment été envisagé pour le confinement des contaminants dans les aquifères de roc fracturés. Le développement de la biobarrière consiste à stimuler la croissance des populations microbiennes indigènes de l'eau souterraine par l'injection de nutriments et d'accepteurs d'électrons. Les bactéries stimulées adhèrent aux parois des fractures, sécrètent des exopolysaccharides (EPS) qui s'agglutinent aux parois, entraînant la formation d'une matrice visqueuse appelée biofilm dans laquelle les bactéries croissent et se multiplient, causant une baisse de perméabilité et éventuellement le colmatage de la zone fracturée. Bien que des bactéries productrices de biofilms soient fréquemment présentes dans l'aquifère de façon naturelle, des bactéries aptes à produire des quantités accrues d'EPS peuvent aussi y être introduites via des puits d'injection.

La démonstration du concept des biobarrières pour le confinement des eaux souterraines contaminées a été réalisée avec succès à l'échelle de terrain dans des aquifères poreux. Également, lors de travaux récents menés à l'échelle de

laboratoire, l'application de ce principe à une fracture simple dans du calcaire a entraîné une baisse significative de la perméabilité de la fracture. La démonstration encore plus récente de ce concept, à l'échelle de terrain dans une nappe souterraine circulant dans un roc fracturé, a donné des résultats prometteurs quant à son applicabilité au contrôle de la pollution dans les rocs fracturés. Suite à tous ces travaux, l'emphase est présentement mise sur l'évaluation de la stabilité à long terme et la longévité des biobarrières.

Le but principal de ce projet de recherche est d'évaluer la stabilité à long terme d'un biofilm généré dans un montage de laboratoire simulant une fracture dans un roc de calcaire. Le projet comportait deux objectifs majeurs: (1) évaluer le potentiel de colmatage du montage en modifiant les modes d'apport en nutriments et en inoculum qui avaient été utilisés lors d'un projet antérieur, (2) quantifier l'effet d'un arrêt d'apport en nutriments sur la stabilité à long terme du biocolmatage induit, et ce, dans une perspective de démantèlement.

L'essai expérimental a été réalisé sur un assemblage horizontal de plaques de calcaire comportant une fracture simple (1.55 mm ouverture x 4.5 mm largeur x 49.8 cm longueur; volume: 2.6 cm^3), présentant un volume de colmatage potentiel de 11.4 cm^3, et équipé de piézomètres permettant la mesure des pertes de charge hydraulique. L'essai s'est déroulé sur une période de plus de sept mois et a comporté deux phases principales au cours desquelles la fracture a été alimentée en continu en eau souterraine synthétique. Au cours de la phase I (43 jours), la fracture a été inoculée avec les populations microbiennes indigènes d'une eau souterraine et alimentée en nutriments en continu afin d'initier la croissance d'un biofilm. Au cours de la phase II (179 jours), l'injection de bactéries et la biostimulation ont été interrompues afin de mesurer la persistance du biofilm formé. Le niveau de biocolmatage a été évalué via la mesure de la conductivité hydraulique (K) dans la fracture grâce à la mesure manuelle des pertes de charge hydraulique le long de la fracture et du débit de l'effluent en temps réel.

Ces mesures ont mis en évidence une réduction de K dans la zone centrale de la fracture (K_f) de 99.9% pendant la phase de biocolmatage (jours 0 à 43) et de 33.9% pendant la phase de persistance (jours 44 à 222), menant à une réduction globale de

99.95% pour la durée totale de l'essai. Ces valeurs ont été obtenues après avoir fait circuler dans la fracture un volume total d'eau souterraine de 190 L, équivalent à 16 565 volumes de fracture et 3.1 L de milieu nutritif. Parallèlement, l'ouverture de la fracture dans la zone centrale (a_f) a diminué de 97.3% pendant la durée totale de l'essai. Cette baisse significative de K a été attribuée à l'accumulation de calcite précipitée et de bactéries en forme de bâtonnets courts, allongés et d'autres à l'aspect filamenteux.

Entre les jours 167 à 222 de la phase de persistance, une baisse de stabilité traduite par une augmentation de K_f (cm min^{-1}) de l'ordre de 1.3 logs (~ 1980%) a toutefois été observée. Cette baisse a été attribuée à des épisodes intermittents de détachement localisé de portions de biofilm qui en retour ont été imputés à une combinaison de divers processus. Ces processus peuvent possiblement inclure le vieillissement du biofilm, des changements chimiques, une diminution des forces de cisaillement appliquées sur la surface du biofilm, la famine des bactéries et les changements morphologiques qui y sont associés tels que le passage d'une forme bâtonnet à une forme cocci ou la fragmentation de filaments bactériens.

L'ensemble des résultats du projet supporte l'hypothèse selon laquelle un biofilm formé dans du roc fracturé via la biostimulation d'une population microbienne indigène d'une eau souterraine démontre une stabilité dans le temps. L'essai semble indiquer qu'un biofilm exposé à des conditions d'écoulement très faible et une période de famine prolongée puisse persister malgré le risque accru d'une baisse de stabilité avec le temps. Ces résultats suggèrent que pour assurer le maintien du niveau de colmatage visé et de la stabilité à long-terme d'une biobarrière utilisée sur le terrain pour la restauration des aquifères fracturés, il serait recommandable de développer un protocole d'entretien prenant en considération la nécessité d'un apport en nutriments à une fréquence à déterminer en fonction de chaque cas de restauration.

ABSTRACT

Over the last two decades, contaminated groundwaters in fractured media have been discovered with increasing frequency, suggesting that groundwaters in these media are highly vulnerable to pollution. Until very recently, the containment or the remediation of contaminated groundwater in fractured media has been achieved using remediation technologies developed for the treatment of contaminated aquifers in porous media. However, the numerous drawbacks that are associated with these technologies limit their applicability at fractured rock sites. For instance, *ex-situ* treatments such as *pump-and-treat* are cost prohibitive, contaminants that have migrated within deep fractures are often difficult to reach and pump, and some materials (e.g. grouts) that are used for the construction of vertical barriers for containment purposes can be toxic. Consequently, strategies using biotechnological processes are becoming appealing alternatives for the remediation of groundwater in fractured media.

The use of biofilms to form biobarriers is an innovative technology that is just being explored. The concept of biobarriers consists of stimulating the growth of indigenous bacterial population via the injection of nutrients and electron acceptors. The stimulated bacteria adhere to fracture walls, secrete exopolysaccharides (EPS) that form a viscous matrix in which bacteria grow and multiply to form biofilms which will eventually fill the voids in the fractures, reducing their permeability. Even though bacteria able to produce EPS may already be present in the aquifer, bacteria able to produce copious amounts of EPS can also be introduced in the aquifer via a series of injection wells.

The proposed concept of biobarriers for the containment of contaminated groundwaters has been successfully demonstrated at the field scale in porous aquifers. Also, at the laboratory scale, in a recent work performed on a single fracture in limestone, clogging by continuous biostimulation of groundwater bacteria with molasses caused a significant decrease in permeability in the fracture. More recently, a field demonstration of this concept in a fractured rock aquifer has yielded promising

evidence of its applicability for the control of pollution in fractured rocks. Future works will focus on the long-term stability and longevity of biobarriers.

The main goal of this research project was to investigate the long-term stability of a biofilm developed in a laboratory apparatus simulating a fracture in a limestone rock. Two major objectives were elaborated for this study: (1) to test the clogging potential of a single-fracture apparatus used in a previous study and continuously fed with bacteria and nutrients (2) to quantify the effect of an interruption of the supply of nutrients on the long-term stability of the induced bioclogging, in a dismantling perspective.

The experiment was performed on a horizontal set-up of limestone blocks containing a single fracture (1.55 mm aperture x 4.5 mm width x 49.8 cm length; volume: 2.6 cm^3), displaying a potential bioclogging volume of 11.4 cm^3, and equipped with vertical piezometers installed along the apparatus to detect hydraulic head changes. The set-up was operated over a period of seven months and the experiment was composed of two main phases during which the fracture was continuously supplied with synthetic groundwater. During the first phase (43 days), the fracture was inoculated with groundwater indigenous bacterial populations, and continuously fed with nutrients to initiate the biofilm growth. During the second phase (179 days), the supply of bacteria and nutrients has been interrupted to measure the persistence of the developed biofilm. The bioclogging level was evaluated by measuring the hydraulic conductivity (K) in the fracture via the manual measurement of hydraulic head losses along the fracture and on line measurement of the effluent flow.

These measures showed a 99.9% reduction in K in the central zone of the fracture (K_f) during the bioclogging phase (days 0 to 43) and a 33.9% reduction in K_f during the persistence phase (days 44 to 222), resulting in a 99.95% reduction for the whole experiment. These values were obtained after circulation of a total groundwater volume of 190 L in the fracture, corresponding to 16 565 fracture volumes and 3.1 L of nutritive solution. Concomitantly, during the whole experiment, the aperture in the central zone of the fracture (a_f) was reduced by 97.3%. This significant reduction in K was attributed to the accumulation of precipitated calcite and short, elongated or filamentous-like rod-shaped bacteria.

Between days 167 and 222 of the persistence phase, a decrease in stability reflected by an increase in K_f (cm min^{-1}) of 1.3 logs (~ 1980%) orders of magnitude was however observed. This decrease in stability was attributed to sporadic episodes of biofilm sloughing, which, in return, were imputed to a combination of different processes. Amongst these are biofilm ageing, chemical changes, a reduction in the shear forces applied on the biofilm surface, bacterial starvation and the associated morphological changes such as the transition from a rod to a coccal shape or the fragmentation of bacterial filaments.

The results of this project support the hypothesis according to which a biofilm formed in a fractured rock via the biostimulation of groundwater indigenous bacterial populations maintains its stability over time when the biostimulation is interrupted. The experiment suggests that a biofilm exposed to very low flow conditions and a prolonged starvation period could persist despite an increasing risk of drop in stability within time. These results also suggest that to maintain the intended clogging level and the long-term stability of a biobarrier used in the field for the containment of a contaminated fractured aquifer, a maintenance protocol taking into account the need to supply nutrients at a frequency adapted to each remediation case should be developed.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ..... **IV**

RÉSUMÉ ..... **V**

ABSTRACT ..... **VIII**

TABLE DES MATIÈRES ..... **XI**

LISTE DES TABLEAUX ..... **XV**

LISTE DES FIGURES ..... **XVI**

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS ..... **XVII**

LISTE DES ANNEXES ..... **XIX**

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION **1**

1.1 La problématique de la contamination des aquifères fracturés 1
1.2 Approche envisagée 2
1.3 Hypothèse et objectifs de recherche 3

CHAPITRE 2 – REVUE DE LITTÉRATURE **4**

2.1 L'environnement des aquifères de calcaire fracturés 4
2.1.1 Les aquifères de calcaire *4*
2.1.1.1 Propriétés des roches calcaires 5
2.1.1.2 Les calcaire fracturés 7
2.1.1.3 Les eaux souterraines des aquifères de calcaire 13
2.2 Les biofilms 18
2.2.1 Définition *18*
2.2.2 Omniprésence des biofilms et applications potentielles *19*
2.2.3 Organisation spatiale des biofilms *21*
2.2.4 Composition des biofilms bactériens *25*

2.2.4.1 La matrice de substances polymériques extracellulaires 26
2.2.4.2 Les bactéries des biofilms 29
2.2.5 Mécanismes de formation des biofilms 32
2.2.5.1 Formation d'un film de conditionnement 33
2.2.5.2 Transport des cellules bactériennes 33
2.2.5.3 Attachement des cellules bactériennes 34
2.2.5.4 Maturation du biofilm 34
2.2.5.5 Processus de détachement 36
2.2.6 Propriétés des biofilms 38
2.2.6.1 Caractéristiques physico-chimiques des biofilms 38
2.2.6.2 Caractéristiques mécaniques des biofilms 41
2.2.7 Rôle des biofilms dans les cycles biogéochimiques 43
2.2.7.1 Cycle du carbone dans les biofilms 43
2.2.7.2 Cycle de l'azote dans les biofilms 46
2.2.7.3 Cycle du soufre dans les biofilms 48
2.2.7.4 Cycle du fer dans les biofilms 50
2.2.8 Rôles des EPS au sein des biofilms 52
2.2.8.1 Participation à l'adhésion initiale des bactéries aux surfaces 52
2.2.8.2 Formation d'agrégats cellulaires 53
2.2.8.3 Barrière protectrice 53
2.2.8.4 Sorption des substances organiques et inorganiques 54
2.2.9 Stabilité mécanique du biofilm 55
2.2.9.1 Rôle de la matrice des EPS dans la stabilité du biofilm 55
2.2.9.2 Rôle de l'attachement cellulaire dans la stabilité initiale du biofilm. 56
2.2.9.3 Évolution temporelle de la stabilité du biofilm 58
2.3 Technologies de contrôle hydraulique des aquifères fracturés 61
2.3.1 Le traitement ex situ 61
2.3.2 Les barrières physiques de confinement 62
2.3.2.1 Les rideaux d'injection 63
2.3.2.2 Les parois moulées et les rideaux de palplanches 64
2.3.3 La barrière biologique in situ ou biobarrière 68
2.3.3.1 Biocolmatage des milieux poreux saturés 72

2.3.3.2 Biocolmatage de milieux fracturés 83

CHAPITRE 3 – APPROCHE MÉTHODOLOGIQUE 87

3.1 Conception, assemblage du montage et essais préliminaires 87

3.1.1 Conception et assemblage du montage 87

3.1.2 Essais préliminaires 92

3.2 Préparation des solutions 94

3.2.1 Eau souterraine synthétique 94

3.2.2 Solution nutritive 94

3.3 Isolation des bactéries indigènes de l'eau souterraine naturelle 95

3.4 Évaluation du comportement hydraulique initial 95

3.5 Saturation du montage de pré-colmatage 96

3.6 Inoculation des plaques, biostimulation des bactéries et persistance 96

3.7 Démantèlement de l'assemblage, prélèvement et analyses du biofilm 97

3.8 Suivis hydraulique, physico-chimique et microbiologique 97

3.8.1 Suivi des paramètres hydrauliques 97

3.8.2 Suivi des paramètres microbiologiques 98

3.8.3 Suivi des paramètres physico-chimiques 99

CHAPITRE 4 – STABILITÉ D'UN BIOFILM SOUMIS À UNE FAMINE PROLONGÉE DANS UNE FRACTURE DE CALCAIRE 101

4.1 Présentation de l'article 101

4.2 Stability of a Nutrient-Starved Biofilm in a Limestone Fracture 102

4.2.1 Abstract 102

4.2.2 Nomenclature 103

4.2.3 Introduction 104

4.2.4 Methodology 105

4.2.4.1 Experimental set-up and groundwater 105

4.2.4.2 Experimental phases and analyses 107

4.2.5 Results 111

4.2.5.1 Changes in hydraulic conductivity and fracture aperture 111

4.2.5.2 Influent & effluent physicochemical and microbiological analyses 112

4.2.5.3 Biofilm characterization upon apparatus dismantling 113
4.2.6 Discussion 116
4.2.7 Conclusions 122
4.2.8 Acknowledgements 123
4.2.9 Literature cited 123

CHAPITRE 5 – DISCUSSION, CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS 128

5.1 Discussion générale 128
5.2 Conclusions 133
5.3 Recommandations 134

RÉFÉRENCES 136

ANNEXES 168

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Porosité des calcaires vs d'autres matériaux géologiques 11
Tableau 2.2 Perméabilité et *K* des calcaires vs d'autres matériaux géologiques 11
Tableau 2.3 Constituants des eaux souterraines des aquifères de calcaires 13
Tableau 2.4 Composition chimique des eaux souterraines isssues de divers types d'aquifères calcaires 14
Tableau 2.5 Composantes principales des biofilms 25
Tableau 2.6 Exemples d'espèces bactériennes isolées de biofilms prélevés dans l'environnement des eaux souterraines 32
Tableau 2.7 Épaisseur et densité de biofilms d'espèces bactériennes distinctes 40
Tableau 2.8 Étapes de dégradation de la matière organique en acétate 44
Tableau 2.9 Liste de fonctions attribuables aux EPS des biofilms 52
Tableau 2.10 *K* obtenus pour des coulis utilisés pour les rideaux d'injection 64
Tableau 2.11 Conductivité hydraulique de matériaux des parois moulées 66
Tableau 2.12 Avantages et désavantages de technologies utilisées pour la restauration des milieux fracturés 67
Tableau 2.13 Avantages et aspects à investiguer du concept des biobarrières 71
Tableau 2.14 Exemples d'espèces bactériennes des biofilms des milieux poreux 76
Tableau 2.15 Essais de biocolmatage de colonnes de milieux poreux saturés 77
Tableau 2.16 Essais de biocolmatage de colonnes de milieux poreux (suite) 78
Tableau 2.17 Essais de persistance réalisés sur des milieux poreux biocolmatés 81
Tableau 2.18 Essais de biocolmatage réalisés sur des milieux fracturés 85
Tableau 3.1 Liste des tests préliminaires réalisés avant le démarrage de l'essai 93
Tableau 3.2 Protocoles relatifs à l'étude expérimentale 100

Table 4.1 Summary of operating conditions, fracture specifications and hydrodynamic characterization 106
Table 4.2 Physicochemical, geochemical, and microbiological analyses on influent & effluent groundwater 110

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Classification des discontinuités selon leurs dimensions 8
Figure 2.2 Modèle des plaques parallèles pour une fracture linéaire simple 10
Figure 2.3 Régimes empiriques d'écoulement dans une fracture simple 12
Figure 2.4 Impact de la profondeur des eaux sur leur composition chimique 15
Figure 2.5 Potentiel redox de réactions importantes dans les aquifères 17
Figure 2.6 Observation par microscopie électronique à balayage (MEB) d'un gel polymérique et de cellules bactériennes fixés sur un support 19
Figure 2.7 Observation microscopique d'un biofilm formé suite à l'accumulation d'algues, de bactéries et de polymères sur la surface d'une particule sédimentaire de kaolinite 20
Figure 2.8 Modèle originel du biofilm homogène de Wilderer et Characklis 22
Figure 2.9 Modèle conceptuel de l'architecture en forme de "champignons" d'un biofilm observé par microscopie confocale à balayage laser 23
Figure 2.10 Étapes de formation d'un biofilm 38
Figure 2.11 Cycle du carbone dans les biofilms des eaux souterraines 45
Figure 2.12 Cycle de l'azote dans les biofilms des eaux souterraines 47
Figure 2.13 Cycle du soufre dans les biofilms des eaux souterraines 49
Figure 2.14 Cycle du fer dans les biofilms des eaux souterraines 51
Figure 2.15 Étapes de biocolmatage d'une fracture rocheuse 69
Figure 2.16 Schéma du concept des biobarrières appliqué aux milieux fracturés 70
Figure 3.1 Schéma global de la méthodologie générale 88
Figure 3.2 Vue d'ensemble du montage utilisé pour l'étude expérimentale 89
Figure 3.3 Assemblage des plaques de calcaire connecté au circuit hydraulique 90
Figure 4.1 Set-up used for the fracture bioclogging experiment 107
Figure 4.2 Changes in *K*, nutrient consumption and hydraulic apertures 112
Figure 4.3 Changes in effluent bacterial density, nutrient consumption, DO upstream from the fracture inlet and in the effluent, DO consumption, influent and effluent pH, effluent Eh, effluent Ca^{2+} concentration and effluent pH 114
Figure 4.4 Epifluorescence photomicrographs of stained effluent samples 115

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

a	ouverture hydraulique de la fracture, cm
A	section moyenne de l'écoulement au travers de la fracture, cm^2
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
BSR	bactéries sulfato-réductrices
BTEX	Benzène, Toluène, Éthylbenzène, Xylène
CF	Chloroforme
CLSM	*Confocal Laser Scanning Microscopy*
C/N/P	ratio carbone/azote/phosphore où C, N et P sont en moles L^{-1}
D_h	diamètre hydraulique moyen de la fracture, cm
DO	concentration en oxygène dissous, mg L^{-1}
e	épaisseur du biofilm, µm
Eh	potentiel redox standard, mV
EPS	substances polymériques extracellulaires
g	constante gravitationnelle (9.806 m s^{-2})
ID	diamètre intérieur, mm
k	perméabilité, cm^2
K	conductivité hydraulique, cm min^{-1}
L	longueur de la fracture, cm
l	distance entre les piézomètres, cm
LDNA	liquides denses non-aqueux
MCBL	microscopie confocale à balayage laser
MEB	microscopie électronique à balayage
M.O.	matière organique
OD	diamètre extérieur, mm
ORP	potentiel redox, mV
p	probabilité
p'	périmètre extérieur de la section d'écoulement de la fracture, mm
PEHD	polyéthylène haute densité
PVC	chlorure de polyvinyle

Q	débit de l'effluent, mL min^{-1}
r_p	coefficient de corrélation de Pearson
Re	nombre de Reynolds
R_r	paramètre adimensionnel caractérisant la rugosité relative
SD	déviation standard
SDT	solides dissous totaux
TCE	trichloroéthylène
UMB	ultramicrobactérie
V	vitesse de l'eau dans la fracture, cm min^{-1}

Caractères grecs

α	porosité d'un matériau géologique, (%)
β	largeur de la fracture, cm
ϵ	rugosité des parois de la fracture, µm
ρ	masse volumique, g cm^{-3}
μ	viscosité dynamique, g cm^{-1} s^{-1}
Δh	perte de charge, cm
ν	viscosité cinématique, m^2 s^{-1}

Indices

uf	zone amont de la fracture
f	zone centrale de la fracture
df	zone aval de la fracture
0	condition initiale

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I: Caractéristiques du calcaire utilisé pour l'essai de colmatage 169
ANNEXE II: Description du site de prélèvement de l'eau souterraine..... 170
ANNEXE III: Comportement hydraulique initial du montage fracturé..... 172
ANNEXE IV: Protocole PE 43A..... 175
ANNEXE V: Protocole PE 43B..... 193
ANNEXE VI: Protocole PE 43D 211
ANNEXE VII: Protocole PE 43E..... 224
ANNEXE VIII: Protocole PE43F..... 230
ANNEXE IX: Protocole PE 43G 239
ANNEXE X: Protocole PE 43H 251
ANNEXE XI: Protocole PE 43I..... 257
ANNEXE XII: Protocole PE 43J 268
ANNEXE XIII Protocole PE 43K..... 279
ANNEXE XIV: Protocole PE 43M..... 291

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION

1.1 La problématique de la contamination des aquifères fracturés

La contamination des aquifères fracturés est une problématique environnementale de plus en plus reconnue autant par les gestionnaires de sites que par les institutions gouvernementales et industrielles. Les milieux fracturés sont généralement beaucoup plus vulnérables aux contaminants chimiques que les milieux poreux en raison de leurs vitesses d'écoulement plus élevées qui favorisent le transport des polluants et de leur hétérogénéité géologique qui encourage la persistance de ces polluants dans les fractures. Les contaminants peuvent en effet s'agglutiner aux parois des fractures, être séquestrés dans les zones faiblement interconnectées ou encore diffuser dans la matrice après s'être dissous dans la phase aqueuse (Steimle, 2002). L'hétérogénéité inhérente des réseaux fracturés rend aussi la caractérisation géologique, hydraulique et chimique d'un milieu fracturé contaminé fort complexe (Steimle, 2002).

Jusqu'à ces quelques dernières années, les stratégies envisagées pour le confinement ou la restauration des aquifères fracturés ont été largemement empruntées au domaine de la restauration des milieux poreux (Steimle, 2002). L'application de ces technologies aux milieux fracturés présente cependant plusieurs inconvénients. Par exemple, la technologie du pompage et traitement externe (*pump-and-treat*), qui est encore utilisée aujourd'hui pour la restauration de certains aquifères fracturés contaminés (Steimle, 2002), est jugée inapplicable à la restauration des aquifères fracturés profonds en plus d'engendrer des coûts prohibitifs (Marcus et Bonds, 1999). D'autre part, l'applicabilité des barrières de confinement traditionnelles (parois moulées, rideaux de palplanches) est souvent remise en question en présence de rocs difficilement excavables.

Les méthodes de traitement par voie biologique sont devenues une option d'intérêt croissant pour la restauration des aquifères contaminés. Ces techniques utilisent la capacité des micro-organismes à éliminer, transformer les polluants ou à

agir en tant que "tampon" entre la source de pollution et le milieu à protéger. Ces technologies ont aussi l'avantage d'être abordables au niveau des coûts, de pouvoir être utilisées *in situ* et de ne pas générer de sous-produits toxiques (Sturman *et al.*, 1995). Une de ces techniques biologiques met à profit la capacité de certaines bactéries à former des biofilms qui permettent de colmater les pores et les vides des milieux géologiques. Ce concept, qui peut être utilisé pour réduire la perméabilité de zones géologiques spécifiques et éventuellement pour créer un confinement (James *et al.*, 1995c), est aujourd'hui reconnu pour son efficacité à colmater les milieux poreux. Depuis très récemment, cette approche suscite également un intérêt accru pour le colmatage des milieux fracturés.

1.2 Approche envisagée

Ce projet de maîtrise fait suite à un projet de doctorat qui a été réalisé à la Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites du département des génies civil, géologique et des mines de l'École Polytechnique de Montréal, et qui portait sur la stimulation d'une microflore des eaux souterraines pour biocolmater un milieu géologique fracturé (Ross, 1999). Les travaux à l'échelle de laboratoire de ce projet de doctorat ont entre autres permis de démontrer la faisabilité de colmater une fracture simple dans du calcaire suite à l'activité d'une population bactérienne indigène des eaux souterraines soumise à une biostimulation continue. Les résultats ont montré que le niveau de biocolmatage obtenu et le temps requis pour l'atteindre étaient comparables aux valeurs qui ont été obtenues pour le biocolmatage de milieux poreux, tel que recensé dans la littérature.

Le présent projet s'inscrit dans la même lignée que ce projet pionnier tout en explorant une notion nouvelle, qui est celle de "stabilité dans le temps" des biocolmatages. L'expérimentation a, dans un premier temps (43 jours), consisté à reproduire l'essai de biocolmatage sur un montage fracturé légèrement modifié, et, dans un deuxième temps (179 jours), visé à examiner le comportement du biocolmatage lorsqu'exposé à des conditions de famine prolongée.

1.3 Hypothèse et objectifs de recherche

La présente étude est basée sur l'hypothèse selon laquelle le colmatage d'une **fracture** dans un **roc de calcaire** par un biofilm formé via la **biostimulation** d'une population microbienne indigène d'une eau souterraine demeure **stable** après l'interruption de l'apport en nutriments.

Les deux objectifs qui ont été fixés pour vérifier cette hypothèse de recherche sont les suivants:

- évaluer le potentiel de colmatage d'un montage simulant une fracture dans un roc de calcaire, dont les modes d'alimentation en nutriments et en inoculum ont été modifiés, et
- quantifier l'effet d'un arrêt d'apport en nutriments sur la stabilité à long terme du biocolmatage induit, et ce, dans une perspective de démantèlement.

CHAPITRE 2 – REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 L'environnement des aquifères de calcaire fracturés

2.1.1 Les aquifères de calcaire

Les calcaires qui, par définition, sont constitués d'au moins 50 % de minéraux carbonatés par poids, sont de loin les roches sédimentaires les plus répandues (Banton et Bangoy, 1997). Les calcaires tirent leur origine de la consolidation de matériaux carbonatés relargués dans les eaux peu profondes des mers tropicales ou tempérées, suite à leur sédimentation par des processus chimiques et biologiques (Gauri et Bandyopadhyay, 1999).

Les aquifères de calcaires, qui constituent près de 7 à 15 % des aquifères terrestres (Fitts, 2002), présentent une répartition géographique considérablement étendue à l'échelle du globe[1] (Banton et Bangoy, 1997) et desservent près de 25% de la population mondiale en eau potable (Escolero *et al.*, 2002). Le rendement des aquifères calcaires est généralement autour de 14%, soit à mi-chemin entre celui des aquifères d'argile (~3%) et celui des aquifères de sable et de gravier (~25%) (Todd, 1980), mais peut varier grandement en raison de la grande diversité des types de roches calcaires (Kehew, 2001).

Au Québec, les aquifères calcaires se situent principalement dans les Basses-Terres du Saint-Laurent (ex.: aquifère captif de la région de Mirabel, Nord-ouest de Montréal (Banton *et al.*, 1999)) et dans les Appalaches (ex.: aquifère de la Formation de La Coulée, Péninsule de Gaspé (Jutras *et al.*, 1999)) (Banton et Rouleau, 1999). Les aquifères des Appalaches sont peu connus et peu exploités tandis que ceux des Basses-Terres du Saint-Laurent desservent plus de 90% de la population du Québec par des puits. En revanche, les centres urbains tels que Montréal sont généralement approvisionnés en eau de surface par des réseaux de distribution. D'autre part, en

[1] Bassin méditerranéen, Amérique du Nord et Centrale, Sud-Est asiatique, Océanie, Afrique subsaharienne

Ontario, la région des Basses-Terres des Grands-Lacs compte aussi d'importants aquifères de calcaire, tels que les aquifères karstiques de l'escarpement du Niagara (Worthington, 2002; Zanini *et al.*, 2000).

2.1.1.1 Propriétés des roches calcaires

Origines des roches calcaires

Les calcaires ont des origines diverses. Ils peuvent être d'origine mécanique, (détritique) c'est-à-dire formés par la destruction et la compaction de débris de calcaires préexistants (calcaires lithographiques), d'origine organique, c'est-à-dire produits par l'accumulation et l'agglutination de débris inorganiques d'organismes invertébrés (calcaires à algues (cocoolithes), coquilliers et récifaux), et plus rarement d'origine chimique, à savoir causés par la précipitation de carbonate de calcium en solution (calcaires oolithiques[1], marbre stalagmitique) (Geyssant, 2001).

Composition chimique du calcaire

Les calcaires sont principalement formés de calcite ($CaCO_3$), à laquelle peuvent s'ajouter d'autres constituants tels que la dolomite ($CaMg(CO_3)_2$), l'aragonite[2] et la sidérite ($FeCO_3$) (Trudgill, 1985). Selon leur contenu en calcite et en dolomite, les calcaires sont considérés purs (95 à 100% de calcite) ou magnésiens (5 à 10% de dolomite ou de Mg^{2+}) et sont plus ou moins aisément altérables (Trudgill, 1985). Les ions les plus fréquemment rencontrés dans la matrice de calcaire incluent (Gauri et Bandyopadhyay, 1999):

- le carbonate (CO_3^{2-}), l'unité chimique fondamentale du calcaire,
- des cations, dont majoritairement le calcium (Ca^{2+}) et le magnésium (Mg^{2+}),
- des formes ioniques dont la teneur, faible, varie selon le degré d'altération de la roche (ex.: Na^+, K^+, Cl^-, SO_4^{2-}, NO_3^-, Si^{4+}, Fe^{2+}, Fe^{3+} et $(SiO_4)^{4-}$).

---

[1] Une oolithe est une sphère de petit diamètre (~0.5 à 2 mm) dont le centre est un débris autour duquel s'est développé en couches concentriques une enveloppe ou cortex

[2] L'aragonite a la même formule que la calcite mais une structure cristalline différente

Porosité, perméabilité & conductivité primaires du calcaire

La porosité α (%) d'un matériau géologique représente l'aptitude de ce matériau à contenir un fluide (Banton et Bangoy, 1997; Todd, 1980). La porosité primaire ou de matrice d'un matériau représente ainsi l'ensemble des vides dus à l'emprisonnement de gaz (porosité vacuolaire) et à la présence d'interstices entre les grains et cristaux de la roche (porosité intergranulaire) (Banton et Bangoy, 1997).

D'autre part, la perméabilité primaire k [L^2] d'un matériau représente l'aptitude de ce matériau à laisser s'écouler un fluide quelconque à travers lui et dépend avant tout de la porosité intergranulaire (Todd, 1980).

La porosité et la perméabilité primaires des calcaires sont en général faibles mais très variables, car influencées par divers facteurs tels que l'origine géologique et l'âge du calcaire ainsi que la géométrie, la taille, le degré de compaction et de cimentation des éléments constitutifs (Banton et Bangoy, 1997). Ainsi, bien que la porosité et la perméabilité primaires des calcaires varient typiquement entre 10 et 25% et 10^{-13} cm^2 et 10^{-9} cm^2 respectivement (Tableaux 2.1 et 2.2), α et k peuvent prendre des valeurs aussi élevées que 40% et 10^{-5} cm^2 pour les calcaires faiblement cimentés (ex.: craies ou calcaires coralliens) (Fitts, 2002) et des valeurs bien inférieures à 1% et 10^{-11} cm^2 pour les calcaires cristallins (Geyssant, 2001; Matthess et Harvey, 1982).

La perméabilité k [L^2] est fréquemment utilisée, à tort, pour désigner la conductivité hydraulique K [$L\ T^{-1}$] des matériaux géologiques. À l'inverse du concept de perméabilité, le concept de conductivité hydraulique introduit une notion de dépendance aux propriétés du fluide. Ainsi, k, qui est une propriété intrinsèque du matériau géologique et K, qui est à la fois dépendante du médium et des propriétés du fluide qui le traverse, sont liées par la relation 2.1 (Banton et Bangoy, 1997).

$$K = k \cdot \frac{\rho g}{\mu} \qquad (2.1)$$

où ρ est la masse volumique [$M\ L^{-3}$] du fluide, μ est sa viscosité dynamique [$M\ L^{-1}\ T^{-1}$] et g est la constante gravitationnelle (9.806 $m\ s^{-2}$). L'équivalence entre k et K ainsi que des valeurs typiques de porosité, de k et de K pour le calcaire et d'autres

matériaux géologiques sont à titre comparatif présentés aux tableaux 2.1 et 2.2. Le *K* primaire des calcaires est ainsi communément inférieur à 10^{-5} cm s^{-1} (Singhal et Gupta, 1999) et se situe à mi-chemin entre celui de l'argile et du gravier (Tableau 2.2).

2.1.1.2 Les calcaire fracturés

Les fractures

L'action des forces tectoniques sur les roches sédimentaires peut entraîner le plissement ou la cassure de la roche, pouvant en retour engendrer de multiples types de discontinuités, aussi appelées fractures (Fetter, 2001; Singhal et Gupta, 1999). Les types de discontinuités qui contribuent le plus à l'écoulement de l'eau souterraine dans les formations géologiques consolidées incluent: les joints, les fissures, les fractures de cisaillement et les failles (Rouleau *et al.*, 1999), et se distinguent par leur origine, leur mode de formation et leur taille. Les failles (origine tectonique ou sismique) sont des plans de rupture de grande étendue affectant tout le massif rocheux (Banton et Bangoy, 1997). Les joints (origine tectonique/thermique) sont des ruptures planaires présentant peu ou pas de déplacement parallèlement au plan de faiblesse, mais possiblement un déplacement normal très faible (Singhal et Gupta, 1999). Les fractures de cisaillement (origine tectonique), souvent plus étendues et continues que les joints (Singhal et Gupta, 1999), résultent d'un mouvement de cisaillement parallèlement au plan de faiblesse et peuvent présenter une ouverture étroite normale à ce plan (Genest, 2000). Les fissures (origine tectonique/thermique), des ruptures linéaires pouvant atteindre une grande étendue suite à l'application de contraintes de tension/compression, ont une ouverture étroite (0.1 à 1 cm) pouvant être agrandie à plusieurs cm par dissolution (Genest, 2000; Singhal et Gupta, 1999). Une classification dimensionnelle de ces discontinuités est présentée à la Figure 2.1.

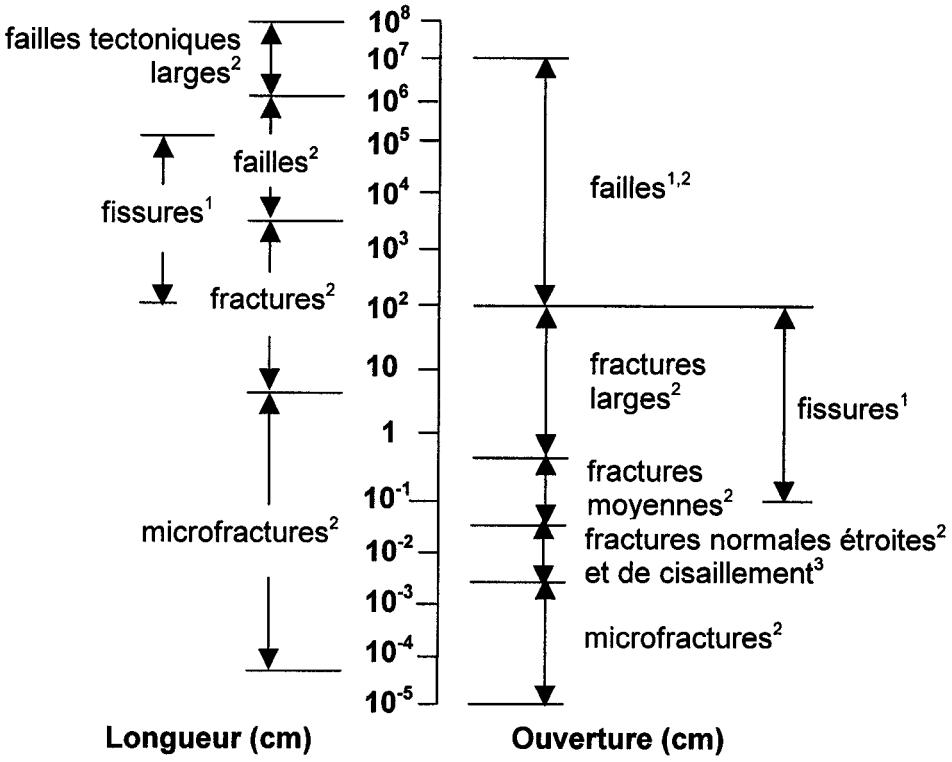


Figure 2.1 Classification des discontinuités selon leurs dimensions (adapté de [1]Brochu et Michel (1994); [2]Chernyshev et Dearman (1991) et [3]Singhal et Gupta (1999))

Perméabilité et conductivité relatives à la fracturation dans le calcaire

Sous l'action d'une contrainte, les roches à faible plasticité telles que les calcaires peuvent développer une porosité secondaire ou porosité de fracture, qui vient s'additionner à la porosité originelle de la roche et engendrer une augmentation de *K* au sein du matériau (Banton et Bangoy, 1997). La fracturation d'une roche calcaire intacte peut ainsi entraîner jusqu'à 9 ordres de grandeur d'augmentation de *K*, avec un *K* passant par exemple de 10^{-9} à 5 cm s^{-1} (Singhal et Gupta, 1999).

Les principaux facteurs qui conditionnent le *K* d'une fracture simple sont: l'ouverture, définie comme étant la distance perpendiculaire séparant les parois d'une fracture (Singhal et Gupta, 1999), la forme et la rugosité des surfaces, l'orientation et

la profondeur de la fracture (de Marsily, 1986), l'âge de la formation géologique ainsi que l'intrusion de matériaux de remplissage et la nature de ceux-ci (argile, sable, minéraux précipités) (Singhal et Gupta, 1999).

Si l'ouverture des fractures est généralement diminuée par l'intrusion de matériaux, à l'inverse, elle peut être élargie par une dissolution de la matrice, causant des augmentations considérables de la porosité et de la conductivité hydraulique secondaires (de Marsily, 1986). Ainsi, dans le calcaire, des K aussi élevés que 10^2 à 10^3 cm s^{-1} (Banton et Bangoy, 1997; White, 1988) ont été mesurés au sein de *karsts*, des formations comportant des réseaux de fractures élargies et de cavités souterraines (chenaux, cavernes, gouffres, galeries) issues de la dissolution du calcaire au contact d'eaux souterraines légèrement acidifiées (Banton et Bangoy, 1997).

L'écoulement en milieu fracturé

Modèle d'écoulement pour une fracture linéaire simple

Le modèle le plus ancien et le plus simple visant à décrire l'écoulement et le transport d'un fluide visqueux dans une fracture linéaire discrète est le *modèle des plaques parallèles* (Sisavath *et al.*, 2003). Dans ce modèle, où l'écoulement est supposé permanent, le régime laminaire et le fluide incompressible (Waite *et al.*, 1998), une fracture linéaire simple est représentée par une ouverture constante a séparant deux plaques parallèles de surface lisse et de très faible perméabilité matricielle (Banton et Bangoy, 1997) (Figure 2.2). La conductivité hydraulique K [L T^{-1}] dans la fracture peut être exprimée en fonction de l'ouverture a [L] de la fracture selon la relation 2.2 (Witherspoon *et al.*, 1980):

$$K = \frac{\rho g}{12\mu} \bullet a^2 \qquad (2.2)$$

où ρ et μ sont respectivement la masse volumique [M L^{-3}] et la viscosité dynamique [M L^{-1} T^{-1}] du fluide et g est la constante gravitationnelle [L T^{-2}].

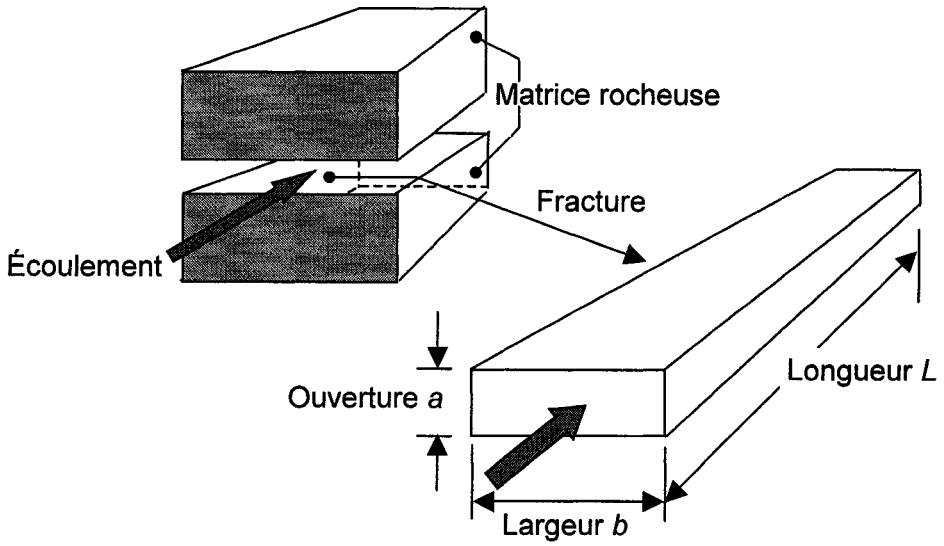


Figure 2.2 Modèle des plaques parallèles pour une fracture linéaire simple

K peut également être exprimé selon l'équation 2.3 en fonction du gradient hydraulique $\Delta h/L$ [L L^{-1}] imposé sur la fracture en utilisant la loi de Darcy (de Marsily, 1986):

$$K = \frac{QL}{A\Delta h} \tag{2.3}$$

où *A* [L^2] est la section moyenne de l'écoulement au travers de la fracture, *L* est la longueur de la fracture [L] et *Q* [L^3 T^{-1}] est le débit dans la fracture.

Le modèle des plaques parallèles ne peut cependant pas être considéré comme une représentation fidèle de l'écoulement au sein des fractures naturelles puisque celles-ci présentent fréquemment des parois rugueuses, des ouvertures variables (Sisavath *et al.*, 2003) et des zones de contact pouvant engendrer la formation de chemins préférentiels (Hakami et Larsson, 1996). Ainsi, lorsque la rugosité ε des parois de la fracture devient difficilement négligeable (i.e. $\varepsilon/a > 0.065$), ce qui est par exemple le cas avec une fracture d'ouverture très faible, l'expression de *K* dans la fracture devient (Witherspoon *et al.*, 1980):

$$K = \frac{\rho g a^2}{6\mu} \cdot \frac{1}{1+6(\varepsilon/a)^{1.5}} \tag{2.4}$$

Tableau 2.1 Porosité des calcaires vs d'autres matériaux géologiques

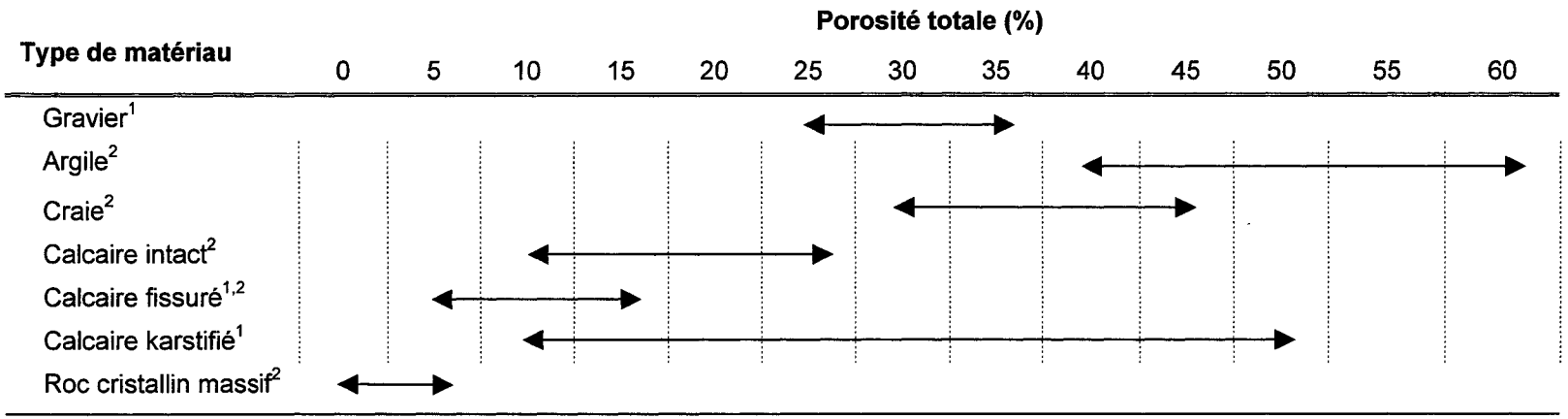
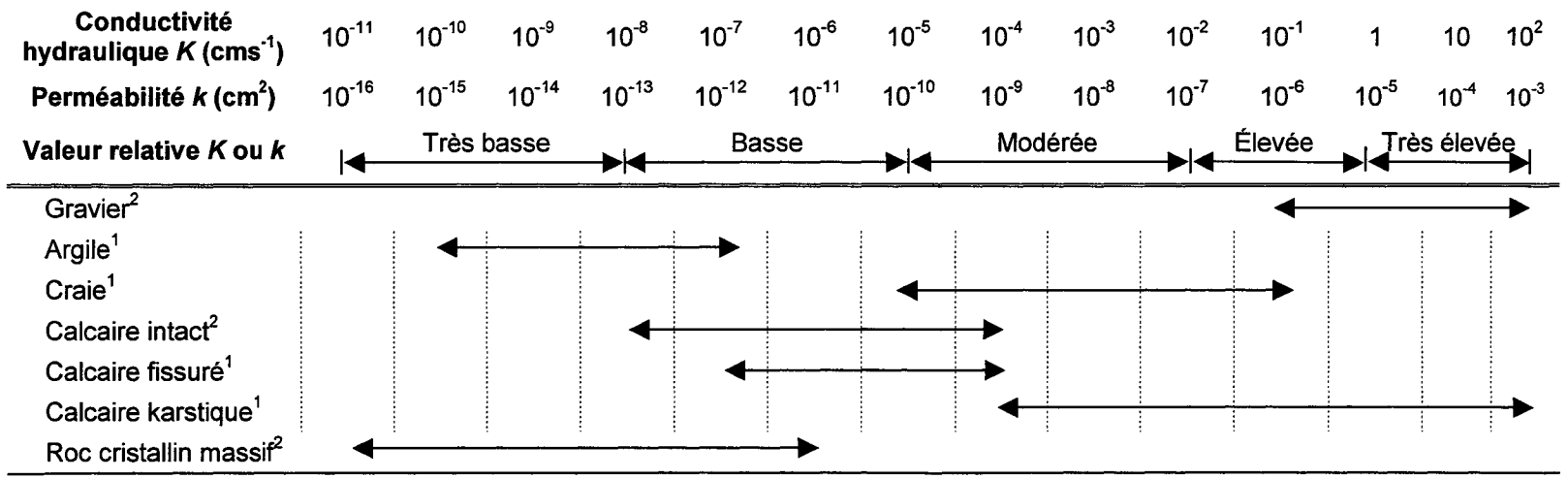


Tableau 2.2 Perméabilité et *K* des calcaires vs d'autres matériaux géologiques



[1]Banton et Bangoy (1997); [2]Singhal et Gupta (1999)

Régime d'écoulement dans une fracture linéaire simple

En hydraulique classique, le passage d'un régime d'écoulement laminaire à un régime d'écoulement turbulent dans un canal ouvert ou une conduite se produit généralement pour un nombre de Reynolds $R_e \sim 2000$ (Fetter, 2001), où R_e est défini par:

$$Re = \frac{VDh\rho}{\mu} \tag{2.5}$$

où V [L T^{-1}] est la vitesse moyenne du fluide, $D_h = 4A/p'$ [L] est le diamètre hydraulique de la fracture, A [L^2] étant la section moyenne d'écoulement de la fracture et p' [L] le périmètre extérieur de cette section. La nature du régime d'écoulement dans une fracture peut cependant être définie de façon plus spécifique en tenant compte de R_e et R_r simultanément, où $R_r = \epsilon/D_h$ est un paramètre adimensionnel caractérisant la rugosité relative (de Marsily, 1986). Ainsi, dépendamment du débit d'écoulement, de la géométrie de la fracture et des caractéristiques de surface des parois, l'écoulement peut être de type laminaire lisse, laminaire rugueux, turbulent lisse, turbulent rugueux, turbulent très rugueux ou encore être dans une zone de transition (Figure 2.3).

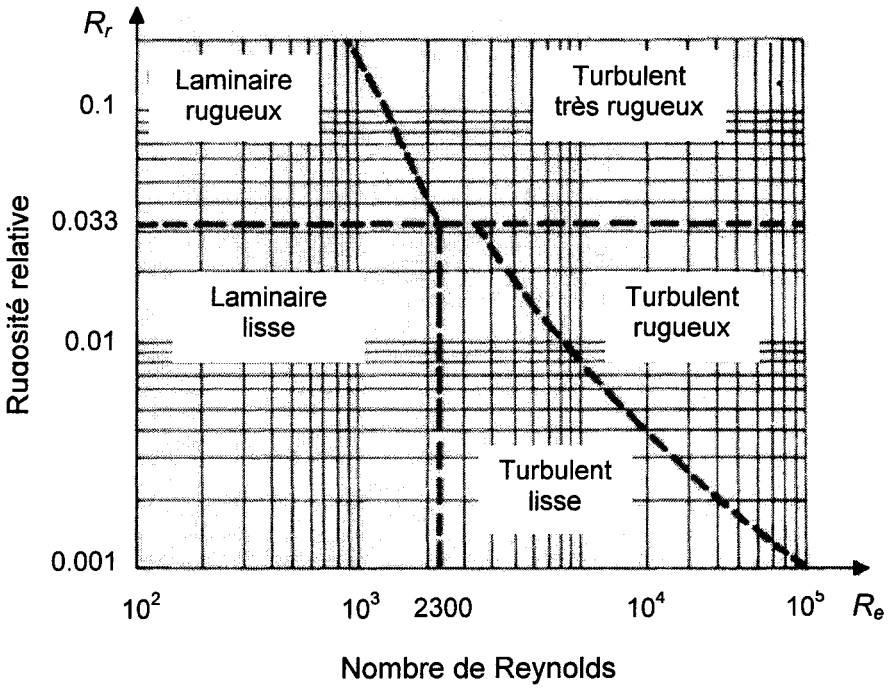


Figure 2.3 Régimes empiriques d'écoulement dans une fracture simple (tiré de: de Marsily, 1986)

2.1.1.3 Les eaux souterraines des aquifères de calcaire

Composition chimique des eaux des aquifères calcaires

Les caractéristiques chimiques des eaux souterraines sont généralement étroitement liées à la géologie de la roche-hôte (Banton et Rouleau, 1999). Ainsi, la composition chimique des eaux souterraines varie souvent considérablement d'un aquifère à l'autre en raison de la grande diversité des origines des roches calcaires (détritique, chimique ou organique) (Matthess et Harvey, 1982). La composition chimique des eaux souterraines prélevées de divers types d'aquifères calcaires est, à titre comparatif, présentée au Tableau 2.3.

Les eaux souterraines des aquifères calcaires présentent généralement une concentration en solides dissous totaux (SDT) modérée, de l'ordre de 500 à 800 mg L^{-1} (Tableau 2.3), imputable à leur contenu modéré en ions (Bakalowicz, 1994). Les ions prédominants incluent fréquemment les bicarbonates (HCO_3^-), issus de la dissolution du CO_2 gazeux dans l'eau, ainsi que les ions Ca^{2+} et Mg^{2+}, résultant de l'altération de la calcite et de la dolomite (Tableau 2.3) (Bakalowicz, 1994). Ainsi, les eaux souterraines issues des aquifères dolomitiques présentent généralement un ratio $[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}]$ proche de 1 (Rangées 4, 6, 7 & 9, Tableau 2.4) (Langmuir, 1984). En contrepartie, les eaux issues des aquifères dont la teneur est plus élevée en calcite qu'en dolomite ont un ratio $[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}]$ qui varie généralement entre 2 et 10 (Rangées 5 & 8, Tableau 2.4).

Tableau 2.3 Constituants des eaux souterraines des aquifères de calcaires

Majeurs[1]	Mineurs[2]	Espèces autres[3]
Quantités importantes:	Potassium (K^+)	Fer ferreux (Fe^{2+})
Calcium (Ca^{2+})	Nitrates (NO_3^-)	Fer ferrique (Fe^{3+})
Magnésium (Mg^{2+})	Carbonates (CO_3^{2-})	Fluor (F^-)
Bicarbonates (HCO_3^-)		Manganèse (Mn^{2+})
Quantités moindres:		Aluminium (Al^{2+})
Silice (SiO_2)		
Sodium (Na^+),		
Sulfates (SO_4^{2-})		
Chlorures (Cl^-)		

Tableau adapté de Kehew (2001) & Langmuir (1984); [1]C (concentration (mg L^{-1})) > 5; [2]0.01 < C < 10; [3]C < 1

Tableau 2.4 Composition chimique des eaux souterraines isssues de divers types d'aquifères calcaires

	Lieu et nature géologique de l'aquifère	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^{+}	K^{+}	HCO_3^-	CO_3^{2-}	SO_4^{2-}	Cl^-	NO_3^-	SiO_2	SDT	pH
		mg L^{-1}											–
1	Mississauga, Sud-Ontario[1]; Argile schisteuse interstratifiée avec calcaire fracturé	58.0	19[a]	207	14	381	< 3	96	197	0.08	–	937	8.4
2	Région de Montréal[2] (puits) Calcaires et schistes	4.5	4.8	400.0	3.1	482.0	5.0	111	250	<0.02	7.7	1500	8.5
3	Région de Mirabel, Basses-Terres du Saint-Laurent[3] (puits); Calcaires	39.0	58.0	11.5	2.2	138.0	n.d	4.0	3.0	11.0	n.d.	~258	7.5
4	Tuscumbia, Alabama, ÉU[4]; Karst dolomitique	34.0	14.0[b]	2.0	0.6	160.0	n.d.	3.7	2.8	3.2	9.2	~230	7.5
5	Aquifère Edwards, Texas, ÉU[5] (puits); Calcaires	74.0	9.5[c]	24.0	7.0	277.0	n.d.	19.0	24.0	4.1	11.0	309	7.0
6	Sicile, Italie[6]; Dolomies	44.0	23.7[d]	7.9	0.3	256.0	n.d.	2.5	7.1	n.d.	n.d.	233	7.7
7	Source Fürstenquelle, Amberg, Allemagne[4]; Calcaire	58.6	27.4[e]	Tr.	Tr.	303.0	n.d.	Tr.	n.d.	11.0	n.d.	n.d.	nd
8	Source karstique du Lez, Montpellier, France[6]	111	7.9[f]	23.0	1.6	350.0	n.d.	30.0	39.0	n.d.	4.5	~592	7.3
9	Source karstique de Ras-Al Aïn, Syrie[7]	108.0	56.0[d]	36.0	6.0	244.0	n.d.	180.0	107.0	20.0	n.d.	757	7.2

[1]Lapcevic *et al.* (1999a); [2]Simard & Des Rosiers (1980); [3]Simard (1978); [4]Matthess & Harvey (1982); [5]Langmuir (1984); [6]Bakalowicz (1994); [7]Kattan (2002); [a]$[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}] \cong 1.9$; [b]$[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}] \cong 1.4$; [c]$[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}] \cong 4.8$; [d]$[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}] \cong 1.1$; [e]$[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}] \cong 1.3$; [f]$[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}] \cong 8.6$ où $[Ca^{2+}]$ et $[Mg^{2+}]$ sont en moles L^{-1}; SDT = Solides dissous totaux; Tr. = Traces; n.d. = non disponible

Propriétés physico-chimiques des eaux des aquifères calcaires

Les eaux souterraines naturelles des aquifères calcaires ont généralement un caractère légèrement alcalin attribuable à la dissolution des minéraux carbonatés et silicatés (Banton et Bangoy, 1997). Le pH de ces eaux, qui varie généralement entre 6.5 et 9.0, y est un paramètre-clé puisqu'il influence de façon sensible la solubilité des espèces carbonatées (HCO_3^-, CO_3^{2-}) (Ford et Williams, 1989a).

D'une manière générale, les eaux situées à de faibles profondeurs au sein des aquifères calcaires ont un pH plus élevé que les eaux issues de profondeurs plus importantes. En effet, sous les conditions naturellement rencontrées, la dissolution de la calcite et de la dolomite augmente rapidement en fonction de la concentration en CO_2 dissous (équations 2.6 et 2.7 respectivement (Ford et Williams, 1989a)) et est conséquemment plus importante au sein des eaux peu profondes en raison des échanges avec le CO_2 qui y sont accrus (White, 1988).

$$CaCO_3 + CO_2 + H_2O \Leftrightarrow Ca^{2+} + 2HCO_3^- \quad (2.6)$$

$$CaMg(CO_3)_2 + 2CO_2 + 2H_2O \Leftrightarrow Ca^{2+} + Mg^{2+} + 4HCO_3^- \quad (2.7)$$

Des concentrations en CO_2 de l'ordre de 20 à 50 mg L^{-1} peuvent ainsi dissoudre des concentrations en calcite de l'ordre de 150 à 300 mg L^{-1} (Matthess et Harvey, 1982), et donner lieu à des teneurs élevées en espèces carbonatées (HCO_3^-). En revanche, les vitesses d'écoulement plus lentes et les temps de résidence plus longs qui caractérisent les eaux souterraines plus profondes favorisent une dissolution accrue des sels (Figure 2.4) (Kehew, 2001; Bakalowicz, 1994).

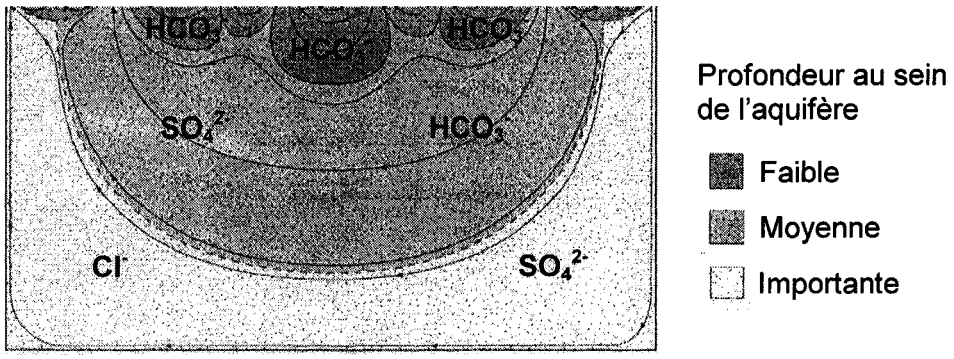


Figure 2.4 Impact de la profondeur des eaux sur leur composition chimique (adapté de Kehew, 2001)

Pendant leur transport, les constituants des eaux souterraines sont sujets à des réactions chimiques d'oxydo-réduction (réactions redox) qui sont contrôlées par l'abondance, la distribution et la réactivité d'agents oxydants et réducteurs potentiels, la nature et l'intensité des activités bactériennes ainsi que les conditions environnementales telles que le pH (Drever, 1997).

L'oxygène moléculaire, qui exerce un contrôle important sur les processus biologiques, est l'agent oxydant actif le plus répandu au sein des aquifères (Strayer, 1994; Knox *et al.*, 1993). Les conditions redox des eaux souterraines sont habituellement contrôlées par l'équilibre existant entre la teneur en oxygène des eaux de recharge et la consommation en oxygène résultant de l'activité bactérienne (Drever, 1997).

Ainsi, au sein des systèmes fracturés ou des eaux souterraines peu profondes, l'apport en oxygène, important en raison des taux de recharge élevés, excède fréquemment les taux de respiration cellulaire, engendrant un pouvoir oxydant et des teneurs en oxygène élevés (~ 6 à 12 mg L^{-1}) (Drever, 1997; Knox *et al.*, 1993; Matthess et Harvey, 1982). À l'inverse, au sein des eaux souterraines plus profondes, des systèmes non-fracturés, des aquifères riches en matière organique ou recouverts de dépôts de surface, la consommation excède généralement l'apport en oxygène (Matthess et Harvey, 1982) et les teneurs en oxygène dissous sont souvent non mesurables (< 0.1 mg L^{-1}) (Chapelle, 2001). En cas d'épuisement total de l'oxygène, les nitrates, le manganèse, le fer, et les sulfates peuvent être tour à tour réduits, causant une baisse concomitante du potentiel redox (Strayer, 1994) (Figure 2.5).

La température des eaux souterraines peut aussi avoir une influence déterminante sur la composition chimique des eaux en agissant sur la solubilité de l'oxygène dissous (Kegley et Andrews, 1998) et des minéraux constituants (Bakalowicz, 1994). Une baisse de la température de l'eau cause une augmentation de la solubilité de l'oxygène dissous (Kegley et Andrews, 1998), qui en retour favorise une hausse du pouvoir oxydant de l'eau. De même, une baisse de température augmente la solubilité du CO_2 dissous (White, 1988) et conséquemment celle des minéraux carbonatés. La température des eaux souterraines est aussi étroitement liée à la profondeur de la nappe d'eau, et augmente typiquement de 1°C pour chaque

40 mètres de profondeur (Freeze et Cherry, 1979), suggérant une baisse du pouvoir oxydant et du pouvoir tampon avec l'augmentation de la profondeur.

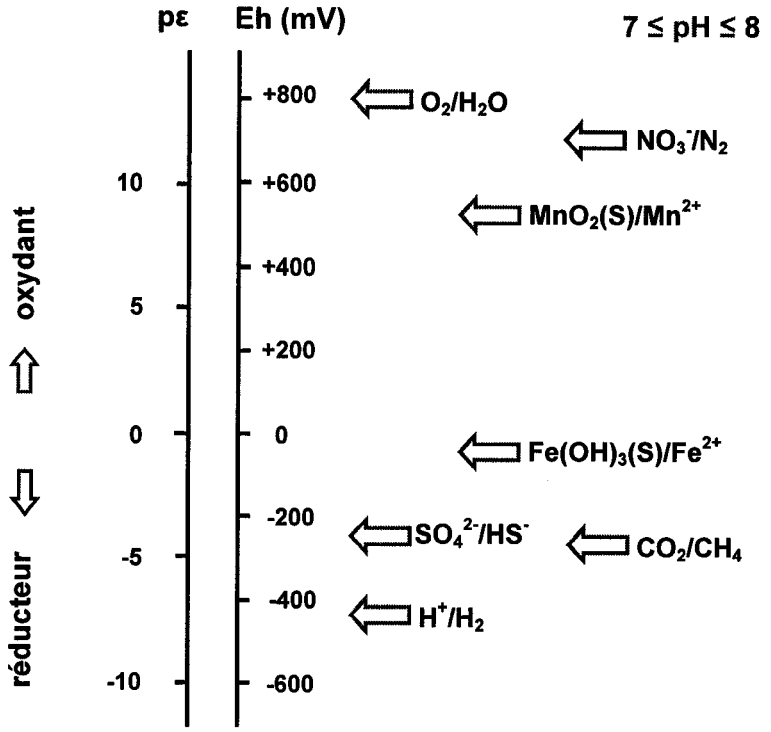


Figure 2.5 Potentiel redox de réactions importantes dans les aquifères (adapté de Schüring *et al.* (2000))

Microorganismes des eaux souterraines

Les virus, les eucaryotes (algues, protozoaires et mycètes) et les bactéries sont les principaux micro-organismes qui habitent les aquifères (Chapelle, 2001). Les bactéries, qui sont les micro-organismes dominants des eaux souterraines (Chapelle, 2001; Baveye *et al.*, 1998), y existent sous deux formes distinctes, soit en suspension libre dans l'eau (état planctonique) ou sous forme de micro-colonies ou de biofilms fixés aux surfaces d'un support solide (état sessile) (Filloux et Vallet, 2003). La forme planctonique résulte fréquemment de conditions ambiantes oligotrophes, c'est-à-dire pauvres en nutriments (Marshall, 2000).

Les bactéries planctoniques des eaux souterraines varient tant en diversité qu'en quantité, et ce, en fonction de leur localisation au sein de la colonne d'eau

(Chapelle, 2001). Ainsi, dans les zones d'écoulement peu profondes, la population bactérienne planctonique est typiquement diversifiée, abondante (~10^4 à 10^7 cellules mL^{-1}) (Knox *et al.*, 1993) et à dominance hétérotrophe aérobie en raison des vitesses d'écoulement et des taux de recharge élevés qui favorisent le transport des nutriments et de l'oxygène à partir de la zone vadose (Chapelle, 2001). En revanche, les faibles teneurs en oxygène dissous, les conditions oligotrophes et possiblement stagnantes qui caractérisent les eaux souterraines profondes (> 75 m) (Chapelle, 2001), engendrent des populations bactériennes typiquement moins denses (~10^2 à 10^5 cellules mL^{-1}) (Knox *et al.*, 1993) et anaérobies (facultatives ou strictes) (ex.: méthanogènes et sulfato-réductrices) (Chapelle, 2001).

2.2 Les biofilms

Le phénomène d'attachement des micro-organismes aux surfaces a été étudié à partir des années 1930 par le microbiologiste Zobell qui, dès lors, avait observé que les cellules bactériennes pouvaient adhérer sous forme de micro-colonies aux parois humides des bouteilles (Bryers, 2000). Dès le début des années 70, les chercheurs ont assimilé les biofilms à des systèmes relativement simples de dépôts homogènes de sécrétions bactériennes comportant des bactéries physiologiquement identiques à leurs homologues planctoniques (De Lancey Pulcini, 2001). Les progrès technologiques qui ont été réalisés au cours des trente dernières années ont cependant permis de mettre en évidence l'architecture hétérogène et complexe des biofilms, de différencier les bactéries sessiles des bactéries planctoniques et conséquemment d'infirmer l'approche originelle (De Lancey Pulcini, 2001; Wimpenny, 1996).

2.2.1 Définition

Maints chercheurs se sont attardés à définir les biofilms. Characklis et Marshall (1990) les ont par exemple décrits comme «des matrices organiques de polymères bactériens dans lesquelles sont immobilisées des cellules adsorbées à une surface ainsi que des macroorganismes et des substances dégradables ou inorganiques» (traduction libre française). Plus récemment, Costerton *et al.* (1999) ont établi une définition plus large présentant les biofilms comme «des communautés

organisées de cellules bactériennes adhérées à une surface inerte ou vivante et enfouies dans une matrice polymérique synthétisée par ces mêmes cellules bactériennes» (traduction libre française) (Figure 2.6).

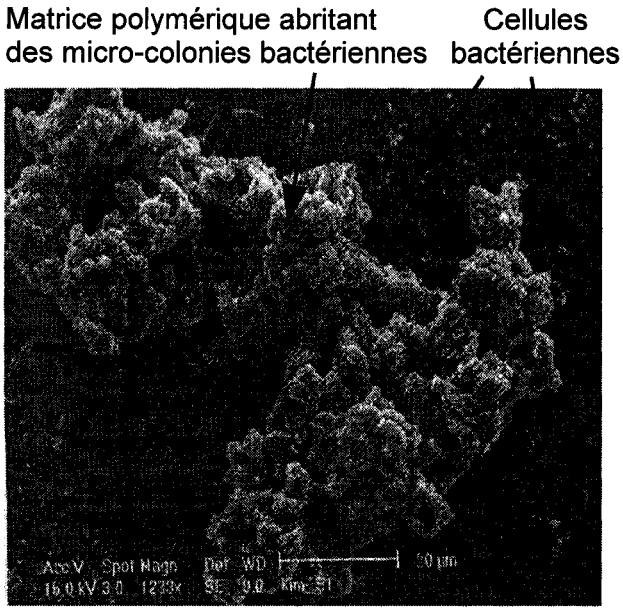


Figure 2.6 Observation par microscopie électronique à balayage (MEB) d'un gel polymérique et de cellules bactériennes fixés sur un support
Reproduit de Kim et Fogler (2000) avec la permission de John Wiley & Sons, Inc. ©Wiley-Liss, Inc., 2000 (subsidiaire de John Wiley)

2.2.2 Omniprésence des biofilms et applications potentielles

Les biofilms sont omniprésents dans une diversité d'environnements, naturels ou artificiels, partout où les surfaces sont non-stériles et exposées à une certaine humidité (Sutherland, 2001b). Dans les écosystèmes aquatiques suffisamment riches en nutriments, 99% des bactéries existeraient à l'état de biofilm (Costerton *et al.*, 1995), et y constitueraient de véritables réservoirs d'espèces (Bourion, 2001).

La formation de biofilms sur les surfaces est cependant de plus en plus souvent identifiée comme la source récurrente de nombreux problèmes d'ordre environnemental, industriel et sanitaire en raison des transformations qu'ils induisent sur le transport de masse et d'énergie ainsi que sur les processus chimiques et biologiques (Applegate et Bryers, 1991). Des exemples des effets indésirables de l'attachement des biofilms sur les surfaces sont: les pertes d'énergie dans les

échangeurs de chaleur où les biofilms agissent comme isolant thermique (Flemming, 2002), les surconsommations de carburant dues à l'accumulation de dépôts d'organismes aquatiques catalysée par la formation de biofilms bactériens sur les coques de navires (Flemming & Wingender, 2001), et la contraction d'infections nosocomiales[1] chez les patients immunodéprimés due à la contamination d'instruments ou de matériaux médicaux (cathéters, implants, prothèses, organes artificiels) par des biofilms abritant des bactéries pathogènes (Costerton *et al.*, 1999).

Dans de nombreux cas les biofilms ont toutefois une influence bénéfique sur leur milieu, voire même vitale. Par exemple, il a été démontré que les biofilms sécrétés par la bactérie marine *Shewanella colwelliana* étaient indispensables à la métamorphose des larves d'huîtres ainsi qu'à leur fixation aux surfaces (Zhao *et al.*, 2003). De même, les biofilms qui se développent sur les surfaces des sédiments benthiques peuvent aider à en réduire l'érosion (Black *et al.*, 2002) (Figure 2.7).



Figure 2.7 Observation microscopique d'un biofilm formé suite à l'accumulation d'algues, de bactéries et de polymères sur la surface d'une particule sédimentaire de kaolinite

En vert: les algues; en rouge: les bactéries; en bleu: la matrice polymérique.
Tiré de: http://www.ec.gc.ca/EnviroZine/french/issues/38/feature3_f.cfm
Reproduit avec la permission de Nathalie Ross

[1] Infections contractées en milieu hospitalier

Dans les environnements souterrains, la capacité qu'ont les biofilms à se fixer sur les matériaux géologiques tels que les grains des milieux poreux (Baveye *et al.*, 1998), les parois des fractures rocheuses (Brown *et al.*, 1998), les sédiments (Brigmon *et al.*, 2003) et les matières particulaires (Dussart *et al.*, 2003) peut être mise à profit à des fins de protection environnementale pour obtenir le colmatage sélectif de zones géologiques perméables (James *et al.*, 1995b; MacLeod *et al.*, 1988). Les biofilms bactériens peuvent en effet colmater les pores et les vides des milieux géologiques pour former des barrières antimigration (Ross et Bickerton, 2002; Chen-Charpentier, 1999).

Une description générale des biofilms, de leurs composantes, de leur mode de formation et de leurs propriétés, dont leur stabilité, est présentée au cours des sections 2.2.3 à 2.2.9 suivantes.

2.2.3 Organisation spatiale des biofilms

À l'origine, le modèle qui a été proposé pour décrire la structure des biofilms est celui de Wilderer et Characklis (1989) (Figure 2.8). Dans ce modèle unidimensionnel simple, le biofilm a été assimilé à une structure homogène comportant quatre compartiments:

1. la surface d'attache,
2. la base du biofilm, représentée par une couche uniforme plane constituée de cellules enfouies dans une matrice de biopolymères,
3. la surface du biofilm, formée d'une couche très rugueuse et
4. le fluide environnant.

Le transport des microorganismes, des substrats et des déchets métaboliques y est assuré par un écoulement convectif dans le fluide et, dans le biofilm, par des processus de diffusion moléculaire se produisant perpendiculairement aux surfaces.

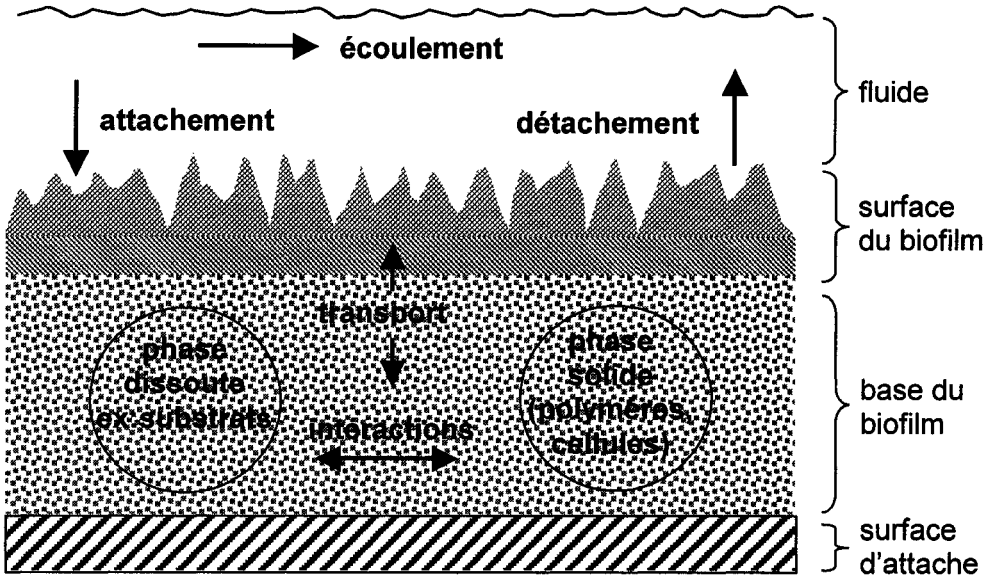


Figure 2.8 Modèle originel du biofilm homogène de Wilderer et Characklis (figure adaptée de Wilderer et Characklis (1989))

Le modèle conceptuel de l'organisation spatiale des biofilms a cependant dramatiquement changé au cours de la dernière décennie (Picioreanu *et al.*, 2000a; Stoodley *et al.*, 1999b). Les progrès des techniques de microscopie et en particulier l'introduction de la microscopie confocale à balayage laser (MCBL ou *CLSM* pour *Confocal Laser Scanning Microscopy*), une technologie non destructive permettant la reconstitution tridimensionnelle directe de la structure des objets, ont révélé la complexité de l'architecture interne des biofilms sous leur forme naturelle complètement hydratée (Stoodley *et al*, 1999b; Bishop, 1997).

Des photographies de biofilms prises par MCBL ont ainsi permis de visualiser des micro-colonies de cellules enfouies dans une matrice polymérique fibreuse et poreuse présentant des structures à géométries variables (cônes, tours, formes "champignons") séparées par des pores interconnectés formant de minuscules canaux (De Lancey Pulcini, 2001; Okabe *et al.*, 1997; Lewandowski *et al.*, 1995; Costerton *et al.*, 1994) (Figure 2.9). Ces canaux, qui renferment la majeure partie de l'eau du biofilm et peuvent représenter jusqu'à 50% de son volume (de Beer *et al.*, 1997b), forment un réseau de circulation permettant, d'une part, d'acheminer l'oxygène et les

nutriments dans les couches internes, et, d'autre part, d'évacuer les déchets métaboliques cellulaires hors du biofilm (Filloux et Vallet, 2003; Martín-Cereceda *et al.*, 2001). L'activité de prédation bactérienne soutenue de populations de protistes permettrait de maintenir ou de restaurer les canaux au sein des biofilms matures (Massol-Deyá *et al.*, 1995; de Beer *et al.*, 1994a).

Dans ce modèle conceptuel, le transport de masse s'effectuerait au travers de deux zones distinctes, soit la *zone externe* au biofilm, délimitée par le fluide jusqu'à l'interface fluide/biofilm, et la *zone interne* du biofilm (Beyenal et Lewandowski, 2002; Picioreanu *et al.*, 2000b). Dans la zone externe, le transport des substances dissoutes s'effectuerait par diffusion et par convection (Picioreanu *et al.*, 2000c). En revanche, dans la zone interne, le transfert de masse serait à la fois diffusif et convectif au travers des canaux de la matrice, mais exclusivement diffusif au sein des aggrégats cellulaires où le fluide est essentiellement stagnant (de Beer *et al.*, 1994b).

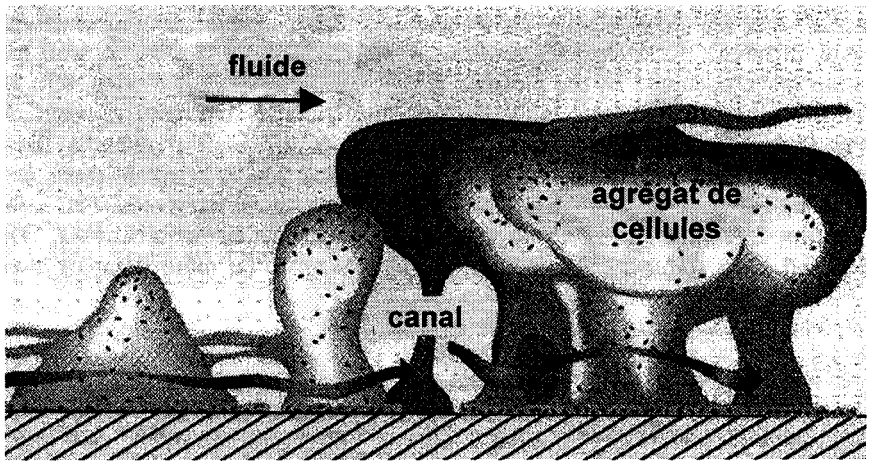


Figure 2.9 Modèle conceptuel de l'architecture en forme de "champignons" d'un biofilm observé par microscopie confocale à balayage laser
Reproduit de Lewandowski *et al.* (1995) avec la permission du détenteur du droit d'auteur *IWA Publishing*

L'avènement de la technologie des microélectrodes a aussi permis de mettre en évidence l'existence d'hétérogénéités physico-chimiques parfois importantes au sein des biofilms (Yu et Bishop, 2001). Quelques-uns des paramètres ou métabolites pour lesquels des gradients de concentration ont été expérimentalement mesurés au sein de biofilms bactériens incluent: le pH, le potentiel redox (Li et Bishop, 2002), le

dioxyde de carbone (Beyenal *et al.*, 2004; de Beer *et al.*, 1997a), l'oxygène dissous, l'ammoniaque (Okabe *et al.*, 2003), le méthane (Damgaard *et al.*, 2001), le glucose (Beuling *et al.*, 2000) et les nitrites, nitrates (Okabe *et al.*, 2003) et sulfures (Yu et Bishop, 2001). Ces stratifications chimiques sont généralement unidirectionnelles et perpendiculaires à la base du biofilm (Picioreanu *et al.*, 2000a).

D'autre part, des mesures physiques réalisées sur divers biofilms indiquent que les distributions spatiales de porosité et de densité y sont très souvent non-homogènes (Zhang et Bishop, 1994b). Les hétérogénéités physico-chimiques seraient en retour responsables de disparités biotiques pouvant prendre la forme de gradients spatiaux d'espèces (Zhang et Bishop, 1994a), de croissance (Costerton *et al.*, 1995), de densité (Madoni *et al.*, 2001), de viabilité (Sutherland, 2001a; Bishop, 1997) et de résistance (Boyd et Chakrabarty, 1995) bactériennes. La microzonation des processus au sein des biofilms n'est cependant pas un phénomène statique car les processus biotiques (ex.: compétition bactérienne pour les nutriments) et abiotiques (ex.: diffusivité, transfert de masse) sont en constante interaction (Zhang *et al.*, 1994; Zhang et Bishop, 1994a).

À titre d'exemple, les conditions non limitantes en nutriments et en oxygène qui caractérisent les biofilms minces (< 150 µm) favoriseraient une distribution homogène des bactéries et la dominance d'espèces bactériennes aérobies (Zhang *et al.*, 1994). En revanche, les importants gradients chimiques, notamment en oxygène, présents dans les biofilms plus épais (> 500 µm) favoriseraient une microzonation de la diversité des populations microbiennes et des processus métaboliques (Madoni *et al.*, 2001; Okabe et Watanabe, 2000; Costerton *et al.*, 1995). En surface, la grande partie de l'oxygène et des nutriments est en effet utilisée par des espèces bactériennes aérobies strictes, métaboliquement actives et à croissance rapide (Marshall, 2000; Okabe *et al.*, 1997). À l'inverse, les populations des couches sous-jacentes sont peu actives et à dominance microaérophile, anaérobie facultative ou anaérobie stricte (Marshall, 2000; Zhang *et al.*, 1994).

2.2.4 Composition des biofilms bactériens

Les composantes majeures des biofilms bactériens sont résumées au Tableau 2.5.

Tableau 2.5 Composantes principales des biofilms

Composante[1]	Proportion massique
Eau	jusqu'à 99%
Cellules bactériennes	2 à 5%
Matrice exopolysaccharidique	1 à 2%
Protéines et glycoprotéines (protéines lytiques, enzymes excrétées)	1 à 2%
ADN et ARN issus de cellules lysées	<1 à 2%
Lipides, phospholipides, substances humiques et ions séquestrés de l'environnement immédiat	?

[1]Tableau adapté d'Allison (2003), de Sutherland (2001b) et de Wingender *et al.*, (1999a)

L'eau, qui adhère aux parois cellulaires ou qui circule dans les pores et canaux de la matrice, représente de ~87% (Huang et Pinder, 1995) à 99% (Wingender *et al.*, 1999a) de la masse du biofilm.

Les cellules bactériennes, regroupées en micro-colonies, qui peuvent inclure plusieurs espèces distinctes, représentent jusqu'à 5% de la masse du biofilm (Sutherland, 2001b). Des virus et des organismes de niveaux trophiques plus élevés (micro-algues, mycètes, protozoaires) peuvent aussi être présents (Baveye *et al.*, 1998).

La matrice exopolysaccharidique est formée par la sécrétion de polysaccharides à l'extérieur de la paroi des cellules bactériennes, et englobe les cellules qui la synthétisent (Sutherland, 2001b). Ces polysaccharides sont désignés sous divers termes, dont: "polysaccharides extracellulaires ou exocellulaires", "exopolymères", "exopolysaccharides" ou encore sous l'acronyme "EPS" (*Extracellular Polymeric Substances*) (Wingender *et al.*, 1999a). Bien qu'ils ne représentent que 1 à 2% de la masse du biofilm (Allison, 2003), les EPS y forment de 50% à 90% de la matière organique totale (Wingender *et al.*, 1999a).

2.2.4.1 La matrice de substances polymériques extracellulaires

Définition des EPS bactériens

Une grande quantité de bactéries synthétisent divers types de polysaccharides qui peuvent être classés selon leur localisation dans la cellule (Sandford, 1979). Ainsi, les substances polymériques extracellulaires (EPS) sont, par définition, synthétisées à l'extérieur de la paroi cellulaire tandis que les polysaccharides intracellulaires sont sécrétés dans le cytoplasme où ils sont utilisés par la bactérie comme source d'énergie. Enfin, d'autres types de polysaccharides tels que le peptidoglycane et les acides téichoïques sont des constituants majeurs de la paroi des bactéries Gram-positives (Prescott *et al.*, 1995; Sandford, 1979).

Le mode de sécrétion extracellulaire offre à la cellule plusieurs avantages majeurs, dont ceux de faciliter l'attachement aux surfaces et de pouvoir affronter une variété d'environnements naturels (Durmaz et Sanin, 2001). Dans l'environnement naturel, on retrouve cependant une minorité de bactéries qui sont incapables de produire d'EPS malgré leur capacité à adhérer aux surfaces et à s'organiser en micro-colonies (Sutherland, 2001c). En revanche, plusieurs espèces bactériennes sont capables de synthétiser au moins deux types d'EPS distincts (Allison, 2003).

Composition et structure des EPS bactériens

Les EPS bactériens sont essentiellement de minces et très longues macromolécules aux poids moléculaires élevés, de l'ordre de 10^3 à 10^8 Da, qui forment un réseau complexe à consistance fibreuse ou visqueuse autour des cellules (Allison, 2003). Les EPS sont soit capsulaires, c'est-à-dire intimement associés à la surface de la cellule, soit liés à la paroi cellulaire de façon très lâche (Zhang *et al.*, 1999).

Les EPS bactériens varient grandement en composition. Ils peuvent en effet être formés d'un seul type de monosaccharide (homopolysaccharides) ou encore d'unités répétitives régulières comportant de deux à huit monosaccharides (hétéropolysaccharides) (Sutherland, 2001a). Les hexoses ($C_6H_{12}O_6$) comptent parmi les monosaccharides qui y sont le plus fréquemment retrouvés (Sutherland, 2001a). La composition des EPS peut être davantage complexifiée par la présence de

groupements non saccharidiques (ex.: acétyle (CH3COO–), sulfate ($-SO_4^{2-}$), phosphate ($-PO_4^{2-}$), pyruvate ($CH_3COCOO-$)[1]), fréquemment spécifiques à la souche bactérienne, pouvant conférer aux EPS une haute réactivité (Lawrence *et al.*, 2001) et une charge quelquefois neutre, rarement polycationique et le plus fréquemment polyanionique (Sutherland, 2001c).

Dans les environnements naturels, la plupart des EPS bactériens sont semi-solides, hydratés, relativement solubles dans l'eau et se détachent plutôt facilement des surfaces (Sutherland, 1999a). Selon l'existence et la nature des liaisons au sein des chaînes polymériques, cet état peut devenir plus ordonné, ou, à l'extrême opposé, encore plus amorphe pour finalement produire des biofilms aux propriétés d'adhérence et de ténacité variables (Sutherland, 1999a).

