

Titre: Biodisponibilité du pentachlorophénol durant son transport en milieux poreux saturés
Title: Biodisponibilité du pentachlorophénol durant son transport en milieux poreux saturés

Auteur: Yves Dudal
Author:

Date: 2000

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Dudal, Y. (2000). Biodisponibilité du pentachlorophénol durant son transport en milieux poreux saturés [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal].
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8626/>

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/8626/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Louise Deschênes, & Réjean Samson
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**BIODISPONIBILITÉ DU PENTACHLOROPHÉNOL
DURANT SON TRANSPORT EN MILIEUX POREUX SATURÉS**

**YVES DUDAL
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL**

**THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)
(GÉNIE CHIMIQUE)
OCTOBRE 2000**



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

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

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

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

Your file Votre référence

Our file Notre référence

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

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

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

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

0-612-60934-0

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

**BIODISPONIBILITÉ DU PENTACHLOROPHÉNOL
DURANT SON TRANSPORT EN MILIEUX POREUX SATURÉS**

présentée par: DUDAL Yves
en vue de l'obtention du diplôme de: Philosophiae Doctor
a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de:

M. LEGROS Robert, ing., Ph.D., président

Mme DESCHÈNES Louise, Ph.D., membre et directrice de recherche

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

M. JOLICOEUR Mario, ing. Ph.D., membre

M. BAVEYE Philippe, Ph.D., membre

Aux Victors et Sherri de mon insistance

"Je choisis ce mot d'insistance pour l'opposer à l'existence, dont on nous rebat les oreilles. Ce que j'entends par insistance serait le propre de tout être, conscient ou non, vivant ou non: insister, en ce sens, c'est être dans l'être, dans le présent et s'y maintenir, c'est s'efforcer, c'est préserver, c'est continuer, et ce toujours à l'intérieur d'autre chose qui nous contient, qui est l'espace, qui est le temps, qui est le monde, toujours immanent, toujours nécessaire... L'insistance, c'est donc la vérité de l'existence, pour tout être, et pour l'homme même dès qu'il se débarrasse des illusions finalistes, spiritualistes et anthropocentriques qu'il se fait sur lui-même. Adieu l'existentialisme! Exister, c'est insister: parce que c'est continuer d'être et d'agir."

André Compte-Sponville (1996)

REMERCIEMENTS

Un doctorat ne se fait pas seul et plusieurs personnes ont contribué, durant ces quatre années et demi, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail. Je tiens à en remercier les suivantes, sur un plan professionnel, puis sur un plan plus personnel:

- tout d'abord, ma directrice de recherche, la Professeure Louise Deschênes, qui, malgré certains vents et certaines marées, m'a toujours apporté sa confiance et ses encouragements, éléments essentiels dans cette épreuve d'insistance qu'est le doctorat,
- ensuite, mais à valeur égale, mon codirecteur de recherche, initiateur du projet, le Professeur Réjean Samson, qui a su faire souffler les vents du doute, nécessaires à tout approfondissement,
- mais surtout, les deux ensembles, pour leur disponibilité face à mes attentes, à mes interrogations, la richesse des discussions communes et l'intérêt porté aux taux de biodisponibilités massique et toxique, pour la grande latitude qu'ils m'ont octroyés et qui m'a permis non pas simplement de compléter un doctorat, mais bien d'apprendre les métiers de chercheur et d'enseignant,
- le Professeur Michel Perrier pour m'avoir fait profiter d'une petite partie de son immense expertise sur les problèmes de modélisation, petite partie qui a aidé à approfondir cette étude de la biodisponibilité,
- le Professeur Philippe Baveye, pour m'avoir par deux fois fait confiance en m'invitant aux Instituts Scientifiques Avancés de l'Otan sur la biodisponibilité, qui m'ont beaucoup aidé à définir ma vision du concept,
- le Professeur Danilo Klvana pour la grande confiance qu'il m'a apportée, à plusieurs reprises depuis ces trois dernières années, et qui m'a permis d'acquérir une expérience exceptionnelle en enseignement,

- mes collègues étudiants, post-doc. ou chercheurs, qui, par nos discussions nombreuses et intéressantes et par le partage de leurs expériences m'ont permis d'avancer: Borhane, Gérald, Nathalie, Valérie, Gontran, Andreas, Muriel, Frédéric, Élise,
 - Jacques Bureau pour ses conseils avisés dans le domaine de la toxicité environnementale,
 - Manon Leduc, pour son aide de tous les jours concernant le bon déroulement des opérations au laboratoire,
 - les partenaires de la Chaire pour leur aide financière.
-
- À l'interface du professionnel et du personnel, personne clé du premier au dernier jour de ce doctorat, Olivier Schoefs, dont la multitude de manière de prononcer son nom est à la hauteur de l'aide et du soutien qu'il m'a apportés. Nos multiples et passionnantes discussions, portant sur les concepts de biodégradation en système multiphasiques ou sur l'indépendance du Québec ont éclairé mes approches du premier sujet et nos discordances sur le second! Faire un doctorat nécessite deux choses: un petit bout de cerveau et un ami de tous les jours; j'ai eu la chance, contrairement à la première, de n'avoir aucune limite sur la seconde.
 - Sur un plan personnel, mais bien qu'il ait subi lui aussi mes hauts et bas de biodisponibilité, François Roberge, dont l'amitié sans faille m'a bien souvent aidé à décoller de ce projet pour quelques dégustations alléchantes et quelques discussions passionnantes, merci François et merci aussi Nathalie...
 - Mes amis de dix ans, Dom, Vincent et Marie, si loins et pourtant si proches, et dont l'amitié est un véritable phare,
 - mes parents pour leur soutien inconditionnel et pour m'avoir appris l'insistance...
 - Comment remercier Sherri ?, compagne aimante et attentionnée, sans qui je ne veux imaginer ce qu'auraient été ces quatre années et demi, ni ce que vont être celles à venir... Merci.

RÉSUMÉ

La biodisponibilité des contaminants organiques dans l'environnement est au cœur des problématiques de biorestauration des sites et d'analyse des risques associés aux contaminations. Les recherches sur ce sujet se sont amplifiées au cours des dix dernières années, permettant le développement de différentes approches conceptuelles et de différentes méthodes de quantification. Cette thèse porte sur la biodisponibilité des contaminants durant leur transport en milieu poreux saturé. Le concept de biodisponibilité y est défini comme un taux d'exposition des organismes biologiques aux contaminants présents. Ces organismes biologiques peuvent être de deux types: d'une part les microorganismes dégradeurs des contaminants présents et d'autre part les organismes qui induisent une réponse toxique lorsqu'ils se trouvent exposés aux contaminants. Dans le premier cas, étant donné que la réponse biologique à l'exposition consiste en une perte de masse du contaminant, cette biodisponibilité est qualifiée de massique. Dans le second cas, la réponse biologique consiste en une toxicité, la biodisponibilité est dite toxique. Ainsi, des taux de biodisponibilité massique et toxique du contaminant sont établis.

Afin de quantifier ces taux, une méthode théorique de quantification est développée, basée sur les études classiques de transport de contaminant en milieux poreux saturés. Ces études génèrent en laboratoire ou directement sur le terrain des courbes d'élution du contaminant dans différentes situations qui permettent de quantifier plus ou moins précisément le devenir du contaminant dans le milieu considéré. Deux paramètres, très utilisés pour le calcul de la biodisponibilité pharmacologique, sont extraits de ces courbes: l'aire sous la courbe et un temps de référence prenant en compte le temps global de passage du contaminant au travers du milieu. Les taux de biodisponibilité massique et toxique sont obtenus grâce à l'extraction de ces paramètres sur chacune des deux courbes d'élution: massique et toxique.

Cette méthode théorique est appliquée sur une étude de laboratoire, au cours de laquelle des courbes d'élutions sont générées sur des colonnes saturées avec différents

milieux poreux composés de sable standard et d'une résine rétentrice spécifique du contaminant utilisé: le pentachlorophénol (PCP). Le sable est utilisé soit en conditions abiotiques, soit inoculé par des microorganismes dégradeurs de PCP, préalablement activés en bioréacteurs grâce à des ajouts successifs de contaminant. Le PCP est dissous dans un milieu salin minéral et élué de la sorte au travers des colonnes. La concentration en PCP de même que la toxicité mesurée par la méthode Microtox sont suivies en sortie de colonne et permettent de construire les courbes d'élutions massique et toxique. Différentes conditions expérimentales sont étudiées, en faisant varier trois facteurs au sein des colonnes: le degré de rétention du contaminant, par ajout supplémentaire de résine, la vitesse d'écoulement de l'eau, par simple ajustement de la pompe, et le degré d'inoculation du sable, par alimentation continue de la colonne. Toutes les courbes d'élution obtenues sont modélisées en utilisant un modèle de transport des contaminants qui tient compte de l'advection, de la dispersion, de la partition, de la sorption lente réversible et de la biodégradation, avec ou sans croissance.

Deux types d'études expérimentales sont réalisées sur ces colonnes. D'une part, la détermination des taux de biodisponibilité instantanés, c'est-à-dire la réponse du milieu à une contamination subite. D'autre part, la détermination des taux de biodisponibilités intégraux, intégrant donc l'évolution des taux instantanés dans le temps, c'est à dire la réponse du milieu à plus long terme. Dans le premier cas, les courbes d'élutions sont analysées en terme d'impulsion du contaminant sur le milieu, effet instantané. Dans le second cas, de véritables échelons de contaminant sont appliqués sur les différentes colonnes pour estimer l'effet intégral.

Les résultats concernant les taux instantanés de biodisponibilité montrent que les taux de biodisponibilités massique et toxique varient fortement avec le degré de rétention du contaminant par le milieu. Lorsque la quantité de résine est doublée dans la colonne, le taux adimensionnel de biodisponibilité massique est diminué d'un facteur 10 et celui de biodisponibilité toxique est diminué d'un facteur 5. La vitesse d'écoulement de l'eau et le degré d'inoculation ont aussi des influences importantes mais surtout sur la biodisponibilité massique. Enfin, le rapport entre la biodisponibilité massique et la

biodisponibilité toxique s'est vu très fortement corrélé à un double nombre de Damkohler, prenant en compte les différentes cinétiques responsables du devenir du contaminant dans le milieu considéré (hydrodynamique, sorption lente, biodégradation). La biodisponibilité du PCP durant son transport est donc régie par des données cinétiques.

Les résultats concernant les taux intégraux ont montré une augmentation du rapport biodisponibilité massique sur toxique grâce à la croissance bactérienne qui est intervenue dans toutes les colonnes inoculées. La compétition pour le contaminant entre l'hydrodynamique, la sorption lente et la biodégradation a, dans tous les cas, été en faveur des microorganismes, qui avec le temps, ont pu inverser des situations de taux instantanés très négatifs (forte biodisponibilité toxique et faible biodisponibilité massique) pour atteindre des situations beaucoup plus positives. Une augmentation de la population bactérienne donnée d'un facteur 10 par le modèle utilisé a résulté en une augmentation de la biodisponibilité massique d'un facteur 10 permettant la diminution de la biodisponibilité toxique d'un facteur 1,5.

Ces résultats démontrent l'influence importante des microorganismes sur une contamination en milieu dynamique, où l'eau apporte sans cesse une fraction du contaminant utilisable par les microorganismes qui jouent alors le rôle de siphon en vidant petit à petit le système du contaminant. Parallèlement, la résine, par sa capacité de rétention réversible du contaminant joue le rôle d'éponge qui relâche le contaminant au fur et à mesure que les microorganismes jouent leur rôle de siphon.

ABSTRACT

Bioavailability of organic contaminants in the environment is a center of interest for both site bioremediation and assessment of risks associated with contaminations. Research on this subject have amplified over the last ten years, allowing the development of different conceptual approaches as well as different quantification methods. The present document focuses on the bioavailability of organic contaminants during their transport through saturated porous media. The concept of bioavailability is here defined as an exposure rate of the biological organisms to the contaminant. These biological organisms can be of two different types: on the one hand, the microorganisms capable of degrading the contaminant and on the other hand, the organisms that will induce a toxic response when exposed to the contaminant. In the first case, as the biological response leads to a loss in the contaminant mass, it is qualified mass bioavailability. In the second case, as the biological response consists in a toxic response, it is qualified toxic bioavailability. Therefore, mass and toxic bioavailability rates are established.

To quantify these rates, a theoretical method of quantification is developed, based on the classic studies of contaminant transport through saturated porous media. These studies generate, at the laboratory scale or directly on the field, contaminant breakthrough curves in different experimental situations, allowing a more or less precise quantification of the contaminant fate. Two parameters, extensively used for the calculation of pharmacological bioavailability, are extracted from these curves: the area under the curve and a reference time taking into account the global residence time of the contaminant in the medium. Mass and toxic bioavailability rates are obtained using these parameters from two breakthrough curves: one mass and one toxic.

This theoretical method is applied in a laboratory study, during which breakthrough curves are generated from contaminant (pentachlorophenol, PCP) elutions through saturated columns containing different porous media. These media are composed of standard sand and of a pentachlorophenol-retaining resin. The sand is used

either abiotic or after inoculation with PCP-degrading microorganisms, pre-activated in a fed-batch bioreactor using sequential addition of PCP. PCP is dissolved in a basal salt medium and eluted through the columns. PCP concentration as well as the associated toxicity, measured using the Microtox method, are monitored on the column effluent and mass and toxic breakthrough curves are generated. Different experimental conditions are studied, by varying three main factors within the columns: the extent of contaminant retention, by adding more resin, the pore-water velocity, by increasing the flow-rate and the extent of sand inoculation, by continuous feeding of the column. All the breakthrough curves are modeled by using a model taking into account advection, dispersion, partition, slow reversible sorption, biodegradation with or without growth.

Two types of experiments are carried out on the columns. On the one hand, instantaneous bioavailability rates are quantified, corresponding to the response of the environment to a sudden contamination. On the other hand, integral bioavailability rates are quantified, taking into account the evolution of the medium towards the contamination. In the first case, breakthrough curves are analysed in terms of pulse elutions of contaminant and in the second case, step elutions are performed to assess the integral bioavailability.

Results regarding the instantaneous bioavailability rates show that mass and toxic bioavailability both vary strongly with the extent of contaminant retention by the medium. When the amount of resin within the column is doubled, the non-dimensional mass bioavailability rate is lowered by a factor 10 and the toxic one by a factor 5. The pore-water velocity and the extent of sand inoculation also have strong influences but mainly on the mass bioavailability rate. Finally, the ratio between the mass and the toxic bioavailability is strongly correlated to a double Damkohler number built from the kinetics responsible for the contaminant fate (hydrodynamic, slow sorption, biodegradation). These kinetics are thus responsible of the PCP bioavailability during its transport through saturated porous media.

Results regarding the integral bioavailability rates show an increase in the ratio between the mass and toxic bioavailability rates, due to bacterial growth that occurred in

all the inoculated columns. The competition for the contaminant between the hydrodynamic, the slow sorption and the biodegradation is, in all cases, in favor of the microorganisms which, with time, were able to reverse negative situations in terms of instantaneous bioavailability (strong toxic and weak mass bioavailability) to reach much more positive situations. A ten-fold increase in the biomass population, estimated by the model, resulted in a ten-fold increase in the mass bioavailability, allowing a 1.5-fold decrease in the toxic bioavailability.

These results demonstrate the important influence of the microorganisms on the contamination in a dynamic medium, where water constantly brings a fraction of the contaminant to the microorganisms which act as a sink, slowly emptying the contaminant in the system. The resin itself, by its capacity of reversible retention of the contaminant acts as a sponge that releases the contaminant while the microorganisms degrade it.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	V
RÉSUMÉ.....	VII
ABSTRACT	X
TABLE DES MATIÈRES	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XVII
LISTE DES FIGURES.....	XVIII
LISTE DES ANNEXES	XX
LISTE DES NOTATIONS	XXI
AVANT-PROPOS	XXIV
1. INTRODUCTION	1
2. REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
2.1. LE PENTACHLOROPHÉNOL.....	4
2.2. LA DISPONIBILITÉ CHIMIQUE.....	5
2.2.1. <i>Équilibres de sorption</i>	6
2.2.2. <i>Non-équilibres de sorption</i>	11
2.2.3. <i>Influence de l'écoulement en milieu poreux saturé</i>	13
2.3. LA BIODISPONIBILITÉ PHARMACOLOGIQUE	15
2.3.1. <i>La biodégradation</i>	15
2.3.2. <i>La toxicité</i>	19
2.4. LA BIODISPONIBILITÉ ENVIRONNEMENTALE.....	20
2.4.1. <i>Descriptions qualitatives</i>	21
2.4.2. <i>Approches de quantification</i>	22
2.4.3. <i>Influence de différents facteurs</i>	23
2.4.4. <i>Effet du transport du contaminant sur la biodisponibilité</i>	25

3. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES TRAVAUX.....	26
3.1. APPROCHE CONCEPTUELLE DE LA BIODISPONIBILITÉ	26
3.2. DÉFINITION DE LA BIODISPONIBILITÉ	28
3.3. HYPOTHÈSE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS.....	28
3.4. MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE	29
3.4.1. <i>Les composantes de l'étude expérimentale</i>	29
3.4.1.1. Suivi du PCP.....	30
3.4.1.2. Le milieu poreux saturé: sable standard et résine	30
3.4.1.3. Les organismes biologiques de mesure de la biodisponibilité	31
3.4.1.4. Le système de transport: le montage en colonne.....	32
3.4.2. <i>Modélisation des courbes d'élution massique</i>	33
3.5. LIMITES TECHNIQUES DE LA MÉTHODE.....	35
3.6. PRÉSENTATION DES ARTICLES	36
4. PREMIER MANUSCRIT: DEVELOPMENT OF A METHOD TO ESTIMATE THE MASS AND TOXIC BIOAVAILABILITIES OF PENTACHLOROPHENOL DURING ITS TRANSPORT THROUGH SATURATED POROUS MEDIA	38
4.1. ABSTRACT	38
4.2. INTRODUCTION	38
4.2.1. <i>Definitions of Bioavailability.....</i>	39
4.2.2. <i>Quantification of Bioavailability</i>	40
4.3. METHOD DEVELOPMENT.....	42
4.4. MATERIALS AND METHODS	45
4.4.1. <i>Production of PCP-Degrading Microorganisms.....</i>	46
4.4.2. <i>Study Columns.....</i>	46
4.4.3. <i>Column Hydrodynamics</i>	47
4.4.4. <i>Abiotic Breakthroughs.....</i>	47
4.4.5. <i>Biotic Breakthroughs.....</i>	48
4.4.6. <i>Toxicity Measurement</i>	48
4.5. RESULTS	49
4.5.1. <i>Pentachlorophenol Fate and Transport in the Columns</i>	49
4.5.1.1. Hydrodynamics.....	49
4.5.1.2. Abiotic Controls	49
4.5.1.3. Biotic Breakthroughs.....	51
4.5.2. <i>Toxicity Elutions.....</i>	51
4.5.3. <i>Quantification of Bioavailability Rates</i>	52

4.6. DISCUSSION	54
5. LIEN ENTRE LE PREMIER ET LE DEUXIÈME MANUSCRIT	57
6. DEUXIÈME MANUSCRIT: QUANTIFYING MASS AND TOXIC BIOAVAILABILITY RATES OF PENTACHLOROPHENOL DURING TRANSPORT THROUGH SATURATED POROUS MEDIA	58
6.1. ABSTRACT	58
6.2. INTRODUCTION	59
6.3. MATERIALS AND METHODS	61
6.3.1. <i>Chemicals</i>	61
6.3.2. <i>Production of bioactive sand</i>	62
6.3.3. <i>Experimental set-up</i>	62
6.3.4. <i>Toxicity measurement</i>	64
6.3.5. <i>Modeling of mass breakthroughs</i>	64
6.4. RESULTS AND DISCUSSION	66
6.4.1. <i>Column hydrodynamic characteristics</i>	66
6.4.2. <i>Dynamic sorptive behavior of the model solids</i>	66
6.4.3. <i>Mass and toxic breakthroughs</i>	70
6.4.4. <i>Bioavailability during transport</i>	74
7. LIEN ENTRE LE DEUXIÈME ET LE TROISIÈME MANUSCRIT	79
8. TROISIÈME MANUSCRIT: EFFECT OF BIOMASS GROWTH ON THE RATES OF MASS AND TOXIC BIOAVAILABILITY DURING CONTINUOUS TRANSPORT OF PENTACHLOROPHENOL THROUGH SATURATED POROUS MEDIA	80
8.1. ABSTRACT	80
8.2. INTRODUCTION	81
8.3. THEORY	82
8.4. MATERIALS AND METHODS	83
8.4.1. <i>General experimental design</i>	85
8.4.2. <i>Biodegradation activity monitoring</i>	86
8.4.3. <i>Breakthrough curves modeling</i>	86
8.5. RESULTS AND DISCUSSION	89
8.5.1. <i>Abiotic breakthrough curves (BTC)</i>	89
8.5.2. <i>Mass and toxic integral breakthroughs</i>	92

8.5.3. <i>Limited-growth dual-compartment sorption model</i>	94
8.5.4. <i>Growth-associated biodegradation</i>	95
8.5.5. <i>Growth-associated bioavailability</i>	97
9. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	103
10. CONCLUSION	109
11. RÉFÉRENCES.....	112
12. ANNEXES	134