La forme ordonnée, qui consiste généralement en une structure hélicoïdale secondaire (double brins) dans laquelle les hélices peuvent à leur tour s'agglomérer pour former des réseaux complexes (Sutherland, 1999a), est généralement favorisée par la présence de molécules d'eau ou de concentrations ioniques ambiantes élevées (Sutherland, 1997). Les ions de l'environnement immédiat peuvent en effet interagir avec les substituants chargés les plus exposés des brins de l'hélice pour former des chaînes moins solubles, plus visqueuses et plus rigides, et pouvant supporter des forces de cisaillement considérablement plus élevées (Sutherland, 2001c). De surcroît, certains EPS tels que le curdlane, un homopolysaccharide synthétisé par des bactéries du genre *Agrobacterium*, présentent des structures en triple hélice formant des gels hydrophobes très rigides et très résistants aux attaques enzymatiques ou acides. Ces propriétés sont attribuées aux ponts hydrogènes qui forment des liaisons solides entre l'intérieur des brins de l'hélice (Sutherland, 2001c).

En revanche, la forme amorphe confère aux EPS une flexibilité accrue, une solubilité dans l'eau et une capacité de détachement élevées ainsi qu'une inaptitude à maintenir l'intégrité du biofilm et des cellules hôtes, comme dans le cas des EPS synthétisés par certaines bactéries du genre *Rhizobium* (Sutherland, 1997). L'état amorphe serait essentiellement dû à un manque de liaisons solides entre l'intérieur

---

[1] Le pyruvate est le produit final de la glycolyse (une des voies de dégradation du glucose)

des brins de la structure en double hélice (rareté des ponts hydrogènes et substituants chargés situés en périphérie plutôt qu'à l'intérieur des brins) (Sutherland, 1997).

L'exposition à des conditions environnementales spécifiques (stress de chaleur ou de cisaillement) ainsi que la maturation du biofilm, fréquemment accompagnée d'un accroissement des gradients ioniques et de nutriments et d'une production cellulaire de métabolites secondaires (agents chélatants, enzymes), peut entraîner le passage d'un état ordonné à un état amorphe (solubilité accrue, dépolymérisation localisée pouvant causer du détachement et des pertes cellulaires) (Allison, 1998).

Structure de la matrice des EPS

La couche d'EPS se présente sous la forme d'une matrice tri-dimensionnelle, souvent hautement hydratée, pouvant représenter de 50 à 90% du volume total du biofilm, et permettant d'ancrer les cellules bactériennes et d'en faciliter l'arrangement spatial (Costerton *et al.*, 1995). La matrice des EPS est rarement homogène spatialement, physiquement et chimiquement puisqu'elle contient typiquement au moins deux types d'EPS distincts, même dans le cas de monocultures (Costerton *et al.*, 1995). Lorsque les populations bactériennes impliquées sont mixtes, une multiplicité de types d'EPS peuvent même être générés (Chappell et Evangelou, 2002). Les actions synergiques qui peuvent avoir lieu entre les EPS issus d'espèces bactériennes distinctes peuvent de plus accroître les enchevêtrements complexes entre les chaînes polymériques (Allison, 1998).

Paramètres d'influence sur la synthèse des EPS

La synthèse des EPS (quantité et composition) au sein des biofilms est fortement influencée par la nature et la disponibilité des nutriments, notamment par l'équilibre existant entre la source de carbone et les sources de nutriments limitants (azote, phosphate, potassium, soufre) (Sutherland, 2001c; Durmaz et Sanin, 2001). En outre, il semblerait que la production en EPS puisse être améliorée par des conditions de limitations en azote, donc par une augmentation du ratio C/N du milieu nutritif (Sutherland, 2001c; Durmaz et Sanin, 2001; Flemming *et al.*, 2000). À titre d'exemple, au cours d'essais de biocolmatage menés sur une colonne de sable fin inoculé avec la souche bactérienne aérobie *Arthrobacter*, Vandevivere et Baveye

(1992a) ont dû augmenter le ratio C/N de la solution d'alimentation glucosée de 39 à 77 pour obtenir une concentration en EPS mesurable.

Dans une autre étude impliquant la formation de biofilms sur les parois de plaquettes disposées dans un réacteur à plaques parallèles inoculé avec la souche *Escherichia coli*, Huang *et al.* (1994) ont aussi observé une amélioration de la production en EPS avec une hausse du ratio C/N de la solution nutritive glucosée. Les auteurs ont également mesuré une baisse de la réplication cellulaire qui semblerait être étroitement corrélée avec l'accroissement de la production en EPS. De même, Turner (1995) rapporte que des ratios C/N en nutriments élevés auraient un effet stimulant sur la formation de résidus d'acide glucuronique[1] au sein des polysaccharides sécrétés par les bactéries, ce qui aurait un effet bénéfique sur la résistance des EPS, puisque les acides glucuroniques accroissent la résistance à la décomposition chimique et biologique des EPS.

2.2.4.2 Les bactéries des biofilms

Bien qu'elles ne constituent qu'une fraction mineure (au plus 10%) du poids sec de la matière organique des biofilms matures (Percival *et al.*, 2000) ou encore de 20 à 50% du volume du biofilm (Christensen et Characklis, 1990), les micro-colonies bactériennes constituent l'unité structurelle et fonctionnelle de base du biofilm (Costerton *et al.*, 1995). Pour pouvoir s'intégrer au biofilm et s'adapter à vivre à la proximité d'une surface, les bactéries planctoniques modifient cependant leur phénotype[2] de façon majeure (Costerton *et al.*, 1995).

Différenciation entre bactéries sessiles et bactéries planctoniques

Les cellules sessiles des biofilms ont un phénotype radicalement différent des cellules planctoniques de la même espèce (Marshall, 2000; Boyd et Chakrabarty, 1995). Les bactéries sessiles possèdent, à titre d'exemple, une viabilité accrue, un taux de croissance et une activité métabolique plus lents que leurs homologues planctoniques et produisent des quantités et une variété d'EPS distincts plus

---

[1] Acide uronique provenant de la conversion du glucose

[2] Ensemble des caractères morphologiques ou fonctionnels définissant une espèce

importantes que ces dernières (Boyd et Chakrabarty, 1995). Ces différences physiologiques seraient attribuables à des différences distinctes dans le contenu en protéines et en polysaccharides des cellules (Vandevivere et Kirchman, 1993), par exemple dans la composition en protéines de la paroi cellulaire (Boyd et Chakrabarty, 1995). Ce concept des différences phénotypiques pourrait expliquer pourquoi les cellules sessiles et leurs homologues planctoniques ne manifestent pas la même sensibilité aux agents antimicrobiens (Costerton *et al.*, 1995).

Densité bactérienne et coopération métabolique au sein des biofilms

Les concentrations cellulaires au sein des biofilms sont considérablement plus élevées qu'au sein des colonnes d'eau, et ce parfois jusqu'à 60 000 fois (Daly *et al.*, 1998). La densité bactérienne des biofilms matures peut ainsi atteindre jusqu'à 10^{13} cellules mL^{-1} (Characklis *et al.*, 1990b) alors que celle des bactéries planctoniques atteint généralement un maximum d'environ 10^{7} cellules mL^{-1} (Knox *et al.*, 1993).

À l'état naturel, les biofilms sont majoritairement constitués d'espèces bactériennes mixtes (Filloux et Vallet, 2003). Cette mixité des populations est généralement favorisée par les temps élevés de rétention qui favorisent les interactions entre les bactéries immobilisées, ainsi que par l'hétérogénéité des conditions physico-chimiques qui y prévalent (Costerton *et al.*, 1994). La diversité phylogénétique et métabolique des espèces bactériennes est généralement faible au sein des jeunes biofilms, mais augmente souvent avec l'âge pour atteindre un point culminant au sein des biofilms matures (Percival *et al.*, 2000).

Stratégies de survie des bactéries sessiles

Bien que l'analyse de centaines de systèmes aquatiques démontre que les biofilms se retrouvent en prédominance dans des environnements relativement riches en nutriments (Costerton *et al.*, 1995), les biofilms des eaux souterraines sont souvent confrontés à des conditions oligotrophes, par exemple lorsqu'ils induisent une réduction de la section disponible pour l'écoulement et donc pour l'apport en nutriments (Kim et Fogler, 2000).

Ainsi, sous des conditions extrêmement oligotrophes, les bactéries sessiles adoptent une stratégie phénotypique consistant à se disséminer sous forme de

cellules planctoniques dormantes de taille très réduite[1], soit de diamètre ≤ 0.3 µm (MacLeod et *al.*, 1988), appelées "ultramicrobactéries" (UMB) (Bryers et Sanin, 1995; Costerton *et al.*, 1995; Turner, 1995). Les cellules bactériennes réagissent en effet aux stress nutritionnels en modifiant leur morphologie (ex.: réduction de volume, transition d'une forme bâtonnet à une forme cocci), en passant d'une phase de croissance exponentielle à une phase stationnaire[2], en ralentissant leur métabolisme (Marco-Noales *et al.*, 1999) ou encore en diminuant leur capacité à adhérer aux surfaces et à produire des EPS (James *et al.*, 1995b; MacLeod *et al.*, 1988). Ces diminutions de volume et de la capacité à produire des EPS entraînent généralement une amélioration de la pénétrabilité des cellules qui peut, en retour, être mise à profit en biorestauration *in situ* des milieux géologiques pour obtenir le colmatage sélectif de zones perméables (James *et al.*, 1995b; MacLeod *et al.,* 1988).

Les UMB, qui ont la capacité de recouvrer une forme sessile en présence de conditions nutritionnelles plus favorables, ont été comparées par Costerton *et al.* (1995) à des agents de survie dormants optimaux à la dissémination et à la préservation du génome bactérien, par opposition aux biofilms qui seraient plutôt des agents favorables à la reproduction et à la croissance cellulaire au sein de communautés. En raison de leur taille infime, les UMB ont aussi la capacité d'échapper à la prédation (Fegatella et Cavicchioli, 2000). Certaines espèces bactériennes réagissent aussi aux stress nutritionnels en se fragmentant, c'est-à-dire en adoptant un mode de division cellulaire rapide sans croissance (Kim et Fogler, 1999; Bryers et Sanin, 1995; James *et al.*, 1995a). Le processus de fragmentation cellulaire engendre des populations d'UMB très denses (Bryers et Sanin, 1995) présentant généralement une viabilité et une longévité accrues (Kjelleberg *et al.*, 1982) ainsi qu'une meilleure capacité de transport en milieu poreux faiblement perméable (Kim et Fogler, 1999).

---

[1] Des bactéries de 1 à 2 µm ∅ peuvent être réduites jusqu'à ~0.1 µm ∅ (Bryers et Sanin, 1995)

[2] Utilisation des nutriments pour le maintien des fonctions vitales plutôt que pour la croissance, la reproduction et la synthèse de produits

Nature des bactéries des biofilms

Les bactéries qui ont une forte propension à former des biofilms appartiennent à deux groupes physiologiques distincts, soit les bactéries hétérotrophes[1] (ex.: *Pseudomonas*) et les bactéries chimiolithotrophes[2] (dont les méthanogènes, sulfato-réductrices, nitrifiantes) (ex.: *Beggiatoa*, *Thiothrix*) (Characklis et Marshall, 1990). Même si un grand nombre de ces bactéries n'est pas identifié, certaines bactéries qui ont été isolées de biofilms prélevés dans l'environnement immédiat des eaux souterraines le sont. Des exemples de ces bactéries sont présentés au Tableau 2.6.

Tableau 2.6 Exemples d'espèces bactériennes isolées de biofilms prélevés dans l'environnement des eaux souterraines

Espèces/genres bactériens	Environnement
Beggiatoa sp.[1], *Desulfobacter*[1]	Aquifère de roches carbonatées
Pseudomonas oryzihabitans[2]	Surface de matières particulaires en suspension dans les eaux souterraines d'un aquifère karstique de craie
Legionella (pathogène)[3]	Parois de puits d'alimentation en eau souterraine
Thiothrix sp.[4]	Systèmes suivants alimentés en eau souterraine: système d'irrigation; puits privés; réservoirs municipaux de stockage d'eau potable; système de filtration d'une usine d'embouteillage d'eau de source
Thiothrix unzii[5]	Sources d'eau d'un aquifère karstique Planchers de caves karstiques
Desulfovibrio[6] *Desulfomicrobium*[6]	Source d'eau souterraine issue d'un aquifère comportant du sable, du gravier et du till

[1]Labrenz *et al.* (2000); [2]Dussart *et al.* (2003); [3]Riffard *et al.* (2001); [4]Brigmon *et al.* (1997); [5]Brigmon *et al.* (2003); [6]Bade *et al.* (2000)

2.2.5 Mécanismes de formation des biofilms

La formation d'un biofilm est un processus séquentiel comportant grossièrement 6 étapes faisant intervenir une multitude de processus physico-chimiques et biologiques (Allison, 1993) (Figure 10). Ces étapes sont: 1) la formation

---

[1] Organismes utilisant des molécules organiques réduites comme sources principales de C

[2] Organismes tirant leur source d'énergie de l'oxydation de composés inorganiques

d'un film de conditionnement sur la surface du support, 2) le transport des bactéries vers la surface du support à coloniser, 3) l'adhérence, ou l'adsorption réversible des cellules au support, 4) l'adhésion, ou la fixation irréversible des cellules au support, 5) la maturation du biofilm, 6) le détachement de cellules ou de portions entières de biofilm.

2.2.5.1 Formation d'un film de conditionnement

Le film de conditionnement organique se forme dès que le support est immergé en milieu aqueux (Marshall, 1992). Ce film, constitué de particules, de macromolécules et de molécules de poids moléculaire moins élevé en suspension dans le milieu aqueux (Bryers et Fletcher, 2000; Marshall, 1992), se forme à la surface du support très rapidement (Bryers et Fletcher, 2000; Characklis et Cooksey, 1983), en l'espace de quelques minutes dans certains cas (Korber *et al.*, 1995).

En adhérant aux surfaces, le film de conditionnement modifie les propriétés de surface originelles du support, dont la charge et l'énergie libre de surface, ce qui en retour agit directement sur l'intensité de la force d'adhésion et la nature et la quantité de bactéries qui iront s'adhérer (Marshall, 1992). En plus de constituer une source concentrée de nutriments pour les bactéries, le film de conditionnement détoxifie les substances inhibitrices dissoutes qui ont été absorbées (Percival, 1998).

2.2.5.2 Transport des cellules bactériennes

L'adsorption des cellules bactériennes suppose d'abord un rapprochement de celles-ci vers les surfaces à coloniser. Ce rapprochement implique divers mécanismes, tels que de la diffusion moléculaire, des forces thermodynamiques telles que du mouvement Brownien (Liu et Tay, 2002), de la sédimentation, due à la différence de gravité entre le fluide et la bactérie (Davies, 2000), du transport passif causé par des mouvements hydrodynamiques (Davies, 2000; Liu et Tay, 2002) et chez les bactéries mobiles, de la mobilité cellulaire (transport actif), assurée par de l'activité flagellaire[1] (Davies, 2000; Allison, 1993).

---

[1] Les flagelles sont des appendices locomoteurs très fins d'environ 20 nm de diamètre et de 15 à 20 µm de long qui s'étendent à l'extérieur de la paroi cellulaire

2.2.5.3 Attachement des cellules bactériennes

Les bactéries s'attachent aux surfaces selon une séquence de deux étapes cinétiquement distinctes, soit l'adhérence et l'adhésion (Bryers, 2000; Razatos, 2001).

L'adhérence, qui correspond à une adsorption réversible des cellules, consiste en une interaction physique généralement aspécifique, précaire, de courte durée (Razatos, 2001), résultant d'un équilibre entre des forces physiques (forces attractives de van der Waals, forces électrostatiques répulsives, interactions hydrophobes) et des forces chimiques (liaisons hydrogènes, dipôles) (Razatos, 2001; Liu et Tay, 2001b; Flemming, 1995). L'adhérence étant un processus exclusivement réversible, les cellules peuvent se détacher aisément des surfaces sous l'action de contraintes hydrodynamiques imposées par le milieu (Allison, 1993).

L'adhésion, qui correspond à une fixation irréversible des cellules, et qui réfère à une interaction spécifique et à courte portée entre la bactérie et le substrat (Razatos, 2001), est de durée plus longue et d'intensité plus forte que l'adhérence (Bryers et Fletcher, 2000). Malgré la présence de forces répulsives qui nuisent à l'établissement d'un contact direct avec la surface, la cellule bactérienne induit un contact ferme avec la surface du support possiblement en utilisant des appendices tels que les flagelles, les fimbriae[1] et les EPS (Allison, 1993; Bryers et Fletcher, 2000).

Les taux d'attachement bactérien dépendent fortement de la nature et de la mobilité de la souche bactérienne (Ahearn *et al.*, 1999), de la charge nette de surface de la cellule bactérienne et du support, du degré relatif d'hydrophobicité de la surface bactérienne en relation avec le support et le fluide environnant (Davies, 2000), et de la rugosité de surface du support (Percival *et al.*, 2000). Les micro-cavités de surface permettraient entres autres aux bactéries d'augmenter leur surface d'attachement avec le substrat et de se protéger du détachement (Bryers et Fletcher, 2000).

2.2.5.4 Maturation du biofilm

Le processus de maturation du biofilm débute dès que les bactéries se retrouvent irréversiblement fixées à la surface du support (Dunne, 2002). La densité

---

[1]Appendices non locomoteurs courts et fins communs aux bactéries Gram-négatives

cellulaire globale et la complexité du biofilm augmentent alors que les cellules sessiles commencent à se multiplier et à former des colonies, que des cellules planctoniques continuent à se greffer à la surface (Percival *et al.*, 2000) et que les EPS produits par les cellules adhérées interagissent avec des molécules organiques et inorganiques de l'environnement immédiat pour former la matrice extracellulaire (Dunne, 2002). La maturation du biofilm donne typiquement lieu à une redistribution des bactéries loin du support et au développement d'une architecture tridimensionnelle complexe comportant des structures protubérantes avec des pores et des canaux assurant la circulation des fluides (Davies, 2000). Le dévelopement subséquent du biofilm entraîne aussi une augmentation de la diversité des espèces bactériennes, entre lesquelles un certain niveau de coopération métabolique s'installe (formation de consortia bactériens) (Percival *et al.*, 2000; Brading *et al.*, 1995).

Le potentiel de croissance du biofilm peut cependant devenir vite limité par la disponibilité des nutriments de l'environnement immédiat, le développement de microgradients physiques et chimiques au sein de la matrice (Percival *et al.*, 2000; Brading *et al.*, 1995), la raréfaction de l'oxygène à proximité de la surface du support (Percival *et al.*, 2000), ainsi que par l'accumulation de débris organiques ou inorganiques (Wimpenny, 1996). À partir du moment où le biofilm atteint une masse critique et un équilibre dynamique, certaines des cellules situées à la surface du biofilm commencent à se détacher tandis que les cellules les plus proches du support deviennent dormantes ou se lysent en raison de conditions physico-chimiques défavorables (Dunne, 2002).

La maturation du biofilm est couramment accompagnée d'une sévère compétition spatiale et nutritionnelle entre les microorganismes colonisateurs pionniers et des microorganismes de niveaux trophiques plus élevés (Wimpenny, 1996; Allison, 1993), ce qui donne lieu au processus de développement successionnel (Korber *et al.*, 1995). Les espèces bactériennes pionnières, fréquemment des bactéries en forme de bâtonnet, sont ainsi souvent supplantées par des espèces appendiculées (Korber *et al.*, 1995; Wimpenny, 1996), lesquelles à leur tour peuvent éventuellement être soumises à la prédation de protozoaires (Korber *et al.*, 1995).

2.2.5.5 Processus de détachement

Le détachement est un processus interfacial causant le transfert de cellules ou de portions de biofilm jusque dans la phase liquide (Characklis, 1990). Le processus de détachement débute dès que l'attachement aux surfaces est initié (Brading *et al.*, 1995), équilibre la croissance microbienne, et contrôle ainsi l'accumulation et l'activité globale du biofilm (van Loosdrecht *et al.*, 1995). Le détachement est causé par des processus physiques continus ou discontinus tels que l'abrasion, l'érosion et l'arrachage massif (*sloughing*) (Morgenroth et Wilderer, 2000; Brading *et al.*, 1995; Boyd et Chakrabarty, 1995).

Les processus d'abrasion et d'érosion impliquent tous les deux l'arrachage de petits groupes de cellules de la surface du biofilm, affectent les biofilms plutôt fins (Nicolella *et al.*, 1997) et se différencient par leur mécanisme (Morgenroth et Wilderer, 2000). L'abrasion résulte des collisions fortuites de particules solides avec le biofilm tandis que l'érosion, qui est un processus plus continu, est dû aux forces de cisaillement qui sont générées par le fluide en mouvement (Nicolella *et al.*, 1997).

En revanche, l'arrachage massif, qui affecte typiquement les biofilms épais, matures et issus d'environnements riches en nutriments (Percival *et al.*, 2000), est marqué par le détachement aléatoire, localisé et rapide de larges portions de biofilm (Nicolella *et al.*, 1997; Brading *et al.*, 1995). Par contraste avec les processus d'abrasion et d'érosion qui affectent toute la surface du biofilm, l'arrachage massif, qui implique un détachement jusqu'à la base du biofilm, n'affecte qu'une portion de la surface du biofilm (Morgenroth et Wilderer, 2000). L'arrachage massif est habituellement causé par une raréfaction de l'oxygène ou des nutriments au sein du biofilm, par un changement important des conditions de l'environnement immédiat, et possiblement par l'activation ou l'induction de certaines enzymes (Percival *et al.*, 2000). Les biofilms de culture mixte seraient plus susceptibles à l'arrachage massif que les biofilms de monoculture; d'une part parce que les EPS peuvent être dépolymérisés par des espèces bactériennes autres que celles qui les ont synthétisées et d'autre part parce que certains EPS, du fait de leur incompatibilité avec certaines surfaces bactériennes, peuvent introduire une faiblesse dans la structure matricielle (Brading *et al.*, 1995). Bien que le détachement résulte

généralement d'une combinaison de ces trois processus différents, un seul d'entre eux est souvent dominant (Morgenroth et Wilderer, 2000).

Les forces de détachement ont une influence majeure sur la morphologie des biofilms (Liu et Tay, 2001a; Tijhuis *et al.*, 1995). Ainsi, les forces de détachement relativement fortes engendrent des biofilms généralement fins, denses (Liu *et al.*, 2003), à croissance lente (Liu et Tay, 2001a), et peu susceptibles à l'arrachage massif et aux instabilités (van Loosdrecht *et al.*, 1995). À l'inverse, les forces de détachement plus faibles engendrent des biofilms plus hétérogènes, plus poreux, plus faibles, à croissance plus rapide (Liu *et al.*, 2003) et éventuellement moins stables (van Loosdrecht *et al.,* 1995).

La disponibilité des nutriments influence aussi fortement le mécanisme de détachement chez les biofilms (Sawyer et Hermanowicz, 1998). La majorité des études rapportent une baisse de la densité cellulaire au sein des biofilms et une augmentation concomitante du détachement avec une baisse de l'apport en nutriments (Percival *et al.*, 2000; Sawyer et Hermanowicz, 1998; Brading *et al.*, 1995).

Morgenroth et Wilderer (2000) ont également spéculé sur l'influence des différents processus de détachement sur la distribution des types physiologiques bactériens au sein du biofilm. Ainsi, selon eux, les processus de détachement par arrachage massif favoriseraient les bactéries hétérotrophes, à croissance rapide, aux dépens des bactéries autotrophes, à croissance plus lente. En effet, lorsque le biofilm est soumis à des processus d'arrachage massif qui peuvent l'affecter jusqu'à sa base, les bactéries autotrophes, qui croissent normalement entre le support et la couche hétérotrophe localisée en surface du biofilm, établissent une niche moins volumineuse et plus près du support où elles sont mieux protégées du détachement. En revanche, lorsque les processus de détachement sont superficiels (érosion et abrasion), les bactéries autotrophes croissent plus près de l'interface fluide/biofilm.

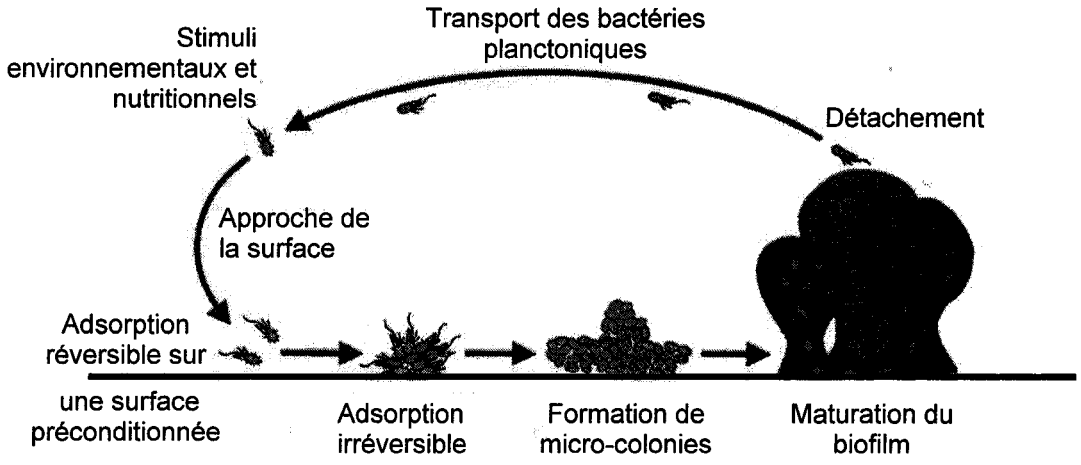


Figure 2.10 Étapes de formation d'un biofilm (adapté de Filloux et Vallet, 2003)

2.2.6 Propriétés des biofilms

Les propriétés des biofilms sont de façon générale influencées par la structure et la composition de leurs constituantes principales, soit les cellules microbiennes et les EPS (Sutherland, 2001a; Flemming *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999).

2.2.6.1 Caractéristiques physico-chimiques des biofilms

Les caractéristiques physico-chimiques des biofilms qui ont été identifiées comme étant les plus pertinentes dans le contexte de l'étude de la stabilité d'un biocolmatage sont l'épaisseur, la densité, la diffusion et la solubilité.

En biorestauration *in situ*, l'épaisseur du biofilm est la variable ultime qui contrôle le colmatage des milieux poreux (Peyton, 1996). L'atteinte d'une épaisseur de biofilm quasi-constante semblerait entre autres être indispensable à la stabilisation de la perméabilité du milieu biocolmaté (Cunningham *et al.*, 1991). L'épaisseur du biofilm influence sa capacité à laisser diffuser les nutriments (Cunningham *et al.*, 1991), à résister à la friction du fluide (Christensen et Characklis, 1990) et à contrer l'arrachage massif, qui peut fortement altérer la stabilité globale de la matrice (Picioreanu *et al.*, 2000a).

L'épaisseur des biofilms bactériens fluctue généralement entre une dizaine de µm et quelques mm (Christensen et Characklis, 1990). À l'inverse des biofilms de monoculture qui sont généralement peu épais (< 150 µm), les biofilms des milieux aquatiques naturels stagnants, riches en nutriments et en espèces, peuvent atteindre plusieurs dizaines de mm (Christensen et Characklis, 1990).

L'épaisseur des biofilms augmente typiquement avec l'âge du biofilm (Okkerse *et al.*, 2000), l'augmentation du taux d'apport en nutriments (van Loosdrecht *et al.*, 2002) la diminution des forces hydrodynamiques (Liu et Tay, 2002), la présence de consortia bactériens (Christensen et Characklis, 1990) et la capacité des bactéries à produire des EPS (Freitas dos Santos et Livingston, 1995) (ex.: Ligne 3, Tableau 2.7). Lorsqu'ils excèdent une certaine épaisseur, soit d'environ 500 µm (Costerton *et al.*, 1995), les biofilms deviennent généralement plus hétérogènes, instables, et donc plus susceptibles au détachement (Liu et Tay, 2002).

L'épaisseur semblerait aussi être positivement corrélée avec la densité des biofilms (Peyton, 1996; Ohashi *et al.*, 1999), une autre variable communément utilisée pour en quantifier l'accumulation. La densité des biofilms, qui se situe généralement entre 10 et 130 kg m^{-3} (Christensen et Characklis, 1990) (Tableau 2.7), augmente substantiellement avec une augmentation de la profondeur (Zhang et Bishop, 1994a; Cunningham *et al.*, 1991), du contenu en EPS (Ohashi *et al.*, 1999), des contraintes hydrodynamiques (Stoodley *et al.*, 1999a) ainsi qu'avec l'âge du biofilm et une baisse du taux d'apport en nutriments (Wäsche *et al.*, 2002).

Selon Marshall (1992), la densité des biofilms dépendrait aussi en grande partie de la physiologie et de la structure de la communauté microbienne impliquée. Des biofilms compacts seraient ainsi produits par des bactéries chimiolithotrophes ou à croissance lente (van Loosdrecht *et al.*, 1995) (ex.: Ligne 4, Tableau 2.7). De même, les bactéries cocciformes et en forme de bâtonnets produiraient des biofilms plus denses que les bactéries filamenteuses qui génèrent des structures de surface relativement plus rugueuses (Marshall, 1992).

Tableau 2.7 Épaisseur et densité de biofilms d'espèces bactériennes distinctes

Type bactérien	Épaisseur (µm)	Densité (kg m^{-3})
Pseudomonas aeruginosa[1]	0 - 60	27
Pseudomonas putida[3]	12 - 117	34 - 76
Xanthobacter autotrophicus[2, 5]	500 - 1800	50 - 65
Consortium nitrifiant[4]	150 - 580	42 - 109
Consortium hétérotrophe[4]	30 - 1300	20 - 105
Consortium hétérotrophe[1]	160 - 210	66 - 130

[1]Peyton (1996); [2]Freitas dos Santos et Livingston (1995); [3]Tanyolac et Beyenal (1997); [4]Christensen et Characklis (1990); [5]la souche *Xanthobacter autotrophicus* sécrète des quantités anormalement élevées d'EPS

Le mécanisme de diffusion moléculaire est également d'une importance majeure pour les biofilms puisqu'il exerce un grand contrôle sur le déroulement des processus physico-chimiques et biologiques (Stewart, 2003).

La diffusion au sein des biofilms est fréquemment entravée, d'une part par les agrégats cellulaires, qui occupent de 20 à 50% du volume du biofilm, et d'autre part par la présence de la matrice extracellulaire qui agit à la fois comme une matière adsorbante, une membrane de filtration moléculaire (Christensen et Characklis, 1990) et une barrière diffusionnelle (Converti *et al.*, 1999; de Beer *et al.*, 1997b). Bien que les pores et les canaux de la matrice puissent améliorer la diffusion des métabolites au sein des liquides qui y circulent, ils ne garantissent toutefois pas le libre accès des solutés jusqu'à l'intérieur des agrégats cellulaires (Stewart, 2003). Ainsi, même si elle est fréquemment diminuée au sein des agrégats cellulaires, la diffusion est le mécanisme de transport qui y prédomine (Stewart, 2003).

Des mesures ont indiqué que la diffusion de substances de faible poids moléculaire (oxygène, glucose, ammonium, nitrate) était en moyenne de 5 à 50% plus basse au travers des biofilms qu'au travers de l'eau pure (de Beer *et al.*, 1997b; Christensen et Characklis, 1990). De plus, la diffusion de macromolécules telles que l'ADN, le dextrane[6] et les protéines est généralement sévèrement altérée au travers

[6] Homopolysaccharide bactérien de masse moléculaire très élevée (~ 10^6 Da) utilisé comme matériel de stockage par la bactérie

de la matrice du biofilm, et donne lieu à des coefficients de diffusion beaucoup plus faibles que dans l'eau pure (de Beer *et al.*, 1997b).

La diffusion diminue en général avec toute augmentation de l'épaisseur (Converti *et al.*, 1999) ou de la densité cellulaire (Christensen et Characklis, 1990) ou extrapolysaccharidique du biofilm (Costerton *et al.*, 1995) ainsi qu'avec une augmentation des contraintes de cisaillement appliquées (Beyenal et Lewandowski, 2002). En effet, une augmentation des vitesses d'écoulement entraîne généralement une hausse de la densité du biofilm, qui en retour favorise une baisse du transport de masse et de la diffusion internes (Beyenal et Lewandowski, 2002). La diffusion varie aussi avec l'âge du biofilm, notamment en raison des variations de densité et de diversité bactériennes résultant de la maturation du biofilm, ainsi qu'avec le pH, la force ionique du fluide environnant, et l'intensité des forces électrostatiques au sein de la matrice (Christensen et Characklis, 1990).

La solubilité des biofilms bactériens dans l'eau est en grande partie contrôlée par la solubilité de leurs constituants exopolysaccharidiques. La plupart des EPS bactériens sont en retour relativement solubles dans l'eau, et, en raison de leur masse moléculaire élevée, produisent des solutions aqueuses hautement visqueuses (Sutherland, 2001c). Certains ions peuvent de plus interagir avec certains groupements fonctionnels des EPS pour produire des réseaux de macromolécules occasionnant des augmentations de viscosité, voire même de la gélification (Sutherland, 2001c).

2.2.6.2 Caractéristiques mécaniques des biofilms

Les biofilms bactériens, qui se présentent donc soit sous forme de gels, soit sous forme de corps visqueux semi-solides, s'illustrent par leur comportement viscoélastique (Sutherland, 2001a). La viscoélasticité est avant tout un attribut des EPS bactériens, qui, comme la plupart des biopolymères, manifestent à la fois un comportement élastique[1] et un comportement visqueux[2] (Stoodley *et al.*, 1999a). Le

---

[1] Un matériau élastique recouvre sa forme originelle après l'enlèvement de la contrainte

[2] Un matériau visqueux garde une déformation irréversible après l'enlèvement de la contrainte

comportement des matériaux viscoélastiques est typiquement élastique sur des échelles de temps courtes, mais devient visqueux lorsque les contraintes sont plus élevées ou appliquées sur des échelles de temps plus longues (Martins dos Santos *et al.*, 1997).

La réponse élastique des biopolymères est en partie attribuable à la cohésion de l'édifice macromoléculaire, qui est favorisée par l'enchevêtrement des brins individuels de l'hélice polymérique et la présence de liaisons hydrogène faibles (Klapper *et al.*, 2002). En revanche, une réponse visqueuse (déformation permanente du polymère) résulte de forces de friction ou d'un glissement irréversible entre les brins ou encore d'une rupture des liaisons hydrogène.

L'observation microscopique en temps réel, de biofilms de souches mixtes de bactéries du genre *Pseudomonas* cultivés dans des cellules de circulation et soumis à des conditions d'écoulement turbulent, a permis de visualiser les micro-colonies des biofilms sous la forme de structures ayant l'aspect de serpentins très flexibles ondulant dans la direction de l'écoulement, permettant ainsi de mettre en évidence le caractère viscoélastique des biofilms (Stoodley *et al.*, 2002).

Les propriétés viscoélastiques des biofilms ont également pu être quantifiées lorsque les travaux d'Ohashi et Harada (1994) ont révélé qu'il était possible d'effectuer des mesures de résistance mécanique, notamment du module d'élasticité[1] (mesure de la rigidité) sur des biofilms. Ainsi, le module d'élasticité de biofilms cultivés à partir d'une monoculture de *Pseudomonas aeruginosa* (~ 6500 Pa) s'est avéré comparable à celui de gels polymériques faibles (Körstgens *et al.*, 2001b), mais par contre plus élevé que celui de biofilms mixtes de bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae* et *Stenotrophomonas maltophilia* (~ 40 Pa) (Stoodley *et al.*, 1999a). Le module d'élasticité de ces biofilms mixtes s'est par contre montré comparable à celui de mucus de limace ou de sécrétions de patients atteints de fibrose kystique (Stoodley *et al.*, 2002). Le module d'élasticité de tous les biofilms sus-mentionnés s'est malgré tout montré de 1 à 4 ordres de grandeur

[1] Mesure de la rigidité d'un matériau, donnée par le rapport entre la variation de contrainte et la variation de déformation

plus bas que celui de gels de carraghénine (polymère extrait des parois de la plupart des algues rouges) ou d'agar 1.5% (p/p) (~ 50000 Pa) (Stoodley *et al.*, 1999a) ou de gélatine souple utilisée pour l'encapsulation de médicaments (> 10^6 Pa) (Felton *et al.*, 1996).

Les propriétés viscoélastiques des biofilms engendrent des changements dans la géométrie de ces derniers, modifiant en retour leur porosité, leur densité, le transport des fluides, et causant des augmentations des forces de traînée et du détachement. La viscoélasticité des biofilms serait par exemple en partie responsable des pertes de pression importantes causées par l'augmentation des forces de traînée dans les conduits biocolmatés (Stoodley *et al.*, 1999a; Characklis et Cooksey, 1983).

2.2.7 Rôle des biofilms dans les cycles biogéochimiques

En raison de leur structure stratifiée présentant d'importants gradients chimiques (O_2, pH), les biofilms offrent des micro-habitats optimaux au maintien de processus biochimiques diversifiés impliquant des bactéries aux caractéristiques physiologiques distinctes (Hibiya *et al.*, 2003). La structure stratifiée des biofilms est attribuée à la présence de différents accepteurs d'électrons qui créent des zones redox dont les niveaux les plus faibles se retrouvent à la base du biofilm (van Loosdrecht *et al.*, 2002). Au sein d'une même zone redox, les bactéries qui se retrouvent dans les couches de surface du biofilm sont essentiellement celles dont la croissance est la plus rapide (van Loosdrecht *et al.*, 2002). Par exemple, dans les biofilms aérobies, les bactéries hétérotrophes recouvrent généralement les bactéries nitrifiantes tandis que dans les biofilms ou les zones de biofilm anaérobies, les bactéries acidifiantes recouvrent les bactéries oxydant le méthane (van Loosdrecht *et al.*, 2002).

Les sections suivantes donnent un aperçu des transformations biochimiques dans les cycles de l'azote, du carbone, du soufre et du fer qui prennent place au sein des biofilms des eaux souterraines.

2.2.7.1 Cycle du carbone dans les biofilms

Une grande partie des processus biochimiques du cycle du carbone survient dans des environnements anaérobies et ne se produit donc qu'au sein de biofilms

suffisamment épais pour pouvoir comporter des zones anaérobies ou anoxiques (Damgaard *et al.*, 2001). La matière organique $(CH_2O)_n$ peut y être dégradée par fermentation méthanique (Étape 1, Fig. 2.11) ou par méthanogénèse (Étapes 2a & 2b, Fig. 2.11) si l'environnement, en plus d'être anoxique, présente de faibles teneurs en nitrates, sulfates et fer oxydé (Schink, 1997).

Avant d'être utilisable pour la méthanogénèse, la matière organique doit d'abord être dégradée en acétate au cours d'un processus à 3 étapes, incluant l'hydrolyse de la matière organique (Étape 3, Fig. 2.11), l'acidogénèse (Étape 4, Fig. 2.11) et l'acétogénèse (Étapes 5a & 5b, Fig. 2.11) (Conrad, 1999). Ces processus sont résumés dans le Tableau 2.8.

Tableau 2.8 Étapes de dégradation de la matière organique en acétate

Processus	Étape #	Description
Hydrolyse de la M.O.	3	Dégradation de la matière organique en monomères sous l'action d'enzymes sécrétées par des bactéries fermentatives
Acidogénèse	4	Transformation d'une partie des monomères obtenus par hydrolyse en alcools et acides gras volatils sous l'action des bactéries acidogènes
Acétogénèse	5a	Dégradation des alcools et des acides gras produits en acétate (CH_3COO^-), H_2 et CO_2 sous l'action des bactéries syntrophes acétogènes
	5b	Transformation d'une partie des monomères obtenus par hydrolyse en acétate par les bactéries homoacétogènes

Au cours de la méthanogénèse, les bactéries méthanogènes acétotrophes convertissent l'acétate produit en CH_4 et en CO_2 (Éq. 2.8; Étape 2a, Fig. 2.11), tandis que le H_2 et le CO_2 obtenus au cours de l'étape de fermentation méthanique (Étape 1, Fig. 2.11) sont transformés en CH_4 par les bactéries méthanogènes hydrogénotrophes (Éq. 2.9; Étape 2b, Fig. 2.11).

$$CH_3COOH \Rightarrow CO_2 + CH_4 \quad (2.8)$$

$$4\ H_2 + CO_2 \Rightarrow 2\ H_2O + CH_4 \quad (2.9)$$

Une grande partie du méthane ainsi produit peut cependant diffuser (Étape 6, Fig. 2.11) jusqu'aux couches oxiques de surface du biofilm pour y être oxydée en CO_2 (Étape 7, Fig. 2.11), sous l'action de bactéries méthanotrophes (Damgaard *et al.*, 2001), avec production intermédiaire de méthanol (CH_3OH), de formaldéhyde (CH_2O) et de formiates (CH_2O_2), selon l'équation globale 2.10:

$$CH_4 + 2\ O_2 \Rightarrow CO_2 + 2\ H_2O \qquad (2.10)$$

Les bactéries méthanotrophes sont des bactéries aérobies strictes uniques dans leur capacité à utiliser le méthane comme source unique de carbone et d'énergie (Hanson et Hanson, 1996). Certaines bactéries méthanotrophes des biofilms peuvent synthétiser une enzyme soluble capable de dégrader de façon fortuite une large quantité de composés organochlorés (trichloroéthylène (TCE), chloroforme (CF)) en CO_2, Cl^- et autres produits non-toxiques (Chang et Alvarez-Cohen, 1997).

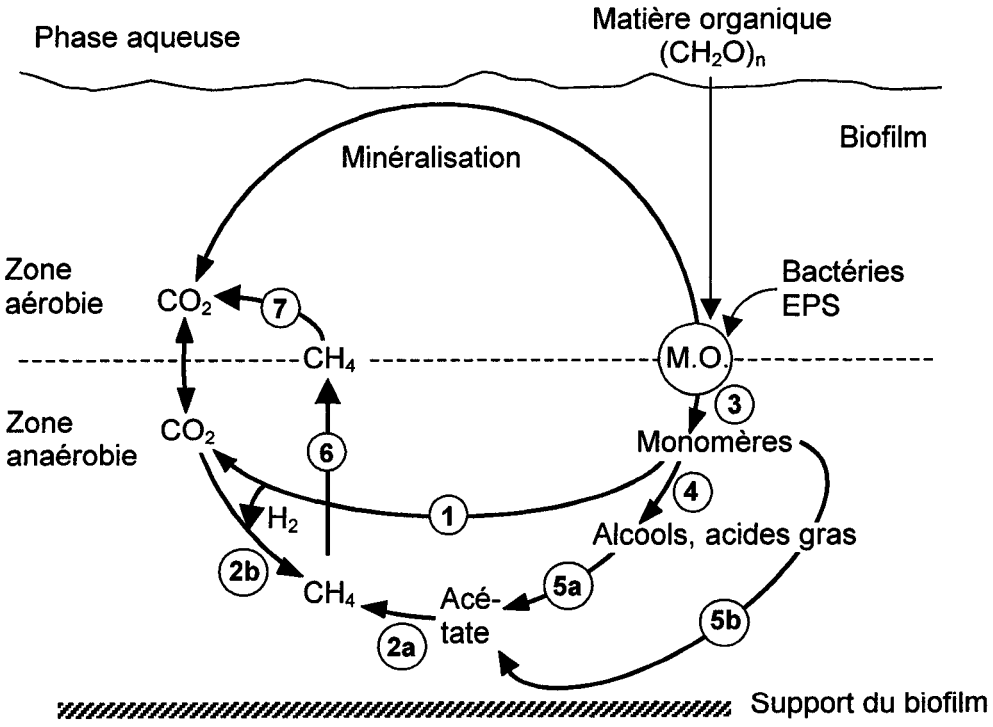


Figure 2.11 Cycle du carbone dans les biofilms des eaux souterraines

2.2.7.2 Cycle de l'azote dans les biofilms

Les composés ammoniacaux issus de l'ammonisation de la matière organique au sein de la colonne d'eau (Étape 1, Fig. 2.12) (Paerl et Pinckney, 1996) diffusent dans les biofilms, puis subissent une nitrification, réalisable par deux groupes de bactéries autotrophes aérobies strictes distincts (Okabe *et al.*, 2002). Par la nitrosation, les bactéries nitrosantes oxydent l'ammonium (NH_4^+) en nitrites (NO_2^-) (Éq. 2.11; Étape 2, Fig. 2.12), et subséquemment, les bactéries nitratantes réalisent la nitratation en oxydant les nitrites en nitrates (NO_3^-) (Éq. 2.12; Étape 3, Fig. 2.12) (Bernet *et al.*, 2001):

Nitrosation: $NH_4^+ + 1.5\ O_2 \Rightarrow NO_2^- + H_2O + H^+$ (2.11)

Nitratation: $NO_2^- + 0.5\ O_2 \Rightarrow NO_3^-$ (2.12)

La sensibilité des bactéries nitrifiantes aux conditions ambiantes (O_2, pH, T°) et la compétition entre bactéries nitrosantes et nitratantes rendent la nitrification dans les biofilms très vulnérable (Li et Bishop, 2002; Bernet *et al.*, 2001). Les bactéries nitratantes, qui habitent la base du biofilm, moins oxygénée que la surface, subissent de plus fortes limitations en O_2 que les bactéries nitrosantes (Garrido *et al.*, 1997). La croissance du biofilm, qui intensifie les gradients en O_2, favorise donc fréquemment l'activité des bactéries nitrosantes au dépend des nitratantes, causant en retour une nitrification incomplète et une accumulation de nitrites (Bernet *et al.*, 2001). De même, la présence conjointe de bactéries nitrifiantes et hétérotrophes au sein des biofilms mixtes peut ralentir, voire inhiber la nitrification (Satoh *et al.*, 2000). Dans les milieux riches en carbone, les bactéries hétérotrophes, qui ont une croissance rapide, tendent à occuper la surface du biofilm et à dominer les bactéries nitrifiantes (Bernet *et al.*, 2001) qui y occupent la base (Ohashi *et al.*, 1995). En cas d'épuisement des sources de carbone, les bactéries nitrifiantes peuvent cependant rivaliser avec les bactéries hétérotrophes, permettant une reprise de la nitrification.

Au cours de la dénitrification, les bactéries dénitrifiantes hétérotrophes telles que *Pseudomonas denitrificans* (Cattaneo *et al.*, 2003) réduisent les nitrates, issus de la nitrification et ayant diffusé dans les zones anoxiques du biofilm, en azote gazeux (N_2), avec production intermédiaire de nitrites et de gaz azotés (NO, N_2O) (Paerl et

Pinckney, 1996) (Éq. 2.13; Étapes 4a à 4d, Fig. 2.12). La dénitrification peut aussi être réalisée par certaines bactéries autotrophes anaérobies (Jetten *et al.*, 1998) qui utilisent le NH_4^+ comme donneur d'électron (Éq. 2.14; Étape 5, Fig. 2.12).

Dénitrification: $NO_3^- \Rightarrow NO_2^- \Rightarrow NO \Rightarrow N_2O \Rightarrow N_2$ (2.13)

$$NO_2^- + NH_4^+ \Rightarrow N_2 + 2\ H_2O \quad (2.14)$$

Au cours de l'étape de fixation de l'azote (Éq. 2.15; Étape 6, Fig. 2.12), qui peut se dérouler tant dans les zones anaérobies qu'aérobies des biofilms, les produits de la dénitrification (N_2, N_2O et NO) sont convertis en NH_3 biologiquement disponible. En raison de l'important apport en énergie qu'elle requiert, cette étape est souvent limitée au sein des biofilms des aquifères oligotrophes (Chapelle, 2001).

Fixation de l'azote: $N_2 + 3\ H_2 \Rightarrow 2\ NH_3$ (2.15)

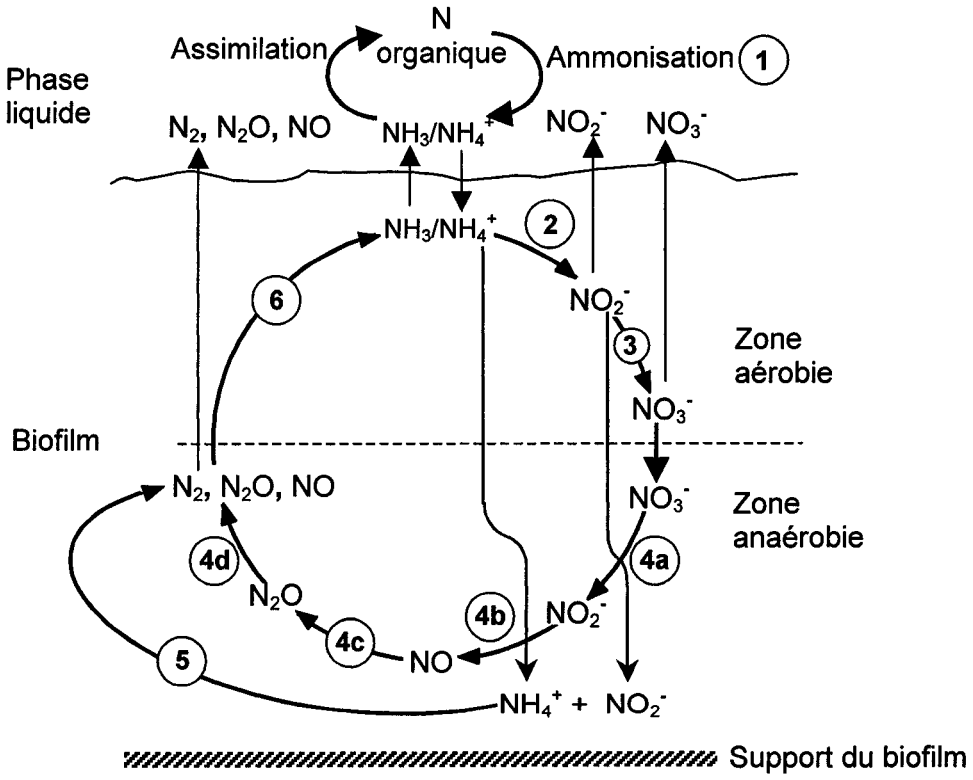


Figure 2.12 Cycle de l'azote dans les biofilms des eaux souterraines

2.2.7.3 Cycle du soufre dans les biofilms

Les sulfates constituent la forme dominante de soufre inorganique dans les eaux souterraines. Les micro-environnements anoxiques des biofilms peuvent être impliqués dans une réduction microbienne à grande échelle des sulfates qui y ont diffusé à partir des eaux souterraines (sulfato-réduction) (Paerl et Pinckney, 1996). Les SO_4^{2-} des biofilms peuvent ainsi oxyder, sous l'action de bactéries sulfato-réductrices (BSR), la matière organique présente, menant à la production de sulfure d'hydrogène (H_2S) (Okabe *et al.*, 1999) (Éq. 2.16; Étape 1, Fig. 2.13):

Sulfato-réduction: $$CH_2O + SO_4^{2-} \Rightarrow H_2S + 2\ HCO_3^- \quad (2.16)$$

Le H_2S produit par la sulfato-réduction peut ensuite être réoxydé en SO_4^{2-} tant sous conditions aérobies qu'anaérobies (Okabe *et al.*, 1999).

Une partie du H_2S produit peut être réoxydée dans la zone oxique du biofilm d'abord en soufre élémentaire (S^0) (Éq. 2.17; Étape 2, Fig. 2.13), puis éventuellement en SO_4^{2-} (Éq. 2.18; Étape 3, Fig. 2.13) (Yu et Bishop, 2001; Seppänen, 2000).

Oxydation aérobie du H_2S: $$H_2S + 0.5\ O_2 \Rightarrow S^0 + H_2O \quad (2.17)$$

Oxydation aérobie du S^0: $$S^0 + 1.5\ O_2 + H_2O \Rightarrow SO_4^{2-} + 2\ H^+ \quad (2.18)$$

Cette réoxydation aérobie du H_2S, réalisable par des bactéries telles que *Thiobacillus* (Chapelle, 2001) et *Beggiatoa* (Okabe *et al.*, 1998), peut entraîner une consommation substantielle de l'O_2 présent dans le biofilm. Le sulfate ainsi produit peut aussi précipiter sous forme de minéraux sulfatés et conséquemment être temporairement soustrait du cycle du soufre (Étape 4, Fig. 2.13) (Chapelle, 2001).

Thiobacillus denitrificans, qui utilise préférentiellement l'O_2 plutôt que les nitrates comme accepteur d'électrons lorsque l'O_2 et les NO_3^- sont tous les deux présents, peut toutefois utiliser les nitrates en cas d'épuisement complet de l'O_2 pour réaliser la réoxydation du H_2S dans les couches anaérobies du biofilm (Okabe *et al.*, 1999) (Éq. 2.19; Étape 5, Fig. 2.13).

$$H_2S + 4\ NO_3^- \Rightarrow 4\ NO_2^- + SO_4^{2-} + 2\ H^+ \quad (2.19)$$

La réoxydation sous conditions anaérobies peut également être réalisée avec une production intermédiaire de thiosulfates ($S_2O_3^{2-}$) (Étape 6a, Fig. 2.13), oxydables en SO_4^{2-} selon la réaction (2.20) (Chapelle, 2001):

$$S_2O_3^{2-} + H_2O \Rightarrow SO_4^{2-} + HS^- + H^+ \qquad (2.20)$$

Cette production de $S_2O_3^{2-}$ semblerait être couplée à une réduction par le H_2S de composés de fer présents dans le biofilm, menant à la formation de minéraux soufrés réduits (e.g. FeS, FeS_2) pouvant être soustraits du cycle du soufre (Chapelle, 2001) (Étape 6b, Fig. 2.13).

Le H_2S produit dans le biofilm pourrait non seulement résulter de la sulfato-réduction (Étape 1, Fig. 2.13), mais aussi de la réduction anaérobie, par des BSR ou d'autres espèces bactériennes anaérobies hétérotrophes, de soufre élémentaire (S^0) provenant de la couche oxique (Okabe *et al.*, 1999) (Étape 7, Fig. 2.8). En cas de réoxydation interne incomplète du H_2S, celui-ci peut diffuser jusqu'à la surface du biofilm et éventuellement jusque dans la phase aqueuse (Okabe *et al.*, 1998) (Étape 8, Fig. 2.13).

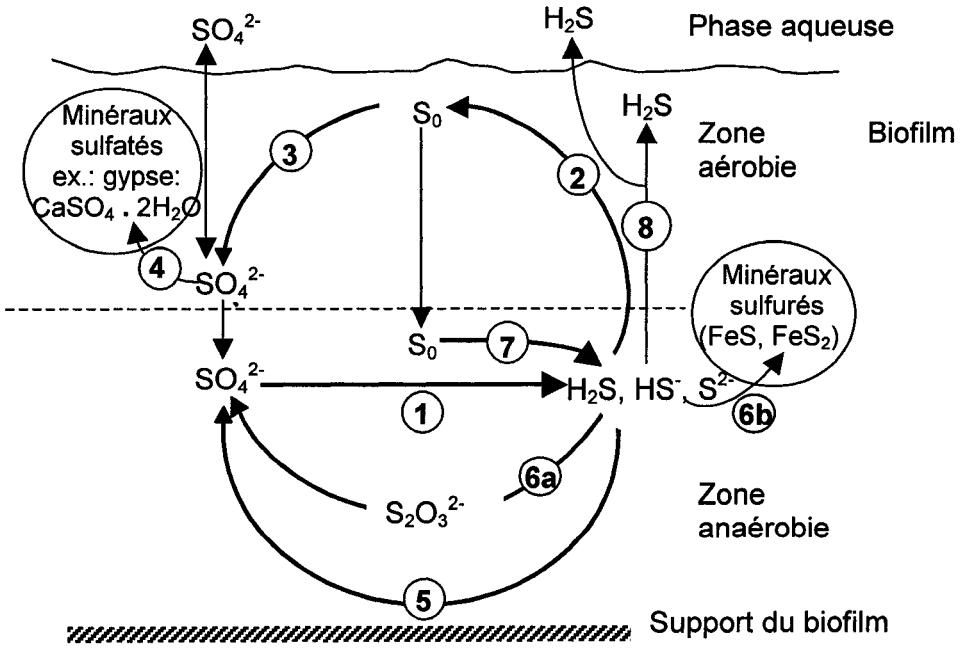


Figure 2.13 Cycle du soufre dans les biofilms des eaux souterraines

2.2.7.4 Cycle du fer dans les biofilms

Les biofilms des systèmes aquatiques sont des récupérateurs d'ions métalliques naturels très efficaces, et peuvent servir de matrices à la précipitation de phases minérales insolubles (Ferris *et al.*, 1989).

Au contact de l'oxygène contenu dans l'eau souterraine circulant à l'intérieur ou à l'extérieur du biofilm, le fer est d'abord oxydé en fer ferreux (Fe^{2+}), selon la réaction 2.21 (Lee et Newman, 2003):

$$Fe + ½\ O_2 + H_2O \Rightarrow Fe^{2+} + 2\ OH^- \qquad (2.21)$$

L'oxydation des ions Fe^{2+} (forme réduite et généralement soluble ou adsorbée du fer) en ions Fe^{3+} (forme oxydée du fer) (Éq. 2.22; Étape 1, Fig. 2.14), survient généralement dans la zone aérobie des biofilms qui présentent un pH et un potentiel redox suffisamment élevés (Banton et Bangoy, 1997):

$$Fe^{2+} \Rightarrow Fe^{3+} + e^- \qquad (2.22)$$

À leur tour, les ions Fe^{3+}, qui s'hydrolysent facilement, peuvent se lier aux surfaces des bactéries pour y former des précipités insolubles (Warren et Ferris, 1998) d'hydroxydes (ex.: ferrihydrite $Fe(OH)_3$, Éq. 2.23), d'oxydes (ex.: hématite Fe_2O_3) ou d'oxyhydroxydes (ex.: goethite FeOOH) de Fe^{3+} (Kielemoes *et al.*, 2002) (Étape 2, Fig. 2.14).

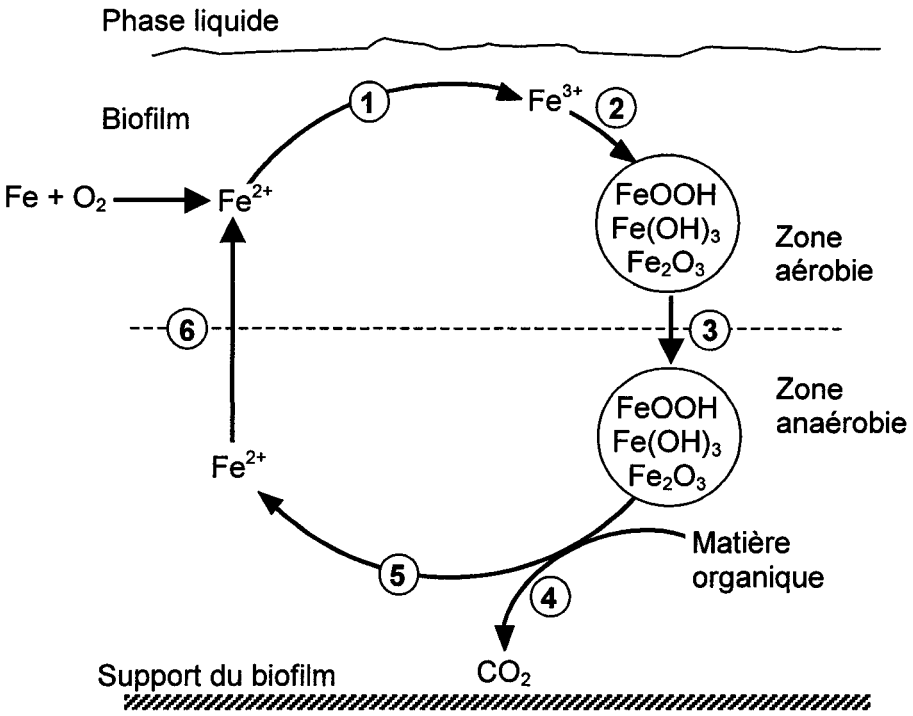
$$Fe^{3+} + 3\ H_2O \Rightarrow Fe(OH)_3 + 3\ H^+ \text{ (Banton et Bangoy, 1997)} \qquad (2.23)$$

Bien que les précipités d'oxyde ferrique soient fréquemment détectés dans les EPS des biofilm bactériens (Ferris *et al.*, 1989), l'examen de biofilms bactériens prélevés des parois de fractures granitiques a démontré que les précipités d'oxydes de fer pouvaient aussi se former directement à la surface des cellules bactériennes (Brown *et al.*, 1998). De même, des dépôts d'oxydes de fer ont été identifiés à la surface de bactéries du genre *Siderocapsa* isolées de biofilms d'eaux de rivière (Lünsdorf *et al.*, 1997).

Les (oxy)(hydr)oxydes ferriques sont cependant instables et sujets à la dissolution par réduction en présence de composés organiques et sous des conditions

anaérobies et de pH non-neutre (Banton et Bangoy, 1997). Au cours de la réduction ferrique (conditions anaérobies), le Fe^{3+} est à son tour utilisé comme accepteur d'électron terminal par certaines bactéries pour la minéralisation complète de la matière organique non récalcitrante présente dans les biofilms (Lovley et Philips, 1986). Le formaldéhyde (CH_2O) peut par exemple être oxydé sous l'action des oxydes de Fe^{3+} hautement insolubles de la ferrihydrite $Fe(OH)_3$ qui sont alors réduits en Fe^{2+} (Éq. 2.24; Étapes 4 & 5, Fig. 2.14) (Lovley, 1997).

$$CH_2O + 7\ CO_2 + 4\ Fe(OH)_3 \Rightarrow 4\ Fe^{2+} + 8\ HCO_3^- + 3\ H_2O \qquad (2.24)$$



Processus impliqués dans le cycle du Fer	
1	Oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+}
2	Précipitation des ions Fe^{3+} sous forme d'oxydes
3	Diffusion des oxydes
4	Oxydation de la matière organique
5	Réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+}
6	Diffusion du Fe^{2+}

Figure 2.14 Cycle du fer dans les biofilms des eaux souterraines

2.2.8 Rôles des EPS au sein des biofilms

Le mode de vie à l'état de biofilm présente de nombreux avantages pour les microorganismes qui y vivent (Flemming, 2002). Les EPS sont responsables de la grande majorité des fonctions qui y sont accomplies (Wingender *et al.*, 1999a). Parmi ces fonctions, celles qui se sont avérées les plus pertinentes dans le contexte de la présente étude sont présentées au tableau 2.9.

Tableau 2.9 Liste de fonctions attribuables aux EPS des biofilms

Fonction[1]	Effet(s)
Adhésion initiale des bactéries aux surfaces	Colonisation des surfaces par les bactéries et les microcolonies pionnières
Formation d'agrégats cellulaires	Immobilisation relative des cellules Potentiel d'obtention de très hautes densités cellulaires
Agent structural	Stabilité mécanique Développement de microconsortia Développement de gradients de concentration Rétention d'enzymes extracellulaires Transport convectif au travers des canaux
Barrière protectrice	Tolérance aux métaux, toxines et biocides Protection contre la prédation des protistes
Capacité de sorption	Accumulation des nutriments Rétention d'eau, protection contre la dessiccation

[1]Tableau adapté de Flemming (2002)

2.2.8.1 Participation à l'adhésion initiale des bactéries aux surfaces

La participation des EPS dans l'adhésion initiale des bactéries aux surfaces est une fonction des EPS qui a souvent été mentionnée dans la littérature (Boyd et Chakrabarty, 1995; Costerton *et al.*, 1995; Characklis et Marshall, 1990). Boyd et Chakrabarty (1995) ont par exemple émis l'hypothèse que le pont entre la cellule et la surface d'attache pourrait être assuré par les EPS étant donné que ceux-ci sont soumis à un degré de répulsion électrostatique moindre que celui qui existe entre la cellule bactérienne et la surface d'attache. Le rôle joué par les EPS dans le mécanisme d'adhésion initiale des cellules aux surfaces n'a cependant pas été établi

de façon concluante (Flemming *et al.*, 2000; Percival *et al.*, 2000; Quintero et Weiner, 1995). En effet, alors que la production d'EPS a, à l'origine, été perçue comme un prérequis à l'adhésion bactérienne (Boyd et Chakrabarty, 1995; Marshall, 1992; Characklis et Marshall, 1990), certains travaux ont suggéré que la synthèse des EPS pourrait plutôt être le résultat de l'attachement des bactéries aux surfaces (Danese *et al.*, 2000; Vandevivere et Kirchman, 1993; Allison et Sutherland, 1987), que certaines souches bactériennes non productrices d'EPS auraient aussi la capacité de s'attacher aux surfaces (Boyd et Chakrabarty, 1995) et que le mécanisme d'adhésion aux surfaces pourrait impliquer des molécules autres que les EPS (Quintero et Weiner, 1995).

2.2.8.2 Formation d'agrégats cellulaires

Les EPS jouent également un rôle fondamental dans la formation d'agrégats cellulaires (Sutherland, 2001a). L'aptitude des EPS à former des agrégats cellulaires semblerait être en partie attribuable aux caractéristiques hydrophobes des EPS (Sutherland, 2001a). Bien que la matrice des EPS soit généralement hydrophile en raison de la présence de sucres (Flemming et Wingender, 2001; Christensen et Characklis, 1990), certaines de ses régions seraient en effet hydrophobes en raison de leur teneur élevée en acides aminés hydrophobes. Cette hydrophobicité pourrait favoriser le développement d'agrégats cellulaires plus larges (Sutherland, 2001a), ce qui en retour engendrerait des densités cellulaires plus élevées (Flemming, 2002).

2.2.8.3 Barrière protectrice

Un grand nombre parmi les divers rôles qui ont été attribués aux EPS des biofilms implique, d'une manière ou d'une autre, la protection des bactéries de la matrice (Allison, 1998). La matrice des EPS, qui constitue une véritable microniche pour chacune des microcolonies bactériennes qu'elle enrobe, agit en tant que barrière au sein de laquelle le transport diffusif l'emporte sur le transport convectif (Flemming et Schaule, 1996), assurant ainsi la protection des cellules immobilisées contre les variations rapides des conditions environnementales (Percival *et al.*, 2000). Les cellules sont ainsi protégées des changements osmotiques (Chappell et Evangelou, 2002; Wuertz *et al.*, 2001), de pH (Wuertz *et al.*, 2001; Gibbs et Bishop, 1995), des

conditions redox (Chappell et Evangelou, 2002), de pression hydraulique et aussi de la pénétration de substances toxiques (Flemming et Schaule, 1996; Gibbs et Bishop, 1995). Les EPS ont aussi la capacité de protéger les bactéries des activités de prédation des protozoaires (consommation de bactéries et de portions de la surface externe du biofilm) (Percival *et al.*, 2000; Costerton *et al.*, 1995; Tijhuis *et al.*, 1995).

2.2.8.4 Sorption des substances organiques et inorganiques

Les EPS sont réputés pour leur capacité élevée à sorber/désorber une multitude de substances organiques et inorganiques (Wuertz *et al.*, 2001; Flemming, 1995), dont les minéraux (Wuertz *et al.*, 2000) et les nutriments (Percival *et al.*, 2000; Boyd et Chakrabarty, 1995; Freeman et Lock, 1995) pour ne mentionner que ceux qui sont pertinents dans le cadre de la présente étude. La charge négative des EPS accroît par exemple la capacité à piéger certains nutriments cationiques tels que les amines[1] (Percival *et al.*, 2000). Cette capacité accrue à capturer les nutriments pourrait être responsable de la viabilité et de la densité cellulaire plus élevées des bactéries des biofilms comparativement à celles de leurs homologues planctoniques (Boyd et Chakrabarty, 1995). Tel que mentionné à la section 2.2.4.1, les ions séquestrés de l'environnement immédiat engendrent aussi très souvent des biofilms moins solubles, plus visqueux et plus rigides, et les ions Ca^{2+} auraient un rôle particulièrement important dans l'amélioration ou le maintien de la stabilité mécanique du réseau polymérique (Huang et Pinder, 1995). La capacité de rétention d'eau élevée des EPS serait aussi responsable de la résistance accrue à la dessiccation des cellules bactériennes (Flemming et Wingender, 2001).

Le rôle le plus important des EPS est sans doute celui qu'ils jouent en tant qu'agents structuraux de la matrice (Wingender *et al.*, 1999a). Cette fonction des EPS, qui assure en partie la stabilité mécanique des biofilms (Körstgens *et al.*, 2001b), est discutée dans la section suivante.

---

[1]La fonction amine $-NH_2$ donne lieu au groupement cationique $-NH^+-$ (Flemming, 1995)

2.2.9 Stabilité mécanique du biofilm

La stabilité est définie d'une manière très générale comme étant le caractère de ce qui tend à demeurer dans le même état (Robert *et al.*, 1993). Comme la plupart des biopolymères, les biofilms sont des matières non récalcitrantes, qui ne s'accumulent donc pas indéfiniment dans l'environnement (Baveye *et al.*, 1998). Leur stabilité dépend donc avant tout de leur capacité à résister à la biodégradation.

La stabilité des biofilms, qui est d'une importance capitale pour toutes les technologies à biofilm où l'obtention de niveaux de performance acceptables est un pré-requis (Körstgens *et al.*, 2001b), dépend d'abord étroitement de la stabilité intrinsèque de la matrice extracellulaire (Liu et Tay, 2001b; Flemming *et al.*, 2000), mais aussi de la stabilité initiale de l'attachement cellulaire (Beyenal et Lewandowski, 2002).

2.2.9.1 Rôle de la matrice des EPS dans la stabilité du biofilm

Les EPS jouent un rôle clé dans le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la matrice des biofilms (Liu et Tay, 2001b; Flemming *et al.*, 2000). Des études expérimentales ont en effet démontré que l'extraction sélective des EPS entraînait une altération de la stabilité globale du biofilm (Sutherland; 2001a). Dans l'environnement naturel, il a été établi que la sécrétion des EPS bactériens contribuait à stabiliser les sols (Wolfaardt *et al.*, 1999) ainsi que les sédiments aquatiques (van Duyl *et al.*, 2000; Tolhurst *et al.*, 1999) en augmentant leur résistance aux forces de cisaillement (Wolfaardt *et al.*, 1999) et leur seuil critique de résistance à l'érosion (de Winder *et al.*, 1999). De même, Tijhuis *et al.* (1995) ont émis l'hypothèse que la partie du biofilm exposée au fluide pourrait être plus susceptible à l'érosion et à l'abrasion et donc moins stable que la base du biofilm, et ce, du fait que les microorganismes de surface croissent plus rapidement que ceux de la base du biofilm, et que la production en EPS est typiquement moindre chez les microorganismes à croissance rapide.

La cohésion et la stabilité de la matrice extracellulaire seraient en partie assurées par de faibles forces d'interaction, dont les forces de Van der Waals, les forces d'interactions électrostatiques et les liaisons hydrogènes et, possiblement, par des enchevêtrements entre les EPS de la matrice (Flemming *et al.*, 2000).

Les forces de Van der Waals, qui surviennent principalement dans les zones hydrophobes de la matrice, sont les plus faibles des trois types de forces (énergie de liaison ~ 2.5 kJ $mole^{-1}$) (Flemming *et al.*, 2000). Les forces d'interactions électrostatiques, relativement fortes (12 à 29 kJ $mole^{-1}$), interviennent entre ions et dipôles et peuvent par exemple impliquer des cations multivalents (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{3+}, Al^{3+}) et les nombreux sites de liaison potentiels chargés négativement des EPS (groupements carboxyles (–COOH) des acides uroniques[1]; résidus phosphates (–PO_4^{2-}) des acides nucléïques; groupements sulfates (–SO_4^{2-}) ou hydroxyles (–OH)) (Flemming *et al.*, 2000; Wingender *et al.*, 1999a; Flemming, 1995). De plus, lorsqu'elles sont de nature répulsive, ces forces contribuent à maintenir une structure gonflée et spongieuse (pores et canaux) au sein de la matrice d'EPS. Les liaisons hydrogènes, d'intensité comparable aux forces électrostatiques (10 à 30 kJ $mole^{-1}$), impliquent des groupes hydroxyles, particulièrement fréquents au sein des molécules d'eau et des constituants des EPS (Flemming *et al.*, 2000).

Bien qu'elles soient très faibles lorsque considérées individuellement, les énergies de liaison de chacun de ces types de force s'additionnent pour atteindre des valeurs comparables à l'énergie des liens covalents C-C (~ 250 kJ $mole^{-1}$) (Flemming *et al.*, 2000). Les enchevêtrements entre les chaînes exopolysaccharidiques de la matrice, qui peuvent devenir fréquents lorsque la concentration en macromolécules au sein du biofilm dépasse 2% (p/p), pourraient également contribuer à stabiliser la matrice (Flemming *et al.*, 2000).

2.2.9.2 Rôle de l'attachement cellulaire dans la stabilité initiale du biofilm

Selon Beyenal et Lewandowski (2002), la zone d'interface entre le biofilm et la surface du support sur lequel il croît pourrait être extrêmement vulnérable. Busscher et van der Mei (2000) ont notamment rapporté qu'une faiblesse au niveau de l'interface support-biofilm pouvait entraîner le détachement entier du biofilm alors qu'un manque de cohésion interne ne cause généralement que des détachements partiels. Ces constatations renforcent le concept selon lequel l'intensité de l'adhésion bactérienne serait d'une importance capitale pour l'établissement d'un biofilm stable

---

[1] Monosaccharides simples de formule $HOOC.(CH_2OH)_4.CHO$

(Teixera et Oliveira, 1998). Massol-Deyá *et al.* (1995) pensent, par exemple, que les cellules bactériennes actives des couches internes profondes pourraient contribuer à maintenir la base du biofilm fermement attachée au support, et, conséquemment, à accroître la résistance du biofilm au phénomène d'arrachage massif non contrôlé.

Les caractéristiques du support et la morphologie des cellules adhérentes sont deux paramètres qui influencent fortement les processus initiaux d'adhésion bactérienne. Au cours de travaux visant à comparer l'efficacité d'adhésion à différents types de matériaux d'un consortium de bactéries nitrifiantes cultivé en bioréacteur, Teixera et Oliveira (1998) ont constaté que les matériaux qui favorisaient la formation des biofilms les plus stables étaient ceux qui possédaient l'énergie libre interfaciale d'adhésion avec les bactéries la plus basse. Parmi les matériaux qui ont été testés, ceux qui se sont avérés les plus efficaces à l'adhésion, étaient, par ordre décroissant: le calcaire, le sable, le basalte et la pierre ponce. La charge de surface ainsi que la porosité du support auraient également une influence déterminante sur l'adhésion. Tandis que la charge de surface la plus favorable serait celle qui engendrerait la liaison la plus forte entre la cellule et le matériau du support, le diamètre des pores optimal à l'accumulation de biomasse stable et viable sur les parois du matériau serait de 1 à 5 fois la taille des microorganismes (Teixera et Oliveira, 1998).

D'autre part, il semblerait que l'efficacité d'adhésion des cellules au support puisse être influencée par la morphologie des cellules bactériennes. L'efficacité d'adhésion des cellules aux surfaces solides serait notamment plus élevée pour les cellules allongées que pour les cellules sphériques (Weiss *et al.*, 1995). La morphologie allongée et parfois ramifiée des bactéries filamenteuses ferait ainsi de ces bactéries des agents particulièrement efficaces pour stabiliser la structure des biofilms (Black *et al.*, 2002; Galván *et al.*, 2000). La morphologie des bactéries filamenteuses favorise la stabilité d'adhésion des cellules car elle leur procure des aires de surface accrues pour l'attachement au support et les interactions cellule à cellule (Weiss *et al.*, 1995). En magnifiant l'effet de rugosité de surface (Characklis et Cooksey, 1983), les bactéries filamenteuses offrent aussi une résistance élevée à la friction des fluides (de Beer et Stoodley, 1995; Characklis *et al.*, 1990a), qui est par ailleurs en partie responsable des pertes de pression importantes dans les conduites

des systèmes de distribution d'eau (Vandevivere et Baveye, 1992c; Characklis *et al.*, 1990a).

La production de filaments par certaines cellules bactériennes serait stimulée par divers stress environnementaux tels qu'une limitation en nutriments (Donachie, 1993) ou en oxygène (Allan *et al.*, 2002), ce qui expliquerait l'omniprésence des bactéries filamenteuses dans les biofilms des écoulements stagnants (Kielemoes *et al.*, 2002). La résistance accrue des filaments bactériens à la famine prolongée serait imputable à leur capacité élevée à stocker les nutriments (Beccari *et al.*, 1998; Ferris et Lowson, 1997). En raison de leur résistance accrue à la prédation par des organismes de niveaux trophiques plus élevés tels que les protozoaires (Jürgens *et al.*, 1999), les bactéries filamenteuses des environnements stagnants contribueraient également à atténuer les effets néfastes de la prédation sur la structure du biofilm (Wingender *et al.*, 1999b).

2.2.9.3 Évolution temporelle de la stabilité du biofilm

La stabilité des biofilms nouvellement formés peut de surcroît subir des fluctuations temporelles fréquentes sous l'effet de divers processus abiotiques (changements des conditions hydrodynamiques ou physico-chimiques) ou biotiques (famine, vieillissement, dégradation enzymatique).

Les ions Ca^{2+} joueraient un rôle particulièrement important dans l'amélioration ou le maintien de la stabilité mécanique du réseau polymérique des biofilms. Les ions Ca^{2+} encourageraient les liaisons cellule-EPS et EPS-EPS, notamment grâce aux forces d'interactions électrostatiques, stimuleraient la production d'EPS et accroîtraient la résistance à l'érosion des biofilms (Huang et Pinder, 1995). Des essais comparatifs de résistance mécanique à la compression menés sur divers échantillons de biofilms d'une monoculture de *Pseudomonas aeruginosa* et contenant des concentrations variables en ions Ca^{2+} ont en effet indiqué qu'au-delà d'une valeur critique de la teneur en Ca^{2+}, le module d'élasticité des échantillons était positivement corrélé aux concentrations en Ca^{2+} (Körstgens *et al.*, 2001a). Les ions Ca^{2+} peuvent cependant avoir un effet dual sur les biofilms, car si, d'une part, ils peuvent accroître leur résistance, ils peuvent d'autre part causer de l'arrachage massif s'ils sont

soudainement relâchés de la structure (Applegate et Bryers, 1991). Des essais expérimentaux ont en effet démontré que l'extraction par chélation des ions Ca^{2+} de la matrice était susceptible d'entraîner une déstabilisation du biofilm (Flemming *et al.*, 2000). Des changements rapides et répétés de pH dans le fluide environnant ou dans le biofilm peuvent à titre d'exemple causer une dissolution de la calcite ou une précipitation soudaine des ions Ca^{2+}, et des changements de volume concomitants occasionnant une altération structurelle locale ou généralisée (Applegate et Bryers, 1991).

La stabilité mécanique des biofilms est également étroitement liée aux conditions hydrodynamiques. Les travaux de Beyenal et Lewandowski (2002) suggèrent que les biofilms adaptent leur architecture interne aux conditions hydrodynamiques du milieu ambiant afin d'assurer au moins deux fonctions: (i) maintenir une stucture suffisamment robuste pour résister aux contraintes de cisaillement et (ii) maintenir un taux d'apport en nutriments adéquat jusqu'aux couches les plus profondes. Il semblerait que le maintien de la résistance mécanique soit accompli aux dépens du maintien de l'apport en nutriments. Ainsi, des forces de cisaillement élevées favoriseraient des biofilms compacts, forts et stables (van Loosdrecht *et al.*, 1995), tandis que des forces de cisaillement plus faibles génèreraient des biofilms fragiles, hétérogènes et poreux (Liu et Tay, 2002). Une réduction des forces de cisaillement peut ultimement mener à de la stagnation, qui en retour entraîne généralement un affaiblissement considérable de la structure du biofilm (Davies, 1999).

Outre la prédation des protistes, les processus biotiques qui peuvent altérer la stabilité des biofilms sont: la synthèse d'enzymes, de biosurfactants et d'agents chélateurs par certaines bactéries (Sutherland, 1999a) ainsi que la famine et le vieillissement du biofilm (Applegate et Bryers, 1991).

Certaines enzymes peuvent causer du détachement massif imprévisible en entraînant une dépolymérisation de la matrice extracellulaire par des cassures aléatoires très rapides des chaînes d'EPS (Sutherland, 1999a). Ce relargage d'enzymes par des bactéries du biofilm dans le milieu environnant pourrait entre autres être stimulé par une stagnation de l'écoulement (Davies, 1999).

La perte de stabilité mécanique occasionnée par le vieillissement d'un biofilm est en partie imputable aux augmentations d'hétérogénéité physiologique et physico-chimique au sein de la matrice (McBain *et al.*, 2000). Avec la maturation du biofilm et l'augmentation concomitante de l'épaisseur et de la densité cellulaire, les gradients physico-chimiques (nutriments, gaz, pH) générés par l'activité métabolique des cellules enfouies dans la matrice deviennent plus marqués. Des augmentations d'épaisseur et de biomasse au-delà des limites critiques sont conséquemment susceptibles d'entraîner des évènements d'arrachage massif (McBain *et al.*, 2000).

De même, lorsque le biofilm vieillit, les espèces bactériennes deviennent de plus en plus diverses et complexes, et tendent à exercer des pressions sélectives disproportionnées sur la totalité du biofilm (McBain *et al.*, 2000). Le vieillissement cause très fréquemment une baisse très marquée de la croissance et une augmentation de la lyse des cellules dans les couches les plus profondes du biofilm, ce qui éventuellement stimule la formation de cavités à l'interface support-biofilm, affaiblit la structure du biofilm et entraîne de l'arrachage massif (Picioreanu *et al.*, 2001; Ohashi et Harada, 1996). Au cours d'essais réalisés dans le temps sur des biofilms dénitrifiants cultivés en réacteur sur des supports en PVC, Ohashi et Harada (1996) ont observé que des cavités étaient apparues à l'interface support-biofilm après 65 jours d'opération. Ces biofilms, dont les cavités avaient des surfaces qui représentaient de 10 à 20% de la surface totale du biofilm, se sont montrés beaucoup plus susceptibles à la rupture par cisaillement que les biofilms exempts de cavités.

La famine des bactéries sessiles est aussi susceptible d'entraîner des altérations majeures de la stabilité matricielle. Lorsque des discontinuités d'apport en nutriments surviennent au sein des biofilms, la croissance des bactéries se poursuit généralement à court-terme jusqu'à ce que la totalité des nutriments disponibles *in-situ* soient consommés (Kim et Fogler, 2000). Des composés biodégradables tels que des fragments de biofilm détachés (Van der Kooij, 2000), des débris de la lyse cellulaire, des sous-produits métaboliques (Marshall, 2000) et possiblement des nutriments stockés, comme ils peuvent l'être par certaines bactéries filamenteuses (Beccari *et al.*, 1998), peuvent constituer des sources alternatives de nutriments. Les EPS pourraient aussi jouer le rôle de source d'énergie puisque leur dégradation par

les cellules qui les produisent a été observée par Zhang et Bishop (2003). Bien que les EPS résistent à la décomposition rapide ou du moins se minéralisent plus lentement qu'ils sont produits (Baveye *et al.*, 1998), ils peuvent en effet être hydrolysés lorsqu'ils sont soumis à des temps de résidence prolongés (Nielsen *et al.*, 1997). De plus, un épuisement des nutriments disponibles *in-situ* peut, comme dans le cas d'un biofilm mature, accroître la lyse des cellules dans les couches les plus profondes du biofilm et affaiblir la zone d'interface support-biofilm (Picioreanu *et al.*, 2001).

Paradoxalement, une perte de stabilité ponctuelle n'est pas toujours néfaste aux biofilms (Sutherland, 1999b). En effet, le détachement de fragments de biofilms peut augmenter la surface disponible pour l'attachement, et, à plus long terme, peut stimuler la formation de nouveaux biofilms (Sutherland, 1999b). Les cellules demeurées attachées aux surfaces après un épisode de détachement massif seraient par exemple plus sujettes à la recroissance (Picioreanu *et al.*, 2001; Santegoeds *et al.*, 1998). De plus, les matières biodégradables et inorganiques relarguées lors d'un épisode de détachement ou lors d'une dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire peuvent être réutilisés comme sources de carbone et d'énergie par d'autres cellules (Sutherland, 1999b).

2.3 Technologies de contrôle hydraulique des aquifères fracturés

Le traitement *ex situ*, les barrières physiques de confinement et les barrières biologiques *in situ* (biobarrières) sont trois alternatives de contrôle de la contamination des eaux souterraines en milieu fracturé.

2.3.1 Le traitement *ex situ*

La technologie du pompage-et-traitement externe (*pump-and-treat*), qui est la technologie la plus reconnue des technologies *ex situ* conventionnelles, consite à traiter et à disposer des eaux souterraines contaminées suite à leur pompage (Bilbrey et Shafer, 2001; Suthersan, 1997). La technologie du pompage-et-traitement en milieu fracturé peut s'avérer efficace lorsque les fractures sont suffisamment accessibles et connectées pour permettre l'extraction des eaux contaminées, et ce,

souvent sans avoir à appliquer de forts gradients ou avoir à pomper des volumes d'eau excessifs (Steimle, 2002).

Le manque d'interconnectivité des fractures est cependant souvent un obstacle majeur à l'utilisation de cette technologie. La technique du pompage-et-traitement se montre aussi souvent inapte à assurer la destruction complète des contaminants dans des délais convenables (Bilbrey et Shafer, 2001) et peut entraîner une remobilisation des contaminants dans l'aquifère en raison des gradients d'eau induits par le pompage (Marcus et Bonds, 1999). De plus, dans 50% des cas, les fractures originelles doivent être agrandies par des techniques de fracturation pour augmenter la production de l'extraction. Selon l'Agence Américaine de Protection Environnementale, la technologie du pompage-et-traitement serait aussi trop dispendieuse et techniquement inapplicable à la restauration des aquifères fracturés profonds (Marcus et Bonds, 1999). Se basant sur un sondage réalisé auprès de praticiens de terrain et de chercheurs travaillant dans le domaine de la restauration des milieux fracturés contaminés, Steimle (2002) rapporte toutefois que la technologie du pompage-et-traitement est encore utilisée dans près de 60% des cas aux États-Unis et en Ontario.

Depuis une dizaine d'années, les technologies de confinement sont ainsi envisagées comme une alternative à la technologie du pompage-et-traitement.