LISTE DES TABLEAUX

Tableau A.-P. 1: Publications générées par les travaux de la thèse.....	XXIV
Table 4-1 : Summary of bioavailability numbers.	53
Table 6-1: Experimental conditions and hydrodynamic characteristics for each column	67
Table 6-2: Model parameters estimated from experimental results.....	69
Table 6-3: Mass and toxic dynamic bioavailability results for each bioactive column..	75
Table 8-1: Experimental conditions and hydrodynamics characteristics for each column	84
Table 8-2: Model parameters estimated from experimental results.....	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Les deux axes d'approche de la biodisponibilité environnementale	2
Figure 3.1: Schéma conceptuel de la biodisponibilité dans le cas d'un système statique	26
Figure 3.2: Schéma conceptuel de la biodisponibilité pour un système dynamique	27
Figure 3.3: Schéma du montage expérimental.....	33
Figure 3.4: Schéma conceptuel du modèle utilisé pour les courbes d'élutions massiques.....	34
Figure 4.1: Abiotic and biotic breakthroughs for the three columns: column 1 and 3 (standard sand, 1 and 0.5 mL·min⁻¹) and column 2 (w./ resin, 1 mL·min⁻¹).	50
Figure 4.2 : Mass and toxic elution derivatives for Column 1	53
Figure 6.1: Abiotic PCP breakthrough curves (experimental and model-fitted) with the three different media: column 1, standard sand; column 2, 0.2% resin-amended sand and column 3, 0.4% resin-amended sand.	68
Figure 6.2: PCP Dose - Microtox EC10 response plot and toxic response empirical modeling.....	70
Figure 6.3: a) Breakthrough curves from column 4 (bioactive sand) and b) their derivatives for calculation of bioavailability rates.....	71
Figure 6.4: Mass and toxic breakthrough curves for a) columns 5 (standard sand at half flow rate) and 6 (superbioactive standard sand), and b) columns 7 (0.2% resin- amended bioactive sand) and 8 (0.4% resin-amended bioactive sand).....	72
Figure 6.5: Correlation between the mass bioavailability and the double kinetic ratio and between the overall bioavailability and the double kinetic ratio.....	77
Figure 8.1: PCP step elutions performed under abiotic conditions on column 1 (standard sand), column 2 (standard sand amended with 0.5g of resin) and column 3 (Standard sand amended with 1 g of resin).	90
Figure 8.2: a) mass breakthrough curves (experimental and model-fitted) obtained with PCP step elutions performed under biotic conditions on: column 4 (inoculated sand), column 7 and 8 (inoculated sand amended with 0.5 and 1 g of resin respectively), b) toxic breakthrough curves (experimental and fitted) obtained from	

the same columns and c) mass and toxic breakthrough curves obtained on columns 5 (inoculated sand, half flowrate) and 6 (inoculated and reinjected sand).....	93
Figure 8.3: a) Experimental biodegradation activity index evolving with time and column length and b) Model-generated profiles of biomass within the column at different time of elution.	96
Figure 8.4: Time evolution of the variables related to bioavailability, for column 8 (inoculated sand amended with 1 g of resin): a) mass and toxic breakthrough curves (experimental and fitted), b) sorbed contaminant, c) instantaneous biodegradation rate, d) instantaneous bioavailability rate, e) integral biomass growth and f) mass and toxic integral bioavailability rate.....	98
Figure 8.5: Time-evolution of the ratio between the mass and toxic bioavailability rates for all the inoculated columns (4 to 8).	100

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protocole 7A	134
Annexe 2 : Protocole 7B	138
Annexe 3 : Protocole 7C	143
Annexe 4 : Protocole 7E	147
Annexe 5 : Protocole G12	151
Annexe 6 : Schéma de la méthode de séparation et de détection du PCP par HPLC	159
Annexe 7 : Spectre du PCP en ultra-violet.....	160

LISTE DES NOTATIONS

K_D	coefficient de distribution (L/kg)
S	concentration de contaminant en phase solide (mg/kg)
C	concentration de contaminant en phase aqueuse (mg/L)
K_{OC}	coefficient de partition sur le carbone organique (L/kg)
K_P^{eq}	coefficient de partition à l'équilibre (L/kg)
f_{OC}	fraction de carbone organique
K_{OM}	coefficient de partition sur la matière organique (L/kg)
f_{OM}	fraction de matière organique
K_{OW}	coefficient de partage entre l'eau et le 1-octanol (L/L)
C_w^{sat}	solubilité aqueuse (mg/L)
D	coefficient de distribution globale (L/kg)
Q	fraction de composé se trouvant sous la forme ionisée
K_a	constante d'acidité (M)
$[H^+]_w$	concentration en protons dans l'eau (M)
A_s	aire spécifique de la phase minérale (m ² /g)
D	coefficient de dispersion hydrodynamique axiale (cm ² /s)
α_L	dispersivité dynamique longitudinale (cm)
D^*	coefficient de diffusion effective (cm ² /s)
ω	facteur de tortuosité
D_D	coefficient de diffusion du soluté dans le milieu (cm ² /s)
x	distance (cm)
t	temps (s)
v	vitesse de l'écoulement (cm/s)
V	vitesse réelle des particules (cm/s)
θ	porosité
K_H	conductivité hydraulique (cm/s)

dh/dl	gradient hydraulique
F	fraction de contaminant adsorbé
R	coefficient de retard
k	constante cinétique de premier ordre de sorption lente réversible (s^{-1})
k_{bio}	constante cinétique de premier ordre de biodégradation (s^{-1})
Y	coefficient de rendement (mg/mg)
X	biomasse (mg/L)
Y_X	coefficient de rendement contaminant/biomass (mg/mg)
L	facteur limitant (mg/L)
Y_L	coefficient de rendement facteur limitant/biomasse (mg/mg)
μ	taux de croissance (s^{-1})
μ_m	taux de croissance maximal (s^{-1})
K_S	constante de demi-saturation pour le substrat (mg/L)
K_L	constante de demi-saturation pour le facteur limitant (mg/L)
$\tau_{BioDmass}$	taux de biodisponibilité massique (s^{-1})
$\tau_{massBioA}$	mass bioavailability rate (s^{-1})
$\tau_{BioDtox}$	taux de biodisponibilité toxique (s^{-1})
$\tau_{toxBioA}$	toxic bioavailability rate (s^{-1})
AUC_{mass}	aire sous la courbe d'élution massique
AUC_{tox}	aire sous la courbe d'élution toxique
t_{exp}	temps d'exposition (s)
t_{mass}	temps de résidence moyen pour la courbe massique (s)
σ^2_{mass}	variance de la distribution des temps de résidence massique
t_{tox}	temps de résidence moyen pour la courbe toxique (s)
σ^2_{tox}	variance de la distribution des temps de résidence toxique
ρ	densité du milieu
z	distance selon l'axe
C_0	concentration initiale (mg/L)
Da	nombre adimensionnel de Damkohler

$\tau_{BioA}(t)$	vecteur-temps de biodisponibilité
AUC^{ref}_{mass}	Aire sous la courbe d'élution massique de référence
PCP	pentachlorophénol
MSM	milieu salin minéral
BSM	basal salt medium
UV	ultra-violet

AVANT-PROPOS

L'ensemble du travail effectué au cours de ces quatre années et demi se retrouve résumé dans cette thèse, mais il a aussi donné lieu à des présentations au cours de conférences et à des participations à des ouvrages communs qui sont détaillés dans le tableau suivant.

Tableau A.-P.1 : Publications générées par les travaux de la thèse

Date de l'événement	Intitulé de l'événement	Publication	Titre de la participation	Auteurs
Août 1997	Bioavailability of organic xenobiotics in the environment NATO ASI, Jesenice, Czech Republic	(Dudal <i>et al.</i> , 1999b)	Quantifying the intrinsic bioremediation potential and the hazard index of organic xenobiotics in aquifers based on their bioavailability rates	Y.D., L.D. et R.S.
Octobre 1997	Rejets industriels et prévention de la pollution, Montréal, QC	Collection environnement de l'Université de Montréal, n°10 (hors-série)	P.O. : Applicabilité de l'atténuation naturelle dans un contexte d'analyse de risque pour la réhabilitation des eaux souterraines contaminées	Y.D., J.B., L.D. et R.S
Juin 1998	Congrès du chapitre St-Laurent de la Society for Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Québec, QC		Pos. : Biodisponibilité : paramètre déterminant pour la biorestauration intrinsèque des eaux souterraines	Y.D., J.B., L.D. et R.S.
Mai 1999	5th <i>In Situ</i> and On-Site Bioremediation Symposium, San Diego, CA	(Dudal <i>et al.</i> , 1999a)	Pos. : Quantifying mass and toxic bioavailability rates of organics in saturated porous media	Y.D., L.D. et R.S.
Juin 1999	Congrès du chapitre St-Laurent de la Society for Environmental Toxicology and		P.O. : Développement d'une méthode d'évaluation des taux de biodisponibilités	Y.D., L.D. et R.S.

	Chemistry (SETAC), Montréal, QC		massique et toxique des contaminants organiques dans les eaux souterraines	
Octobre 1999	49th Canadian chemical engineering conference, Saskatoon, SK		Assessment of site bioremediation potential in saturated media using a novel kinetic analysis of contaminant breakthrough curves	Y.D., L.D. et R.S.
Avril 2000	10th symposium on environmental toxicology and risk assessment (ASTM), Toronto, ON	Acceptable après révision dans : <i>ASTM</i> <i>STP 1403</i> (voir P36.)	Development of a method to estimate the mass and toxic bioavailabilities of organic contaminants in dynamic systems	Y.D. et L.D.
Juin 2000	Groundwater 2000 : International conference on groundwater research, Copenhague, Danemark	(Dudal <i>et al.</i> , 2000)	Non-bioavailable transport of pentachlorophenol through saturated porous media	Y.D., R.S. et L.D.
Juillet 2000		Soumis à <i>Environmental Science and Technology</i>	Quantifying mass and toxic bioavailability rates of pentachlorophenol during transport through saturated porous media	Y.D., R.S. et L.D.
Sep- tembre 2000		Soumis à <i>Environmental Science and Technology</i>	Effect of biomass growth on the mass and toxic bioavailability rates of pentachlorophenol during continuous transport through saturated porous media	Y.D., R.S. et L.D.
Sep- tembre 2000	Environmentally- acceptable pollution and reclamation endpoints: scientific issues and policy development NATO ASI, Visegrad, Hungary		Biomass influence on the hazard associated with pentachlorophenol transport through saturated porous media	Y.D., R.S. et L.D.

Y.D. : Yves Dudal, J.B. : Jacques Bureau, R.S. : Réjean Samson, L.D. : Louise Deschênes. P.O. : présentation orale, Pos. : poster.

1. INTRODUCTION

BIODISPONIBILITÉ: se lancer dans un tel sujet de recherche relève de l'innocence tellement il est difficile de cerner et plus encore de définir le concept. Premier réflexe, le dictionnaire. Ni le *Larousse*, ni le *Petit Robert* ne sont d'une grande aide, ne listant aucun terme de la famille des biodisponibles et définissant la disponibilité comme le fait de pouvoir utiliser ce qui l'est. L'anglais étant la langue de partage des sciences, le dictionnaire *Chambers* est ouvert pour découvrir l'étymologie anglaise du mot. "Bioavailability: the extent to which a drug, etc, after administration, is available to the tissue it is intended to act on. Available: at one's disposal, that one may avail oneself of. To avail: to be of value or service to". Ces définitions, bien qu'appliquées au domaine pharmaceutique mettent bien en relief l'aspect potentiel du concept de biodisponibilité (may avail oneself of). Transcrite au domaine de la contamination des sites, cette définition pourrait se délier comme l'ampleur de la contamination qui se retrouve en possibilité d'avoir un effet sur les récepteurs biologiques présents. Le défi est lancé: comment approcher quelque chose de potentiel, comment quantifier cette notion et en écrire une thèse de doctorat?