2.3.2 Les barrières physiques de confinement

L'utilisation de barrières physiques de confinement est une stratégie répandue pour maintenir en place un panache de contamination ou rediriger l'écoulement des eaux souterraines hors d'un foyer de contamination (Rubin et Rabideau, 2000). Ces barrières sont généralement des parois étanches permanentes (*cutoff walls*) conçues pour être durables, résistantes aux contraintes mécaniques et au retrait, et assurer une conductivité hydraulique inférieure à 10^{-7} cm s^{-1} (Mitchell et Rumer, 1997). La technologie des rideaux d'injection (*grout curtains*) est actuellement fortement privilégiée pour le confinement des contaminations en milieu consolidé fracturé (Evans, 1995). En revanche, les technologies des parois moulées (*slurry walls*) et des

rideaux de palplanches (*sheet piling*) ne peuvent être utilisées que là où les matériaux géologiques sont aisément excavables.

2.3.2.1 Les rideaux d'injection

Les rideaux d'injection (*grout curtains*) sont des barrières formées par l'injection d'une suspension (coulis) à base de ciment ou de matériaux autres dans le milieu géologique. Ce coulis, injecté sous pression dans les vides et les fractures du milieu géologique, entraîne une baisse de la perméabilité originelle après s'être solidifié (Canter et Knox, 1986).

L'espacement entre les points d'injection, la pression d'injection et la composition du coulis sont des paramètres critiques à considérer pour l'optimisation du design des rideaux d'injection. Alors que l'espacement entre les points d'injection doit permettre de couvrir toute la largeur de la contamination à traiter, la pression d'injection doit être ni trop élevée pour ne pas entraîner une fracturation de la roche et des pertes inutiles en coulis, et à l'inverse, ni trop faible pour éviter un épanchement insuffisant et la solidification prématurée du coulis (Canter et Knox, 1986).

La composition du coulis doit être choisie en fonction de la nature du milieu géologique, puis de la nature et de l'âge de la contamination à traiter (Canter et Knox, 1986). Les coulis peuvent être de type particulaire (ex.: ciment, ciment-sol, ciment-eau, ciment-eau-argile, ciment-argile-sable, bitume) (Canter et Knox, 1986) ou chimique (ex: silicates, résines acryliques, polymères) (Mitchell et Rumer, 1997). La conductivité hydraulique des coulis cimentaires oscille généralement autour de 10^{-6} cm s^{-1}, mais peut être abaissée jusqu'à 10^{-10} cm s^{-1} avec l'ajout de superplastifiants (Evans, 1995) (Tableau 9).

Les coulis chimiques ont été utilisés pendant des décennies en construction pour des applications d'étanchéisation, mais leur utilisation pour le confinement des contaminations est relativement nouvelle et présente de nombreux défis en raison du coût élevé de ces coulis (Mitchell et Rumer, 1997) (Tableau 9) et du potentiel toxique de certains d'entre-eux (Canter et Knox, 1986). L'utilisation des coulis à base de formaldéhyde et de lignine a par exemple été bannie en raison de leur haute toxicité (Canter et Knox, 1986). Ces coulis sont aussi à proscrire dans les environnements

hautement acides ou alcalins car de fortes acidités ou alcalinités peuvent inhiber la réaction acido-basique impliquée dans leur solidification (Canter et Knox, 1986). Les coulis chimiques ont cependant des propriétés (ex: viscosité, résistance mécanique, temps de solidification) avantageusement manipulables et la conductivité hydraulique que certains d'entre-eux induisent suite à une injection dans le milieu géologique est très faible (Tableau 2.10) (Mitchell et Rumer, 1997).

Tableau 2.10 *K* obtenus pour des coulis utilisés pour les rideaux d'injection

Type de coulis	Conductivité hydraulique (cm s^{-1})	Longévité (ans)	Coût[4] ($/$m^2$)
Sol-ciment[1]	10^{-6} - 10^{-7}	-	-
Ciment[3]	10^{-5}	-	-
Sol-ciment avec adjuvants[1]	~10^{-10}	-	-
Silicate de sodium[2]	10^{-5}	10-20	130
Gels acryliques[2]	10^{-9} - 10^{-11}	>25	2000-4400
Époxy[2]	10^{-10}	>25	490
Cire de lignite[2]	10^{-4} - 10^{-7}	25	300
Ciment polymérique à base de sulfate[2]	10^{-10}	>25	190

[1]Evans (1995); [2]Mitchell et Rumer (1997); [3]Suthersan (1997); [4]coût du coulis par unité de surface de mur

Bien qu'il puisse être difficile de satisfaire aux critères élevés de réduction de perméabilité et d'obtenir le colmatage complet des fractures naturelles du fait du caractère aléatoire de leur taille, de leur orientation, de leur connectivité et de leur distribution (Mitchell et Rumer, 1997), la technologie des rideaux d'injection sied relativement mieux au confinement des milieux rocheux fracturés que les autres types de barrières physiques verticales (Mitchell et Rumer, 1997). Cette technologie a par exemple été envisagée comme alternative pour le confinement des eaux souterraines contaminées par la migration de liquides denses non-aqueux (LDNA) dans le roc fracturé de Smithville, dans le sud de l'Ontario (O'Neill et Gill, 1997).

2.3.2.2 Les parois moulées et les rideaux de palplanches

Les parois moulées et les rideaux de palplanches sont des structures verticales érigées dans le sol qui constituent des barrières passives à l'écoulement horizontal des eaux souterraines et à la migration de contaminants présents dans

l'environnement (Sharma et Lewis, 1994). Ces structures sont volumineuses et ne peuvent être érigées à même les fractures. La construction d'une paroi moulée implique en effet l'excavation d'une tranchée (~1 m épaisseur x 25 m profondeur max.) dans le matériel géologique (Houlihan et Lucia, 1999) tandis que l'installation d'un rideau de palplanches (45 m profond max.) implique l'enfoncement de la structure dans le sol (Canter et Knox, 1986). Ces technologies sont difficilement applicables à un matériau géologique tel que le roc, mais peuvent toutefois y être utilisées si celui-ci est facilement excavable (R. Chapuis, communication personnelle, février 2004).

Les parois moulées et les rideaux de palplanches peuvent être érigés en amont du foyer de contamination pour assurer le détournement des eaux hors de ce foyer, en aval de la contamination pour assurer la capture de la contamination lorsque le débit amont est faible, ou encore autour de la source pour encercler la contamination au complet (Sharma et Lewis, 1994).

Les parois moulées

Les parois moulées (*slurry walls*) sont des tranchées souterraines verticales remplies d'un mélange de matériaux faiblement perméables. Cette technique consiste en l'excavation d'une tranchée étroite à l'aide d'une boue (*slurry*) composée d'eau et d'argile qui agit d'abord comme support des parois. La boue de la tranchée est ensuite remplacée par un mélange auto-durcissable de matériaux de remplissage pouvant inclure une portion du sol excavé. Les mélanges de remplissage les plus fréquents sont: sol-bentonite, argile-béton, béton plastique[1] et ciment-bentonite (Sharma et Lewis, 1994). Un mélange sol-bentonite type contient de 2 à 4 % (p/p) de bentonite, de 20 à 35% d'eau, de 15 à 40% de sol fin et de 40 à 60% de sol plus grossier (Houlihan et Lucia, 1999).

Des géomembranes, le plus souvent de polyéthylène haute densité (PEHD), peuvent aussi être intégrées à même une paroi moulée (barrière composite) pour augmenter la résistance de la paroi aux contaminants très récalcitrants. Malgré leur résistance chimique accrue, leur longévité élevée et leur très faible conductivité

---

[1] Béton souple capable de supporter des déformations sans se fissurer

hydraulique (10^{-13} cm s^{-1}) (Mitchell et Rumer, 1997), les géomembranes sont très peu répandues en raison de leur coût élevé et de leur complexité d'installation (Sharma et Lewis, 1994). La conductivité hydraulique induite par divers matériaux au sein des parois moulées est donnée au Tableau 2.11.

Tableau 2.11 Conductivité hydraulique de matériaux des parois moulées

Matériau des parois[1]	**Conductivité hydraulique sur le terrain (cm s^{-1})**
Boue de bentonite	5×10^{-7}
Ciment-bentonite	10^{-6}
Sol compacté-bentonite	10^{-7}
Sol-ciment	5×10^{-7}

[1]Tiré de Suthersan (1997)

Plusieurs types de problèmes peuvent affecter la performance d'une paroi moulée. Les problèmes les plus fréquemment rencontrés concernent la détérioration ou la hausse de perméabilité de certaines zones des parois exposées à des variations d'humidité ou de température ou à des contaminants (Suthersan, 1997). Certains des avantages et inconvénients inhérents à cette technologie sont présentés au Tableau 2.12.

Tableau 2.12 Avantages et désavantages de technologies utilisées pour la restauration des milieux fracturés

Technologie	Avantages	Désavantages
Rideaux d'injection	• Capacité de pénétration des coulis dans les pores, les vides, les fractures[1] et les zones confinées • Conductivité hydraulique de certains coulis très basse[2] • Grande variété de coulis chimiques et non-chimiques[3] • Potentiel de contrôle des propriétés des coulis[2] • Bonne connaissance des coulis qui sont utilisés depuis 100 ans en construction et en stabilisation des sols[3] • Systèmes efficaces lorsque bien conçus[3]	• Coût de 3 à 35 fois plus élevé que celui des parois moulées[4]: 430 à 1200 $/m^2 • Potentiel toxique de certains coulis chimiques[3] • Planification et tests préliminaires de pression requis[3] • Possibilité de colmatage incomplet des fractures due à la complexité géométrique et à l'hétérogénéité inhérentes des réseaux fracturés[2]
Parois moulées	• Faible coût[4]: 35 à 150 $/m^2 • Simplicité et rapidité de construction[3] • Facilité d'entretien[3] • Bonne résistance aux contaminants et longévité de certaines bentonites[3] • Possibilité d'amender les matériaux classiques avec des additifs offrant une résistance accrue aux polluants[5] • Pas d'impact sur le niveau de la nappe[3] • Profondeurs de construction signifivatives (45-60 m)[5]	• L'applicabilité en milieu rocheux dépend de la facilité à excaver le roc[1] • Mauvaise résistance aux cycles de gel/dégel et sécheresse/humidité[6] • Détérioration possible de certains matériaux au contact de lixiviats fortement ionisés[3] • Incapacité de la technologie, lorsque utilisée seule, à éliminer la source de contamination[7] • Conductivité hydraulique médiocre sans l'ajout de géomembrane ou d'adjuvant[5]
Rideaux de palplanches	• Simplicité de construction car excavation non requise[3] • Entretien non requis suite à sa construction[3] • Coût intermédiaire entre celui des parois moulées et celui des rideaux d'injection[4]: 160 à 430 $/m^2	• L'installation requiert un enfoncement des panneaux qui est problématique dans le roc[3] • Étanchéité potentiellement faible au niveau des joints des panneaux[3] • Possibilité de corrosion de l'acier des panneaux par certains produits chimiques[3]

[1]Evans (1995); [2]Mitchell et Rumer (1997); [3]Canter et Knox (1986); [4]Houlihan et Lucia (1999); [5]Suthersan (1997); [6]Sharma et Lewis (1994); [7]Freeman et Harris (1995)

Les rideaux de palplanches

Les rideaux de palplanches (*sheet piling*) consistent en un assemblage de panneaux, en général faits d'acier, qui sont enfoncés dans le sol pour constituer une barrière à l'écoulement des eaux souterraines (Canter et Knox, 1986). Les palplanches manifestent une haute résistance mécanique et sont faciles à installer en milieux poreux car elles ne requièrent pas d'excavation (Mitchell et Rumer, 1997). Leur utilisation demeure néanmoins limitée en milieu rocheux en raison des difficutés associées à l'enfoncement des panneaux dans le roc (Canter et Knox, 1986). Les fuites d'eau qui peuvent se produire au sein des petites ouvertures existant entre les panneaux et, dans une moindre mesure, les risques de corrosion du métal au contact des contaminants sont des problèmes inhérents à l'utilisation de cette technologie (Tableau 2.12) (Mitchell et Rumer, 1997). Le design des palplanches a cependant été récemment modifié par l'incorporation de joints d'étanchéité spéciaux entre les sections adjacentes (Suthersan, 1997). Des conductivités hydrauliques inférieures à 10^{-8} cm s^{-1} ont pu être mesurées sur le terrain avec ce nouveau design.

2.3.3 La barrière biologique *in situ* ou biobarrière

Depuis près d'une dizaine d'années, l'approche de confinement ou de traitement des eaux souterraines par le biais d'une biobarrière mobilise l'attention de plusieurs équipes de recherche (James *et al.*, 1995c; Turner, 1995; Johnston *et al.*, 1997; Hiebert *et al.*, 2001; Ross et Bickerton, 2002).

Les biobarrières ont une multitude d'applications potentielles. Elles peuvent à titre d'exemples être utilisées en tant qu'écrans d'étanchéité verticaux (*vertical cutoff walls*) positionnés en amont d'un panache de contamination pour détourner l'écoulement hors du foyer de pollution (Ross et Bickerton, 2002; Chen-Charpentier, 1999), horizontalement en tant que recouvrement ou couche de fond pour empêcher la migration des lixiviats dans les sites d'enfouissement (Cunningham *et al.*, 1997; Brough *et al.*, 1997; Turner, 1995), ou encore comme zone réactive dans laquelle les contaminants peuvent être biodegradés *in situ* comme à l'intérieur d'un biofiltre (Hiebert *et al.*, 2001; Turner, 1995). Les barrières réactives sont désignées dans la littérature par plusieurs appellations variées, telles que: barrières perméables

réactives (*permeable reactive barriers*) (Guerin *et al.*, 2002), murs réactifs *in situ* (*in situ reactive walls*) (Suthersan, 1997), écrans biologiques *in situ* (*in situ bioscreens*) (Rijnaarts *et al.*, 1997) et barrières actives de biofilm (*active biofilm barriers*) (Brough *et al.*, 1997).

Dans le présent projet, les biobarrières réfèrent à l'utilisation des biofilms pour colmater les pores et les vides des milieux fracturés (Figure 2.15) dans le but d'y former des écrans d'étanchéité verticaux, y engendrant par le fait même une baisse de conductivité hydraulique. L'utilisation des biobarrières pour le confinement des contaminants en milieu poreux à l'échelle de terrain a été initiée avec succès par Johnston *et al.* (1999) et est actuellement à l'essai par Hiebert *et al.* (2001). Des résultats d'essais de terrain récents suggèrent que cette technologie soit aussi applicable aux milieux rocheux fracturés (Bickerton *et al.*, 2004).

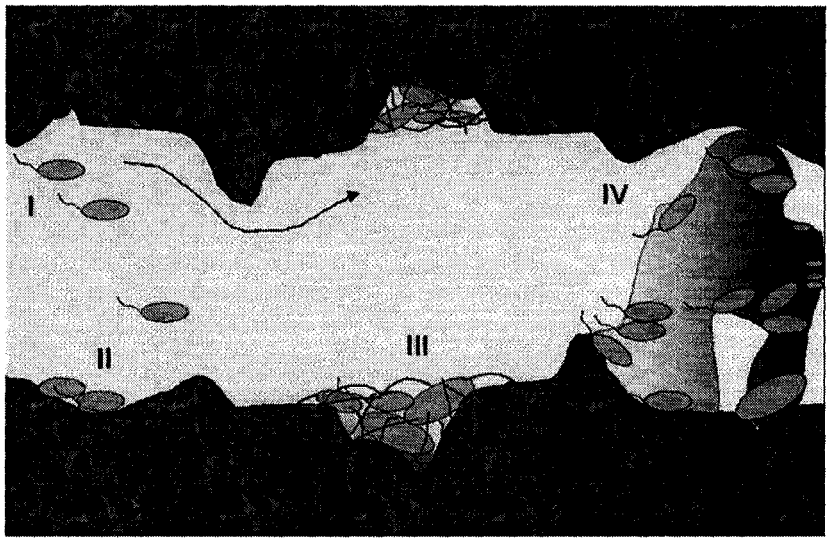


Figure 2.15 Étapes de biocolmatage d'une fracture rocheuse
I: bactéries en suspension
II: attachement des bactéries
III: multiplication des bactéries et production d'EPS
IV: expansion du biofilm et colmatage de la fracture rocheuse
Tiré de: http://www.ec.gc.ca/EnviroZine/french/issues/38/feature3_f.cfm
Reproduit avec la permission de Nathalie Ross

Les biobarrières sont formées en stimulant la croissance de bactéries capables de produire d'abondantes quantités d'EPS et de former des biofilms suite à l'injection de sources de carbone et d'accepteurs d'électrons (Hiebert *et al.*, 2001; Chen-Charpentier, 1999; James *et al.*, 1995c) (Figure 2.16). Les bactéries productrices de biofilms peuvent être présentes dans l'aquifère de façon naturelle, ou encore y être introduites via des puits d'injection (Hiebert *et al.*, 2001).

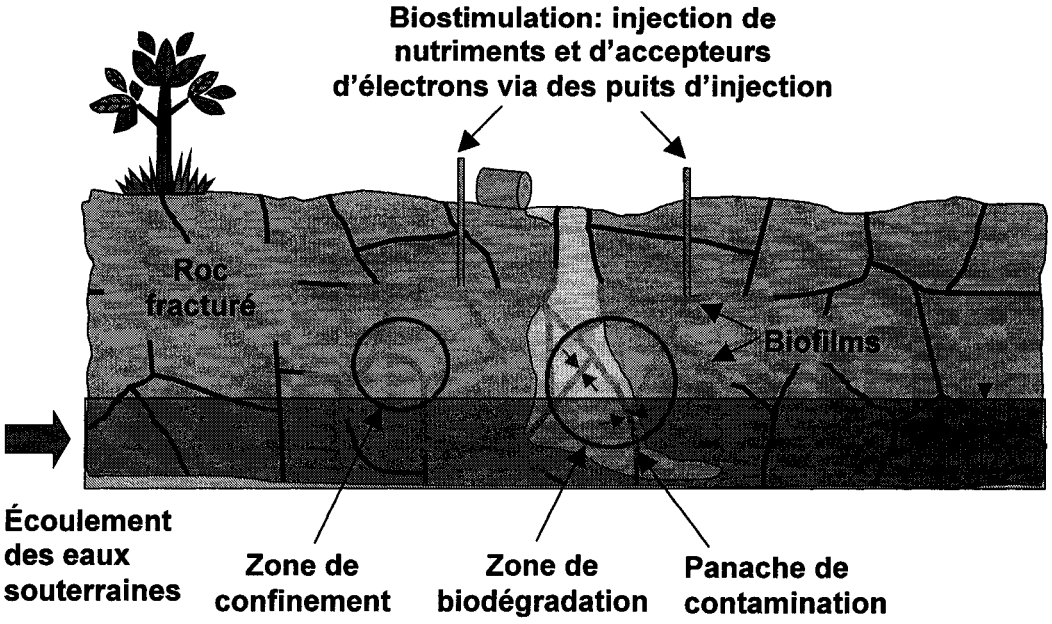


Figure 2.16 Schéma du concept des biobarrières appliqué aux milieux fracturés

Bien que la vision la plus répandue soit d'utiliser les biobarrières exclusivement comme biobarrières de confinement en les positionnant en amont du foyer de contamination, les biobarrières peuvent aussi être installées en aval du foyer polluant de façon à réduire la migration des contaminants en aval et à assurer leur dégradation concomitante par voie microbienne (Hiebert *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 1997).

Le concept des biobarrières présente plusieurs intérêts, dont son faible coût d'installation et d'entretien (Hiebert *et al.*, 2001) et son potentiel d'applicabilité aux milieux rocheux fracturés où peu de technologies de restauration se sont jusqu'à maintenant avérées efficaces (Ross et Bickerton, 2002). Un aperçu des avantages de

cette technologie et des aspects requiérant davantage de recherches est présenté au Tableau 2.13.

Tableau 2.13 Avantages et aspects à investiguer du concept des biobarrières

Avantages	Pas de limitation en profondeur[1] Applicable à tous les types de sols[1] (perméabilité faible ou élevée, rocs fracturés) Faible coût d'installation et d'entretien[1] Rapidité d'installation[1] Excavation non requise[1] (contrairement aux parois moulées) Éléments structuraux non requis (≠ palplanches) Disponibilité de nutriments à faible coût Fréquence d'apport en nutriments requise peu élevée Utilisation des populations bactériennes indigènes de l'aquifère[1] Technologie temporaire (possibilité de démantèlement) à l'inverse des barrières verticales traditionnelles qui sont permanentes[4] Potentiel d'utilisation dans des zones confinées (ex.:sous des bâtiments) ou dans des zones où l'utilisation d'équipement d'excavation est impossible[1]
Aspects de la technologie à investiguer	Innocuité environnementale[3] Résistance aux contaminants organiques[2, 5] Persistance à l'arrêt d'apport en nutriments[2]

[1]Hiebert *et al.* (2001); [2]Ross *et al.* (2001a);[3]Ross *et al.* (2001b); [4]Ross *et al.* (1996); [5]Turner (1995)

Les travaux de recherche portant sur l'utilisation des biofilms pour la restauration des aquifères fracturés sont assez récents et se sont, à leurs débuts, inspirés des connaissances acquises dans le domaine du biocolmatage en milieu poreux.

Les sections 2.3.3.1 et 2.3.3.2 présenteront d'une part les résultats de travaux de laboratoire portant sur le biocolmatage de milieux poreux et de milieux fracturés, et d'autre part l'état d'avancement des applications de la technologie sur le terrain, et ce, tant en milieux poreux qu'en milieux fracturés.

2.3.3.1 Biocolmatage des milieux poreux saturés

Essais de biocolmatage en colonne

La croissance des bactéries au sein des milieux géologiques poreux saturés entraîne un déclin, parfois sévère, de la conductivité hydraulique (*K*) de ces milieux (Baveye *et al.*, 1998; James *et al.*, 1995c).

Les travaux qui ont porté sur le biocolmatage des milieux poreux soit pour l'éviter (ex.: colmatage des puits d'extraction en eau potable (Baveye *et al.*, (1998)), soit pour l'encourager (ex.: barrières de confinement (Turner, 1995)) sont multiples. Les tableaux 2.15 et 2.16 résument les résultats de quelques essais de biocolmatage réalisés sur des colonnes de milieu poreux.

Les divers mécanismes responsables du biocolmatage sont de nature physique (ex: rétention de particules solides en suspension dans le fluide; production de gaz par des bactéries chimiolithotrophes) (Sanchez de Lozada *et al.*, 1994; Vandevivere et Baveye, 1992a), chimique (ex: précipitation de minéraux) (Rinck-Pfeiffer *et al.*, 2000), et biologique (Sanchez de Lozada *et al.*, 1994). Dans certains cas, la baisse de *K* peut être causée par l'action simultanée ou même par des interactions entre des facteurs appartenant à chacune de ces classes de mécanismes (Baveye *et al.*, 1998). En revanche, des mécanismes chimiques tels que la dissolution de minéraux pourraient renverser le colmatage de milieux poreux induit par des processus physiques et biologiques (Rinck-Pfeiffer *et al.,* 2000).

Les mécanismes biologiques les plus fréquemment invoqués pour expliquer la baisse de *K* dans les milieux poreux sont la production et l'accumulation d'EPS (Baveye *et al.*, 1998; Taylor et Jaffé, 1990) ainsi que le colmatage des pores par les cellules bactériennes (Rinck-Pfeiffer *et al.*, 2000; Sanchez de Lozada *et al.*, 1994). Les EPS, qui forment des gels ou des solutions hautement visqueuses (Sutherland, 2001a; Baveye *et al.*, 1998), abaissent le *K* des milieux en diminuant la porosité efficace de ces milieux et en augmentant la résistance au mouvement des fluides (Baveye *et al.*, 1998).

L'effet des EPS sur l'abaissement de *K* dans les milieux poreux a été démontré par Vandevivere et Baveye (1992c) (Tableau 2.15, Ligne 1) au cours d'essais réalisés sur quatre colonnes de sable saturées alimentées en glucose et inoculées à leur mi-hauteur avec quatre souches bactériennes distinctes issues du même isolat. Les souches utilisées consistaient en deux souches productrices d'EPS, dont une souche capsulaire (CAP) et une souche mucoïde (SLI) et deux autres souches non-mucoïdes mutantes[1] des deux premières souches (CAP^- et SLI^-). Parmi les quatre souches testées, seule la souche mucoïde a entraîné une baisse importante de *K* (~2 ordres de grandeur), suggérant que seuls les EPS produits sous la forme d'une couche de substance diffuse et non organisée (EPS mucoïdes) aient la capacité d'entraîner une réduction significative de *K*. À l'inverse, les EPS capsulaires liés à la cellule bactérienne auraient un effet négligeable sur le *K* puisqu'ils abaisseraient l'hydrophobicité de surface de la cellule, ce qui en retour nuirait à ses mécanismes d'adhésion.

Tel qu'il a été mentionné à la section 2.2.4.1, une limitation du milieu nutritif en azote peut stimuler la production d'EPS. Ainsi, au cours d'un autre essai de biocolmatage réalisé sur une colonne de sable inoculée avec une souche *Arthrobacter*, Vandevivere et Baveye (1992a) ont constaté qu'en haussant de 39 à 77 le ratio C/N du milieu nutritif, les bactéries avaient synthétisées des concentrations en EPS détectables, ce qui en retour avait entraîné une diminution de *K* de 2 fois (Tableau 2.15, Ligne 2).

La baisse de *K* dans les milieux poreux semblerait aussi être positivement corrélée avec l'augmentation dans les biofilms des teneurs en EPS difficilement dégradables (Baveye *et al.*, 1998; Ragusa *et al.*, 1994). Les EPS qui comportent par exemple des acides uroniques seraient plus résistants à la dégradation que les EPS uniquement formés de sucres simples, ce qui agirait en faveur d'un abaissement de *K* dans le milieu (Baveye *et al.*, 1998).

D'autre part, les cellules bactériennes, même si elles n'occupent qu'une fraction mineure de l'espace au sein des milieux poreux (Baveye *et al.*, 1998), peuvent

---

[1] Cellule manifestant de nouvelles caractéristiques dues à des changements de son ADN

causer une baisse importante de *K* en bloquant l'ouverture des pores du milieu (Shaw *et al.*, 1985). Baveye *et al.* (1998) rapportent par exemple qu'au cours d'essais réalisés sur des colonnes de sable inoculées avec une souche bactérienne *Arthrobacter* et alimentées en milieu glucosé, des biomasses cellulaires exemptes d'EPS et correspondant à 3.8% et 6.3% de l'espace poreux avaient causé des réductions de *K* de 10 et 100 fois respectivement. De même, au cours de l'essai mené par Vandevivere et Baveye (1992a) sur une colonne de sable inoculée avec une souche *Arthrobacter*, l'accumulation de larges agrégats cellulaires sous la forme de "bouchons" dans les pores du milieu avait, à elle seule, induit une baisse de *K* de 3 ordres de grandeur en 9 jours et les EPS n'avaient pu être produits en quantité mesurable sans doute en raison du faible ratio C/N de la solution nutritive (Tableau 2.15, Ligne 2).

L'importance de l'effet de la mobilité bactérienne sur l'efficacité de biocolmatage a été mise en lumière par Vandevivere et Baveye (1992b) lors d'une autre étude utilisant deux bactéries aérobies strictes non mobiles et non mucoïdes (souches *Arthrobacter* AK 19 et SLI$^-$) (Tableau 2.16, Ligne 1). Les résultats expérimentaux ont montré que la souche SLI$^-$ était un agent colmatant moins efficace que la souche *Arthrobacter* AK 19, probablement en raison de sa plus grande mobilité. La plus faible mobilité d'*Arthrobacter* AK 19 serait attribuable à sa plus grande tendance à former des agrégats que SLI$^-$, étant donné que la formation d'agrégats réduirait la mobilité des cellules (Vandevivere et Baveye, 1992b).

Au cours d'essais de percolation de suspensions de bactéries mortes menés sur des modèles de billes de verre, Shaw *et al.* (1985) ont constaté que les bactéries mortes avaient entraîné une baisse de *K* de l'ordre de 40% en l'espace de 29 heures, suggérant que les bactéries mortes aient la capacité de boucher l'ouverture des pores en agissant en tant que petites particules inertes (Tableau 2.15, Ligne 3).

De nombreuses études expérimentales réalisées sur des modèles de milieux poreux ont révélé que l'injection de cellules bactériennes de taille normale dans les modèles pouvait entraîner des problèmes de colmatage sévère dans la zone d'injection des milieux (Sanchez de Lozada *et al.*, 1994; Vandevivere et Baveye, 1992a; Taylor et Jaffé, 1990; MacLeod *et al.*, 1988; Shaw *et al.*, 1985). Ce

phénomène de zonation du colmatage, désigné par "*skin plugging*", qui a été attribué à la production d'importantes quantités d'EPS par les bactéries aérobies qui prédominent dans les zones d'injection des milieux, entrave la pénétration et la croissance des bactéries en aval de la zone d'injection (Baveye *et al.*, 1998). Un tel colmatage localisé est indésirable dans les cas où une pénétration profonde et des baisses de *K* uniformes sont requises (ex.: barrières de confinement) (Turner, 1995).

Les UMB, des bactéries de diamètre ≤ 0.3 µm manifestant généralement une capacité d'adhérence aux surfaces et de production en EPS diminuée (Section 2.2.4.2), présentent un intérêt certain pour la prévention du colmatage des puits d'injection des nutriments en milieux poreux en raison de leur capacité accrue à atteindre des profondeurs de pénétration importantes et à se distribuer uniformément dans les milieux (Turner, 1995).

Ainsi, au cours d'essais de biocolmatage menés sur des colonnes de bille de verre, MacLeod *et al.* (1988) ont observé que des *Klebsiella pneumoniae* à l'état d'UMB avaient eu une plus grande facilité que leurs bactéries homologues de taille normale à se déplacer au sein du milieu, et avaient conséquemment une tendance moins marquée à en colmater les zones d'injection (Tableau 2.16, Ligne 2). Leurs travaux ont aussi démontré que les UMB avaient entraîné un colmatage moindre que les cellules de taille normale (baisse de *K* de 11 à 71% pour les UMB vs de 99% pour les cellules normales) (Tableau 2.16), probablement en raison de leur plus faible capacité à produire des EPS. Des photos de microscopie ont de plus confirmé qu'à l'inverse des UMB qui étaient distribuées uniformément au sein du milieu et qui avaient produit des quantités infimes en EPS, les cellules normales avaient produit des quantités d'EPS significatives à l'entrée de la colonne.

Le colmatage des milieux géologiques a pendant longtemps été attribué à des activités anaérobies ou microaérophiles en raison de l'épuisement en oxygène et de la baisse locale du potentiel redox qui sont souvent associés aux fortes réductions de *K* (Baveye *et al.*, 1998). Les travaux de Vandevivere et Baveye (1992a) utilisant la souche bactérienne aérobie stricte *Arthrobacter* AK19 pour colmater une colonne de sable ont cependant démontré que le développement de conditions anaérobies dans le milieu n'était pas un prérequis à l'obtention de niveaux de colmatage élevés. Lors

d'un essai mené sous des conditions limitantes en carbone, la baisse de *K* dans les zones de la colonne les plus limitées en oxygène (~2.5 mg L^{-1}) était 25 fois moindre que dans les zones les plus colmatées, mais atteignait toutefois un ordre de grandeur. Des études comparatives démontrent que les bactéries aérobies tendent à produire de larges quantités de biofilms à proximité des zones d'injection du fluide, tandis que les bactéries anaérobies forment des biofilms généralement plus uniformes, mais à des taux plus lents (Baveye *et al.*, 1998).

Bactéries des milieux poreux colmatés

Plusieurs bactéries isolées des aquifères poreux biocolmatés ont pu être identifiées (Tableau 2.14). Les bactéries isolées ne sont cependant pas forcément toutes actives, et donc responsables de la baisse de *K* dans le milieu duquel elles proviennent (Baveye *et al.*, 1998). La baisse de *K* dans les milieux poreux saturés est généralement attribuée à l'activité de groupes bactériens physiologiques distincts, dont les bactéries aérobies strictes, les bactéries dénitrifiantes, les bactéries acétogènes, les bactéries sulfato-réductrices et les bactéries méthanogènes (Baveye *et al.*, 1998).

Tableau 2.14 Exemples d'espèces bactériennes des biofilms des milieux poreux

Processus bactérien	**Espèces ou genres bactériens**
Aérobie strict	*Arthrobacter* AK19[1]
Aérobie	*Beijerinckia indica*[2], *Pseudomonas aeruginosa*[3]
Dénitrification	*Pseudomonas* sp.[4], *Bacillus licheniformis*[5]
Fermentation	*Leuconostoc mesenteroides*[6], *Proteus*[2], *Klebsiella* sp.[7,8,9]
Méthanogénèse	*Methanosarcina barkeri*[10]

[1]Vandevivere et Baveye (1992a); [2]Dennis et Turner (1998); [3]Cunningham *et al.* (1991); [4]Mattison *et al.* (2002); [5]Yakimov *et al.*, (1997); [6]Kim et Fogler (2000); [7]MacLeod *et al.* (1988); [8]James *et al.* (1995c); [9]Cunningham *et al.* (1997); [10]Sanchez de Lozada *et al.* (1994)

Tableau 2.15 Essais de biocolmatage de colonnes de milieux poreux saturés

Objectif(s) des travaux[réf.]	Nature du montage expérimental	Conductivité hydraulique (*K*) initiale ($cm\ s^{-1}$)	K_{finale} & Baisse (%) Durée du test	Nature du test de percolation	Type de bactérie(s)
Étudier l'influence de la capacité à produire des EPS sur le potentiel de biocolmatage[1]	Colonnes de sable de quartz Alimentation à débit constant	6.3×10^{-3}	2.8×10^{-5} (⇓99.5%) 32 jours	Percolation en continu avec solution nutritive glucosée	Bioaugmentation avec une souche mucoïde
			5×10^{-3} (⇓~20%) 38 jours	Conditions aérobies	Bioaugmentation avec souche capsulaire ou non-mucoïde
Évaluer le potentiel de colmatage d'une bactérie aérobie stricte et des agrégats cellulaires[2]	Colonnes de sable Charge hydraulique constante	7.2×10^{-3}	6.5×10^{-6} (⇓99.1%) 9 jours	Percolation continue d'une solution minérale glucosée	Bioaugmentation avec *Arthrobacter* AK19 (aérobie stricte et non mobile)
	Alimentation à débit constant	7.2×10^{-3}	2.9×10^{-4} (⇓96.0%) 18 jours	Ratio C/N ~ 39	
			1.4×10^{-4} (⇓98.0%) 30 jours	Ratio C/N ~ 77	
Comparer les taux de biocolmatage induits par des bactéries vivantes et des bactéries mortes[3]	Colonnes de billes de verre Alimentation sous charge hydraulique constante	6.3×10^{-3}	3.8×10^{-5} (⇓99.4%) 43 heures	Percolation d'un milieu de culture avec bactéries vivantes	Bioaugmentation avec bactéries *Pseudomonas* (aérobies) isolées d'un cours d'eau
		6.7×10^{-3}	4.1×10^{-3} (⇓39%) 29 heures	Percolation avec bactéries mortes	
Mesurer la baisse de *K* d'un sol biocolmaté[4]	Colonne de sable limoneux; Charge hydraulique = cte	2×10^{-5}	1.4×10^{-8} (⇓99.9%) 22 jours	Percolation en continu avec solution nutritive glucosée	Bioaugmentation avec *Beijerinckia indica* (aérobie)

[1]Vandevivere et Baveye (1992c); [2]Vandevivere et Baveye (1992a); [3]Shaw *et al.* (1985); [4]Dennis et Turner (1998)

Tableau 2.16 Essais de biocolmatage de colonnes de milieux poreux (suite)

Objectif(s) des travaux[réf.]	Nature du montage expérimental	*K* initial (cm s^{-1})	*K* final & baisse (%) Durée test	Nature du test de percolation	Type de bactérie(s)
Étudier l'influence de la mobilité de 2 souches aérobies strictes non mucoïdes sur le biocolmatage[1]	Colonnes de sable de quartz Alimentation à débit constant	8.2×10^{-3}	3.3×10^{-5} (⇓99.6%) 12 jours 4.9×10^{-3} (⇓40%) 20 jours	Percolation en continu avec solution glucosée enrichie en minéraux	Bioaugmentation avec la souche non-mucoïde *Arthrobacter* Bioaugmentation avec la souche non-mucoïde SLI⁻
Comparer le potentiel des UMB avec celui des bactéries de taille normale pour le biocolmatage des milieux poreux[2]	Colonnes de billes de verre Alimentation sous charge constante	–	⇓71% ⇓11% ⇓99%	Injection d'UMB mantenues 2 semaines dans tampon phosphate Injection d'UMB affamées 4 semaines Injection de suspensions de bactéries maintenues à l'état végétatif dans du citrate de sodium	Bioaugmentation avec 500 volumes de pore de suspensions de *Klebsiella pneumoniae* (bactérie anaérobie facultative)
Étudier l'effet des processus biogéochimiques sur le colmatage[3]	Colonne de sable alimentée à débit constant	9.0×10^{-4}	7.18×10^{-5} (⇓92%) 7 jours	Alimentation en continu avec eaux usées	Bioaugmentation avec une microflore d'eaux usées; Processus aérobies & anaérobies
Établir un lien entre la croissance du biofilm, l'utilisation des nutriments et la réduction de *K*[4]	Colonnes acryliques remplies de sable maintenues en aérobie Débit constant	0.251	$\sim 10^{-4}$ (⇓>99.9%) Baisse obtenue à partir du jour 14 et maintenue pour un total de 283 jours	Percolation en continu avec solution nutritive de sels minéraux enrichie en méthanol	Inoculation avec culture bactérienne de boues activées acclimatée au méthanol

[1]Vandevivere et Baveye (1992b); [2]MacLeod *et al.* (1988); [3]Rinck-Pfeiffer *et al.* (2000); [4]Taylor et Jaffé (1990)

Persistance des milieux biocolmatés

Plusieurs travaux ont aussi mis l'emphase sur l'étude de la persistance des milieux biocolmatés à différents types de stress environnementaux, tels que des conditions de famine, de dessiccation, de détachement massif ou de toxicité chimique.

Les phénomènes de détachement massif peuvent causer des hausses soudaines de conductivité hydraulique. Brough *et al.* (1997) ont par exemple rapporté qu'un évènement de détachement massif survenu à un endroit localisé le long d'une colonne de sable colmatée par des biofilms de bactéries issues de boues activées avait entraîné une hausse de *K* de 17%. De même, le *K* dans un micromodèle bi-dimensionnel poreux préalablement inoculé avec une culture bactérienne mixte d'eaux usées a augmenté de 100% suite à un évènement de détachement massif (Dupin et McCarty, 2000).

L'effet des cycles de dessiccation/humidification sur la conductivité hydraulique a été étudié par Dennis et Turner (1998) sur des colonnes de sable limoneux colmatées par des biofilms de *Beijerinckia indica*, une bactérie aérobie produisant d'importantes quantités d'EPS et capable de tolérer des conditions anoxiques et de grandes fluctuations de pH (Tableau 2.17, Ligne 3). Les auteurs ont rapporté que ce traitement avait entraîné des augmentations importantes de *K* dans les sols, soit des hausses de l'ordre de 0.5 à 1 log avec des pointes instables pouvant atteindre jusqu'à 1.3 logs. La percolation des échantillons avec un milieu nutritif a entraîné une nouvelle baisse de *K*. Bien que les valeurs recouvrées étaient de 1.5 à 2 fois plus élevées que les valeurs initiales, cet essai suggère toutefois qu'un colmatage altéré suite à des conditions d'humidité adverses puisse être restauré *in situ* par une biostimulation. D'autres essais impliquant la percolation de diverses solutions inorganiques (NaCl 5M, HCl pH3, NaOH pH11) au travers de colonnes similaires ont montré que le milieu biocolmaté avait été beaucoup moins affecté par les changements de pH que par les cycles de dessiccation/humidification (Tableau 2.17, Ligne 3) (Dennis et Turner, 1998).

Les travaux de Shaw *et al.* (1985) et de Brough *et al.* (1997) ont aussi démontré que l'exposition des milieux biocolmatés à certains agents biocides (ex.:

hypochlorite de sodium 1%) était susceptible d'entraîner des gains de perméabilité significatifs (Tableau 2.17, Lignes 4 et 5).

Les travaux de laboratoire ou à l'échelle pilote de Kim et Fogler (2000), de Cunningham *et al.* (1997) et de James *et al.* (1995c) démontrent d'autre part que les milieux poreux biocolmatés soumis à des conditions de famine et d'écoulement très faible peuvent maintenir une excellente stabilité pour des durées parfois considérables.

Kim et Fogler (2000) ont testé la persistance à un arrêt d'apport en nutriments de biocolmatages induits dans des micromodèles bi-dimensionnels poreux. Préalablement au test de persistance, *K* avait subi une baisse de 2.6 ordres de grandeur suite à une inoculation avec *Leuconostoc mesenteroides*, une bactérie productrice d'EPS à croissance rapide (Tableau 2.17, Ligne 2). La famine des bactéries du biofilm, qui a été initiée par le remplacement du milieu nutritif par une solution tampon phosphate, a entraîné des épisodes de détachement massif causant une hausse de *K* de l'ordre de 0.5 log. Malgré cette hausse, une baisse de *K* de l'ordre de 2.1 ordres de grandeur a été maintenue jusqu'à la fin de l'essai (18 jours).

De même, Cunningham *et al.* (1997) rapportent qu'un lysimètre à l'échelle pilote (122 cm x 92 cm x 45 cm) contenant du sable biocolmaté à 99.99 % suite à une bioaugmentation avec des UMB (*Klebsiella oxytoca*), a maintenu son développement et sa performance originels suite une période de famine de quatre mois.

Au cours de leurs travaux, James *et al.* (1995c) ont testé la persistance à un arrêt d'apport en nutriments de biofilms de *Klebsiella pneumoniae* formés dans des colonnes de sable en remplaçant le milieu nutritif par des solutions oligotrophes (Tableau 2.17, Ligne 1). Les colonnes, dont le *K* avait été réduit d'environ 0.9 log suite à une inoculation avec *K. pneumoniae*, ont d'abord été soumises à la percolation d'une solution d'eau déionisée pendant une période de 7 jours, entraînant une hausse de *K* de 0.7 log. La réintroduction du milieu nutritif a toutefois permis de recouvrer les valeurs de *K* atteintes avant sa suppression. De façon similaire, une percolation pendant 11 jours avec une solution minéralisée a causé une hausse de *K* de 0.6 log, et la réintroduction du milieu nutritif a permis de recouvrer les valeurs initiales de *K*.

Tableau 2.17 Essais de persistance réalisés sur des milieux poreux biocolmatés

Objectif(s) des travaux[réf.]	Description du montage expérimental	*K* avant test de persistance (cm s^{-1})	*K* final ou/et Variation de *k* (%) & Durée du test	Nature du traitement	Nature de l'inoculum & viabilité
Évaluer l'effet de la famine sur la persistance d'une biobarrière[1]	Colonnes de sable Charge hydraulique constante	5×10^{-3}	2.9×10^{-2} ⇑400% (7 jours) 2.0×10^{-2} ⇑300% (11 j.)	Percolation avec eau déionisée pour 7 jours Percolation avec solution minérale (11 j.)	*Klebsiella pneumoniae* (bactérie aérobie) à l'état d'UMB
Étudier la stabilité d'un biofilm soumis à une famine[2]	Micromodèle 2D simulant un milieux poreux; Débit fixe	$K_f/K_i = 0.009$	K_f/K_i min.= 0.0069 (⇓23%) 18 jours	Percolation avec solution saline pour affamer les bactéries	*Leuconostoc mesenteroides* (bactérie aérobie)
Tester la persistance de milieux biocolmatés à divers traitements[3]	Colonnes de sable limoneux (~0.26 mm Ø) alimentées par une charge hydraulique constante	1.0×10^{-8}	1.3×10^{-8} (⇑30%) 27 jours	Percolation avec solution de NaCl 0.5M	*Beijerinckia indica* (aérobie stricte) ⇓viabilité de 33%
		1.0×10^{-8}	2.75×10^{-8} (⇑175%) 4 jours	Percolation avec solution de HCl, pH = 3	⇓viabilité de 1 log
		1.5×10^{-8}	1.9×10^{-8} (⇑26%) 24 jours	Percolation avec solution NaOH, pH = 11	⇓viabilité de ½ log
		1.0×10^{-8}	2×10^{-7} (⇑1.3 logs) 30 jours	Alternance de 10 cycles sécheresse/hydratation	–
Mesurer la résistance à un biocide[4]	Colonnes de sable Charge hydraulique fixe	3.5×10^{-2}	$> 8.6 \times 10^{-2}$ (⇑ >100%) 1 heure	Percolation avec hypochlorite de sodium 1% pendant 1 heure	Bactéries indigènes de boues activées
Évaluer la résistance à divers traitements chimiques[5]	Colonnes de billes de verre 0.09 mm ø Alimentation sous charge constante	6.30×10^{-3}	6.35×10^{-3} (⇑0.8%) ~5 jours	Biocide (isothiazalone)	Bactéries isolées d'un champ pétrolifère
		6.6×10^{-3}	9.2×10^{-3} (⇑39%) 28 heures	Hypochlorite de sodium 5% (p/p)	

[1]James *et al.* (1995c); [2]Kim et Fogler (2000); [3]Dennis et Turner (1998); [4]Brough *et al.* (1997); [5]Shaw *et al.* (1985)

Essais de terrain

À ce jour, très peu d'essais de biocolmatage de milieux poreux à l'échelle de terrain ont été recensés.

Un premier essai de terrain a été réalisé par Johnston *et al.* (1999) dans le but de produire une biobarrière à l'échelle pilote sur une portion d'aquifère d'environ 10 m de long par 2 m de large et s'étalant jusqu'à 4 m sous le niveau de la nappe phréatique. L'aquifère, localisé dans la région d'Adélaïde dans le sud de l'Australie, était de sable fin à moyen ($K \approx 9$ m j^{-1}), et contaminé par du diesel, du pétrole et des BTEX. Une biostimulation de 2.25 jours des bactéries indigènes de l'aquifère avec un milieu nutritif (20 g L^{-1} glucose, 1.6 g L^{-1} NH_4Cl, 1.0 g L^{-1} $NaNO_3$ et 132 mg L^{-1} NaBr) a entraîné une augmentation considérable des teneurs en EPS pendant les 4 premiers jours de l'essai et une baisse concomitante de K d'environ 5 fois. Cette réduction ne s'est toutefois pas maintenue, et 23 jours après que la biostimulation ait été initiée, le K avait recouvré sa valeur de pré-colmatage. Malgré le caractère éphémère du biocolmatage obtenu qui a été attribué à la dissolution des EPS du milieu, ce premier essai sur le terrain a permis de démontrer qu'il était possible de stimuler la formation d'une biobarrière en milieu poreux.

Une démonstration sur le terrain du concept des biobarrières a aussi été entreprise par le groupe du *MSE Technology Applications Inc.* du Montana (James et Hiebert, 2001; Hiebert *et al.*, 2001) avec comme objectifs principaux de caractériser le transport des UMB et leurs propriétés de ressuscitation dans les milieux poreux et de développer un protocole pour la conception, l'installation et l'entretien des biobarrières en tenant compte des caractéristiques inhérentes à chaque site (Hiebert *et al.*, 2001). L'étude a été réalisée sur une cellule d'essai de 55 m x 40 m x 6 m comportant un mélange de matériaux géologiques homogènes et hautement perméables en soumettant cette cellule à un gradient hydraulique constant. La formation de la biobarrière a été initiée par l'injection, pendant une période de deux jours, de suspensions cellulaires de *Pseudomonas fluorescens* sp. CPC211A (capacité accrue à produire des EPS) affamées et d'un milieu nutritif à base de mélasse et de nitrates via des puits d'injection positionnés perpendiculairement à l'écoulement des eaux

souterraines. L'injection de nutriments s'est poursuivie pendant une période supplémentaire de deux mois sous la forme de six apports ponctuels d'une durée variant entre 1.4 et 8.1 jours (James et Hiebert, 2001).

Suite à cette bioaugmentation, la réduction de K a atteint un maximum de 99.8% dans la totalité du site deux mois après que l'essai ait débuté (Hiebert *et al.*, 2001), et la biobarrière a maintenu une réduction moyenne de 99.7% pendant six mois sous des conditions de limitation en nutriments. Le niveau de colmatage initial de 99.8% a pu être récupéré suite à un apport ponctuel supplémentaire en nutriments. Les auteurs de cette étude soutiennent qu'un apport en nutriments à raison de une à deux fois par an est suffisant pour maintenir le colmatage de cette biobarrière à des niveaux élevés.

2.3.3.2 Biocolmatage de milieux fracturés

Les travaux qui portent sur l'utilisation potentielle des biofilms pour induire le biocolmatage de milieux fracturés dans une perspective de confinement des eaux souterraines contaminées sont récents et peu nombreux. Ces travaux s'inspirent des recherches provenant de deux domaines principaux, soit de l'étude de l'écoulement et du transport en milieu fracturé et de l'étude de la formation des biofilms en milieux poreux (Hill et Sleep, 2002).

Essais en laboratoire

Deux travaux de laboratoire ont démontré la faisabilité d'utiliser les biofilms pour le biocolmatage des milieux fracturés. Ross *et al.* (2001a) ont d'abord examiné le potentiel d'utilisation d'un biofilm pour colmater une fracture linéaire simple, tandis que Hill et Sleep (2002) ont étudié l'effet des biofilms sur l'hydrodynamique des milieux fracturés. Les objectifs, les méthodes expérimentales et les résultats de ces deux études sont résumés dans le tableau 2.18.

Dans leur étude, Ross *et al.* (2001a) ont examiné le potentiel d'utilisation des biobarrières pour le confinement des aquifères de roc fracturé. Le montage expérimental utilisé, qui était maintenu à 10°C, consistait en un assemblage horizontal étanche de deux plaques de calcaire (60 cm x 10 cm x 5 cm) comportant une fracture linéaire (0.5 cm large x 0.05 cm ouverture x 50 cm longueur, volume de 1.25 cm^3), et

était alimenté en continu par une eau souterraine synthétique. La formation d'un biofilm a été initiée en stimulant avec un milieu nutritif à base de mélasse les bactéries indigènes d'une eau souterraine avec lesquelles la fracture avait été préalablement inoculée. Cette biostimulation s'est traduite par une baisse de *K* notable, soit de 99.2% après 22 jours de tests, donnant lieu à un niveau de colmatage comparable aux niveaux obtenus dans les colonnes de milieu poreux. Le colmatage de la fracture a été attribué d'une part à la précipitation de carbonate de calcium ($CaCO_3$) et d'hydroxyde ferreux $Fe(OH)_2$ suite au mouvement d'ions contenus dans la matrice de calcaire et l'eau souterraine synthétique, et d'autre part à l'activité soutenue des bactéries qui ont été utilisées pour inoculer les plaques (Ross *et al.*, 2001a). La caractérisation des bactéries de l'inoculum a en effet révélé la présence de quantités significatives d'UMB et de bactéries capables de produire des EPS et de former des biofilms.

Dans leur travail, Hill et Sleep (2002) se sont intéressés à l'effet de la croissance d'un biofilm sur l'écoulement et le transport dans une fracture (500 µm d'ouverture, volume de 33 cm^3) taillée dans un assemblage de deux plaques de verre parallèles (21 cm large x 28 cm long x 6 mm épais). Suite à une heure de bioaugmentation avec des microorganismes de sol et 140 heures d'un apport continu en glucose et en oxygène sous une charge hydraulique constante, *K* a atteint une réduction de 1.4 ordres de grandeur (96.7%), équivalente à une réduction d'ouverture de fracture de 72% (baisse de 500 µm à 140 µm). À partir d'environ 150 heures, et ce, jusqu'au 19ième jour, une réduction de *K* supérieure à 1 ordre de grandeur a été maintenue. Ces niveaux de réduction de *K* se sont avérés comparables à ceux atteints dans des colonnes de milieu poreux. Le démantèlement de l'assemblage au 26ième jour a révélé la présence de chemins préférentiels et de zones à faible perméabilité au sein de la biomasse colmatante. En plus d'indiquer que la croissance du biofilm avait significativement modifié l'écoulement au travers de la fracture, des tests de traçage réalisés à différents moments pendant l'essai de colmatage ont montré que la formation de zones de mélange et de chemins préférentiels dans le plan de la fracture avait augmenté de façon exponentielle avec la réduction de *K* en raison d'une augmentation concomitante des variations de l'ouverture de la fracture.

Tableau 2.18 Essais de biocolmatage réalisés sur des milieux fracturés

Objectif(s) des travaux[réf.]	Montage expérimental	$K_{initiale}$ (cm s^{-1})	K_{finale} (cm s^{-1}) Baisse de K (%) Durée du test	Description du test	Nature du traitement bactérien et de l'inoculum
Vérifier la possibilité de colmater un milieu fracturé en biostimulant les bactéries indigènes d'une eau souterraine Mesurer le niveau de biocolmatage induit[1]	Assemblage de plaques de calcaire comportant une fracture de 1.25 cm^3 et de 500 µm d'ouverture Opération à 10°C et à la noirceur	5.6	4.5×10^{-2} (⇓99.2%) (22 jours)	Alimentation en continu sous charge hydraulique constante avec de l'eau souterraine synthétique Apport en continu d'une solution nutritive à base de mélasse	Biostimulation avec les bactéries indigènes d'une eau souterraine
Établir un modèle général de réduction de la conductivité hydraulique dans une fracture Relier ce modèle à des observations visuelles[2]	Assemblage de plaques de verre comportant une fracture de 33 cm^3 et de 500 µm d'ouverture	18	0.6 (⇓96.7%) (8 jours) Maintien pour ~13 jours à un niveau de colmatage ≥ 90%	Alimentation en continu sous charge hydraulique constante d'élévation ajustable Apport en continu sous conditions aérobies d'une solution nutritive minérale à base de glucose (5 mg L^{-1})	Bioaugmentation avec bactéries provenant d'un échantillon de terre arable

[1]Ross *et al.* (2001a)
[2]Hill et Sleep (2002)

Essais de terrain

En milieu fracturé, un seul projet de terrain visant l'utilisation d'une biobarrière pour le confinement des eaux souterraines contaminées a été recensé à ce jour. Cet essai de terrain, qui est toujours en cours, a pour objectifs de mesurer l'étendue, la stabilité dans le temps et la résistance à la famine d'un biocolmatage induit dans une nappe d'eau souterraine circulant dans un roc fracturé situé au sein d'un site non contaminé de la région de Mississauga, en Ontario (Ross et Bickerton, 2002).

La fracture qui a été sélectionnée pour cet essai de terrain et qui a fait l'objet d'une caractérisation hydrologique approfondie sur une période de 20 ans (Lapcevic *et al.*, 1999a) est horizontale, extensive, d'une ouverture moyenne de 250 µm, et logée entre des unités de calcaire et de schistes argileux à environ 10.5 m sous la surface du site (Ross et Bickerton, 2002). L'accès à la fracture est actuellement assuré par 29 puits verticaux de 17 à 18.5 m de profondeur répartis sur une surface approximative de 25 m x 25 m (Ross et Bickerton, 2002). La fracture a été isolée du reste du milieu géologique via l'installation de systèmes d'obturateurs équipés de capteurs de pression permettant la mesure des changements de hauteurs de charge (Ross et Bickerton, 2002). Suite à l'application d'un gradient hydraulique forcé sur l'étendue du site (Ross et Bickerton, 2002) et d'une biostimulation des bactéries indigènes de l'aquifère avec de la mélasse, des réductions de vitesse des eaux souterraines de l'ordre de 70% à 90% (vitesse initiale de 5 m j^{-1}), de perméabilité de 33% à 93% et d'ouverture de la fracture de plus de 40% ont été mesurées deux semaines après que l'essai ait débuté (Bickerton *et al.*, 2004).

La suite de ces travaux de terrain portera sur l'évaluation de la stabilité à long terme de la biobarrière. Dans le futur, l'innocuité environnementale de la technologie est aussi un aspect important qui sera exploré dans ce projet. Une préoccupation associée à l'utilisation de ce concept est de s'assurer que la biostimulation dans les aquifères fracturés ne déclenche pas une dispersion accrue de bactéries potentiellement pathogènes en raison des vitesses qui sont généralement plus élevées en milieu fracturé qu'en milieu poreux (Ross et Bickerton, 2002).

CHAPITRE 3 – APPROCHE MÉTHODOLOGIQUE

Ce chapitre présente un survol de la démarche expérimentale du projet en mettant l'emphase sur des aspects qui n'ont pas été abordés dans le manuscrit présenté au chapitre 4. La méthodologie générale qui a été adoptée pour l'essai expérimental est illustrée à la figure 3.1.

3.1 Conception, assemblage du montage et essais préliminaires

3.1.1 Conception et assemblage du montage

La conception du montage expérimental (Étape 1, Figure 3.1) a impliqué les composantes suivantes:

- un assemblage de plaques fracturé (#1, Figure 3.2),
- un système de stockage et d'alimentation en eau souterraine synthétique assurant un apport continu en eau à la fracture, sous une charge hydraulique constante, et couplé à un système de débordement assurant la récupération du surplus d'eau d'alimentation (#2, Figure 3.2),
- un système de mesure de la conductivité hydraulique dans la fracture constitué d'un dispositif formé de quatre piézomètres (#3, Figure 3.2) assurant la mesure des pertes de charge dans la fracture et d'un dispositif mesurant le débit de l'effluent en temps réel,
- un système d'alimentation en nutriments et en bactéries (#4, Figure 3.2),
- un système permettant de mesurer en temps réel les teneurs en oxygène à l'entrée et à la sortie des plaques.

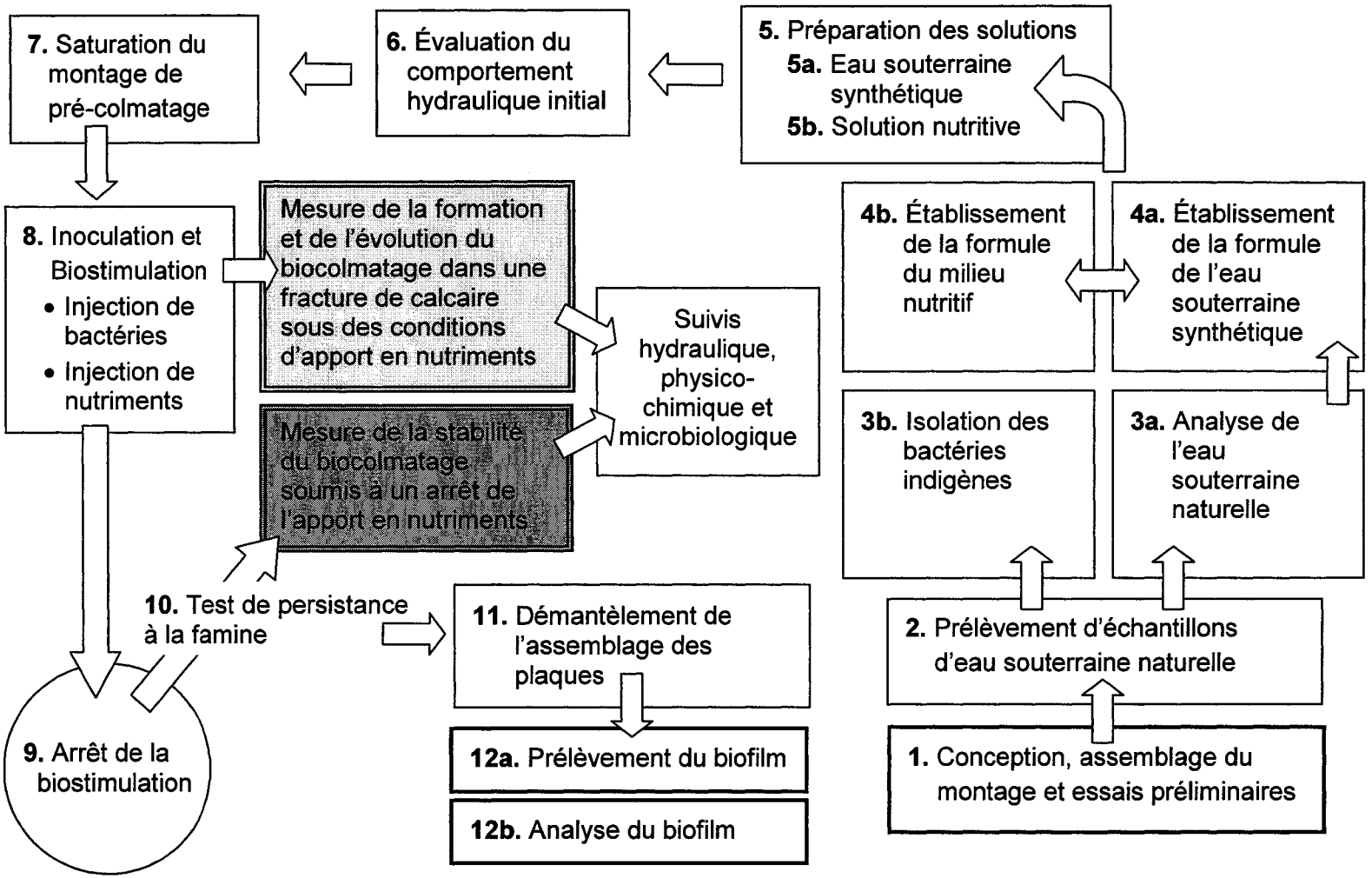


Figure 3.1 Schéma global de la méthodologie générale

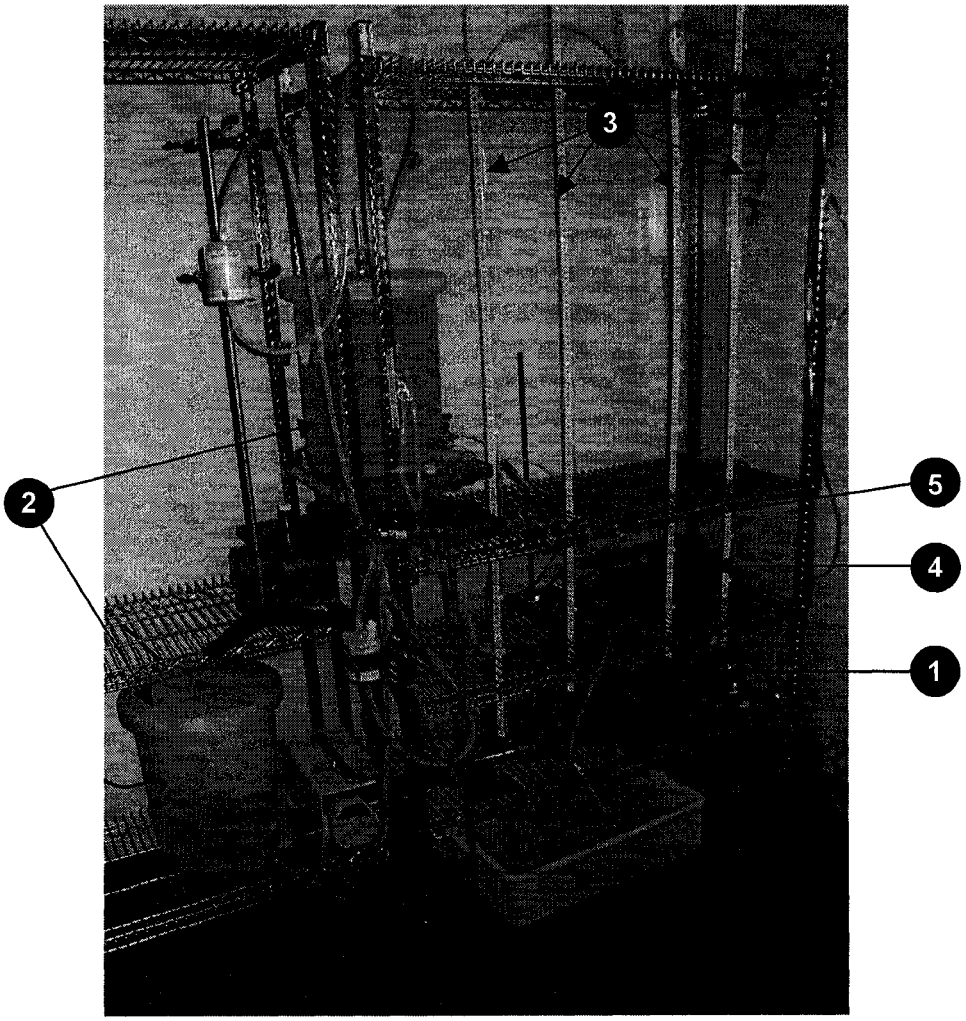


Figure 3.2 Vue d'ensemble du montage utilisé pour l'étude expérimentale (1) assemblage des plaques de calcaire; (2) système de stockage et d'alimentation en eau souterraine synthétique; (3) piézomètres; (4) injection via une pompe-seringue des nutriments et des bactéries; (5) sortie du circuit hydraulique (les dispositifs de mesure en temps réel du débit de l'effluent et des teneurs en oxygène à l'entrée et à la sortie des plaques n'apparaissent pas sur cette photo)

Les plaques de calcaire constituant l'assemblage fracturé ont été obtenues à partir d'un large bloc de calcaire extrait d'une carrière opérant dans la région métropolitaine de Montréal. Les caractéristiques de ce calcaire, qui était de type Saint-Marc, sont présentées en annexe I (p. 169). La fracture a été simulée par une rainure linéaire de section rectangulaire (49.8 cm long x 4.5 mm large x 1.55 mm

d'ouverture) taillée sur la face supérieure de la plaque de calcaire inférieure. Les deux plaques de calcaire disposées en "sandwich" (Figure 3.3) ont été étanchéifiées par du silicone d'aquarium appliqué en couche mince sur le pourtour de la fracture. L'étanchéité de l'assemblage a été obtenue par une étape de séchage, pendant laquelle un resserrement graduel des plaques au moyen de plusieurs paires de serres et une compaction progressive de la couche de silicone ont été réalisés. La méthode d'assemblage des plaques ainsi que les caractéristiques dimensionnelles de celles-ci et de la fracture sont décrites dans le protocole PE 43A de l'annexe IV (p. 175).



Figure 3.3 Assemblage des plaques de calcaire connecté au circuit hydraulique

Le système de stockage et d'alimentation en eau souterraine synthétique (#2, Figure 3.2) comportait un réservoir de stockage et une chaudière d'alimentation entre lesquels l'eau était pompée. L'eau dans la chaudière d'alimentation était maintenue à un niveau constant grâce à un port de trop-plein percé dans la paroi verticale, ce qui en retour garantissait l'application d'une charge hydraulique constante sur l'assemblage des plaques. La stérilisation de l'eau acheminée jusqu'à la chaudière d'alimentation était assurée par deux cartouches filtrantes de 0.45 µm et 0.22 µm respectivement montées en série sur le circuit d'alimentation principal entre le réservoir et la chaudière d'alimentation.

Le système permettant de quantifier la conductivité hydraulique dans la fracture comportait un dispositif assurant l'enregistrement en temps réel de la masse d'eau éluée à la sortie des plaques ainsi que quatre piézomètres assurant la mesure des pertes de charge dans la fracture ainsi qu'en amont et en aval de celle-ci. La mesure en temps réel de la masse d'effluent élué était effectuée d'une part par une

balance de précision analytique à plateau de chargement supérieur sur laquelle les récipients récupérant l'effluent à la sortie des plaques était déposés, et d'autre part par un ordinateur de bureau connecté à la balance et muni d'une carte d'acquisition de données et d'un logiciel graphique (LabVIEW®, National Instruments Corporation, Austin, Texas) assurant l'enregistrement et la visualisation sur l'écran des données acquises. La mesure quotidienne des pressions d'eau en amont, en aval, et à l'intérieur de la fracture était accomplie via quatre piézomètres de téflon (#3, Figure 3.2) qui étaient installés à quatre emplacements distincts en amont, en aval et le long de l'assemblage des plaques et qui permettaient de quantifier la charge hydraulique par une mesure manuelle de l'élévation de la surface libre dans les tubes.

Le dispositif assurant l'alimentation en nutriments et en bactéries (#4, Figure 3.2) était essentiellement une pompe-seringue constituée d'un plateau mobile actionnant deux seringues de 60 mL disposées parallèlement et maintenues en position horizontale par un système de support à ressorts. Cette pompe était ajustée à un débit 50 fois moindre que le débit de l'effluent afin d'éviter de perturber le débit de l'eau souterraine à l'entrée de l'assemblage des plaques.

Le système permettant la mesure *in situ* en temps réel des teneurs en oxygène dissous à l'entrée et à la sortie des plaques comportait d'une part une microélectrode à oxygène connectée à un oxymètre assurant la mesure de la concentration en oxygène dissous présente à l'extrémité de la microélectrode, ainsi que deux ports localisés dans le circuit hydraulique principal, directement en amont et en aval de l'assemblage des plaques, permettant d'insérer la microélectrode. D'autre part, un ordinateur de bureau, muni d'une carte d'acquisition de données et du logiciel graphique LabVIEW® permettant l'enregistrement en temps réel des données mesurées, était relié à l'oxymètre (Section 3.2.2, Protocole PE 43D, Annexe VI, p. 211). La mesure des niveaux d'oxygène dissous était réalisée en alternance entre l'entrée et la sortie en déplaçant la microélectrode d'un port d'insertion à l'autre.

Une description des diverses composantes sus-mentionnées, de leur mode d'assemblage et de leur fonctionnement est présentée au protocole PE 43A (p. 175).

3.1.2 Essais préliminaires

Une série de tests préliminaires a d'abord été réalisée afin de mettre à l'épreuve le montage expérimental (Étape 1, Figure 3.1; Tableau 3.1).

L'étanchéité de l'assemblage des plaques a d'abord été testée sur une durée d'environ 4 heures par pompage d'eau déionisée stérile à débit constant (~10 mL min^{-1}) (Étape 1a, Tableau 3.1). Lorsque des fuites étaient détectées, l'assemblage des plaques devait être démantelé, et les processus d'étanchéification et de contrôle de l'étanchéité devait être répétés jusqu'à obtention d'un assemblage étanche. Suite à cette étape, l'étanchéité du circuit hydraulique assemblé a, à son tour, été vérifée par pompage d'eau déionisée stérile afin de détecter la présence éventuelle de fuites au niveau des nombreux raccords et valves (Étape 1b, Tableau 3.1).

Le système de débordement de la chaudière d'alimentation pleine a été testé en haussant de façon intermittente le débit de la pompe d'alimentation afin de causer une hausse du niveau d'eau dans la chaudière au-delà du niveau du port de trop-plein (Étape 1c, Tableau 3.1).

Des tests d'ajustement de l'élévation du tube de sortie ont également été réalisés de façon à obtenir des niveaux piézométriques de pré-colmatage pratiques à mesurer, c'est-à-dire arrivant à mi-hauteur du montage (Étape 1d, Tableau 3.1).

Des tests préliminaires de courte durée (~1 à 2 heures) de saturation du circuit hydraulique principal et de l'assemblage des plaques de calcaire par l'application d'une hauteur de charge constante ont ensuite été réalisés (Étape 1e, Tableau 3.1). Ces tests ont mis en évidence la nécessité de monter les piézomètres sur des valves 3-voies afin de permettre l'évacuation de bulles d'air qui y sont fréquemment emprisonnées. Des valves 3-voies ont aussi été rajoutées à des endroits stratégiques le long du circuit hydraulique principal (aval de la chaudière d'alimentation et de la pompe-seringue) afin de permettre de purger des portions de ce circuit.

L'utilisation d'une microélectrode pour la mesure *in situ* des niveaux d'oxygène dissous a nécessité l'installation de deux ports d'insertion sur la ligne principale du circuit hydraulique, directement en amont et en aval de l'assemblage des plaques respectivement (Étape 1f, Tableau 3.1). Chaque port d'insertion consistait en un

raccord en Té dans lequel un septum pré-percé avait été calé. Des essais préliminaires de mesure de l'oxygène dissous par l'insertion de la microélectrode dans le fluide en mouvement via les ports d'insertion ont montré que le signal affiché par l'oxymètre était beaucoup trop instable pour permettre une lecture. Ce phénomène d'instabilité a été attribué au courant très bas et à l'impédance élevée générée par la microélectrode, ce qui la rendait très susceptible aux interférences externes (www.diamondgeneral.com). Pour remédier à ce problème, une cage de Faraday consistant en une gaine d'isolation tressée tubulaire a, dans un premier temps, été aménagée autour de la microélectrode. Dans un deuxième temps, une "mise à la terre" de la cage de Faraday, effectuée en reliant d'un fil conducteur la paroi externe de la gaine d'isolation à une prise de terre, a permis d'obtenir un signal stable à l'oxymètre.

Tableau 3.1 Liste des tests préliminaires réalisés avant le démarrage de l'essai

Étape	Nature du test	Description du test
1a	Test de l'étanchéité de l'assemblage des plaques de calcaire	Injection par pompage d'eau dionisée stérile à un débit d'environ 10 mL min^{-1} pendant une durée de 4 heures
1b	Test de l'étanchéité du circuit hydraulique principal	Tel que ci-dessus
1c	Test du système de débordement	Augmentation du débit de la pompe d'alimentation
1d	Ajustement de la hauteur du tube de sortie	Ajustement du tube à sa sortie des plaques à une élévation garantissant des niveaux piézométriques mesurables
1e	Saturation de courte durée du montage par l'application d'une hauteur de charge constante	Saturation du circuit hydraulique et de l'assemblage des plaques par l'application d'une hauteur de charge constante
1f	Test d'une méthode de mesure de l'O_2 au moyen d'une microélectrode	Installation de ports pour insérer la microélectrode dans le circuit hydraulique Mise au point d'une méthode d'isolation de la microélectrode

3.2 Préparation des solutions

3.2.1 Eau souterraine synthétique

L'eau souterraine synthétique qui a été utilisée pour l'essai expérimental simule chimiquement l'eau souterraine naturelle d'échantillons qui ont été prélevés d'un puits du site de Clarkson, situé dans la ville de Mississauga, au sud-ouest de Toronto (Ontario) (Étape 2, Figure 3.1). Une description des conditions hydrogéologiques de ce site non contaminé comportant deux fractures extensives horizontales est présentée en annexe II (p. 170). Les échantillons d'eau souterraine ont été pompés d'une profondeur d'environ 10 m et recueillis suite à une purge de plus de cinq volumes de puits, soit environ 480 L d'eau.

L'établissement de la formule chimique de l'eau souterraine synthétique (Étape 4a, Figure 3.1) a été réalisé suite à l'analyse des principaux constituants de l'eau souterraine naturelle (Étape 3a, Figure 3.1). Les résultats d'analyse de l'eau souterraine naturelle, la procédure d'établissement de la formule chimique de l'eau souterraine synthétique, et la méthode de préparation de celle-ci sont présentés au protocole PE 43B de l'annexe V (p.193). La méthode d'établissement de la formule chimique de l'eau synthétique décrite dans ce protocole se base sur une reproduction fidèle du pH, de la dureté, de la force ionique et des concentrations en anions et cations majeurs de l'eau souterraine naturelle. La préparation de l'eau souterraine synthétique (Étape 5a, Figure 3.1) a été réalisée en lots de 14 L, sous conditions stériles, par une méthode gravimétrique impliquant l'ajout consécutif, dans un ordre pré-établi, de huit composés chimiques dans de l'eau déionisée stérile. L'eau préparée a été conservée à 4°C et utilisée à l'intérieur d'une période de 5 jours.

3.2.2 Solution nutritive

La formule du milieu nutritif à base de mélasse (Étape 4b, Figure 3.1) a été établie en fixant le taux d'apport en mélasse à 10 mg $m^{-2}.min^{-1}$. La préparation du milieu nutritif (Étape 5b, Figure 3.1) a été réalisée par l'ajout de mélasse et d'urée à de l'eau déionisée et par une stérilisation subséquente de la solution obtenue par filtration. L'ajout d'urée a permis de hausser d'environ huit fois le ratio N:P de la

solution d'eau souterraine synthétique enrichie en mélasse, donnant lieu à un ratio C:N:P final d'environ 231:20:1. Les détails de la méthode qui a mené à l'établissement de la formule du milieu nutritif et à sa préparation sont présentés à la section 6.4 du protocole PE 43B.

3.3 Isolation des bactéries indigènes de l'eau souterraine naturelle

Des échantillons d'eau souterraine naturelle prélevés du site de Clarkson ont également été utilisés pour l'isolation des populations bactériennes (Étape 3b, Figure 3.1) qui ont servi à inoculer l'assemblage des plaques fracturé. La méthode d'isolation et de préservation du concentrat bactérien isolé, qui a été utilisée telle que décrite au protocole PE 43F de l'annexe VIII (p. 230), consiste d'abord à concentrer les souches bactériennes par une double-centrifugation de l'échantillon d'eau souterraine prélevé. La préservation du concentrat bactérien isolé est réalisée par un ajout rapide de glycérol (agent cryoprotecteur), suivi d'une congélation rapide dans de l'azote liquide, puis d'une conservation dans un congélateur à -80°C jusqu'à utilisation des souches.

3.4 Évaluation du comportement hydraulique initial

Avant de réaliser la saturation du montage, étape préalable au démarrage de l'essai de biocolmatage, le comportement hydraulique initial de la fracture a été examiné en faisant varier le débit à l'entrée des plaques et en mesurant les pertes de charge correspondantes en amont, en aval, et le long de la fracture (Étape 6, Figure 3.1). Les résultats de ces essais, rapportés en annexe III (p. 172), ont montré que la relation entre le débit de l'effluent et les pertes de charge était quasi-linéaire, conformément à la relation 2.3 montrée à la page 10.

Les résultats de ces essais hydrauliques ont montré que pour le débit de pré-colmatage de 3 à 4 mL min^{-1} qui avait été envisagé, les différences de pertes de charge entre les deux piézomètres situés de part et d'autre de la fracture étaient mesurables, soit de l'ordre de 1 à 1.5 mm. Pour la présente fracture, dont la section d'écoulement est de 0.217 cm^2 (Tableau 4.1, p. 106), un débit de 3 à 4 mL min^{-1} correspond à une vitesse d'écoulement de 0.230 à 0.307 cm s^{-1}. Cette vitesse est intermédiaire entre les vitesses typiques des milieux fracturés (jusqu'à 10 m j^{-1}, soit 1.2

x 10^{-2} cm s^{-1} (Lapcevic *et al.*, 1999b)) et les vitesses qui caractérisent les milieux karstiques (ex.: ≈ 50 cm s^{-1} (Ford et Williams, 1989b)).

3.5 Saturation du montage de pré-colmatage

L'étape de saturation du montage (Étape 7, Figure 3.1), qui est l'étape préliminaire au démarrage de l'essai de biocolmatage, a consisté à faire circuler en continu dans le montage un volume total d'environ 18 L d'eau souterraine synthétique à un débit supérieur (6 mL min^{-1}) au débit initial de l'essai (4 mL min^{-1}), et ce, sous une charge hydraulique constante et pour une durée d'au moins 48 heures. Cette procédure, qui est présentée au protocole PE 43E de l'annexe VII (p. 224), a essentiellement pour but de chasser les bulles d'air du circuit hydraulique et de l'assemblage des plaques afin d'obtenir une stabilisation du comportement hydraulique.

3.6 Inoculation des plaques, biostimulation des bactéries et persistance

L'inoculation des plaques et la biostimulation des bactéries injectées (Étape 8, Figure 3.1) ont été réalisées par l'injection en continu d'inoculum et de solution nutritive dans la ligne d'alimentation du circuit hydraulique principal, et ce, conformément à la méthode décrite dans le protocole PE 43G (p. 239). Cette méthode préconise l'injection indépendante, mais simultanée, d'inoculum et de solution nutritive via deux seringues de 60 mL actionnées par le plateau mobile d'une pompe-seringue, et l'utilisation de suspensions d'inoculum préparées à partir d'échantillons de concentrats bactériens récemment décongelés, et renouvellées à une fréquence d'au moins une fois par 24 heures. Cette méthode d'inoculation et de biostimulation, qui exclut toute mise en culture et toute adaptation préalable des bactéries au milieu nutritif, a été privilégiée car elle reproduit le plus fidèlement possible les conditions qui prévalent dans le milieu naturel en favorisant le maintien de la viabilité et de la biodiversité bactériennes initiales. Afin de conserver une certaine proportionnalité entre le taux d'apport en nutriments et la baisse du débit de l'effluent consécutive au biocolmatage de la fracture, le débit de la pompe-seringue a été ajusté en fonction du débit décroissant de l'effluent pendant toute la durée de l'expérience.

Le test de persistance (Étape 10, Figure 3.1) a été initié lorsque la réduction de conductivité hydraulique dans la zone centrale de la fracture avait atteint un peu plus de deux ordres de grandeur, et ce, en interrompant l'inoculation et la biostimulation. Ce test a été mené sur une durée correspondant à environ quatre fois la durée de la phase de biostimulation.

3.7 Démantèlement de l'assemblage, prélèvement et analyses du biofilm

Le démantèlement de l'assemblage des plaques (Étape 11, Figure 3.1), qui a mis fin à l'essai de persistance et de biocolmatage, a été entrepris suite à l'isolation hydraulique de l'assemblage et à sa déconnexion subséquente du circuit hydraulique principal. Ce démantèlement a été réalisé à 20°C, sous conditions stériles, suite à une procédure de rupture mécanique par fatigue du joint de silicone qui maintenait l'étanchéité des plaques, conformément à la méthode décrite dans le protocole PE 43M de l'annexe XIV (p. 291). Le prélèvement du biofilm (Étape 12a, Figure 3.1) adhéré aux surfaces des plaques ouvertes a été effectué sous conditions stériles suite à une série d'observations qualitatives et quantitatives du biofilm intact. Des analyses, dont la nature et les méthodes analytiques sont listées au protocole PE 43M, ont ensuite été effectuées sur des échantillons du biofilm prélevé (Étape 12b, Figure 3.1).

3.8 Suivis hydraulique, physico-chimique et microbiologique

Les méthodes qui ont été adoptées pour le suivi et l'échantillonnage pendant les diverses phases de l'étude expérimentale sont décrites au protocole PE 43D de l'annexe VI (p. 211). Ce protocole décrit d'une part, la nature, la fréquence et la séquence des suivis, des échantillonnages et des analyses qui ont été réalisés et d'autre part, les méthodes qui ont été utilisées, et ce, en fonction de la phase expérimentale de l'essai (biostimulation, persistance, démantèlement).

3.8.1 Suivi des paramètres hydrauliques

Tel que sus-mentionné, le suivi de la conductivité hydraulique dans la fracture a été réalisé par un suivi informatisé, en temps réel, du débit à la sortie des plaques, ainsi que par un suivi manuel quotidien des niveaux piézométriques tant dans les zones amont et aval de la fracture que dans la zone centrale de cette dernière.

3.8.2 Suivi des paramètres microbiologiques

Pendant les phases d'inoculation/biostimulation et de persistance de l'essai (Étapes 9 & 10, Figure 3.1), le suivi microbiologique a été réalisé par des décomptes bactériens et des mesures de concentration en EPS. Au cours de ces deux phases, ces analyses n'ont pu être réalisées sur le biofilm lui-même, et ont donc été effectuées sur des échantillons d'effluent.

Les décomptes bactériens sur l'effluent ont été accomplis selon le protocole PE 43J présenté en annexe XII (p. 268), par une technique directe de dénombrement par microscopie par épifluorescence utilisant le *Bac*Light™, un colorant fluorescent. Cette méthode, basée sur l'intégrité membranaire des cellules, consiste à différencier les cellules viables (vert fluorescent) des cellules non-viables (rouge fluorescent) suite à une seule étape de coloration (Boulos *et al.*, 1999). Un suivi de la qualité de l'eau du réservoir et de la chaudière d'alimentation a aussi été effectué par observation microscopique tout au long de l'expérience afin de maintenir la stérilité de l'eau souterraine acheminée jusqu'à la solution d'inoculation (Section 3.2.3, Protocole PE 43D, Annexe VI).

Lors du prélèvement du biofilm consécutif à l'ouverture des plaques (Étape 12a, Figure 3.1), des décomptes bactériens ont également été réalisés par microscopie par épifluorescence sur une série d'échantillons obtenus à partir de dilutions sérielles dans de l'eau saline stérile d'une portion de biofilm, et ce conformément à la procédure présentée à la section 3.8.1.2 du protocole PE 43M de l'annexe XIV.

La détermination de la concentration en EPS des échantillons de l'effluent a été entreprise par la méthode présentée au protocole PE 43H de l'annexe X (p. 251). La procédure consistait d'abord à extraire par traitement chimique (ajout de NaCl et de EDTA) les EPS de l'échantillon d'effluent en augmentant la solubilité de ceux-ci dans l'eau, puis à les séparer des cellules bactériennes par traitement physique (centrifugation). Les EPS contenus dans le surnageant issu de la centrifugation étaient ensuite précipités par l'ajout d'éthanol, récupérés par filtration, puis quantifiés par gravimétrie.

3.8.3 Suivi des paramètres physico-chimiques

Au cours des phases de biostimulation et de persistance, les paramètres physico-chimiques qui ont requis l'utilisation de protocoles expérimentaux spécifiques pour la détermination de leur concentration dans l'effluent se résument à l'oxygène dissous et aux glucides. Les autres paramètres physico-chimiques qui ont été mesurés par des protocoles d'opération standards sont présentés au tableau 4.2 du chapitre 4 (p. 110).

Tel que sus-mentionné, le suivi de l'oxygène dissous a été réalisé en temps réel, *in situ*, soit en amont et en aval de l'assemblage des plaques par le biais d'une microélectrode à oxygène reliée à un oxymètre et un système informatisé d'acquisition de données. La mesure de l'O_2 dissous par le biais de la microélectrode a été réalisée conformément au protocole PE 43K de l'annexe XIII (p. 279). Ce protocole décrit le fonctionnement de l'oxymètre, qui, couplé à la microélectrode, permet de convertir le courant mesuré par celle-ci en concentration d'O_2, et propose une méthode de calibration et d'isolation de la microélectrode, deux procédures qui se sont avérées cruciales pour l'obtention d'une lecture stable à l'oxymètre.

Tel que présenté au protocole PE 43I de l'annexe XI (p. 257), le dosage des glucides totaux de l'effluent a été réalisé sur les filtrats issus de l'analyse des EPS en utilisant une méthode colorimétrique adaptée de la méthode originelle mise au point par Dubois *et al.* (1956). La méthode de Dubois consiste à ajouter deux réactifs, soit respectivement du phénol et de l'acide sulfurique, à l'échantillon dont on veut déterminer la concentration en glucides, ce qui produit une couleur jaune-orange stable, dont l'intensité, proportionnelle à la quantité de glucides présente, est mesurée par absorbance puis comparée à une courbe étalon standard pré-établie du glucide à doser. Bien que cette méthode permette de détecter de façon fiable des concentrations en glucides aussi faibles que 10 mg L^{-1} dans une solution, sa limite de détection s'est avérée être trop haute pour qu'elle puisse être utilisée telle quelle pour la présente étude. Le principe de la méthode qui a été utilisée (Protocole PE 43I) se base sur l'utilisation de cuves spectrophotométriques dix fois plus longues que les

cuves de taille standard, ce qui a permis d'abaisser de 10 fois la limite de détection de la méthode de Dubois originelle (échelle de détection: 0.5 à 10 mg L^{-1}).