La contamination du sol et des eaux souterraines débute toujours par un incident, ponctuel ou diffus, qui a pour effet de modifier, temporairement ou à jamais, le milieu récepteur à caractère géologique et biologique. Les contaminants se répartissent dans ce milieu et interagissent avec la matrice géologique ainsi qu'avec les acteurs biologiques et microbiologiques présents. La biodisponibilité se trouve à l'interface de ces deux types d'interactions. La matrice géologique s'approprie le contaminant qui devient non-accessible aux organismes du milieu. L'ampleur (thermodynamique) de cette appropriation et son évolution dans le temps (cinétique) sont étroitement liés aux actions des organismes présents sur la contamination, par exemple, la biodégradation par des microorganismes ou la bioaccumulation par des organismes supérieurs.

Deux points de vue se dégagent de part et d'autres du concept de biodisponibilité, qui vont permettre le développement de deux axes d'approche de ce concept. D'une part, l'approche géologique ou physico-chimique consiste à qualifier et quantifier les interactions entre les contaminants et la matrice géologique pour cerner la fraction de contamination non-accessible aux récepteurs biologiques. D'autre part, l'approche biologique consiste à demander directement aux organismes ce qu'ils ressentent en les mettant dans des situations de milieux contaminés. La véritable biodisponibilité est au milieu et le schéma suivant développé par Dickson *et al.*, (1994) en conclusion d'un symposium sur la question résume bien cette position.

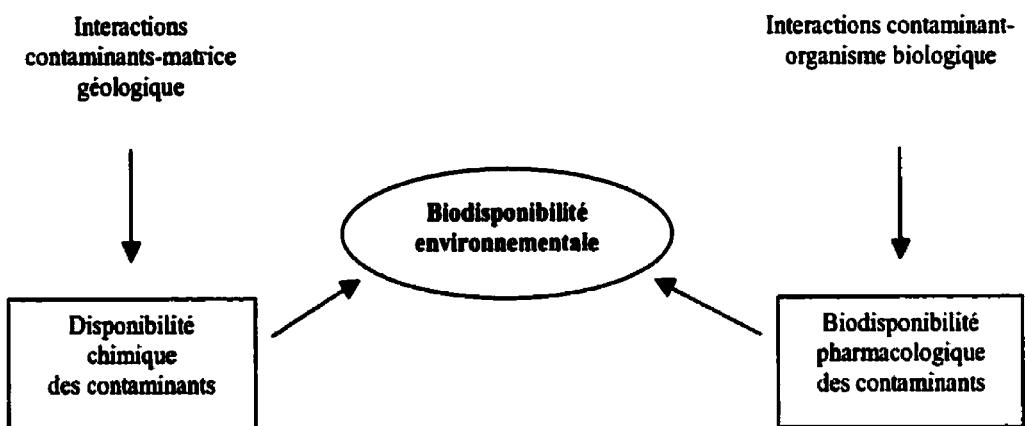


Figure 1.1: Les deux axes d'approche de la biodisponibilité environnementale

La disponibilité chimique représente la résultante des interactions physico-chimiques entre les contaminants et la matrice géologique. La biodisponibilité pharmacologique représente le potentiel d'action des contaminants sur un organe constituant des organismes cibles, une fois le contaminant se retrouvant dans l'organisme. Cette biodisponibilité pharmacologique est similaire à celle définie dans le milieu médical (voir définition ci-dessus dans le dictionnaire *Chambers*). Entre les deux se loge la

biodisponibilité environnementale, but de l'étude, qui, si jamais accessible aux chercheurs, le sera par l'un ou l'autre des deux côtés.

La Figure 1.1 semble représenter une vision relativement statique du concept de biodisponibilité. Une fois la situation établie, la biodisponibilité paraît être une donnée plutôt stable, d'un ordre thermodynamique. Dans un milieu où les interactions prenant place sont lentes, tel un sol, cette visualisation peut être adéquate. Cependant, lorsqu'un facteur tel que l'écoulement de l'eau souterraine vient perturber cette situation en quasi-équilibre, la situation évolue en fonction du temps, donc dans un domaine d'études cinétiques. C'est particulièrement cet aspect qui est étudié dans la thèse, afin de qualifier et quantifier la biodisponibilité environnementale d'un contaminant au cours de son transport dans un milieu poreux saturé, représentant un aquifère.

La revue de littérature qui suit se décline selon le schéma conceptuel présenté à la Figure 1.1. En premier lieu, les interactions générales entre les contaminants et la matrice géologique seront présentés. Dans un second temps, les interactions entre les contaminants et les organismes récepteurs seront étudiés. Enfin, les tentatives d'approche de la biodisponibilité environnementale, tant qualitatives que quantitatives, seront examinées. Cette revue de la littérature sera suivie par la présentation générale des travaux de recherche qui ont mené à cette thèse, comprenant l'hypothèse de recherche, les objectifs ainsi que la méthodologie générale. Viendront ensuite les trois manuscrits, liés entre eux, corps du document, donnant accès au chapitre synthèse, à la conclusion et aux recommandations.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

Cette revue générale de la littérature s'articule selon les axes schématisés dans la figure 1.1. La première partie s'oriente vers les mécanismes non-biologiques, responsables de la disponibilité chimique, la deuxième partie présentera les mécanismes biologiques à la base des interactions entre les contaminants et les organismes récepteurs et enfin, à l'interface de ces deux axes, la troisième partie se concentrera sur le biodisponibilité environnementale. Pour chacune des deux premières parties, les interactions seront présentées de manière générale, quelque soit le contaminant étudié, puis explicitées plus spécifiquement pour le contaminant d'intérêt de cette thèse, le pentachlorophénol (PCP) présenté ci-dessous.

2.1. Le pentachlorophénol

Le pentachlorophénol (PCP) est un contaminant organique composé d'un noyau aromatique branché en ortho d'une fonction alcool, lui conférant son appartenance à la famille des composés phénoliques et branchés sur les cinq autres atomes de carbone du cycle d'un atome de chlore. Cette structure donne au PCP un poids moléculaire de 226,36 g/mol, un point de fusion de 190°C et un point d'ébullition proche de 300°C pour une pression de 101325 Pa (Gebefugi *et al.*, 1979). Son caractère ionisable (pKa de 4,75) fait en sorte que sa solubilité varie en fonction du pH. Lorsque ce dernier vaut 7, la solubilité du PCP dans l'eau est de 14 mg/L. Le PCP a été principalement utilisé comme biocide depuis 1930, du fait de sa capacité à découpler le processus de phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire des organismes vivants (Weinbach, 1957). Cette caractéristique lui a valu son utilisation intensive comme fongicide et insecticide pour la préservation du bois. Il est donc retrouvé dans l'environnement principalement sur les sites des usines de préservation de bois, au niveau des sols et des eaux souterraines (Valo *et al.*, 1984; Kitunen *et al.*, 1987). Le PCP est utilisé, lors de la

préservation du bois, sous forme dissoute dans de l'huile de préservation et à cette forme technique, est associée la présence de dioxines et furanes, beaucoup moins mobiles du fait de leur solubilité extrêmement plus faibles que celle du PCP (Cull *et al.*, 1984). Néanmoins, il est à noter que la contamination au PCP est très souvent accompagnée d'une contamination aux dioxines et furanes (PCDDs et PCDFs, polychlorodibenzo-*p*-dioxines et polychlorodibenzofuranes respectivement). Le PCP a aussi été détecté en concentrations non-négligeables dans les sols et les eaux souterraines autour des poteaux de bois traités servant aux lignes de transport (Arsenault, 1976). Comme il le sera présenté dans les sections suivantes, le PCP est biodégradable mais présente une toxicité importante. Ce contaminant s'avère donc particulièrement intéressant pour sa mobilité importante (Jackson et Bisson, 1990) et les différentes réponses biologiques qu'il peut induire (biodégradation et toxicité).

2.2. La disponibilité chimique

Les multiples interactions physico-chimiques prenant place entre les contaminants organiques et les matrices solides sont généralement divisées en deux catégories: thermodynamique ou encore interactions d'équilibre et cinétique ou interactions de non-équilibre. Dans un but de clarté, le mot anglais *sorption* sera utilisé en français pour indiquer la famille des processus d'ad- et d'absorption et correspond à la capture du soluté par la phase solide sans référence à un mécanisme particulier. L'adsorption fait appel à un mécanisme dans lequel la fixation s'effectue sur une surface bi-dimensionnelle alors que l'absorption concerne la fixation du composé dans une matrice tri-dimensionnelle.

2.2.1. Équilibres de sorption

La nature de ces mécanismes regroupés sous le terme de sorption est très variée, mais ils peuvent être groupés en trois catégories, selon les forces mises en jeu entre le soluté et la phase solide ou sorbante (Weber JR *et al.*, 1991): les interactions chimiques, électrostatiques et physiques, dans l'ordre décroissant des forces. Les interactions chimiques comprennent les liaisons covalentes, bien qu'il s'agisse dans ce cas de sorption irréversible, ainsi que les liaisons hydrogènes. Les interactions ioniques et ion-dipôle forment la famille des électrostatiques. Les interactions physiques, quant à elles, regroupent les liaisons de type London-Van Der Waals et Coulomb entre dipôles. Il est aussi possible de répartir les mécanismes en deux autres groupes toujours selon la nature des interactions en jeu (Chiou, 1989). D'une part, la partition, au cours de laquelle le composé organique est capté par la matrice de matière organique du sol, encore appelée physisorption (Weber JR *et al.*, 1991) ou sorption hydrophobique (Hassett et Banwart, 1989). Cette sorption est non-spécifique et correspond à une séparation de phases. D'autre part, la sorption référée dans ce cas aux interactions chimiques entre le soluté et le sol encore appelée chimisorption, est basée sur la structure spécifique du composé.

Afin de quantifier la répartition du soluté entre les phases aqueuse et solide, un coefficient de distribution est utilisé, c'est le K_d . Il est exprimé en L/kg, selon:

$$K_d = \frac{S}{C} \quad (2.1)$$

où S représente la concentration de soluté en phase solide (mol.kg⁻¹) et C , la concentration de soluté en phase aqueuse (mol.L⁻¹). Si différentes concentrations initiales de contaminant sont introduites dans l'eau souterraine, plusieurs valeurs de K_d seront obtenues, donnant forme à l'isotherme d'équilibre d'adsorption; en effet, la valeur de K_d n'est retenue qu'une fois l'équilibre atteint; c'est le K_d^{eq} . L'isotherme d'adsorption obtenu peut être linéaire ou suivre le modèle plus général de Freundlich

dans lequel la concentration du contaminant en phase aqueuse est élevée à la puissance n , représentant l'ordre de la réaction d'adsorption (Voice et Weber Jr, 1983).