Tel qu'indiqué au protocole PE 43D de l'annexe VI (p. 211), pendant les phases de biostimulation et de persistance, une réduction graduelle des fréquences et des volumes d'échantillonnage de même qu'une priorisation des analyses ont dû être effectuées en raison de la baisse de débit occasionnée par le colmatage de la fracture.

Les protocoles expérimentaux sus-mentionnés sont listés au tableau 3.2. Certains de ces protocoles sont sous une forme abrégée. Leur version originale est disponible au local A-682 de la Chaire en assainissement et gestion des sites.

Tableau 3.2 Protocoles relatifs à l'étude expérimentale

Protocole	Titre	Annexe	Page
PE 43A	Description du montage utilisé pour biocolmater, par l'utilisation d'une microflore indigène des eaux souterraines, un assemblage de plaques de calcaire reproduisant un milieu rocheux fracturé	IV	175
PE 43B	Préparation d'une solution d'eau souterraine synthétique par gravimétrie	V	193
PE 43D	Opération, suivi et échantillonnage du montage	VI	211
PE 43E	Saturation du montage	VII	224
PE 43F	Isolation de l'inoculum	VIII	230
PE 43G	Inoculation et biostimulation	IX	239
PE 43H	Détermination de la concentration en EPS d'un échantillon aqueux	X	251
PE 43I	Détermination de la concentration en glucides d'un échantillon aqueux	XI	257
PE 43J	Énumération directe des bactéries viables et totales d'un échantillon d'eau ou de sol par microscopie à épifluorescence (Bac*Light*™)	XII	268
PE 43K	Mesure in *situ* de l'O_2 dissous avec une microélectrode	XIII	279
PE 43M	Démantèlement et analyses du biofilm	XIV	291

CHAPITRE 4 – STABILITÉ D'UN BIOFILM SOUMIS À UNE FAMINE PROLONGÉE DANS UNE FRACTURE DE CALCAIRE

4.1 Présentation de l'article

Ce chapitre reproduit l'article intitulé «Stability of a Nutrient-Starved Biofilm in a Limestone Fracture» qui a été soumis le 19 décembre 2003 pour publication dans la revue *Water Research*. Les auteurs de cet article sont Françoise Castegnier[1], Nathalie Ross[2], Robert P. Chapuis[3], Louise Deschênes[1] et Réjean Samson[1].

Après un résumé, ce chapitre traite en introduction (section 4.2.3) de la problématique de la contamination des eaux souterraines en milieu rocheux fracturé et de l'attrait que représente la technologie novatrice des biobarrières pour le confinement de ces milieux géologiques. Un bref aperçu de l'état actuel de développement de cette technologie, suivi des objectifs de l'étude qui visent à approfondir le concept de stabilité à un arrêt d'apport en nutriments d'un biocolmatage induit dans un assemblage de calcaire fracturé, sont présentés. La section 4.2.4 qui suit l'introduction présente la méthodologie qui a été adoptée en décrivant le montage expérimental qui a été utilisé, les phases et les sous-phases opératoires qu'a comportées l'étude expérimentale, ainsi que les différentes analyses qui ont été réalisées afin de rencontrer les objectifs de recherche du projet.

La section 4.2.5 de ce chapitre présente les résultats qui ont été répertoriés en fonction des diverses phases opératoires de l'étude expérimentale. Les résultats décrivent les changements du comportement hydraulique dans la fracture ainsi que

---

[1] Chaire CRSNG en assainissement et gestion des sites, Département de Génie Chimique, École Polytechnique de Montréal

[2] Institut National de Recherche sur les Eaux, Environnement Canada, 867 Lakeshore Road, P.O. Box 5050, Burlington, On, Canada, L7R 4A6

[3] Département des Génies Civil, Géologique et des Mines, École Polytechnique de Montréal

des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de l'effluent. Les résultats incluent également des analyses du biofilm qui a été prélevé suite au démantèlement de l'assemblage fracturé. La section 4.2.6 du chapitre présente une discussion des résultats obtenus en faisant intervenir certaines des notions hydrauliques, géochimiques, et microbiologiques qui ont été présentées dans la revue de littérature du chapitre 2. Enfin, les conclusions présentées à la section 4.2.7 résument les résultats expérimentaux obtenus ainsi que l'interprétation de ceux-ci. Les remerciements des auteurs ainsi que les références citées sont présentés dans les sections 4.2.8 et 4.2.9 respectivement.

4.2 Stability of a Nutrient-Starved Biofilm in a Limestone Fracture

4.2.1 Abstract

The stability of biofilms is a key element of the biobarrier concept applied to fractured rock. After a 43-day biostimulation with molasses for the biofilm growth (phase I), the effects of a 179-day starvation on the stability of the biofilm (phase II) were investigated in a single-fractured limestone apparatus equipped to detect small changes in hydraulic conductivity (K) (cm min^{-1}). The K in the central fracture section (K_f) was reduced by 3.2 logs during phase I and by a further 0.2 log during phase II, leading to an overall 3.4-log reduction for the 222-day experiment. However, despite this decreasing trend, K_f increased by 1.3 logs between days 167 to 222 of phase II. Accumulation of rod- and filamentous-shaped bacteria as well as precipitated calcite were observed and thought to account for the decrease in K_f. Even though filaments possibly enhanced the stability of the developing biofilm, increases in K_f became more frequent after 100 days of operation. This decrease in stability was presumably related to sloughing events, which were in turn attributed to a combination of processes, including chemical changes, biofilm ageing, and decreasing fluid shear. This study indicates that biofilms developed in fractures can persist for extended periods at reduced and stable K when exposed to starvation despite an increasing risk of loss in stability with time.

Keywords: biobarrier, clogging, fractured rock, groundwater, stability

4.2.2 Nomenclature

a	fracture hydraulic aperture, cm
A	mean cross-sectional area of flow across fracture, cm^2
D_h	mean fracture hydraulic diameter, cm
DO	dissolved oxygen concentration, mg L^{-1}
e	biofilm thickness, µm
Eh	oxydoreduction potential referred to the hydrogen scale, mV
EPS	extracellular polymeric substances
ID	inside diameter, mm
K	hydraulic conductivity, cm min^{-1}
L	fracture length, cm
l	distance between piezometers, cm
OD	outside diameter, mm
ORP	oxydoreduction potential, mV
p	probability value (p-value)
Q	effluent flowrate, mL min^{-1}
r_p	Pearson's correlation coefficient
Re	Reynolds number
SD	standard deviation
v_f	water velocity in fracture, cm min^{-1}

Greek letters

β	fracture width, cm
Δh	head loss, cm
ν	kinematic viscosity, $m^2\ s^{-1}$

Subcripts

uf	fracture upstream
f	fracture central section
df	fracture downstream
0	initial condition

4.2.3 Introduction

Contaminated fractured media are technically challenging and presently cost-prohibitive to remediate due to their complex geometry and complex fluid flow as well as the potential for contaminants to persist within fractures and diffuse into the rock matrix (Steimle, 2002). Biobarriers have been recently considered as a promising remedial approach for fractured aquifers (Ross and Bickerton, 2002; Hiebert *et al.*, 2001). Biobarriers may offer several advantages over conventional remediation technologies including no need for excavation, low maintenance costs, and environmental sustainability (Hiebert *et al.*, 2001).

The biobarrier concept is based on the use of biofilms to fill voids in permeable geologic formations and form biofilm barriers (Ross and Bickerton, 2002). Biofilms are structured sessile communities of microbial cells enmeshed in a self-produced and highly hydrated matrix of extracellular polymeric substances (EPS) (Allison, 2003). The EPS are responsible for important biofilm functions, including cellular cohesion and surface adhesion, nutrient sequestration, and mechanical stability (Flemming, 2002). Mechanical stability is of utmost significance to the hydrodynamic behaviour and performance of biofilms in biotechnological processes (Zhang and Bishop, 2003; Picioreanu *et al.*, 2001) since it determines the capacity of biofilms to maintain their structure (Flemming, 2002) and therefore persist for extended periods of time.

The clogging of voids with biofilms in geologic media leads to a significant reduction in hydraulic conductivity (K) (Baveye *et al.*, 1998). The reduction in K may be due to one or a combination of the following factors: (1) accumulation of live and/or dead bacterial cells, (2) bacterial production of EPS, (3) chemically- or microbiologically- mediated precipitation, (4) retention of organic or inorganic matter, (5) entrapment of poorly soluble gases generated by denitrifiers or methanogens, and (6) soil swelling (Baveye *et al.*, 1998). The decrease in K induced by biobarriers can be used favourably in horizontal liners to contain hazardous wastes or in vertical cutoff walls to constrain contaminant plume migration (Ross and Bickerton, 2002).

At laboratory-scale, Ross *et al.* (2001) observed that clogging of a single limestone fracture by continuous biostimulation of groundwater microbes with

molasses led to a two order of magnitude decrease in *K* in 22 days. In another study, Hill and Sleep (2002) have reported a 1.5 orders of magnitude reduction in *K* after 6 days of biostimulation of soil microorganisms with glucose and O_2 in a 21 cm wide by 28 cm long glass parallel plate fracture roughened by sandblasting.

To date, the investigation of the long-term stability to starvation of biobarriers in fractured media has yet to be performed (Ross and Bickerton, 2002). The objectives of this study were (1) to test a modified single-fracture apparatus, previously used to measure bioclogging with groundwater indigenous microorganisms (Ross *et al.*, 2001) and (2) to document the long-term stability of a starved biofilm over a six-month period after stopping the biostimulation with nutrients.

4.2.4 Methodology

4.2.4.1 Experimental set-up and groundwater

The experimental set-up consisted in a horizontal single-fractured limestone apparatus (Ross *et al.*, 2001) slightly modified to enlarge the fracture aperture and width (Table 4.1 and Fig. 4.1). Four vertical piezometers made of flexible Teflon tubing (3-mm ID, 250 cm-long) were installed along the apparatus to measure hydraulic head changes (Fig. 4.1). The volume available for bioclogging was found to be, upon dismantling of the apparatus, more than four times larger than the volume of the fracture (Table 4.1) as the gap between the fracture edges and the upper and the lower limestone blocks was not completely filled with the silicone used to seal the two blocks.

A synthetic groundwater was used to feed the limestone apparatus to prevent variations in the chemical composition of the influent groundwater. The composition of the synthetic groundwater, based on chemical analyses of a natural groundwater collected from a 18 m-deep horizontal shale fracture in Mississauga, Ontario (Ross and Bickerton, 2002), was (mg L^{-1}): $NaHCO_3$ (497.3), $MgSO_4$ (99.1), NaCl (179.9), $CaCl_2$ (174.2), KCl (28.6), $FeCl_2.3H_2O$ (0.6), $Na_2HPO_4.7H_2O$ (0.2), and $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ (0.1) (pH = 8.39 ± 0.03).

The natural groundwater was also used to provide microbial inocula. The microorganisms were concentrated via a double centrifugation (20 min at 6000 g followed by 10 min at 2800 g) and stored in 15% (v/v) glycerol at –80°C before use. The inocula were prepared from thawed frozen microorganisms resuspended in sterile groundwater, and adjusted to a final cell density of 10^4 viable cells mL^{-1} approximately.

Table 4.1 Summary of operating conditions, fracture specifications and hydrodynamic characterization

Parameter	Value
Fracture characterization	
Initial hydraulic aperture, a_0 (cm)	0.155
Width, β (cm)	0.45
Length, L (cm)	49.8
Volume (cm^3)	2.6
Characterization of space available for bioclogging (fracture & space around and above fracture)	
Volume (cm^3)	11.4
Wetted surface coverage (cm^2)	296
Mean cross-sectional area, A (cm^2)	0.217
Mean hydraulic diameter, D_h (cm)	0.245
Temperature (°C)	
Cold room	10
Groundwater	8
Hydraulic results	
Initial effluent flowrate, Q_0 ($mL\ min^{-1}$)	4.59
R_e	
Day 0 ($v_{f\,max}$ = 20.8 cm min^{-1})	6.10
Day 155 ($v_{f\,min}$ = 8.3 x 10^{-3} cm min^{-1})	2.4 x 10^{-3}
Initial C source loading rate (mgC mL^{-1} min^{-1})†	1.04 x 10^{-3}

†182 mgC g^{-1} molasses

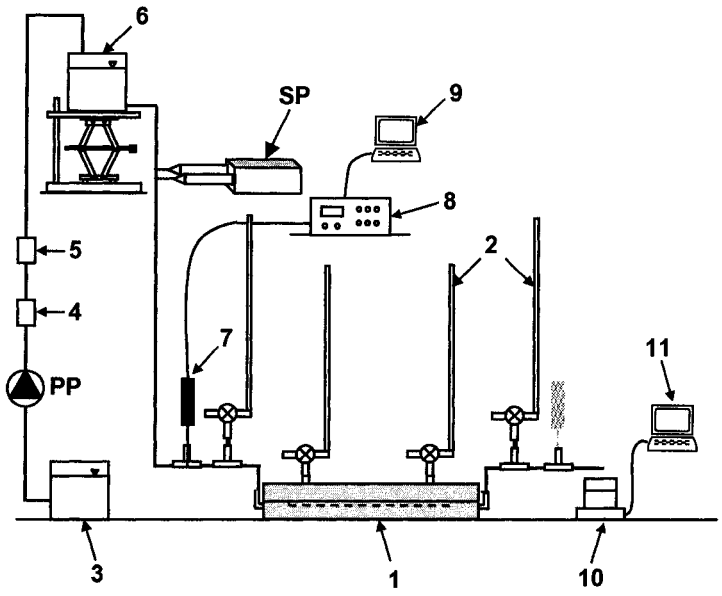


Figure 4.1 Set-up used for the fracture bioclogging experiment (not to scale): (1) fractured limestone apparatus; (2) piezometers; (3) 19-liter groundwater feed-tank; (4) 0.45-µm filter; (5) 0.22-µm filter; (6) 19-liter groundwater surge tank; (7) needle-shaped DO microelectrode; (8) chemical microsensor; (9) DO levels data acquisition; (10) effluent sampling and flowrate monitoring; (11) effluent flowrate data acquisition; PP: peristaltic pump; SP: syringe pump.

4.2.4.2 Experimental phases and analyses

The experimental set-up was maintained in a dark, 10°C cold room to simulate Eastern Canadian groundwater temperatures, which usually range between 5°C (Simard and Des Rosiers, 1980) and 11°C (Zanini *et al.*, 2000). After a two-day saturation with groundwater (flowrate of 6 mL min^{-1}), a two-phase experiment was undertaken, consisting in a biostimulation phase with nutrients to initiate the biofilm growth (phase I: days 0 to 43) followed by a starvation phase to measure the biofilm persistence by interrupting the biostimulation (phase II: days 44 to 222). The entire experimental set-up, with the exception of the limestone apparatus, was autoclaved (121°C, 103.4 kPa, 20 min.).

During the biostimulation phase (days 0 to 43), the inocula and nutrient solution were pumped individually in the influent using a syringe-pump (Sage™ M365, Thermo

Orion, Beverly, MA; initial flowrate: 0.079 mL min^{-1} adjusted proportionally with the decreasing effluent flowrate) (Fig. 4.1). The nutrient solution consisted in a 0.22 µm-filtered solution of (mg L^{-1}): blackstrap molasses (813) (Nutrimax, Lifemax Inc., Pickering, ON) and urea (27.8) (Anachemia, Richmond, BC), with molasses as the main C source (Table 4.1) and urea as the N source. The biostimulation was interrupted (starvation phase, days 44 to 222) when K_f was reduced by more than two orders of magnitude.

The K in the upstream (K_{uf}), K in the central (K_f), and K in the downstream (K_{df}) sections of the fracture were calculated using Darcy's law (Singhal and Gupta, 1999)

$$K = \frac{Ql}{A(\Delta h)} \tag{1}$$

where K is the hydraulic conductivity (cm min^{-1}), Q is the effluent flowrate (Q_0 = 4.59 mL min^{-1}), A is the mean cross-sectional area (cm^2) (Table 4.1), Δh is the head loss, and l is the distance between the piezometers for the investigated section (cm). The hydraulic heads were measured daily while the effluent flowrates were monitored on line gravimetrically using a data acquisition software program (Labview™, National Instruments, Austin, TX) (Fig. 4.1).

The ratio K/K_0 was used as an indicator of clogging. The initial K_{uf}, K_f, and K_{df} were 2073.3, 2225.3, and 1360.6 cm min^{-1} respectively, which are values commonly found in karstified carbonate rocks (Banton and Bangoy, 1997). The corresponding decrease in hydraulic apertures (a) across the fracture was estimated using a relationship combining the cubic law and Darcy's law (Singhal and Gupta, 1999)

$$\frac{a}{a_0} = \sqrt{\frac{K}{K_0}} \tag{2}$$

where a_0 is the initial fracture a (cm) (Table 4.1). The biofilm thickness in the upstream (e_{uf}), central (e_f), and downstream (e_{df}) sections was estimated by subtracting a_{uf}, a_f, and a_{df} values from a_0 respectively.

Darcy's law and the cubic law are valid for laminar flow, which occurs for R_e < 100 in fractures (Singhal and Gupta, 1999). The Reynolds number (R_e) in the fracture is given by (Singhal and Gupta, 1999):

$$Re = \frac{v_f D_h}{\nu} \quad (3)$$

where v_f is the water velocity in the fracture ($v_f = K_f(\Delta h)/l$) (cm min^{-1}), D_h is the mean fracture hydraulic diameter (cm) (Table 4.1), and ν is the water kinematic viscosity (~ 1.391 x 10^{-6} m^2 s^{-1}, 8°C).

Physicochemical, geochemical, and microbiological analyses were carried out on influent and effluent groundwater throughout the two-phase experiment while analyses were conducted on the biofilm at the end once the fractured-apparatus was dismantled (day 222) (Table 4.2). Bacterial counts from the effluent and from the biofilm were expressed as the arithmetic mean ± the standard deviation (SD). The dissolved oxygen (DO) levels were measured in situ upstream from the fracture inlet and in the effluent through a needle-shaped O_2 microelectrode (8 cm-long, 0.89 mm-OD, #768-20R, Diamond General, Ann Arbor, MI) coupled to a microsensor (#1201, Diamond General) and protected from electrical interferences by a Faraday cage. The DO levels were recorded on line using a data acquisition software program (Labview™, National Instruments, Austin, TX) (Fig. 4.1 & Table 4.2). The major correlations between variables were identified using Pearson's product momentum correlation coefficients (r_p) using Statistica (Statsoft, Tulsa, OK) ($p < 0.05$).

The dismantling of the fractured apparatus (day 222) was conducted at 20°C in sterile conditions. Precautions were taken to keep the biofilm intact while opening the fracture. Biomass samples (10 to 700 mg) were collected at 3-cm increments along the fracture and stored at –20°C. Some biofilm samples were analysed for dry mass (%) after heating for 24 h at 105°C, Ca^{2+} content using atomic absorption spectrometry (#3111-B, APHA *et al.*, 1998), and total and viable counts using epifluorescence microscopy (Ross *et al.*, 2001). The bacterial counts were performed on a dilution of a 30-mg biofilm sample vortexed 1 minute with 1 mL of sterilized saline solution (0.85% NaCl).

Table 4.2 Physicochemical, geochemical, and microbiological analyses on influent & effluent groundwater

Parameter	Analytical method/Reference	Frequency	Tested media
pH	[1]	Days 0-70: daily Days 71-222: weekly	Influent, Effluent
DO	In situ measurement with a DO microelectrode	On line throughout experiment	Inlet, Effluent
ORP	Measurement with Accumet electrode & conversion to Eh by adding 215 mV[3]	Idem as for pH	Effluent
TOC	Ion chromatography #5310 C[2]	Phase I: 1-15 days intervals Phase II: monthly/ bimonthly	
TKN & ammonia	Colorimetric method #4500-NH_3 G[2]		
Total phosphorus	In-line UV/persulfate digestion #4500-P I[2]		
Nitrates/Nitrites/Sulfates	Ion chromatography #4110 C[2]		
HCO_3^-	Titration method #2320 B[2]		
Fe^{2+}	Colorimetric method #3500-Fe D[2]		
$Fe^{3+}/Mg^{2+}/Ca^{2+}$	Flame atomic absorption spectrometry #3111 B[2]		
Enumeration of microorganisms	Direct bacterial viability by epifluorescence microscopy[1]	Days 0-75: daily Days 76-222: weekly/biweekly	Effluent
Microscopical observation for contamination	As above	Weekly/biweekly throughout experiment	Influent
EPS	Quantification on thawed frozen effluent samples using a dry weight-based method[1]	Phase I: 1-6 days intervals Days 44-70: 1-10 days intervals Days 71-222: none	Effluent
Carbohydrates	Measurement on the filtrate recovered from the EPS extraction using a colorimetric method[†] and 10-cm long spectrophotometer cells		

[1]Ross *et al.* (2001); [2]APHA *et al.* (1998); [3]4M KCl Ag/AgCl reference electrode at 8°C

4.2.5 Results

4.2.5.1 Changes in hydraulic conductivity and fracture aperture

During the biostimulation phase (phase I), K_{uf} started to decrease sharply by day 1 ($K_{uf}/K_{uf(0)}$ = 85.9%) and K_f by day 14 ($K_f/K_{f(0)}$ = 82.1%), while K_{df} declined from day 33 ($K_{df}/K_{df(0)}$ = 87.2%) (Fig. 4.2A). The overall reductions in K_{uf}, K_f, and K_{df} reached 99.7%, 99.9%, and 89.1% respectively after 43 days. These corresponded to a_{uf}, a_f, and a_{df} values of approximately 80 μm, 40 μm, and 510 μm (Fig. 4.2B) translating to estimated biofilm thicknesses of 1470 μm, 1510 μm, and 1040 μm respectively for the fracture upstream, the central section, and the fracture downstream (data not shown).

During the starvation phase (phase II), K_{uf}, K_f, and K_{df} continued to decrease, and were reduced by 84.6%, 33.9%, and 97.6% respectively between days 44 and 222. The changes in K indicated three distinct phases (Fig. 4.2A). During phase IIa (days 44 to 93), the shifts in K were generally slight and stable. During phase IIb (days 94 to 154), wide fluctuations in effluent flowrates and hydraulic heads occurred intermittently. From day 114, K_{uf} rose significantly while K_f and K_{df} decreased concomitantly. In phase IIc (days 155 to 222), very low flowrate and K_f and K_{df} values were measured between days 155 and 167. The lowest flowrate (0.04% of Q_0) occurred in day 155 while the highest reduction in K_f (4.6 orders of magnitude), which corresponded to a 99.5% reduction in a_f and an approximate e_f of 1540 μm, was measured in day 167. Following this, despite instabilities, K_f, K_{uf}, and K_{df} had a rising trend, which led to overall increases of 1.17, 0.64, and 1.56 orders of magnitude respectively during phase IIc.

At the end of the experiment, K_f and a_f were reduced by approximately 99.95% and 97.3% respectively, while e_f was estimated at 1515 μm. These values were obtained after circulation of a total groundwater volume of 190 L in the fracture, corresponding to 16 565 fracture volumes and 3.1 L of nutritive solution.

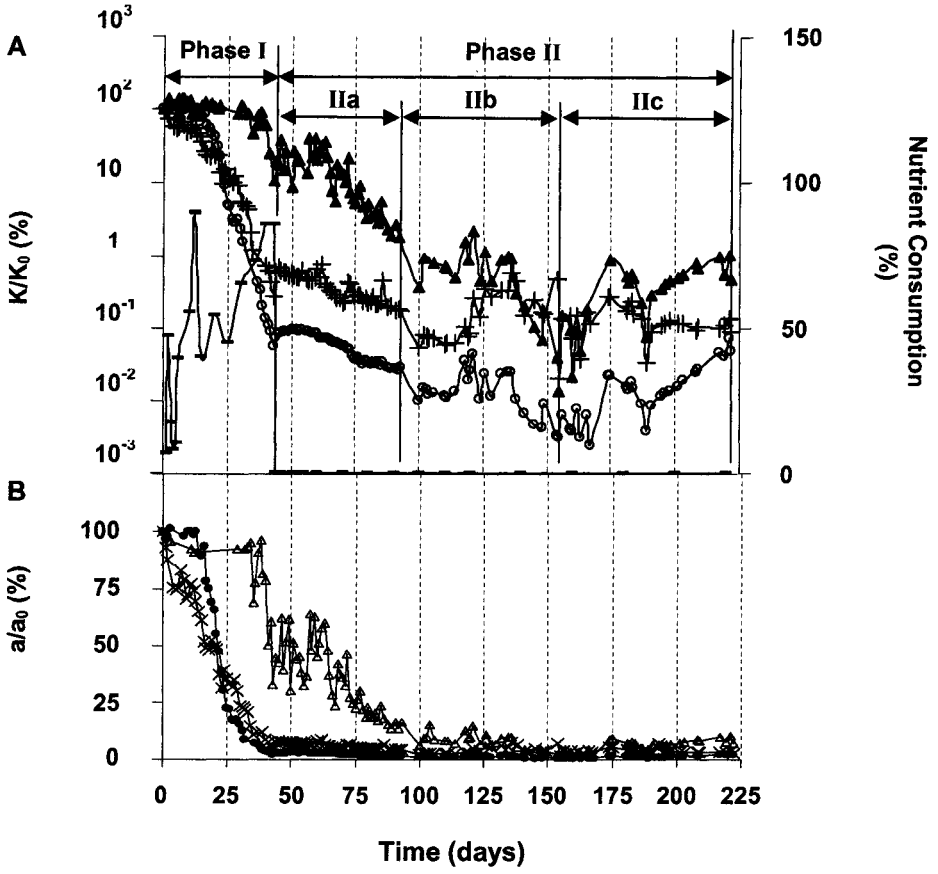


Figure 4.2 Changes in K, nutrient consumption and hydraulic apertures
A: Conductivity K_f (○), K_{uf} (+), K_{df} (▲); Nutrient consumption (−);
B: Hydraulic apertures a_f (●), a_{uf} (×), a_{df} (△)

4.2.5.2 Influent & effluent physicochemical and microbiological analyses

During days 0 to 16, the effluent microbial population grew exponentially as it augmented by 10^4 folds (Fig. 4.3A). Following this, the effluent viable counts fluctuated around $(2.6 \pm 1.2) \times 10^6$ cells mL^{-1} for the remainder of phase I and around $(1.8 \pm 1.5) \times 10^6$ cells mL^{-1} during phase II.

During phase I, the biostimulation induced a sharp decrease in DO concentrations upstream from the fracture inlet and in the effluent (Fig. 4.3B), although measurable levels (> 0.3 mg L^{-1}) were maintained. Despite abrupt drops, which occurred between days 2 to 5 and days 12 to 25 (Fig. 4.2A & 4.3A), the nutrient

consumption increased overall, but never reached more than 90%, suggesting that injected nutrients were probably not entirely utilized in the fracture.

Immediately after the biostimulation was stopped (days 44 to 54), the DO levels upstream from the fracture inlet and in the effluent increased by more than 2 mg L^{-1} (Fig. 4.3B). Following this, the levels decreased during phase IIb and increased during phase IIc. The DO consumption increased gradually from the start to reach a peak (2.4 mg L^{-1}) by mid-phase IIb, and then decreased down to around 1.8 mg L^{-1} during phase IIc.

Since the EPS concentration was not measurable in the effluent during days 0 to 70 (data not shown), it was decided not measure it from day 71 onwards. With the exception of Ca^{2+}, no changes in effluent geochemistry were noted over time. Changes in Ca^{2+} concentrations, however, stayed relatively modest through the course of the experiment, as effluent Ca^{2+} levels fluctuated by no more than 25% of the initial influent Ca^{2+} level (Fig. 4.3D).

Throughout the experiment, significant morphological changes in effluent cells were observed via microscopical examinations (Fig. 4.4A to 4.4C). For the first 20 days, the effluent cells appeared as short rod-shaped bacteria (Fig. 4.4A). From day 20, multicompartmented filamentous-like rods up to ten times the length of an average cell started to be observed (Fig. 4.4B). From days 79 to 145, the effluent total microbial population increased by 1.1 logs, while cells appeared mostly as small cocci (Fig. 4.4C) with filamentous cells becoming less prominent. Conversely, during phase IIc (days 155 to 222), effluent bacteria seemed to progressively increase in cell size and transit from coccus to rod morphology.

4.2.5.3 Biofilm characterization upon apparatus dismantling

The dismantling of the apparatus showed that most of the surface available for bioclogging was covered with biomass, despite heterogeneous surface colonization in the extremities. The Ca^{2+} content and total and viable cell densities were estimated at 1.1 mg g^{-1} dry weight and $(1.2 \pm 0.3) \times 10^8$ and $(5.0 \pm 1.8) \times 10^7$ cells mL^{-1} respectively.

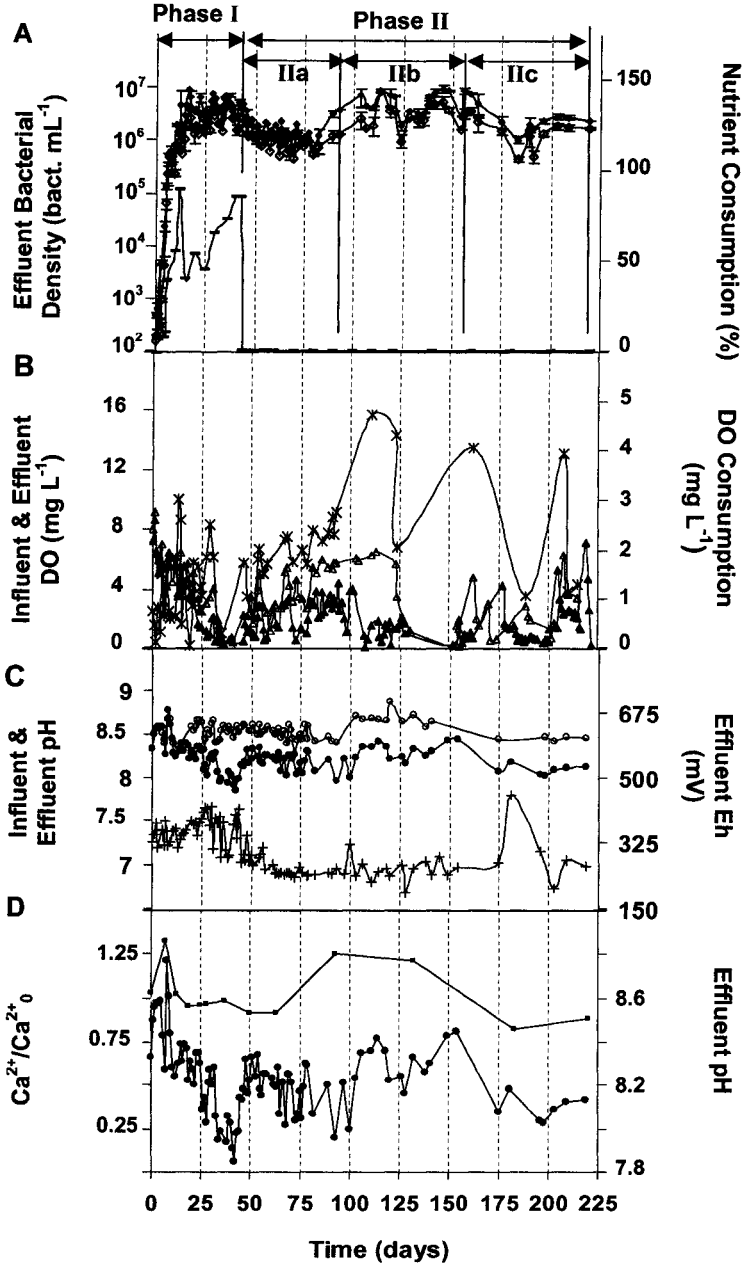


Figure 4.3 Changes in effluent bacterial density, nutrient consumption, DO upstream from the fracture inlet and in the effluent, DO consumption, influent and effluent pH, effluent Eh, effluent Ca^{2+} concentration and effluent pH

- **A:** Effluent total (◆) and viable (◇) bacterial density & nutrient consumption (—)
- **B:** DO upstream from the fracture inlet (△) and in the effluent (▲), and DO consumption (ж)
- **C:** Influent pH (○), effluent pH (●) and effluent Eh (+)
- **D:** Effluent Ca^{2+} concentration (■) and effluent pH (●)

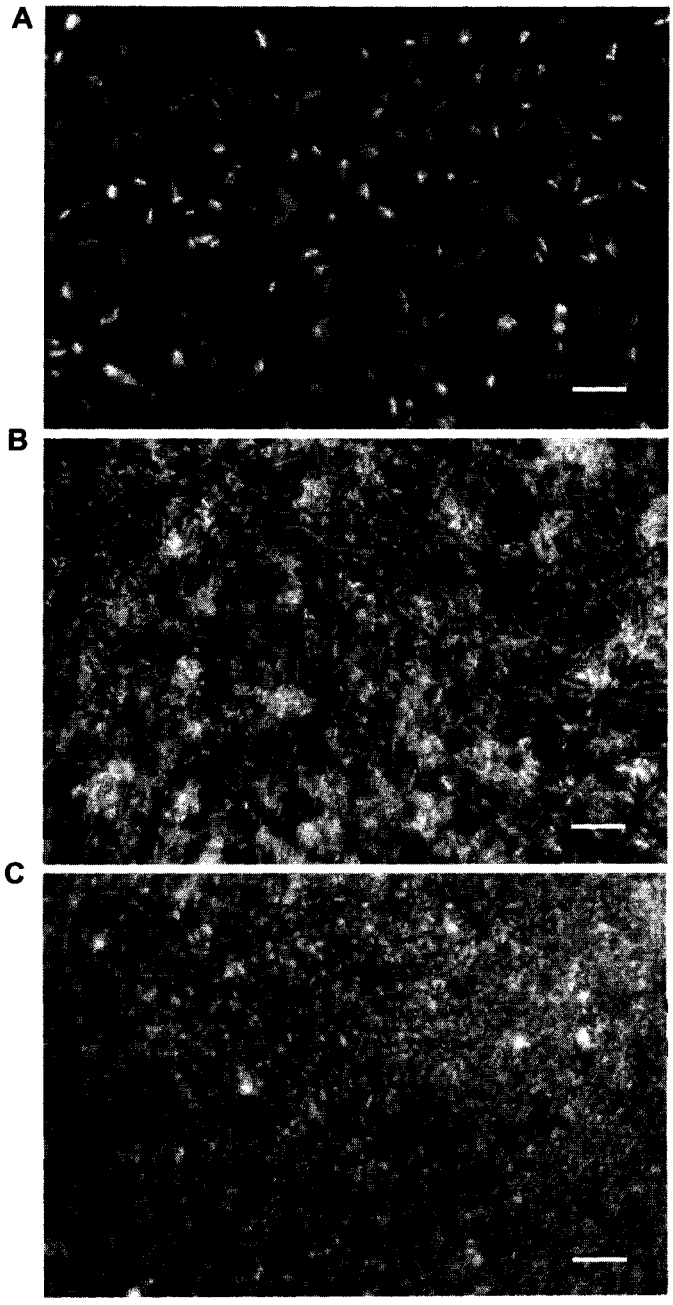


Figure 4.4 Epifluorescence photomicrographs of stained effluent samples

A: 50-mL sampled on day 7 (phase I) showing viable (green) and non-viable (red) rods
B: 20-mL (day 20, phase I) showing enlarged rods and bacterial filaments
C: 40-mL (day 118, phase IIb) showing coccoid-shaped cells. Bar = 10 μm.

4.2.6 Discussion

The overall increase in effluent bacterial density in conjunction with the rise in nutrient and DO consumption measured during the biostimulation phase (Fig. 4.3A & 4.3B) confirmed bacterial activities in the fracture. In nutrient-rich environments, bacterial adhesion to surfaces, though a random process, usually predominates planktonic growth (Costerton *et al.*, 1995). Moreover, since limestones display a higher bacterial adhesion efficiency than other common geologic materials partly due to the bridging between the rock surface cations (Ca^{2+}) and the negative charge of most bacterial cells (Teixeira and Oliveira, 1998), it was assumed that the biostimulation triggered cellular adhesion to the limestone surfaces. As adhered bacteria consumed nutrients, grew, and initiated the formation of a biofilm through attached cell replication, some cells were continuously detached from the biofilm and collected in the effluent.

Even though EPS are very often involved in the decrease in K of porous media (Baveye *et al.*, 1998) and fractured media (Ross *et al.*, 2001), it is believed that in the present study the clogging of the fracture resulted mainly from the accumulation of bacterial cells and chemical precipitates. The role played by bacterial cells in the K reduction during the biostimulation phase was supported by the increase in effluent total and viable bacterial counts, which correlated with the drop in K_{uf} or K_f ($r_{p(uf)\ total}$ = -0.6206, $r_{p(f)\ total}$ = -0.4952 & $r_{p(uf)\ viable}$ = -0.6748, $r_{p(f)\ viable}$ = -0.6238; $p < 0.001$). The EPS were thought not to be involved in the reduction in K in the fracture, as they were non-quantifiable in the effluent. Plausible explanations for this observation could be that the dominant biofilm-forming bacterial strains were not EPS producers or that the influent C/N mass ratio (~ 45) was too low to trigger EPS production, since some bacteria need to be exposed to severe N limitation (i.e. very high C/N ratios) to produce EPS (Vandevivere and Baveye, 1992). Indeed, Vandevivere and Baveye (1992) found that secretion of EPS in sand-filled permeameters inoculated with aerobic Arthrobacter fed on glucose was obtained when the influent C/N ratio was raised from 39 to 77, but that the presence of EPS in the media was not necessary to induce severe clogging.

In addition, the precipitation of Ca^{2+} as calcite in the fracture was suggested by the 28% and 32% decreases in effluent Ca^{2+} levels, which were measured during days 7 to 19 and 132 to 183 respectively (Fig. 4.3D). Calcite precipitation could have been triggered by an increase in pH (e.g. 0.5 unit rise during days 100 to 154) or the high Na^+ content of influent groundwater (Na^+/Ca^{2+} molar ratio ~ 5.7). Raising the pH can indeed induce calcite precipitation (Fujita *et al.*, 2000) while high Na^+ levels may stimulate the release of Ca^{2+} from geological materials and its further re-precipitation as calcite (Todd, 1980). The measurable Ca^{2+} concentration (1.1 mg g^{-1}) detected in the biofilm provided an additional indication that calcite precipitation in the fracture may have occurred and been involved in the clogging process. Previous research has shown that changes in Ca^{2+} concentrations in geological media could be partly responsible for significant changes in *K* (Rinck-Pfeiffer *et al.*, 2000).

This 222-day experiment demonstrated that the fractured apparatus biofilm maintained a good stability for 93 days, which included 50 days of starvation. The stability seemed to be disturbed by temporary and slight recoveries in *K* (up to 0.5 log) during phase IIb but more important recoveries (up to 1.7 logs) during phase IIc. Sloughing, which consists in the incidental and localized detachment of massive portions of biofilm (Picioreanu *et al.*, 2001), was suspected as the main process responsible for these losses in stability. Sloughing is usually triggered by a loss in biofilm adhesive and cohesive strength, which in turn can result from various biotic and abiotic processes among which chemical changes, biofilm ageing, starvation, and decreasing fluid shear stress (Applegate and Bryers, 1991) are the most relevant in this study.

The accumulation of Ca^{2+} is a major chemical factor which can affect the biofilm susceptibility to sloughing (Applegate and Bryers, 1991). The Ca^{2+} can have a dual effect on the mechanical stability of biofilms since calcium precipitates can increase the biofilm cohesiveness (Flemming *et al.*, 2000) and resistance to erosion (Huang and Pinder, 1995) but conversely can cause massive sloughing if suddenly released from the structure (Applegate and Bryers, 1991). If calcite precipitation probably occurred during days 7 to 19 and 132 to 183 of this study, conversely, the 35% increase in effluent Ca^{2+} levels measured between days 63 and 93 and the

concomitant 0.2 unit decrease in pH (Fig. 4.3D) indicated that calcite dissolution could have occurred and destabilized the biofilm structure during this period.

It has been shown that biofilm ageing and the concomitant increase in thickness and physiological and physicochemical heterogeneities could destabilize the biofilm structure and lead to sloughing (McBain *et al.*, 2000). Therefore, it was not surprising to observe that the biofilm was relatively old (~100 days) and thick (> 1400 μm) (Costerton *et al.*, 1995) when the first major sloughing event occurred.

The occurrence of important DO gradients is frequent in fast growing biofilms and appears to be correlated with the formation of heterogeneous porous biofilm structures, which in turn usually manifest an increased susceptibility to sloughing (McBain *et al.*, 2000). In the present study, some substantial heterogeneities in the spatial distribution in DO were suspected to have formed during the early development of the biofilm. The temporal profiles in DO showed that DO concentrations were up to nine folds greater upstream from the fracture inlet than in the effluent during the biostimulation phase (Fig. 4.3B), indicating that spatial gradients in DO were present in the biofilm. These gradients in DO concentration may have favoured the production of biomass by aerobic bacteria in the inlet section of the fracture and a non-uniform distribution of biomass throughout the fracture, which was reflected by sharp discrepancies between the reduction in K_{uf}, K_f, and K_{df} during phase I (Fig. 4.2A).

Moreover, the presence of a correlation between the decline in K_{uf} or K_f and the rise in DO consumption ($r_{p(uf)}$ = -0.4937 & $r_{p(f)}$ = -0.4749; p = 0.001) in conjunction with the absence of significant correlation between K_{df} and the DO uptake provided an additional indication that preferential clogging probably occurred in the inlet section of the fracture. Similar localized clogging patterns have been reported in previous works carried on porous media (Sanchez de Lozada *et al.*, 1994; Vandevivere and Baveye, 1992). In addition, the strong correlation between the sharp reduction in a_{uf} (Fig. 4.2B) and the decrease in effluent DO (Fig. 4.3B) (r_p = 0.3608; p = 0.016) in phase I suggested that the increase in biofilm thickness in the inlet may have led to a reduction in the DO transport in the fracture downstream. Previous studies have indeed shown that the diffusion of low molecular weight substrates such as O_2 or glucose was in

average 10% lower through biofilms than through pure water (de Beer *et al.*, 1997), but could be reduced by up to 90% through biofilm flocs (Stewart, 1998). These observations on the interrelationships between the distribution of DO and biomass illustrated previous findings which showed that the local availability of substrates (DO and nutrients) within a medium usually influences the spatial distribution of biomass, and that, reciprocally, the biomass distribution can affect the further mass transfer of these substrates (Picioreanu *et al.*, 2000).

In this work, the development of strong spatial nutrient gradients in the biofilm was inferred from the temporal fluctuations in nutrient consumption observed during the biostimulation phase (Fig. 4.2A) and, similarly to DO, these gradients were thought to have contributed to increase the biofilm susceptibility to sloughing. Indeed, the decrease in nutrient consumption measured between days 2 to 5 and days 12 to 25 corresponded to concomitant 15% and 77% increases in biofilm thickness in the inlet and central sections of the fracture respectively. This suggests that an increase in thickness at specific locations along the fracture limited the penetration of nutrients to the superficial layers of the biofilm, in turn triggering nutrient depletion at microbial activity sites and in the biofilm depths. Furthermore, plausible explanations for the increase in nutrient consumption measured after day 25 (Fig. 4.2A) could be either that, as the biostimulation phase progressed, the biofilm evolved towards a heterogeneous structure containing channels which enhanced the nutrient supply to the surrounding cells (Picioreanu *et al.*, 2000) or that bacteria became more efficient at sequestering nutrients after a change in cellular morphology. The latter speculation was supported by the appearance of filamentous bacteria in the effluent after approximately 20 days of growth, therefore suggesting the growth of filamentous cells within the biofilm, and by the fact that some bacterial strains elongate or form filaments to adapt to low O_2 (Jensen and Woolfolk, 1985) or nutrient (Steinberger *et al.*, 2002) environments. If physicochemical heterogeneities can in the long-term alter the structural stability of biofilms (McBain *et al.*, 2000), conversely, filamentous cells, due to their elongated morphology which provides extended surface area for strong attachment (Weiss *et al.*, 1995), may act as structural stabilizing agents (Galván *et al.*, 2000). It was therefore believed that the filamentous cells which developed in the

biofilm may have contributed to attenuate the deleterious effects of spatial nutrient and DO heterogeneities on the biofilm integrity.

Previous studies have indicated that biofilm starvation could intensify cellular decay in the biofilm depths, which in turn could weaken the biofilm structure and eventually lead to sloughing (Picioreanu *et al.*, 2001; Applegate and Bryers, 1991). In the present investigation, the effect of starvation on biofilm stability seemed to have not been immediate, as the biofilm has persisted for 57 days without nutrients before the first major sloughing occurred (day 100). At the beginning of the starvation phase (days 44 to 54), K_f increased by 28%, which appeared to be related to a retardation in cellular growth or an increase in cellular decay, as this rise in K_f correlated strongly with the decline in effluent viable and total cell numbers ($r_{p(viable)}$ = -0.8271, $p_{(viable)}$ = 0.002; $r_{p(total)}$ = -0.8809, $p_{(total)} < 0.001$). Microorganisms indeed frequently respond to short-term starvation by shifting from exponential to stationary growth (Costerton *et al.*, 1995), which in turn can considerably decrease the detachment of single cells from biofilms (Picioreanu *et al.*, 2001).

This starvation-induced increase in K was however temporary as after 11 days of starvation, K resumed decreasing for a 46-day period. This decrease could be indicative of a bacterial regrowth in the fracture as a result of cellular adaptation to nutrient deprivation. Regrowth could be attributed to the presence of alternative nutrient sources, such as residual molasses in the feed lines, biodegradable organic matter (e.g., lysed cells, biomass debris) in the biofilm or the release of substrates formerly stored in filamentous cells (Beccari *et al.*, 1998).

The hydraulic instabilities induced by starvation became visible after 50 days of nutrient deprivation (day 93). These were thought to be partly related to the decrease in size (Fig. 4.4C) and the increase in effluent cell numbers (Fig. 4.3A) which started to occur after 36 days of starvation (day 79), but lasted for the remainder of phases IIa and IIb. These morphological responses were thought to be related to fragmentation, an adaptive strategy to starvation defined as a fast cell division without growth which leads to denser populations of decreased cell volume (Mueller, 1996). Furthermore, as filamentous cells may also fragment into single cells under deprived DO (Jensen

and Woolfolk, 1985) or nutrient (Herman and Costerton, 1993) conditions, fragmentation of the biofilm filamentous cells was suspected to have occurred, possibly due to a depletion in alternative nutrient sources. Also, the latter fragmentation could have been partly responsible for the significant 1.1-log increase in effluent total cells measured between days 79 to 145. Despite a sequence of new sloughing episodes (days 114 to 154) which seemed to be triggered by the first sloughing event (day 100), *K* continued to decrease in the central and downstream fracture sections between days 136 and 154. A plausible explanation for this decrease in *K* could be that biomass previously sloughed from the fracture inlet deposited in the central and downstream sections, therefore causing flow constrictions. Alternatively, since sloughing may stimulate bacterial regrowth locally (Picioreanu *et al.*, 2001), it was believed that biomass released by sloughing could have been used as nutrient for the regrowth of cells remained attached to surfaces.

As the experiment progressed, decreasing shear stress was expected to increase the biofilm susceptibility to sloughing as exposure to low shear usually favours fast growing biofilms displaying high thickness, high porosity, and strong substrate gradients (van Loosdrecht *et al.*, 2002). A decrease in shear stress can ultimately lead to stagnation, which in turn usually triggers considerable weakening in biofilm structure (Davies, 1999). Throughout the phase IIb of this investigation, the effluent flowrate never reached more than 5% of the initial flowrate, suggesting that an extensive stagnant condition developed in the fracture. Hence, it was believed that this condition triggered the succession of the sloughing episodes observed between days 167 and 221, and which induced the 30- and 6-fold increase in K_f and K_{df} respectively (Fig. 4.2A). Similarly, in a bi-dimensional porous micromodel reduced in *K* by 14 folds after inoculation with wastewater microbial cultures and feeding with oxygenated acetate, a sudden 2-fold increase in *K* was found to correlate with a sloughing event caused by the clogging of a preferential flow channel (Dupin and McCarty, 2000).

This study suggests the importance of developing strategies to maintain the stability of biobarriers applied to fractured media. Future work should include the identification of the dominant biofilm bacterial populations and the characterization of

their temporal shifts to elucidate (1) the roles of filamentous bacteria in the bioclogging and (2) whether the dominance of coccoid-shaped cells during the starvation phase resulted from a change in morphology of a dominant bacterial strain or from the emergence of a non-dominant strain.

4.2.7 Conclusions

A single-fractured limestone apparatus used to simulate the growth and long-term stability of biofilms used for the containment of groundwater in fractured aquifers was operated for 222 days, including 43 days of biostimulation (phase I) and 179 days of persistence to starvation (phase II).

The main conclusions of this study are that:

1. During the 43-day biostimulation phase, K_f decreased by 3.2 logs, presumably due to the accumulation of short and filamentous rod-shaped bacteria and calcite precipitation. The EPS were not detected in the effluent and thought not to be involved in the clogging process.
2. The biofilm maintained a good stability for the first 50 days of the starvation phase, which was followed by a further 61-day starvation period characterized by sporadic and moderate hydraulic instabilities attributed to sloughing events. Despite these instabilities, the decrease in K_f reached a maximum of 1.5 logs during the starvation phase.
3. Even though significant hydraulic instabilities attributed to frequent biomass sloughing induced a 1.3-log recovery in K_f during the last 55 days of the experiment, the reduction in K_f reached 3.4 logs over the 222-day experiment.
4. It was believed that biofilm sloughing was the main factor responsible for the decrease in biofilm stability measured during the starvation phase. Sloughing was presumably intensified by a combination of processes, including morphological and physicochemical changes, biofilm ageing, starvation, and decreasing fluid shear. However, the adverse effects of these processes may have been attenuated by bacterial filamentation, accumulation of Ca^{2+}, and bacterial regrowth.

This laboratory-scale study provides a preliminary perspective of the decrease in stability of a fractured-apparatus biofilm exposed to reduced flow conditions and a 179-day starvation period and, when extrapolated to field conditions, indicates that biobarriers used for remediation purposes in fractured media may in the long-term require maintenance feeding to sustain the expected clogging level.

4.2.8 Acknowledgements

The authors would like to thank Petro Canada Lubricants (Mississauga, Ontario) for giving access to their site for groundwater sampling. They acknowledge the financial support from the Industrial Chair partners: Alcan Aluminium Ltd., Bell Canada, Cambior, Canadian Pacific Railways, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ), City of Montreal, Ministère des Affaires Municipales et de la Métropole, Gaz de France/Électricité de France (GdF/EdF), Hydro-Quebec, Natural Science and Engineering Research Council (NSERC), Petro-Canada, Solvay and Total Fina Elf. The contribution of Mr. Patrice Legault and Mr. Christian Legault in polishing the limestone blocks, Mr. Daniel Dumas, Mr. Carol Painchaud, Mr. Jean Huard in assembling the apparatus, Mr. Robert Delisle in designing the real-time data acquisition systems, as well as Ms. Manon Leduc and Ms. Lucie Jean in supporting the lab-experiment was very appreciated.

4.2.9 Literature cited

Allison, D.G. (2003). The Biofilm Matrix. *Biofouling.* **19**(2): 139-150.

APHA, AWWA and WEF (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. New York, USA: American Public Health Association.

Applegate, D.H. and Bryers, J.D. (1991). Effects of Carbon and Oxygen Limitations and Calcium Concentrations on Biofilm Removal Processes. *Biotechnology and Bioengineering.* **37**(1): 17-25.

Banton, O. and Bangoy, L.M. (1997). *Hydrogeology: Environmental Multiscience of Groundwaters. (Hydrogéologie: Multiscience Environnementale des Eaux Souterraines).* Sainte-Foy, Québec: Presses de l'Université du Québec. 474 pages.

Baveye, P., Vandevivere, P., Hoyle, B.L., DeLeo, P.C., Sanchez de Lozada, D. (1998). Environmental Impact and Mechanisms of the Biological Clogging of Saturated Soils and Aquifer Materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* **28**(2): 123-191.

Beccari, M., Majone, M., Massanisso, P., Ramadori, R. (1998). A Bulking Sludge with High Storage Response Selected under Intermittent Feeding. *Water Research.* **32**(11): 3403-3413.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology.* **49:** 711-745.

Davies, D.G. (1999). Regulation of Matrix Polymer in Biofilm Formation and Dispersion. In: *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*, ed. J. Wingender, T.R. Neu & H.-C. Flemming. Heidelberg, Berlin & New York: Springer-Verlag. p. 93-117.

de Beer, D., Stoodley, P., Lewandowski, Z. (1997). Measurement of Local Diffusion Coefficients in Biofilms by Microinjection and Confocal Microscopy. *Biotechnology and Bioengineering.* **53**(2): 151-158.

Dupin, H.J. and McCarty, P.L. (2000). Impact of Colony Morphologies and Disinfection on Biological Clogging in Porous Media. *Environmental Science and Technology.* **34**(8): 1513-1520.

Flemming, H.-C. (2002). Biofouling in Water Systems — Cases, Causes and Countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **59**(6): 629-640.

Flemming, H.-C., Wingender, J., Mayer, C., Körstgens, V., Borchard, W. (2000). Cohesiveness in Biofilm Matrix Polymers. In: *Community Structure and Co-operation in Biofilms*, 59th Symposium of the Society for General Microbiology, ed. D.G. Allison, P. Gilbert, H.M. Lappin-Scott and M. Wilson. Cambridge: Cambridge University Press. p. 87-105.

Fujita, Y., Ferris, F.G., Lawson, R.D., Colwell, F.S., Smith, R.W. (2000). Calcium Carbonate Precipitation by Ureolytic Subsurface Bacteria. *Geomicrobiology Journal.* **17**(4): 305-318.

Galván, A., Urbina, P., de Castro, F. (2000). Characterization of Filamentous Microorganisms in Rotating Biological Contactor Biofilms of Wastewater Treatment Plants. *Bioprocess Engineering.* **22**(3): 257-260.

Herman, D.C. and Costerton, J.W. (1993). Starvation-Survival of a p-Nitrophenol-Degrading Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology.* **59**(1): 340-343.

Hiebert, R., Sharp R., Cunningham, A., James, G. (2001). Development and Demonstration of Subsurface Biofilm Barriers Using Starved Bacterial Cultures. *Contaminated Soil, Sediment & Water.* 45-47.

Hill, D.D. and Sleep, B.E. (2002). Effects of Biofilm Growth on Flow and Transport through a Glass Parallel Plate Fracture. *Journal of Contaminant Hydrology.* **56**(3): 227-246.

Huang, J. and Pinder, K.L. (1995). Effects of Calcium on Development of Anaerobic Acidogenic Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering.* **45**(3): 212-218.

Jensen, R.H. and Woolfolk, C.A. (1985). Formation of Filaments by Pseudomonas putida. *Applied and Environmental Microbiology.* **50**(2): 364-372.

McBain, A.J., Allison, D.G., Gilbert, P. (2000). Population Dynamics in Microbial Biofilms. In: *Community Structure and Co-operation in Biofilms*, 59th Symposium of the Society for General Microbiology, ed. D.G. Allison, P. Gilbert, H.M. Lappin-Scott and M. Wilson. Cambridge: Cambridge University Press. p. 257-278.

Mueller, R.F. (1996). Bacterial Transport and Colonization in Low Nutrient Environments. *Water Research.* **30**(11): 2681-2690.

Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (2001). Two-Dimensional Model of Biofilm Detachment Caused by Internal Stress from Liquid Flow. *Biotechnology and Bioengineering.* **72**(2): 205-218.

Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (2000). Effect of Diffusive and Convective Substrate Transport on Biofilm Structure Formation: A Two-Dimensional Modeling Study. *Biotechnology and Bioengineering.* **69**(5): 504-515.

Rinck-Pfeiffer, S., Ragusa, S., Sztajnbok, P., Vandevelde, T. (2000). Interrelationships Between Biological, Chemical, and Physical Processes as an Analog to Clogging in Aquifer Storage and Recovery (ASR) Wells. *Water Research.* **34**(7): 2110-2118.

Ross, N. and Bickerton, G. (2002). Application of Biobarriers for Groundwater Containment at Fractured Bedrock Sites. *Remediation.* **12**(3): 5-21.

Ross, N., Villemur, R., Deschênes, L., Samson, R. (2001). Clogging of a Limestone Fracture by Stimulating Groundwater Microbes. *Water Research.* **35**(8): 2029-2037.

Sanchez de Lozada, D., Vandevivere, P., Baveye, P., Zinder, S. (1994). Decrease of the Hydraulic Conductivity of Sand Columns by Methanosarcina barkeri. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **10**(3): 325-333.

Simard, G. and Des Rosiers, R. (1980). *Groundwater Quality in Quebec (Qualité des eaux souterraines du Québec).* Québec: Gouvernement du Québec, Ministère de l'environnement, Service des eaux souterraines. 161 pages.

Singhal, B.B.S. and Gupta, R.P. (1999). *Applied Hydrogeology of Fractured Rocks.* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic. p. 125-150.

Steimle, R. (2002). The State of the Practice: Characterizing and Remediating Contaminated Groundwater at Fractured Rock Sites. *Remediation.* **12**(2): 23-33.

Steinberger, R.E., Allen, A.R., Hansma, H.G., Holden, P.A. (2002). Elongation Correlates with Nutrient Deprivation in Pseudomonas aeruginosa–Unsaturated Biofilms. *Microbial Ecology*. **43**(4): 416-423.

Stewart, P.S. (1998). A Review of Experimental Measurements of Effective Diffusive Permeabilities and Effective Diffusion Coefficients in Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*. **59**(3): 261-272.

Teixeira, P. and Oliveira, R. (1998). The Importance of Surface Properties in the Selection of Supports for Nitrification in Airlift Bioreactors. *Bioprocess Engineering*. **19**(2): 143-147.

Todd, D.K. (1980). *Groundwater Hydrology*, 2nd ed. New York: John Wiley. p. 305.

van Loosdrecht, M.C.M, Heijnen, J.J., Eberl, H., Kreft, J., Picioreanu, C. (2002). Mathematical Modelling of Biofilm Structures. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**(1): 245-256.

Vandevivere, P. and Baveye, P. (1992). Saturated Hydraulic Conductivity Reduction Caused by Aerobic Bacteria in Sand Columns. *Soil Science Society of America Journal*. **56**(1): 1-13.

Weiss, T.H., Mills, A.L., Hornberger, G.M., Herman, J.S. (1995). Effect of Bacterial Cell Shape on Transport of Bacteria in Porous Media. *Environmental Science and Technology*. **29**(7): 1737-1740.

Zanini, L., Novakowski, K.S., Lapcevic, P., Bickerton, G.S., Voralek, J., Talbot, C. (2000). Ground Water Flow in a Fractured Carbonate Aquifer Inferred from Combined Hydrogeological and Geochemical Measurements. *Ground Water*. **38**(3): 350-360.

Zhang, X. and Bishop, P.L. (2003). Biodegradability of Biofilm Extracellular Polymeric Substances. *Chemosphere*. **50**(1): 63-69.

CHAPITRE 5 – DISCUSSION, CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

5.1 Discussion générale

Cette étude expérimentale a comporté deux phases distinctes, soit une phase de biostimulation (phase I) et une phase de persistance (phase II), qui se sont chacune caractérisées par des processus biotiques et abiotiques spécifiques.

Pendant la phase de biostimulation, l'augmentation de la densité bactérienne dans l'effluent et la hausse concomitante de la consommation en nutriments et en oxygène qui a été mesurée dans la fracture suggèrent qu'une activité bactérienne soutenue a eu lieu dans celle-ci. Il est probable qu'après avoir consommé les nutriments avec lesquels elles ont été biostimulées, les bactéries inoculantes ont adhéré aux parois de la fracture pour s'y développer, puis initier la formation d'un biofilm par réplication cellulaire alors que des cellules se sont continuellement détachées du biofilm pour être recueillies dans l'effluent. Dans les environnements riches en nutriments, l'adhésion bactérienne aux surfaces, bien qu'étant un processus aléatoire, est généralement favorisée par rapport au mode de croissance à l'état planctonique (Costerton *et al.*, 1995). De plus, l'adhésion bactérienne est généralement plus efficace aux roches calcaires qu'elle l'est à la plupart des autres matériaux géologiques couramment rencontrés en partie en raison de l'effet de pontage qui existe entre les cations Ca^{2+} de la surface du calcaire et la surface des cellules bactériennes, généralement de charge négative (Teixeira et Oliveira, 1998).

Deux phénomènes majeurs, soit l'accumulation de cellules bactériennes et l'accumulation de composés précipités, ont été invoqués pour expliquer le colmatage de la fracture. Une relation étroite a pu être établie entre la hausse de la densité bactérienne viable ou totale de l'effluent et la baisse de K_{uf} ou de K_f pendant la phase I, suggérant que l'accumulation des cellules bactériennes vivantes ou mortes ait pu contribuer au colmatage de la fracture. La précipitation dans la fracture des ions Ca^{2+} sous forme de calcite pourrait également avoir participé au colmatage de la fracture. Ce processus de précipitation, qui a été suspecté suite à la détection de teneurs en Ca^{2+} mesurables (1.1 mg g^{-1}) dans le biofilm, pourrait expliquer les baisses des

concentrations en Ca^{2+} qui ont été mesurées dans l'effluent entre les jours 7 à 19 et 132 à 183. Cette précipitation a pu résulter de hausses momentanées de pH (Fujita *et al.*, 2000) ou encore de teneurs élevées en Na^{+} dans l'eau souterraine d'alimentation. La présence de fortes teneurs en Na^{+} dans la phase liquide peut entraîner une migration d'ions Ca^{2+} présents dans la phase solide (plaques de calcaire) vers la phase liquide, où ils peuvent être re-précipités sous forme de calcite (Todd, 1980).

Bien que les EPS soient fréquemment impliqués dans la baisse de *K* des milieux poreux (Baveye *et al.*, 1998) et fracturés (Ross *et al.*, 2001), il est possible que dans le cas de la présente étude, les EPS n'aient pas été impliqués dans le colmatage de la fracture puisqu'ils n'ont pas été quantifiés dans l'effluent. Ces teneurs en EPS non mesurables peuvent s'expliquer soit par le fait que les espèces bactériennes dominantes n'étaient pas productrices d'EPS ou encore par le fait que le ratio C/N de l'alimentation (~ 45) était trop bas pour stimuler la production d'EPS. Vandevivere et Baveye (1992) ont en effet démontré que certaines bactéries ne produisent des EPS que lorsqu'elles sont exposées à de sévères limitations en azote, mais que la production d'EPS n'est toutefois pas requise pour causer de colmatage sévère.

Cette étude a démontré que le comportement du biofilm formé dans la fracture de calcaire a été très stable pendant les 57 premiers jours de la phase de persistance. La stabilité du biofilm semblerait avoir été perturbée par des hausses faibles et temporaires de *K* (jusqu'à 0.5 log) pendant la phase IIb (jours 94 à 154) et par des hausses plus importantes (jusqu'à 1.7 logs) pendant la phase IIc (jours 155 to 222). Ces instabilités hydrauliques pourraient être principalement attribuées à des évènements fortuits et localisés de détachement de portions massives de biofilm. Le détachement massif est généralement causé par une baisse de la cohésivité du biofilm et une baisse de la force d'adhésion du biofilm au support, qui peuvent en retour résulter de divers processus biotiques et abiotiques, tels qu'une limitation en nutriments, un vieillissement du biofilm, des changements dans les conditions physico-chimiques ainsi qu'une diminution des forces de cisaillement appliquées sur le biofilm par le fluide en mouvement (Applegate et Bryers, 1991).

La famine à laquelle le biofilm a été soumis pendant la phase de persistance a pu en partie être responsable de ces épisodes de détachement massif puisque la famine accroît souvent le taux de mortalité cellulaire au sein des couches profondes des biofilms, ce qui en revanche peut en affaiblir la structure globale (Picioreanu *et al.*, 2001; Applegate et Bryers, 1991). L'effet de la famine des bactéries sur la stabilité du biofilm n'a cependant pas semblé être immédiat, étant donné que le biofilm a persisté 57 jours sans nutriments avant que le premier évènement de détachement massif majeur ne survienne (jour 100). Au début de la phase de famine (jours 44 à 54), une hausse de K_f de 28% a été attribuée à un ralentissement de la croissance cellulaire ou encore à une augmentation de la mortalité cellulaire. En effet, à court-terme, les microorganismes réagissent à la famine en transitant d'une phase de croissance exponentielle à une phase de croissance stationnaire (Costerton *et al.*, 1995). Cette hausse de K_f associée à l'arrêt de l'apport en nutriments a cependant été temporaire étant donné qu'après 11 jours de famine, K_f a poursuivi la baisse qui avait été initiée pendant la phase de biostimulation, et ce, pour une période de 46 jours. Cette reprise de la baisse de K_f pourrait être due à de la recroissance bactérienne dans la fracture, en revanche attribuable à une adaptation des cellules à des conditions de famine ou à l'utilisation par les bactéries de sources de nutriments alternatives.

Les instabilités hydrauliques causées par la famine, qui sont devenues plus évidentes suite à une période de limitation en nutriments de 57 jours, pourraient en partie être attribuables à la diminution de la taille des cellules et à l'augmentation de la densité bactérienne de l'effluent, tel qu'observé à partir du jour 79, et ce, jusqu'à la fin de la phase IIb. Il est probable que ces changements morphologiques aient été causés par la fragmentation des filaments bactériens qui se sont développés pendant la phase I. La fragmentation, un processus de division cellulaire rapide sans croissance menant à la formation de populations plus denses de cellules plus petites, est utilisée chez certaines bactéries comme stratégie d'adaptation à la famine (Mueller, 1996). Il est en effet reconnu que les cellules filamenteuses peuvent se fragmenter en plusieurs cellules individuelles sous l'effet de conditions limitantes en nutriments (Herman et Costerton, 1993) ou en oxygène (Jensen et Woolfolk, 1985).

Au cours de l'étude, le vieillissement du biofilm a aussi probablement intensifié les épisodes de détachement massif car les processus de maturation entraînent généralement un accroissement concomitant de l'épaisseur et des hétérogénéités physiologiques et physico-chimiques (ex.: oxygène, pH) des biofilms, ce qui, en revanche, peut causer une déstabilisation de la structure (McBain *et al.*, 2000). Le biofilm était en effet relativement mature (~100 jours) et épais (> 1.4 mm) (Costerton *et al.*, 1995) lorsque le premier évènement majeur de détachement massif est survenu.

Ainsi, il est fort probable que d'importants gradients dans la distribution de l'oxygène se soient formés au sein du biofilm très tôt pendant son développement dans la fracture. Les profils dans le temps de la distribution en oxygène ont par exemple indiqué que pendant la phase de biostimulation, les concentrations en oxygène étaient jusqu'à 9 fois plus élevées en amont de l'entrée de la fracture que dans l'effluent. Ceci aurait favorisé le colmatage préférentiel de la zone d'entrée de la fracture par des bactéries aérobies et donc une distribution non-uniforme de la biomasse le long de la fracture, telle que reflétée par des disparités entre les profils temporels de K_{uf}, de K_f et de K_{df} pendant la phase I.

De même, il est possible que d'importants gradients en nutriments se soient développés dans le biofilm, contribuant ainsi à augmenter la susceptibilité du biofilm au détachement massif. En effet, la baisse de la consommation en nutriments mesurée entre les jours 2 et 5 et les jours 12 à 25 a possiblement résulté des hausses concomitantes de l'épaisseur du biofilm qui ont été estimées dans les zones d'entrée et du centre de la fracture respectivement. Ceci suggère qu'une augmentation de l'épaisseur du biofilm à des endroits spécifiques le long de la fracture a pu entraîner une limitation de la pénétration des nutriments dans les couches de surface du biofilm, engendrant en retour une raréfaction des nutriments dans les sites d'activité microbienne et dans les couches les plus profondes du biofilm. Cette dernière spéculation a été supportée par l'apparition de bactéries filamenteuses dans l'effluent après approximativement 20 jours de croissance, suggérant que des cellules filamenteuses se soient développées dans le biofilm. Il est en effet reconnu que certaines souches bactériennes s'allongent ou forment des filaments pour pouvoir

s'adapter à des environnements pauvres en oxygène (Jensen and Woolfolk, 1985) ou en nutriments (Steinberger *et al.*, 2002), étant donné que la morphologie allongée des cellules filamenteuses agit en tant qu'agent structural stabilisant (Galván *et al.*, 2000) en augmentant la surface d'attachement de la bactéries au support (Weiss *et al.*, 1995). Ainsi, il est probable que les cellules filamenteuses qui se sont développées dans le biofilm aient contribué à atténuer les effets indésirables de la formation de gradients en oxygène et en nutriments sur l'intégrité du biofilm.

En revanche, les facteurs abiotiques qui ont pu avoir un effet non négligeable sur la stabilité du biofilm incluent des facteurs hydrodynamiques tel que la baisse du débit ainsi que des facteurs physico-chimiques tel que l'accumulation d'ions Ca^{2+}.

Au fur et à mesure que l'expérience a progressé dans le temps et que la force de cisaillement a diminué, une augmentation de la vulnérabilité du biofilm était anticipée étant donné que les forces de cisaillement faibles génèrent généralement des biofilms épais, poreux et instables (van Loosdrecht *et al.*, 2002). Les conditions stagnantes d'écoulement observées dans la fracture pendant la phase IIb ont ainsi pu être responsables des épisodes de détachement massif qui sont survenus entre les jours 167 et 221.

En revanche, l'accumulation d'ions Ca^{2+} dans le biofilm peut avoir eu un effet dual sur la stabilité de celui-ci puisque les précipités de calcium peuvent accroître la cohésivité (Flemming *et al.*, 2000) et la résistance à l'érosion (Huang and Pinder, 1995) des biofilms mais, à l'inverse, ils peuvent entraîner du détachement massif s'ils sont soudainement relargués de la matrice du biofilm (Applegate et Bryers, 1991). Ainsi, alors que des évènements de précipitation en calcite ont pu se produire au cours des jours 7 à 19 et 132 à 183, inversement, la hausse des teneurs en Ca^{2+} mesurée dans l'effluent (jours 63 à 93) et la baisse concomitante de 0.2 unité de pH suggèrent qu'il est probable qu'une dissolution de calcite se soit produite pendant cette période, et ait entraîné une déstabilisation de la structure du biofilm.

5.2 Conclusions

Les deux objectifs principaux de ce projet de recherche ont été rencontrés. Dans un premier temps, le colmatage d'une fracture dans un montage de roc de calcaire a été réalisé avec succès grâce à un apport continu en bactéries indigènes d'une eau souterraine et à la biostimulation de celles-ci. Dans un deuxième temps, l'effet d'un arrêt de la biostimulation sur la stabilité à long terme du biocolmatage induit a été quantifié.

Afin de répondre à ces objectifs, l'essai s'est déroulé sur une période totale d'un peu plus de sept mois (222 jours). La première phase de l'essai (43 jours) a consisté en la biostimulation de populations bactériennes avec une solution nutritive à base de mélasse tandis que la deuxième phase (179 jours) s'est produite en l'absence d'inoculation et de biostimulation.

La biostimulation a entraîné une baisse immédiate de la conductivité hydraulique dans la fracture, causant une réduction de 99.9% dans la zone centrale de la fracture (K_f) pendant la phase de biocolmatage. La réduction équivalente de l'ouverture de la fracture a été de 97.6%. L'accumulation de calcite précipitée et de bactéries en forme de bâtonnets courts, allongés ou à l'aspect filamenteux a été invoquée pour expliquer cette baisse significative de K. Ces résultats permettent d'affirmer que les caractéristiques et les conditions physico-chimiques de la biostimulation ont été favorables au développement et au soutien de l'activité microbiologique.

Au cours du test de persistance, une diminution de K_f de 33.9% et de l'ouverture de la fracture de 21.1% a été mesurée. Au cours du dernier tiers de cette phase, une baisse de stabilité causée par des épisodes intermittents de détachement localisé, et reflétée par une augmentation de K_f (cm min^{-1}) de l'ordre de 1.3 logs, a cependant été mesurée. Ce test suggère que le vieillissement du biofilm, l'arrêt prolongé de l'apport en nutriments, et des conditions d'écoulement très faible catalysent une cascade de processus physiologiques et physico-chimiques qui entraînent une altération de la stabilité du biofilm. Malgré cette période d'instabilités, la réduction pour la durée totale de l'essai a été de 99.95% pour K_f et de 97.3% pour

l'ouverture de la fracture, suggérant que la perte de stabilité n'a eu qu'un impact mineur sur le niveau de colmatage.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'un biocolmatage soumis à des conditions prolongées de limitation en nutriments peut maintenir une bonne stabilité dans le temps, mais que cette stabilité peut toutefois être altérée avec une augmentation de la durée de l'arrêt de l'apport en nutriments. Ces résultats soulèvent des questionnements concernant:

- l'effet qu'une limitation en nutriments beaucoup plus prolongée pourrait avoir sur la réversibilité ou l'irréversibilité de la baisse de stabilité du biocolmatage;
- l'effet qu'une reprise de l'apport en nutriments pourrait avoir sur la récupération des niveaux de stabilité perdus.

5.3 Recommandations

Sur la base des travaux qui ont été accomplis, les recommandations qui sont proposées portent sur l'amélioration du montage et sur son utilisation pour la poursuite de travaux futurs:

- répéter l'essai de biocolmatage sur des périodes plus longues, soit de l'ordre de 12 à 18 mois. Ceci permettrait d'évaluer le degré de réversibilité d'une interruption très prolongée de l'apport en nutriments sur la stabilité du biofilm;
- modifier la conception du montage de façon à éloigner le plus possible les points d'injection des bactéries et des nutriments de la chaudière d'alimentation en eau souterraine afin de diminuer les risques de contamination bactérienne causée par un déplacement des bactéries vers les zones amont aux points d'injection, lesquels sont particulièrement élevés lorsque les conditions d'écoulement sont très faibles;
- travailler sur l'amélioration de la conception d'un assemblage de plaques fracturé comportant des puits de prélèvement étanches le long de la fracture, équipés de piézomètres montés sur des aiguilles amovibles, et dans lesquels des microélectrodes pourraient être insérées pour y mesurer *in situ* divers paramètres physico-chimiques (pH, POR, O_2);

- mettre au point une méthode de détection sensible pour quantifier la concentration en EPS dans des échantillons de biofilm. En effet, lors de la présente étude, une quantification des EPS a été tentée sur le biofilm par la méthode de Dubois *et al.* (1956), en supposant que les glucides présents se trouvaient essentiellement sous forme d'EPS, considérant qu'au moment du démantèlement, le biofilm n'avait pas été alimenté en glucides depuis 179 jours. La concentration en EPS mesurée selon celle méthode s'est révélée non détectable. En plus d'être restreinte par sa limite de détection (5 mg L^{-1}), cette méthode biochimique présente l'inconvénient d'entraîner une altération de la matrice du biofilm (Strathmann *et al.*, 2002). Ainsi, des méthodes de microscopie sont de plus en plus utilisées pour visualiser et quantifier *in-situ* et de façon non destructive les EPS des biofilms. Par exemple, l'utilisation d'une lectine[1] couplée à un marqueur fluorescent, en combinaison avec l'épifluorescence et la microscopie confocale à balayage laser (MCBL), représente un outil performant permettant de différencier les cellules bactériennes des EPS (Strathmann *et al.*, 2002).

  Une autre méthode qui peut être suggérée pour déterminer de façon approximative la quantité d'EPS présents dans un échantillon de biofilm consisterait à effectuer une analyse des protéines sur l'échantillon en entier (D. Goeres, communication personnelle, février 2003). Connaissant la densité bactérienne de l'échantillon de biofilm, la quantité de protéines de l'échantillon due à la présence des cellules pourrait être estimée, puis soustraite de la quantité totale obtenue par analyse afin de déterminer la contribution en protéines des EPS.

---

[1] Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines provenant d'animaux, de plantes ou de microbes, et qui se lient aux sucres présentant certaines caractéristiques (Strathmann *et al.*, 2002)

RÉFÉRENCES

AHEARN, D.G., BORAZJANI, R.N., SIMMONS, R.B., GABRIEL, M.M. (1999). Primary Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to Inanimate Surfaces Including Biomaterials. *Methods in Enzymology.* **310:** 551-557.

ALLAN, V J M, CALLOW, M.E., MACASKIE, L.E. PATERSON-BEEDLE, M. (2002). Effect of Nutrient Limitation on Biofilm Formation and Phosphatase Activity of a Citrobacter sp. *Microbiology.* **148**(1): 277-288.

ALLISON, D.G. (2003). The Biofilm Matrix. *Biofouling.* **19**(2): 139-150.

ALLISON, D.G. (1998). Exopolysaccharide Production in Bacterial Biofilms. *Biofilm Journal.* Volume 3, Paper 2. http://bioline.bdt.org.br/bf

ALLISON, D.G. (1993). Biofilm-Associated Exopolysaccharides. *Microbiology Europe.* **1**: 16-19.

ALLISON, D.G. & SUTHERLAND, I.W. (1987). The Role of Exopolysaccharides in Adhesion of Freshwater Bacteria. *Journal of General Microbiology.* **133**: 1319-1327.

APPLEGATE, D.H. & BRYERS, J.D. (1991). Effects of Carbon and Oxygen Limitations and Calcium Concentrations on Biofilm Removal Processes. *Biotechnology and Bioengineering.* **37**(1): 17-25.

BADE, K., MANZ, W., SZEWZYK, U. (2000). Behavior of Sulfate Reducing Bacteria under Oligotrophic Conditions and Oxygen Stress in Particle-Free Systems Related to Drinking Water. *FEMS Microbiology Ecology.* **32**(3): 215-223.

BAKALOWICZ, M. (1994). *Groundwater Ecology.* Water Geochemistry: Water Quality and Dynamics; éd. par J. Gibert, D.L. Danielopol & J.A. Stanford. San Diego, California: Academic Press. Pages 97-127.

BANTON, O., BANGOY, L., LAROCQUE, M., HURTREZ, C., RICHARD, D., RIVARD, C. (1999). Contribution des outils mathématiques à la caractérisation hydrogéologique des Basses-Terres du Saint-Laurent de la région de Mirabel (Québec, Canada). *Hydrogéologie.* **4**: 33-42.

BANTON, O. & ROULEAU, A. (1999). Eaux souterraines et hydrogéologie au Québec. *Hydrogéologie.* **4**: 3-8.

BANTON, O. & BANGOY, L.M. (1997). *Hydrogéologie: Multiscience Environnementale des Eaux Souterraines.* Sainte-Foy, Québec: Presses de l'université du Québec. 474 pages.

BAVEYE, P., VANDEVIVERE, P., HOYLE, B.L., DELEO, P.C., SANCHEZ DE LOZADA, D. (1998). Environmental Impact and Mechanisms of the Biological Clogging of Saturated Soils and Aquifer Materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* **28**(2): 123-203.

BECCARI, M., MAJONE, M., MASSANISSO, P., RAMADORI, R. (1998). A Bulking Sludge with High Storage Response Selected under Intermittent Feeding. *Water Research.* **32**(11): 3403-3413.

BERNET, N., DANGCONG, P., DELGENÈS, J.P., MOLETTA, R. (2001). Nitrification at Low Oxygen Concentration in Biofilm Reactor. *Journal of Environmental Engineering.* **127**(3): 266-271.

BEULING, E.E., VAN DEN HEUVEL, J.C., OTTENGRAF, S.P.P. (2000). Diffusion Coefficients of Metabolites in Active Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering.* **67**(1): 53-60.

BEYENAL, H., DAVIS, C.C., LEWANDOWSKI, Z. (2004). An Improved Severinghaus-type Carbon Dioxide Microelectrode for Use in Biofilms. *Sensors and Actuators B.* **97**(2): 202-210.

BEYENAL, H. & LEWANDOWSKI, Z. (2002). Internal and External Mass Transfer in Biofilms Grown at Various Flow Velocities. *Biotechnology Progress.* **18**(1): 55-61.

BICKERTON, G., ROSS, N., VORALEK, J. (2004). *Thirty-Ninth Symposium on Water Quality Research Book Abstracts.* Characterizing Biofilm Development in Fractured Bedrock Using Hydraulic Testing and Point Dilution. Burlington, Ontario.

BILBREY, L.C. & SHAFER, J.M. (2001). Funnel-and-Gate Performance in a Moderately Heterogeneous Flow Domain. *Ground Water Monitoring and Remediation.* **21**(3): 144-151.

BISHOP, P. L. (1997). Biofilm Structure and Kinetics. *Water Science and Technology.* **36**(1): 287-294.

BLACK, K.S., TOLHURST, T.J., PATERSON, D.M. & HAGERTHEY, S.E. (2002). Working with Natural Cohesive Sediments. *Journal of Hydraulic Engineering.* **128**(1): 2-9.

BOULOS, L., PRÉVOST, M., BARBEAU, B., COALLIER, J., DESJARDINS, R. (1999). LIVE/DEAD ® *Bac*Light™: Application of a New Rapid Staining Method for Direct Enumeration of Viable and Total Bacteria in Drinking Water. *Journal of Microbiological Methods.* **37**(1): 77-86.

BOURION, F. (2001). *Les Biofilms dans les Bio-industries.* Édité par ASEPT Sas, 2ième édition. Laval, France. 106 pages.

BOYD, A. & CHAKRABARTY, AM. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Role of the Alginate Exopolysaccharide. *Journal of Industrial Microbiology.* **15:** 162-168.

BRADING, M.G., JASS, J., LAPPIN-SCOTT, H.M. (1995). *Microbial Bofilms: Structure, Physiology and Ecology of Biofilms.* Dynamics of Bacterial Biofilm Formation; éd. par: H.M. Lappin-Scott & J.W. Costerton. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Pages 46-63.

BRIGMON, R.L., FURLONG, M., WHITMAN, W.B. (2003). Identification of *Thiothrix unzii* in Two Distinct Ecosystems. *Letters in Applied Microbiology.* **36**(2): 88-91.

BRIGMON, R.L., MARTIN, H.W., ALDRICH, H.C. (1997). Biofouling of Groundwater Systems by *Thiothrix* spp. *Current Microbiology.* **35**(3): 169-174.

BROCHU, M. & MICHEL, J.P. (1994). *Dictionnaire de géomorphologie à caractère dimensionnel*; éd. Eska, Paris. Montréal: Guérin Universitaire. 298 pages.

BROUGH, M.J., AL-TABBAA, A., MARTIN, R.J. (1997). *Fourth International Symposium on In Situ and On Site Bioremediation.* Active Biofilm Barriers for Waste Containment and Bioremediation Laboratory Assessment. Columbus, Ohio: Battelle Press. **4**: 233-238.

BROWN, D.A., BEVERIDGE, T.J., KEEVIL, C.W., SHERRIFF, B.L. (1998). Evaluation of Microscopic Techniques to Observe Iron Precipitation in a Natural Microbial Biofilm. *FEMS Microbiology Ecology.* **26**(4): 297-310.

BRYERS, J.D. (2000). *Biofilms II: Process Analysis and Applications.* Biofilms: An Introduction: Fundamental Aspects of Biofilm Systems; éd. par J.D. Bryers. New York: John Wiley. Pages 3-11.

BRYERS, J.D. & FLETCHER, M. (2000). *Biofilms II: Process Analysis and Applications.* Biofilm Formation and Persistence: Fundamental Aspects of Biofilm Systems; éd. par J.D. Bryers. New York: John Wiley. Pages 45-88.

BRYERS, J.D. & SANIN,S. (1995). Resuscitation of Starved Ultramicrobacteria to Improve *in Situ* Bioremediation. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **754**: 61-76.

BUSSCHER, H.J. & VAN DER MEI, H.C. (2000). *Community Structure and Co-operation in Biofilms, 59th Symposium of the Society for General Microbiology.* Initial Microbial Adhesion Events: Mechanisms and Implications; éd. par D.G. Allison, P.

Gilbert, H.M. Lappin-Scott et M. Wilson. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Pages 25-36.

CANTER, L.W.& KNOX, R.C. (1986). *Ground Water Pollution Control.* Physical Control Measures. Chelsea, Michigan: Lewis Publishers. Pages 65-87.

CATTANEO, C., NICOLELLA, C., ROVATTI, M. (2003). Denitrification Performance of *Pseudomonas denitrificans* in a Fluidized-Bed Biofilm Reactor and in a Stirred Tank Reactor. *Engineering in Life Sciences.* **3**(4): 187-192.

CHANG, H.-L. & ALVAREZ-COHEN, L. (1997). Two-stage Methanotrophic Bioreactor for the Treatment of Chlorinated Organic Wastewater. *Water Research.* **31**(8): 2026-2036.

CHAPPELL, M.A. & EVANGELOU, V.P. (2002). Surface Chemistry and Function of Microbial Biofilms. *Advances in Agronomy.* **76**: 164-199.

CHAPELLE, F.H. (2001). *Ground-Water Microbiology and Geochemistry.* 2nd edition. New York: John Wiley. 477 pages.

CHAPUIS, R. (2004). Communication personnelle.

CHARACKLIS, W.G. (1990). *Biofilms.* Biofilm Processes; éd. par W.G. Characklis et K.C. Marshall. New York: John Wiley. Pages 195-231.

CHARACKLIS & MARSHALL (1990). *Biofilms.* Biofilms: A Basis for an Interdisciplinary Approach; éd. par W.G. Characklis et K.C. Marshall. New York: John Wiley. Pages 3-15.

CHARACKLIS, W.G., TURAKHIA, M.H., ZELVER, N. (1990a). *Biofilms.* Transport and Interfacial Transfer Phenomena; éd. par W.G. Characklis et K.C. Marshall. New York: John Wiley. Pages 265-340.

CHARACKLIS, W.G., MARSHALL, K.C., MCFETERS, G. (1990b). *Biofilms.* The Microbial Cell; éd. par W.G. Characklis et K.C. Marshall. New York: John Wiley. Pages 131-159.

CHARACKLIS, W.G. & COOKSEY, K.E. (1983). Biofilms and Microbial Fouling. *Advances in Applied Microbiology.* **29:** 93-137.

CHEN-CHARPENTIER, B. (1999). Numerical Simulation of Biofilm Growth in Porous Media. *Journal of Computational and Applied Mathematics.* **103**(1): 55-66.

CHERNYSHEV, S.N. & DEARMAN, W.R. (1991). *Rock Fractures.* London, UK: Butterworth-Heinemann. 272 pages.