La majorité des études de sorption des composés organiques en sols saturés revues par Chiou, (1989) ont montré que le phénomène principal des équilibres de sorption consiste en la partition, c'est à dire la formation de liaisons hydrophobiques entre le soluté organique et la matière organique du sol, sous la forme d'un équilibre rapide. Le coefficient de distribution est alors couramment appelé coefficient de partition, K_P et il est directement relié à la quantité de matière organique présente dans le sol (Karickhoff *et al.*, 1979), permettant de définir un coefficient de partition sur le carbone organique du sol, K_{OC} spécifique au composé étudié ou sur la matière organique, K_{OM} , selon:

$$K_{OC} = \frac{K_P^{eq}}{f_{OC}} \quad (2.2)$$

$$\text{ou} \quad K_{OM} = \frac{K_P^{eq}}{f_{OM}} \quad (2.3)$$

avec f_{OC} et f_{OM} , les fractions de carbone et de matière organiques présents dans le sol, respectivement. La valeur de f_{OC} est généralement prise comme la moitié de f_{OM} . Connaissant la nature hydrophobique de ces liaisons et dans le but de prédire le coefficient de distribution, le K_{OC} a été relié au coefficient de partage entre le composé considéré et le 1-octanol, le K_{OW} , ainsi qu'à la solubilité du composé (Karickhoff *et al.*, 1979; Schwarzenbach *et al.*, 1993):

$$\log K_{OC} = a \log K_{OW} + b \quad (2.4)$$

$$\text{ou} \quad \log K_{OM} = -c \log C_w^{sat} + d \quad (2.5)$$

Le K_{OW} étant facilement mesurable, il est alors aisé de prédire un coefficient de distribution d'un contaminant organique non-ionique dans un sol saturé, connaissant le

K_{OW} (ou la solubilité: C_w^{sa}) du composé ainsi que la fraction de matière organique du sol étudié. De nombreuses corrélations ont été compilées pour des composés tels que des pesticides, des hydrocarbones poliaromatiques, des polychloro-biphényles, etc. (Fetter, 1993).

Dans le cas de composés possédant un ou plusieurs groupements ionisables, l'approche est modifiée. C'est le cas du pentachlorophénol, qui possède une fonction phénol, ionisable. En solution aqueuse, le PCP peut donc se retrouver sous sa forme neutre, PCP^0 , ou ionisée, PCP^- . Schellenberg *et al.*, (1984) ont établi un coefficient de distribution globale, D_G , des composés ionisables en posant l'hypothèse que seule la fraction neutre s'adsorbe sur la matière organique du sol, d'où:

$$D_G = K_p^a Q \quad (2.6)$$

et
$$Q = \frac{1}{1 + \frac{K_a}{[H^+]_w}} \quad (2.7)$$

Q étant la fraction de composé se trouvant sous la forme ionisée à un pH donné, K_a , la constante d'acidité et $[H^+]_w$, la concentration en protons dans l'eau. Les auteurs concluent que la sorption des formes neutre et ionisée s'effectue, mais qu'à des valeurs de pH inférieure ou égale au pKa du composé, c'est la sorption de la forme neutre qui prédomine. Lee *et al.*, (1990) ont apporté le fait que la sorption de la forme ionisée se fait par l'intermédiaire de la formation d'une paire d'ions avec un cation présent en solution, tel que: M^+PCP^- . Dans ce cas, plus la force ionique est importante, plus la sorption de la forme ionisée se fera. Des résultats équivalents ont été obtenus par Westall *et al.*, (1985) ainsi que Jafvert *et al.*, (1990). Le PCP exhibe tout particulièrement la dualité des interactions possibles: physiques et chimiques. En effet, son hydrophobilité est importante; $\log K_{OW} = 5.24$, (Schellenberg *et al.*, 1984), mais son pKa de 4,75 indique que la fraction de PCP ionisée retrouvée dans la majorité des sols

(pH de 4 à 8,5) sera non-négligeable. De fait, le K_{OW} des composés ionisés tels le PCP varie en fonction du pH (Kaiser et Valdmanis, 1982). Lee *et al.*, (1990) ont ainsi montré que le log K_{OW} du PCP peut prendre des valeurs allant de 2,95 pour des pH supérieurs à 8 jusque 5.24 pour des pH inférieurs à 4.

En réalité, la valeur de K_d est plus ou moins sous-estimée quand seule la sorption sur la matière organique est prise en compte. En effet, les composés organiques peuvent aussi créer des liaisons avec la matrice minérale du sol, impliquant ainsi de tenir compte d'un K_{min} , coefficient de distribution spécifique sur les matrices minérales (Schwarzenbach *et al.*, 1993). Haderlein *et al.*, (1996) ont montré la capacité des minéraux d'argiles à adsorber spécifiquement des pesticides. Rebhun *et al.*, (1992) ont observé que pour des sols ayant de faibles teneurs en matière organique, le K_{min} devient non-négligeable et que ce dernier, tout comme le K_{OM} , est lié au K_{OW} du composé. McCarty *et al.*, (1981) ont montré que les composés organiques s'adsorbent sur les matrices minérales pures. Ils ont défini un seuil de carbone organique dans le sol, fixé sur les matrices minérales, en-deça duquel, la matière minérale joue un rôle important dans la sorption totale des contaminants organiques. Cette valeur critique est donnée par la relation suivante:

$$f_{oc}^* = \frac{A_s}{200} \frac{1}{0,84 K_{OW}} \quad (2.8)$$

avec A_s , l'aire spécifique de la phase minérale ($\text{L}^2 \cdot \text{M}^{-1}$). Plus le composé est hydrophobe, plus la valeur de ce seuil est basse.

Il est à noter que la matière organique retrouvée dissoute dans l'eau souterraine peut jouer un rôle de solubilisation accrue du contaminant organique dans la phase aqueuse, la fugacité de ce dernier dans cette phase en étant réduite. Par exemple, l'augmentation de la fraction de méthanol dissous dans l'eau implique la baisse de l'isotherme d'adsorption pour les chlorophénols (Lee *et al.*, 1993; Nzengung *et al.*, 1996). Par

contre, la matière organique naturelle retrouvée dissoute dans la phase aqueuse n'a pas montré d'effet de diminution du retard observé pour le PCP à faibles concentrations sur des échantillons de sol saturé (Lafrance *et al.*, 1994). Ceci peut être dû au fait que la sorption des composés ionisables, tel que le PCP, est dépendante du pH de la solution ainsi que du pKa du composé, les deux pouvant être modifiés par l'ajout d'un cosolvant (Lee et Rao, 1996). Rehbun *et al.*, (1996) proposent d'utiliser ce phénomène de cosolvant pour l'extraction des contaminants organiques hydrophobes ($\log K_{ow} > 4$) des sols. Le facteur de retard obtenu lors de l'élution en est réduit de 90 % pour l'ajout de 20 à 200 mg/L de matière humique dissoute. De même, lors d'expériences de non-équilibre de sorption, Lee *et al.*, (1993) ont utilisé ce phénomène afin de diminuer le temps d'élution en colonne. Ils ont mis en évidence une corrélation linéaire entre ce temps de rétention et la fraction de cosolvant utilisée.

La problématique de l'estimation des équilibres de sorption a aussi été abordée selon d'autres approches, particulièrement l'approche thermodynamique. Selon cette théorie, la matrice organique du sol est considérée comme polymérique, associée à la matrice argileuse (Freeman et Cheung, 1981). Le modèle est basé sur la théorie des paramètres de solubilité d'un composé dans une phase polymérique. La solubilité d'un composé dans un solvant polymérique est estimée à partir du coefficient d'activité ou fugacité de ce composé, au sein de la phase organique. L'activité d'un soluté en faible concentration dans un solvant polymérique amorphe (matrice organique du sol) est donnée par l'équation de Flory-Huggins et dépend d'un coefficient d'interactions soluté-polymère correspondant à un excès d'entropie et d'enthalpie (Chiou *et al.*, 1983). Ce coefficient d'interactions peut être lui-même estimé à partir des énergies de cohésion de chaque composé, δ (Kopinke *et al.*, 1995). La valeur de l'énergie de cohésion de la matière organique du sol, δ_{OM} a été évaluée à $12,5 \pm 0,5$ (al.cm^{-3}) $^{1/2}$, permettant ainsi de remonter à l'équation de Flory-Huggins et d'estimer un coefficient de distribution, tenant compte non seulement des attractions hydrophobiques entre le soluté et la matière organique du sol, mais aussi de toutes les autres attractions possibles entre ces deux

entités. D'autres modèles suivant cette approche ont été élaborés (Spurlock et Biggar, 1994). D'autres tentatives d'estimation de la sorption ont été réalisées, regroupées sous le terme général des QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*), qui tentent, à partir des caractéristiques moléculaires, des groupements chimiques de la molécule de soluté, d'estimer l'activité de celui-ci face à la matière organique du sol (Sabijic, 1987; Ames et Grulke, 1995; Engebretson *et al.*, 1996; Luehrs *et al.*, 1996).

2.2.2. Non-équilibres de sorption

Les interactions jusqu'à lors étudiées dans cette revue ont été observées sous l'angle de l'équilibre, c'est à dire que l'ampleur des interactions était mesurée une fois l'équilibre atteint. Or, il s'avère que les équilibres observés dans les sols ne sont pas de vrais équilibres dans le sens où ceux-ci continuent à évoluer, mais de manière beaucoup plus lente. Karickhoff, (1980) a observé et modélisé deux étapes lors de l'adsorption et de la désorption des composés organiques du sol, l'une rapide et l'autre lente. Une fraction du contaminant sorbé atteint l'équilibre au bout de quelques minutes, tandis que la sorption de la fraction restante est caractérisée par une cinétique très lente, d'ordre 1, que ce soit pour la sorption ou la désorption. Plus tard, Wu et Gschwend, (1986) ont attribué ces cinétiques très lentes à la sorption des composés organiques sur des sites difficilement accessibles dans la matrice de matière organique. La technique des courbes d'élution a été utilisée par Nkedi-Kizza *et al.*, (1989) pour démontrer qu'une partie de la sorption est due à la diffusion du soluté à l'intérieur de la matière organique. L'asymétrie des courbes d'élution obtenues ne pouvait s'expliquer par les équilibres de sorption. Les mêmes sols desquels la matière organique avait été enlevée n'exhibait plus cette asymétrie. Brusseau et Rao, (1991) ont modélisé les courbes d'élution de plusieurs composés, neutres et ionisables, par un modèle dans lequel une fraction du contaminant s'adsorbe instantanément, et l'autre fraction est limitée cinétiquement. Pour les composés neutres et les ionisables sous leur forme neutre, la structure de la phase sorbante n'a pas montré d'influence sur les cinétiques. Par contre, pour les

composés ionisés, les cinétiques de l'étape lente étaient encore plus faibles que pour les composés neutres.

Une autre explication au phénomène de non-équilibre de sorption provient de la diffusion intra-particulaire. En effet, Ball et Roberts, (1991) ont montré que le fait de diminuer la taille des particules de sol augmente de manière importante les cinétiques de non-équilibre de sorption. Ils proposent donc la diffusion intra-particulaire comme explication et le rayon des particules comme distance de diffusion. Les deux mécanismes peuvent sans doute s'effectuer en même temps (Pignatello et Xing, 1996) et ce de manière très similaire à ce qui peut se passer entre un contaminant organique et un polymère (Xing et Pignatello, 1997).

Le PCP subit lui aussi ces mécanismes de sorption lentes (Lee *et al.*, 1991). Divincenzo et Sparks, (1997) ont montré que la résultante en terme de sorption était dépendante de la concentration. et à une moindre ampleur du temps de contact entre le contaminant en solution et la phase solide.

Enfin, l'observation de ces cinétiques de sorption très lentes expliquées par de la diffusion intra-particulaire ou intra-matière organique, donne des pistes de compréhension au phénomène de la séquestration des composés organiques avec l'âge de la contamination. En effet, Pignatello *et al.*, (1993) ont observé une différence importante entre l'élution d'un sol fraîchement contaminé avec un herbicide et un sol ayant subi une contamination équivalente, mais beaucoup plus ancienne. La mobilité du contaminant nouvellement ajouté était bien supérieure à celle de l'ancien contaminant. De même, Hatzinger et Alexander, (1995) ont réalisé des extractions à partir de sols fraîchement contaminés et de sols à vieilles contaminations et les résultats obtenus montrent que l'extractibilité diminue avec l'âge de la contamination. Même la sonication des particules de sol n'a pu parvenir à libérer le contaminant du sol vieilli. Le composé 1,2-dibromométhane a été retrouvé dans les sols 19 ans après son application et démontrait une résistance totale à la désorption, par contre la destruction de la structure du sol a fortement contribué au relargage du contaminant, montrant que ce composé était emprisonné dans les micropores du sol (Steinberg *et al.*, 1987). Enfin, le vieillissement

de la contamination permet la création de liens chimiques irréversibles entre le contaminant et la phase solide du sol conduisant à la transformation du composé, sa polymérisation, jusqu'au mécanisme d'humification (Richnow *et al.*, 1997).

2.2.3. Influence de l'écoulement en milieu poreux saturé

Le milieu d'intérêt étant saturé, il est indispensable de prendre en compte l'écoulement de l'eau et son influence sur les mécanismes décrits ci-dessus. L'hydrodynamique en milieu poreux saturé permet le transport du contaminant dissous en phase aqueuse, par les mécanismes d'advection et de dispersion. L'advection représente le mouvement général de l'eau et est caractérisé par la vitesse des molécules d'eau, v . La dispersion trouble en quelque sorte l'advection et est une résultante de la diffusion moléculaire, due à des gradients de concentration de contaminant, ainsi que de l'hétérogénéité de la phase particulaire. Le coefficient de dispersion hydrodynamique, exprimé dans l'axe de l'écoulement (longitudinal), D , est défini comme étant gouverné à la fois par la vitesse de l'eau souterraine, mais aussi par la diffusion moléculaire, selon:

$$D = \alpha_L v + D^* \quad (2.9)$$

où α_L est la dispersivité dynamique longitudinale et D^* , le coefficient de diffusion effective ($L^2 \cdot T^{-1}$) défini comme étant le coefficient de diffusion du soluté dans le milieu, D_D , corrigé d'un facteur de tortuosité, ω , dû à l'hétérogénéité du milieu (Fetter, 1993):

$$D^* = \omega D_D \quad (2.10)$$

L'écriture d'un bilan de matière pour un soluté non réactif sur un élément de volume de ce milieu, en mono-dimensionnel, amène à l'équation suivante (Levenspiel, 1972; Todd, 1980):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - v \frac{\partial C}{\partial x} \quad (2.11)$$

où C est la concentration en contaminant considéré dans la phase aqueuse ($M \cdot L^{-3}$), D , le coefficient de dispersion longitudinale ($L^2 \cdot T^{-1}$), v , la vitesse de l'eau souterraine ($L \cdot T^{-1}$), x la direction de l'écoulement (L) et t , le temps (T).

La vitesse exprimée dans cette équation représente la vitesse de décharge de l'eau souterraine et est donnée par la loi de Darcy (Freeze et Cherry, 1979):

$$v = -K_H \frac{dh}{dl} \quad (2.12)$$

où K_H est le coefficient de perméabilité encore appelé conductivité hydraulique ($L \cdot T^{-1}$) et dh/dl le gradient hydraulique. La conductivité hydraulique s'exprime comme une vitesse et prend des valeurs comprises entre 10^{-3} et 10^{-1} cm/s pour les sables jusqu'à 10^{-11} à 10^{-7} cm/s pour les argiles. La vitesse réelle des particules fluides est donnée par :

$$V = \frac{v}{\theta} \quad (2.13)$$

où θ est la porosité de la zone aquifère considérée, c'est à dire le rapport entre le volume réellement affecté par l'écoulement et le volume total. La porosité prend des valeurs, en fonction de la matrice considérée, proches de 0,35 (entre 0,25 et 0,45) (Todd, 1980).

L'écoulement ainsi décrit vient influencer les interactions physico-chimiques présentées plus haut. En effet, le temps requis pour atteindre un pseudo-équilibre peut être rencontré dans les sols, mais l'écoulement constant de l'eau ne permet pas ce contact long entre la molécule de contaminant et la matrice solide. Brusseau, (1992) a montré que la vitesse de l'eau influence une cinétique réversible de premier ordre de sorption

lente. De même, en utilisant cette fois un modèle de diffusion basée sur la loi de Fick pour caractériser la sorption lente, (Hutzler *et al.*, 1986) ont obtenu des résultats similaires.

2.3. La biodisponibilité pharmacologique

La notion de biodisponibilité pharmacologique développée par Dickson *et al.*, (1994) et présentée à la figure 1.1 sera ici étendue à tous les organismes biologiques pouvant être exposés au contaminant, c'est à dire les organismes dont la réponse à l'exposition est mesurée en terme de toxicité, mais aussi ceux pour lesquels l'exposition au contaminant conduit à la biodégradation de ce dernier.

2.3.1. La biodégradation

La biodégradation des contaminants organiques retrouvés dans les eaux souterraines est réalisée par les bactéries présentes dans ce milieu. Ces bactéries y sont en grande variété et en quantité variable (Chapelle, 1993). Knox *et al.*, (1993) ont répertorié des résultats de comptes microbiens effectués sur différentes eaux souterraines à des profondeurs allant de 1 à 1752 m. Les valeurs obtenues oscillent entre 10^2 et 10^7 cellules/mL. Les valeurs moyennes observées sur des sites contaminés sont toutes légèrement plus élevées, se concentrant autour de 10^5 cellules/mL. Les bactéries se regroupent sous forme de micro-colonies ou sous forme de biofilm recouvrant les surfaces des matrices solides (McCarty *et al.*, 1984). Elles utilisent la matière organique indigène comme source de carbone et différents accepteurs d'électrons possibles pour ce métabolisme: soit l'oxygène dissous présent dans l'eau, soit des ions tels que les nitrates, sulfates, ions ferriques, etc. Les métabolismes aérobies (utilisation de l'oxygène comme accepteur d'électrons) sont en général plus rapides que les anaérobies. Mais, dans le cas d'une contamination, l'oxygène dissous tombe très rapidement en-dessous de 2 mg/L et ne

supporte plus les métabolismes aérobies, permettant le développement des microorganismes anaérobies sur les autres accepteurs d'électrons (Chapelle, 1993). C'est l'acclimatation des microorganismes à la contamination. Ce phénomène est souvent accompagné d'une diminution de la diversité microbienne, du fait de la pression sélective (Beaulieu *et al.*, 2000). En effet, seuls les microorganismes possédant les enzymes nécessaires à la biodégradation du contaminant présent pourront croître et le feront au détriment des autres. L'acclimatation peut prendre plusieurs semaines (Chapelle, 1993), mais elle peut aussi être impossible, donnant lieu au phénomène de récalcitrance inhérente (Huesemann, 1997) du fait d'un manque d'enzyme ou d'une inhibition de la microflore par excès de substrat. La structure des composés organiques qui viennent contaminer les eaux souterraines est alors d'analyse très utile. En effet, plus le composé sera simple, plus sa biodégradation sera rapide et complète, quelque soit le milieu récepteur étudié. Par exemple, les composés du pétrole, alcanes à chaînes plus ou moins longues, sont relativement facilement dégradés dans les eaux souterraines (Chapelle, 1993). Une augmentation de la complexité des structures chimiques augmente la récalcitrance et donc les limites à la biodégradation. Les dioxines et furanes, par exemple, sont des composés récalcitrants, bien qu'une étude ait montré qu'en co-métabolisme (utilisation concomitante d'un autre substrat carboné pour la croissance), ces molécules pouvaient être partiellement utilisées, selon des mécanismes de déchlorination réductive (Wilkes *et al.*, 1996).

Le pentachlorophénol est un composé biodégradable, en métabolisme aérobie ou anaérobie (Boyd *et al.*, 1989; Hale *et al.*, 1994). De nombreuses souches capables de le dégrader en conditions aérobies ont été identifiées: des *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* et *Mycobacterium* (Hale *et al.*, 1994). Le mécanisme réactionnel de biodégradation a été mis en évidence pour la souche *Arthrobacter* ATCC 33790 (Schenk *et al.*, 1990) par marquage à l'oxygène radioactif. La première déchlorination du PCP se fait en fait par l'intermédiaire de l'eau plutôt que de l'oxygène et elle est suivie par une déshalogénéation hydrolytique complète de la molécule, menant

au catéchol. Ce dernier subit ensuite une série d'oxydations qui permettent de rompre le cycle et d'aboutir à l'acétyl-coenzyme A et au succinate ou bien au pyruvate et à l'acétaldéhyde, composés rentrant dans le cycle de Krebs de la cellule (Glick et Pasternak, 1994). Le PCP peut aussi être biodégradé par métabolisme anaérobie. Ce phénomène a été mis en évidence dans des boues anaérobies acclimatées, au sein desquelles le PCP a été déchloriné de manière réductive par étapes successives pour donner des chlorophénols (tri- et di-) puis le phénol (Mikesell et Boyd, 1986). Il est à noter que le PCP peut aussi être biodégradé par l'action de champignons, de la famille des *white rot fungi*. Trois d'entre eux ont démontré de telles capacités : *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Inonotus dryophilus* en conditions batch ou sous forme de films fixes (Logan *et al.*, 1994; Alleman *et al.*, 1995).

En terme de cinétiques de biodégradation, les résultats expérimentaux obtenus dans les différentes études montrent de grandes différences. La souche ATCC 33790 a minéralisé plus de 80% des 14,7mg/L en phase aqueuse, en 45h, permettant un doublement de la population bactérienne (Lin et Wang, 1991). En comparaison, La souche *Rhodococcus chlorophenolicus* a permis la dégradation de 1,2 mg/L de PCP en 160h, en phase aqueuse (Jacobsen et Arvin, 1996). Les coefficients de rendement entre le PCP et la biomasse ont été déterminés dans cette étude et prennent des valeurs moyennes de 0,35 g/g. Les taux de croissance maximum, mesurés pour différentes concentrations initiales en PCP, ont montré qu'en dessous de 0,5 mg/L de PCP, la croissance n'est pas soutenue. Par contre, au-delà de cette concentration, le taux de croissance est d'environ $7j^{-1}$. Une étude en colonne, utilisant la souche *Arthrobacter* ATCC 33790 fixée sur des billes de verre, a permis d'activer la biodégradation par ajout successifs de PCP en entrée de colonne (Edgehill, 1996). Cette activation a permis d'augmenter le taux de biodégradation des 150 mg/L alimentés de 200h à 10h. La poursuite des ajouts jusqu'à des concentrations de 366 mg/L n'ont pas induit de limitations, mais le saut à 1000 mg/L a stoppé la biodégradation, sans doute par effet toxique du PCP. L'utilisation d'un consortium bactérien pour la biodégradation du PCP, et son activation en réacteur fed-batch a permis d'atteindre des taux de minéralisation de

plus de 80% en 30h avec des concentrations initiales de 100 mg/L, 300h pour 300 mg/L et en accord avec l'étude précédente, un arrêt de la biodégradation pour des concentrations de 500 mg/L (Otte *et al.*, 1994).