CHRISTENSEN, B.E. & CHARACKLIS, W.G. (1990). *Biofilms.* Physical and Chemical Properties of Biofilms. New York: John Wiley. Pages 93-130.

CONRAD, R. (1999). Contribution of Hydrogen to Methane Production and Control of Hydrogen Concentrations in Methanogenic Soils and Sediments. *FEMS Microbiology Ecology.* **28**(3): 193-202.

CONVERTI, A., ZILLI, M., ARNI, S., DI FELICE, R., DEL BORGHI, M. (1999). The Effects of Temperature and Viscosity on Glucose Diffusivity through *Saccharomyces cerevisiae* Biofilms. *The Canadian Journal of Chemical Engineering.* **77**(4): 618-626.

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science.* **284**(5418): 1318-1321.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R. & LAPPIN-SCOTT, H.M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology.* **49:** 711-745.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., , KORBER, D. R. & JAMES, G. (1994). Biofilms, the Customized Microniche. *Journal of Bacteriology.* **176**(8): 2137-2142.

CUNNINGHAM, A., WARWOOD, B., STURMAN, P., HORRIGAN, K., JAMES, G., COSTERTON, J.W., HIEBERT, R. (1997). *The Microbiology of the Terrestrial Deep Subsurface.* Biofilm Processes in Porous Media – Practical Applications; éd. par P.S. Amy & D.L. Haldeman. Boca Raton: Lewis Publishers. Pages 336-344.

CUNNINGHAM, A. B., CHARACKLIS, W.G., ABEDEEN, F. & CRAWFORD, D. (1991). Influence of Biofilm Accumulation on Porous Media Hydrodynamics. *Environmental Science and Technology.* **25**(7): 1305-1311.

DALY, B., BETTS, W.B., BROWN, A.P., O'NEILL, J.G. (1998). Bacterial Loss from Biofilms Exposed to Free Chlorine. *Microbios.* **96**(383): 7-21.

DAMGAARD, L.R., NIELSEN, L.P., REVSBECH, N.P. (2001). Methane Microprofiles in a Sewage Biofilm Determined with a Microscale Biosensor. *Water Research.* **35**(6): 1379-1386.

DANESE, P.N., PRATT, L.A., KOLTER, R. (2000). Exopolysaccharide Production is Required for Development of *Escherichia coli* K-12 Architecture. *Journal of Bacteriology.* **182**(12): 3593-3596.

DAVIES, D.G. (2000). *Community Structure and Co-operation in Biofilms, 59th Symposium of the Society for General Microbiology.* Physiological Events in Biofilm Formation; éd. par D.G. Allison, P. Gilbert, H.M. Lappin-Scott et M. Wilson. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Pages 37-52.

DAVIES, D.G. (1999). *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function.* Regulation of Matrix Polymer in Biofilm Formation and Dispersion; éd. par J. Wingender, T.R. Neu & H.-C. Flemming. Berlin: Springer-Verlag. Pages 104-106.

DE BEER, D., GLUD, A., EPPING, E., KUHL, M. (1997a). A Fast-responding CO_2 Microelectrode for Profiling Sediments, Microbial Mats, and Biofilms. *Limnology and Oceanography.* **42**(7): 1590-1600.

DE **BEER, D., STOODLEY, P., LEWANDOWSKI, Z. (1997b).** Measurement of Local Diffusion Coefficients in Biofilms by Microinjection and Confocal Microscopy. *Biotechnology and Bioengineering.* **53(**2): 151-158.

DE **BEER, D. & STOODLEY, P. (1995).** Relation Between the Structure of an Aerobic Biofilm and Transport Phenomena. *Water Science and Technology.* **32**(8): 11-18.

DE **BEER, D., STOODLEY, P., ROE, F., LEWANDOWSKI, Z. (1994a).** Effects of Biofilm Structures on Oxygen Distribution and Mass Transport. *Biotechnology and Bioengineering.* **43**(11): 1131-1138.

DE **BEER, D., STOODLEY, P., ROE, F., LEWANDOWSKI, Z. (1994b).** Liquid Flow in Heterogeneous Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering.* **44**:(5): 636-641.

DE **LANCEY PULCINI, E. (2001).** Bacterial Biofilms: A Review of Current Research. *Néphrologie.* **22**(8): 439-441.

DE **MARSILY, G. (1986).** *Quantitative Hydrogeology*: *Groundwater Hydrology for Engineers.* San Diego, California: Academic Press. Pages 13-84.

DE **WINDER, B., STAATS, N., STAL, L.J., PATERSON, D.M. (1999).** Carbohydrate Secretion by Phototrophic Communities in Tidal Sediments. *Journal of Sea Research.* **42**(2): 131-146.

DENNIS, M.L. & TURNER, J.P. (1998). Hydraulic Conductivity of Compacted Soil Treated with Biofilm. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering.* **124**(2): 120-127.

DONACHIE, W.D. (1993). The Cell Cycle of Escherichia Coli. *Annual Review of Microbiology.* **47**:199-230.

DREVER, J.I. (1997). *The Geochemistry of Natural Waters: Surface and Groundwater Environments.* 3ième édition; éd. par R.A. McConnin. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall. 436 pages.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., SMITH, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry.* **28**(3): 350-356.

DUNNE, W.M. JR. (2002). Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews.* **15**(2): 155-166.

DUPIN, H. J. & McCARTY, P.L. (2000). Impact of Colony Morphologies and Disinfection on Biological Clogging in Porous Media. *Environmental Science and Technology.* **34**(8): 1513-1520.

DURMAZ, B. & SANIN, F.D. (2001). Effect of Carbon to Nitrogen Ratio on the Composition of Microbial Extracellular Polymers in Activated Sludge. *Water Science and Technology.* **44**(10): 221-229.

DUSSART, L., DUPONT, J.-P., ZIMMERLIN, I., LACROIX, M., SAITER, J.M., JUNTER, G.-A., JOUENNE, T. (2003). Occurrence of Sessile *Pseudomonas oryzihabitans* from a Karstified Chalk Aquifer. *Water Research.* **37**(7): 1593-1600.

ESCOLERO, O.A., MARIN, L.E., STEINICH, B., PACHECO, A.J., CABRERA, S.A., ALCOCER, J. (2002). Development of a Protection Strategy of Karst Limestone Aquifers: The Merida Yucatan, Mexico Case Study. *Water Resources Management.* **16**(5): 351-367.

EVANS, J.C. (1995). *Assessment of Barrier Containment Technologies – A Comprehensive Treatment for Environmental Remediation Applications – Proceedings of the International Containment Technology Workshop.* Soil- and Cement-Based Vertical Barriers with Focus on Materials; éd. par R.R. Rumer & J.K. Mitchell. Springfield, VA: US Department of Energy. Pages 5-43.

FEGATELLA, F. & CAVICCHIOLI (2000). Physiological Responses to Starvation in the Marine Oligotrophic Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. *Applied and Environmental Microbiology.* **66**(5): 2037-2044.

FELTON, L.A., SHAH, N.H., ZHANG, G., INFELD, M.H., MALICK, A.W., McGINITY, J.W. (1996). Physical-Mechanical Properties of Film-Coated Soft Gelatin Capsules. *International Journal of Pharmaceutics*. **127**(2): 203-211.

FERRIS, F.G. & LOWSON, E.A. (1997). Ultrastructure and Geochemistry of Endolithic Microorganisms in Limestone of the Niagara Escarpment. *Canadian Journal of Microbiology*. **43**(3): 211-219.

FERRIS, F.G., SCHULTZE, S., WITTEN, T.C., FYFE, W.S., BEVERIDGE, T.J. (1989). Metal Interactions with Microbial Biofilms in Acidic and Neutral pH Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**(5): 1249-1257.

FETTER, C.W. (2001). *Applied Hydrogeology*. 4ième édition. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall. 598 pages.

FILLOUX, A. & VALLET. I. (2003). Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Médecine/Sciences*. **19**(1): 77-83.

FITTS, C.R. (2002). *Groundwater Science*. Amsterdam: Academic Press. Pages 27-284.

FLEMMING, H.-C. (2002). Biofouling in Water Systems – Cases, Causes and Countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **59**(6): 629-640.

FLEMMING, H.-C. & WINGENDER, J. (2001). Relevance of Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPSs) - Part II: Technical Aspects. *Water Science and Technology*. **43**(6): 9-16.

FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J., MAYER, C., KÖRSTGENS, V., ET BORCHARD, W. (2000). *Community Structure and Co-operation in Biofilms, 59th Symposium of the Society for General Microbiology*. Cohesiveness in Biofilm Matrix Polymers; éd. par: D.G. Allison, P. Gilbert, H.M. Lappin-Scott et M. Wilson. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Pages 87-105.

FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J., MORITZ, R., BORCHARD, W., & MAYER, C (1999). *Biofilms in the Aquatic Environment.* Physico-chemical Properties of Biofilms: A Short Review; éd. par: C.W. Keevil, A. Godfree, D. Holt, C. Dow. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. Pages 1-12.

FLEMMING, H.-C. & SCHAULE, G. (1996). *Microbial Deterioration of Materials.* Biofouling; éd. par E. Heitz, W. Sand & H.-C. Flemming. Heidelberg: Springer. Pages 39-54.

FLEMMING, H.-C. (1995). Sorpion Sites in Biofilms. *Water Science and Technology.* **32**(8): 27-33.

FORD, D.C. & WILLIAMS, P.W. (1989a). *Karst Geomorphology and Hydrology.* Dissolution Chemical and Kinetic Behaviour of the Karst Rocks. London, UK: Unwin Hyman. Pages 53-60.

FORD, D.C. & WILLIAMS, P.W. (1989b). *Karst Geomorphology and Hydrology.* Karst Hydrology. London, UK: Unwin Hyman. Page 129.

FREEMAN, H.M. & HARRIS, E.F. (1995). *Hazardous Waste Remediation: Innovative Treatment Technologies.* Waste Containment: Soil-bentonite Slurry Walls. Lancaster, Pa: Technomic Pub. Pages 3-10.

FREEMAN, C., & LOCK, M.A. (1995). The Biofilm Polysaccharide Matrix: A Buffer Against Changing Organic Substrate Supply? *Limnology and Oceanography.* **40**(2): 273-278.

FREEZE, R.A. & CHERRY, J.A. (1979). *Groundwater.* Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall. 604 pages.

FREITAS DOS SANTOS, L.M. & LIVINGSTON, A.G. (1995). Membrane-Attached Biofilms for VOC Wastewater Treatment I : Novel In Situ Biofilm Thickness Measurement Technique. *Biotechnology and Bioengineering.* **47**(1): 82-89.

GALVÁN, A., URBINA, P., DE CASTRO, F. (2000). Characterization of Filamentous Microorganisms in Rotating Biological Contactor Biofilms of Wastewater Treatment Plants. *Bioprocess Engineering.* **22**(3): 257-260.

GARRIDO, J.M., VAN BENTHUM, W.A.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J. (1997). Influence of Dissolved Oxygen Concentration on Nitrite Accumulation in a Biofilm Airlift Suspension Reactor. *Biotechnology and Bioengineering.* **53**(2): 168-178.

GAURI, K.L. & BANDYOPADHYAY, J.K. (1999). *Carbonate Stone: Chemical Behavior, Durability and Conservation.* New York: John Wiley. 284 pages.

GENEST, C. (2000). *Dictionnaire de Géomorphologie.* Trois-Rivières, Québec: Société de Géographie de la Mauricie. 411 pages.

GEYSSANT, J. (2001). *Calcium Carbonate: From the Cretaceous Period into the 21st Century.* Geology of Calcium Carbonate; éd. par F.W. Tegethoff. Boston: Birkhäuser Verlag. Pages 15-30.

GIBBS, J. T. & BISHOP, P.L. (1995). A Method for Describing Biofilm Surface Roughness Using Geostatistical Techniques. *Water Science and Technology.* **32**(8): 91-98.

GOERES, D. (2003). Communication personnelle. darla_g@erc.montana.edu. Center for Biofilm Engineering (CBE), Montana State University, Bozeman, USA.

GUERIN, T.F., HORNER, S., MCGOVERN, T., DAVEY, B. (2002). An Application of Permeable Reactive Barrier Technology to Petroleum Hydrocarbon Contaminated Groundwater. *Water Research.* **36**(1): 15-24.

HAKAMI, E. & LARSSON, E. (1996). Aperture Measurements and Flow Experiments on a Single Natural Fracture. *International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences and Geomechanics Abstracts.* **33**(4), 395-404.

HANSON, R.S. & HANSON, T. (1996). Methanotrophic Bacteria. *Microbiological Reviews.* **60**(2): 439-471.

HIBIYA, K., TERADA, A., TSUNEDA, S., HIRATA, A. (2003). Simultaneous Nitrification and Denitrification by Controlling Vertical and Horizontal Microenvironment in a Membrane-aerated Biofilm Reactor. *Journal of Biotechnology.* **100**(1): 23-32.

HIEBERT, R., SHARP, R., CUNNINGHAM, A. & JAMES, G. (2001). Development and Demonstration of Subsurface Biofilm Barriers Using Starved Bacterial Cultures. *Contaminated Soil Sediment & Water.* (Août 2001).

HILL, D.D. & SLEEP, B.E. (2002). Effects of Biofilm Growth on Flow and Transport through a Glass Parallel Plate Fracture. *Journal of Contaminant Hydrology.* **56**(3): 227-246.

HOULIHAN, M.F. & LUCIA, P.C. (1999). *The Handbook of Groundwater Engineering.* Remediation of Contaminated Groundwater; éd. par J.W. Delleur. Boca Raton, Fla.: CRC Press. Pages 25-1 à 25-43.

HUANG, J. & PINDER, K.L. (1995). Effects of calcium on Development of Anaerobic Acidogenic Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering.* **45**(3): 212-218.

HUANG, C.-T., PERETTI, S.W., BRYERS, J.D. (1994). Effects of Medium Carbon-to-Nitrogen Ratio on Biofilm Formation and Plasmid Stability. *Biotechnology and Bioengineering.* **44**(3): 329-336.

JAMES, G. & HIEBERT, R. (2001). *Sixth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium.* Biofilm Barriers for Groundwater Containment; éd. par A. Leeson et V.S. Magar. Columbus, OH: Battelle Press.

JAMES, G.A., BEAUDETTE, L., COSTERTON, J.W. (1995a). Interspecies Bacterial Interactions in Biofilms. *Journal of Industrial Microbiology.* **15**(4): 257-262.

JAMES, G.A., KORBER, D.R., CALDWELL, D.E., COSTERTON, J.W. (1995b). Digital Image Analysis of Growth and Starvation Responses of a Surface-Colonizing *Acinetobacter* sp. *Journal of Bacteriology*. **177**(4): 907-915.

JAMES, G. A., WARWOOD, B.K., CUNNINGHAM, A.B., STURMAN, P.J., HIEBERT, R., & COSTERTON, J.W. (1995c). *Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research.* Evaluation of Subsurface Biobarrier Formation and Persistence. Pages 82-91.

JETTEN, M.S.M., STROUS, M., VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T., SCHALK, J., VAN DONGEN, U.G. J.M., VAN DE GRAAF, A.A., LOGEMANN S., MUYZER, G., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. & KUENENA, J.G. (1998). The Anaerobic Oxidation of Ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*. **22**(5): 421-437.

JOHNSTON, C.D., TREFRY, M.G., RAYNER, J.L., RAGUSA, S.R., DE ZOYSA, D.S., DAVIS, G.B. (1999). *Proceedings of the 1999 Contaminated Site Remediation: Challenges Posed by Urban & Industrial Contaminants Conference.* In situ Bioclogging for the Confinement and Remediation of Groundwater Hydrocarbon Plumes. Fremantle, Western Australia. Pages 649-656.

JOHNSTON, C.D., RAYNER, J.L., DE ZOYSA, D.S., RAGUSA, S.R., TREFRY, M.G., DAVIS, G.B. (1997). *Proceedings of the 4th International In Situ & On-Site Bioremediation Symposium*. Studies of Bioclogging for Containment and Remediation of Organic Contaminants. New Orleans: Battelle. **4**: 241-246.

JÜRGENS, K., PERNTHALER, J., SCHALLA, S., & AMANN, R. (1999). Morphological and Compositional Changes in a Planktonic Bacterial Community in Response to Enhanced Protozoan Grazing. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(3): 1241-1250.

JUTRAS, P., PRICHONNET, G., VON BITTER, P.H. (1999). The La Coulée Formation, a New Post-Acadian Continental Clastic Unit Bearing Groundwater Calcretes, Gaspé Peninsula, Québec. *Atlantic Geology*. **35**(2): 139-156.

KATTAN, Z. (2002). Use of Hydrochemistry and Environmental Isotopes for Evaluation of Groundwater in the Paleogene Limestone Aquifer of the Ras Al-Aïn Area (Syrian Jezireh). *Environmental Geology.* **41**(1/2): 128-144.

KEGLEY, S.E. & ANDREWS, J. (1998). *The Chemistry of Water.* Sausalito, California: University Science Books. 167 pages.

KEHEW, A.E. (2001). *Applied Chemical Hydrogeology*; éd. par P.F. Corey, P. Lynch, A. Griffith, S. Hale, K. Schiaparelli & B. Sturla. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall. 368 pages.

KIELEMOES, J., BULTINCK, I., STORMS, H., BOON, N., VERSTRAETE, W. (2002). Occurence of Manganese-oxidizing Microorganisms and Manganese Deposition during Biofilm Formation on Stainless Steel in a Brackish Surface Water. *FEMS Microbiology Ecology.* **39**(1): 41-55.

KIM, D.-S. & FOGLER, H.S. (2000). Biomass Evolution in Porous Media and Its Effects on Permeability Under Starvation Conditions. *Biotechnology and Bioengineering.* **69**(1): 47-56.

KIM, D.-S. & FOGLER, H.S. (1999). The Effects of Exopolymers on Cell Morphology and Culturability of *Leuconostoc mesenteroides* during Starvation. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **52**(6): 839-844.

KJELLEBERG, S., HUMPHREY, B.A., MARSHALL, K.C. (1982). Effect of Interfaces on Small, Starved Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* **43**(5): 1166-1172.

KLAPPER, I., RUPP, C.J., CARGO, R., PURVEDORJ, B., STOODLEY, P. (2002). Viscoelastic Fluid Description of Bacterial Biofilm Material Properties. *Biotechnology and Bioengineering.* **80**(3): 289-296.

KNOX, R.C., SABATINI, D.A., CANTER, L.W. (1993). *Subsurface Transport and Fate Processes.* Boca Raton, Fla.: Lewis Publishers. 430 pages.

KORBER, D.R., LAWRENCE, J.R., LAPPIN-SCOTT, H.M., COSTERTON, J.W. (1995). *Microbial Bofilms: Structure, Physiology and Ecology of Biofilms.* Growth of Microorganisms on Surfaces; éd. par: H.M. Lappin-Scott et J.W. Costerton. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Pages 15-45.

KÖRSTGENS, V., FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J., BORCHARD, W. (2001a). Influence of Calcium Ions on the Mechanical Properties of a Model Biofilm Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa. Water Science and Technology.* **43**(6): 48-57.

KÖRSTGENS, V., FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J., BORCHARD, W. (2001b). Uniaxial Compression Measurement Device for Investigation of the Mechanical Stability of Biofilms. *Journal of Microbiological Methods.* **46**(1): 9-17.

LABRENZ, M., DRUSCHEL, G.K., THOMSEN-EBERT, T., GILBERT, B., WELCH, S.A., KEMNER, K. M., LOGAN, G.A., SUMMONS, R.E., DE STASIO, G., BOND, P.L., LAI, B., KELLY, S.D., BANFIELD, J.F. (2000). Formation of Sphalerite (ZnS) Deposits in Natural Biofilms of Sulfate-Reducing Bacteria. *Science.* **290**(5497): 1744-1747.

LANGMUIR, D. (1984). *Guide to the Hydrology of Carbonate Rocks.* Physical and Chemical Characteristics of Carbonate Water; éd. par P.E. La Moreaux, B.M. Wilson & B.A. Memon. Paris: Unesco. Pages 69-130.

LAPCEVIC, P.A., NOVAKOWSWKI, K.S., SUDICKY, E.A. (1999a). The Interpretation of a Tracer Experiment Conducted in a Single Fracture under Conditions of Natural Groundwater Flow. *Water Resources Research.* **35**(8): 2301-2312.

LAPCEVIC, P.A., NOVAKOWSWKI, K.S., SUDICKY, E.A. (1999b). *The Handbook of Groundwater Engineering.* Groundwater Flow and Solute Transport in Fractured Media; éd. par J.W. Delleur. Boca Raton, Fla.: CRC Press. Page 17-8.

LAWRENCE, J.R., KOPF, G., & NEU, T.R. (2001). Sorption and Metabolism of Selected Herbicides in River Biofilm Communities. *Canadian Journal of Microbiology.* **47**(7): 634-641.

LEE, A.K. & NEWMAN, D.K. (2003). Microbial Iron Respiration: Impacts On Corrosion Processes. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **62**(2): 134-139.

LEWANDOWSKI, Z., STOODLEY, P., ALTOBELLI, S. (1995). Experimental and Conceptual Studies on Mass Transport in Biofilms. *Water Science and Technology.* **31**(1): 153-162.

LI, J. & BISHOP, P.L. (2002). *In Situ* Identification of Azo Dye Inhibition Effects on Nitrifying Biofilms Using Microelectrodes. *Water Science and Technology.* **46**(1/2): 207-214.

LIU, Y., LIN, Y.-M., YANG, S.-F., TAY, J.-H. (2003). A Balanced Model for Biofilms Developed at Different Growth and Detachment Forces. *Process Biochemistry.* **38**(12): 1761-1765.

LIU, Y. & TAY, J-H. (2002). The Essential Role of Hydrodynamic Shear Force in the Formation of Biofilm and Granular Sludge. *Water Research.* **36(**7): 1653-1665.

LIU, Y. & TAY, J.-H. (2001a). Metabolic Response of Biofilm to Shear Stress in Fixed-film Culture. *Journal of Applied Microbiology.* **90**(3): 337-342.

LIU, Y. & TAY, J.-H. (2001b). Detachment Forces and their Influence on the Structure and Metabolic Behaviour of Biofilms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **17**(2): 111-118.

LOVLEY, D.R. (1997). Microbial Fe(III) Reduction in Subsurface Environments. *FEMS Microbiology Reviews.* **20**(3): 305-313.

LOVLEY, D.R. & PHILIPS, E.J.P. (1986). Organic Matter Mineralization with Reduction of Ferric Iron in Anaerobic Sediments. *Applied and Environmental Microbiology.* **51**(4): 683-689.

LÜNSDORF, H., BRÜMMER, I., TIMMIS, K.N., WAGNER-DÖBLER, I. (1997). Metal Selectivity of *In Situ* Microcolonies in Biofilms of the Elbe River. *Journal of Bacteriology.* **179**(1): 31-40.

MACLEOD, F. A., LAPPIN-SCOTT, H.M., ET COSTERTON, J.W. (1988). Plugging of a Model Rock System by Using Starved Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* **54**(6): 1365-1372.

MADONI, P., DAVOLI, D., FONTANI, N., CUCCHI, A., AND ROSSI, F. (2001). Spatial Distribution of Microorganisms and Measurements of Oxygen Uptake Rate and Ammonia Uptake Rate Activity in a Drinking Water Biofilter. *Environmental Technology.* **22**(4): 455-462.

MARCO-NOALES, E., BIOSCA, E.G.; AMARO, C. (1999). Effects of Salinity and Temperature on Long-Term Survival of the Eel Pathogen *Vibrio vulnificus* Biotype 2 (Serovar E). *Applied and Environmental Microbiology.* **65**(3): 1117-1126.

MARCUS, D.L. & BONDS, C. (1999). Results of the Reactant Sand-fracking Pilot Test and Implications for the in Situ Remediation of Chlorinated VOCs and Metals in Deep and Fractured Bedrock Aquifers. *Journal of Hazardous Materials.* **68**(1): 125-153.

MARSHALL, K.C. (2000). *Nonculturable Microorganisms in the Environment.* Starved and Nonculturable Microorganisms in Biofilms; éd. R.R. Colwell & D.J. Grimes. Washington, DC: American Society for Microbiology Press. Pages 113-129.

MARSHALL, K. (1992). Biofilms: An Overview of Bacterial Adhesion, Activity, and Control at Surfaces. *ASM News.* **58**(4): 202-204.

MARTÍN-CERECEDA, M., ÁLVAREZ, A.M., SERRANO, S., DUINEA, A. (2001). Confocal and Light Microscope Examination of Protozoa and Other Microorganisms in the Biofilms from a Rotating Biological Contactor Wastewater Treatment Plant. *Acta Protozoologica.* **40**(4): 263-272.

MARTINS DOS SANTOS, V.A.P., LEENEN, E.J.T.M., RIPPOLL, M.M., VAN DER SLUIS, C., VAN VLIET, T., TRAMPER, J., WIJFFELS, R.H. (1997). Relevance of Rheological Properties of Gel Beads for Their Mechanical Stability in Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering.* **56**(5): 517-529.

MASSOL-DEYÁ, A.A., WHALLON, J., HICKEY, R.F., TIEDJE, J.M. (1995). Channel Structures in Aerobic Biofilms of Fixed-Film Reactors Treating Contaminated Groundwater. *Applied Environmental Microbiology.* **61**(2): 769-777.

MATTISON, R.G., TAKI, H., HARAYAMA, S. (2002). The Bacterivorous Soil Flagellate *Heteromita globosa* Reduces Bacterial Clogging under Denitrifying Conditions in Sand-Filled Aquifer Columns. *Applied and Environmental Microbiology.* **68**(9): 4539-4545.

MATTHESS, G. & HARVEY, J. C. (1982). *The Properties of Groundwater.* New York: John Wiley. 406 pages.

McBAIN, A.J., ALLISON, D.G., GILBERT, P. (2000). *Community Structure and Co-operation in Biofilms, 59th Symposium of the Society for General Microbiology.* Population Dynamics in Microbial Biofilms; éd. D.G. Allison, P. Gilbert, H.M. Lappin-Scott & M. Wilson. Cambridge: Cambridge University Press. Pages 257-278.

MITCHELL, J.K. & RUMER, R.R. (1997). *Proceedings of the in Situ Remediation of the Geoenvironment Conference.* Waste Containment Barriers: Evaluation of the Technology; éd. par J.C. Evans. Reston, VA: American Society of Civil Engineers. Pages 1-25.

MORGENROTH, E. & WILDERER, P.A. (2000). Influence of Detachment Mechanisms on Competition in Biofilms. *Water Research.* **34**(2): 417-426.

NICOLELLA, C., CHIARLE, S., DI FELICE, R. & ROVATTI, M. (1997). Mechanisms of Biofilm Detachment in Fluidized Bed Reactors. *Water Science and Technology.* **36**(1): 229-235.

NIELSEN, P.H., JAHN, A., PALMGREN, R. (1997). Conceptual Model for Production and Composition of Exopolymers in Biofilms. *Water Science and Technology.* **36**(1): 11-19.

NOVAKOWSKI, K.S., LAPCEVIC, P.A., VORALEK, J., BICKERTON, G. (1995). Preliminary Interpretation of Tracer Experiments Conducted in a Discrete Rock Fracture under Conditions of Natural Flow. *Geophysical Research Letters.* **22**(11): 1417-1420.

OHASHI, A., KOYAMA, T., SYUTSUBO, K. & HARADA, H. (1999). A Novel Method for Evaluation of Biofilm Tensile Strength Resisting Erosion. *Water Science and Technology.* **39**(7): 261-268.

OHASHI, A. & HARADA, H. (1996). A Novel Concept for Evaluation of Biofilm Adhesion Strength by Applying Tensile Force and Shear Force. *Water Science and Technology.* **34**(5): 201-211.

OHASHI, A., VIRAJ DE SILVA, D.G., MOBARRY, B., MANEM, J.A., STAHL, D.A., RITTMANN, B.E. (1995). Influence of Substrate C/N Ratio on the Structure of Multi-Species Biofilms Consisting of Nitrifiers and Heterotrophs. *Water Science and Technology.* **32**(8): 75-84.

OHASHI, A. & HARADA, H. (1994). Adhesion Strength of Biofilm Developed in an Attached-Growth Reactor. *Water Science and Technology.* **29**(10/11): 281-288.

OKABE, S., ITO, T., SATOH, H., WATANABE, Y. (2003). Effect of Nitrite and Nitrate on Biogenic Sulfide Production in Sewer Biofilms Determined by the Use of Microelectrodes. *Water Science and Technology.* **47**(11): 281-288.

OKABE, S., NAITOH, H., SATOH, H., WATANABE, Y. (2002). Structure and Function of Nitrifying Biofilms as Determined by Molecular Techniques and the Use of Microelectrodes. *Water Science and Technology.* **46**(1/2): 233-241.

OKABE S. & WATANABE, Y. (2000). Structure and Function of Nitrifying Biofilms as Determined by *In Situ* Hybridization and the Use of Microelectrodes. *Water Science and Technology.* **42**(12): 21-32.

OKABE, S., ITOH, T., SATOH, H., WATANABE, Y. (1999). Analyses of Spatial Distributions of Sulfate-Reducing Bacteria and Their Activity in Aerobic Wastewater Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology.* **65**(11): 5107-5116.

OKABE, S., MATSUDA, T., SATOH, H., ITOH, T., WATANABE, Y. (1998). Sulfate Reduction and Sulfide Oxidation in Aerobic Mixed Population Biofilms. *Water Science and Technology.* **37**(4): 131-138.

OKABE, S., YASUDA, T., WATANABE, Y. (1997). Uptake and Release of Inert Fluorescence Particles by Mixed Population Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering.* **53**(5): 459-469.

OKKERSE, W.J.H., OTTENGRAF, S.P.P., OSINGA-KUIPERS, B. (2000). Biofilm Thickness Variability Investigated with a Laser Triangular Sensor. *Biotechnology and Bioengineering.* **70**(6): 619-629.

O'NEILL, J.E. & GILL, E. (1997). *Containment and Restoration Technology Development for DNAPL in Fractured Bedrock (An Overview of the Smithville Phase IV Program).* Air & Waste Management Association's 90th Annual Meeting & Exhibition. Toronto, Ontario, Canada.

PAERL, H.W. & PINCKNEY, J.L. (1996). A Mini-review of Microbial Consortia: Their Roles in Aquatic Production and Biogeochemical Cycling. *Microbial Ecology.* **31**(3): 225-247.

PERCIVAL, S.L., WALKER, J.T., HUNTER, P.R. (2000). *Microbiological Aspects of Biofilms and Drinking Water.* Biofilm Development in General; éd. par R.H. Vreeland. Boca Raton, Fla.: CRC Press. Pages 61-84.

PERCIVAL, S.L. (1998). Review of Potable Water Biofilms in Engineered Systems. *British Corrosion Journal.* **33**(2): 130-137.

PEYTON, B.M. (1996). Effects of Shear Stress and Substrate Loading Rate on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Thickness and Density. *Water Research.* **30**(1): 29-36.

PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNAN, J.J. (2001). Two-Dimensional Model of Biofilm Detachment Caused by Internal Stress from Liquid Flow. *Biotechnology and Bioengineering.* **72**(2): 205-218.

PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNAN, J.J. (2000a). *Community Structure and Co-operation in Biofilms – 59th Symposium of the Society for General Microbiology.* Modelling and Predicting Biofilm Structure; éd. par: D.G. Allison, P. Gilbert, H.M. Lappin-Scott et M. Wilson. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Pages 129-166.

PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J. (2000b). A Theorical Study on the Effect of Surface Roughness on Mass Transport and Transformation in Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering.* **68**(4): 355-369.

PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J. (2000c). Effect of Diffusive and Convective Substrate Transport on Biofilm Structure Formation: A Two-Dimensional Modeling Study. *Biotechnology and Bioengineering.* **69**(5): 504-515.

PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P., KLEIN, D.A. (1995). *Microbiologie.* Bruxelles: DeBoeck-Wesmael. 1014 pages.

QUINTERO, E.J. & WEINER, R.M. (1995). Evidence for the Adhesive Function of the Exopolysaccharide of *Hyphomonas* Strain MHS-3 in its Attachment to Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology.* **61**(5): 1897-1903.

RAGUSA, S.R., ZOYSA, D.S., RENGASAMY, P. (1994). The Effect of Microorganisms, Salinity and Turbidity on Hydraulic Conductivity of Irrigation Channel Soil. *Irrigation Science.* **15**(4): 159-166.

RAZATOS, A. (2001). Application of Atomic Force Microscopy to Study Initial Events of Bacterial Adhesion. *Methods in Enzymology.* **337**: 276-285.

RIFFARD, S., DOUGLASS, S., BROOKS, T., SPRINGTHORPE, S., FILION, L.G., SATTAR, S.A. (2001). Occurrence of *Legionella* in Groundwater: An Ecological Study. *Water Science and Technology.* **43**(12): 99-102.

RIJNAARTS, H.H.M., BRUNIA, A., VAN AALST, M. (1997). *Fourth International Symposium on In Situ and On Site Bioremediation.* In-Situ Bioscreens. Columbus, Ohio: Battelle Press. **4**: 203-208.

RINCK-PFEIFFER, S., RAGUSA, S., SZTAJNBOK, P., VANDEVELDE, T. (2000). Interrelationships Between Biological, Chemical, and Physical Processes as an Analog to Clogging in Aquifer Storage and Recovery (ASR) Wells. *Water Research.* **34**(7): 2110-2118.

ROBERT, P., REY-DEBOVE, J., REY, A. (1993). *Le Nouveau Petit Robert.* Paris: Dictionnaires Le Robert. 2551 pages.

ROSS, N. & BICKERTON, G. (2002). Application of Biobarriers for Groundwater Containment at Fractured Bedrock Sites. *Remediation.* **12**(3): 5-21.

ROSS, N., VILLEMUR, R., DESCHÊNES, L., SAMSON, R. (2001a). Clogging of a Limestone Fracture by Stimulating Groundwater Microbes. *Water Research.* **35**(8): 2029-2037.

ROSS, N., VILLEMUR, R., MARCANDELLA, É., DESCHÊNES, L.. (2001b). Assessment of Changes in Biodiversity when a Community of Ultramicrobacteria Isolated from Groundwater is Stimulated to Form a Biofilm. *Microbial Ecology.* **42**(1): 56-68.

ROSS, N. (1999). *Stimulation d'une microflore des eaux souterraines: Évaluation de l'innocuité environnementale dans une perspective de biocolmatage d'un milieu*

géologique fracturé. Thèse de doctorat. Montréal, Québec: Département des génies civil, géologique et des mines, École polytechnique de Montréal. 274 pages.

ROSS, N., DESCHÊNES, L., CLÉMENT, B., SAMSON, R. (1996). *19ième Symposium international sur le traitement des eaux usées, 8ième Atelier sur l'eau potable & 36ième Réunion annuelle de la Société canadienne des biologistes en environnement.* Optimisation des conditions physico-chimiques pour le développement d'une biobarrière dans une nappe aquifère en milieu fracturé. Montréal, Québec. Pages 275-276 & 435-443.

ROULEAU, A., GUHA, J., ARCHAMBAULT, G., BENLAHCEN, A. (1999). Groundwater and Hydrogeology in Quebec - An Overview of the Hydrogeology of the Precambrian Basement in Quebec and Related Mining Problems. *Hydrogeologie.* **4**: 23-32.

RUBIN, H. & RABIDEAU, A.J. (2000). Approximate Evaluation of Contaminant Transport through Vertical Barriers. *Journal of Contaminant Hydrology.* **40**(4): 311-333.

SANCHEZ DE LOZADA, D., VANDEVIVERE, P., BAVEYE, P., ZINDER, S. (1994). Decrease of the Hydraulic Conductivity of Sand Columns by *Methanosarcina barkeri. World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **10**(3): 325-333.

SANDFORD, P.A. (1979). Exocellular, Microbial Polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.* **36**: 265-313.

SANTEGOEDS, C.M., FERDELMAN, T.G., MUYZER, G., ET DE BEER, D. (1998). Structural and Functional Dynamics of Sulfate-Reducing Populations in Bacterial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology.* **64**(10): 3731-3739.

SATOH, H., OKABE, S., NORIMATSU, N., WATANABE, Y. (2000). Significance of Substrate C/N Ratio on Structure and Activity of Nitrifying Biofilms Determined by *in situ* Hybridization and the Use of Microelectrodes. *Water Science and Technology.* **41**(4/5): 317-321.

SAWYER, L. K. & HERMANOWICZ, S.W. (1998). Detachment of Biofilm Bacteria due to Variations in Nutrient Supply. *Water Science and Technology.* **37**(4/5): 211-214.

SCHINK, B. (1997). Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **61**(2): 262-280.

SCHÜRING, J., SCHLIEKER, M. & HENCKE, J. (2000). *Redox Fundamentals, Processes and Applications.* Redox Fronts in Aquifer Systems and Parameters Controlling their Dimensions; éd. par J. Schüring, H.D. Schulz, W.R. Fischer, J. Böttcher & W.H.M. Duijnisveld. Berlin: Springer-Verlag. Pages 135-151.

SEPPÄNEN, H. (2000). *Groundwater Updates.* Biological Treatment of Groundwater; éd. par K. Sato & Y. Iwasa. Tokyo: Springer-Verlag. Pages 289-294.

SHARMA, H.D. & LEWIS, S.P. (1994). *Waste Containment Systems, Waste Stabilization, and Landfills: Design and Evaluation.* Vertical Barriers: Slurry Walls. New York: John Wiley. Pages 321-367.

SHAW, J. C., BRAMHILL, B., WARDLAW, N.C. & COSTERTON, J.W. (1985). Bacterial Fouling in a Model Core System. *Applied and Environmental Microbiology.* **49**(3): 693-701.

SIMARD, G. & DES ROSIERS, R. (1980). *Qualité des eaux souterraines du Québec.* Québec: Ministère de l'environnement, Service des eaux souterraines, Gouvernement du Québec. 161 pages.

SIMARD, G. (1978). *Hydrogéologie de la région de Mirabel.* Québec: Ministère des richesses naturelles, Direction générale des eaux, Gouvernement du Québec. 69 pages.

SINGHAL, B.B.S. & GUPTA, R.P. (1999). *Applied Hydrogeology of Fractured Rocks.* Dordrecht, Pays-Bas: Kluwer Academic. 400 pages.

SISAVATH, S., AL-YAARUBY, A., PAIN, C.C., ZIMMERMAN, R.W. (2003). A Simple Model for Deviations from the Cubic Law for a Fracture Undergoing Dilation or Closure. *Pure and Applied Geophysics.* **160**(5): 1009-1022.

STEIMLE, R. 2002. The State of the Practice: Characterizing and Remediating Contaminated Groundwater at Fractured Rock Sites. *Remediation.* **12**(2): 23-33.

STEWART, P.S. (2003). Diffusion in Biofilms. *Journal of Bacteriology.* **185**(5): 1485-1491.

STOODLEY, P., CARGO, R., RUPP, C.J., WILSON, S., KLAPPER, I. (2002). Biofilm Material Properties as Related to Shear-Induced Deformation and Detachment Phenomena. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* **29**(6): 361-367.

STOODLEY, P., LEWANDOWSKI, Z., BOYLE, J.D., LAPPIN-SCOTT, H.M. (1999a). Structural Deformation of Bacterial Biofilms Caused by Short-Term Fluctuations in Fluid Shear: An *in Situ* Investigation of Biofilm Rheology. *Biotechnology and Bioengineering.* **65**(1): 83-92.

STOODLEY, P., BOYLE, J., DE BEER, D., LAPPIN-SCOTT, H.M. (1999b). Evolving Perspectives of Biofilm Structure. *Biofouling.* **14**(1): 75-90.

STRATHMANN, M., WINGENDER, J., FLEMMING, H.-C. (2002). Application of Fluorescently Labelled Lectins for the Visualization and Biochemical Characterization of Polysaccharides in Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods.* **50**(3): 237-248.

STRAYER, D.L. (1994). *Groundwater Ecology.* Limits to Biological Distributions in Groundwater; éd. par J. Gibert, D.L. Danielopol & J.A. Stanford. San Diego, California: Academic Press. Pages 287-310.

STURMAN, P.J., STEWART, P.S., CUNNINGHAM, A.B., BOUWER, E.J., WOLFRAM, J.H. (1995). Engineering Scale-up of *In Situ* Bioremediation Processes: A Review. *Journal of Contaminant Hydrology.* **19**(3): 171-203.

SUTHERLAND, I.W. (2001a). Exopolysaccharides in Biofilms, Flocs and Related Structures. *Water Science and Technology.* **43**(6): 77-86.

SUTHERLAND, I.W. (2001b). The Biofilm Matrix - An Immobilized but Dynamic Microbial Environment. *Trends in Microbiology.* **9**(5): 222-227.

SUTHERLAND, I.W. (2001c). Biofilm Exopolysaccharides: A Strong and Sticky Framework. *Microbiology.* **147**(1): 3-10.

SUTHERLAND, I.W. (1999a). *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function.* Biofilm Exopolysaccharides; éd. par J. Wingender, T.R. Neu & H.-C. Flemming. Berlin: Springer-Verlag. Pages 87-92.

SUTHERLAND, I.W. (1999b). *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function.* Polysaccharases in Biofilms – Sources – Action – Consequences! éd. par J. Wingender, T.R. Neu & H.-C. Flemming. Berlin: Springer-Verlag. Pages 201-213.

SUTHERLAND, I.W. (1997). *Biofilms Community Interactions and Control.* Microbial Biofilm Exopolysaccharides – Superglues or Velcro? éd. par J.W.T. Wimpenny, P. Hardley, P. Gilbert, H.M. Lappin-Scott. Strainfield, UK: Bioline Publications. Pages 33-39.

SUTHERSAN, S.S. (1997). *Remediation Engineering: Design Concepts.* Boca Raton, Fla.: CRC-Lewis Publishers. Pages 187-300.

TANYOLAC, A. & BEYENAL, H. (1997). Prediction of Average Biofilm Density and Performance of a Spherical Bioparticle under Substrate Inhibition. *Biotechnology and Bioengineering.* **56**(3): 319-329.

TAYLOR, S.W. & JAFFÉ, P.R. (1990). Biofilm Growth and the Related Changes in the Physical Properties of a Porous medium. I. Experimental Investigation. *Water Resources Research.* **26**(9): 2153-2159.

TEIXEIRA, P. & OLIVEIRA, R. (1998). The Importance of Surface Properties in the Selection of Supports for Nitrification in Airlift Bioreactors. *Bioprocess Engineering.* **19**(2): 143-147.

TIJHUIS, L., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J. (1995). Dynamics of Biofilm Detachment in Biofilm Airlift Suspension Reactors. *Biotechnology and Bioengineering.* **45**(6): 481-487.

TODD, D.K. (1980). *Groundwater Hydrology.* 2ième édition; éd. par D.K. Todd. New York: John Wiley. 535 pages.

TOLHURST, T.J., BLACK, K.S., SHAYLER, S.A., MARTHER, S., BLACK, I., BAKER, K., & PATERSON, D.M. (1999). Measuring the *in situ* Erosion Shear Stress of Intertidal Sediments with the Cohesive Strength Meter (CSM). *Estuarine Coastal and Shelf Science.* **49**(2): 281-294.

TRUDGILL, S. (1985). *Limestone Geomorphology.* Carbonate Rocks and Erosion Processes; éd. par K.M. Clayton. London: Longman Group. Pages 8-11.

TURNER, J.P. (1995). *Proceedings of the National Conference on Innovative Technologies for Site Remediation and Hazardous Waste Management.* Biofilm Barriers: A New Concept for Waste Containment. Pittsburgh, PA. Pages 101-109.

VAN DER KOOIJ, D. (2000). Biological Stability: A Multidimensional Quality Aspect of Treated Water. *Water Air and Soil Pollution.* **123**(1): 25-34.

VAN DUYL, F.C., DE WINDER, B., KOP, A.J., WOLLENZIEN, U. (2000). Consequences of Diatom Mat Erosion for Carbohydrate Concentrations and Heterotrophic Bacterial Activities in Intertidal Sediments of the Ems-Dollard Estuary. *Continental Shelf Research.* **20**(10): 1335-1349.

VAN LOOSDRECHT, M.C.M, HEIJNEN, J.J., EBERL, H., KREFT, J., PICIOREANU, C. (2002). Mathematical Modelling of Biofilm Structures. *Antonie van Leeuwenhoek.* **81**(1): 245-256.

VAN LOOSDRECHT, M.C.M., EIKELBOOM, D., GJALTEMA, A., MULDER, A., TIJHUIS, L., HEIJNEN, J.J. (1995). Biofilm structures. *Water Science and Technology*. **32**(8): 35-43.

VANDEVIVERE, P. & KIRCHMAN, D.L. (1993). Attachment Stimulates Exopolysaccharides Synthesis by a Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(10): 3280-3286.

VANDEVIVERE, P. & BAVEYE, P. (1992a). Saturated Hydraulic Conductivity Reduction Caused by Aerobic Bacteria in Sand Columns. *Soil Science Society of America Journal*. **56**(1): 1-13.

VANDEVIVERE, P. & BAVEYE, P. (1992b). Relationship Between Transport of Bacteria and their Clogging Efficiency in Sand Columns. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(8): 2523-2530.

VANDEVIVERE, P. & BAVEYE, P. (1992c). Effect of Bacterial Polymers on the Saturated Hydraulic Conductivity of Sand Columns. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(5): 1690-1698.

WAITE, M.E., GE, S., SPETZLER, H., BAHR, D.B. (1998). The Effect of Surface Geometry on Fracture Permeability: A Case Study Using Sinusoidal Fracture. *Geophysical Research Letters*. **25**(6): 813-816.

WARREN, L.A. & FERRIS, F.G. (1998). Continuum between Sorption and Precipitation of Fe(III) on Microbial Surfaces. *Environmental Science and Technology*. **32**(15): 2331-2337.

WÄSCHE, S., HORN, H., HEMPEL, D.C. (2002). Influence of Growth Conditions on Biofilm Development and Mass Transfer at the Bulk/Biofilm Interface. *Water Research*. **36**(19): 4775-4784.

WEISS, T.H., MILLS, A.L., HORNBERGER, G.M., HERMAN, J.S. (1995). Effect of Bacterial Cell Shape on Transport of Bacteria in Porous Media. *Environmental Science and Technology.* **29**(7): 1737-1740.

WHITE, W.B. (1988). *Geomorphology and Hydrology of Karst Terrains.* New York: Oxford University Press. 464 pages.

WILDERER, P.A. & CHARACKLIS, W.G. (1989). *Structure and Function of Biofilms.* Structure and Function of Biofilms. New York: John Wiley. Pages 5-17.

WIMPENNY, J. (1996). Ecological Determinants of Biofilm Formation. *Biofouling.* **10**(1/3): 43-63.

WITHERSPOON, P.A., WANG, J.S.Y., IWAI, K., GALE, J.E. (1980). Validity of Cubic Law for Fluid Flow in a Deformable Rock Fracture. *Water Resources Research.* **16**(6): 1016-1024.

WINGENDER, J., NEU, T.R., FLEMMING, H.-C. (1999a). *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function.* What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? éd. par: J.Wingender, T.R. Neu & H.-C. Flemming. Berlin: Springer-Verlag. Pages 1-19.

WINGENDER, J., NEU, T.R., FLEMMING, H.-C. (1999b). *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function.* Interaction Between Extracellular Polysaccharides and Enzymes; éd. par: J.Wingender, T.R. Neu & H.-C. Flemming. Berlin: Springer-Verlag. Pages 231-251.

WOLFAARDT, G.M., LAWRENCE, J.R., KORBER, D.R. (1999). *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function.* Function of EPS; éd. par: J Wingender, T.R. Neu, et H.-C. Flemming. Berlin: Springer-Verlag. Pages 172-200.

WORTHINGTON, S.H. (2002). Test Methods for Characterizing Contaminant Transport in a Glaciated Carbonate Aquifer. *Environmental Geology.* **42**(5): 546-551.

WUERTZ, S., SPAETH, R., HINDERBERGER, A., GRIEBE, T., FLEMMING, H.-C., WILDERER, P.A. (2001). A New Method for Extraction of Extracellular Polymeric Substances from Biofilms and Activated Sludge Suitable for Direct Quantification of Sorbed Metals. *Water Science and Technology*, **43** (6): 25-31.

WUERTZ, S., MÜLLER, E., SPAETH, R., PFLEIDERER, P., FLEMMING H.-C. (2000). Detection of Heavy Metals in Bacterial Biofilms and Microbial Flocs with the Fluorescent Complexing Agent Newport Green. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **24**:(2): 116-123.

YAKIMOV, M.M, AMRO, M.M., BOCK, M., BOSEKER, K., FREDRICKSON, H.L., KESSEL, D.G., TIMMIS, K.N. (1997). The Potential of *Bacillus licheniformis* Strains for In Situ Enhanced Oil Recovery. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. **18**(1): 147-160.

YU, T. & BISHOP, P.L. (2001). Stratification and Oxidation-Reduction Potential Change in an Aerobic and Sulfate-Reducing Biofilm Studied Using Microelectrodes. *Water Environment Research*. **73**(3): 368-373.

ZANINI, L., NOVAKOWSKI, K.S., LAPCEVIC, P., BICKERTON, G.S., VORALEK, J. & TALBOT, C. (2000). Ground Water Flow in a Fractured Carbonate Aquifer Inferred from Combined Hydrogeological and Geochemical Measurements. *Ground Water*. **38**(3): 350-360.

ZHANG, X. & BISHOP, P.L. (2003). Biodegradability of Biofilm Extracellular Polymeric Substances. *Chemosphere*. **50**(1): 63-69.

ZHANG, X., BISHOP, P.L., KINKLE, B.K. (1999). Comparison of Extraction Methods for Quantifying Extracellular Polymer in Biofilms. *Water Science and Technology*. **39**(7): 211-218.

ZHANG, T.C., FU, Y.C., BISHOP, P.L. (1994). Competition in Biofilms. *Water Science and Technology*. **29**(10/11): 263-270.

ZHANG, T.C. & BISHOP, P.L. (1994a). Density, Porosity, and Pore Structure of Biofilms. *Water Research.* **28**(11): 2267-2277.

ZHANG, T.C. & BISHOP, P.L. (1994b). Structure, Activity and Composition of Biofilms. *Water Science and Technology.* **29**(7): 335-344.

ZHAO, B., ZHANG, S., QIAN, P.-Y. (2003). Larval Settlement of the Silver- or Goldlip Pearl Oyster *Pinctada maxima* (Jameson) in Response to Natural Biofilms and Chemical Cues. *Aquaculture.* **220**(1): 883-901.

ANNEXES

ANNEXE I: Caractéristiques du calcaire utilisé pour l'essai de colmatage

Le calcaire qui a été utilisé pour l'essai de biocolmatage est un calcaire Saint-Marc. Ce type de calcaire est de couleur gris brun pâle, fossilifère, très compact, à grain moyen, à porosité très faible et renferme de très minces feuilles de schistes bitumineux noir (http: //www.stone.ca). Sa composition minéralogique révèle une forte proportion (> 15%) en oxydes de calcium et de magnésium.

Tableau I.1. Composition minéralogique du calcaire[1]

Paramètre	Proportion (%)
SiO_2	9.30
Al_2O_3	2.56
TiO_2	0.02
CaO	27.35
MgO	17.40
K_2O	1.86
Na_2O	0.05
$Fe_{(tot)}$	0.93
MnO	0.06
Perte au feu (1110°C)	39.85

[1]Tiré de Ross (1999)

ANNEXE II: Description du site de prélèvement de l'eau souterraine

L'eau souterraine qui a été utilisée pour l'établissement de la formule de l'eau souteraine synthétique ainsi que pour l'isolation de bactéries indigènes a été prélevée du puits de surface #5, situé à l'extrémité nord-ouest du site de Clarkson (Figure II.1).

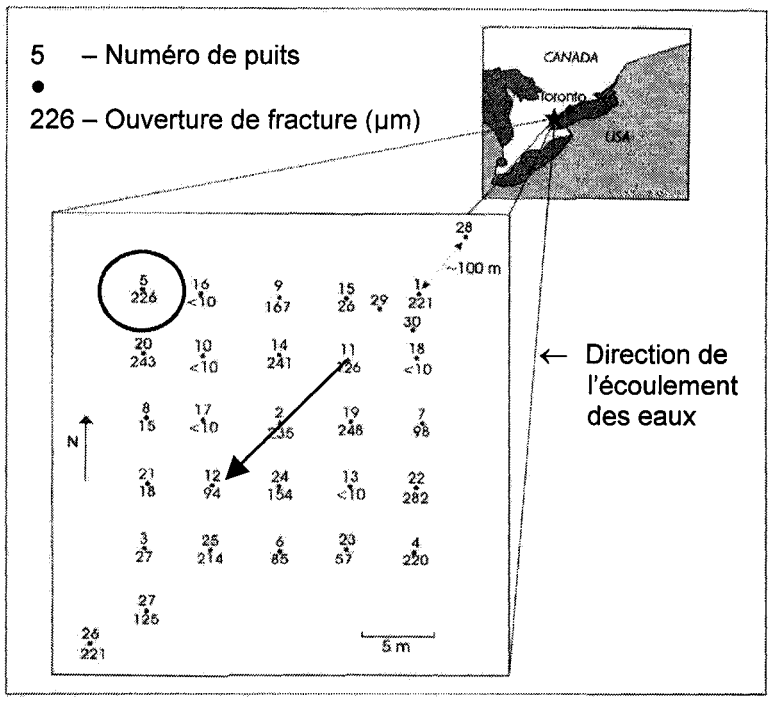


Figure II.1 Localisation du site et du puits de surface duquel l'eau souterraine naturelle a été prélevée (adapté de Ross et Bickerton, 2002)

Ce site, qui est équipé de 27 puits d'observation d'une profondeur de 17 à 18.5 mètres (Lapcevic *et al.*, 1999a), est non-contaminé et comporte un mort-terrain de sable argileux de 3 mètres d'épaisseur masquant le socle rocheux (Ross et Bickerton, 2002). Les 20 premiers mètres de la zone rocheuse sont formés de schiste argileux altéré d'une porosité de 1à 3%, et renfermant de nombreuses couches horizontales de calcaire d'une épaisseur maximale de 30 cm (Lapcevic *et al.*, 1999a). Les contacts aigus qui existent entre les couches de calcaire et le schiste argileux sont à l'origine de deux vastes fractures horizontales relativement peu profondes (~10.5 mètres sous le niveau de la surface) (Ross et Bickerton, 2002; Lapcevic *et al.*, 1999a), dans

lesquelles l'eau souterraine s'écoule vers le sud/sud-ouest (Lapcevic *et al.*, 1999a). C'est à partir de la fracture la plus profonde que l'eau souterraine a été prélevée. L'ouverture de cette fracture manifeste une forte variabilité (Lapcevic *et al.*, 1999a): elle est non détectable (i.e ± 10 µm) pour environ 25% des puits du site, traduisant un degré de fermeture important, mais supérieure à 50 µm dans les deux tiers des cas (Novakowski *et al.*, 1995).

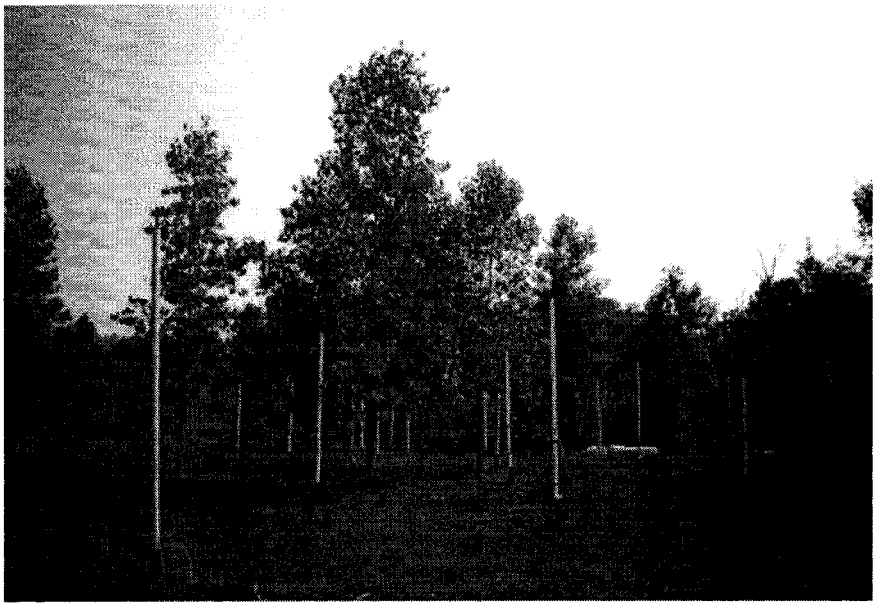


Figure II.2 Site de Clarkson, Mississauga, Ontario
Tiré de: http://www.ec.gc.ca/EnviroZine/french/issues/38/feature3_f.cfm
Reproduit avec la permission de Nathalie Ross

ANNEXE III: Comportement hydraulique initial du montage fracturé

Tableau III.1 Niveaux piézométriques vs débits

Position valve	Masse totale	Masse tare	Temps	Q	$Q_{mov.}$	Niveaux piézométriques (mm)			
						Piézomètre #			
	(g)		(min.)	(mL/min.)		1	2	3	4
15.5	–	–	–	0	0	21.75	21.5	21.0	19.5
14.7	33.275	30.774	19.77	0.1265	0.136	23.0	23.0	22.0	21.0
	30.767	29.298	10.57	0.1390		23.0	23.0	22.5	20.5
	31.856	29.333	17.77	0.1420		22.5	22.5	22.0	20.5
					Moy.	22.83	22.83	22.17	20.67
14.65	50.233	30.488	18.15	1.0879	1.087	24.5	23.0	22.5	21.0
	48.979	29.417	18.12	1.0797		24.0	23.5	22.5	20.5
	75.868	52.484	21.37	1.0944		24.5	23.5	22.5	21.0
					Moy.	24.33	23.33	22.5	20.83
14.55	72.627	50.806	13.68	1.5947	1.586	25.5	23.5	22.5	21.0
	67.100	49.781	10.97	1.5793		25.0	24.0	23.5	21.5
	68.848	50.835	11.37	1.5847		25.5	24.5	23.5	22.5
					Moy.	25.33	24.0	23.17	21.67
14.5	87.692	51.538	17.37	2.0818	2.070	25.5	24.5	23.5	22.5
	72.132	51.296	10.12	2.0596		25.5	25.0	23.5	21.5
	87.244	50.679	17.68	2.0678		26.5	25.0	23.5	21.5
	90.287	49.409	19.73	2.0715		26.5	25.0	23.5	22.5
	90.287	49.410	19.73	2.0715	Moy.	26.0	24.88	23.5	22.00
14.5	66.059	52.311	5.60	2.4551	2.472	26.0	24.5	23.5	22.0
	73.968	48.950	10.03	2.4934		26.5	25.0	23.5	22.5
	79.608	49.834	12.07	2.4674		26.0	25.0	23.5	22.0
					Moy.	26.17	24.83	23.5	22.17
14.4	72.795	49.725	7.88	2.9263	2.963	27.0	25.5	23.5	21.5
	67.875	30.651	12.57	2.9621		27.0	25.5	23.5	21.5
	87.606	50.666	12.32	2.9992		27.5	25.5	24.0	22.5
					Moy.	27.17	25.50	23.67	21.83
14.35	161.199	102.27	9.78	6.0234	6.021	29.0	27.0	24.0	23.0
	176.172	101.85	12.38	6.0020		29.5	27.0	24.0	22.0
	169.081	111.23	9.58	6.0361		30.5	28.0	25.0	23.0
					Moy.	29.67	27.33	24.33	22.67

Tableau III.2 Pertes de charge vs débit en fonction de la position le long de la fracture

	Δh (mm)			
	Distance des piézomètres (cm)			
Débit moyen (mL/min.)	Piézo 1	Piézo 2	Piézo 3	Piézo 4
	7.5	22.5	37.5	52.5
0.000	0.00	0.00	0.00	0.00
0.136	1.08	1.33	1.17	1.17
1.087	2.58	1.83	1.50	1.33
1.586	3.58	2.50	2.17	2.17
2.070	4.25	3.38	2.50	2.50
2.472	4.42	3.33	2.50	2.67
2.963	5.42	4.00	2.67	2.33
6.021	7.92	5.83	3.33	3.17

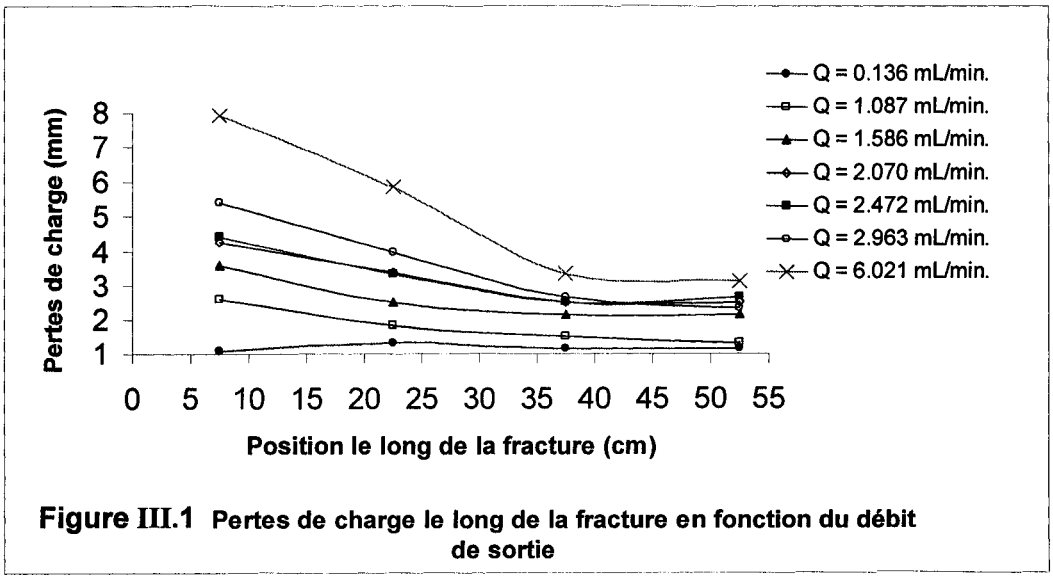


Figure III.1 **Pertes de charge le long de la fracture en fonction du débit de sortie**

Tableau III.3 Pertes de charge vs débit pour la zone centrale de la fracture

Débit moyen (mL/min.)	$\Delta h_2 - \Delta h_3$
0.000	0.00
0.136	0.16
1.087	0.33
1.586	0.33
2.070	0.88
2.472	0.83
2.963	1.33
6.021	2.50

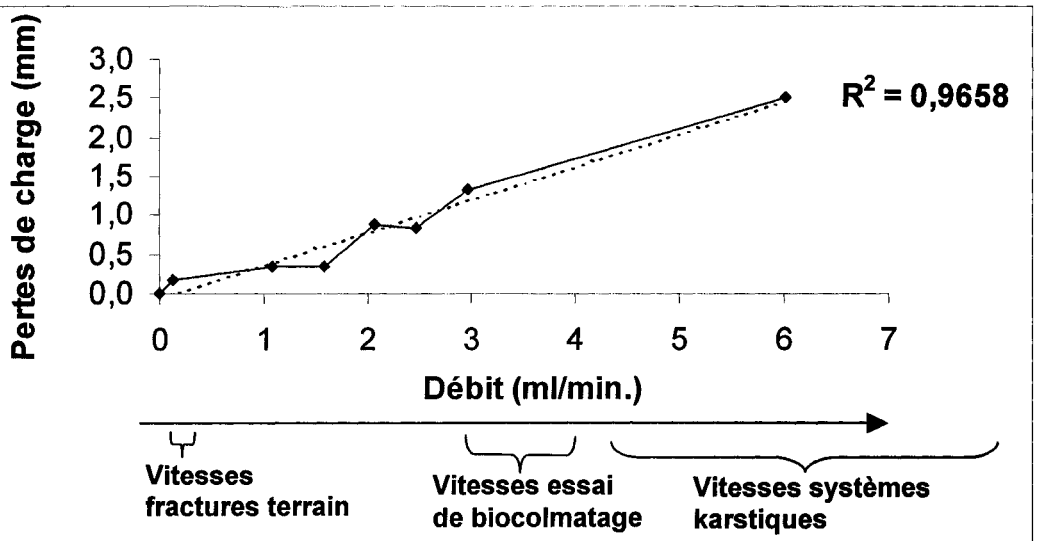


Figure III.2 Pertes de charge vs débit pour la zone centrale de la fracture

ANNEXE IV: Protocole PE 43A

Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites	**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**
Protocole #: PE 43A	**Nombres de pages:** 17
Version: 2 abrégée	**Date:** 02-03-2004
Auteur: Françoise Castegnier	
Approuvé par:	**Signatures:** **Date:**
Réjean Samson	☐ ☐ 31/08/04 ☐
Titre: Description du montage utilisé pour biocolmater, par l'utilisation d'une microflore indigène des eaux souterraines, un assemblage de deux plaques de calcaire reproduisant un milieu rocheux fracturé	
Mots clés: biocolmatage, microflore indigène des eaux souterraines, montage de plaques de calcaire, simulation d'un milieu rocheux fracturé	

1 OBJECTIF(S)

Le montage décrit dans le présent document vise à simuler une fracture dans un roc de calcaire alimentée en continu par de l'eau souterraine, dans des conditions reproduisant celles d'un aquifère au Québec (10°C et à la noirceur). Une étude antérieure [1] a démontré le potentiel de ce montage pour simuler le comportement hydrodynamique d'un biocolmatage induit par la colonisation d'un milieu rocheux fracturé par des microorganismes indigènes des eaux souterraines.

L'objectif de ce protocole est de décrire la composition, le mode d'assemblage ainsi que le fonctionnement des divers systèmes constituant le montage.

2. MATÉRIEL

Afin de faciliter sa description, le montage a été compartimenté en plusieurs systèmes qui ont été identifiés sur la figure IV.2.1. Ces systèmes sont les suivants:

- **Système A:** Système de l'assemblage des plaques de calcaire
- **Système B:** Système d'alimentation en eau souterraine
- **Système C:** Système de débordement de la chaudière d'alimentation
- **Système D:** Système d'alimentation en nutriments et en bactéries
- **Système E:** Système des lignes et raccords du circuit d'alimentation
- **Système F:** Système d'échantillonnage à la sortie du montage

Les pièces constituant les différents systèmes sont listées et décrites dans les tableaux 2.1 à 2.7 suivants, ainsi qu'identifiées sur les figures IV.2.1 à IV.2.7 des pages suivantes. La numérotation des pièces suit la nomenclature suivante:

Tableau IV.2.1 Nomenclature de la numérotation des pièces des différents systèmes

Système	Description du système	# pièce
A	Système de l'assemblage des plaques de calcaire	**1-8**
B	Système d'alimentation en eau souterraine	**10-16**
C	Système de débordement de la chaudière d'alimentation	**20-26**
D	Système d'injection des nutriments et des bactéries	**30-33**
E	Système des lignes et raccords du circuit d'alimentation	**40-56**
F	Système d'échantillonnage à la sortie du montage	**60-63**

2.1 Matériel général

- Chambre froide à 10°C
- Autoclave

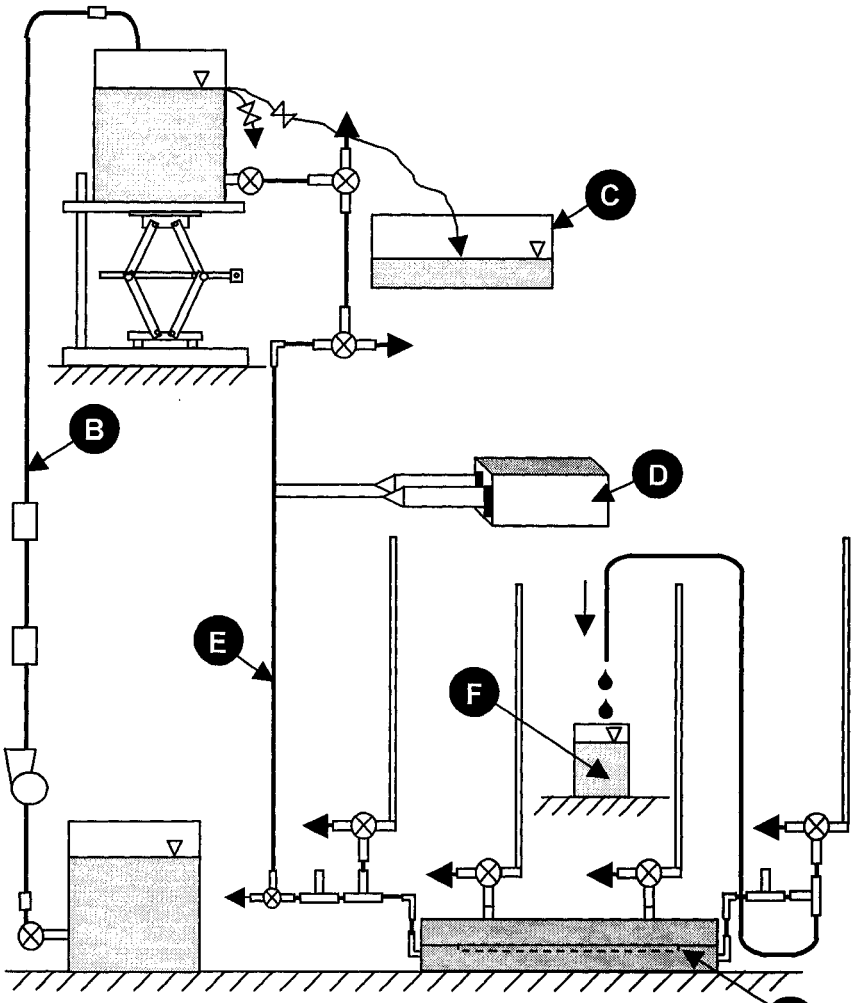


Figure IV.2.1 Schéma général du montage de biocolmatage

2.2 Matériel du système A: Assemblage des plaques de calcaire

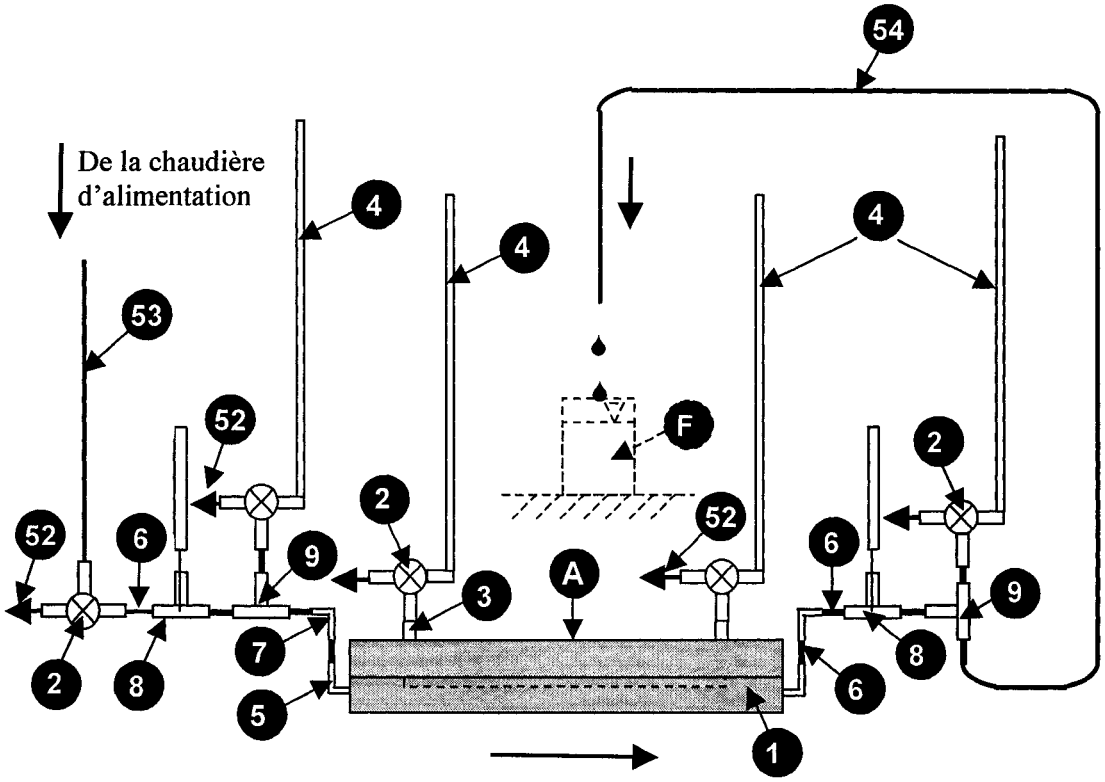


Figure IV.2.2 Système A: Assemblage des plaques de calcaire

Tableau IV.2.2 Composantes du système A: Assemblage des plaques de calcaire

# Pièce	Appellation	Description	Qtité
1	Assemblage des 2 plaques de calcaire	Plaques de calcaire étanchéifiées avec du silicone et immobilisées par des serres	1
2	Valve de commutation à 3-voies	Valve de commutation à 3 voies pour tube ¼'' OD	4
3	Tige raccordant l'assemblage des plaques à la valve 3-voies	Tige cylindrique ¼'' OD x 11/64'' ID x 5-cm de long	2
4	Piézomètre	Tube de polycarbonate 6-mm OD x 3-mm ID x ~250-cm de long	2
5	Raccord en coude inséré dans les extrémités des plaques inférieures	Raccord coude union de nylon pour tube ¼'' OD x ¼'' filet NPT	2
6	Tube hydraulique	Tube PTFE 6-mm OD x 4.48-mm ID x 5-cm long; autoclavable	9
7	Raccord coude raccordant plaques au circuit hydraulique principal	Raccord à tube coude union pour tubes ¼'' OD en acier inoxydable	2
8	Raccord en T muni d'un septum pour l'insertion des microélectrodes	Raccord Té-Union pour tubes ¼'' OD Septum SS-138; 9.5 mm Ø x 3 mm épais comportant une face en téflon	2 2
9	Raccord pour connection des 2 piézomètres situés en amont et en aval des plaques	Raccord Té-Union pour tubes ¼'' OD	2
(52)[§]	Tube de purge ou d'échantillonnage	Tube PTFE, 6-mmOD x 4.48-mm ID, ~10-15 cm de long	4
(53)[§]	Tube du circuit d'alimentation principal en amont des plaques	Tube PTFE autoclavable 6-mm OD x 4.48-mm IDx 80-cm de long	1
(54)[§]	Tube de sortie de l'assemblage des plaques	Tube PTFE, 6-mm OD x 4.48-mm ID, 160-cm de long	1

[§]Pièces du circuit d'alimentation

2.3 Matériel du système B: Alimentation en eau souterraine synthétique

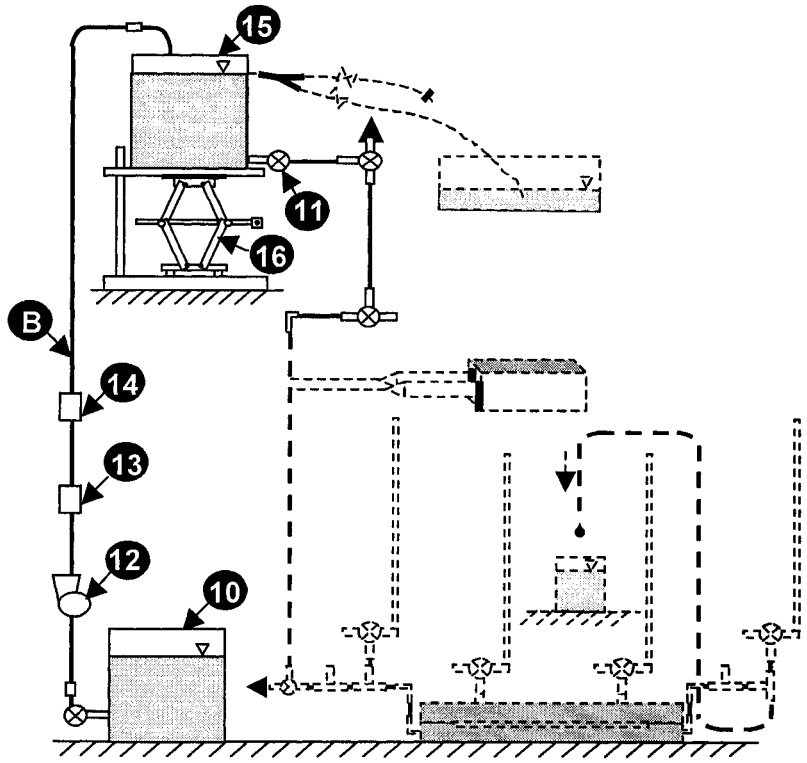


Figure IV.2.3 Système B: Alimentation en eau souterraine

Tableau IV.2.3 Composantes du système B: Alimentation en eau souterraine

# Pièce	Appellation	Description	Qtité
10	Réservoir d'alimentation en eau souterraine	Réservoir cylindrique polypropylène (PP); 11"Ø x 15" H x 3/16" épais; Capacité 18.92 L	1
11	Valve réservoir ou chaudière d'alimentation	Valve à pointeau à chapeau intégral en acier inox. 316; *Entrée:* NPT mâle ¼; *Sortie:* ¼	2
12	Pompe péristaltique Tête de pompe	Pompe péristaltique électrique 1/10 hp Tête de pompe EASY-LOAD Masterflex	1 1
13	Capsule de filtration 0.45µm Ø de pores	Capsule de filtration stérile, 0.45µm Ø pores, capacité ~ 20 litres	1
14	Capsule filtrante 0.22µm	Capsule de filtration, 0.2µm Ø pores, ~ 20 L	1
15	Chaudière d'alimentation	Réservoir cylindrique identique à l'item # 10	1
16	Trépied de la chaudière d'alimentation	Système supportant la chaudière, muni d'un cric d'auto modifié permettant de modifier l'élévation de cette dernière	1

2.4 Matériel du système C: Système de débordement de l'eau souterraine

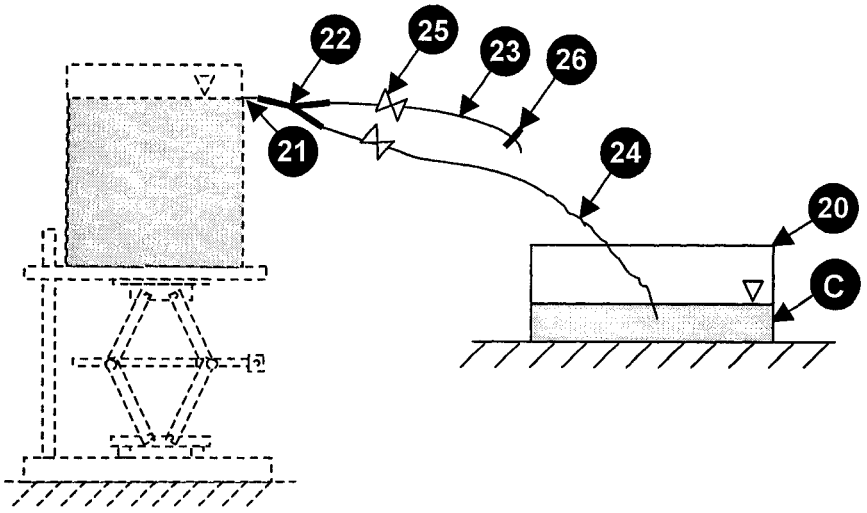


Figure IV.2.4 Système C: Débordement de la chaudière d'alimentation

Tableau IV.2.4 Composantes du système C: Débordement de la chaudière d'alimentation

# Pièce	Appellation	Description	Qtité
20	Bac de débordement pour eau souterraine	Bac en plastique d'une capacité de 25 à 30 L pour emmagasiner le trop-plein d'eau provenant de la chaudière d'alimentation	1
21	Tube inséré dans la chaudière d'alimentation & raccordé au raccord en "Y"	Tube de silicone translucide 6.4 mm ID x 9.5 mm OD x ~10 cm long	1
22	Raccord reliant le tube inséré dans la chaudière aux tubes de débordement et d'échantillonnage	Raccord en "Y" en polypropylène	1
23	Tube d'échantillonnage de l'eau de la chaudière d'alimentation	Tube de silicone translucide 6.4 mm ID x 9.5 mm OD x ~30 cm long	1
24	Tube de débordement	Tube de silicone translucide 6.4 mm ID x 9.5 mm OD x ~150 à 180 cm long	1
25	Pince de serrage permettant de contrôler le débit de sortie	Pince de serrage en polypropylène pour tube 3.2 à 13 mm OD comportant 15 positions d'ajustement	2
26	Filtre ayant pour but d'empêcher la pénétration des bactéries provenant de l'air ambiant	Unité filtrante 0.22 µm $Ø_{pores}$ pour seringue	1

2.5 Matériel du système D: Système d'injection des nutriments et des bactéries

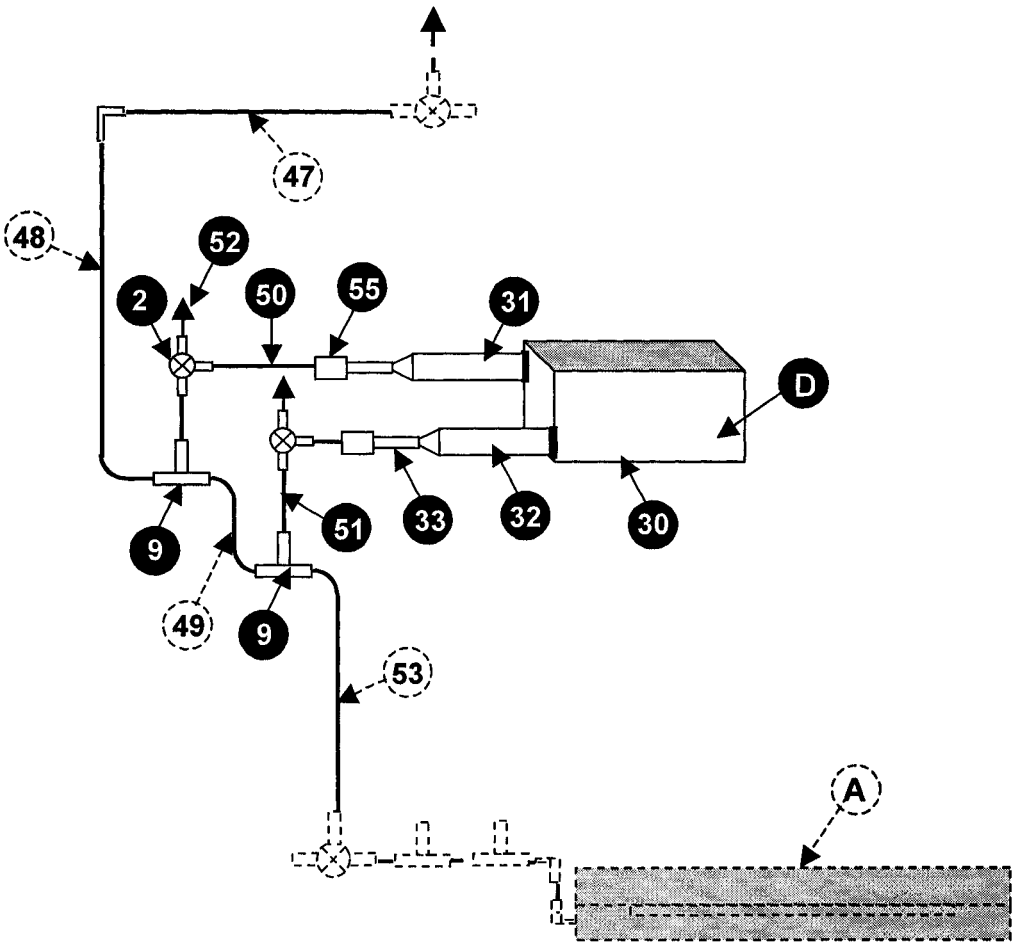


Figure IV.2.5 Système D: Alimentation en nutriments et en bactéries

Tableau IV.2.5 Composantes du système D: Injection des nutriments et des bactéries

# Pièce	Appellation	Description	Qtité
2	Valve de commutation à 3-voies	Valve de commutation à 3 voies pour tube ¼'' OD	2
9	Raccord en Té connectant le circuit de la pompe-seringue au circuit principal	Raccord Té-Union pour tubes ¼'' OD	2
30	Pompe-seringue	Pompe-seringue M 365 Sage Orion	1
31	Seringue d'injection comportant le milieu nutritif	1 seringue LUER-LOK ™ de 60 mL stérile jetable en plastique Becton Dickinson	1
32	Seringue d'injection comportant l'inoculum	1 seringue LUER-LOK ™ de 60 mL stérile jetable	1
33	Tube de silicone tenu par un *tie-wrap* sur l'extrémité des seringues d'injection (nutriments/bactéries) venant s'insérer dans un connecteur "*barb*" (#54)	Tube de silicone translucide 6.4 mm ID x 9.5 mm OD x ~3 cm long	2
50	Tube permettant de connecter chaque raccord "*barb*" (#55) à la valve (#2) située en aval	Tube PTFE, 6-mmOD x 4.48-mm ID, ~15 cm de long	2
51	Tube hydraulique reliant la valve (#2) au raccord en Té (#9) du circuit d'alimentation principal	Tube PTFE, 6-mmOD x 4.48-mm ID, ~15 cm de long	2
52	Tube de purge ou d'échantillonnage	Tube PTFE, 6-mmOD x 4.48-mm ID, ~10-15 cm de long	2
55	Connecteur "*barb*" raccordant chaque seringue à un tube (#50)	Raccord "*barb*" pour tubes ¼'' OD en acier inox.	2

2.6 Matériel du système E: Lignes et raccords du circuit d'alimentation en eau

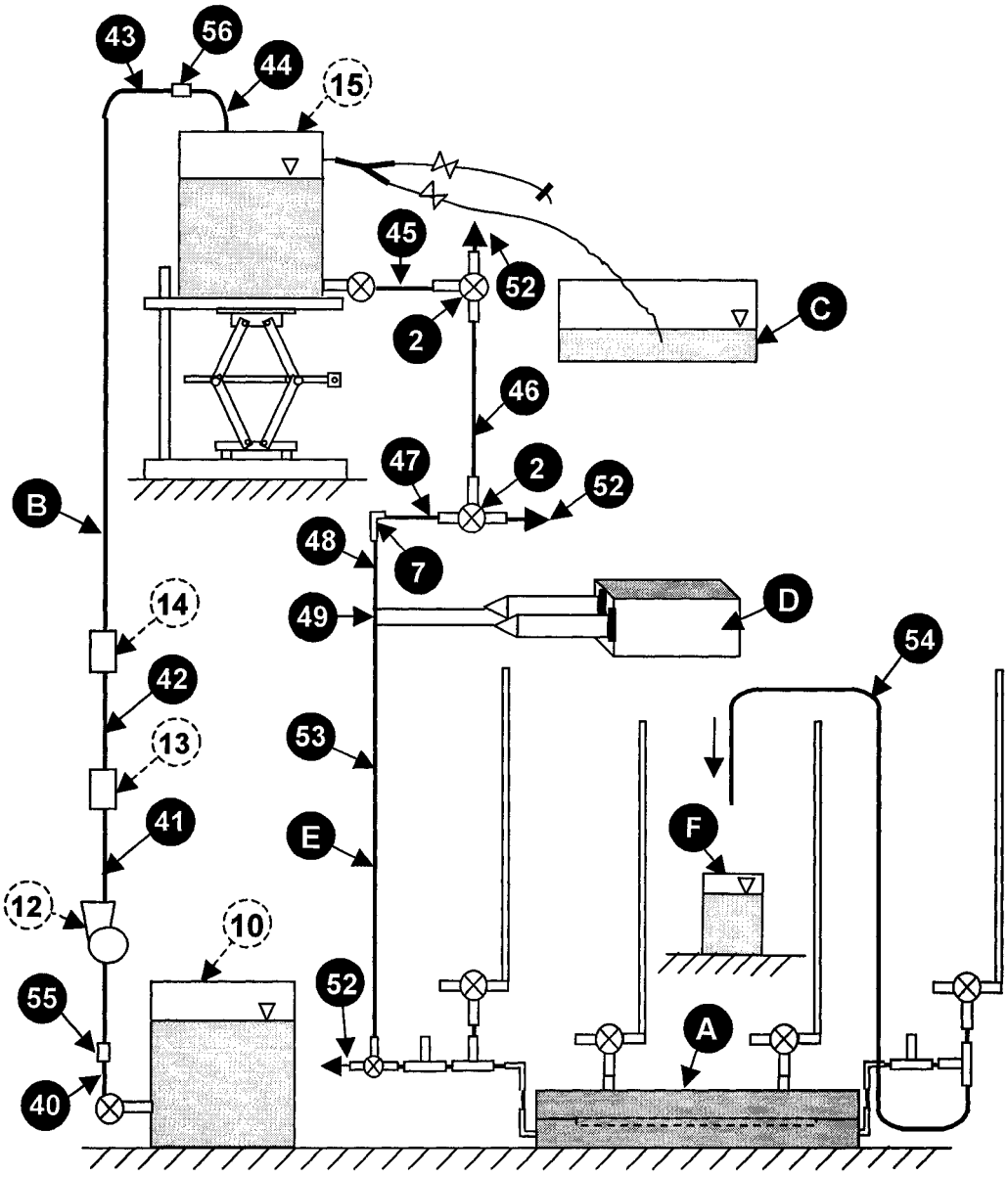


Figure IV.2.6 Système E: Lignes et raccords du circuit d'alimentation en eau souterraine

Tableau IV.2.6 Composantes du système E: Lignes et raccords du circuit d'alimentation

# Pièce	Appelation	Description	Qtité
2	Valves de purge situées en aval de la chaudière d'alimentation	Valve de commutation à 3 voies pour tube ¼'' OD	2
7	Raccord coude raccordant les tubes (#47) et (#48)	Raccord à tube coude union pour tubes ¼'' OD en acier inox.	1
40	Tube hydraulique reliant le robinet du réservoir au raccord "*barb*" (#55)	Tube PTFE 6-mm OD x 4.48-mm ID x 5-cm long (autoclavable)	1
41	Tube reliant raccord "*barb*" (#55) en amont & la capsule de filtration (#13) aval, et passant dans la tête de pompe	Tube de silicone translucide 6.4 mm ID x 9.5 mm OD x ~150 cm long	1
42	Tube reliant les 2 capsules de filtration (#13) & (#14)	Tube de silicone 6.4 mm ID x 9.5 mm OD x ~180 cm long	1
43	Tube reliant la capsule de filtration (#14) et le connecteur droit (#56)	Tube de silicone 6.4 mm ID x 9.5 mm OD x ~150 cm long	1
44	Tube reliant raccord (#56) et la chaudière d'alimentation (#15) dans lequel il vient s'insérer (couvercle)	Tube de silicone 6.4 mm ID x 9.5 mm OD x ~50 cm long	1
45	Tube reliant le robinet de la chaudière d'alimentation & la valve (#2)	Tube PTFE 6-mm OD x 4.48-mm ID x ~30 cm long	1
46	Tube reliant les 2 valves de purge situées en aval de la chaudière	Tube PTFE 6-mm OD x 4.48-mm ID x ~100 cm long	1
47	Tube reliant la 2ième valve de purge au raccord coude (#7)	Tube PTFE 6-mm OD x 4.48-mm ID x ~30 cm long	1
48	Tube reliant le raccord coude (#7) au 1er raccord en T situé vis-à-vis du système D (Figure IV.2.5, Tableau IV.2.5)	Tube PTFE 6-mm OD x 4.48-mm ID x ~30 cm long	1
49	Tube reliant les 2 raccords en T situés vis-à-vis du système D	Tube PTFE 6-mm OD x 4.48-mm ID x ~5 cm long	1
52	Tube de purge ou d'échantillonnage	Tube PTFE, 6-mm OD x 4.48-mm ID, ~10-15 cm de long	3
53	Tube reliant la pompe-seringue à l'assemblage des plaques de calcaire	Tube PTFE, 6-mm OD x 4.48-mm ID, ~120-150 cm de long	1
54	Tube très long situé à la sortie de l'assemblage des plaques de calcaire	Tube PTFE, 6-mm OD x 4.48-mm ID, ~150-200 cm de long	1
55	Connecteur "*barb*" raccordant le réservoir d'alimentation au tube (#41)	Raccord "*barb*" pour tubes ¼'' OD en acier inox.	1
56	Connecteur droit raccordant les tubes de silicone (#43) & (#44)	Connecteur droit "*barb*" en polypropylène	1

2.7 Matériel du système F: Système de prélèvement

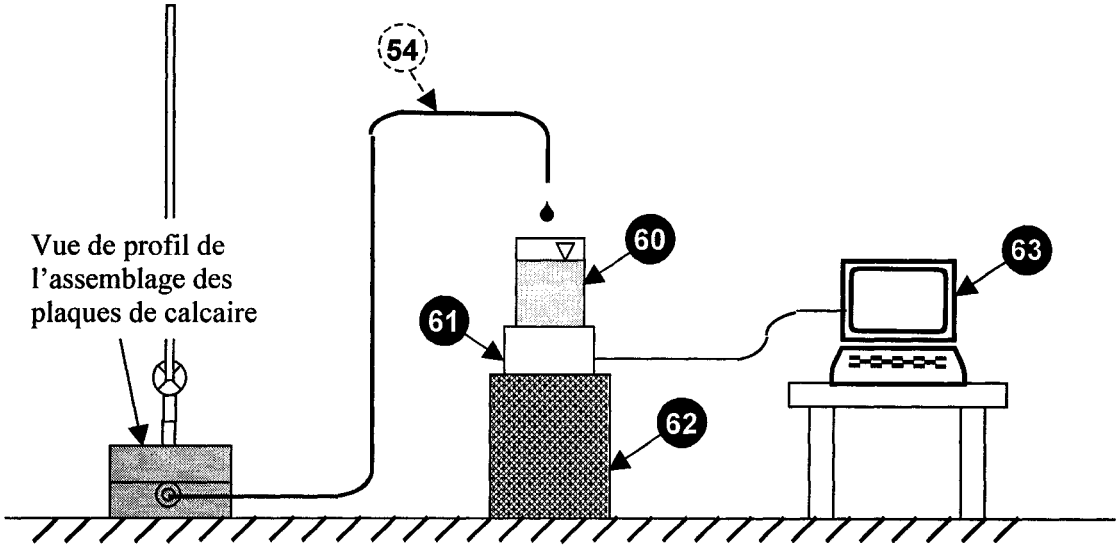


Figure IV.2.7 Système F: Système de prélèvement

Tableau IV.2.7 Composantes du système F: Système de prélèvement

N^0 Pièce	Appellation	Description	Qtité
60	Récipient de récupération ou d'échantillonnage	Récipient d'échantillonnage fourni par les Cies effectuant les analyses ou récipient de récupération de volume variable	1
61	Balance	Balance électronique à plateau supérieur (*top loading*) comportant un port RS232	1
62	Élévation	Table, tabouret, réservoir ou autre objet servant à déposer le récipient de récupération ou d'échantillonnage et l'élever à la hauteur du tube de sortie	1
63	Système d'acquisition de données	Ordinateur	1
53	Tube de sortie de l'assemblage des plaques	Tube de PTFE, 6-mm OD x 4.5-mm ID x 160-cm long; autoclavable	1

3 MÉTHODOLOGIE

3.1 Description et assemblage des différents systèmes

3.1.1 Système A: Assemblage des plaques de calcaire

Deux plaques de calcaire (5 cm x 10 cm x 60 cm) taillées à partir d'un large bloc de calcaire extrait d'une carrière opérant dans la région métropolitaine de Montréal, ont été utilisées pour simuler un roc fracturé. La fracture a été simulée par une cannelure linéaire simple de section rectangulaire (4.5 mm largeur x 1.55 mm profondeur x 49.8 cm longueur, volume de 2.6 cm^3) qui a été taillée sur la face supérieure de la plaque de calcaire inférieure à l'aide d'une lame de coupe pour roc (voir Figures IV.5.1 à IV.5.5 en annexe). L'étanchéité de l'assemblage a été obtenue en collant les plaques avec du silicone d'aquarium et en les immobilisant avec des serres. Le silicone a été appliqué jusqu'à 1" du bord de la zone fracturée sur la surface supérieure du bloc inférieur et sur la surface inférieure du bloc supérieur de façon à ne pas boucher la fracture lors de l'assemblage des plaques. Le volume disponible pour le colmatage résultant de l'utilisation de cette méthode d'étanchéification représente en fait le volume délimité par le silicone qui a été étalé entre les deux plaques une fois séché. Ce volume devrait être supérieur au volume de la fracture (voir Figure IV.5.1). Une valve de commutation à 3 voies (#2) fixée au bout d'une tige cylindrique (#3) a été insérée verticalement à deux endroits le long de la fracture et un piézomètre (#4) a été connecté à un des ports d'injection de chaque valve (#2). Le système constitué des 2 piézomètres permet ainsi de mesurer les variations de pertes de charge entre l'entrée et la sortie de la fracture.