En conditions de terrain, des évidences de minéralisation du PCP ont été recueillies (Pignatello *et al.*, 1985). Une période d'acclimatation de 3 à 5 semaines a été observée dans les eaux de surface étudiées, suivie par une dégradation aérobie plus rapide que l'anaérobiose. Une augmentation de la contamination en PCP a conduit à une augmentation dans la capacité de biodégradation de ce contaminant par les microorganismes indigènes. La majorité des bactéries responsables de la dégradation ont été retrouvées attachées à des surfaces (Pignatello *et al.*, 1983). De même, la souche *Arthrobacter* ATCC 33790 a été cultivée en biofilms fixés naturellement sur billes de verre et a permis la biodégradation du PCP (Edgehill, 1996).

Ces différentes recherches ont mené à l'utilisation de la bioaugmentation pour remédier aux problèmes de contamination des sols par le PCP. Plusieurs études ont montré l'intérêt de la méthode pour ce contaminant, soit à l'aide de culture de souches pures (Edgehill et Finn, 1983; Crawford et Mohn, 1985) ou par activation des microorganismes provenant d'un échantillon de sol contaminé (Otte *et al.*, 1994). Cette activation se traduit par une diminution importante de la diversité bactérienne dans le sol utilisé. Beaulieu *et al.*, (*in press*) ont montré qu'à la fin d'une telle bioactivation, 96% des clones examinés avaient le même profil en utilisant la méthode SSCP (single-strand-conformation-polymorphism). La bioaugmentation subséquente à l'enrichissement du sol contaminé par un échantillon de ce même sol déjà décontaminé a permis la minéralisation de près de 60% du PCP (Laine et Jorgensen, 1996). L'utilisation de bioréacteurs a aussi mené à la décontamination d'eaux souterraines contaminées au PCP et à la créosote (Mueller *et al.*, 1993), et ce même à basses températures (Jarvinen *et al.*, 1994). La modélisation de résultats similaires obtenus en réacteurs bioaugmentés de boues activées a montré la capacité des microorganismes de croître avec le PCP comme source de substrat carboné (Jacobsen et Arvin, 1996).

2.3.2. La toxicité

Les voies d'exposition et les moyens d'action des contaminants organiques sur les organismes biologiques sont multiples et variés. Néanmoins, à partir du moment d'exposition entre les deux, quelques étapes communes peuvent être dégagées, telles que l'entrée du contaminant dans l'organisme, le transport au sein de l'organisme, son entreposage, son métabolisme et son excrétion hors de l'organisme (Landis et Yu, 1995). La première étape est souvent régie, en ce qui concerne les contaminants organiques, par la lipophilicité du contaminant, c'est à dire son attirance pour les corps gras. En effet, les membranes extérieures des organismes biologiques sont souvent constituées principalement de lipides, envers lesquelles les contaminants organiques sont attirés, par rapport à l'eau. Ainsi, le K_{OW} présenté à la section 2.1 peut servir, comme première estimation, pour connaître la quantité de contaminant qui, à l'équilibre, se retrouvera sur ou dans la membrane lipidique des organismes (Knezovich, 1994). Ce phénomène, encore appelé bioaccumulation, représente la porte d'entrée des contaminants dans l'organisme. Ceux-ci peuvent ensuite être transportés par le système sanguin ou lymphatique et ainsi distribués aux différents tissus ou organes sur lesquels ils pourront agir, ou être entreposés. Le foie joue un rôle majeur dans l'entreposage et la biotransformation des xénobiotiques (étrangers à l'organisme) grâce à sa caractéristique de centrale enzymatique (Landis et Yu, 1995). Les mécanismes d'action des contaminants sur les organismes sont variés. Il peut y avoir destruction cellulaire, combinaison du contaminant avec un enzyme empêchant l'activité de ce dernier, mais bien souvent, le contaminant organique qui s'accumule au niveau de la membrane lipidique vient bloquer le fonctionnement des protéines qui agissent comme pompe ionique, régulant le transport des ions au travers de la membrane. Ce phénomène appelé narcose finit par étouffer la cellule et la détruire (Landis et Yu, 1995).

Le pentachlorophénol est reconnu et utilisé pour sa toxicité, surtout bactérienne. Néanmoins, des valeurs importantes de toxicité ont été mesurées pour ce composé sur

différents organismes: LC50 sur une carpe (*Cyprinus carpio*) à pH7 de 0.1 mg/L et LC50 sur *Daphnia pulex* de 3 mg/L (Mayer Jr. *et al.*, 1994) ou encore LC50 sur une truite (*Salmo trutta*) de 0.2 mg/L (Hale *et al.*, 1994). Une caractéristique de ce composé réside dans sa structure chimique: l'aspect ionisable. Cette caractéristique implique des toxicités différentes à différents pH, du simple fait de la solubilité du PCP à ces différents pH. Ainsi, la LC50 sur *Cyprinus carpio* passe de 0.1 mg/L à pH7 à 0.06 à pH5. Le PCP a ainsi plus tendance à se bioaccumuler à des pH plus faibles. De plus, les membranes biologiques ont été comparées avec succès à des liposomes composés de phosphatidylcholine zwitterionique. Le PCP peut donc développer avec ces membranes des liens ioniques en plus des liens hydrophobes, augmentant de la sorte le phénomène de nécrose (Escher et Schwarzenbach, 1996).

2.4. La biodisponibilité environnementale

À mi-chemin entre la disponibilité chimique et la biodisponibilité pharmacologique se situe la biodisponibilité environnementale, d'intérêt dans cette thèse. La littérature plus spécifique à cette biodisponibilité est maintenant présentée, des points de vue biodégradation et toxicité. Les études portant sur la biodisponibilité en terme de toxicité ont surtout été réalisées sur les contaminations des eaux de surfaces (Hamelink *et al.*, 1994) et ont été séparées jusque très récemment des études portant sur la biodisponibilité en terme de biodégradation. Dans un premier temps, des descriptions qualitatives du phénomène de biodisponibilité seront présentées, suivies de récentes approches de quantification. L'effet de différents facteurs tels que l'âge de la contamination, le type de microorganismes ou la présence de co-contaminants seront ensuite traités et enfin, l'influence du transport du contaminant sur la biodisponibilité sera évoquée.

2.4.1. Descriptions qualitatives

Les premières observations de limitations de la biodégradation dans les sols remontent aux années 40, lorsque Ensminger et Gieseking, (1942) ont remarqué que la fixation de composés organiques sur la matrice minérale du sol influençait leur disponibilité pour les microbes du sol. Plus tard, Weber et Coble, (1968) ont étudié la décomposition microbienne du diquat, pesticide, adsorbé sur deux types d'argile: la montmorillonite et la kaolinite, et ont observé que l'addition d'une quantité de montmorillonite suffisante pour adsorber la moitié du diquat diminuait l'ampleur de la biodégradation de ce dernier de moitié. Par contre, la kaolinite ne présentait aucun effet équivalent. Le développement de la recherche dans ce domaine a apporté des résultats confirmant ces premières observations. Steen *et al.*, (1980) ont montré que plusieurs composés utilisés industriellement se trouvaient hors d'atteinte des micro-organismes dégradeurs lorsqu'adsorbés sur des sédiments. Gordon et Millero, (1985) ont mis en évidence une corrélation négative entre l'étendue de l'adsorption de plusieurs acides organiques sur des surfaces d'hydroxyapatite et les taux de biodégradation de ces composés. De même, l'étendue de la minéralisation du 2,4,6-trichlorophénol diminue en fonction de l'augmentation de la quantité d'acide humique dans le sol (Robinson et Novak, 1994). En terme de toxicité, des observations similaires étaient faites. Des sols contaminés à la dioxine et administrés par gavage à des cobayes n'ont induit aucune toxicité sur ces organismes. L'analyse de leur foie ont montré une très faible biodisponibilité de la dioxine (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine, TCDD) du sol (Umbreit *et al.*, 1986). La présence de carbone organique dissous dans l'eau a induit une diminution de la biodisponibilité des HAP à l'organisme *Pontoporeia hoyi* (Landrum *et al.*, 1985). Des résultats identiques ont été observés sur *Daphnia magna* (Kukkonen et Oikari, 1991). Plus précisément, la nature et la composition chimique de la matière organique interviennent dans l'estimation de la biodisponibilité au vers de terre *Lumbriculus variegatus* (Standley, 1997).

Les recherches se sont ensuite précisées quant aux mécanismes responsables de ces observations. Les mises en évidence physico-chimiques des phénomènes observés (partition et mécanismes de sorption lente (Pignatello et Xing, 1996; Nam et Alexander, 1998)) ont été utilisées pour les études de biodégradation en milieu multiphasiques. La biodisponibilité s'est alors avérée être un phénomène à deux temps: une fraction du contaminant se trouvant aisément accessible aux organismes est utilisée en premier, puis une seconde fraction, plus récalcitrante, pour laquelle l'accès aux organismes dégradeurs est limitée par la désorption du contaminant (Rijnaarts *et al.*, 1990; Robinson *et al.*, 1990; Gamerdinger *et al.*, 1991; Mihelcic et Luthy, 1991; Al-Bashir *et al.*, 1994; White et Alexander, 1996). En terme de toxicité, de nombreuses observations ont montré qu'elle diminuait inversement à la fraction de matière organique présente, soit particulaire, soit dissoute (Gobas et Zhang, 1994). De même, la toxicité relativement importante au début de la contamination diminue dans un second temps (Traina *et al.*, 1996; Robertson et Alexander, 1998). Récemment, la biodisponibilité a été étudiée à la fois envers un microorganisme dégradeur et envers un organisme induisant une toxicité (Kelsey et Alexander, 1997). Cette étude a montré des évaluations similaires de la biodisponibilité pour les deux types d'organismes.

2.4.2. Approches de quantification

Au cours des dix dernières années, des méthodes de quantification de la biodisponibilité des contaminants organiques dans les sols ont été développées. Celles-ci sont basées sur différentes définitions du concept de biodisponibilité. La biodisponibilité a été définie, de la manière la plus simple, par la fraction de contaminant présent dans la phase aqueuse (Cuypers *et al.*, 1999). L'analyse directe de la concentration du contaminant dans cette phase permet alors une évaluation de la biodisponibilité. Cette méthode est à la base d'une série de méthodes basées sur une approche chimique de la biodisponibilité. Plusieurs tests ont été développés qui utilisent différents solvants, allant de l'eau jusqu'à des solvants organiques très forts. Des corrélations sont ensuite observées entre les

quantités de contaminants extraits et les réponses biologiques de biodégradation ou de toxicité (Kelsey *et al.*, 1997; Loibner *et al.*, 1999). La grande variabilité de la nature des sols rend cette approche difficile et des résultats récents ont remis en question les corrélations développées (Chung et Alexander, 1998). De même, en milieu aqueux principalement, des sondes basées sur des colonnes de chromatographie C18 ont été développées pour estimer la fraction de contaminant bioaccumulable (Hsieh et Dorsey, 1995; van Loon *et al.*, 1996). Un indice de biodisponibilité (BI) a été défini comme le ratio entre la concentration du contaminant dans 1 gramme de lipide et dans 1 gramme de sédiment (Rice et O'Keefe, 1995). Ces différentes approches chimiques de la biodisponibilité ont la caractéristique de se baser sur des notions thermodynamiques, sur des fractions de contaminant. Une autre approche générale consiste à considérer les différents taux en jeu dans le devenir du contaminant: taux de sorption, taux de biodégradation, taux de transport. Ainsi, la biodisponibilité peut se définir, dans les eaux de surface, comme le taux d'accumulation par les organismes rapporté au taux de transport de l'eau (Landrum *et al.*, 1994). Cette approche a été appliquée à la problématique de la décontamination des sols et la biodisponibilité est alors devenue le rapport entre le taux de biodégradation et le taux de désorption des contaminants (Bosma *et al.*, 1997; Ramaswami et Luthy, 1997; Zhang *et al.*, 1998). Ce concept de taux est déjà utilisé dans le domaine pharmacologique, où il a donné lieu à la terminologie de taux de biodisponibilité (Hrudey *et al.*, 1996).