L'injection de l'eau souterraine à l'entrée de l'assemblage des plaques et sa récupération à la sortie sont réalisées grâce à deux raccords en coude de nylon **(#5)** insérés respectivement dans les extrémités de la plaque de calcaire inférieure. Chaque raccord en coude est connecté à un tube hydraulique court **(#6)**. Ce tube hydraulique est connecté à un raccord à tube coude-union **(#7)**, qui est lui-même raccordé, par l'intermédiaire d'un autre tube hydraulique court **(#6)**, à:

- un raccord "té union" **(#9)** relié à un piézomètre, en amont des plaques;
- un raccord "té union" muni d'un septum **(#8)** servant à l'insertion de microélectrodes, en aval des plaques;

En amont des plaques, le raccord **(#9)** est connecté à un raccord "té union" muni d'un septum **(#8)** grâce à un tube hydraulique court **(#6)**, et en aval des plaques, le raccord "té union" **(#8)** est connecté par un tube hydraulique **(#6)** à un raccord "té union" **(#9)** porteur d'un piézomètre.

En amont des plaques, le raccord "té union" **(#8)** est connecté par un tube hydraulique **(#6)** à une valve-3 voies **(#2)**, tandis qu'en aval des plaques, la 2ième sortie du raccord "té union" **(#9)** est connectée à un tube de sortie en PTFE **(#54)**.

3.1.2 Système B: Alimentation en eau souterraine synthétique

Le système d'alimentation en eau souterraine synthétique est constitué des éléments suivants:

- Un **réservoir d'alimentation (#10)** d'une capacité de 19 litres permettant de stocker l'eau souterraine synthétique;
- Une **pompe péristaltique électrique (#12)** permettant de faire circuler l'eau du réservoir d'alimentation dans le circuit d'alimentation principal;
- Deux **capsules de filtration** pré-stérilisées montées en série et assurant la filtration de l'eau souterraine synthétique. Le but du 1er filtre **(#13)** est de retenir les matières et microorganismes de taille supérieure à 0.45 µm présents dans l'eau du réservoir d'alimentation, et le but du second filtre **(#14)** est de retenir les bactéries de taille supérieure à 0.22 µm;
- Une **chaudière d'alimentation en eau souterraine (#15)**, d'une capacité de 19 litres, servant à emmagasiner l'eau pompée après qu'elle ait été filtrée. Le rôle de cette chaudière est d'alimenter en continu en eau souterraine synthétique l'assemblage des plaques rocheuses, en conservant une charge hydraulique constante. Afin d'assurer une constance dans la charge hydraulique appliquée, le niveau d'eau de la chaudière doit être gardé à son maximum par:
  - Un apport continu en eau provenant du réservoir d'alimentation,
  - Un système de trop-plein assurant un débordement de l'eau lorque le niveau de celle-ci dépasse une certaine hauteur de colonne, déterminée par un trou percé dans la paroi de la chaudière. Le ''trop-plein'' d'eau provenant de la chaudière d'alimentation est recueilli dans le bac de débordement **(#20)**, d'une capacité de 25 à 30 L. Cette hauteur de charge hydraulique influence directement la vitesse ou le débit d'eau à l'entrée des plaques et peut être modifié en ajustant la hauteur de la chaudière grâce au système d'élévation **(#16)** et/ou l'ouverture de la valve à pointeau **(#11)** de la chaudière d'alimentation **(#15)**.

3.1.3 Système C: Débordement de l'eau souterraine

Le système de débordement de l'eau souterraine comporte:

- Un **tube d'insertion (#21)** en silicone introduit dans un trou circulaire de 6 mm de diamètre percé dans la paroi verticale de la chaudière d'alimentation;
- Un **raccord en polypropylène (PP) en "Y" (#22)**, servant à raccorder le tube d'insertion de la chaudière **(#21)** à:
    - un **tube d'échantillonnage (#23)**, muni d'un **système de contrôle du débit par barrure (#25)**. Ce système de contrôle de débit, qui n'est débarré que pour effectuer des prélèvements d'eau, assure un débit d'eau nul en position complètement fermée. Afin de prévenir tout risque de contamination par l'air ambiant, un filtre **(#26)** est placé dans l'extrémité du tube **(#23)** lorsqu'aucun prélèvement n'est effectué;
    - un tube de débordement **(#24)** dont l'extrémité est placée dans le bac de débordement (#20).
- Un **bac de débordement (#20),** d'une capacité de 25 à 30 L, servant à récupérer l'eau souterraine du trop-plein de la chaudière d'alimentation déversée par le biais du tube de débordement.

3.1.4 Système D: Injection des nutriments et des bactéries

Le système d'injection des nutriments et des bactéries est constitué de:

- Une **pompe-seringue (#30)**, constituée d'un plateau mobile actionnant deux seringues de 60 mL disposées parallèlement et maintenues en position horizontale par un système de support à ressorts;
- Deux **seringues de plastique** LUER-LOK ^{TM} de 60 mL, sans aiguille, **(#31)** et **(#32)**, servant à injecter le milieu nutritif stérile et l'inoculum respectivement. Chacune des seringues est munie à son extrémité d'un court tube de silicone **(#33)**. Une extrémité du tube (#33) est insérée autour du bec de la seringue et attachée sur celle-ci à l'aide d'un *tie-wrap*, alors que l'extrémité libre vient s'insérer dans un raccord *barb* **(#55)**;
- Deux **petits circuits hydrauliques**, disposés parallèlement, qui viennent se connecter au circuit d'alimentation principal. Chaque circuit, qui est monté en série avec chaque seringue d'injection, comporte:

- Un **tube de PTFE (#50)**, reliant le raccord *barb* **(#55)** à une valve à 3 voies **(#2)** permettant de purger ou d'échantillonner le contenu du circuit d'injection amont;
- Un **tube de PTFE (#51)**, reliant la valve à 3 voies **(#2)** à un raccord en Té **(#9)** faisant partie du circuit d'alimentation principal;

Ces deux petits circuits hydrauliques sont reliés par un **tube de PTFE (#49)** assurant la jonction entre les deux Té **(#9)** du circuit d'alimentation principal.

3.1.5 Système E: Lignes et raccords du circuit d'alimentation

Ce système comporte:

- Un **raccord *"barb"* (#55)**, permettant de connecter le tuyau de sortie du robinet du réservoir d'alimentation **(#10)** au circuit principal d'alimentation;
- Un **tube de PTFE (#40)** connectant le robinet du réservoir d'alimentation au raccord *barb* **(#55)**;
- Un **tube de silicone (#41)** permettant de connecter le raccord *"barb"* **(#55)** du réservoir d'alimentation **(#10)** au filtre **(#13)**. Ce tube est également inséré dans les mâchoires de la pompe péristaltique **(#12)**;
- Un **tube de silicone (#43)** raccordant les filtres **(#13)** et **(#14)**;
- Un **tube de silicone (#43)** raccordant le filtre **(#14)** au raccord **(#56)**;
- Un **raccord *barb* (#56)**, connectant les tubes hydrauliques **(#43)** et **(#44)**;
- Un **tube de silicone (#44)** inséré dans la chaudière d'alimentation par un trou de 6 mm de diamètre percé dans le couvercle de la chaudière;
- Un **tube de PTFE (#45)** connecté directement à la sortie de la chaudière **(#15)**;
- Un **tube de PTFE (#46)** reliant les 2 **valves 3 voies (#2)**;
- Un **tube de PTFE (#47)** reliant la 2ième valve **(#2)** et le raccord coude-union **(#7)**;
- Un **tube de PTFE (#48)** situé en amont du système de la pompe-seringue (système D);
- Un **tube de PTFE (#49)**, situé entre les deux raccords en Té et permettant de relier le système D au circuit d'alimentation principal;
- Un **tube de PTFE (#53)** reliant le système à l'assemblage des plaques;
- Un **tube de PTFE (#54)** situé à la sortie de l'assemblage des plaques;

3.1.6 Système F: Système de prélèvement

Dans ce système, un port de la balance **(#61)** est connecté à l'ordinateur **(#63)**, permettant d'enregistrer en temps réel la masse d'eau souterraine éluée (mesure en continu du débit d'eau).

4. RÉFÉRENCE

[1] Ross, N. (1999). Clogging of a Single Fracture in Limestone with a Groundwater Microbial Community. Dans: Innocuité environnementale de la stimulation d'une microflore indigène dans une perspective de biocolmatage d'une nappe aquifère de roc fracturé. Thèse de Ph. D., École Polytechnique de Montréal.

5. ANNEXES

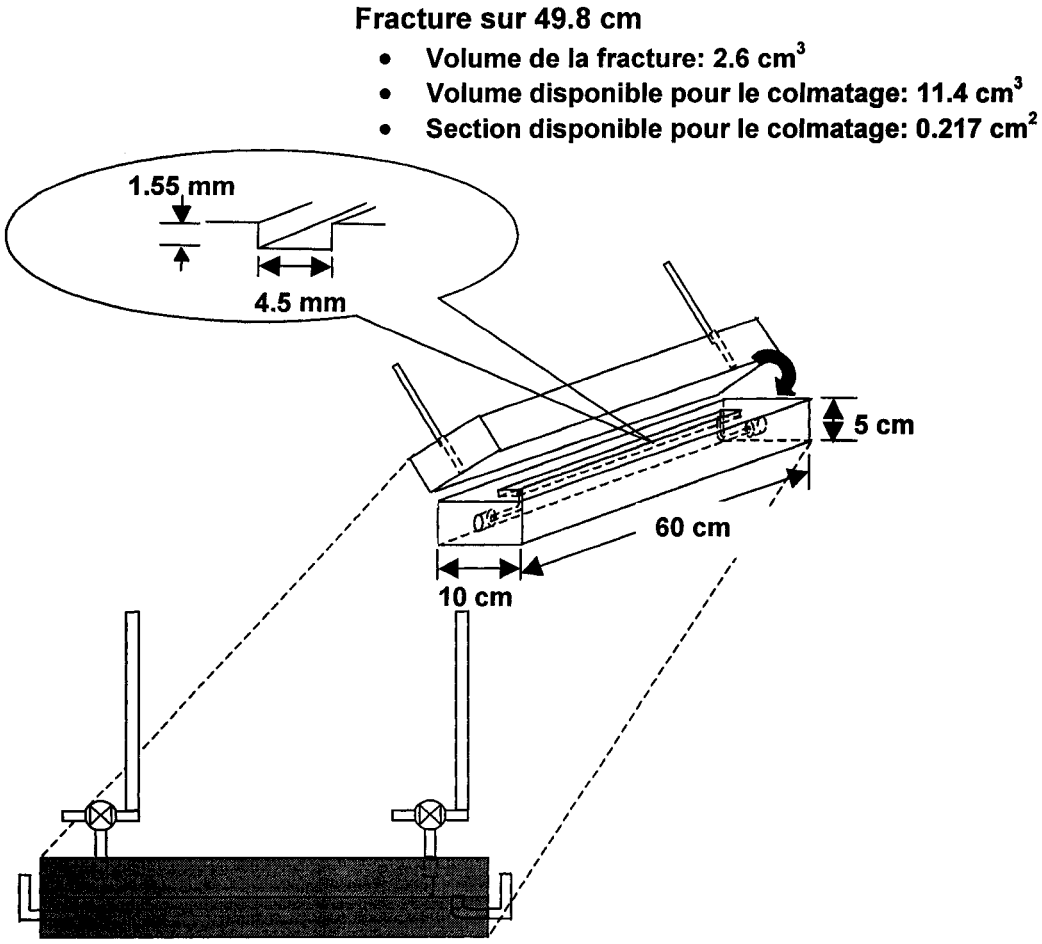


Figure IV.5.1 Assemblage des plaques de calcaire

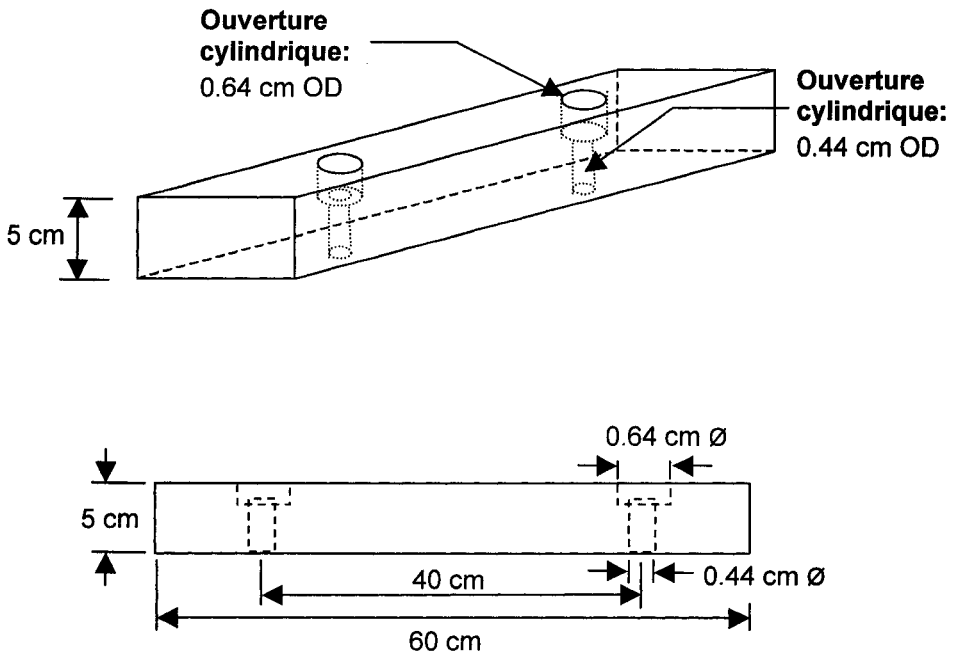


Figure IV.5.2 Vue tridimensionnelle (haut) et d'élévation (bas) de la plaque de calcaire

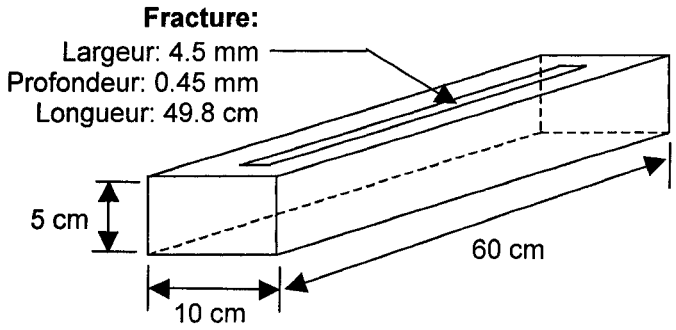


Figure IV.5.3 Vue tridimensionnelle de la plaque de calcaire inférieure

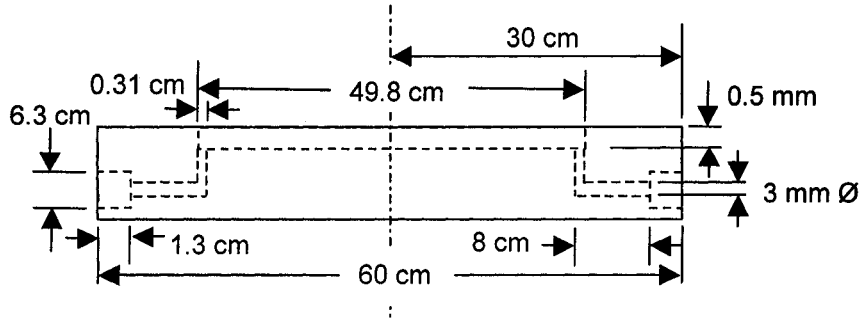


Figure IV.5.4 Vue d'élévation de la plaque de calcaire inférieure

ANNEXE V: Protocole PE 43B

Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites	**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**
Protocole #: PE 43B	**Nombres de pages:** 19
Version: 1	**Date:** 03-09-01
Auteur(s): Françoise Castegnier	
Approuvé par:	**Signatures:** **Date:**
Manon Leduc	☒ Manon Leduc 31-03-04
Réjean Samson	☐ Réjean Samson 31/4/04
	☐

Titre: Préparation d'une solution d'eau souterraine synthétique par gravimétrie
Mots clés: eau souterraine synthétique, préparation d'une eau souterraine, analyse chimique d'une eau souterraine

1. OBJECTIFS

Le présent protocole suggère une méthode pour établir la formule d'une eau souterraine synthétique à partir de l'analyse chimique des principaux constituants d'une eau souterraine naturelle et pour préparer l'eau souterraine synthétique à partir de la formule établie.

L'eau souterraine synthétique est souvent utilisée pour simuler le plus fidèlement possible de l'eau souterraine naturelle lorsque:

- Il est peu pratique, et parfois impossible, de prélever d'importants volumes d'eau naturelle, et ce, à des fins expérimentales,
- On veut éviter des variations, par exemple saisonnières, dans la composition de l'eau souterraine, par exemple pour des expériences de longues durées.

2. MATÉRIEL

- Eau souterraine naturelle d'un volume de 2 litres prélevée d'un puits de surface depuis moins de 30 heures, et conservée à 4°C;
- 16 litres ou plus d'eau déionisée;
- 8 bidons à essence en polypropylène (PP) (autoclavables) de 4.7 litres, à bouchons vissables;
- 1 bidon à essence de 15 litres à bouchon vissable, autoclavable, et muni d'un gros barreau magnétique (6 à 7.5 cm de long);
- 1 bécher de 500 mL pré-stérilisé à l'autoclave;
- 4 béchers de 25 mL pré-stérilisés à l'autoclave;
- 1 bécher de 25 mL muni d'un petit barreau magnétique;
- 4 béchers de 10 mL pré-stérilisés à l'autoclave;
- 2 brûleurs;
- 1 agitateur magnétique;
- Éthanol 70%;
- 1 balance analytique METTLER TOLEDO AB204 portative, dont les parois internes seront pré-stérilisées par nettoyage à l'éthanol;
- 1 balance *METTLER PE 16*
- Spatules pré-stérilisées à l'autoclave;
- Pipette automatique pipetman de 10 mL;
- Embouts stériles pour pipette automatique 10 mL;
- Pipette automatique pipetman de 1000 µl;
- Embouts stériles pour pipette automatique de 1000 µl;
- pH-mètre accumet®, modèle 25;
- Les produits chimiques suivants:
    - Chlorure de potassium (KCl), Anachemia, #7600
    - Chlorure de sodium (NaCl), Anachemia, #AC-8304
    - Chlorure de calcium ($CaCl_2$), Fisher Scientific, #C77-500
    - Sulfate de magnésium ($MgSO_4.7H_2O$), Anachemia, AC-5568
    - Bicarbonate de soude ($NaHCO_3$), Anachemia, 8248

- Chlorure ferreux ($FeCl_2.3.2H_2O$), Anachemia, AC-4500
- Nitrate de calcium ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$), Anachemia, AC-1983
- Phosphate de sodium dibasique ($Na_2HPO_4.7H_2O$) Anachemia, AC-8460
- Hydroxyde de potassium (KOH) Anachemia, AC-7650
- Acide chlorhydrique (HCl) Anachemia, AC-4955

- Solution d'eau de javel (hypochlorite de sodium) 5.25%;
- 1 chronomètre;
- 1 unité de filtration Millipore Express en PES (polyéthersulfone) de 500 mL et 0.22 µm de pores, Fischer Scientific, #SCGP U05 RE;
- 1 ballon de 500 mL;
- 1 bouteille de verre de 1L à bouchon vissable pré-stérilisée à l'autoclave;
- Autoclave;
- Hotte microbiologique.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Analyse de l'échantillon d'eau naturelle

- Obtenir un volume de 2 L d'eau souterraine naturelle dont on veut simuler les propriétés chimiques;
- Effectuer l'analyse chimique de l'échantillon d'eau souterraine naturelle pour les paramètres indiqués au tableau 6.1 de l'annexe 6.1.

3.2 Détermination de la formule chimique de l'eau souterraine synthétique

À partir de l'analyse chimique de l'échantillon d'eau souterraine naturelle prélevée d'un site spécifique, établir une formule qui servira à la fabrication de l'eau souterraine synthétique. Essayer de respecter la concentration des divers paramètres énumérés au tableau 6.1 de l'annexe 6.1 afin que l'eau souterraine synthétique reproduise le plus fidèlement possible trois paramètres importants, qui sont: le pH, la dureté, et la force ionique de l'eau souterraine naturelle (voir la définition de ces paramètres à la section 6.5.3.1. de l'annexe 6).

La formule chimique montrée au tableau 3.1 ci-dessous a été établie à partir des résultats de l'analyse de l'eau souterraine naturelle prélevée du site de Clarkson, Ontario, tels que présentés à la section 6.2 de l'annexe.

Le détail des calculs qui a mené à l'établissement de la formule est présenté aux tableaux 6.2 à 6.8 des annexes 6.3 et 6.4.

Le détail des calculs du pH, de la dureté, de la force ionique, de la conductivité électrique et de la teneur en solides dissous totaux (SDT) est donné pour l'eau souterraine naturelle à la section 6.5.3.2. de l'annexe. Le détail des calculs du pH, de la dureté et de la force ionique pour l'eau souterraine synthétique est présenté à la section 6.5.3.3 de l'annexe.

Tableau V.3.1 Formule chimique de l'eau souterraine synthétique

Ordre d'ajout composé	Composé	Formule	Concentration (g/L)	Quantité pour 14 L (g)	Volume bécher pour pesée (mL)
1	Chlorure de potassium	KCl	0.0286	0.4004	10
2	Chlorure de sodium	NaCl	0.1801	2.5215	25
3	Chlorure de calcium	$CaCl_2$	0.1744	2.4414	25
4	Sulfate de magnésium	$MgSO_4.7H_2O$	0.2028	2.8395	25
5	Bicarbonate de soude	$NaHCO_3$	0.4971	6.9595	25
6	Chlorure ferreux	$FeCl_2.3.2H_2O$	0.0006	0.0083	10
7	Nitrate de calcium tétra hydrate	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	0.00015	0.00213	10
8	Phosphate de sodium dibasique	$Na_2HPO_4.7H_2O$	0.0005	0.00753	10
9	Hydroxyde de potassium ou acide chlorhydrique	KOH ou HCl	Ajustement du pH: ajout jusqu'à obtention d'un pH de 8.39 ± 0.03 (voir Tableau 6.15 en annexe 6)		

3.3 Préparation de la solution d'eau souterraine synthétique

3.3.1 Stérilisation de l'eau déionisée et d'un bidon de 15 L

1. Remplir au ¾ d'eau déionisée 4 bidons d'essence de 4.7 L;
2. Visser très légèrement les bouchons des bidons d'essence;
3. Stériliser à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C et 103.4 kPa les bidons ainsi remplis;
4. À leur sortie de l'autoclave, revisser légèrement les bouchons des récipients;
5. Laisser si possible refroidir les bidons sous la hotte microbiologique (UV & ventilation) avant de revisser fermement les bouchons afin d'éviter une déformation des récipients causée par les différences de pression et de température;

6. Lorsque refroidis à la température de la pièce, revisser les bouchons, et conserver les récipients à 4°C jusqu'à utilisation;
7. Autoclaver un bidon de 15 litres muni d'un gros barreau magnétique pour 20 minutes à 121°C et 103.4 kPa;

3.3.2 Transfert de l'eau déionisée dans le bidon de 15 L

Pour les étapes suivantes, travailler sous conditions stériles, soit près de la flamme d'un brûleur. Garder le goulot des bidons toujours orienté vers la flamme.

1. Déposer le bidon de 15 L stérilisé selon le point 7 de la section 3.3.1. sur la balance METTLER PE16;
2. Dévisser le bouchon du bidon, puis déposer près de la flamme du brûleur;
3. Mettre la balance à "0";
4. Remplir le bidon stérile de 15 L avec 13.5 L d'eau déionisée stérile contenue dans les petits bidons de 4.7 L;
5. Réserver 500 mL d'eau déionisée stérile dans un bécher stérile, et garder près de la flamme. Ce restant d'eau servira à rincer les béchers lors de l'ajout des produits chimiques;
6. Placer le bidon de 15 L contenant les 13.5 L d'eau déionisée sur l'agitateur magnétique, toujours près de la flamme d'un brûleur.

3.3.3 Pesée et ajout des composés

1. Installer la balance analytique près d'un brûleur de façon à pouvoir l'utiliser en conditions stériles;
2. Nettoyer toutes les surfaces intérieures de la balance avec de l'éthanol afin de stériliser les parois;
3. Allumer le brûleur à côté de la balance analytique;
4. Peser sur la balance analytique, dans un petit bécher stérile de 10 mL, au moyen d'une spatule stérile, le 1er composé (KCl), tel qu'indiqué au tableau 3.1 ci-dessus;
5. Mettre en marche l'agitateur magnétique placé sous le bidon de 15 L en vérifiant que le barreau magnétique du bidon soit placé vis-à-vis de l'agitateur;

6. Procéder à l'ajout du chlorure de potassium à l'eau du bidon. Rincer le bécher quantitativement avec des portions de l'eau stérile qui a été réservée dans le bécher de 500 mL;
7. Répéter les étapes 4 à 6 pour les 7 autres composés énumérés au tableau 3.1, en:
   - Respectant l'ordre d'ajout indiqué au tableau 3.1,
   - Attendant la dissolution complète de chaque composé avant de procéder à l'ajout du suivant. Procéder **lentement** pour l'ajout du bicarbonate de soude, du chlorure de sodium, du chlorure de calcium, et du sulfate de magnésium vu leur volume plus important. L'ordre et la vitesse d'ajout de chaque composé sont importants afin d'éviter la précipitation de la solution;
   - Après l'ajout du 8ième composé, laisser la solution sous agitation pendant 5 minutes;

3.3.4 Ajustement du pH de la solution

1. Après avoir agité la solution d'eau souterraine synthétique pendant 5 minutes, prélever stérilement du bidon de 15 L un volume de solution d'environ 20 mL. Utiliser le pipetman 10 mL muni d'un embout stérile ou une pipette préemballée stérile de 25 mL pour le prélèvement, puis déposer l'eau dans un bécher de 25 mL muni d'un petit barreau magnétique;
2. Mesurer au pH-mètre le pH de la solution. Noter la valeur du pH après 5 minutes, puis rejeter l'eau ayant servi à la mesure du pH;
3. Dans le cas d'un pH différent de **8.39 ± 0.03**, procéder à son ajustement en utilisant:
   - une solution **stérile** d'hydroxyde de potassium (KOH) **1M** si le pH de la solution d'eau souterraine est inférieur à 8.39;
   - une solution **stérile** d'acide chlorhydrique (HCl) **1M** si le pH de la solution d'eau souterraine est supérieur à 8.39.

   Ajouter avec le pipetman 1000 µL et des embouts stériles la solution de KOH ou de HCl à la solution d'eau souterraine par incrément(s) de 300 µL environ pour toute augmentation désirée de pH de l'ordre de 0.03;
4. Suite à l'ajout de KOH ou de HCl, mesurer à nouveau le pH de la solution en procédant selon les points 1 & 2 de cette section;

5. Poursuivre l'ajustement du pH jusqu'à temps que celui-ci atteigne une valeur de 8.39 ± 0.03.

Un exemple de préparation d'une solution de 14 L d'eau souterraine synthétique et d'ajustement de son pH est donné aux tableaux 6.14 et 6.15 de la section 6.6 de l'annexe 6.

3.4 Conservation de la solution d'eau souterraine synthétique

3.4.1 Conservation à long terme

Une conservation à long terme peut être réalisée en congelant à -25°C l'eau souterraine ainsi préparée. Pour cela, sous conditions stériles, répartir les 14 L d'eau souterraine dans 4 bidons de 4.7 L préstérilisés (≈3.5 L par bidon). Pour décongeler l'eau souterraine, placer le bidon à la température ambiante pendant au moins 24 heures.

Cette méthode est cependant à déconseiller puisqu'elle peut entraîner une précipitation partielle des sels au fond du bidon.

3.4.2 Conservation à court terme

Cette méthode de conservation est à privilégier. L'eau préparée devra cependant être utilisée en dedans d'une période de cinq jours:

- Entreposer la solution d'eau souterraine synthétique dans le bidon de 15 L où elle aura été préparée. Refermer le bouchon du bidon sous conditions stériles;
- Conserver le bidon à 4°C jusqu'à utilisation;
- **Pour plus de précaution** avant d'utiliser l'eau souterraine du bidon, on pourra observer par microscopie par épifluorescence (voir protocole PE 43J) un échantillon de 10 mL de l'eau souterraine conservée afin de constater l'absence ou la présence de bactéries. Si l'observation microscopique indique la présence d'une seule bactérie, la solution d'eau souterraine de 14 L devra être rejetée au lavabo après y avoir rajouté environ 300 µL d'hypochlorite de sodium (eau de javel) 5.25% (concentration finale d'hypochlorite de sodium ~ 1ppm).

4 RÉFÉRENCE(S)

[1]. **Tchobanoglous, G. et Schroeder, E.D. (1987).** *Water Quality*: Characteristics, Modeling, Modification. Reading, MA: Addison-Wesley Publishing Company.

[2]. **Characklis, W.G. (1990).** Microbial Fouling. Dans: Biofilms, éd. par W.G. Characklis et K.C. Marshall. New York: John Wiley. Page 555.

5 RECOMMANDATION(S)

- Le chlorure ferreux et le chlorure de calcium sont des produits chimiques fortement hygroscopiques, et doivent donc être conservés dans le dessiccateur;
- Travailler sous conditions stériles lorsque indiqué. Garder alors les goulots des bidons près de la flamme du brûleur;
- Respecter toutes les conditions permettant d'éviter la précipitation de la solution d'eau souterraine synthétique.

6 ANNEXE(S)

6.1 Paramètres d'analyse pour l'eau souterraine naturelle

Tableau V.6.1 Analyses requises pour établir la formule chimique d'une eau souterraine

Type de paramètre	**Paramètre mesuré**		**Symbole**
Physico-chimique	Acidité/basicité		pH
	Oxygène dissous		O_2
	Potentiel d'oxydo-réduction		POR
Chimique	Sels	Calcium, Potassium, Sodium	Ca, K, Na
	Métaux	Fer total	Fe_{tot}
		Magnésium	Mg
	Cations majeurs	Calcium dissous	Ca^{2+}
		Magnésium dissous	Mg^{2+}
		Potassium dissous	K^+
		Sodium dissous	Na^+
	Cations mineurs	Fer ferreux, Fer ferrique	Fe^{2+}, Fe^{3+}
	Anions majeurs	Bicarbonates, Carbonates	HCO_3^-, CO_3^{2-}
		Sulfates, Chlorures	SO_4^{-2}, Cl^-
	Anions mineurs	Ions hydroxydes	OH^-
	Nutriments	Carbone organique total	COT
		Ammoniaque libre	NH_3
		Nitrates, Nitrites	NO_3^-, NO_2^-
		Azote Kjeldahl total	TKN
		Phosphore total	P_{tot}

6.2 Résultats d'analyse de l'eau souterraine prélevée du site de Clarkson, Ontario

TECHNI-LAB
pyroanalyse
géochimie
environnement

CERTIFICAT D'ANALYSE

Client Madame Françoise Castegnier
Chaire industrielle
CRSNG en assainissement et gestion des sites
Département de Génie chimique
École Polytechnique
2500, Chemin de Polytechnique
Montréal (Québec) H3T 1J7

Télécopieur (514) 340-5913

Date de prélèvement 24-août-00
Date de réception 25-août-00
Projet E-38415
Prélevé par Mme Françoise Castegnier
Matrice Eau

Parametres	Concentrations	Limites maximales acceptables	Méthodes
Azote ammoniacal	1.3 mg N/L	—	Sous-traitance
Azote Kjeldahl total	1.9 mg N/L	—	Sous-traitance
Bicarbonate	361 mg/L	—	Sous-traitance
Carbonate	<3 mg/L	—	Sous-traitance
Chlorure	212 mg/L	—	T-CHLO-10
Nitrite	<0.06 mg N/L	—	T-NITR-11
Nitrate	0.08 mg N/L	—	T-NITR-11
o-Phosphate	0.01 mg P/L	—	Sous-traitance
pH	8.39	—	T-PH-1
Phosphore total	<0.03 mg P/L	—	Sous-traitance
Sulfate	96 mg/L	—	T-SULF-8B
Calcium	63 mg/L	—	Sous-traitance
Fer total	0.18 mg/L	—	T-MET-17A
Magnésium	20 mg/L	—	Sous-traitance
Potassium	15 mg/L	—	Sous-traitance
Sodium	207 mg/L	—	Sous-traitance
Ammonium	0.1 mg N/L	—	T-AMMO-16A
Ammoniaque libre	1.2 mg N/L	—	T-AMMO-16A
Carbone organique total	25 mg/L	—	Sous-traitance
Calcium dissous	58 mg/L	—	Sous-traitance

Commentaire :

Accréditation :

Roger Turmel, B. Sc.
Chimiste, 96-044

12-sept-00
Date

Note : Ces résultats ne se rapportent qu'aux échantillons soumis pour analyse.

Toutes les analyses incluses dans ce certificat ont été effectuées selon les règles de l'art incluant les procédures d'assurance et de contrôle de la qualité à moins d'entente écrite contraire au préalable avec le client. Les échantillons seront conservés pendant 30 jours à partir de la date du certificat à moins d'indication contraire convenue préalablement. Ce rapport est pour l'usage exclusif du client et ne peut être reproduit, sauvé ou copié, sans l'autorisation écrite de Techni-Lab S.Q.B. Abitibi inc.

Parametres	Concentrations	Limites maximales acceptables	Méthodes
Magnésium dissous	19 mg/L	—	Sous-traitance
Potassium dissous	14 mg/L	—	Sous-traitance
Sodium dissous	197 mg/L	—	Sous-traitance
Hydroxyde	<0.5 mg $CaCO_3$/L	—	Sous-traitance
Fer ferreux	<0.01 mg/L	—	T-MET-17E
Fer ferrique	à suivre mg/L	—	T-MET-17E

6.3 Concentration en éléments à respecter pour établir la formule de l'eau souterraine

Tableau V.6.2 Concentration en éléments déduite de l'analyse de l'eau souterraine

Élément ou composé	Symbole	Masse molaire (g)	Concentration (mg/L)
Carbone organique total	**COT**	12.011	25
Azote total	**TKN**	14.006	1.9
Phosphore total	**P**	30.973	0
Soufre	**S**	32.06	32.06
Calcium	**Ca**	40.08	63
Fer	**Fe**	55.847	0.18
Potassium	**K**	39.098	15
Magnésium	**Mg**	24.305	20
Sodium	**Na**	22.989	207
Sulfates	**SO_4^{2-}**	96.057	96
Chlorures	**Cl^-**	35.453	212
Bicarbonates	**HCO_3^-**	61.017	361
Nitrates	**NO_3^-**	62.005	0.08

6.4 Méthode d'établissement de la formule pour l'eau souterraine synthétique

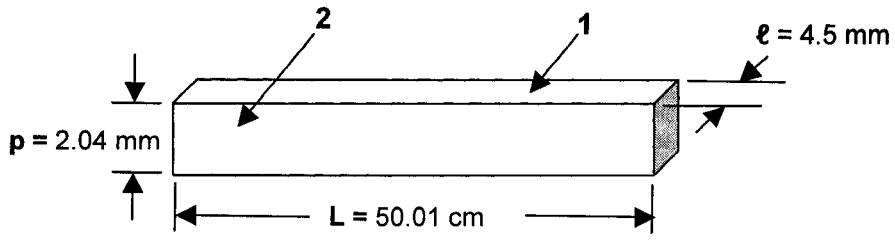
La formule de l'eau souterraine synthétique, qui a été établie à partir du tableau 6.2 ci-dessus, est résumée dans le tableau 6.7.

La concentration molaire de chacun des composés a été évaluée en tenant compte:

- De la concentration requise pour chaque élément, déduite de l'analyse (Tableau 6.2);
- De l'apport en COT, en azote total, et en phosphore total associé à la présence du milieu nutritif (mélasse). La concentration du milieu nutritif (1.626×10^{-2} g $_{mélasse}/L_{eau}$, Section 6.4.1) est une valeur fixe qui a été déterminée indépendamment de la composition de l'eau souterraine naturelle, en se basant sur les paramètres suivants:
  - un taux d'alimentation en mélasse de 10 mg/m^2.min. Des taux d'alimentation en glucose de l'ordre de 3 à 17 mg/m^2.min se sont en effet montrés favorables à la formation de biofilms [2];
  - un débit initial de l'eau souterraine dans la fracture de 4 mL/minute;
  - un type de mélasse dont la composition en COT, TKN, et P_{tot} est telle qu'indiquée au tableau 6.4;

6.4.1 Évaluation des teneurs en C, N et P dues au milieu nutritif

Les teneurs en C, N et P attribuables à l'apport en milieu nutritif ont été calculées en supposant un taux d'alimentation en mélasse de 10 mg/m^2.min et des dimensions de fracture telles qu'indiquées à la figure ci-dessous.



Les surfaces 1 et 2 correspondent aux surfaces exposées au liquide circulant dans la fracture (2 surfaces cachées). La surface totale exposée au fluide en circulation, qui est de 65.08 cm^2, soit de 6.508 x 10^{-3} m^2, requiert un apport en mélasse de 6.508 x 10^{-2} mg/min. pour un taux d'alimentation en mélasse de 10 mg/m^2.min.. Pour un débit initial dans la fracture de 4 mL/minute, ce taux d'alimentation équivaut à un apport en mélasse de 1.626 x 10^{-2} mg/mL d'eau souterraine.

Dans la seringue utilisée pour l'injection des nutriments, la concentration du milieu nutritif devra être telle qu'indiquée au tableau 6.3 sachant que le débit initial de la pompe seringue est de 0.08 mL/minute.

Tableau V.6.3 Concentration de la mélasse dans la seringue vs dans l'eau souterraine

Milieu	**Débit initial** (mL/min.)	**Concentration résultante**	
		Mélasse	**Urée**
Eau souterraine (entrée ou sortie du montage) (mg/mL d'eau souterraine)	4	1.626 x 10^{-2}	0.556
Seringue d'injection (mg/mL d'eau déionisée)	0.08	0.813	27.8

L'ajout d'urée au milieu nutritif a entraîné une hausse du ratio N:P d'environ 8 fois (Tableau V.6.6).

Tableau V.6.4 Contenu en COT, TKN, et P_{tot} de la mélasse verte Nutri-Max Ltd

Paramètre	**Concentration de la mélasse** ($mg/L_{mélasse}$)	**Concentration en mélasse de l'eau souterraine pour un taux d'alimentation en mélasse de 10 mg/m².min[1]** ($mg_{mélasse}/L_{eau}$)
COT	272800	2.95
TKN	3360	3.64×10^{-2}
P_{tot}	293	3.2×10^{-3}

[1]densité de la mélasse supposée à ~ 1.5 g/cm³

Les concentrations en COT, TKN, et P_{tot} de la mélasse verte (colonne 2) ont été obtenues d'analyses de laboratoire. Les concentrations équivalentes en COT, TKN, et P_{tot} dans l'eau souterraine (colonne 3) sont calculées de la façon suivante:

- **[COT]** = (272800 $mg_{mélasse}/L_{mélasse}$) x (1.626×10^{-2} $mg_{mélasse}/10^{-3}$ $L_{eau\ souterraine}$) x (10^{-3} $L_{mélasse}/1500$ $mg_{mélasse}$) = 2.95 $mg_{COT}/L_{eau\ souterraine}$
- **[TKN]** = (3360 $mg_{mélasse}/L_{mélasse}$) x (1.626×10^{-2} $mg_{mélasse}/10^{-3}$ $L_{eau\ souterraine}$) x (10^{-3} $L_{mélasse}/1500$ $mg_{mélasse}$) = 3.64×10^{-2} $mg_{TKN}/L_{eau\ souterraine}$
- **[P_{tot}]** = (293 $mg_{mélasse}/L_{mélasse}$) x (1.626×10^{-2} $mg_{mélasse}/10^{-3}$ $L_{eau\ souterraine}$) x (10^{-3} $L_{mélasse}/1500$ $mg_{mélasse}$) = 3.2×10^{-3} $mg_{Ptot}/L_{eau\ souterraine}$

Tableau V.6.5 Formule de la solution nutritive dans la seringue d'injection

Composé	**Nom**	**Masse molaire (mg/mole)**	**Concentration par L d'eau déionisée**	
			mole	**mg**
NH_2CONH_2	**Urée**	60060	4.63×10^{-4}	27.8
-	**Mélasse**	-	-	813.1

Tableau V.6.6 Effet de l'ajout d'urée sur le ratio C:N:P de l'eau souterraine + nutriments

Composition de l'eau	**Ratio C:N:P**
Eau souterraine & mélasse	231 : 2.4 : 1
Eau souterraine & mélasse & urée	231 : 19.8 : 1

Tableau V.6.7 Méthode d'établissement de la formule de l'eau souterraine synthétique

Masse de divers éléments ou composés (mg/L) telle que dictée par le tableau 6.2										Concentration équivalente du composé	# Moles du composé par L d'eau souterraine
Na	**Cl**	**Mg**	**S**	**Ca**	**K**	**P**	**N**	**Fe**	**C**		
0	13.60	0	0	0	15	0	0	0	0	**KCl**	3.836×10^{-4}
70.81	109.1	0	0	0	0	0	0	0	0	**NaCl**	3.079×10^{-3}
0	0	20	26.3	0	0	0	0	0	0	**$MgSO_4.7H_2O$**	8.229×10^{-4}
0	111.4	0	0	62.9	0	0	0	0	0	**$CaCl_2$**	1.571×10^{-3}
136.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**$NaHCO_3$**	5.917×10^{-3}
0	0.228	0	0	0	0	0	0	0.18	0	**$FeCl_2.3.2H_2O$**	3.23×10^{-6}
0	0	0	0	0.026	0	0	0	0	0	**$Ca(NO_3)_2.4H_2O$**	6.451×10^{-7}
0.09	0	0	0	0	0	0.030	0	0	0	**$Na_2HPO_4.7H_2O$**	8.52×10^{-7}
0	0	0	0	0	0	0.003	0.036	0	2.95	**Mélasse (g/L)**	1.626×10^{-2}
0	0	0	0	0	0	0	0.259	0	0	**NH_2CONH_2 (urée)**	9.26×10^{-6}
207.0	**234.4**	**20**	**26.3**	**63.0**	**15**	**0.033**	**0.295**	**0.18**	**2.95**	**Total**	

Tableau V.6.8 Formule chimique de l'eau souterraine synthétique

Nom du composé	Formule	Masse molaire (mg/mole)	Concentration	
			(mole/L)	(g/L)
Chlorure de potassium	KCl	74550	3.836×10^{-4}	0.0286
Chlorure de sodium	NaCl	58440	3.079×10^{-3}	0.1801
Chlorure de calcium	$CaCl_2$	110990	1.571×10^{-3}	0.1744
Sulfate de magnésium	$MgSO_4$	246480	8.229×10^{-4}	0.0990
Bicarbonate de soude	$NaHCO_3$	84010	5.917×10^{-3}	0.4971
Chlorure ferreux	$FeCl_2.3.2H_2O$	184404	3.23×10^{-6}	0.00059
Nitrate de calcium tétrahydrate	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	236150	6.451×10^{-7}	0.00015
Phosphate de sodium dibasique	$Na_2HPO_4.7H_2O$	268070	8.520×10^{-7}	0.00023

6.4.2 Exemple de calcul de la concentration molaire de divers composés

6.4.2.1 Calcul de la concentration molaire en KCl requise

- Concentration en K requise selon le tableau V.6.2 de la section 6.3 = 15 mg/L;
- Masse molaire de K = 39.098 g/mole

  15 mg/L de K requis → X mole/L de K requis

  39 098 mg/L de K → 1 mole/L de K
- Nombre de moles de KCl requis = 15/39 098 = 3.836×10^{-4} (1^{ière} ligne, dernière colonne, Tableau V.6.7).

6.5 Vérification analytique de la formule de l'eau souterraine synthétique

6.5.1 Résultats d'analyse de l'eau souterraine synthétique

TECHNI-LAB
pyroanalyse
géochimie
environnement

CERTIFICAT D'ANALYSE

Client Madame Françoise Castegnier
Chaire industrielle
CRSNG en assainissement et gestion des sites
Département de Génie chimique
École Polytechnique
2500, Chemin de Polytechnique
Montréal (Québec) H3T 1J7

Télécopieur (514) 340-5913

Date de prélèvement Non disponible
Date de réception 1-déc-00
Projet E-40407
Prélevé par Mme Françoise Castegnier
Matrice Eau potable

Paramètres	Concentrations	Limites maximales acceptables	Méthodes
Azote ammoniacal dissous (NH_4)	<0.1 mg N/L	---	T-AMMO-16A
Azote libre (NH_3)	<0.1 mg N/L	---	T-AMMO-16A
Nitrite	<0.06 mg N/L	---	T-NITR-11
Nitrate	0.15 mg N/L	---	T-NITR-11
Phosphore dissous inorganique	0.09 mg P/L	---	T-PHOS-15A
Calcium dissous	46.0 mg/L	---	T-MET-17A
Fer dissous	<0.04 mg/L	---	T-MET-17A
Magnésium dissous	18.4 mg/L	---	T-MET-17A
Potassium dissous	16 mg/L	---	T-MET-17A
Sodium dissous	194 mg/L	---	T-MET-17A
Carbonates dissous	<3 mg/L	---	Sous-traitance
Bicarbonates dissous en HCO_3	350 mg/L	---	Sous-traitance
Fer ferreux dissous	<0.01 mg/L	---	T-MET-17E
Fer ferrique dissous	<0.01 mg/L	---	T-MET-17E
Hydroxyde	<0.5 mg $CaCO_3$/L	---	---

Commentaire :

Accréditation :

CHIMISTE Roger Turmel 96-044 QUÉBEC

Roger Turmel, B. Sc.
Chimiste, 96-044

14-déc-00
Date

Note : Ces résultats ne se rapportent qu'aux échantillons soumis pour analyse.

Toutes les analyses incluses dans ce certificat ont été effectuées selon les règles de l'art incluant les procédures d'assurance et de contrôle de la qualité à moins d'entente écrite conclue au préalable avec le client. Les échantillons seront conservés pendant 30 jours à partir de la date du certificat à moins d'indication contraire convenue préalablement. Ce rapport est pour l'usage exclusif du client et ne peut être reproduit, sinon en entier, sans l'autorisation écrite de Techni-Lab S.G.B. Abitibi inc.

184, Principale - C.P. 208, Ste-Germaine Boulé (Québec) J0Z 1M0 Tél. : (819) 787-6116 - Téléc. : (819) 787-6527

6.5.2 Vérification des propriétés de l'eau naturelle et de l'eau synthétique

6.5.2.1 Définition du pH, de la dureté, de la force ionique(μ), de la conductivité électrique (EC) et de la teneur en SDT

- **pH** = -log $[H^+]$, où $[H^+]$ est la concentration des ions H^+ exprimée en moles/L
- **Dureté** = Σ (cations multivalents) = $(Ca^{2+}) + (Mg^{2+})$

  où (Ca^{2+}) et (Mg^{2+}) sont les concentrations respectives en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} exprimées en équivalents/m^3 (Tchobanoglous et Schroeder, 1987)
- **Force ionique** $\mu = \frac{1}{2} \Sigma_i (C_i \times Z_i^2)$ (moles/L)

  C_i = concentration de l'espèce ionique i exprimée en moles/L

  Z_i = charge de l'espèce ionique i [1]
- **Conductivité électrique EC** (µS/cm) $\cong$ **62 500 x** μ
- **Teneur en SDT (Solides Dissous Totaux)** (mg/L) = **EC/1.125**

6.5.2.2 Calcul des force ionique, conductivité électrique, teneur en SDT, dureté, alcalinité et du pH de l'eau souterraine naturelle

Force ionique de l'eau souterraine naturelle

Tableau V.6.9 Force ionique de l'eau souterraine naturelle du site de Clarkson

Espèce ionique	Concentration (mg/L)	Masse molaire (g/mole)	Concentration C_i (mole/L)	Charge Z_i	$C_i \times Z_i^2$
Ca^{2+}	58	40.08	1.447×10^{-3}	2	5.7884×10^{-3}
Mg^{2+}	19	24.305	7.82×10^{-4}	2	3.1269×10^{-3}
K^+	14	39.0983	3.58×10^{-4}	1	3.5807×10^{-4}
Fe^{2+}	-	55.847	-	2	-
Na^+	197	22.9898	8.569×10^{-3}	1	8.5690×10^{-3}
HCO_3^-	361	61.0171	5.916×10^{-3}	-1	5.9163×10^{-3}
Cl^-	212	35.453	5.980×10^{-3}	-1	5.9797×10^{-3}
NO_2^-	-	46.0055	-	-1	-
NO_3^-	0.08	62.0049	1.2902×10^{-6}	-1	1.2902×10^{-6}
SO_4^{2-}	80	96.0576	9.99×10^{-4}	-2	3.9976×10^{-3}

$\Sigma_i (C_i \times Z_i^2)$ = **0.03374 mole/L**

$\frac{1}{2} \Sigma_i (C_i \times Z_i^2)$ = **0.01687 mole/L**

Conductivité électrique **EC**

EC $\cong$ 62 500 x 0.01687 $\cong$ **1054 µS/cm**

Teneur en SDT

SDT = 1054/1.125 = **937 mg/L**

Dureté de l'eau souterraine naturelle

Tableau V.6.10 Calcul de la dureté de l'eau souterraine naturelle

Espèce ionique	Concentration (mg/L)	Masse molaire (g/mole)	Charge Z_i	Masse équiv. (mg/méq.)	Concentration (méq./L)
Ca^{2+}	58	40.08	2	20.04	2.89
Mg^{2+}	19	24.30	2	12.15	1.56

Dureté = $(Ca^{2+}) + (Mg^{2+})$ = 4.46 méq/L

Cette eau est considérée dure selon la classification des eaux données dans [1].

Alcalinité et pH de l'eau souterraine naturelle

Tableau V.6.11 Calcul de l'alcalinité et du pH de l'eau souterraine naturelle

Espèce ionique	Concentration (mg/L)	Masse molaire (g/mole)	Charge Z_i	Masse équiv. (mg/méq.)	Concen-tration (méq./L)	Concentration (mole/L)
HCO_3^-	361	61.0	-1	61.0	5.918	5.9×10^{-3}
CO_3^{2-}	< 3	60.0	-2	30.0	< 0.1	-
OH^-	-	-	-	-	$< 10^{-2}$	-
H^+	0.2271	1.0	+1	1.0	0.2271	2.27×10^{-4}

- **Alcalinité** = $(HCO_3^-) + (CO_3^{2-}) + (OH^-) \approx 5.918$ méq./L ≈ 295.9 mg $CaCO_3$/L
- **OH^-** < 0.5 mg $CaCO_3$/L $< 10^{-2}$ méq./L
- **$[H^+]$** $= e^{-pH} = e^{-8.39} = 2.2713 \times 10^{-4}$ mole/L
- **pH** = 8.39, tel que déterminé par analyse (voir section 6.2)

6.5.2.3 Force ionique, dureté, alcalinité et pH de l'eau souterraine synthétique

Selon une méthode identique à la méthode présentée à la section 6.5.2.2, la force ionique, la dureté, l'alcalinité et le pH sont calculés pour l'eau souterraine synthétique à partir des résultats d'analyse de l'eau souterraine synthétique (Section 6.5.1) (Tableau 6.12), puis comparés aux valeurs qui ont été obtenues pour l'eau souterraine naturelle.

Tableau V.6.12 Propriétés physico-chimiques de l'eau souterraine synthétique

Paramètre	Valeur calculée
Force ionique	0.01601 moles/L
Dureté	3.81 méq./L
Alcalinité	286.9 mg $CaCO_3$/L
pH	8.39 tel qu'ajusté lors de sa préparation

6.5.2.4 Comparaison entre les propriétés eau *naturelle* vs eau *synthétique*

Tableau V.6.13 Comparaison entre les propriétés eau *naturelle* vs eau *synthétique*

Type d'eau souterraine	Force ionique (mole/L)	Dureté (méq./L)	pH
Naturelle	0.01687	4.46	8.39
Synthétique	0.01601	3.81	8.39
Différence (%)	5.08	14.54	0.00

On note une différence non négligeable (~15%) entre la dureté de l'eau naturelle et celle de l'eau synthétique. La formule de l'eau souterraine synthétique mise au point dans le tableau 6.7 devrait pourtant fournir une dureté théorique identique à celle de l'eau naturelle. On pourrait attribuer cette différence à un manque de précision dans des pesées qui ont été effectuées lors de la fabrication de la solution de l'eau souterraine synthétique.

6.6 Exemple de préparation d'une solution de 14 L d'eau souterraine synthétique

Tableau V.6.14 Exemple de préparation d'une solution d'eau souterraine synthétique de 14 L

Ordre d'ajout	Nom du composé	Formule	Masse requise (g/14L)	Masse pesée (g/14L)
1	Chlorure de potassium	KCl	0.4004	0.4009
2	Chlorure de sodium	NaCl	2.5215	2.5215
3	Sulfate de magnésium	$MgSO_4.7H_2O$	2.8395	2.8395
4	Chlorure de calcium	$CaCl_2$	2.4414	2.4414
5	Bicarbonate de soude	$NaHCO_3$	6.9595	6.9596
6	Chlorure ferreux	$FeCl_2.3.2H_2O$	0.0083	0.0083
7	Nitrate de calcium tétrahydrate	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	0.0021	0.0021
8	Phosphate de sodium dibasique heptahydrate	$Na_2HPO_4.7H_2O$	0.00151	0.0017
9	Hydroxyde de potassium	KOH 1M	2.3 mL (Tableau 6.15)	

Tableau V.6.15 Ajustement du pH de la solution du Tableau 6.14

Volume de KOH (mL)	pH
0	8.10
1	8.23
1	8.37
0.3	8.39

Volume total de KOH 1M ajouté = 2.3 mL

ANNEXE VI: Protocole PE 43D

Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites	**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**
Protocole #: PE 43D	**Nombres de pages:** 17
Version: 1	**Date:** 26-09-02
Auteure: Françoise Castegnier	
Approuvé par:	**Signatures:** **Date:**
Lucie Jean	☐ Lucie Jean 31/03/04
Réjean Samson	☐ 31/04/04
	☐

Titre:	Procédures de suivi et d'échantillonnage utilisées pour un essai de biocolmatage par des microorganismes indigènes d'une eau souterraine d'une fracture dans du calcaire et pour le test de la persistance de ce biocolmatage
Mots clés:	roc fracturé, biobarrière, biocolmatage, échantillonnage, eau souterraine

1 OBJECTIFS

Les objectifs de ce projet sont de:

1. Identifier les différentes phases de l'essai expérimental;
2. Déterminer la nature des analyses ainsi que les méthodes de prélèvement et d'analyse en fonction des différentes phases de l'essai;
3. Établir la séquence des manipulations, des prélèvements et des analyses en fonction des différentes phases de l'essai;

2. MATÉRIEL

- Chambre froide à 10°C
- Montage des plaques de calcaire et de son alimentation hydraulique

- Balance analytique de précision à plateau supérieur ADP 3100L, capacité 0.11-4.1kg, *Adam Equipment Inc.*, Danbury, Connecticut: http: www.adamequipment.com
- Oxymètre-multimètre portatif ORION, modèle #1230, étanche à l'eau
- Sonde à oxygène ORION 083010;
- Microélectrode à oxygène, modèle #768-20R, *Diamond General Development Corporation*, Ann Arbor, Michigan; http: www.diamondgeneral.com
- Microsenseur chimique # 1201, *Diamond General Development Corporation*
- Sonde à pH ORION de type ROSS® SURE-FLOW™
- pH-mètre Accumet®, modèle #25
- Sonde POR Accumet®
- Matériel pour décomptes au Bac*Light* **[7]**
- Tubes à centrifuger de 15 mL
- 1 pipette préemballée stérile de 20 mL
- Ruban adhésif
- Tube à centrifuger stérile (15 ou 50 mL)
- Bouteilles d'échantillonnage de la Cie PSC: 1 pour chacune des catégories suivantes: Anions, Métaux, Azote total & ammoniacal, et COT
- Bouteilles d'échantillonnage de la Cie Technilab: 1 pour chacune des catégories suivantes: Ca^{2+} & Mg^{2+}, $CaCO_3$ & HCO_3, Fe^{2+} & Fe^{3+};
- Vials à scintillation de 20 mL en pyrex

3 MÉTHODOLOGIE

3.1 Déroulement de l'étude expérimentale

L'étude expérimentale se déroule en 3 phases tel qu'indiqué dans le tableau VI.3.1 ci-dessous.

TableauVI.3.1 Description des différentes phases de l'expérience

Phase de l'expérience	Durée	Objectif(s)	Protocole attitré Action(s)
Saturation montage	~2 jours	Chasser les bulles d'air de la fracture et des lignes d'alimentation	Protocole **PE 43E [3]** Injection d'eau souterraine à un débit de 5-6 mL/min.
Colmatage	À déterminer selon l'évolution de l'essai	Former un biofilm dans la fracture afin d'obtenir une réduction de la conductivité hydraulique	Protocole **PE 43G [4]** • Inoculation et injection de nutriments • Ajustement du débit de la pompe-seringue en fonction du débit de l'effluent
Test de persistance	2 à 3 fois ou plus la durée d'atteinte du plateau de colmatage	Mesurer l'effet d'un arrêt d'inoculation et de biostimulation sur la stabilité du biofilm	Arrêt de l'inoculation et de le biostimulation
Ouverture des plaques	½ journée	Ouvrir les plaques, faire des observations visuelles, et récolter des échantillons de biofilm	Protocole **PE 43M [9]** Observer le biofilm formé Récolter le biofilm Procéder aux analyses

3.2 Nature des paramètres analysés

Les paramètres à mesurer ont été regroupés en 3 catégories:

1. les paramètres mesurés *en temps réel*,
2. les paramètres qui doivent être mesurés ou analysés *le jour-même du prélèvement*, et
3. les paramètres qui peuvent être analysés *en différé*.

3.2.1 Hypothèses générales pour l'analyse des divers paramètres

1. La composition chimique de l'eau varie très peu tout au long de l'expérience, car l'eau souterraine utilisée est synthétique et préparée selon une recette spécifique;
2. La composition chimique du milieu nutritif varie aussi très peu en fonction du temps;
3. Il est difficile de garder une concentration d'inoculum parfaitement constante en fonction du temps à cause de la variabilité de la concentration des bactéries dans les Eppendorfs. La densité bactérienne à l'entrée des plaques sera évaluée à partir de décomptes bactériens réalisés sur l'inoculum sortant de la seringue et du débit connu d'injection de la pompe seringue.

3.2.2 Paramètres mesurés *en temps réel*

Deux paramètres, soit le débit de l'effluent et la concentration en oxygène dissous à l'entrée et à la sortie des plaques, sont mesurés *en temps réel* (Tableau 3.2).

Tableau VI.3.2 Liste des paramètres mesurés *en temps réel*

Paramètres	**Objectif(s) de la mesure du paramètre**	**Méthode de mesure et/ou protocole attitré**	**Endroit(s) où le paramètre est mesuré**
Débit	Calcul de la conductivité hydraulique (*K*)	Méthode gravimétrique **PE 43A [1]**	Effluent
O_2	Suivi de la consommation bactérienne en O_2	Mesure par microélectrode **PE 43K [8]**	Alternance entre l'entrée & la sortie

Mesure du débit

Le suivi du débit à la sortie des plaques, réalisé en continu, sert à évaluer l'évolution de la conductivité hydraulique tout au long de l'expérience. La mesure du débit est assurée par la pesée en temps réel de la masse d'eau éluée à la sortie des plaques (effluent), et ce, au moyen d'une balance de précision analytique ADP 3100L (*Adam Equipment Inc.*, Danbury, CT. USA) munie d'un plateau supérieur. Cette balance est connectée via un port de communication sériel RS232 à un ordinateur de bureau muni d'une carte d'acquisition de données, ce qui assure l'enregistrement des données en temps réel. Le logiciel graphique *Labview* a été utilisé pour gérer, enregistrer puis visualiser sur l'écran les données acquises.

Mesure de l'oxygène dissous

L'oxygène dissous est mesuré en continu, *in situ*, soit directement dans le conduit hydraulique principal, **à l'entrée** ainsi qu'**à la sortie** de **l'assemblage des plaques**, et ce, **en temps réel** et à l'aide d'une microélectrode à oxygène. La microélectrode est insérée temporairement dans le fluide en mouvement au travers d'un septum calé dans un raccord en té monté sur la ligne principale du circuit hydraulique. Étant donné qu'une seule microélectrode est disponible, la mesure des niveaux d'oxygène dissous est réalisée en alternance entre l'entrée et la sortie, en déplaçant la microélectrode.

La microélectrode à oxygène utilisée, de type ampérométrique, est connectée à un microsenseur chimique qui mesure le courant causé par les réactions électrochimiques

impliquant l'oxygène à l'extrémité de la microélectrode. Le microsenseur chimique est en retour relié à un ordinateur de bureau muni d'une carte d'acquisition de données permettant d'enregistrer les données en temps réel, en utilisant, comme pour le suivi du débit, le logiciel *Labview*. Le fonctionnement de la microélectrode à oxygène et du microsenseur chimique qui sont utilisés est présenté dans le protocole PE 43K **[8]**. En ce qui concerne le niveau d'oxygène dissous dans la chaudière d'alimentation, il est mesuré le dernier jour de l'étude expérimentale pour ne pas causer de contamination, et ce, à l'aide de la sonde à oxygène connectée à l'oxymètre portatif ORION.

3.2.3 Paramètres devant être analysés le jour même

Tableau VI.3.3 Liste des paramètres devant être analysés le jour même

Paramètre	But(s) de la mesure	Méthode de mesure (protocole) & Fréquence de mesure	Endroit(s) de mesure
Niveaux des piéziomètres	Mesure du Δh pour calculer *K*	Règle graduée 1 fois/jour[a] 1-3x/sem.[b]	À chaque piézomètre
pH	Mesure de l'activité des bactéries	PSO E3 **[10]** 1 fois/jour[a] 1 fois/sem.[b]	• Réservoir • Chaudière • Effluent
POR	Identifier les processus microbiens impliqués	PSO A3 **[11]** 1 fois/jour[a] 1 fois/sem.[b]	• Chaudière • Effluent
Comptes bactériens	Mesure de la densité & de la viabilité bactériennes	Microscopie par épifluorescence PE 43J **[7]** Analyser dès prélèvement ou conserver à 4°C jusqu'à analyse 1 fois/jour[a] 1-3x/sem. sur effluent seulement[b]	• Effluent • Inoculum
Contrôle de la stérilité de l'alimentation	Vérification par microscopie de la présence/absence de bactéries, sans faire de comptes	Comme ci-dessus: PE 43J **[7]** 1 fois/2 jours[a] 1-3x/sem.[b]	• Réservoir • Chaudière

[a] Fréquence en phase de colmatage
[b] Fréquence en phase de persistance

Mesure des niveaux piézomètriques

L'évaluation de la conductivité hydraulique dans la fracture à un moment précis donné requiert la connaissance non seulement du débit, mais aussi de la pression d'eau dans la fracture. Ces pressions d'eau sont mesurées par des piézomètres, dont les niveaux sont relevés manuellement, une fois par jour pendant la phase de biocolmatage. Pendant la phase de persistance, cette fréquence est réduite à 1 à 3 fois/semaine, dépendamment de la stabilité hydraulique du montage.

Mesure du pH

Le pH est mesuré sur des échantillons d'eau d'un volume minimum de 5 mL, recueillis dans des tubes à centrifuger de 15 mL (stérilité non requise), et prélevés du réservoir d'alimentation, de la chaudière d'alimentation, et de l'effluent.

Les prélèvements sont effectués:

1. dans le réservoir d'alimentation à l'aide d'une pipette préemballée stérile de 20 mL,
2. à partir de la chaudière d'alimentation, en purgeant le conduit d'échantillonnage #4 (Figure VI.5.1, Annexe 5),
3. à la sortie des plaques, par élution de l'effluent dans un tube à centrifuger maintenu en place grâce à un bout de ruban adhésif collé sur l'extrémité du tube de sortie.

La mesure de pH est réalisée dans la chambre froide à 10°C à l'aide de la sonde à pH ORION SURE-FLOW™, qui peut être utilisée avec le pH-mètre Accumet® #25 ou avec le multimètre portatif ORION #1230. La mesure est effectuée à une fréquence d'une fois par jour pendant la phase de biocolmatage, et d'une fois par semaine pendant la phase de persistance.

Mesure du POR

Le POR est mesuré sur des échantillons d'eau d'un volume minimum de 15mL recueillis dans des vials à scintillation de 20 mL en pyrex (stérilité non requise). Les échantillons d'eau sont prélevés de la chaudière d'alimentation et de l'effluent, selon une méthode analogue à la méthode utilisée pour la mesure du pH. La mesure est réalisée dans la chambre froide à 10°C à l'aide de la sonde à POR connectée au pH-mètre Accumet modèle #25 ou encore au multimètre portatif ORION #1230. La fréquence de mesure est d'une fois par jour pendant la phase de biocolmatage, et d'une fois par semaine pendant la phase de persistance.

Comptes bactériens

Pendant les phases de biocolmatage et de persistance, le suivi de la biomasse ne peut pas être effectué sur le biofilm lui-même, et est donc réalisé sur l'effluent. La quantification de la biomasse est accomplie par une technique directe de dénombrement par microscopie par épifluorescence après coloration au *Bac*Light™ **[7]**. Cette technique directe de comptage a été préférée aux méthodes traditionnelles d'énumération par mise en culture, car elle permet de procéder à un ajustement immédiat de la concentration de la solution d'inoculation à injecter, ou encore à un changement immédiat des chaudières d'alimentation en cas de contamination.

Ce suivi est accompli à une fréquence de 1 fois/jour pendant la phase exponentielle de croissance des bactéries et de formation de la biobarrière. Dès l'atteinte de la phase de persistance, la fréquence du suivi est graduellement abaissée à 3 fois/semaine, puis à une fois/semaine.

Les volumes d'effluent requis pour effectuer les comptes au Bac*Light* doivent être ajustés en fonction du temps, en raison de l'évolution temporelle de la densité de la population microbienne. Il est fortement recommandé d'effectuer les comptes de densité bactérienne lorsque la seringue d'injection est au milieu, et non au début ou à la fin de sa course, ce qui pourrait correspondre à un régime d'injection transitoire.

Un suivi de la densité bactérienne est aussi réalisé sur la solution d'inoculation dans le but de contrôler, et le cas échéant, procéder à l'ajustement de sa densité préalablement à son injection. Un volume de 1 à 2 mL de la solution d'inoculation préparé à partir d'une dilution de 1:10 de l'inoculum décongelé semblerait adéquat pour effectuer un compte sur une population bactérienne d'une densité de 5 à 6 logs **[4]**.

Stérilité de l'eau d'alimentation

Un suivi de la qualité de l'eau du réservoir et de la chaudière d'alimentation par microscopie par épifluorescence **[7]** doit aussi être effectué tout au long de l'expérience afin de maintenir la stérilité de l'eau souterraine acheminée jusqu'à la solution d'inoculation.

3.2.4 Paramètres analysés en différé

En raison du nombre élevé d'analyses à effectuer, il a été décidé d'analyser plusieurs paramètres en différé (Tableau VI.3.4).

Tableau VI.3.4 Paramètres analysés en différé

Paramètre analysé	Méthode d'analyse & protocole	Méthode de conservation	Lieu où prélever	Fréquence d'analyse
EPS & glucides	• **PE 43H [5]** • **PE 43I [6]**	Conserver quelques heures à 4°C ou congeler à -20°C	Effluent	3x/semaine
• COT • Sulfates • Nitrite/nitrates • Azote amm. • Azote total • Phosphore tot.	Tableau VI.3.5 ci-dessous	Conserver à 4°C pour une durée maximum de 10 jours avant envoi chez l'analyste	Entrée (Jour 0) & Effluent	Entrée: 1x au Jour 0 Effluent: 1x/semaine[a] 1x/mois[b]
• Ca^{2+} • Mg^{2+} • HCO_3^- • Fe^{2+} • Fe^{3+}	Tableau VI.3.5 ci-dessous	Conserver à 4°C pour un max. de 10 jours avant envoi chez l'analyste	Entrée (1x) & Effluent	Entrée: 1x au Jour 0 Effluent: 1x/semaine[a] 1x/mois[b]

[a] Phase de formation du biofilm
[b] Phase de persistance

Mesure des EPS & glucides

Pour la détermination des EPS et des glucides, l'échantillonnage s'effectue sur l'effluent, à une fréquence d'environ 3 fois/semaine pendant la phase de formation du biofilm. Ce prélèvement doit être réalisé lorsque la seringue d'injection est à mi-course.

Mesure des paramètres chimiques et géochimiques

L'échantillonnage de l'effluent pour l'analyse des paramètres chimiques et géochimiques listés au tableau 4 ci-dessus est réalisé à une fréquence d'une fois/semaine pendant la phase de formation de la biobarrière, et d'une fois/mois pendant la phase de persistance.

L'échantillonnage de l'eau souterraine à l'entrée des plaques est réalisé au démarrage de l'expérience, soit jour 0, afin d'obtenir un aperçu des conditions expérimentales initiales.

L'échantillonnage à l'entrée des plaques n'est pas réalisé pour la suite de l'expérience car il pourrait causer une importante perturbation hydraulique du système.

3.2.5. Volumes d'échantillonnage pour paramètres analysés le jour-même & en différé

Tableau VI.3.5 Volumes d'échantillonnage requis pour diverses analyses

Paramètre analysé	**Volume d'eau souterraine à prélever à la sortie**	**Récipient d'échantillonnage**
Densité & viabilité bactérienne	• Début: 50 mL • Phase de croissance: 100-300 µL	Tube à centrifuger stérile (15 ou 50 mL)
EPS & glucides	Minimum de 20 mL	Tube à centrifuger stérile (50 mL)
Glucides seulement	Minimum de 6 mL	Tube à centrifuger stérile (15 mL)
COT	Minimum de 100 mL	Bouteille identifiée "*COT*" de la Cie PSC
Sulfates, nitrites & nitrates	Minimum de 50 mL	Bouteille PSC identifiée "*Anions*"
Azote total & ammoniacal	Minimum de 100 mL	Bouteille PSC identifiée "*Azote total & ammoniacal*"
Phosphore total	Minimum de 50 mL	Bouteille PSC identifiée "*Métaux*"
Ca^{2+} & Mg^{2+}	Minimum de 200 mL	Bouteille Technilab de ~500 mL, sans préservatif
HCO_3^-	Minimum de 250 mL	Bouteille Technilab sans préservatif & identifiée "*$CaCO_3$ & HCO_3*"
Fe^{2+} & Fe^{3+}	Minimum de 200 mL	Bouteille Technilab identifiée par le préservatif "*HCl*"

Tableau VI.3.6 Méthodes d'analyse des paramètres chimiques et géochimiques

Paramètre analysé	**Méthode d'analyse & référence**	**Analyste**
COT	Ion chromatography #5310-C[d]	PSC[a]
Sulfates	Ion chromatography #4110 C[d]	
Nitrites & nitrates	Ion chromatography #4110 C[d]	
Azote ammoniacal[c]	4500-NH_3-G[d]	
Azote total Kjeldahl (TKN)	4500-NH_3-G & 4500-Norg[d]	
Phosphore total	In-line UV/persulfate digestion #4500-P I[d]	
HCO_3^-	Titration method #2320 B[d]	Techni-lab[b]
Fe^{2+}	Colorimetric method #3500-Fe-D[d]	
Fe^{3+}/Mg^{2+}/Ca^{2+}	Flame atomic absorption spectrometry #3111 B[d]	

[a] PSC Services Analytiques: www.pscanalytical.com; [b] Techni-lab S.G.B. Abitibi Inc.: techni.lab@cablevision:qc.ca; [c] Azote sous forme d'ammoniaque libre NH_3 & d'ions ammonium NH_4^+; [d][12]

3.3 Séquence des prélèvements

Les prélèvements sont réalisés manuellement. La séquence d'échantillonnage proposée ci-dessous permet d'optimiser la durée totale de la phase d'échantillonnage et des analyses qui doivent être effectuées entre-temps.

1. Mesurer le débit sur un volume de l'effluent qui sera utilisé pour effectuer un compte bactérien, puis relever les niveaux piézométriques correspondants;
2. Effectuer un dénombrement au Bac*Light* en triplicata sur le volume d'eau prélevé en 1;
3. Préparer une solution d'inoculum de 10 mL tel que décrit à la section 4.3.1 du protocole PE 43G [4], et effectuer un dénombrement au Bac*Light* en duplicata ou triplicata sur un volume de 1 à 2 mL de cette solution. Suite à ce dénombrement, procéder à un ajustement de la densité bactérienne de la solution d'inoculation en diluant la solution d'inoculum restante;
4. Préparer une solution nutritive, s'il n'en reste plus, tel que décrit à la section 4.3.2 du protocole PE 43G [4];
5. Procéder au remplacement des seringues en remplissant 2 nouvelles seringues avec les solutions fraîches qui viennent d'être préparées;
6. Effectuer un contrôle au Bac*Light* de la qualité de l'eau du réservoir d'alimentation et de la chaudière d'alimentation;
7. Prélever les volumes d'eau requis à l'effluent, au réservoir et à la chaudière d'alimentation afin d'en mesurer le pH;
8. Prélever un volume d'eau à l'effluent pour en mesurer le POR;
9. Procéder au prélèvement d'un volume d'effluent (au moins 20 mL) qui servira à l'analyse des EPS & glucides. Mesurer le débit du volume élué, noter sur le récipient daté, puis conserver à -20°C jusqu'à analyse;
10. Lors des journées prévues par l'échéancier, disposer les bouteilles d'échantillonnage à la sortie pour recueillir l'effluent dans les bouteilles de PSC ou Technilab prévues à cet effet.

3.4 Procédures d'échantillonnage spécifiques au lieu du prélèvement

3.4.1 Échantillonnage à la sortie

Aucune procédure spéciale n'est requise pour effectuer les prélèvements à la sortie, car l'eau s'y écoulant librement (ce point du circuit est à la pression atmosphérique).

3.4.2 Échantillonnage à l'entrée

Lorsque des échantillonnages doivent être effectués à l'entrée et à la sortie, effectuer les prélèvements à la SORTIE avant l'ENTRÉE, car pour échantillonner à l'entrée des plaques, il faut ouvrir la valve #18 (Figure 5.1, Annexe 5), ce qui cause fréquemment une perturbation temporaire du débit et des autres paramètres du système. De plus, l'échantillonnage à l'entrée est réalisé seulement en début d'expérience afin de ne pas perturber l'écoulement de l'eau dans les plaques.

Les échantillonnages initiaux à l'entrée des plaques sont effectués de la manière suivante:

1. Fermer les valves en amont (#16) et en aval (#17) (Figure 5.1) des plaques de façon à arrêter la circulation d'eau et à immobiliser l'eau contenue dans les plaques;
2. Inverser le sens de la valve #18 (Figure 5.1) pour détourner l'écoulement dans le tube d'échantillonnage de la valve #18;
3. Si le niveau d'eau dans les piézomètres fluctue avec l'ouverture de la valve #18, fermer les valves des piézomètres (#14);
4. Lorsque le prélèvement est terminé, rouvrir la valve #17, puis la valve #16;
5. Graduellement, inverser de nouveau le sens de la valve #18 pour rétablir la circulation de l'eau dans les plaques.

3.5 Échantillonnages pendant la phase de biocolmatage et de persistance

Pendant ces phases, les **échantillonnages** peuvent être **restreints** à cause du faible débit de sortie, et la **priorité** est donnée d'abord au suivi des paramètres microbiologiques, puis ensuite à celui des paramètres physico-chimiques (pH/POR).

Pour les tests de persistance, attendre l'**établissement d'un régime permanent** pendant quelques jours **avant** de procéder **à l'arrêt complet** de l'apport en nutriments et en bactéries.

4. RÉFÉRENCES

[1] Castegnier, F. (2004). Protocole PE 43A. Version 2 abrégée. Description du montage utilisé pour biocolmater, par l'utilisation de bactéries indigènes des eaux souterraines, un assemblage de plaques de calcaire reproduisant un milieu rocheux fracturé.

[2] Castegnier, F. (2001). Protocole PE 43B. Préparation d'une solution d'eau souterraine synthétique par gravimétrie.

[3] **Castegnier, F. (2004).** Protocole PE 43E. Procédures de saturation d'un assemblage de plaques de calcaire fracturé utilisé pour simuler le biocolmatage d'une fracture dans du calcaire.

[4] **Castegnier, F. (2004).** Protocole PE 43G. Inoculation par des populations indigènes d'une eau souterraine d'un assemblage de plaques de calcaire fracturé utilisé pour simuler un milieu rocheux fracturé et biostimulation de ces populations par un apport continu en nutriments.

[5]. **Castegnier, F. (2002).** Protocole PE 43H. Détermination par poids sec de la concentration d'exopolysaccharides en suspension dans une solution d'eau souterraine contenant des bactéries productrices d'EPS.

[6]. **Castegnier, F., Leduc, M. et Jean, L. (2000).** Protocole PE 43I. Détermination par une méthode colorimétrique de la concentration en glucides d'une solution aqueuse pour des concentrations comprises entre 5 et 100 mg/L (version I) ou 0.5 et 10 mg/L (version II).

[7] **Castegnier, F. (2004).** Protocole PE 43J. Version 2. Énumération directe des bactéries viables et totales d'un échantillon d'eau ou de sol par microscopie à épifluorescence.

[8] **Castegnier, F. (2001).** Protocole PE 43K. Mesure de l'oxygène dissous dans un biofilm ou une solution aqueuse à l'aide d'une microélectrode à oxygène.

[9] **Castegnier, F., Jean, L., Leduc, M., Martineau, G., Deschênes, L. (2002).** Protocole PE 43M. Procédures permettant de démanteler un montage de plaques rocheuses fracturées simulant un biocolmatage au sein d'un aquifère fracturé, puis de prélever et analyser le biofilm formé

[10] **Estrela, S. (2000). PSO E3.** Instructions pour l'utilisation du pH-mètre ACCUMET®, modèle 25 (ORION) avec une électrode de type ROSS® SURE-FLOW™ (ORION).

[11] **Picard, P. (1996). PSO A3.** Mesure du potentiel d'oxydoréduction dans les solutions aqueuses.

[12] **APHA, AWWA et WEF (1998).** *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. New York, USA: American Public Health Association.

5 ANNEXE

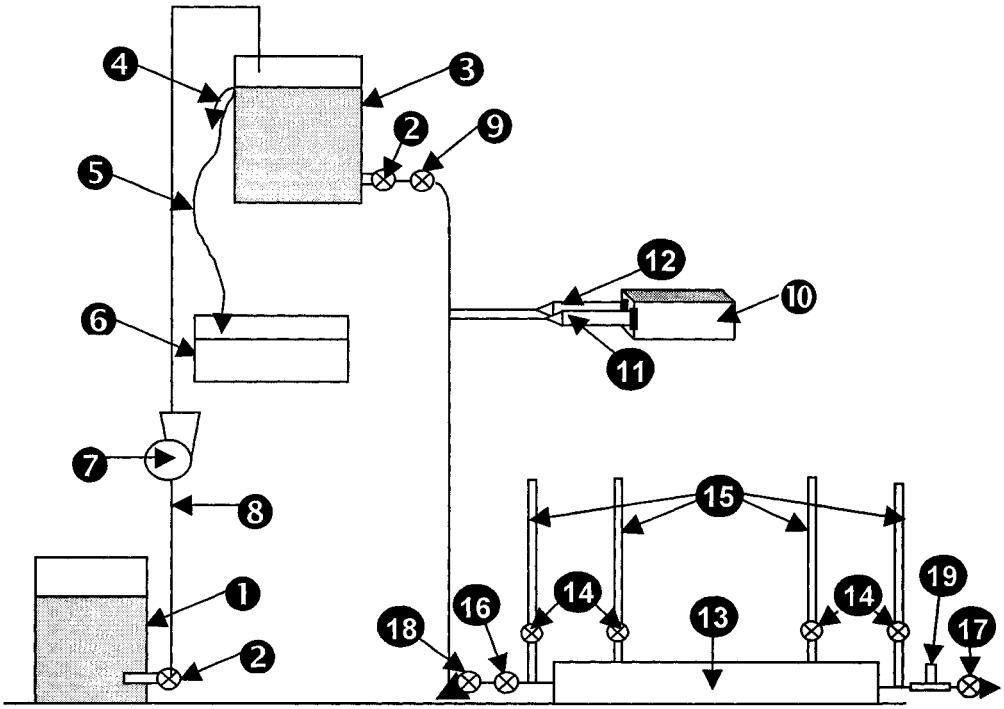


Tableau VI.5.1 Description des pièces du montage montrées à la figure VI.5.1

# Item	Description
1	Réservoir d'alimentation en eau souterraine
2	Robinet des réservoir & chaudière d'alimentation en eau souterraine
3	Chaudière d'alimentation en eau souterraine
4	Tube d'échantillonnage de la chaudière d'alimentation
5	Tube d'évacuation d'eau du système de trop-plein
6	Bac de récupération de l'eau du système de trop-plein
7	Pompe péristaltique
8	Conduit d'alimentation hydraulique
9	Valve-3 voies de la sortie de la chaudière d'alimentation
10	Pompe-seringue
11	Seringue d'injection de la solution d'inoculation
12	Seringue d'injection des nutriments
13	Assemblage des plaques de calcaire
14	Valve-3 voies des piézomètres
15	Piézomètres
16	Vave-2 voies amont des plaques
17	Vave-2 voies aval des plaques
18	Valve-3 voies pour prélèvement à l'entrée
19	Raccord en té pour mesure *in-situ* de l'oxygène dissous

ANNEXE VII: Protocole PE 43E

Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites	**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**
Protocole #: PE 43E	**Nombres de pages:** 6
Version: 1	**Date:** 29-03-04
Auteur(s): Françoise Castegnier	
Approuvé par: Lucie Jean Réjean Samson	**Signatures:** **Date:** ☐ Lucie Jean 31/03/04 ☐ Réjean Samson 31/v/04 ☐

Titre: Procédures de saturation d'un assemblage de plaques de calcaire fracturé utilisé pour simuler le biocolmatage d'une fracture dans du calcaire
Mots clés: saturation, roc fracturé, essai de biocolmatage

1. OBJECTIFS

Le but de ce protocole est de proposer une méthode pour réaliser la saturation d'un assemblage simulant un milieu rocheux fracturé. Le but de la saturation est de chasser les bulles d'air de la fracture de façon à obtenir un comportement hydraulique stable, soit une stabilité dans le temps du débit ainsi que des niveaux piézométriques.

2. MATÉRIEL

- Chambre froide à 10°C;
- Assemblage de plaques de calcaire fracturé connecté à un circuit hydraulique [1];
- ~50 L d'eau souterraine synthétique préparée selon la procédure indiquée au protocole PE43B [2];
- 1 unité filtrante Stericup de 0.22 µm, 500 mL;

- Récipients en plastique de 100 mL ou plus;
- Clés à molette

3. MÉTHODOLOGIE

La procédure de saturation en eau souterraine synthétique du montage fracturé, tel que décrit dans le protocole PE43A [1], a pour but de chasser les bulles d'air de la fracture. Cette saturation est réalisée à un débit supérieur (~ 6 mL/min) au débit initial prévu pour l'essai de biocolmatage (~ 4 mL/min) afin de maximiser le processus d'évacuation de l'air de la fracture. La saturation en eau souterraine de la fracture du montage est réalisée une seule fois avant de démarrer l'essai de biocolmatage.

3.1 Préparation du montage et des solutions

1. Assembler le montage conformément à la figure 5.1 de l'annexe 5 et tel que décrit dans le protocole PE43A [1];
2. Préparer une solution d'eau souterraine synthétique de 50 L selon la procédure décrite au protocole PE43B [2];
3. Filtrer 500 mL de cette solution d'eau souterraine synthétique en utilisant une unité filtrante de 0.22 µm de 500 mL. Conserver l'unité hermétiquement fermée à 4°C;
4. Fermer les valves du réservoir et de la chaudière d'alimentation (#11, Figure 5.1) et mettre toutes les valves (#2, Figure 5.1) du circuit hydraulique principal, de l'assemblage des plaques de calcaire et des piézomètres en position ouverte et de purge.

3.2 Remplissage du réservoir et de la chaudière d'alimentation

1. Remplir le réservoir d'alimentation (#10, Figure 5.1) de 19 L d'eau souterraine synthétique;
2. Ouvrir d'environ ½ tour la valve (#11) du réservoir d'alimentation;
3. Démarrer la pompe péristaltique (#12) et augmenter son débit pour que celui-ci atteigne de 100 à 150 mL/min. Le débit devra être augmenté graduellement de façon à ce que l'air emprisonné dans les tubes hydrauliques et les filtres (#13 & #14) soit évacué sans entraîner de coups dans le circuit hydraulique, ce qui pourrait

éventuellement causer une déconnexion de certaines composantes du circuit (tubes, filtres);

4. Pendant que la chaudière d'alimentation se remplit, tout en veillant à ce que le niveau d'eau dans le réservoir d'alimentation de 19 L reste toujours au moins à moitié plein, installer sur la pompe-seringue deux seringues de 60 mL préalablement remplies, sous conditions stériles, d'eau souterraine synthétique pré-filtrée et procéder à la saturation des lignes du circuit hydraulique de la pompe-seringue de la façon suivante:
   - Mettre les 2 valves du circuit de la pompe-seringue (#2, Figure 5.2) en position de purge;
   - Démarrer la pompe-seringue (#30, Figure 5.2) et ajuster son débit initial pour que celui-ci soit assez important (échelle $1/10^{e}$ ou $1/100^{e}$), pour permettre l'expulsion des bulles des tubes hydrauliques;
   - Recueillir l'eau à la sortie des 2 tubes de purge (#52) à l'aide de récipients en plastique;
   - Lorsque les 2 lignes du circuit hydraulique de la pompe-seringue auront été bien saturées (absence de bulles d'air), inverser le sens des 2 valves #2 pour permettre l'écoulement de l'eau vers le circuit hydraulique principal, et abaisser le débit de la pompe-seringue (échelle $1/1000^{e}$ et débit de 99%);
5. Après 2 à 3 heures de fonctionnement de la pompe-péristaltique, vérifier le niveau d'eau dans la chaudière d'alimentation, qui devrait théoriquement être proche de la hauteur du port de trop-plein;
6. Lorsque le niveau d'eau de la chaudière d'alimentation arrive vis-à-vis du port de trop-plein, abaisser le débit de la pompe péristaltique à environ 6 mL/min;

3.3 Saturation du montage

1. Ouvrir la valve de sortie de la chaudière d'alimentation (#11, Figure 5.1) et ajuster son ouverture pour permettre que l'eau s'écoule à un débit de 6 mL/min (vitesse ~19 cm/min);
2. Récupérer le liquide sortant du tube de purge de la 1ère valve #2 (Figure 5.1) située en aval de la chaudière d'alimentation à l'aide d'un récipient en plastique;

3. Lorsque le tronçon de tube hydraulique situé entre la chaudière et cette valve est saturé, inverser le sens d'écoulement de la valve pour procéder à la saturation du tronçon de tube hydraulique aval;
4. Procéder à la récupération de l'eau sortant du tube de purge de la valve #2 située directement en amont de l'assemblage des plaques avec un récipient en plastique;
5. Une fois que le circuit hydraulique principal situé en amont de l'assemblage des plaques est bien saturé, inverser le sens de la valve située directement en amont de l'assemblage des plaques pour entreprendre la saturation de l'assemblage des plaques;
6. Laisser s'écouler pendant 10 minutes l'eau sortant des tubes de purge des valves des quatre piézomètres (#4, Figure 5.1) tout en la récupérant dans des récipients en plastique d'au moins 100 mL;
7. Placer un récipient d'échantillonnage (#60, Figure 5.1) sur la balance (#61), vis-à-vis du tube de sortie (#54), de façon à en récupérer l'eau;
8. Après 10 minutes, inverser le sens de la valve du 1er piézomètre, et procéder ainsi avec le 2ième, le 3ième et le 4ième piézomètre, l'un après l'autre, de façon à procéder à leur saturation successive;
9. Après avoir laissé monter l'eau dans chacun des piézomètres, éliminer les bulles d'air qui y sont présentes en les frappant légèrement avec un objet solide, par exemple avec une petite clé à molette, en commençant d'abord à éliminer les bulles d'air situées dans le bas du piézomètre;
10. Après stabilisation des niveaux piézométriques, vérifier le débit de l'eau à la sortie du montage, et ajuster l'ouverture de la valve de la chaudière d'alimentation afin qu'un débit d'environ 6 mL/min soit maintenu;
11. Poursuivre la saturation du montage pendant au moins deux jours (48 heures);
12. Faire un suivi manuel de l'élévation des piézomètres au moins 3 fois par jour. Le débit sera suivi en temps réel (fréquence d'une fois par 10 minutes) par la mesure du volume d'eau élué à la sortie via la balance (#61) reliée à un ordinateur (#63, Figure 5.1) muni d'une carte d'acquisition de données;
13. Lorsque la saturation du montage est complétée, fermer les deux valves #2 du circuit hydraulique de la pompe-seringue, et entreprendre l'étape d'injection des bactéries et des nutriments dans la fracture selon les procédures décrites au protocle PE43G [3].

4. RÉFÉRENCE(S)

[1] Castegnier, F. (2004). Protocole PE43A. Version 2 abrégée. Description du montage utilisé pour biocolmater, par l'utilisation de bactéries indigènes des eaux souterraines, un assemblage de plaques de calcaire reproduisant un milieu rocheux fracturé.

[2] Castegnier, F. (2001). Protocole PE43B. Préparation d'une solution d'eau souterraine synthétique par une méthode gravimétrique.

[3]. Castegnier, F. (2004). Protocole PE43G. Inoculation par des populations indigènes d'une eau souterraine d'un assemblage de plaques de calcaire fracturé et biostimulation de ces populations par un apport continu en nutriments.

5. ANNEXE(S)

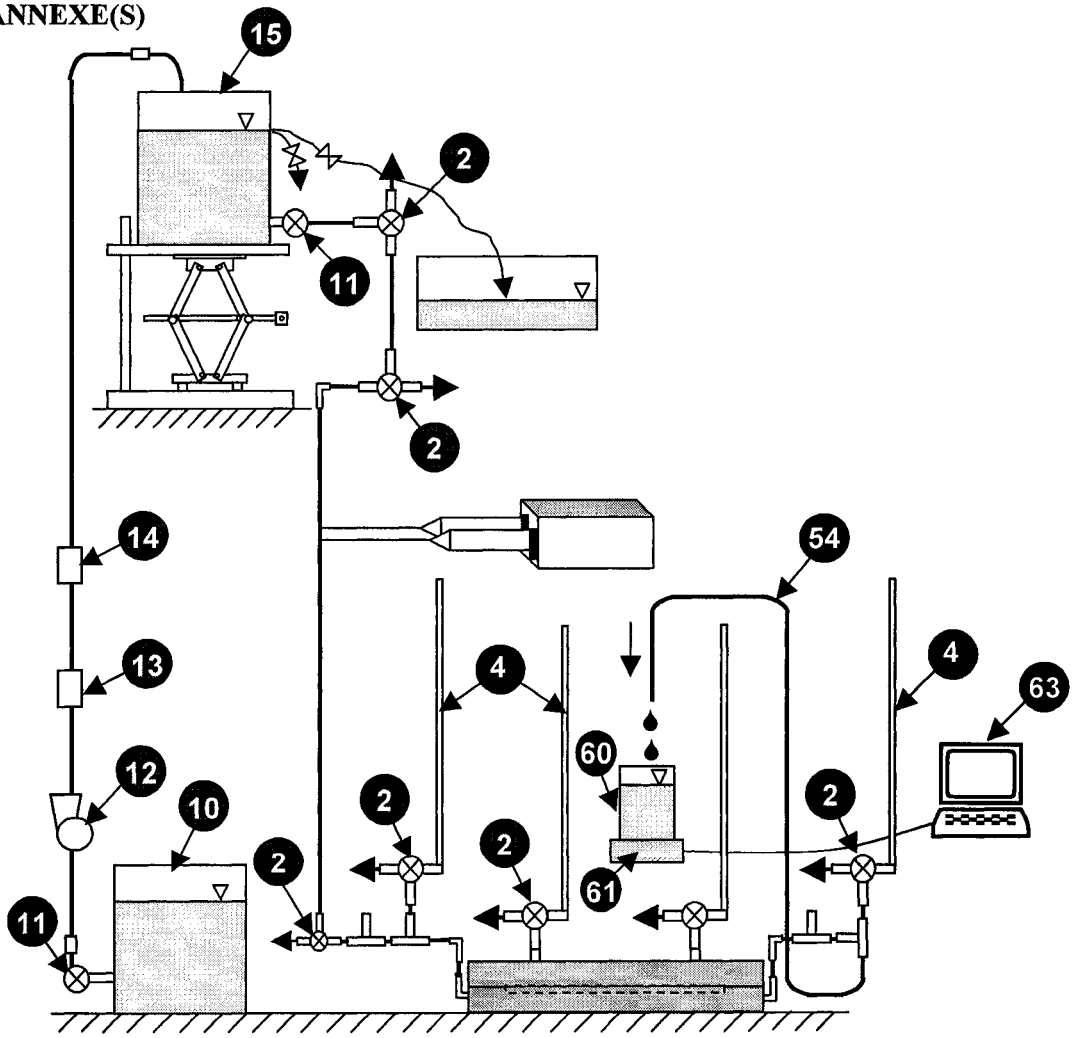


Figure VII.5.1 Schéma général du montage de biocolmatage

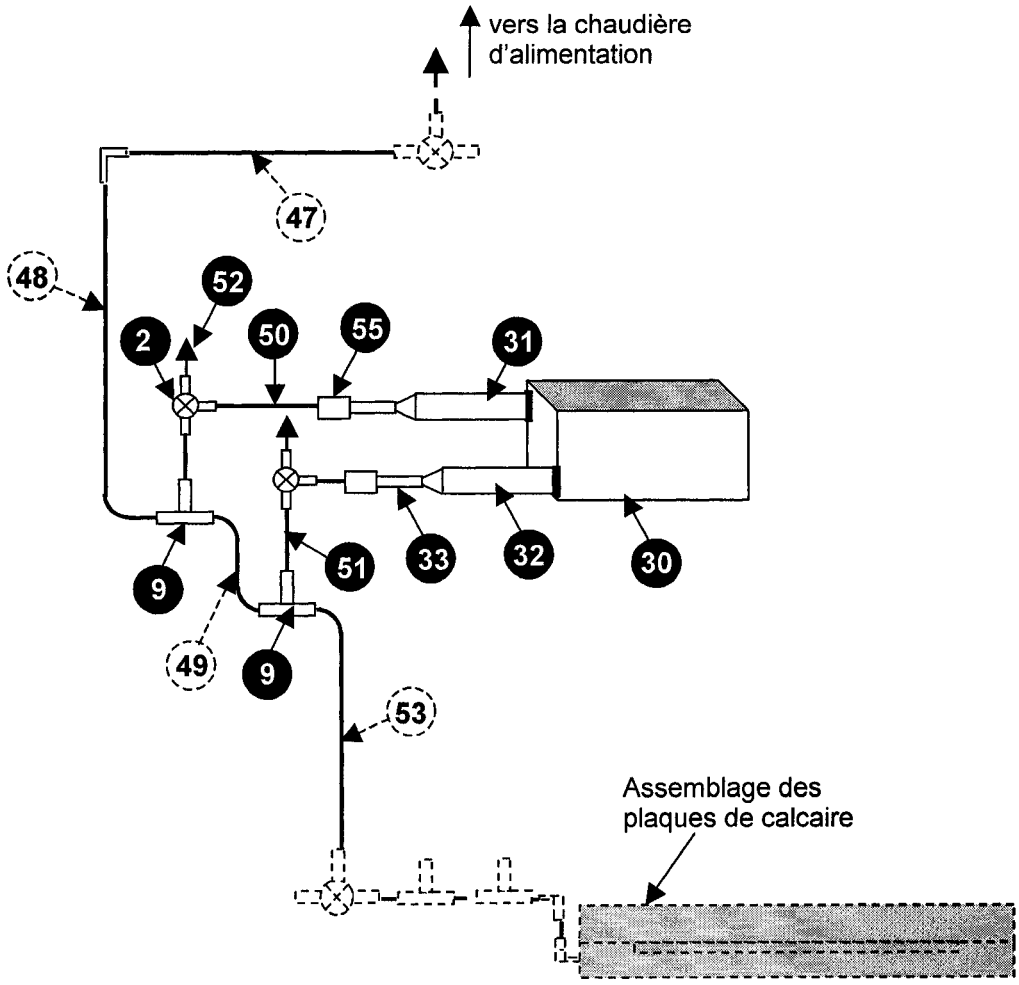


Figure VII.5.2 Système de la pompe-seringue

ANNEXE VIII: Protocole PE43F

Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites	**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**
Protocole #: PE 43F	**Nombres de pages:** 10
Version: 2	**Date:** 29-03-04
Auteur(s): Françoise Castegnier	
Approuvé par: Lucie Jean Réjean Samson	**Signatures:** **Date:** ☐ Lucie Jean 31/03/04 ☐ Réjean Samson 31/04/04 ☐

Titre: Préparation et conservation de toutes les fractions de la population microbienne (ultramicrobactéries et bactéries de taille normale) d'un échantillon d'eau souterraine
Mots clés: population microbienne indigène des eaux souterraines, ultramicrobactéries, bactéries de taille normale, congélation, conservation à long terme

1. OBJECTIFS

Cette méthode vise à:

- Obtenir la biomasse d'une population microbienne indigène d'une eau souterraine prélevée d'un puits de surface;
- Conserver la biodiversité de cette population microbienne pour une durée de l'ordre de un an.

La procédure proposée consiste en une isolation par double-centrifugation des populations bactériennes. La préservation du concentrat bactérien isolé est réalisée par un ajout rapide de glycérol (agent cryoprotecteur) suivi d'une congélation rapide dans de l'azote liquide, puis d'une conservation à -80°C jusqu'à utilisation des souches. Cette procédure ne comporte aucune étape de filtration, et permet donc de récupérer l'entièreté de la population microbienne.

2. MATÉRIEL

- Chambres froide à 4°C et à 10°C;
- Congélateur à -85°C;
- Échantillon d'eau souterraine d'un volume minimal de 2.5 L, prélevé d'un puits de surface depuis moins de 30 heures, et conservé à 4°C dans un contenant stérilisé;
- Hotte microbiologique;
- Hotte chimique;
- Autoclave;
- Centrifugeuse haute-vitesse Beckman, modèle J2-21, vitesse max. de 21,000 RPM;
- Rotor Beckman JA-10 à angle fixe pour centrifugeuse Beckman, 10,000 RPM;
- Centrifugeuse réfrigérée IEC 21000R, International Equipment Company;
- Vortex;
- 6 pipettes de plastique préemballées stériles de 100 mL;
- 6 pipettes de plastique préemballées stériles de 50 mL;
- Poire pour pipette;
- Pipette automatique pipetman 5 mL ou 10 mL avec leurs embouts pré-stérilisés;
- Pipette automatique pipetman 1000 µL avec ses embouts pré-stérilisés à l'autoclave;
- 13 bouteilles à centrifuger Nalgene™ de 500 mL à couvercle vissable en PPCO (copolymère de polypropylène), préalablement autoclavées;
- 7 tubes à centrifuger stériles de 50 mL à fond conique en polypropylène;
- 1 rac à tubes de 50 mL;
- 1 tube à centrifuger stérile de 15 mL à fond conique en polypropylène;
- 1 rac à tubes de 15 mL;
- Une trentaine de tubes Eppendorfs de 1.5 mL en polypropylène préalablement autoclavés (10 tubes/L d'eau prélevé);
- 1 rac à tubes Eppendorfs;
- 1 cylindre gradué de verre 500 mL préalablement autoclavé;
- ~15 mL de glycérol liquide;
- 1 seringue de plastique préemballée stérile de 1 mL;
- 2 béchers de 25 mL;

- Gants thermiques;
- Petite bonbonne à azote liquide;
- Azote liquide (-185°C);
- Panier grillagé cylindrique pouvant rentrer dans la bonbonne à azote liquide;
- Plateau métallique;
- 2 à 3 sacs microbiologiques *Whirlpack*;
- 1 bouteille de lait contenant de l'eau déionisée stérilisée à l'autoclave;
- ~20 mL d'eau souterraine synthétique préparée selon le protocole PE43B [5];
- 1 seringue préemballée stérile de 60 mL;
- 1 unité filtrante 0.22 µm pour seringue;
- Lunettes, sarrau, gants de latex;
- Kit à BacLight et microscope électronique [7].

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Isolation de la population microbienne par double centrifugation

1. Conserver à 4°C un volume d'eau souterraine prélevé d'un puits de surface pour une période maximale de 30 heures suivant son moment de prélèvement;

Pour les étapes de la section suivante, travailler en conditions stériles, c'est-à-dire sous la hotte microbiologique (voir PSO-A12), près de la flamme, et passer, si le matériau le permet, les goulots des tubes, des bouteilles ou des cylindres gradués à la flamme avant et après utilisation.

2. Verser 400 mL de cette eau souterraine dans un cylindre gradué de 500 mL préalablement autoclavé. Transférer les 400 mL contenus dans le cylindre gradué dans 1 bouteille à centrifuger de 500 mL préalablement autoclavée;
3. Répéter l'étape 2 avec 5 autres bouteilles à centrifuger de 500 mL, donnant lieu à un transfert d'eau souterraine d'un volume total de 2.4 L;
4. Revisser les couvercles des 6 bouteilles à centrifuger de 500 mL;
5. Installer le rotor JA-10 dans la centrifugeuse Beckman J2-21;
6. Installer les 6 bouteilles dans le rotor JA-10 de la centrifugeuse J2-21, et indiquer pour chacune d'elle la position du culot par rapport au centre du rotor au moyen d'un stylo

feutre pour permettre d'identifier l'emplacement du culot lorsque les bouteilles seront sorties de la centrifugeuse;

7. Centrifuger les 6 bouteilles pendant 20 minutes à 7,500 RPM (~ 6,000g) [1] (voir fonctionnement de la centrifugeuse à la section 5.2);
8. Après la centrifugation, retirer doucement les 6 bouteilles du rotor en les gardant en position verticale et en évitant de les brasser afin de minimiser toute resuspension du culot;
9. Transporter les 6 bouteilles jusqu'à la hotte microbiologique puis déposer sous la hotte;
10. À l'aide d'une pipette de plastique pré-emballée stérile de 100 mL, enlever de chaque bouteille un volume d'environ 365 mL de surnageant qui sera transféré dans 6 autres bouteilles à centrifuger de 500 mL préalablement autoclavées. Ce surnageant, qui sera appelé "*surnageant 1*", et qui devra être prélevé du côté opposé au culot, sera ainsi conservé jusqu'à la fin de l'expérience. Identifier chacune de ces 6 bouteilles par *surnageant 2.* Effectuer cette opération très délicatement, de façon à éviter une remise en suspension de la partie décantée;
11. Récupérer la suspension microbienne (culot) accumulée au fond de chaque bouteille:
    i. Prélever une partie du culot à l'aide d'un pipetman de 5 ou 10 mL, et asperger les parois de la bouteille au niveau du culot de façon à faire décoller les bactéries des parois. Répéter l'opération plusieurs fois;
    ii. Brasser manuellement, de façon vigoureuse, le contenu de la bouteille pendant une dizaine de secondes;
12. Pour chaque bouteille de 500 mL, transférer le volume de concentrat de 35 mL récupéré selon la méthode décrite au point 11 ci-dessus dans un tube à centrifuger stérile de 50 mL;
13. Après avoir revissé le couvercle des tubes de 50 mL, procéder à leur centrifugation dans la centrifugeuse IEC 21000R pendant 10 minutes à 3000 RPM (~ 700g) et à 10°C [4];
14. Après centrifugation, retirer les 6 tubes de la centrifugeuse selon la méthode décrite au point 8 ci-dessus;
15. Déposer les tubes sous la hotte microbiologique dans un rac à tubes de 50 mL;
16. À l'aide d'une pipette de plastique stérile de 50 mL, prélever de chaque tube de 50 mL un volume de 31 mL de surnageant, qui sera appelé "*surnageant 2*", de façon à laisser 4 mL de culot au fond de chaque tube. Combiner le *surnageant 2* provenant de chacun des 6

tubes de 50 mL (186 mL au total) dans 1 bouteille à centrifuger de 500 mL préalablement autoclavée. Identifier cette bouteille par *surnageant 2*;

17. Décoller le concentrat présent sur les parois de chacun des 6 tubes selon la méthode décrite au point 11;
18. Combiner les 6 fractions de 4 mL du concentrat ainsi obtenu dans un seul tube à centrifuger de 50 mL, et brasser ce tube afin d'en homogénéiser le contenu;
19. Conserver ce tube de concentrat sous la hotte microbiologique si l'étape suivante décrite à la section 3.2.2 peut être effectuée tout de suite. Sinon, conserver à 10°C en attendant de procéder.

La concentration obtenue pour le concentrat (V_{tot} ~ 24 mL) devrait ainsi être de 100 fois (400 mL/4 mL).

3.2 Congélation du concentrat

La congélation du concentrat vise à conserver à long terme la biodiversité de la population microbienne [3].

3.2.1 Préparation des Eppendorfs

Cette étape est une étape de préparation qui devra être effectuée au moins la veille du jour de la manipulation. Les Eppendorfs préparés selon cette procédure pourront être conservés indéfiniment à 4°C jusqu'à leur utilisation.

1. Disposer une trentaine de tubes Eppendorf ouverts dans des racs à Eppendorf;
2. Verser un volume d'une quinzaine de mL de glycérol dans un petit bécher (25 mL);
3. Remplir de glycérol une seringue préemballée stérile de plastique de 1 mL ne portant pas d'aiguille à son extrémité;
4. Déposer un volume de 150 µL de glycérol dans chacun des tubes Eppendorfs;
5. Refermer le couvercle de chaque tube Eppendorf, et stériliser à l'autoclave les tubes laissés dans leur rac.

3.2.2 Distribution et congélation du concentrat

1. Aller chercher de 1 à 2 L d'azote liquide dans une bonbonne à azote liquide. **ATTENTION! L'azote liquide doit être manipulé avec précaution: porter une visière, des lunettes de sécurité et des gants thermiques, afin de réduire les risques de brûlures graves**. Pour plus d'informations, consulter le PSO-G3 [6];

Pour les étapes de la section suivante, travailler en conditions stériles, sous la hotte microbiologique (voir PSO-A12) et près de la flamme.

2. Ouvrir le couvercle d'un tube Eppendorf stérile contenant du glycérol tel qu'obtenu selon l'étape 3.2.1;
3. En utilisant la micropipette de 1000 µL, prélever 1 mL de la solution de concentrat obtenue selon le point 19 de la section 3.1, puis déposer dans l'Eppendorf contenant le glycérol;
4. Refermer le couvercle de l'Eppendorf, puis effectuer de 2 à 3 inversions du tube afin de mélanger le concentrat et le glycérol. La concentration de glycérol obtenue est de 15% (v/v);
5. Tout de suite après ces inversions, déposer le tube dans un panier grillagé suspendu aux parois de la bonbonne à azote, et baignant dans l'azote liquide;
6. Répéter les étapes 2 à 5 jusqu'à épuisement du concentrat;
7. Lorsque le concentrat est épuisé, retirer le panier grillagé de la bonbonne à azote, et étaler les tubes Eppendorfs sur un plateau métallique afin de faire évaporer les résidus d'azote liquide;
8. En utilisant les gants thermiques, déposer les tubes Eppendorfs dans un sac *Whirlpack* préalablement identifié;
9. Refermer le sac *Whirlpack* en y chassant l'air autant que possible;
10. Promptement, placer le sac *Whirlpack* dans le congélateur à -85°C du laboratoire A-674;
11. Déposer la bonbonne à azote liquide sous la hotte chimique pour faire évaporer le restant d'azote à l'air libre, ce qui peut prendre de ½ à 1 journée dépendamment de la quantité d'azote restante;

3.3 Rendement des étapes de centrifugation et de congélation

Chaque centrifugation réalisée à capacité maximale du rotor utilise 2.4 L d'eau souterraine pour produire 24 mL de concentrat microbien, soit 24 tubes Eppendorfs d'inoculum. Cette méthode permet donc de produire **10 tubes Eppendorfs/L d'eau souterraine**. À raison d'un tube Eppendorf requis par inoculation, et d'une inoculation par jour, chaque L d'eau souterraine permettra d'inoculer pendant 10 jours. **3L d'eau souterraine brute, équivalents à 30 tubes Eppendorfs, seront donc requis pour un mois d'inoculation continue.**

3.4 Décongélation des échantillons de concentrat

Procéder à la décongélation des échantillons de biomasse bactérienne indigène des eaux souterraines qui viennent du congélateur à -85°C selon les étapes suivantes [2]:

1. Placer l'échantillon congelé dans les conditions de l'expérience (chambre froide à 10°C) pendant environ 30 minutes;
2. Réchauffer pendant quelques secondes dans sa main les parois du tube Eppendorf de 1.5 mL contenant le concentrat bactérien afin d'en dégeler complètement le contenu;

Pour les étapes de la section suivante, travailler en conditions stériles sous la hotte microbiologique.

4. Après avoir ouvert son couvercle, verser le contenu complet de l'Eppendorf dans un tube à centrifuger stérile de 15 mL;
5. Ajouter 9 mL d'eau déionisée stérile, revisser le couvercle, et centrifuger 10 minutes à 4500 RPM et à 10°C;
6. Après centrifugation, rejeter le surnageant dans un bécher de 25 mL en faisant pivoter le tube de 15 mL rapidement vers le bas, et disposer du surnageant. Cette étape a pour but d'éliminer le glycérol qui est en suspension dans le surnageant;
7. Ajouter au tube de 15 mL un volume de 10 mL d'eau souterraine synthétique préparée selon le protocole PE43B [5] et pré-filtrée à 0.22 μm;
8. Vortexer le tube de 15 mL une quinzaine de secondes pour resuspendre le culot dans la totalité du liquide;
9. Utiliser la solution bactérienne obtenue le plus tôt possible. Cette solution peut toutefois être conservée à 4°C pour un maximum de 24 heures.

4. RÉFÉRENCE(S)

[1] Ross, N. (1999). Clogging of a Single Fracture in Limestone with a Groundwater Microbial Community. Dans: Innocuité environnementale de la stimulation d'une microflore indigène dans une perspective de biocolmatage d'une nappe aquifère de roc fracturé. Thèse de Ph. D., École Polytechnique de Montréal.

[2] http: //www.atcc.org/home.cfm. How to Revive Cultures. Dans: Site Map: American Type Culture Collection.

[3] **Ross, N. (1997).** Protocole P12-B. Préservation et conservation de la diversité microbienne d'un échantillon d'eau souterraine.

[4] **Morais, R. et Chevrier, D. (1999).** Travaux pratiques de biochimie, Cours BCM 3531. Université de Montréal, Département de Biochimie, Faculté des Arts et des Sciences, page 122.

[5] **Castegnier, F. (2002).** Protocole PE43B. Préparation d'une solution d'eau souterraine synthétique à partir de solutions mères.

[6] Protocole d'opération standard PSO-G3. Manutention de l'azote liquide.

[7] **Castegnier, F. (2004).** Protocole PE43J. Version 2. Énumération directe des bactéries viables et totales d'un échantillon d'eau ou de sol par microscopie à épifluorescence.

5. RECOMMANDATIONS

5.1 Travail en conditions stériles

Ne pas passer les goulots des bouteilles à centrifuger sous la flamme puisque ces bouteilles sont en PPCO (copolymère de polypropylène).

5.2 Fonctionnement de la centrifugeuse

- Mettre le rotor à la même température que les échantillons à centrifuger: pré-refroidir le rotor dans la chambre froide à 4°C si les échantillons d'eau ont été conservés à 4°C;
- Mettre l'interrupteur de la centrifugeuse à ''ON'';
- Ajuster la température de centrifugation désirée, indiquée par l'aiguille verte, au moyen du bouton SET;
- Ajuster l'aiguille rouge à la température approximative de la pièce, indiquée par l'aiguille rouge, au moyen du bouton OVERTEMP, tout en maintenant l'aiguille noire entre les aiguilles rouge et verte;
- Ouvrir le couvercle de la centrifugeuse;
- Déposer les bouteilles dans le rotor;
- Installer le rotor dans la centrifugeuse en faisant coïncider les encoches du rotor avec celles de la centrifugeuse;
- Visser le couvercle du rotor dans la tige centrale du rotor. Le couvercle ne vissera pas si les encoches du rotor ne sont pas positionnées vis-à-vis de celles de la centrifugeuse;

- Ajuster la vitesse de rotation (RPM). Cet ajustement déclenche le mouvement de l'aiguille du *vaccum*: attendre que cette aiguille atteigne la zone verte;
- Ajuster la minuterie pour le temps de centrifugation;
- Appuyer sur la touche ''START'';
- Réajuster la minuterie une fois que la centrifugeuse a atteint sa vitesse de croisière, puisque plusieurs minutes peuvent s'écouler avant que celle-ci atteigne la vitesse visée;

5.3 Centrifugation

- Après la centrifugation, la manipulation des bouteilles à centrifuger doit s'effectuer avec soin, afin d'éviter une remise en suspension des bactéries du culot;
- Ajuster la minuterie de la centrifugeuse J2-21 seulement lorsque la vitesse visée est atteinte;
- Garder le surnageant jusqu'à la fin de l'expérience dans des bouteilles qui auront été préalablement stérilisées pour refaire le processus dans le cas où la manip. aurait échoué;

5.4 Utilisation du glycérol

L'utilisation du glycérol entraîne un certain taux de mortalité des bactéries. Il est recommandé de placer les tubes Eppendorfs le plus rapidement possible dans l'azote liquide après que leur contenu (culot et glycérol) ait été mélangé, afin de minimiser ce taux de mortalité.

5.5 Utilisation de l'azote liquide

L'azote liquide doit être manipulé avec précaution (port de la visière, lunettes de sécurité, et gants thermiques). Une mauvaise utilisation de l'azote liquide peut entraîner des risques de brûlures graves. Pour plus d'informations, se référer au PSO-G3 [6].

5.6 Viabilité des bactéries

La méthode de congélation d'une population bactérienne risque d'entraîner un taux de mortalité microbienne. Il peut être utile d'évaluer ce taux à partir de décomptes microbiens par la méthode BacLight™ (protocole PE43J [7]) avant de procéder à l'inoculation des plaques.

5.7 Efficacité de la méthode d'isolation

L'efficacité des diverses étapes de la manipulation (valeur du taux de concentration) peut être vérifiée en effectuant des décomptes bactériens au BacLight™ sur des échantillons de surnageant, de concentrat frais et de concentrat décongelé.

ANNEXE IX: Protocole PE 43G

Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites	**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**
Protocole #: PE 43G	**Nombres de pages:** 13
Version: 1	**Date:** 30-04-04
Auteure: Françoise Castegnier	
Approuvé par:	**Signatures:** **Date:**
Réjean Samson	☐ ☐ 31/03/04 ☐

Titre:	**Inoculation par des populations indigènes d'une eau souterraine d'un assemblage de plaques de calcaire fracturé utilisé pour simuler un milieu rocheux fracturé et biostimulation de ces populations par un apport continu en nutriments**
Mots clés:	**roc fracturé, inoculation, populations microbiennes indigène des eaux souterraines, biostimulation, nutriments**

1 OBJECTIF

Le but de cette méthode est de procéder à l'inoculation, par un échantillon de populations microbiennes d'une eau souterraine, d'une fracture dans du calcaire, et à la biostimulation de ces populations via un apport simultané et continu en nutriments. Cette étape est réalisée après une étape de saturation du montage, telle que présentée au protocole PE 43E [1]. La méthode d'inoculation et de biostimulation proposée vise à reproduire le plus fidèlement possible la fréquence et le mode d'apport en bactéries et en nutriments qui prévalent dans les milieux naturels. Bien que les apports en bactéries et en nutriments au sein des aquifères, qui

proviennent probablement de la zone vadose, s'effectuent à une fréquence relativement constante, ces apports ne s'effectuent pas forcément de façon concomitante.

Cette méthode d'inoculation et de biostimulation, qui exclut toute mise en culture et toute adaptation préalable des bactéries au milieu nutritif, a été privilégiée car elle favoriserait le maintien de la viabilité et de la biodiversité bactériennes initiales. Les résultats de travaux récents [2] ont en effet suggéré que la biostimulation de populations microbiennes indigènes d'une eau souterraine effectuée par une mise en culture de ces populations pouvait entraîner une modification de leur diversité génétique et métabolique.

2 MATÉRIEL

- Chambre froide à 10°C
- Chambre froide à 4°C
- Congélateur à -80°C
- Autoclave
- Spectrophotomètre CARY 100 Bio VARIAN
- Centrifugeuse réfrigérée IEC 21000R, International Equipment Company
- Hotte microbiologique
- Vortex
- Pompe-seringue ORION Sage™, modèle M-365
- 2 valves de commutation à 3-voies en acier inoxydable pour tubes 6-mm OD
- 2 seringues de plastique pré-emballées stériles de 60 mL, Luer-Lok jetables
- Tube hydraulique de PTFE rigide, 6-mm OD x 4.48-mm ID x 50 cm
- Tube de silicone translucide 6.4 mm ID x 9.5 mm OD x ~6 cm long
- 2 *tie-wrap* ~10 cm de long
- 2 connecteurs "*barb*" en acier inoxydable
- 1 L d'eau souterraine synthétique préparée selon le protocole PE 43B et gardée à 10°C
- 1 unité de filtration Stericup Express 0.22 µm de 1000 mL
- 1 ou 2 Eppendorfs de concentrat bactérien congelé à -80°C
- 1 rac à Eppendorfs
- 1 tube à centrifuger stérile de 15 mL
- Pipetman 1000 µL

- Embouts stériles pour Pipetman 1000 µL
- 1 bécher de 100 mL
- 2 bocaux en verre à couvercle vissable de 200 mL pré-autoclavés
- Éthanol
- Clés à mollette petite et moyenne
- Kit à BacLight pour effectuer 2 décomptes
- Pince pour couper les *tie-wrap*

3. EXPÉRIENCES ANTÉRIEURES

Lors d'expériences antérieures [3], l'inoculation des plaques de calcaire a été réalisée grâce à un montage d'inoculation en boucle (Figure 7.2, Annexe 7). Ce montage comportait un circuit hydraulique en forme de demi-boucle constitué d'un erlenmeyer (#1, Figure IX.7.2, Annexe 7) contenant une solution d'inoculation (inoculum décongelé resuspendu dans une solution stérile d'eau souterraine synthétique et de mélasse), une pompe péristaltique (#2), des tubes hydrauliques en PTFE rigide (#3) et divers types de connecteurs (#4 & #5), incluant deux connecteurs rapides (#5) qui permettaient de brancher ou de débrancher la demi-boucle d'inoculation de l'assemblage des plaques de calcaire (A).

Pendant toute la durée de l'essai de biocolmatage, l'inoculation avait été réalisée à une fréquence de 1 fois/semaine, pendant 24 heures, en faisant circuler à un débit de 0.15 mL/min la solution d'inoculation dans l'assemblage des plaques. Cette fréquence d'inoculation avait été déterminée sur la base de courbes de croissance de la population microbienne réalisées dans des conditions similaires aux conditions de l'essai de biocolmatage. Ces tests avaient montré que la phase stationnaire des bactéries avait été atteinte au bout de 7 jours [Nathalie Ross, communication personnelle].

4. MÉTHODOLOGIE

La méthode proposée dans le présent protocole vise à remédier à quelques inconvénients inhérents à la méthode décrite à la section 3, incluant:

1. Le risque d'une remise en suspension, par la circulation en boucle, de bactéries mortes aussi bien que vivantes, de déchets (e.g EPS, produits microbiens solubles) et possiblement de portions de biofilm détaché;

2. Une fréquence d'inoculation (24 heures/semaine) non représentative de la réalité. En réalité, l'apport de bactéries se fait de façon continue en fonction du temps;
3. Une interruption de l'écoulement de l'eau souterraine pendant la période d'inoculation, ce qui pourrait entraîner une perturbation du processus de biocolmatage.

La présente méthode propose d'inoculer les plaques de calcaire avec des bactéries indigènes des eaux souterraines:

i. à une fréquence représentative de la réalité, et
ii. sans interrompre le processus de biocolmatage.

4.1 Description du dispositif d'apport en inoculum et en nutriments

Le dispositif assurant l'inoculation de la fracture des plaques de calcaire et la biostimulation des bactéries injectées (Système D) est décrit aux sections 2.5 et 3.1.4 du protocole PE 43A. En résumé, le système D comporte une pompe-seringue (#30, Tableau IX.7.1 & Figure IX.7.1, Annexe 7), deux seringues de 60 mL (#31 & #32, Figure IX.7.1) contenant l'inoculum et les nutriments respectivement, et actionnées par le plateau mobile de la pompe, ainsi que deux circuits hydrauliques courts situés en aval des seringues, visant à assurer le raccordement de l'extrémité de chaque seringue au circuit d'alimentation principal. Chacun de ces deux circuits hydrauliques comporte une valve 3 voies (#2) munie d'un tube de purge (#52) assurant la purge ou l'échantillonnage du contenu de chacune des deux seringues ainsi que des tubes hydrauliques situés en aval de celles-ci. L'autre sortie de chacune des deux valves 3 voies est connectée au circuit d'alimentation principal. L'ajustement du débit de la pompe-seringue est effectué grâce à 2 sélecteurs, soit un sélecteur d'échelle et un sélecteur de débit (%) [4]. Le sélecteur d'échelle comporte 4 échelles, soit: x 1, x $1/10^{ième}$, x $1/100^{ième}$, et x $1/1000^{ième}$, tandis que le sélecteur de débit peut être réglé entre 0.1% et 99.9%, avec une précision maximale de la pompe-seringue obtenue pour des valeurs comprises entre 30.0% et 99.9%. Le débit maximal est obtenu pour un réglage à x1 du sélecteur d'échelle et à 99.9% du sélecteur de débit. Tel qu'indiqué au tableau IX.4.1, le passage d'une échelle à l'autre fait varier le débit d'un facteur de 10.

Tableau IX.4.1 Débit de la pompe-seringue pour une seringue de 60 mL

Échelle	Débit théorique pour un débit de 99.9%
x1	77.4 mL/min.
x 1/10ième	7.74 mL/min.
x 1/100ième	0.774 mL/min.
x 1/1000ième	0.0774 mL/min.

4.2 Préparation du dispositif d'injection

Tout l'équipement qui est en contact direct avec la solution d'inoculation (tubes hydrauliques, seringues, valves) et la solution nutritive doivent être stérilisés selon les procédures présentées au tableau IX.4.2.

Tableau IX.4.2 Procédures de stérilisation du matériel de la pompe-seringue

# Pièce	Description	Procédure de stérilisation
2	Valve 3-voies	Rinçage à l'éthanol. Les valves **NE DOIVENT PAS ÊTRE AUTOCLAVÉES** car certaines pièces internes (obturateurs) ne tolèrent pas les températures et/ou les pressions élevées
31, 32	Seringue de 60 mL Luer-Lok jetable (Becton Dickinson)	Les seringues sont préemballées stériles et peuvent être utilisées 1 seule fois ou être réutilisées après nettoyage et stérilisation à l'autoclave. Le caoutchouc du piston a par contre tendance à gonfler à l'autoclave ce qui peut compromettre la mobilité du piston dans la seringue
33	Tube de silicone translucide	Stériliser individuellement à l'autoclave avec de l'ouate ou des bouchons en néoprène insérés dans les extrémités afin de les rendre étanches à l'air ambiant. Pour la stérilisation, envelopper dans du papier alu ou déposer dans un contenant en verre fermé hermétiquement par un couvercle vissable
50	Tube de PTFE raccordant la valve 2 au raccord *barb* #55	Raccorder à la pièce #55, et stériliser à l'autoclave, le tout assemblé, avec les extrémités à l'air libre bouchées. Pour la stérilisation, envelopper dans du papier alu ou déposer dans un tube à essai de 50 mL fermé hermétiquement par un bouchon vissable
52	Tube de purge en PTFE	Stériliser à l'autoclave, individuellement, et avec les extrémités bouchées
55	Raccord *barb*	Voir pièce #50

Suite à leur stérilisation, les pièces #52, et #50 & #55 du dispositif d'injection sont connectées au reste du montage dans la chambre froide. Les bouchons qui ont été insérés dans les

extrémités libres des tubes sont gardés tels quels jusqu'à utilisation afin de conserver leur stérilité le plus longtemps possible.

4.3 Préparation des solutions

4.3.1 Solution d'inoculation

La solution d'inoculation (~ 60 mL) est préparée à partir de concentrat bactérien décongelé, puis resuspendu dans de l'eau souterraine synthétique stérile selon les étapes suivantes:

1. Sortir le tube Eppendorf de 1.5 mL contenant l'inoculum du congélateur (-80°C), et placer le tube dans un rac à Eppendorfs dans les conditions de l'expérience, soit dans la chambre froide à 10°C, et ce, pendant environ 30 minutes;
2. Pendant ce temps, filtrer au moyen d'une unité filtrante Stericup 0.22 µm de 1000 mL un volume de 1 L d'eau souterraine synthétique préparée selon le protocole PE 43B [5], et conserver à 10°C jusqu'à utilisation;
3. Après 30 minutes, sortir le tube Eppendorf de la chambre froide, puis réchauffer les parois pendant quelques secondes dans sa main afin d'en dégeler complètement le contenu;

Pour les étapes de la section suivante, travailler en conditions stériles sous la hotte microbiologique

4. Replacer le tube Eppendorf dans le rac à Eppendorfs, ouvrir son capuchon, prélever son contenu complet au moyen du pipetman 1000 µL muni d'un embout stérile, et transférer la totalité du liquide dans un tube à centrifuger stérile de 15 mL;
5. Ajouter au tube à centrifuger de 15 mL environ 10 mL d'eau souterraine synthétique pré-filtrée à 0.22 µm, revisser le couvercle, et centrifuger 10 minutes à 4500 RPM et à 10°C;
6. Après centrifugation, dévisser le couvercle du tube à centrifuger de 15 mL, et rejeter en un seul mouvement, vers le bas, le surnageant (eau souterraine & glycérol) dans un bécher de 100 mL. Disposer du surnageant. Cette étape a pour but d'éliminer le glycérol qui est en suspension dans le surnageant;
7. Ajouter au tube de 15 mL un volume de 10 mL d'eau souterraine synthétique pré-filtrée;

8. Vortexer le contenu du tube de 15 mL pendant quelques secondes pour resuspendre le culot collé contre les parois du tube à centrifuger dans la totalité du liquide;
9. Prélever entre 2 et 4 mL de la solution ainsi obtenue et effectuer un décompte au *BacLight* en duplicata sur un volume de 1 à 2 mL en utilisant la procédure décrite au protocole PE 43J [6];
10. Pendant l'énumération, conserver à 10°C le restant d'inoculum (6 à 8 mL);
11. Après l'énumération, transférer l'inoculum restant dans un bocal en verre à couvercle vissable de 200 mL pré-autoclavé;
12. Selon la densité bactérienne obtenue par énumération directe et le volume d'inoculum restant, ajouter à l'aide d'une pipette préemballée stérile de 100 mL un volume d'eau souterraine synthétique pré-filtrée (volume à déterminer qui sera d'au moins 60 mL) dans le bocal de 200 mL afin d'obtenir la densité bactérienne visée;
13. Conserver la solution d'inoculum à 4°C jusqu'à utilisation.

4.3.2 Solution nutritive

La formule de la solution nutritive établie à la section 6.4.1 du protocole PE 43B [5] est telle qu'indiquée au tableau IX.4.2.

Tableau IX.4.2 Formule de la solution nutritive

Composé	**Concentration (mg/$L_{eau\ déionisée}$)**
Mélasse	813.1
Urée	27.8

1. Préparer 1 L de solution nutritive dans de l'eau déionisée;
2. Filtrer dans une unité filtrante Stericup 0.22 µm de 1000 mL, et conserver à 4°C jusqu'à utilisation.

4.4 Préparation, installation des seringues et démarrage de la pompe-seringue

1. Après plus de 48 heures de saturation du montage selon les procédures présentées au protocole PE 43E [1], éteindre la pompe-seringue, mettre les 2 valves (#2, Figure IX.7.1) du dispositif d'injection en bactéries et en nutriments en position fermée, et enlever puis disposer des seringues qui ont servi à la saturation;

2. Placer tout le matériel nécessaire à l'assemblage des seringues d'injection sous la hotte microbiologique (seringues, *tie-wrap*, tubes hydrauliques en silicone pré-autoclavés) dont les surfaces auront été préalablement stérilisées par un rinçage à l'éthanol;
3. Mettre les UV pour environ 10 minutes;
4. Après 10 minutes, éteindre les UV, et procéder à l'assemblage des seringues sous conditions stériles, près de la flamme d'un brûleur, en portant des gants en latex qui auront été préalablement aspergés d'éthanol et asséchés sous la hotte:
    i. Déballer une seringue de 60 mL;
    ii. Prendre un tube hydraulique en silicone #33 pré-autoclavé, et enlever un bouchon en néoprène d'une des 2 extrémités;
    iii. Insérer cette extrémité du tube sur le bec de la seringue de 60 mL, immobiliser sur le bec, puis entourer et serrer à l'aide d'un *tie-wrap*;
    iv. Couper à l'aide de pinces le bout du *tie-wrap* qui dépasse;
    v. Procéder de même pour l'autre seringue, et déposer les seringues sur la surface de la hotte, près du brûleur;
5. Aller chercher les solutions obtenues selon les points 4.3.1 et 4.3.2 et gardées à 4°C;
6. Ouvrir le bocal contenant la solution bactérienne telle qu'obtenue selon le point 12 de la section 4.3.1;
7. Remplir de cette solution bactérienne l'une des deux seringues de 60 mL préparées selon le point 4 ci-dessus;
8. Purger le contenu de la seringue en positionnant celle-ci avec le bec vers le haut, en appuyant légèrement sur le piston pour faire sortir un peu de liquide, et en cognant légèrement sur les parois pour chasser les bulles d'air présentes;
9. Une fois purgée, rapidement, aller porter la seringue dans la chambre froide, mettre une des 2 valves de la pompe-seringue en position de purge, et installer la seringue sur la même ligne en connectant le tube de silicone dans le raccord *barb*;
10. Caler la seringue sous le ressort de la pompe-seringue pour la maintenir en place;
11. Répéter les points 6 à 10 avec l'autre seringue et la solution nutritive;
12. Ajuster la pompe-seringue à 1/1000e au sélecteur d'échelle et à 99% au sélecteur de débit, puis démarrer cette dernière;

13. Amener le sélecteur d'échelle en position 1/10e pour quelques secondes de façon à saturer les tubes #33 et #50 du contenu des seringues tout en récupérant les liquides à la sortie des tubes de purge;
14. Après ces quelques secondes, et une fois que les tubes hydrauliques #33 et #50 sont bien saturés (absence de bulles), remettre le sélecteur d'échelle à 1/1000e et inverser le sens des 2 valves de façon à ce que les liquides soient injectés dans le circuit d'alimentation principal.

4.5 Ajustement du débit de la pompe et fréquence de changement des seringues

4.5.1 Ajustement du débit

La pompe-seringue est ajustée à un débit initial assez lent (~0.08 mL/min.) afin d'éviter toute perturbation du débit d'alimentation en eau souterraine provenant de la chaudière d'alimentation. Au fur et à mesure que l'essai de biocolmatage évolue, le débit de l'effluent diminue, et le débit de la pompe-seringue est ajusté en fonction de ce débit décroissant en modifiant l'ajustement du sélecteur de débit (%).

4.5.2 Fréquence de changement des seringues

Au début de la phase d'inoculation et de biostimulation, le débit de la pompe-seringue (~0.08 mL/min.) est tel qu'un changement de seringue par 12 heures doit être effectué. Par la suite, suite à la baisse du débit, les changements de seringue peuvent être réalisés à une fréquence variant entre 12 et 24 heures.

5 RÉFÉRENCE(S)

[1] Castegnier, F. (2004). Protocole PE 43E. Procédures de saturation d'un assemblage de plaques de calcaire fracturé utilisé pour simuler le biocolmatage d'une fracture dans du calcaire.

[2] Ross, N., Villemur, R., Marcandella, É., Deschênes, L. (2001). Assessment of Changes in Biodiversity when a Community of Ultramicrobacteria Isolated from Groundwater is Stimulated to Form a Biofilm. *Microbial Ecology.* **42**(1): 56-68.

[3] Ross, N., Villemur, R., Deschênes, L., Samson, R. (2001). Clogging of a Limestone Fracture by Stimulating Groundwater Microbes. *Water Research.* **35**(8): 2029-2037.

[4] ORION (1993). ORION Sage™ Pump Models M361, M362, M365 Instruction Manual.

Boston, MA: ATI ORION Analytical Technology Inc.

[5] Castegnier, F. (2001). Protocole PE 43B. Préparation d'une solution d'eau souterraine synthétique par gravimétrie.

[6] Castegnier, F. (2004). Protocole PE 43J. Version 2. Énumération directe des bactéries viables et totales d'un échantillon d'eau ou de sol par microscopie à épifluorescence.

6. RECOMMANDATIONS ET REMARQUES

1. Porter une attention particulière à la stérilisation de l'équipement et à la filtration de l'eau souterraine synthétique;
2. Même si une fréquence de changement des seringues pouvant aller jusqu'à 24 heures est acceptable, une fréquence de l'ordre de 12 heures est conseillée afin d'éviter une trop grande baisse de la viabilité bactérienne;
3. La préparation de la solution d'inoculation a été réalisée selon le point 12 de la section 4.3.1 suite à la détermination par une méthode de décompte au BacLight de la densité bactérienne d'un échantillon d'inoculum de 10 mL (Point 9, Section 4.3.1). Une méthode de préparation de la solution d'inoculation basée sur la mesure de l'absorbance au spectrophotomètre des échantillons d'inoculum, à une longueur d'onde de 660 nm, a également été testée. Cette méthode n'a cependant pas bien fonctionné, car la majorité des échantillons d'inoculum étaient colorés (présence d'acides humiques ou de matières particulaires??), ce qui a causé des interférences lors des mesures d'absorbance. Un scan effectué sur des échantillons d'inoculum a de plus démontré que le pic d'absorbance localisé à 660 nm était peu prononcé.

7. ANNEXES

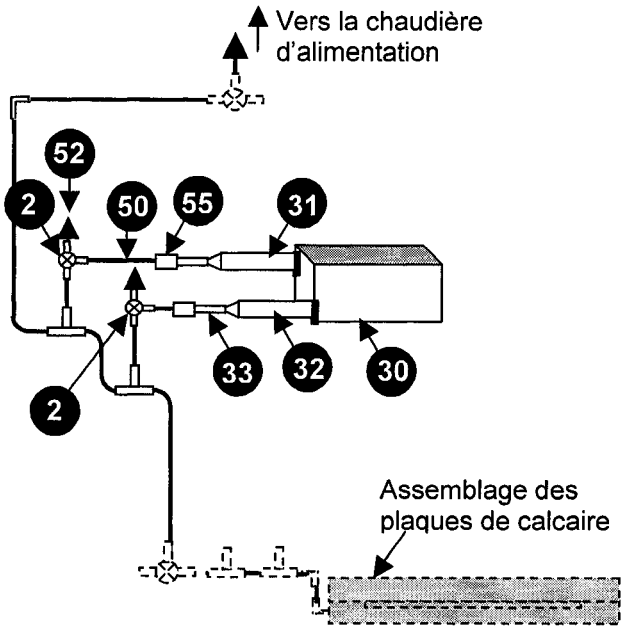


Figure IX.7.1 Système de la pompe-seringue

Tableau IX.7.1 Éléments composant le système de la pompe-seringue

# Pièce	Description
2	Valve de commutation à 3-voies
30	Pompe-seringue Sage Orion M-365
31	Seringue d'injection comportant le milieu nutritif
32	Seringue d'injection comportant l'inoculum
33	Tube de silicone tenu par un *tie-wrap* sur le bec des seringues d'injection (nutriments/bactéries) et venant s'insérer dans un connecteur "*barb*" (#54)
50	Tube permettant de connecter chaque raccord "*barb*" (#55) à la valve (#2) située en aval
52	Tube de purge ou d'échantillonnage
55	Connecteur "*barb*" raccordant chaque seringue à un tube (#50)

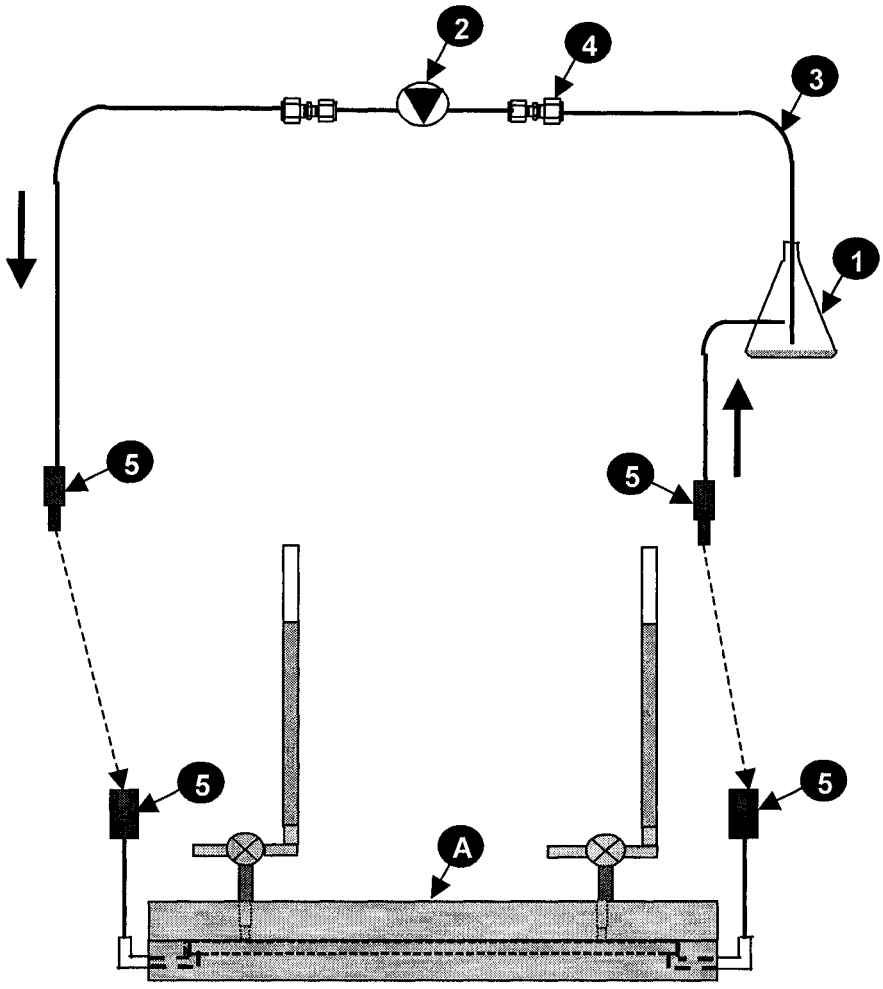


Figure IX.7.2 Montage d'inoculation qui a été utilisé lors d'essais antérieurs

ANNEXE X: Protocole PE 43H

Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites	**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**
Protocole #: PE 43H	**Nombres de pages:** 5
Version: 1	**Date:** 14-04-00
Auteure: Françoise Castegnier	
Approuvé par: Manon Leduc Réjean Samson	**Signatures:** **Date:** ☒ Manon Leduc 31-03-04 ☐ Réjean Samson 31-03-04

Titre:	Détermination par poids sec de la concentration d'exopolysaccharides en suspension dans une solution d'eau souterraine contenant des bactéries productrices d'EPS
Mots clés:	eau souterraine, exopolysaccharides (EPS) en suspension, microflore indigène des eaux souterraines

1. OBJECTIF(S)

Les EPS sont des polymères extracellulaires. Ils sont produits par la plupart des bactéries qui croissent dans des cultures en suspension ou bien dans des biofilms. Les EPS peuvent être soit capsulaires, c'est-à-dire prendre la forme de capsules hautement hydratées attachées à la surface de la cellule qui les produit, ou encore être liés à la paroi cellulaire de façon très lâche [1].

La méthode présentée dans ce protocole vise à quantifier les EPS présents dans un échantillon aqueux. La procédure comporte:

- une étape d'extraction des EPS par un traitement chimique (ajout de NACl et de EDTA) visant à briser les liens existant au sein des EPS pour augmenter la solubilité de ceux-ci dans l'eau,
- une étape de séparation des cellules bactériennes et des EPS par centrifugation,
- une étape de précipitation consistant à ajouter de l'éthanol (agent précipitant) au surnageant,
- une étape de filtration visant à récupérer les EPS sur la surface d'un filtre,
- une étape de pesée du filtre visant à la quantification des EPS par gravimétrie

2. MATÉRIEL

- Échantillon aqueux de 20 mL prélevé stérilement;
- Centrifugeuse haute-vitesse Beckman, modèle J2-21, vitesse max. de 21,000 RPM;
- Rotor Beckman JA-20 à angle fixe pour centrifugeuse Beckman J2-21:
- 20,000 RPM (~31000g), capacité max. de 8 x 50 mL;
- Four à 105°C;
- Dessiccateur;
- Balance analytique;
- 2 agitateurs magnétiques dont 1 comportant une plaque chauffante;
- 2 barreaux magnétiques;
- 1 récipient à couvercle vissable d'au moins 100 mL;
- Bécher de 50 mL;
- Bécher de 150 mL;
- Tubes à centrifuger stérile de 50 mL en PPCO, NALGENE™;
- Pipette volumétrique de verre de 20 mL;
- Pipette volumétrique de verre de 10 mL;
- Seringue de 1000 µL;
- Tige de verre;
- Erlenmeyer à vide de 100 mL;
- Büchner;
- Pince;
- Coupelles de pesée munie d'une poignée, en aluminium, 5 cm Ø, *Fisherbrand*;

- Filtres Whatman No # 1820-055, en microfibre de verre, grade GF/A, 5.5 cm Ø;
- 2 ballons de 100 mL;
- Eau déionisée;
- Solution HCl 1M;
- NaCl (5M);
- Sel disodique dihydraté "EDTA" ($C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$) (agent chelatant), 0.5M (PM 372.24 g), Anachemia #37560-300;
- Éthanol 85% (alcool éthylique dénaturé).

3. MÉTHODOLOGIE

1. Déposer à l'aide d'une pince dans une coupelle en aluminium un filtre Whatman GF/A;
2. Mettre la coupelle comportant le filtre dans le four à 105°C pendant 24 heures, puis dans le dessiccateur pendant 24 heures [2];
3. Sortir du dessiccateur la coupelle comportant le filtre, à l'aide d'une pince, puis peser le tout sur la balance analytique. Noter le poids $\mathbf{m_1}$ obtenu;
4. Prélever de façon stérile, à l'aide d'une pipette volumétrique de 20 mL, un échantillon de 20 mL de l'eau dont on veut déterminer la concentration en EPS, et déposer dans un tube à centrifuger stérile de 50 mL;
5. À l'aide d'une seringue de 1000 µL, ajouter à cet échantillon 400 µL de NaCl (5 M) et 400 µL de EDTA (0.5 M). Mélanger légèrement à l'aide d'une tige de verre, puis laisser reposer pendant 10 minutes;
6. Installer le rotor Beckman JA-20 dans la centrifugeuse Beckman J2-21;
7. Centrifuger pendant 20 minutes le tube de 50 mL et son contenu (Point 5) à 7500 RPM (~ 4410g) dans le rotor JA-20 afin d'obtenir une séparation des deux phases (i.e. cellules bactériennes & EPS) [2];
8. Au moyen d'une pipette volumétrique de 10 mL, prélever du tube centrifugé 10 mL de surnageant, et transférer dans un bécher de 50 mL;
9. Mesurer 30 mL d'éthanol à 85% à l'aide d'une pipette volumétrique de 30 mL;
10. Ajouter l'éthanol au surnageant afin de faire précipiter les EPS [2];
11. Brasser le mélange obtenu avec une tige de verre;
12. Laisser reposer le précipité 10 minutes pour laisser décanter;

13. Déposer dans le büchner fixé sur un erlenmeyer à vide de 100 mL, à l'aide d'une pince, le filtre obtenu au point 3, tout en conservant la coupelle en alu;
14. Filtrer la solution du mélange du surnageant additionné d'éthanol sous un vide relativement faible (~ ¼ tour du robinet de vide) [2];
15. Après la filtration, remettre le filtre dans sa coupelle, puis sécher le filtre selon la procédure décrite au point 2 de cette section;
16. Après 48 heures, répéter le point 3, et noter le poids $\mathbf{m_2}$ du filtre sec.

3.1 Détermination du poids sec des EPS [4]

Déterminer la concentration (mg/L) d'EPS en suspension à l'aide de la relation suivante:

Poids sec des EPS (g/L) = (1000/9.6) x (m_2-m_1) [a]

[a] voir détails des calculs en annexe

4. RECOMMANDATIONS ET REMARQUES

- Après la centrifugation, manipuler avec soin les tubes à centrifugation afin d'éviter une remise en suspension de la biomasse bactérienne du culot dans le surnageant;
- Les traitements chimiques effectués selon le point 5 de la section 3 ont pour but de briser les différents liens qui existent au sein de la matrice des EPS, facilitant ainsi le relargage des EPS dans l'eau. Le EDTA agit comme agent chélateur en augmentant la répulsion parmi les composantes de la matrice des EPS, résultant en une solubilité plus élevée des composantes dans l'eau. Ceci a pour effet d'extraire de la matrice polymérique les cations divalents (Ca^{2+}, Mg^{2+}) qui contribuent à garder la cohésion de la matrice. Également, le NaCl à haute concentration favorise l'échange des cations [3];
- La centrifugation est un traitement physique souvent utilisé après toute procédure d'extraction pour séparer les cellules de la fraction soluble des EPS extraits [3];
- L'extraction chimique est plus efficace lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec une méthode physique.

5 RÉFÉRENCE(S)

[1]. Christensen, B.E. et Characklis, W.G. (1990). Physical and Chemical Properties of Biofilms. Dans: Biofilms, éd. par W.G. Characklis et K.C. Marshall. New York: John Wiley.

[2]. Hacking, A. J., Taylor, I.W.F., Jarman, T.R., Govan, J.R.W. (1983). Alginate biosynthesis by *Pseudomonas mendocina*. *Journal of General Microbiology*. **129**: 3473-3480.

[3]. Nielsen, P.H. & Jahn, A. (1999). Extraction of EPS. Dans: Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function, éd. par: J. Wingender, T.R. Neu, et H.-C. Flemming. Berlin: Springer-Verlag. Pages 49-72.

[4]. Ross, N. (1998). Protocole P12F. Détermination par poids sec de la concentration d'exopolysaccharides en suspension dans un échantillon aqueux.

6. ANNEXE(S)

6.1 Préparation des solutions de NaCl et de EDTA

6.1.1 Solution de NaCl 5 M

Un volume de 100 mL de cette solution de molarité 5M (292.2 g/L) est préparé de la façon suivante:

1. Peser sur la balance analytique 29.22 g de NaCl dans une coupelle;
2. Ajouter dans un ballon de 100 mL contenant un peu d'eau déionisée;
3. Compléter le ballon jusqu'au trait de jauge;
4. Mettre sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète du NaCl;
5. Transférer dans un récipient à couvercle vissable d'au moins 100 mL.

6.1.2 Solution de EDTA 0.5 M

Un volume de 100 mL de EDTA 0.5 M est préparé de la façon suivante:

1. Peser sur la balance analytique, dans une coupelle, 186.12 g de EDTA;
2. Ajouter le EDTA pesé au point 1 dans un ballon de 100 mL rempli au ¾ d'eau déionisée;

3. Placer le ballon sur une plaque chauffante, et mettre sous agitation magnétique avec un flux de chaleur modéré pour initier la solubilisation de l'EDTA;
4. Après solubilisation complète, compléter le niveau du ballon jusqu'au trait de jauge;
5. Prendre le pH de la solution, et ajuster à 7 en ajoutant quelques gouttes de HCl 1M;
6. Poursuivre l'agitation magnétique;
7. Transférer la solution complètement solubilisée dans un bécher d'environ 150 mL;
8. Sans trop attendre, prélever le volume d'EDTA requis (400 µL).

6.2 Calcul du poids sec des EPS (mg/L)

a) **Poids sec des EPS:** $m_2 - m_1$ **(g), où:**
   - m_1 est la **masse du filtre** ayant subi son traitement de dessiccation, **avant la filtration**;
   - **m_2 est la masse du filtre** ayant subi son traitement de dessiccation, **après filtration** de la solution contenant les EPS précipités;

b) **Volume d'eau duquel les EPS ont été prélevés**

Le volume total de l'échantillon aqueux, du NaCl et du EDTA est de (Points 4 & 5, Section 3):

Eau souterraine	20 mL
NaCl	0.4 mL
EDTA	0.4 mL
Volume total	20.8 mL

Le volume de solution qui a été filtré (Point 8, Section 3) est de 10 mL. Cette solution filtrée comprend des fractions d'eau, de NaCl et de EDTA.

Eau souterraine	**?? mL**
NaCl	~ 0.2 mL
EDTA	~ 0.2 mL
Volume total	10.0 mL

$V_{H2O} + V_{NaCl} + V_{EDTA} = V_{prélevé} \Rightarrow V_{H2O} = V_{prélevé} - V_{NaCl} - V_{EDTA} = 10\text{-}2(0.2) = 9.6$ mL

Poids sec des EPS (g/L) = $(m_2\text{-}m_1)$ g/9.6 mL x (1000 mL/L)

= $(m_2\text{-}m_1)$ x (1000/9.6) g/L

ANNEXE XI: Protocole PE 43I

Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites	**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**
Protocole #: PE 43I	**Nombres de pages:** 11
Version: 2	**Date:** 13-02-02
Auteure: Françoise Castegnier	
Approuvé par: Lucie Jean Réjean Samson	**Signatures:** **Date:** ☐ Lucie Jean 31/03/04 ☐ Réjean Samson 31/3/04 ☐

Titre:	Détermination par une méthode colorimétrique de la concentration en glucides d'une solution aqueuse pour des concentrations comprises entre 0.5 et 10 mg/L
Mots clés:	glucides, colorimétrie, méthode phénol-acide sulfurique, méthode de Dubois, concentrations en glucides comprises entre 0.5 et 10 mg/L

1. OBJECTIF

Ce protocole a été mis au point afin de permettre le dosage de concentrations en glucides de l'ordre de 0.5 à 10 mg/L dans des solutions aqueuses, soit des concentrations dix fois moindres que celles qui peuvent être dosées en utilisant la version 1 du protocole PE 43I (concentrations en glucides variant entre 5 et 100 mg/L). La méthode utilise des cuves spectrophotométriques de quartz 10 fois plus longues que les cuves de taille normale, ce qui a permis d'abaisser la limite de détection de la méthode originelle d'environ 10 fois.

Comme dans le cas de la version 1 du protocole PE 43I, cette méthode permet de déterminer la concentration en glucides de solutions aqueuses contenant des monosaccharides, des

disaccharides, des oligosaccharides et des polysaccharides (voir glossaire à la section 6.1 de l'annexe 6).

Dans cette méthode, l'acide sulfurique est utilisé pour briser les glucides en monosaccharides. Les pentoses (5 atomes C) et les hexoses (6 atomes de C) obtenus sont alors déshydratés en furfural (aldéhyde de la série du furanne), qui réagit alors avec le phénol pour produire un composé dérivé du furanne présentant une couleur jaune-orange stable, permanente et insensible aux variations des conditions expérimentales. L'intensité de cette couleur, qui est proportionnelle à la quantité de glucides présents, est alors mesurée par absorbance. La valeur d'absorbance mesurée est ensuite convertie en une concentration en glucides en se référant à une courbe étalon pré-établie [1].

La mélasse verte (*blackstrap molasses*) est le glucide qui a été utilisé pour l'établissement de la courbe étalon de ce protocole.

2. MATÉRIEL

- Échantillon aqueux à analyser
- Mélasse verte (*blackstrap molasses*);
- Eau distillée;
- Acétone;
- Acide sulfurique concentré (qualité réactif 95%);
- Phénol redistillé, qualité réactif;
- Hotte chimique;
- Spectrophotomètre Varian Cary 100 Bio;
- Balance analytique Mettler Toledo AB 204 ou Mettler Toledo AB 204-S;
- Vortex;
- Bain thermostaté;
- 2 cellules de quartz rectangulaires #catalogue Varian: 66-100160-00, 10 cm de long, capacité de 30 mL, pour spectrophotomètre Varian Cary;
- Tubes à essais en verre à bouchon vissable de 50 mL (3 tubes par échantillon analysé, et en prévoir au moins 1 pour le blanc d'expérience);
- Support à tubes pour tubes à essais de 50 mL;
- Pipette volumétrique de 10 mL;

- Bécher de 300 mL;
- Bocal en verre ~200 mL à couvercle vissable;

Pour le tracé de la courbe étalon, la préparation de la solution mère et des solutions filles requiert l'équipement supplémentaire suivant:

- Ballon jaugé de 1 L (préparation de la solution mère);
- Agitateur magnétique;
- Barreau magnétique;
- 10 ballons (environ) jaugés de 100 mL (préparation des solutions filles);
- Pipette de Mohr en verre de 10 mL;
- Pipette volumétrique de 10 mL;
- Pipette volumétrique de 5 mL;
- Pipette volumétrique de 4 mL;
- Pipette volumétrique de 3 mL;
- Pipette volumétrique de 2 mL;
- Pipette volumétrique de 1 mL;
- Pipette jetable préemballée Corning de 25 mL, Fisher Scientific #CS004489;
- Seringue de 250 µL;
- Pipettes Pasteur;
- Lunettes de protection, gants et sarrau.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Préparation d'une solution de phénol

Une solution de phénol de 80% (p/p) est préparée dans un bocal en verre à couvercle vissable d'au moins 200 mL en ajoutant 20 g d'eau distillée à 80 g de phénol redistillé, qualité réactif. La préparation produit un mélange aqueux transparent ou jaunâtre, dépendamment de l'âge du produit brut utilisé. La couleur jaune n'affecte cependant pas la détermination de la concentration en glucides, en autant qu'un blanc d'expérience soit préparé [1]. Le phénol est un composé aromatique qui se présente sous forme de cristaux libres blancs-grisâtres. Étant un produit poison et irritant, et afin d'éviter de respirer les vapeurs fortes et nauséabondes, il est

recommandé de le manipuler et d'effectuer les pesées sous la hotte chimique ou dans tout espace bien ventilé.

Ne conserver la solution de phénol que pour une période de 6 mois, et remplacer toute solution dépassant cette période par une solution fraîche.

3.2 Construction de la courbe étalon standard

3.2.1 Préparation des solutions étalons de mélasse

Préparer une série de solutions étalons de mélasse, de concentration variant **entre 0.5 et 10 mg/L**. Pour ce faire, sélectionner plusieurs valeurs de concentrations fixes, par exemple **0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 mg/L**. Ces solutions, appelées ''solutions filles'', sont préparées à partir d'une ''solution mère'', dans des ballons de 100 mL afin d'augmenter le volume total, ce qui permet de minimiser les erreurs intrinsèques à la dilution:

1. Préparer une solution mère de mélasse d'une concentration de 0.1 g/L:
   - Peser sur la balance analytique, dans un bécher de 300 mL ou plus, 100 mg (0.1 g) de mélasse brute;
   - Ajouter de l'eau distillée, et mettre la mélasse en suspension en pipetant avec une pipette Pasteur;
   - Transférer la solution diluée dans un ballon jaugé de 1 L;
   - Rincer le bécher trois fois de suite avec de l'eau distillée, puis ajouter les trois portions d'eau au ballon;
   - Compléter le volume d'eau distillée du ballon jusqu'au trait de jauge;
   - Inverser le ballon 13 fois afin d'en mélanger le contenu ou mélanger la solution avec un barreau magnétique sur un agitateur.
2. Préparer la série de solutions filles à partir de la solution mère de mélasse. Pour chacune des solutions de la série choisie, effectuer les étapes suivantes:
   - Calculer, en suivant les exemples de calculs présentés à la section 6.2 de l'annexe, le volume X de solution mère requis pour obtenir 100 mL de solution fille pour la concentration désirée (voir tableau 1);
   - Prélever ce volume X à l'aide de la pipette suggérée au tableau 1, puis déposer dans un ballon de 100 mL;
   - Compléter avec de l'eau distillée le volume du ballon jusqu'au trait de jauge;

- Inverser le ballon 13 fois afin d'en mélanger le contenu.

3.2.2 Mesures d'absorbance

Le but de cette procédure est de mesurer l'absorbance d'échantillons de mélasse de diverses concentrations. Réaliser les étapes 1 à 8 suivantes pour:

i. chaque tube à essai contenant une solution fille de mélasse,

ii. le tube contenant le blanc d'expérience. Le blanc d'expérience, qui comportera de l'eau distillée à la place de la solution de mélasse, sera traité de la même façon que les échantillons de mélasse.

1. Pipeter dans un tube à essai de 50 mL, à l'aide d'une pipette volumétrique de 10 mL, **10 mL** de la solution préparée selon le point 2 de la section 3.2.1. Pour le blanc d'expérience, pipeter **10 mL** d'eau distillée;
2. En se plaçant sous la hotte chimique, ajouter au contenu du tube à essai un volume de **250 µL** de la solution de phénol 80% (p/p) (voir procédure de préparation à la section 3.1) en utilisant une seringue de 250 µL ou une pipette de Mohr de 1 mL;
3. Toujours sous la hotte chimique, pipeter un volume de **25 mL** d'acide sulfurique à l'aide d'une pipette préemballée jetable de 25 mL. ***Éviter d'immerger le bec de la pipette plus bas que le niveau des chiffres indiqués sur la pipette, car ces chiffres ne résistent pas à l'acide. Pour le transfert de l'acide sulfurique dans les tubes de 50 mL, garder la pipette bien verticale et effectuer des mouvements très lents afin d'éviter que des bulles d'air ne soient aspirées dans le bec de la pipette, qui est de gros diamètre*;**
4. Ajouter le volume de **25 mL** d'acide sulfurique directement sur la surface de la solution contenue dans le tube de 50 mL, et non sur les parois du tube, afin d'obtenir un bon mélange. Observer le virage de couleur du brun pâle au jaune-orange de chaque échantillon de solution de mélasse. La réaction est fortement exothermique: une température élevée est souhaitée afin d'augmenter la sensibilité du réactif.

   ***Agir avec précaution afin d'éviter les éclaboussures d'acide sulfurique. Manipuler le plus loin possible du corps, et porter des lunettes, un sarrau, et des gants*;**
5. Visser les bouchons des tubes, puis laisser reposer pendant 10 minutes;
6. Vortexer à vitesse faible le contenu du tube à essai pour une courte période (2-3 secondes);
7. Réaliser les étapes 1 à 5 **trois fois** afin d'obtenir des **triplicata**;

8. Déposer les tubes à essai dans un support à tubes, puis maintenir pendant 10 à 20 minutes dans un bain thermostaté entre 25° C et 30° C, afin d'obtenir un refroidissement uniforme des tubes;
9. Transférer la solution fortement visqueuse et corrosive (mélange d'échantillon aqueux, mélasse diluée, phénol et acide sulfurique) contenue dans les tubes de 50 mL dans les cellules de quartz en procédant de la façon suivante:
    a. Accoter délicatement le goulot du tube de 50 mL sur le dessus d'une paroi de la cellule spectrophotométrique de quartz;
    b. Diminuer l'inclinaison du tube en le ramenant vers l'horizontale, afin de pouvoir en verser le contenu dans la cellule;
10. Scanner l'échantillon au spectrophotomètre afin de vérifier si l'échantillon présente bien un pic d'absorbance **à une longueur d'onde de 490 nm**, qui est caractéristique des hexoses (constituant principal de la mélasse) [1]. Si le pic est fortement décalé par rapport à cette valeur, effectuer la lecture d'absorbance à la longueur d'onde indiquée par le scan:
    a. Effectuer les lectures d'absorbance en commençant par la série d'échantillons la plus diluée;
    b. Après chaque lecture, récupérer la solution contenue dans la cellule en la remettant dans son tube de départ, et revisser le bouchon du tube;
    c. Entre chaque série d'échantillons, rincer la cellule de quartz d'abord à l'acétone, puis ensuite à l'eau distillée. Terminer par un séchage à l'air comprimé;
    d. Ne considérer que les lectures d'absorbance comprises entre 0.1 et 1;
    e. La lecture peut être effectuée plusieurs heures après la sortie du bain, car la couleur développée reste stable pendant plusieurs heures.

3.2.3. Courbe étalon standard

À l'aide des valeurs d'absorbance mesurées selon la méthode décrite à la section 3.2.2, construire une courbe étalon en reportant les valeurs de concentration (mg/L) en abscisse, et d'absorbance (sans unités) en ordonnée. Ne garder que la partie de la courbe qui présente un profil linéaire Au besoin, refaire l'essai au complet, uniquement pour des valeurs de concentration strictement comprises dans la partie linéaire de la courbe.

3.3 Détermination de la concentration en glucides d'un échantillon

1. Prélever un échantillon de **10 mL** de la solution dont on veut déterminer la concentration en glucides;
2. S'il y a des risques que l'échantillon considéré **contienne plusieurs types de sucre** (e.g. exopolysaccharides et mélasse), **effectuer une séparation** de ceux-ci. Par exemple, l'extraction des exopolysaccharides de l'échantillon pourra être réalisée selon le protocole PE43H **[4].**
3. Mesurer en triplicata l'absorbance de l'échantillon contenant seulement le sucre étudié en réalisant les étapes décrites à la section 3.2.2;
4. Déduire la concentration en mélasse (mg/L) de l'échantillon en comparant la lecture d'absorbance obtenue ci-dessus avec la courbe étalon établie selon la procédure énumérée à la section 3.2.3. Si l'absorbance de l'échantillon étudié est supérieure à 1.0, effectuer la dilution nécessaire avec de l'eau distillée, afin d'obtenir une lecture d'absorbance comprise entre 0 et 1.

4. RÉFÉRENCE(S)

[1]. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, **28**(3): 350-356.

[2]. Glossaire de biochimie Marcel Lalanne. Département de médecine, Université Laval, Québec. http://www.ulaval.ca/fmed/bcx/m.html.

[3]. Encyclopédie Columbia (2001)

[4]. Castegnier, F. (2000). Protocole PE43H. Détermination par poids sec de la concentration d'exopolysaccharides en suspension dans une solution d'eau souterraine contenant des bactéries productrices d'EPS.

5. RÉSULTATS ET RECOMMANDATION(S)

5.1 Résultats de la courbe étalon réalisée avec de la mélasse verte

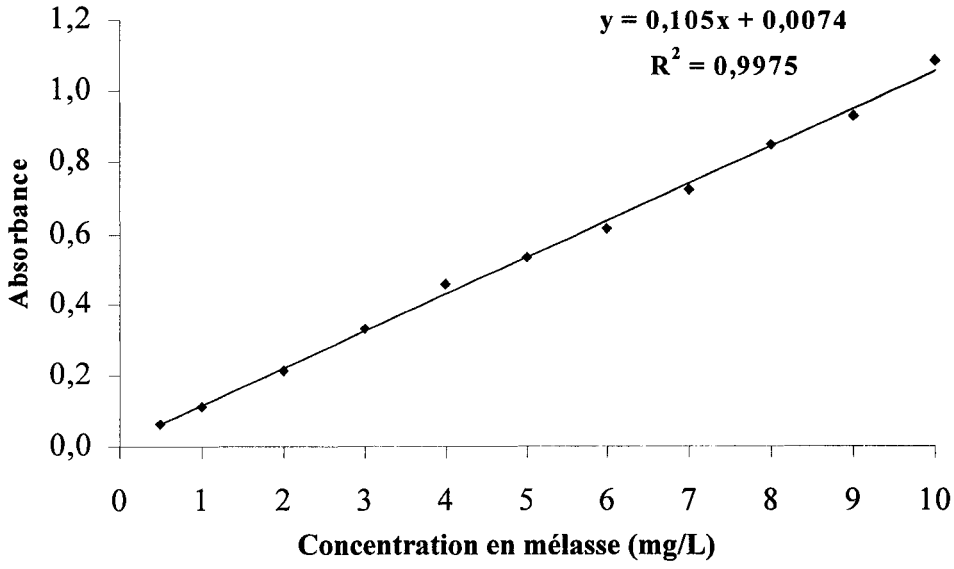


Figure XI.5.1 Courbe étalon[1] de la mélasse Nutrimax réalisée avec des cuves spectrophotométriques de 10 cm de long

[1]réalisée le 27/09/01 par Manon Leduc avec le spectrophotomètre Varian CARY Bio 100

5.2 Recommandation(s)

5.2.1 Sécurité

Étant un composé aromatique poison et irritant, le phénol doit être manipulé avec une attention particulière. Il est recommandé:

- D'éviter de respirer les vapeurs et les poussières en l'utilisant sous la hotte chimique; optimiser le fonctionnement de la hotte en bouchant la prise d'air du dessus au moyen de la vitre qui coulisse verticalement;
- D'éviter tout contact avec la peau et les yeux en portant lunettes, gants et sarrau.

5.2.2 Fréquence d'obtention de la courbe étalon

Il est recommandé de construire une nouvelle courbe étalon tous les mois, à cause des variations d'intensité lumineuse des lampes qui peuvent survenir avec le temps.

6. ANNEXE(S)

6.1. Glossaire (tiré de [2] & [3])

Glucides [2]

Famille de molécules dont la formule chimique brute est, dans la plupart des cas, $C_n(H_2O)_n$. Les glucides sont également nommés hydrates de carbone. Les principaux glucides sont les **polysaccharides**, les **disaccharides** et les **monosaccharides**

Monosaccharide [2]

(ou Monosaccharose). Glucide le plus simple, non hydrolysable. Les monosaccharides sont de deux types: les aldoses (glucide comportant un groupe aldéhyde (-CHO)), et les cétoses (glucide comportant un groupe cétone (>C=O)).
Les monosaccharides se distinguent aussi par le nombre d'atomes de carbone dans leur structure chimique: les trioses (monosaccharide à 3 atomes de carbone), les pentoses (5 atomes C) et les hexoses (6 atomes de C).
Les principaux monosaccharides sont le glucose, le fructose et le mannose.
Les monosaccharides ont tous la même formule chimique $\mathbf{C_n(H_2O)_n = (CH_2O)_n}$ mais des configurations différentes.

Disaccharide [2]

Glucide formé de deux monosaccharides

Oligosaccharide [2]

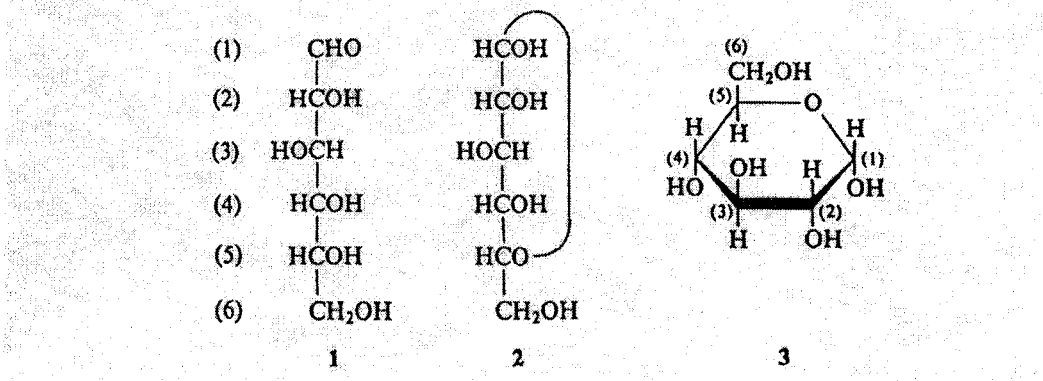
Sucre composé de 2 à 10 résidus de monosaccharides connectés

Polysaccharide [2]

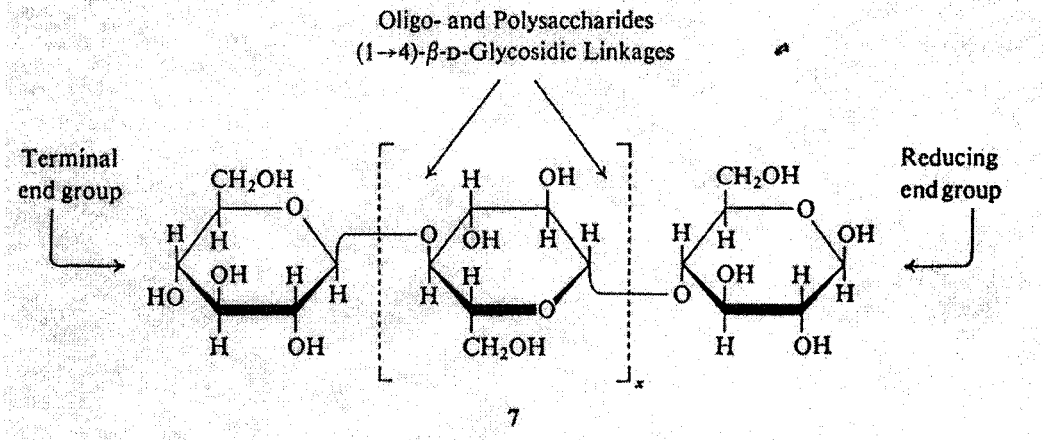
Sucre complexe. Polymère constitué de nombreux monosaccharides, tels l'amidon, le glycogène et la cellulose.
Sucre composé de plus de 10 monosaccharides

Mélasse [3]

Liquide brun obtenu après l'évaporation à base température du jus obtenu à partir de canne à sucre ou de betteraves broyées.
Sa formule empirique est $C_{12}H_{22}O_{11}$ et c'est donc un dissacharide (voir Figure XI.6.1 suivante).



The aldohexose D-glucose in the acyclic Fischer formula (1), the Fischer–Tollens hemiacetal ring formula (2), and the Haworth formula (3).



Polysaccharide: x is large (greater than 8 and usually 100 to 2000).
Oligosaccharides: x is small (0 to 8).
Disaccharide (biose), $x = 0$
Trisaccharide (triose), $x = 1$
Tetrasaccharide (tetraose), $x = 2$
Pentasaccharide (pentaose), $x = 3$

Figure XI.6.1 Formule chimique des glucides

6.2 Calcul des volumes de solution-fille pour diverses concentrations de ces solutions

Exemple: Préparation d'une solution fille de concentration de 10 mg/L:

- Concentration de la solution mère $= C_1 = 100$ mg/L
- Concentration requise solution fille $= C_2 = 10$ mg/L
- Volume de solution fille préparée $= V_2 = 100$ mL

- Volume de solution-mère à prélever = V_1 = ?? mL

$C_1V_1 = C_2V_2 \Rightarrow V_1 = C_2V_2/C_1 = 10 \times 100/100 =$ **10 mL**

Le volume de solution-mère à ajouter dans le ballon de 100 mL sera donc de **10 mL.**

Les volumes de solution-mère à ajouter à un ballon de 100 mL pour obtenir des solutions fille de concentration variant entre 0.5 et 10 mg/L sont rapportés au tableau XI.1 ci-dessous:

Tableau XI.1 Préparation des solutions-filles de mélasse

C_2 (mg/L)	V_1 (mL)	Instrument pour prélever la solution mère
10	10	Pipette volumétrique de 10 mL
9	9	Pipette de Mohr 10 mL en 1/10
8	8	
7	7	
6	6	
5	5	Pipette volumétrique de 5 mL
4	4	Pipette volumétrique de 4 mL
3	3	Pipette volumétrique de 3 mL
2	2	Pipette volumétrique de 2 mL
1	1	Pipette volumétrique de 1 mL
0.5	0.5	Pipette de Mohr de 1 mL en 1/100

6.3 Établissement de la courbe étalon: détail des résultats

Tableau XI.2 Résultats pour l'établissement de la courbe étalon

Concentration de l'échantillon (mg/L)	Absorbance moyenne
0 (Blanc)	0.0039
0.5	0.0607
1.0	0.1110
2.0	0.2123
3.0	0.3297
4.0	0.4536
5.0	0.5311
6.0	0.6132
7.0	0.7250
8.0	0.8520
9.0	0.9323
10.0	1.0868

6.4. Caractéristiques de la mélasse verte (*blackstrap molasses*) utilisée

Tableau XI.3 Composition en COT, TKN et P_{tot} de la mélasse verte LiFemax

Distributeur	Composition (mg/L)		
	COT	TKN	P_{tot}
LiFemax Natural Foods Distribution, Pickering, Ontario	272800	3360	293

ANNEXE XII: Protocole PE 43J

Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites	**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**
Protocole #: PE 43J	**Nombres de pages:**
Version: 2	**Date:** 28-03-04
Auteur(s): Françoise Castegnier Lucie Jean	
Approuvé par: Lucie Jean Réjean Samson	**Signatures:** **Date:** ☐ Lucie Jean 31/03/04 ☐ 31/3/04

Titre:	Énumération directe des bactéries viables et totales d'un échantillon d'eau ou de sol par microscopie à épifluorescence
Mots clés:	énumération directe, bactéries viables et totales, *Bac*Light™, échantillon d'eau, échantillon de sol, microscopie à épifluorescence

1. OBJECTIF(S)

La méthode *Bac*Light™ 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 manquent de spécificité, et requièrent une période d'incubation ou de préparation [3].

Le *kit* de détermination de la viabilité bactérienne LIVE/DEAD *Bac*Light™ 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. La procédure de dénombrement des bactéries viables et totales est simple, rapide et fiable, et peut être réalisée après 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

- Microscope électronique;
- Centrifugeuse réfrigérée IEC 21000R, International Equipment Company;
- Montage de filtration:
  - Support-entonnoir en verre de 15 mL;
  - Support de base en verre fritté;
  - Pince à ressort en aluminium anodisé;
  - Bouchon de silicone perforé;
  - 1 erlenmeyer de filtration à vide de 1 L;
  - 3 erlenmeyers de filtration à vide de 250 mL;
  - 1 pipette préemballée stérile de 10 mL sans l'ouate dans son embout;
  - Tube *vacuum* pour l'acheminement des liquides de filtration;
  - 1 trépied;
  - 3 pinces à fixer au trépied grâce à des noix de fixation
- Échantillon d'eau ou de sol prélevé depuis moins de 30 heures;
- *Kit* L-7007 LIVE/DEAD *Bac*Light™ (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 XII.2.1):

Tableau XII.2.1 Description des 2 solutions du *kit L-7007*

# Solution	Concentration		Volume, avec du diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO) comme solvant
	réactif A[a]	réactif B[b]	
1	1.67 mM	1.67 mM	300 µL
2	1.67 mM	18.3 mM	300 µL

[a] **réactif A:** colorant SYTO® 9
[b] **réactif B:** iodure de propidium

➢ Huile à montage pour lames (*mounting oil*) *Bac*Light™

- Solution saline (0.085% NaCl) stérilisée à l'autoclave;
- 10 mL d'eau déionisée stérile;
- Une dizaine de tubes Eppendorfs 1.5 mL à microcentrifuger préalablement autoclavés;
- 1 support à tubes Eppendorfs 1.5 mL;
- Filtres Millipore noirs en polycarbonate, 0.2 µm ∅ pores, 25 mm ∅ (Millipore, # GTBP02500);
- Filtres Millipore blanc en cellulose, 0.8 µm ∅ pores, 25 mm ∅ (Millipore # AAWP02500);
- 1 petite pince à filtre Millipore stérile;
- Lames et lamelles de microscope;
- Chronomètre;
- Pipettman de 1000 µL;
- Pipettman de 200 µL.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Installation du montage de filtration

Installer le montage de filtration tel que présenté à la figure XII.6.1 de l'annexe 6.

3.2 Préparation de la solution de coloration

Cette préparation devra être effectuée sous conditions stériles, soit sous la hotte microbiologique ou proche de la flamme d'un brûleur.

1. À l'aide d'un pipettman de 1000 µL, combiner les volumes de 300 µL de chacune des solutions 1 et 2 (Tableau XII.2.1) dans un tube Eppendorf à microcentrifuger stérile de 1.5 mL;
2. Après avoir refermé le capuchon de l'Eppendorf, vortexer brièvement son contenu pour homogénéiser le mélange, puis centrifuger brièvement en utilisant la fonction *Short Spin*;
3. À l'aide du pipettman de 200 µL, préparer 6 Eppendorfs de 100 µL de solution concentrée. Pour ce faire, prélever 100 µL du mélange obtenu au point 2, déposer dans un Eppendorf stérile, puis refermer le couvercle. Répéter cette opération 5 fois de façon à prélever la totalité du 600 µL;
4. Centrifuger à *Short Spin* chacun des 6 Eppendorfs pendant quelques secondes, puis entreposer 5 d'entre eux par congélation tel qu'indiqué à la section 3.2, et ce, jusqu'à leur utilisation;
5. À partir de l'Eppendorf qui n'a pas été congelé (100 µL) et à l'aide du pipettman de 200 µL, préparer 5 Eppendorfs de colorant dilué en déposant dans chacun d'eux 20 µL de solution concentrée. Ajouter à chacun de ces 5 Eppendorfs 180 µL d'eau déionisée stérile de façon à obtenir des dilutions de 1:10;
6. Refermer chacun des 5 Eppendorfs, vortexer, centrifuger à *Short Spin*, puis entreposer par congélation (Section 3.2) jusqu'à utilisation.

3.3 Entreposage

La solution de coloration peut durer jusqu'à un an lorsque que conservée selon les procédures suivantes:

1. Conserver à -20°C et à la noirceur les tubes Eppendorfs dont les parois auront été préalablement recouvertes de papier d'aluminium;
2. Avant l'ouverture des tubes Eppendorfs, laisser décongeler le contenu à la température ambiante et à la noirceur et centrifuger brièvement (quelques secondes) afin de recueillir la totalité du liquide au fond de l'Eppendorf. Avant de recongeler, refermer le tube hermétiquement;
3. L'huile à montage *Bac*Light™ reste stable indéfiniment lorsque conservée à la température ambiante.

3.4 Manutention et sécurité

⚠ ATTENTION!

Les solutions 1 et 2 (Tableau XII.2.1) 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 XII.3.1 ci-dessous le volume adéquat d'échantillon d'eau à prélever pour la 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 XII.3.1 Volumes d'eau ou de solution à filtrer selon la nature de l'échantillon

Nature de l'échantillon	Volume de filtration suggéré (mL)
Eau de rivière	1
Eau de réseau de distribution	5-10
Eau souterraine de très bonne qualité	20
Sol	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.

À partir de ce moment, travailler en condition stériles. Allumer la flamme du brûleur. Ce brûleur sera gardé proche du montage de filtration.

2. À l'aide du pipettman 1000 µL, déposer quelques gouttes d'eau saline stérile sur la surface du support de base en verre fritté (#8, Figure XII.6.2, Annexe 6);
3. Déposer le filtre en cellulose (blanc) (#10, Figure XII.6.2) sur les gouttes de solution saline au moyen de la pince à filtre stérilisée (par un passage rapide sous la flamme ou

par rinçage à l'éthanol) afin de l'humidifier et de le faire adhérer à la surface du support en verre fritté (#8);

4. Déposer le filtre en polycarbonate (noir) (#11, Figure XII.6.2) sur le filtre en cellulose. Le but du filtre en cellulose est de protéger le filtre de polycarbonate et d'assurer une distribution uniforme des bactéries sur la surface de celui-ci;
5. Déposer le support-entonnoir de 15 mL (#12, Figure XII.6.2) sur le support de base (#8) et immobiliser le support-entonnoir sur le support de base au moyen des pinces en alu (#13, Figure XII.6.2);
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 (Tableau XII.3.1);
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 et d'y déverser une partie ou la totalité de l'échantillon;
8. Filtrer l'échantillon d'eau:
    - Ouvrir la valve du vide (#1, Figure XII.6.1, Annexe 6) à laquelle le montage de filtration a été branché;
9. Après la filtration:
    - Fermer la valve du vide;
    - Équilibrer les pressions en enlevant la succion encore présente entre les diverses pièces du montage malgré la fermeture de la valve du vide en décollant chaque bouchon #9 (Figure XII.6.2) du goulot de l'erlenmeyer (#3) auquel il est connecté.

3.6 Coloration des bactéries immobilisées sur une membrane

1. Ajouter 1 mL d'eau saline stérile ainsi que 30 µL de la solution de coloration préparée selon la section 3.1. directement sur les filtres montés sur les supports de filtration;
2. Déconnecter du goulot de chacun des erlenmeyers de 250 mL le bouchon de silicone (#9) solidaire du support de base (#8), et laisser incuber la partie déconnectée (pièces #8, 9, 10, 11, 12 & 13 assemblées) 15 minutes à température ambiante et à la noirceur. Une solution pratique est de laisser la partie détachée sur place et de la recouvrir de papier d'aluminium pour empêcher la pénétration de lumière;

3. Après les 15 minutes d'incubation, reconnecter chaque partie déconnectée au goulot de son erlenmeyer correspondant, rétablir la succion et filtrer sous-vide afin d'éliminer la solution saline et les colorants;
4. Une fois la filtration terminée, fermer la valve du vide et équilibrer les pressions en enlevant la succion.

3.7 Préparation de la lame

1. Déposer une goutte d'huile à montage *Bac*Light™ sur une lame à microscope;
2. 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'huile en conservant le filtre dans la même position que lors de la filtration, c'est-à-dire avec la face portant les bactéries dirigée vers le haut;
3. Ajouter une goutte d'huile à montage *Bac*Light™ sur le dessus du filtre;
4. Déposer une lamelle de microscope sur l'huile, puis appliquer une légère pression avec la pince à filtre sur le dessus de la lamelle afin d'obtenir une répartition uniforme de l'huile entre le filtre de polycarbonate et la lamelle.

3.8 Dénombrement

1. Mettre le microscope à épifluorescence NIKON à ''ON'' en appuyant sur le bouton blanc: la lumière verte s'allume;
2. Attendre la stabilisation de l'appareil indiquée par la lumière rouge;
3. Vérifier la présence de la lentille B2A sur un des deux côtés, à l'emplacement des lentilles;
4. Utiliser l'objectif 100x;
5. Ajouter une goutte d'huile à montage *Bac*Light™ sur le dessus de la lamelle;
6. Mettre la lame en place. Coller l'objectif à la lame, puis trouver le champ voulu en éloignant graduellement l'objectif de la lame;
7. Observer la lame au microscope: les bactéries dont les membranes sont intactes apparaîtront en vert, tandis que les bactéries altérées apparaîtront en rouge;
8. 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;

9. Calculer le nombre de bactéries viables et non-viables à l'aide de la formule suivante [2]:

   # bactéries/mL = 31809 x # total de bactéries/(# champs x 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 champ.

4. RÉFÉRENCE(S)

[1]. Molecular Probes. L-7007 LIVE/DEAD® *Bac*Light™ Viability Kit for microscopy. http: www.probes.com.

[2]. Laurent, P. (2000). Communication personnelle.

[3]. Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD *Bac*Light™: Application of a New Rapid Staining Method for Direct Enumeration of Viable and Total Bacteria in Drinking Water. *Journal of Microbiological Methods*. **37**(1): 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. Alors que la capacité mutagène de l'iodure de potassium a été démontrée, aucune donnée n'est disponible sur la toxicité ou la capacité mutagène du réactif SYTO ® 9.

5.2 Entretien du montage de filtration

Vérifier que les niveaux d'eau dans les erlenmeyers (#2 & #3, Figure XII.6.1) n'atteignent pas le tube d'entrée des liquides filtrés. Afin de disposer des réactifs A et B, transférer de temps en temps les solutions contenues dans les erlenmeyers, qui seront conservées dans un récipient prévu à cet effet. Filtrer sur du charbon activé la solution conservée. Les grains de charbon devront être incinérés.

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 champ observé.

5.4 Personnes ressources

Le microscope à épifluorescence NIKON ainsi que le montage de filtration qui sont utilisés appartiennent au groupe de la Chaire en Eau Potable, du département de génie CGM. Dans cette équipe de recherche, la méthode a été utilisée par Jacinthe Mailly et Benoit Barbeau.

Tableau XII.5.1 Personnes ressources pour la microscopie

Personne-ressource	E-mail	# Téléphone (Poly)
Lucie Jean	lucie.jean@polymtl.ca	Poste # 4069
Jacinthe Mailly	jacinthe.mailly@courriel.polymtl.ca	Poste # 2987
Benoit Barbeau	benoit.barbeau@courriel.polymtl.ca	Poste # 2988

6. ANNEXES

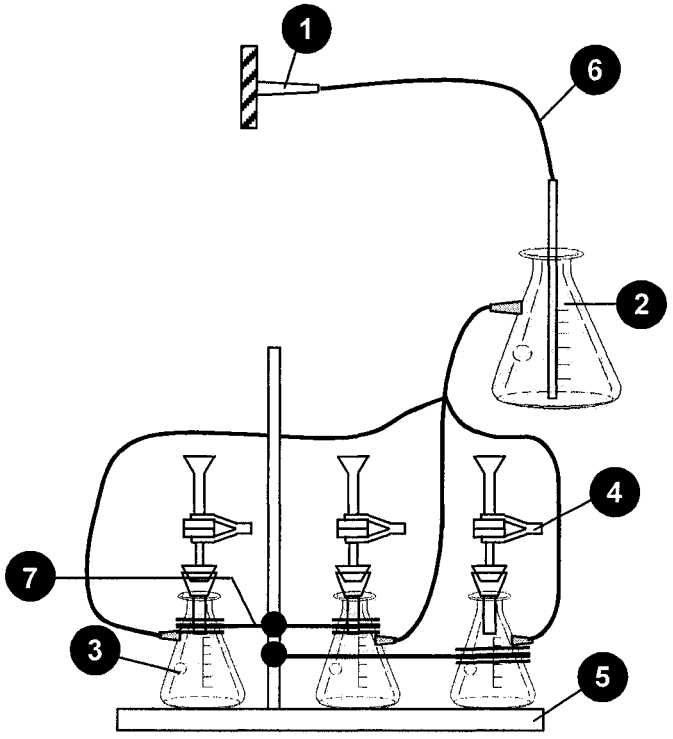


Figure XII.6.1 Montage de filtration pour préparation des échantillons au *Bac*Light™

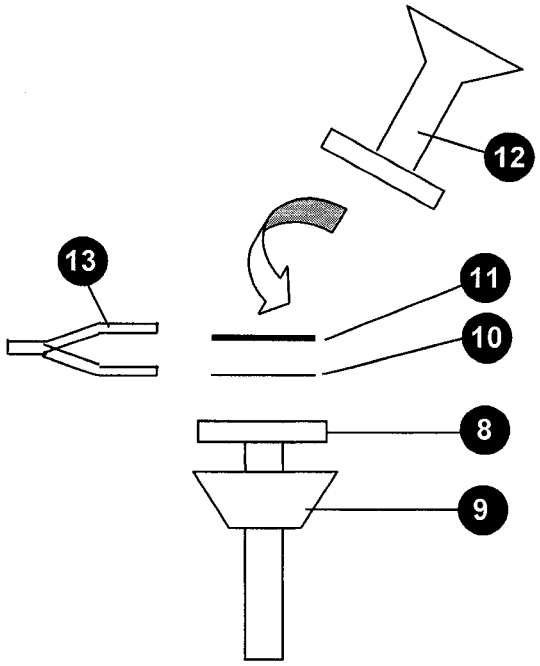


Figure XII.6.2 Détails du montage des filtres entre le support en verre fritté et le support entonnoir

Tableau XII.6.1 Éléments composant le montage de filtration montré aux figures 6.1 et 6.2

# Pièce	Description
1	Vide du réseau
2	Erlenmeyer à vide de 1000 mL
3	Erlenmeyer à vide de 250 mL
4	Filtres montés entre le support-entonnoir et le support de base en verre fritté
5	Trépied
6	Tube de vide
7	Pinces de soutien des erlenmeyers
8	Support de base en verre fritté inséré dans le bouchon de silicone perforé
9	Bouchon de silicone perforé solidaire du support de base en verre fritté
10	Filtre Millipore blanc en cellulose, 0.8 µm ∅ pores, 25 mm ∅
11	Filtre Millipore noir en polycarbonate, 0.2 µm ∅ pores, 25 mm ∅
12	Support-entonnoir en verre de 15 mL
13	Pince à ressort en aluminium anodisé

ANNEXE XIII Protocole PE 43K

Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites	**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**
Protocole #: PE 43K	**Nombres de pages:** 13
Version: 1	**Date:** 10-09-01
Auteure: Françoise Castegnier	
Approuvé par:	**Signatures:** **Date:**
Réjean Samson	☐ ☐ ☐ 31/08/04

Titre: Mesure de l'oxygène dissous dans un biofilm ou un liquide à l'aide d'une microélectrode à oxygène
Mots clés: oxygène dissous, microélectrode, microsonde, biofilm, environnement aérobie

1. OBJECTIF

L'objectif du présent protocole est de présenter une méthode de mesure de l'oxygène dissous dans une solution aqueuse ou au sein d'un biofilm en utilisant une microélectrode à oxygène reliée à un microsenseur chimique, encore appelé oxymètre. Les microélectrodes sont de plus en plus utilisées pour effectuer des mesures directes de paramètres chimiques tels que l'O_2 au sein des biofilms car ce sont des outils non-destructifs qui permettent de prendre des mesures *in situ* [1].

Ce protocole décrit l'oxymètre, son fonctionnement, ainsi qu'une méthode de calibration et d'isolation de la microélectrode nécessaire à l'obtention d'une lecture stable à l'oxymètre. , L'oxymètre permet de convertir le courant (Ampères) mesuré par la microélectrode en concentration d'O_2 (mg/L).

2 MATÉRIEL

- Électrode "aiguille" à oxygène avec référence interne, N° 768-20R, Diamond General Development Corp., Ann Arbor, MI, USA
- Microsenseur chimique, modèle N° 1201, Diamond General Development Corp., Ann Arbor, MI, USA
- Bonbonne à azote
- Échantillon d'eau souterraine
- Trépied (ou support)
- Support à pince, Fisher Scientific N° 5-754
- Pince extension à thermometer Castaloy, Fisher Scientific N° 5-809-10;
- 120 mL d'une solution de NaCl à 0.85% (8.5g/L);

3 MÉTHODOLOGIE

3.1 Installation du montage

1. Placer le microsenseur et la microélectrode à la température de l'expérience (10°C pour la présente expérience);
2. Brancher le microsenseur et mettre l'interrupteur de l'alimentation (#1, Tableau XIII.5.2, Figure XIII.5.2, Annexe 5.2) à *ON*. Dans cette position, l'interrupteur devrait s'illuminer.
3. Connecter le fil de la microélectrode à la prise *INPUT* (#13, Figure XIII.5.3, Tableau XIII.5.3, Annexe 5.2) du panneau arrière du microsenseur;
4. Fixer au moyen d'une de ses noix le support à pince (#D, Figure XIII.5.1, Tableau XIII.5.1, Annexe 5.1) à la tige verticale du trépied (#C);
5. Fixer à l'aide de la seconde noix une pince "extension à thermomètre" sur le support à pince;
6. Insérer l'extrémité supérieure du corps de la microélectrode dans la pince "extension à thermomètre";
7. Installer l'agitateur magnétique sous, et vis-à-vis de la microélectrode.

3.2 Ajustements initiaux

Plusieurs ajustements initiaux doivent être effectués avant de procéder à la calibration de la microélectrode:

a. Positionner le bouton *ELECTRODE POLARITY* (#10, Figure XIII.5.2, Tableau XIII.5.2, Annexe 5.2) à – pour effectuer des mesures de concentration en oxygène dissous;

b. Mettre l'interrupteur *ZERO CHECK/NORMAL* (#9) en position *ZERO CHECK*. Dans cette position, la microélectrode est déconnectée de l'amplificateur de courant, et le voltage de polarisation est enlevé. Il est recommandé de laisser l'interrupteur dans cette position jusqu'à ce que le voltage de polarisation soit déterminé (voir section **3.3.1.**) car l'application d'un voltage excessif peut endommager la microélectrode;

c. Ajuster les cadrans du *FINE GAIN* (#6) et du *FINE ZERO* (#8) en position complètement inversée par rapport au sens des aiguilles d'une montre;

d. Ajuster le *COARSE GAIN* (#5) à 10^{-6}, et le *COARSE ZERO* (#7) à 10^{-12};

e. Laisser les instruments se stabiliser pendant au moins ½ heure avant d'être utilisés;

3.3 Calibration de la sonde

3.3.1 Détermination du voltage de polarisation

La plupart des microélectrodes à oxygène fonctionnent bien pour un voltage compris entre -0.6 et -0.8 volts. Chaque microélectrode peut être caractérisée par un voltage, dit "voltage de polarisation", pour lequel son fonctionnement est optimal. Le voltage de polarisation est déterminé à partir d'une **courbe caractéristique**. Cette courbe est obtenue en établissant la relation entre le voltage de polarisation (différence de voltage entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence), et le courant circulant entre ces 2 électrodes. Pour tracer cette courbe, réaliser les étapes suivantes:

1. Ajuster le microsenseur pour qu'il affiche une lecture de courant (A). Pour ce faire, mettre le bouton *METER* (#2) du panneau de contrôle *avant* en position *OUTPUT*, puis le bouton OUTPUT (#4) en position (%);
2. Ajuster le *COARSE GAIN* (#5) à une valeur initiale initiale de 10^{-6}. C'est l'ajustement du *COARSE GAIN* qui déterminera l'intensité du courant;
3. Placer un erlenmeyer de 125 mL rempli de 120 mL d'une solution de NaCl à 0.85% (8.5g/L) sur l'agitateur magnétique, sous, et vis-à-vis de la microélectrode;
4. Ajouter un petit barreau magnétique dans l'erlenmeyer, et laisser la solution de NaCl s'équilibrer avec l'atmosphère à la température de l'expérience (10°C);
5. Abaisser tranquillement l'extrémité de la microélectrode dans la solution;

6. Ajuster le voltage de polarisation à une valeur initiale de -1.0 volt. Pour ce faire, mettre le bouton *METER* (#2) en position *ELECTRODE POLARIZATION*, et ajuster la valeur du voltage avec le bouton *ELECTRODE POLARIZATION* (#11);
7. Après une période de stabilisation de 5 minutes, relever la valeur du *COARSE GAIN*. Pour ce faire, remettre le *METER* en position *OUTPUT*, et ajuster le *COARSE GAIN* à l'échelle qui permettra de relever le plus grand nombre de chiffres possible. Voir l'exemple donné dans le tableau XIII.3.1 ci-dessous.

Tableau XIII.3.1 Exemple d'ajustement de l'échelle du *COARSE GAIN*

Échelle du coarse gain	**Lecture sur afficheur**	**Résultat avec facteur mutiplicatif de 10^{-2} (Ampères)**
10^{-6}	-00.0	0×10^{-8}
10^{-7}	+00.0	0×10^{-9}
10^{-8}	+01.1	1.1×10^{-10}
10^{-9}	+11.9	1.19×10^{-10}
10^{-10}	+119.0	1.19×10^{-10}

Pour cet exemple, les échelles 10^{-9} et 10^{-10} donnent la meilleure précision.

Si la microélectrode montre une forte instabilité et qu'il est impossible de relever de valeur de courant sur l'afficheur, procéder à l'isolation de la microélectrode tel que décrit à la section 3.4.

8. Réduire le voltage de polarisation à une valeur de -0.9 volt, et répéter **l'étape 7** précédente. Noter la valeur de courant obtenue;
9. Répéter la procédure décrite au **point 7** à des intervalles de 0.1 volt, en allouant à la microélectrode un temps de stabilisation avant chaque lecture;
10. Tracer la courbe caractéristique de la microélectrode à partir des données recueillies, et observer le plateau de la courbe. **Le voltage de polarisation est défini comme la valeur de voltage moyenne définie par le plateau.** Noter cette valeur. L'allure de la courbe caractéristique peut varier avec l'âge et l'utilisation des microélectrodes. Fréquemment, le plateau n'est pas plat, i.e. possède une pente légèrement négative ou positive, et peut s'étaler sur 0.1 à 0.4 volt, avec une valeur moyenne localisée entre 0.6 et 0.8 volt. Une courbe caractéristique obtenue à 20°C pour la microélectrode O_2 N° **768-20R** est montrée à la figure 5.4 de la section 5.3 de l'annexe. Le voltage de polarisation suggéré par cette courbe est d'environ 0.65 volt.

3.3.2 Stabilisation de la microélectrode

1. Ajuster le voltage appliqué sur la microélectrode au voltage de polarisation déterminé à la section 3.3.1;
2. Avant de procéder à la calibration de l'instrument, laisser tremper la microélectrode à sa température d'opération, et à son voltage de polarisation pendant plusieurs heures, préférablement toute une nuit, dans la solution de NaCl à 0.85%, afin d'obtenir une bonne stabilisation.

3.3.3 Calibration de la microélectrode

Une linéarité entre le courant et la concentration en O_2 dissous est supposée. Pour la calibration de la microélectrode, seulement 2 concentrations gazeuses, pré-calibrées, seront donc requises. Les concentrations utilisées pour la calibration seront les suivantes:

- 21% O_2, soit la concentration en O_2 de l'air ambiant;
- 0% O_2, ou encore 100% d'azote gazeux (N_2)

Avant de débuter la calibration, ajuster les boutons de réglage du microsenseur tel qu'indiqué dans le tableau XIII.3.2 ci-dessous:

Tableau XIII.3.2 Ajustement des boutons de réglage avant calibration

Bouton de réglage	Position d'ajustement
METER	Output
OUTPUT	%, ou mm Hg, ou mm Hg EXP (x10 mm Hg), selon les unités de mesure désirées
COARSE GAIN	Sens inverse des aiguilles d'une montre
COARSE ZERO	
FINE GAIN	
FINE ZERO	
ELECTRODE POLARIZATION	Voltage de polarisation déterminé en 3.3.1

Après cette étape, procéder à la calibration de la microélectrode:

1. Reprendre l'erlenmeyer contenant la solution de calibration (NaCl 0.85%), et l'étanchéifier en le recouvrant d'une pellicule de parafilm;
2. Si possible, faire tremper la microélectrode dans la solution de calibration. Pendant au moins dix minutes, buller de l'air du réseau dans la solution de calibration. Pour le bullage, utiliser une aiguille, fixée au bout du tube d'apport en air, qu'on introduira dans

la solution de NaCl après avoir pré-percé la pellicule de parafilm. Ajuster le débit du gaz sortant du réseau (air) et de la bonbonne (azote) de façon à obtenir un bullage modéré dans la solution;

3. Cesser le bullage. Si la procédure de bullage n'a pas pu être effectuée en faisant tremper la microélectrode, promptement, immerger le bout de la microélectrode dans la solution de calibration. Garder l'erlenmeyer recouvert de son parafilm pour minimiser les pertes en O_2;
4. Ajuster les boutons de réglage *COARSE GAIN* et *FINE GAIN* afin d'obtenir une lecture de 21% (ou encore 159 mm Hg) sur l'afficheur. Déterminer l'échelle la plus adéquate en jouant sur l'ajustement du bouton *COARSE GAIN*, et obtenir un réglage plus fin en variant la position du cadran du *FINE GAIN*. Noter la lecture obtenue. Si l'unité de lecture choisie est en %, **multiplier par 10^{-2}** la valeur obtenue pour le *COARSE GAIN*, puisque l'afficheur indique une valeur **multipliée par 100**;
5. Répéter les étapes des points **2**et **3** mais en bullant la solution de calibration pendant au moins 10 minutes **avec 100% d'azote** plutôt qu'avec de l'air;
6. Ajuster les boutons de réglage *COARSE ZERO* et *FINE ZERO* afin d'obtenir une lecture de 0% au "meter". Noter la lecture obtenue. Tel qu'expliqué au point **4**, multiplier la valeur obtenue par un facteur de **10^{-2}**;
7. Étant donné que la calibration du 0% d'oxygène pourrait légèrement affecter la calibration initiale (21% d'O_2), répéter de 1 à 2 fois les étapes de calibration des points **2** à **6** afin d'obtenir une calibration adéquate de la microélectrode.

3.3.4 Mesure de l'oxygène

1. Après calibration, laisser la microélectrode branchée à l'*INPUT* du microsenseur, tout en la retirant de la solution qui a servi à sa calibration par bullage;
2. Plonger l'extrémité de la microélectrode dans le médium (e.g. biofilm, liquide) dont on veut mesurer la concentration en oxygène dissous;
3. Effectuer la lecture après avoir trouvé l'échelle la plus adéquate. Pour cela, ajuster à l'échelle du *COARSE GAIN* qui donnera la meilleure précision de lecture.

3.4 Isolation de la microélectrode à oxygène

Les essais préliminaires de mesure de l'oxygène dissous par l'insertion de la microélectrode dans des fluides démontrent la plupart du temps que le signal affiché par l'oxymètre est

beaucoup trop instable pour permettre une lecture. Ce phénomène d'instabilité est attribué au courant très bas et à l'impédance élevée générée par la microélectrode, qui la rendent très susceptible aux interférences externes **[2]**. Pour remédier à ce problème, il faut d'abord aménager autour de la microélectrode une cage de Faraday. Celle-ci peut par exemple être constituée d'une gaine d'isolation tressée tubulaire avec laquelle on entoure la microélectrode sans toutefois y toucher (on tient la gaine avec une pince fixée à un trépied). Dans un deuxième temps, une "mise à la terre" de la cage de Faraday est effectuée en reliant d'un fil conducteur comportant un embout à pinces alligator la paroi externe de la gaine d'isolation à une prise de terre (Figure XIII.5.5, Tableau XIII.5.5, Annexe 5.5).

4 RÉFÉRENCE(S)

[1] Bishop, P. L. et Yu, T. (1999). A Microelectrode Study of Redox Potential Change in Biofilms. *Water Science and Technology*. **39**(7): 179-185.

[2] http: www.diamondgeneral.com

5 ANNEXE(S)

5.1 Montage

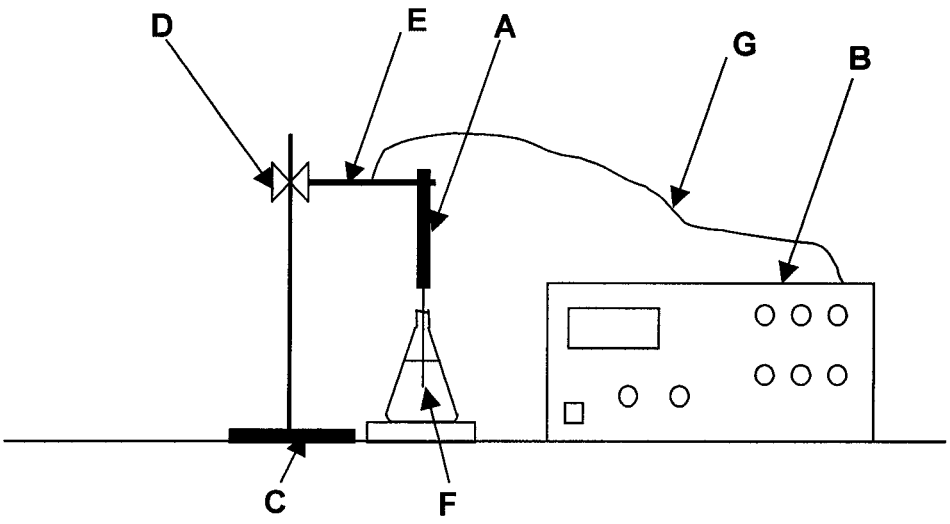


Figure XIII.5.1 Montage microélectrode/microsenseur

Tableau XIII.5.1 Éléments composant le montage montré en figure XIII.5.1

#	**Description**
A	Microélectrode à oxygène
B	Microsenseur
C	Trépied
D	Support à pince
E	Pince "extension à thermomètre"
F	Erlenmeyer de 125 mL contenant la solution de calibration (NaCl 0.85%)
G	Câble de connexion de la microélectrode

5.2 Microsenseur chimique de Diamond General

Ce microsenseur est un instrument de recherche pour la mesure ampériométrique de la pression partielle pour des gaz dissous tels que l'oxygène (O_2) et l'oxyde nitrique (NO). Le meter digital affiche la pression de ces gaz en millimètres de mercure (mm Hg), ou en pourcentage de la pression totale. La pression en NO en unités de nanomoles.

5.2.1 Fonctions de contrôle et connexions principales du microsenseur

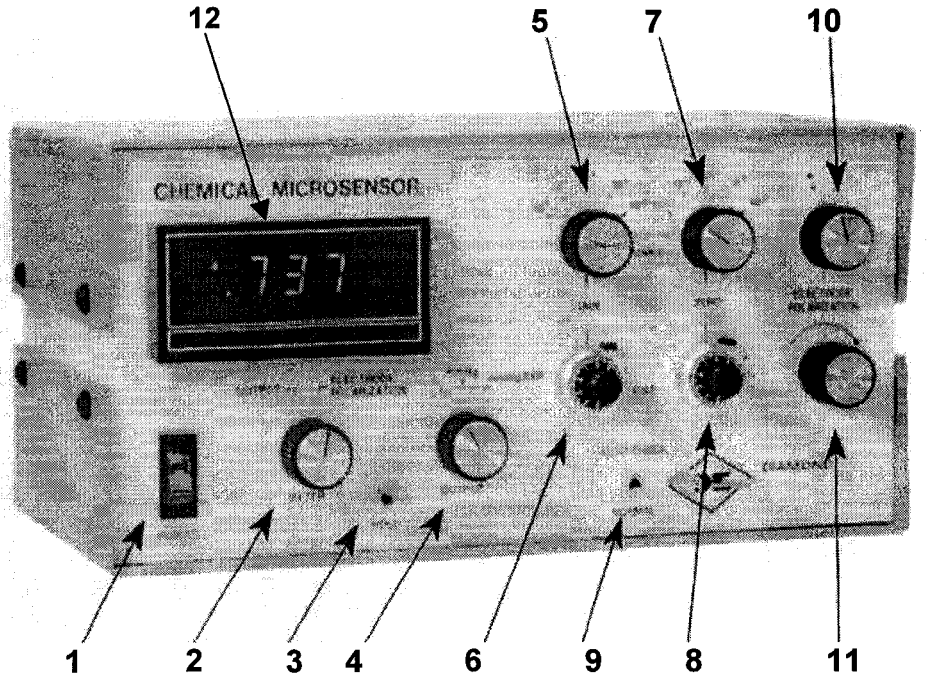


Figure XIII.5.2 Fonctions du panneau avant du microsenseur

Tableau XIII.5.2 Fonctions de base du *panneau de contrôle avant*

#	Appellation	Description
1	***POWER***	**Interrupteur d'alimentation** CA
2	***METER***	**Bouton *d'affichage*** pour 2 fonctions: 1. ***OUTPUT*:** affichage du courant polarographique sous forme de pression partielle (%, mm Hg, ou mm Hg EXP), ou de courant absolu (Ampères (A)) 2. ***ELECTRODE POLARIZATION*:** affichage du voltage de polarisation
3	***HOLD***	Interrupteur permettant de retenir temporairement la valeur affichée pour enregistrer des lectures instables
4	***OUTPUT***	**Bouton permettant *l'affichage*** de la lecture pour ≠ unités de mesure: 1. **%:** affiche la pression en O_2 en pourcentage de la P_{atm}. Aussi utilisé pour mesurer des courants absolus; 2. **mm Hg:** affiche la pression en O_2 en mm Hg; 3. **mm Hg EXP:** échelle élargie: le gain est **multiplié** par un facteur de 10 par rapport à l'échelle mm Hg
5	***COARSE GAIN***	**Bouton d'ajustement** de l'échelle de l'intensité de courant quand l'*OUTPUT* est ajusté à %. Multiplier le résultat final par 10^{-2} car la valeur sur l'afficheur a été multipliée par 100
6	**FINE GAIN**	**Cadran gradué d'ajustement du *COARSE GAIN*.** Permet de faire varier le gain indiqué par le *COARSE GAIN* d'un facteur de 11
7	***COARSE ZERO***	**Bouton d'ajustement** de l'échelle de l'intensité du courant résiduel souvent présent chez les microélectrodes à O_2, même sous conditions anaérobies
8	***FINE ZERO***	**Cadran gradué d'ajustement** permettant de faire varier le courant résiduel indiqué par le *COARSE ZERO*
9	**ZERO CHECK /NORMAL**	**Interrupteur** permettant de déconnecter la microélectrode de l'amplificateur de courant et d'enlever le voltage de polarisation. Mettre en position *ZERO CHECK* avant de déterminer le voltage de polarisation (voir section 3.2.1.), pour protéger certaines microélectrodes de voltages excessifs.
10	***ELECTRODE POLARITY***	**Bouton d'ajustement** pour la polarité du voltage appliqué sur la microélectrode. Positionner à – pour effectuer des mesures en oxygène, et à + pour des mesures en hydrogène et en oxyde nitrique
11	***ELECTRODE POLARIZATION***	**Bouton d'ajustement** permettant de faire varier le potentiel appliqué sur l'électrode
12	***AFFICHEUR***	S'illumine en **rouge** lorsque l'interrupteur d'alimentation est ouvert

Tableau XIII.5.3 Fonctions de base du *panneau de contrôle arrière*

#	Appellation	Description
13	***INPUT***	Prise mâle pour connexion de la microélectrode
14	***REFERENCE***	Prise mâle pour connexion d'une électrode de référence
15	***PRISE***	Prise femelle pour connexion du microsenseur
16	***MODULE FUSIBLE/SÉLECTEUR DE VOLTAGE***	Module comportant 2 composantes: **1.** Carte de sélection du voltage (100/125 VAC ou 210/250 VAC). Doit être installée avant de brancher l'appareil. Le voltage d'opération est déterminé par l'orientation de la position de la carte de sélection du voltage **2.** Support de fusible & fusible 0.25-amp, , type "*slow blow*" MDL 1/4

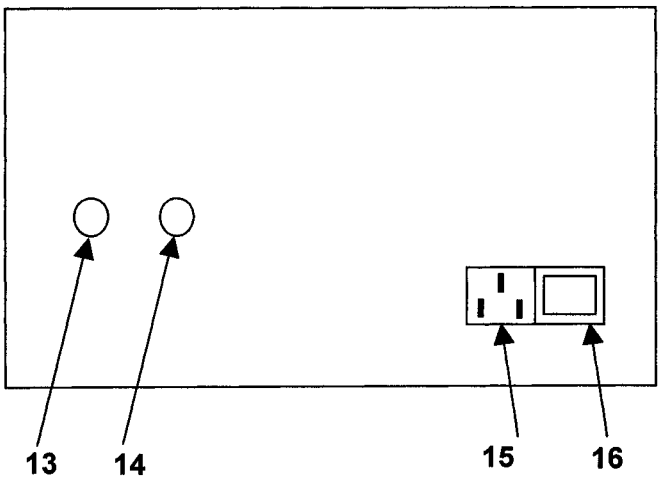


Figure XIII.5.3 Fonctions de base du panneau arrière du microsenseur

5.3 Courbe caractéristique de la microélectrode à O2 No 768-20R

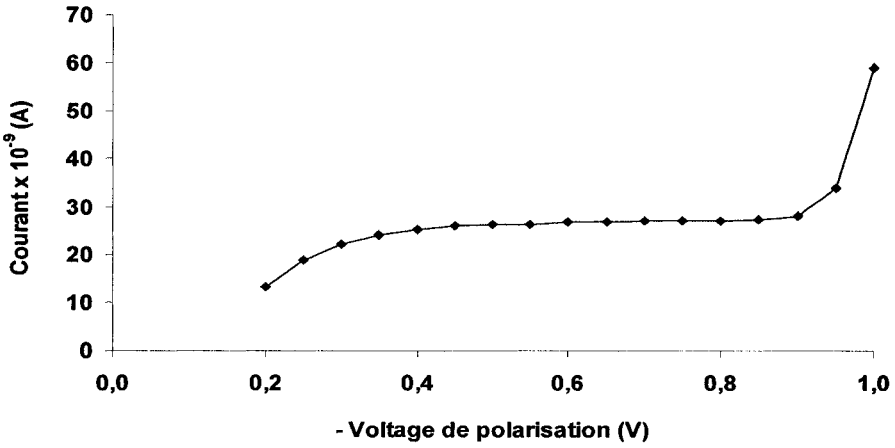


Figure XIII.5.4 Courbe caractéristique de la microélectrode O_2 N° 768-20R

5.4 Exemple de calibration de la microélectrode

Tableau XIII.5.4 Exemple de calibration de la microélectrode

Calibration #	Gaz de bullage	Valeur du *COARSE GAIN*	Valeur du *FINE GAIN*	Graduation finale
1	Air	10^{-8}	8.58	8.58×10^{-10}
	Azote	10^{-10}	0.01	10^{-16}
2	Air	10^{-8}	10.01	10.01×10^{-10}
	Azote	10^{-10}	0.08	8×10^{-14}
3	Air	10^{-9}	0.86	8.6×10^{-12}
	Azote	10^{-10}	0.02	2×10^{-14}
4	Air	10^{-9}	0.14	1.4×10^{-11}
	Azote	10^{-10}	0.02	2×10^{-14}

5.5 Procédure d'isolation de la microélectrode

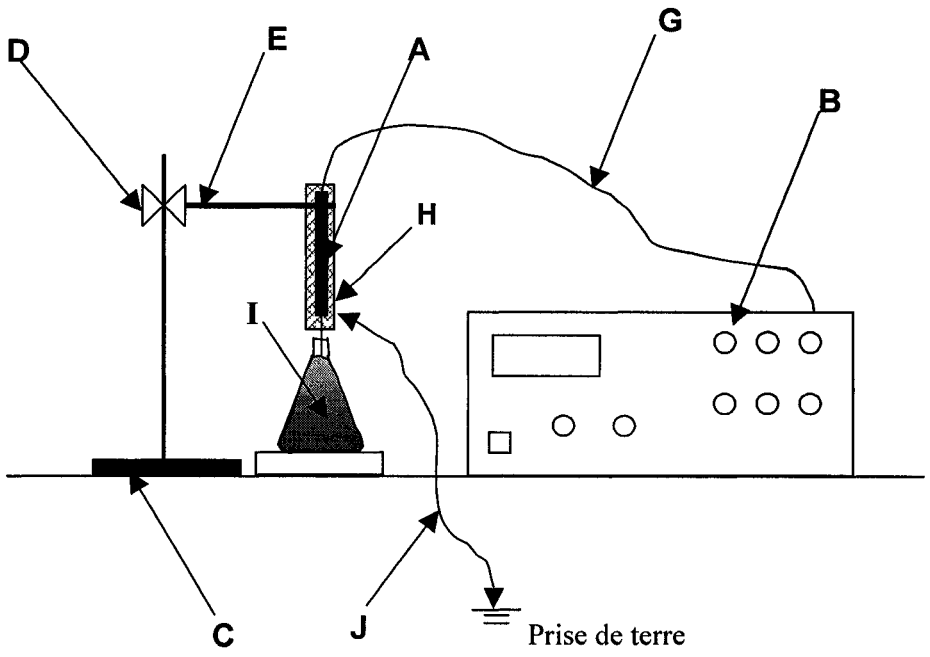


Figure XIII.5.5 Montage du microsenseur avec la microélectrode isolée

Tableau XIII.5.5 Éléments du montage montré à la figure XIII.5.5

#	**Description**
A	Microélectrode à oxygène
B	Microsenseur
C	Trépied
D	Support à pince
E	Pince "extension à thermomètre"
F	Erlenmeyer de 125 mL contenant la solution de calibration (NaCl 0.85%)
G	Câble de connexion de la microélectrode
H	Gaine tressée tubulaire
I	Papier d'aluminium
J	Fil conducteur électrique à pinces alligator relié à une prise de terre

ANNEXE XIV: Protocole PE 43M

Chaire industrielle CRSNG en assainissement et gestion des sites	**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**
Protocole #: PE 43M	**Nombres de pages:** 15
Version: 1 abrégée	**Date:** 13-06-02
Auteure(s): Françoise Castegnier Lucie Jean Manon Leduc	Louise Deschênes Geneviève Martineau
Approuvé par: Lucie jean Réjean Samson	**Signatures:** **Date:** ☐ Lucie Jean 31/03/04 ☐ Réjean Samson 31/3/04

Titre: Procédures permettant de démanteler un montage de plaques rocheuses fracturées simulant un biocolmatage au sein d'un aquifère fracturé, puis de prélever et analyser le biofilm formé
Mots clés: biocolmatage, milieu fracturé, biofilm, récupération, prélèvement, analyses

1. OBJECTIFS

Les objectifs de ce protocole sont de:

- Proposer une méthode pour ouvrir un assemblage de plaques de calcaire fracturé collées avec du silicone et immobilisées avec des serres;
- Réaliser une série d'observations quantitatives et qualitatives sur le biofilm intact;
- Prélever le biofilm en conservant si possible son intégrité;
- Réaliser une série d'analyses sur le biofilm prélevé.

2 MATÉRIEL

- Les protocoles suivants et le matériel qui y est listé:
  - ❖ PE 43A **[1]**,
  - ❖ PE 43H **[3]**,
  - ❖ PE 43I **[6]**,
  - ❖ PE 43J **[5]**,
  - ❖ P33-A **[8]**;
  - ❖ PE 42B **[9]**;
  - ❖ PE 48E **[10]**;
- Plaques de calcaire assemblées;
- 1 à 2 Eppendorfs d'*inoculum* congelé à -80° C pour analyses par DGGE;
- Hotte microbiologique;
- Autoclave du laboratoire A-660;
- Air comprimé;
- Chronomètre;
- Balance analytique METTLER TOLEDO AB204;
- Congélateur à -20°C;
- Congélateur à -80°C ou bonbonne à azote liquide;
- Chambres froides à 4°C & 10°C;
- Microscope électronique équipé d'un appareil photo (ex.: microscope Nikon du local B-430.0, propriété de l'équipe de la Chaire en Eau Potable);
- 2 brûleurs;
- 1 agitateur magnétique;
- 4 barreaux magnétiques pour ballons de 50 mL à 100 mL;
- Appareil photo digital;
- Appareil photo muni d'une lentille macro;
- Vernier (ou pied à coulisse) digital;
- Pinces de menuiserie (boîte à outils);
- 2 petites clés à molette;
- Couteau de travail à lame rétractable avec 4-5 lames de rechange;

- Règle graduée en métal d'au moins 60 cm (~ 2 pieds);
- Micropipette P200 avec ses embouts stériles;
- Micropipette P1000 avec ses embouts stériles;
- 3 pipettes préemballées stériles de 100 mL;
- 3 pipettes préemballées stériles de 5 mL;
- 1 seringue de 500 µL;
- 1 seringue de 1000 µL;
- Lames et lamelles de microscope;
- Chlorure de sodium (NaCl) Anachemia #AC-8304;
- Spatules stérilisées à l'autoclave;
- Pinces stérilisées à l'autoclave;
- Tubes Eppendorfs stériles de 1.5 mL;
- Rac à tubes Eppendorfs;
- 2 ballons de 100 mL;
- 2 ballons de 50 mL;
- 1 "bouteille de lait";
- 1 bécher de plastique de 50 mL ou plus;
- Éthanol 70%;
- Acide nitrique (HNO_3) concentré;
- Acide chlorhydrique (HCl) concentré;
- Acide sulfurique (H_2SO_4) concentré;
- 2 L d'eau déionisée stérile;
- 1 tube Eppendorf contenant ~1 mL d'échantillon d'*inoculum*, et conservé à -80°C;
- 4 bouteilles de prélèvement exemptes de préservatif de la Cie PSC;
- 3 bouteilles de prélèvement exemptes de préservatif de la Cie Technilab;
- Four à convection à 105°C, Precision, GCA Corporation;
- Dessiccateur;
- Four à 550°C, 1400 FURNACE, Thermolyne;
- 1 creuset de porcelaine;
- Pinces de manipulation pour creusets;

- Gants ignifuges;

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Description de l'assemblage des plaques de calcaire

Une description de l'assemblage des plaques de calcaire dont on veut réaliser le démantèlement (ouverture des plaques) est donnée au protocole PE 43A **[1]**. Cet assemblage comporte deux plaques de calcaire 5 cm x 10 cm x 60 cm. Une fracture linéaire simple, de section rectangulaire (4.5 mm x 1 mm x 50 cm) a été taillée sur la face supérieure de la plaque inférieure. Les plaques de calcaire ont été assemblées en "sandwich" et étanchéifiées avec du silicone d'aquarium et des serres. Le silicone a été appliqué en couche mince de 1 à 2 mm d'épaisseur à l'extérieur de la fracture, jusqu'à environ 2.5 cm de son bord, sur la face supérieure de la plaque inférieure (plaque fracturée) ainsi que sur la face inférieure de la plaque de calcaire supérieure. La distance de 2.5 cm a été respectée afin d'éviter l'infiltration du silicone dans la fracture. L'étanchéité de l'assemblage a été obtenue suite à l'étape de séchage, au cours de laquelle un resserrement graduel des plaques au moyen des serres et une compaction progressive de la couche de silicone ont été réalisés.

La procédure de démantèlement de l'assemblage consistera à briser le joint de silicone qui unit les 2 plaques, rendant ainsi possible leur ouverture.

3.2 Déconnexion de l'assemblage des plaques du reste du montage

Préalablement à son transport et à son ouverture, l'assemblage des plaques de calcaire doit d'abord être déconnecté du circuit hydraulique d'alimentation, selon la procédure suivante:

1. Fermer les valves **(#2)** des piézomètres **(#4)** de l'assemblage des plaques (Figure XIV.5.1, Annexe 5);
2. Rapidement, afin d'éviter une surpression dans le circuit hydraulique d'alimentation, fermer la valve **(#2)** située directement en amont du 1er piézomètre de l'assemblage des plaques (Figure XIV.5.1);
3. Toujours rapidement, fermer les 2 valves **(#2)** situées en aval de la chaudière d'alimentation **(#15)**;
4. Fermer le robinet **(#11)** de la chaudière d'alimentation **(#15)**, puis celui du réservoir d'alimentation **(#10)** (Figure XIV.5.1);
5. Arrêter la pompe péristaltique **(#12)**;

6. Déconnecter les 4 piézomètres **(#4)** de leurs valves respectives en dévissant la noix de raccordement. On pourra essayer de récupérer le liquide contenu dans les piézomètres dans un bécher de plastique de 50 mL ou plus, pour éviter que le liquide ne se répande sur le sol;

Pour la dernière étape, travailler en équipe de deux afin de diminuer les risques de perdre le liquide contenu à l'intérieur des plaques.

7. À la sortie de l'assemblage des plaques, faire dévisser rapidement la noix de la sortie du tube hydraulique **(#6)** situé entre le raccord coude de nylon **(#5)** et le raccord en coude en acier inoxydable **(#7)** (Figure 5.2) **par le 1er manipulateur**. Ce dernier devra boucher l'extrémité du tube en mettant son pouce dessus, puis en venant y visser un capuchon de fermeture afin de ne pas perdre de liquide. Pendant ce temps, **le 2ième manipulateur** réalisera la même manœuvre, mais à l'entrée de l'assemblage des plaques. Cette fois-ci, ce sera la noix de l'entrée du tube hydraulique **(#6)** situé entre le raccord en coude **(#7)** et le raccord en coude de nylon **(#5)** que le manipulateur devra dévisser.

3.3 Transport de l'assemblage des plaques à la température ambiante

1. Stériliser à l'éthanol la surface d'un coin de paillasse;
2. À deux personnes, et possiblement à l'aide d'un chariot, sortir l'assemblage de la chambre froide à 10°C, transporter dans le laboratoire à la température ambiante, et déposer sur la surface de paillasse préalablement stérilisée à l'éthanol.

3.4 Ouverture de l'assemblage des plaques de calcaire

L'ouverture de l'assemblage des plaques est effectuée à la température ambiante, sur une paillasse du labo qui aura été pré-stérilisée à l'éthanol.

À partir de cette étape, maintenir:

a. ***un environnement stérile en allumant deux brûleurs qui seront placés de part et d'autre de l'assemblage des plaques,***
b. ***l'assemblage en position horizontale pendant toute la manipulation de façon à conserver la distribution spatiale du biofilm dans les plaques et à récupérer les liquides présents dans la fracture.***

1. Débuter le démontage en enlevant les 3 paires de serres tenant les 2 plaques ensemble;

2. Faire pénétrer la lame du couteau à lame rétractable le plus profondément possible dans le joint de silicone tenant les 2 plaques de calcaire (Figure XIV.5.2, Annexe 5), et essayer de déloger le silicone en effectuant des mouvements de va-et-vient le long du joint. Cette opération peut être très longue tant que la surface du joint n'est pas démantelée. Une pénétration de l'air dans les portions dénudées du joint pourra accélérer le démantèlement;
3. Poursuivre l'opération jusqu'à ce que les deux surfaces en contact soient complètement décollées. Effectuer des observations qualitatives de l'intérieur des plaques dès que possible pour tenter d'observer la présence de biofilm(s);
4. Séparer les 2 plaques l'une de l'autre en faisant faire une rotation de 180° très rapide à la plaque supérieure (Figures XIV.5.3 & XIV.5.4, Annexe 5). Maintenir la plaque inférieure en position horizontale;
5. Une fois séparées, placer les deux plaques vis-à-vis l'une de l'autre (Figure XIV.5.5) pour poursuivre les observations qualitatives.

3.5 Observations qualitatives du biofilm intact

Bien qu'il soit fort probable que l'ouverture des plaques amène une perturbation du biofilm, l'objectif de cette section est de détecter et d'observer des portions intactes de biofilm. Pour cette étape, maintenir, comme à la section 3.4, les deux plaques ouvertes dans un environnement stérile.

1. Placer les deux plaques ouvertes vis-à-vis (Figure XIV.5.5, Annexe 5) de façon à identifier sur la plaque inférieure l'emplacement des deux piézomètres indiqués par la position des trous présents dans la plaque supérieure;
2. Installer une règle graduée le long de la plaque inférieure;
3. Effectuer des observations qualitatives générales concernant l'aspect général du biofilm, et ce, en fonction de l'emplacement le long des plaques, indiqué par la graduation de la règle. Les paramètres à considérer pourront être les suivants:
    - État du dépôt: liquide, solide;
    - Visibilité, couleur, opacité ou transparence;
    - Distribution surfacique et spatiale par rapport à la fracture;
    - Épaisseur en fonction de la position par rapport à la fracture;
    - Hétérogénéité;

- Présence ou absence d'amas cellulaires;

3. Faire des dessins et prendre des photos au besoin:
    - Vues générales;
    - Macrophotos au besoin;

3.6 Mesures quantitatives sur le biofilm intact

À l'aide du vernier digital, effectuer des mesures approximatives sur les paramètres suivants:

- Épaisseur du biofilm;
- Surface totale couverte par le biofilm;

3.7 Méthode de prélèvement du biofilm

Pour cette étape, maintenir les plaques ouvertes dans un environnement stérile

1. Si des morceaux de biofilm solide sont facilement visibles à l'œil nu, utiliser un instrument stérile (spatule, pinces) pour toucher le biofilm et évaluer sa consistance, sa viscosité et sa résistance à la traction. Cette procédure permettra d'évaluer si le biofilm peut être prélevé avec une spatule et/ou des pinces ou encore avec des lamelles de microscope pouvant être délicatement glissées sous le biofilm;
2. Évaluer approximativement le volume de biofilm présent. Le volume théorique de la fracture est d'environ 2.6 mL. Le volume de biofilm recueilli, qui pourrait être aussi faible que $1/10^e$ de ce volume (~ 300 µL), déterminera la nature et la quantité d'analyses qui pourront être effectuées;
3. Si les dépôts présents sont uniquement sous forme liquide, les prélèvements devront être effectués avec une micropipette équipée d'un embout stérile;

3.8 Analyses réalisées sur le biofilm détaché

3.8.1 Observations et analyses microbiologiques

3.8.1.1 Observations microbiologiques à l'œil nu et au microscope

Observations à l'œil nu

Si des amas cellulaires sont visibles à l'œil nu, évaluer à l'aide d'un vernier digital leur ratio L/ℓ (longueur/largeur). La longueur L est définie comme la dimension parallèle à la direction de l'écoulement (donc parallèle à la fracture), tandis que la largeur ℓ est définie comme la dimension perpendiculaire à la direction de l'écoulement. Le ratio L/ℓ est un indicateur de géométrie qui peut être corrélé au régime d'écoulement **[4]**.

Observations du biofilm pur par microscopie par épifluorescence

Le but ultime de cette procédure est de prendre une photo du biofilm visualisé par microscopie par épifluorescence (Bac*Light*) selon la méthode décrite dans le protocole PE 43J [5] modifié de la façon suivante:

1. Prélever 100 µL de biofilm à l'aide de la micropipette P200;
2. Déposer le prélèvement directement au-dessus du filtre de polycarbonate noir, dans l'entonnoir de filtration, et ce, sans toucher aux parois;
3. Ajouter 400 µL d'eau saline stérile, puis 30 µL de fluorochrome;
4. Incuber 15 minutes, puis filtrer;
5. Faire l'observation au microscope, puis prendre une photo.

3.8.1.2 Dénombrements bactériens sur des échantillons de biofilm dilués

L'observation au Bac*Light* est réalisée sur une série d'échantillons obtenus à partir de dilutions sérielles de biofilm dilué dans de l'eau saline selon une méthode similaire à celle des NPP, ceci afin d'identifier la dilution la plus appropriée pour effectuer un décompte bactérien.

Pour les étapes suivantes, maintenir un environnement stérile autour des plaques ouvertes.

1. Préparer une solution saline 0.85% dans un ballon de 100 mL. Transférer dans une bouteille de lait, et stériliser à l'autoclave pour 20 minutes;
2. Stériliser à l'autoclave une douzaine de tubes épendorf 1.5 mL;

À partir de cette étape, travailler sous conditions stériles sous la hotte microbiologique

3. Déposer dans un rac à Eppendorfs 5 tubes dont les capuchons seront ouverts;
4. Prélever 900 µL d'eau saline stérile à l'aide de la micropipette P1000 munie d'un embout stérile, et déposer dans un tube Eppendorf. Refermer le capuchon du tube;
5. Répéter le point 4 avec les 4 autres tubes épendorfs;
6. Identifier au hasard les 5 tubes épendorfs par 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} et 10^{-5};
7. Peser sur la balance analytique le tube 10^{-1} rempli d'eau saline, et noter le poids $\mathbf{m_1}$;
8. Prendre le tube identifié 10^{-1}, et retourner auprès des deux plaques gardées sous atmosphère stérile grâce aux brûleurs allumés à côté des plaques ouvertes;
9. Ouvrir près de la flamme le tube identifié 10^{-1} et déposer dans un rac à tubes Eppendorfs;
10. Prélever 100 µL de solution de biofilm à l'aide de la micropipette P200 munie d'un embout stérile, et transférer aseptiquement dans le tube identifié 10^{-1}. Refermer le

capuchon du tube, et vortexer pendant une minute pour obtenir la dilution 10^{-1}. Peser sur la balance analytique le tube 10^{-1} contenant l'échantillon de biofilm et d'eau saline, et noter le poids $\mathbf{m_2}$ obtenu;

11. Retourner sous la hotte microbiologique, et transférer 100 µL du tube épendorf 10^{-1} au tube 10^{-2}, fermer le capuchon, puis vortexer;

12. Répéter l'étape 11 avec le tube de dilution 10^{-2} pour obtenir le tube de dilution 10^{-3}, et ainsi de suite pour obtenir les tubes de dilution 10^{-4} et 10^{-5}. Changer d'embout pour effectuer chacun des transferts;

13. Effectuer un décompte au Bac*Light* sur 3 échantillons de 100 µL prélevés respectivement des tubes de dilution 10^{-1}, 10^{-3}, et 10^{-5}, selon la méthode du protocole **PE 43J [5]**.

- Identifier chaque lame par sa dilution respective (10^{-1}, 10^{-3}, et 10^{-5});
- Observer les lames, et effectuer un décompte sur celles qui présentent entre 5 et 30 bactéries totales par champ. Jeter les lames qui présentent une densité bactérienne trop faible, soit inférieure à 5 bactéries totales par champ, ou encore trop élevée, soit supérieure à 30 bactéries totales par champ;

14. Si la densité observée par microscopie était trop élevée pour la dilution 10^{-1}, et trop faible pour la dilution 10^{-3}, effectuer un décompte sur 100 µL prélevés du tube de dilution 10^{-2}. Raisonner de la même façon pour déterminer si le tube de dilution 10^{-4} devrait être observé par microscopie;

15. Si la densité bactérienne se montre trop élevée même pour la plus faible dilution (10^{-5}), répéter l'étape 12 avec le tube épendorf dilué à 10^{-5} afin d'obtenir 3 autres dilutions plus faibles (10^{-6}, 10^{-7}, et 10^{-8}), et effectuer un décompte sur 100 µL prélevés de chaque dilution;

16. Au besoin, poursuivre les dilutions selon l'étape 12 et les décomptes selon l'étape 14 jusqu'à ce que la dilution adéquate pour le décompte ait été identifiée;

17. Réaliser des décomptes Bac*Light* en triplicatas sur la dilution identifiée comme adéquate;

18. Calculer la densité cellulaire de l'échantillon liquide, selon la formule suivante, en tenant compte du facteur de dilution pour le volume d'échantillon filtré:

Bactéries/mL = 31809 x # bactéries total/(# champs x volume filtré (mL))

19. Calculer la densité cellulaire de l'échantillon de biofilm à l'aide de la relation suivante:

Bactéries/g de biofilm = # bactéries (bact./mL)/(m_2-m_1)($g_{biofilm}$/mL)

3.8.1.3 Quantification des EPS/Glucides d'un échantillon aqueux contenant un biofilm

La concentration en EPS de l'échantillon aqueux comportant des portions de biofilm et tel que prélevé selon la méthode présentée à la section 3.5 peut être quantifiée selon la méthode présentée dans le protocole **PE 43H [3]**. La concentration en EPS du biofilm est déduite de la relation suivante:

EPS (mg/mg de biofilm) = EPS (mg/L) x V_1 (L)/(m_2-m_1) ($mg_{biofilm}$)

La concentration en glucides du filtrat obtenu suite à la détermination de la concentration en EPS de l'échantillon aqueux pourra ensuite être quantifiée selon le protocole **PE 43I [6]**.

3.8.1.4 Analyses phylogénétiques

La caractérisation phylogénétique du biofilm par la méthode d'**électrophorèse sur gel** (*DGGE* ou *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) sera réalisée sur les échantillons suivants:

1. 1 ou 2 échantillons d'*inoculum* conservés à -80°C;
2. Plusieurs échantillons de biofilm (5 au maximum) prélevés à des endroits stratégiques le long de la fracture ou au niveau des zones d'injection. Le prélèvement des échantillons pourra par exemple être réalisé en fonction de la position des 2 piézomètres, tel qu'indiqué au tableau XIV.3.1 ci-dessous:

Tableau XIV.3.1 Positions pour le prélèvement du biofilm pour l'analyse par DGGE

# Prélèvement	Description de la position
1	Vis-à-vis du piézomètre 1
2	Vis-à-vis du piézomètre 2
3	À mi-chemin entre les piézomètres 1 & 2
4 & 5	En fonction de particularités physiques et/ou spatiales

Les échantillons seront prélevés à l'aide d'instruments stériles, puis déposés dans des épendorfs stériles. Si l'extraction d'ADN ne peut être réalisée sur-le-champ, les Eppendorfs devront être conservés par congélation à -20°C.

3.8.2 Analyses chimiques et géochimiques

Évaluer le volume des dépôts restants après les prélèvements microbiologiques. Prévoir conserver environ 1/10 de ce volume pour chacune des analyses subséquentes.

3.8.2.1 Analyses en COT, TKN , P_{tot}, anions, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+} et Fe^{3+}

Des analyses en COT, TKN, P_{tot}, nitrites, nitrates, et sulfates de l'eau souterraine prélevée à la sortie du montage ont été obtenues pendant toute la durée de l'expérience. À des fins comparatives, le contenu du biofilm en COT, TKN, P_{tot}, nitrites, nitrates, et sulfates sera déterminé par une méthode identique à celle qui a été utilisée pour l'analyse de l'effluent.

Analyse en COT

1. Peser un ballon de 100 mL sur la balance analytique. Noter le poids $\mathbf{m_1}$ obtenu;
2. Prélever stérilement environ 0.2 g de biofilm avec une spatule si le biofilm est sous forme solide, ou encore 20 µL de solution avec la micropipette P200 si le biofilm est sous forme liquide. Déposer l'échantillon dans le ballon de 100 mL, puis noter le nouveau poids $\mathbf{m_2}$;
3. À l'aide d'une seringue de 500 µL, ajouter au ballon 400 µL d'acide sulfurique (H_2SO_4) 50% afin de préserver l'échantillon et favoriser la dissolution du biofilm dans la phase aqueuse, puis jauger le ballon avec de l'eau déionisée stérile;
4. Mettre le ballon sous agitation modérée pendant ~ 10 minutes;
5. Transférer la solution contenue dans le ballon dans une bouteille de prélèvement exempte de préservatif de la Cie PSC. Identifier la bouteille par la nature du prélèvement;
6. Garder dans la chambre froide à 4°C jusqu'à l'envoi pour analyse chez la Cie PSC;
7. Calculer la concentration de COT contenue dans le biofilm par la relation suivante:

$$\mathbf{COT\ (mg_{COT}/mg_{biofilm})} = \mathrm{COT}\ (mg_{COT}/L_{eau})/(10(m_2\text{-}m_1)(mg_{biofilm}/L_{eau}))$$

Analyse en TKN, P_{tot}, nitrites, nitrates, sulfates, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+} et Fe^{3+}

Pour toutes ces analyses, procéder d'une manière analogue à la méthode utilisée pour l'analyse en COT, en utilisant les préservatifs indiqués au tableau XIV.3.2, en respectant les concentrations suggérées.

3.8.2.2 Résumé des analyses chimiques et géochimiques

Tableau XIV.3.2 Résumé des analyses chimiques et géochimiques effectuées sur le biofilm

Nature de l'analyse	Compagnie d'analyse	Préservatif		Volume total de l'échantillon
		Nature	Concentration	
COT	**PSC**	H_2SO_4 à 50% du concentré	2 mL/$g_{biofilm}$	100 mL
TKN	**PSC**	H_2SO_4 à 50% du concentré	2 mL/$g_{biofilm}$	100 mL
P_{tot}	**PSC**	HNO_3 et HCl concentrés	HNO_3: 4 mL/$g_{biofilm}$ HCl: 12 mL/$g_{biofilm}$	50 mL
Nitrites Nitrates Sulfates	**PSC**	Aucun	–	50 mL
Ca^{2+} et Mg^{2+}	**Technilab**	HNO_3concentré (63%)	10 mL/$g_{biofilm}$	100 mL
Fe^{2+}	**Technilab**	HCl 12M	10 mL/$g_{biofilm}$	100 mL
Fe^{3+}	**Technilab**	HNO_3 concentré (63%)	10 mL/$g_{biofilm}$	100 mL

3.8.3 Autres analyses du biofilm

3.8.3.1 Hydratation du biofilm

Cette manipulation a pour but de déterminer le pourcentage d'eau ou d'humidité du biofilm. La procédure proposée est une modification du protocole expérimental **P33A [8]**:

1. Peser sur une balance analytique un creuset de porcelaine, et noter son poids $\mathbf{m_1}$;
2. Prélever un dépôt de biofilm avec une spatule si le dépôt est sous forme solide (~0.2 g ou plus) ou avec une micropipette si le dépôt est liquide (~0.2 µL ou plus);
3. Déposer le prélèvement dans le creuset qui sera pesé avec son contenu (poids $\mathbf{m_2}$);
4. Faire sécher le creuset dans le four à 105°C pour un minimum de 12 heures;
5. Transférer le creuset dans le dessiccateur pour un minimum de 30 minutes;
6. Sortir le creuset du dessiccateur, peser, et noter le nouveau poids $\mathbf{m_3}$;
7. Calculer le % d'eau par la relation suivante:

$$\textbf{\% d'eau} = 100 \times [(m_2-m_1)-(m_3-m_1)]/(m_2-m_1),$$

où $\mathbf{m_1}$ est le poids du creuset vide, $\mathbf{m_2}$ est le poids du creuset contenant l'échantillon humide, et $\mathbf{m_3}$ est le poids du creuset contenant l'échantillon sec.

4. RÉFÉRENCE(S)

[1] **Castegnier, F. (2004).** Protocole PE 43A. Version 2 abrégée. Description du montage utilisé pour biocolmater, par l'utilisation de bactéries indigène des eaux souterraines, un assemblage de plaques de calcaire reproduisant un milieu rocheux fracturé.

[2] **Brough, M.J., Al-Tabbaa, A., Martin, R.J. (1997).** Active Biofilm Barriers for Waste Containment and Bioremediation: Laboratory Assessment. 4th International In Situ and On Site Bioremediation Symposium. Battelle Press, Columbus, Ohio.

[3]. **Castegnier, F. (2002).** Protocole PE 43H. Détermination par poids sec de la concentration d'exopolysaccharides en suspension dans une solution d'eau souterraine contenant des bactéries productrices d'EPS.

[4]. **Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M. (1999).** Influence of Hydrodynamics and Nutrients on Biofilm Structure. *Journal of Applied Microbiology Supplement.* 85: 19S-28S.

[5]. **Castegnier, F., Jean, L. et Schoefs, O. (2000).** Protocole PE 43J. Énumération directe des bactéries viables et totales d'un échantillon d'eau ou de sol par microscopie à épifluorescence.

[6]. **Castegnier, F., Leduc, M. et Jean, L. (2000).** Protocole PE 43I. Détermination par une méthode colorimétrique de la concentration en glucides d'une solution aqueuse pour des concentrations comprises entre 5 et 100 mg/L (version I) ou 0.5 et 10 mg/L (version II).

[8]. **Bertrand, J.-P. et Oudjehani, K. (2000).** Protocole P33A. Détermination de la matière organique par combustion à 550°C.

[9]. **Jean, L. (2001).** Protocole PE 42B. Extraction et quantification de l'ADN à partir d'un échantillon de sol non-saturé.

[10]. **Jean, L. (2002).** Protocole PE 48E. *DGGE* (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* ou Électrophorèse en gel de gradient dénaturant) des extraits d'ADN provenant des microorganismes d'un sol.

5 ANNEXES

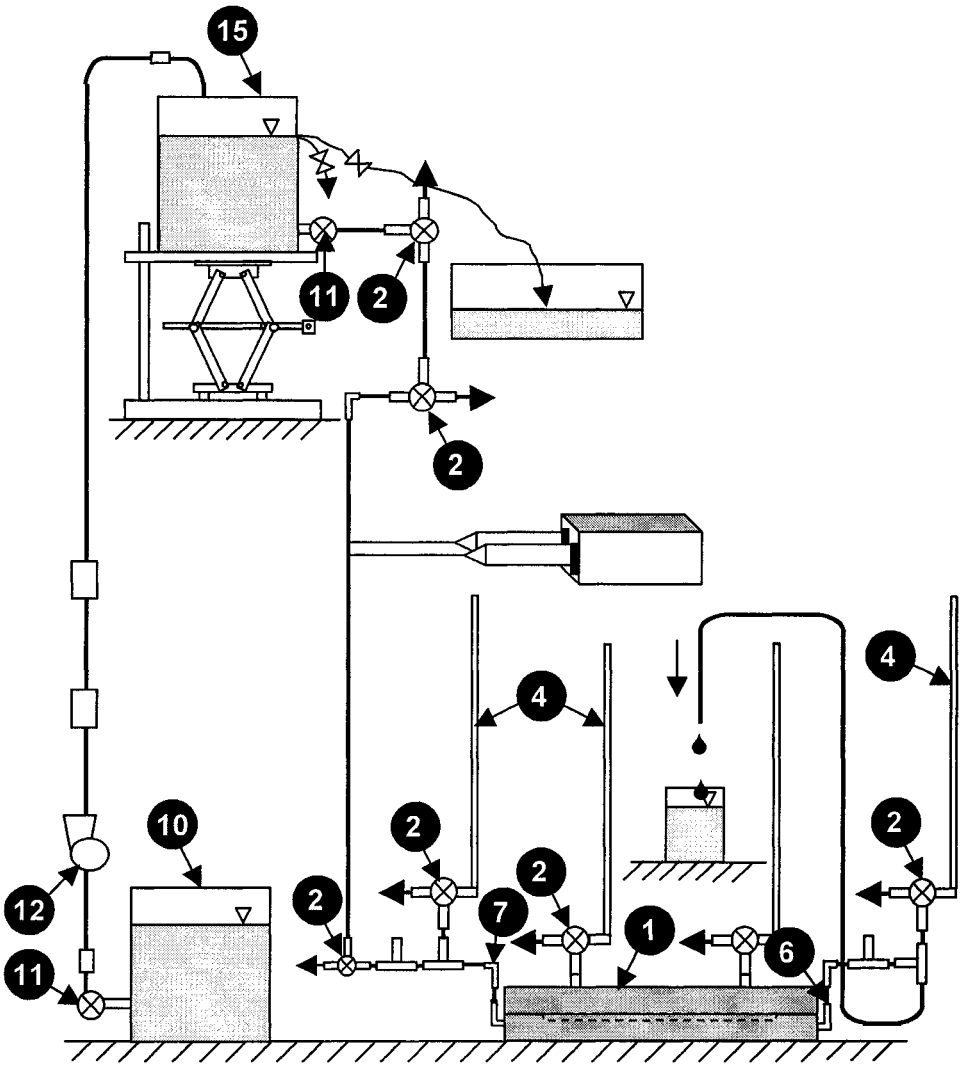


Figure XIV.5.1 Schéma général du montage de biocolmatage
(Voir protocole PE 43A [1] pour une description des pièces montrées)

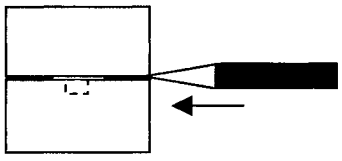


Figure XIV.5.2 Insertion de la lame dans le joint de silicone de l'assemblage des plaques

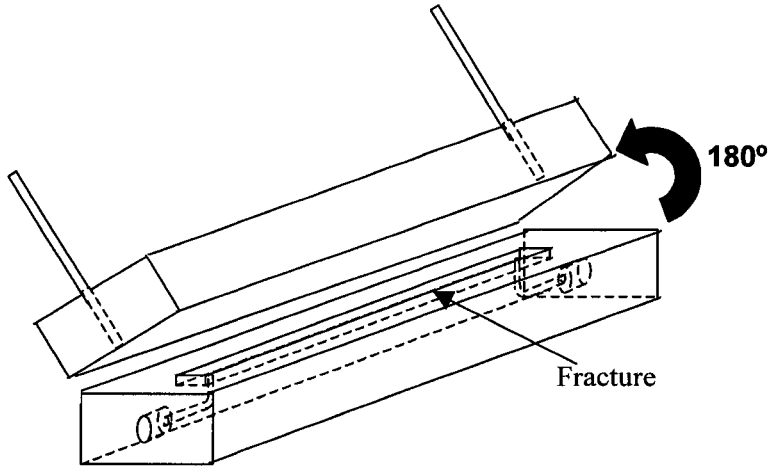


Figure XIV.5.3 Méthode d'ouverture des plaques de calcaire

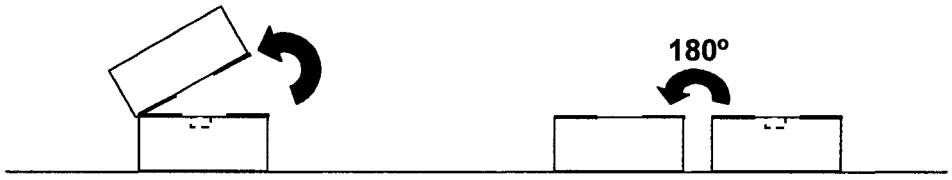


Figure XIV.5.4 Vue de profil des plaques lors de l'ouverture des plaques

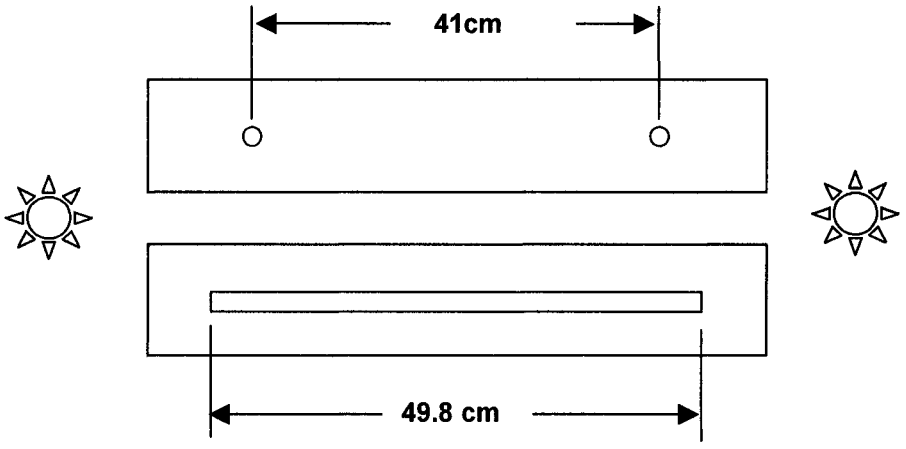


Figure XIV.5.5 Positionnement des plaques "vis-à-vis" et entre 2 brûleurs pour effectuer les observations et les prélèvements