2.4.3. Influence de différents facteurs

Au cours des cinq dernières années, l'influence négative du vieillissement de la contamination dans les sols sur la biodisponibilité a été mis en évidence tant pour les microorganismes dégradeurs que pour les organismes induisant une réponse toxique. (Alexander, 1995; Kelsey et Alexander, 1997; White *et al.*, 1997; Alexander et Alexander, 1999; Alexander et Alexander, 2000). La lente migration des contaminants dans les micropores de la matrice solide et principalement de la matière organique est

principalement responsable de ce résultat (Nam et Alexander, 1998). Néanmoins, cette diminution de la biodisponibilité est difficile à prévoir et les tests d'extractabilité corrélés aux réponses biologiques ont montré des problèmes à le faire (Chung et Alexander, 1998).

Les microorganismes dégradeurs, de part leur action directe sur les contaminants, peuvent influencer la biodisponibilité de ces derniers. Des expériences mettant en jeu deux souches de dégradeurs de naphtalène face à leur substrat absorbés sur différents sols et solides artificiels ont montré des habiletés différentes de ces deux souches à minéraliser le naphtalène dans ces diverses situations, malgré des capacités identiques en phase aqueuse (Crocker *et al.*, 1995; Guerin et Boyd, 1997). Les auteurs ont conclu qu'une des deux souches avait la capacité d'utiliser le substrat sous sa forme adsorbée. Une autre étude a quant à elle conclu que les microorganismes pouvaient accélérer le taux de désorption des contaminants grâce à deux facteurs: leur affinité spécifique pour le substrat considéré, permettant de réduire rapidement la concentration de contaminant en phase aqueuse et la capacité des cellules à s'attacher sur les surfaces où sont adsorbées les contaminants (Harms et Zehnder, 1995). Des résultats similaires ont été obtenus, cette fois en exposant deux organismes différents (un ver de terre, *Lumbriculus variegatus* et une larve de mouscron, *Chironimus riparius*) à des situations identiques de contaminant absorbé (Davies *et al.*, 1999). La production de biosurfactant par les microorganismes dégradeurs eux-mêmes a permis la solubilisation plus importante de leur substrat et donc une augmentation de la biodisponibilité (Déziel *et al.*, 1996). Ces résultats doivent néanmoins être nuancés par l'étude de Deschênes *et al.*, (1995) qui a permis de montrer qu'une augmentation de la mobilité des contaminants n'est pas directement liée à une augmentation de sa biodégradation. Les microorganismes peuvent aussi jouer un rôle à long terme dans les sols contaminés en catalysant la réduction de biodisponibilité des contaminants toxiques (Guthrie et Pfaender, 1998). Le mécanisme d'humification a été prouvé être en partie catalysé par les microorganismes indigènes du sol (Richnow *et al.*, 1997).

La biodisponibilité peut aussi être modifiée lorsque des co-contaminants entrent en compétition, soit pour les sites de sorption, soit envers les microorganismes dégradeurs. Le pétrole résiduel d'une contamination mixte pétrole-aroclor 1242 a joué le rôle de réservoir d'absorption pour l'aroclor, limitant ainsi sa biodisponibilité et le taux de déchlorination (Zwiernik *et al.*, 1999). De même, l'ajout de pyrène dans une contamination au phénantrène vieillie a permis une augmentation de la biodégradation du phénantrène (White *et al.*, 1998). Ce phénomène a été approprié au concept de déplacement compétitif: le pyrène aurait ainsi volé les sites d'absorption du phénantrène, rendant ce dernier plus biodisponible. La compétition entre la biodégradation du phénantrène et la biodégradation des composés de la phase liquide non-aqueuse dans laquelle le phénantrène était dissous a limité la biodisponibilité de ce dernier (Morrison et Alexander, 1997). La compétition s'est faite au niveau de l'azote, du phosphore et de l'oxygène disponible.

2.4.4. Effet du transport du contaminant sur la biodisponibilité

Aucune approche de la biodisponibilité des contaminants durant leur transport en eaux souterraines n'a encore été développée. Certaines études ont montré l'influence de l'hydrodynamique sur la biodégradation des contaminants, mais sans que le contaminant puisse être retenu par les surfaces (Borden et Bedient, 1986; Brusseau *et al.*, 1999). L'augmentation de la vitesse de l'eau entraînait une diminution de la biodégradation du contaminant. Parallèlement et basé sur une modélisation du transport des contaminants, l'effet de l'hydrodynamique sur les taux de dissolution des phases liquides non-aqueuses a été démontré inverse (Seagren *et al.*, 1993). La compétition des différentes cinétiques qui régissent le devenir des contaminants dans les eaux souterraines et sa résultante en terme de biodisponibilité n'est pas encore connue.

3. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES TRAVAUX

À partir des connaissances apportées par la revue de littérature, une approche conceptuelle de la biodisponibilité des contaminants organiques durant leur transport en milieux poreux saturés est tout d'abord développée dans cette section de la thèse. Cette approche permet de définir la biodisponibilité et ainsi de poser les bases de la recherche expérimentale, c'est à dire l'hypothèse de recherche et les objectifs. Enfin, la partie expérimentale et la méthodologie générale suivie sont présentées.

3.1. Approche conceptuelle de la biodisponibilité

Le devenir des contaminants en milieux poreux saturés dépend de leurs interactions avec la matrice géologique et avec les acteurs biologiques du milieu. À l'interface se situe la biodisponibilité environnementale, qui revêt deux aspects, caractérisés par les termes massique et toxique. La Figure 3.1 résume ce double aspect, dans le cas d'un système statique, ou en pseudo-équilibre tel un sol.

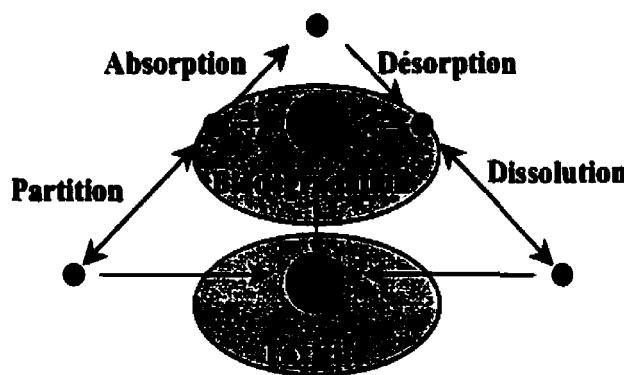


Figure 3.1: Schéma conceptuel de la biodisponibilité dans le cas d'un système statique

L'équilibre qui s'institue entre le contaminant en phase aqueuse et le contaminant adsorbé permet l'extraction du contaminant de l'eau et soit son absorption subséquente au sein de la matrice solide, soit sa biodégradation à l'interface entre les phases aqueuse et solide. En fonction des récepteurs biologiques présents, la biodisponibilité, schématisée par les ovales gris, va s'exprimer en terme de potentiel de perte de masse du contaminant (micro-organisme dégradeur) ou en potentiel de toxicité (organisme susceptible d'exprimer une toxicité quand exposé au contaminant).

Lorsque le système sus-consideré n'est plus dans un état de pseudo-équilibre, par exemple du fait de l'écoulement de l'eau souterraine, le schéma conceptuel est quelque peu différent, et représenté à la Figure 3.2.

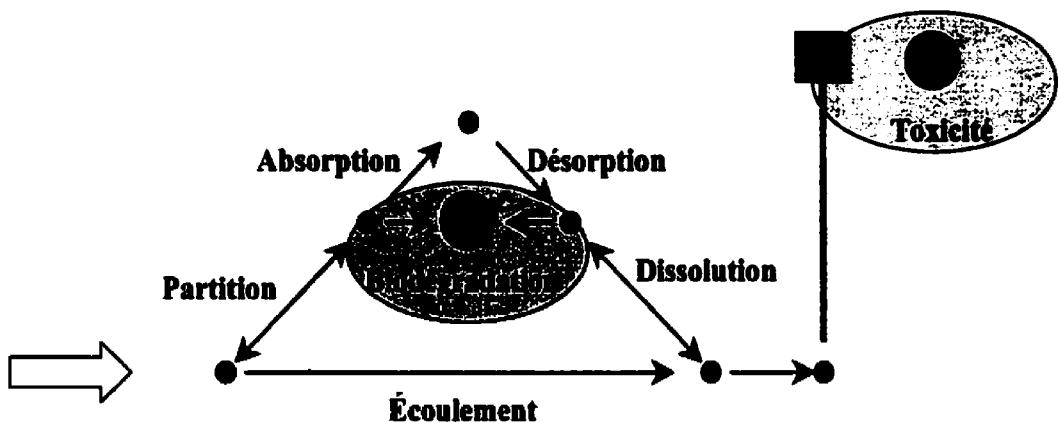


Figure 3.2: Schéma conceptuel de la biodisponibilité pour un système dynamique

Dans ce cas, l'écoulement de l'eau souterraine permet la migration facilitée du contaminant et le potentiel toxique se concentre au niveau des points de résurgence de l'eau souterraine, sachant que le milieu ne contient pas d'organismes récepteurs autres que les bactéries. Ces bactéries peuvent être responsables de la biodégradation du contaminant, principalement à l'interface des phases solide et liquide. La biodisponibilité se décline ici aussi en terme de potentiel massique et toxique, mais le facteur temps prend toute son importance et l'étude de la biodisponibilité va devoir en tenir compte.

3.2. Définition de la biodisponibilité

Basée sur cette analyse conceptuelle de la biodisponibilité qui permet de mettre en évidence son double aspect, massique et toxique, de même que l'importance du facteur temps pour son étude en système dynamique, la définition suivante est proposée. La biodisponibilité des contaminants est définie par le taux d'exposition des organismes biologiques aux contaminants. Ainsi, des taux de biodisponibilité massique et toxique sont développés pour caractériser la dynamique du système. Dans le cas d'un système statique, l'équivalent d'un système dynamique mais pour un temps d'exposition qui devient beaucoup plus grand, ces taux deviennent des ampleurs d'exposition. Dans le but d'obtenir une réponse de la part des organismes biologiques la plus proche possible de la véritable biodisponibilité environnementale, il est nécessaire d'utiliser des organismes ou systèmes biologiques les plus sensibles possibles au contaminant utilisé, afin d'éviter toute limitation intrinsèque aux organismes qui résulteraient en une mesure de la biodisponibilité pharmacologique plutôt qu'environnementale.

3.3. Hypothèse de recherche et objectifs

L'hypothèse qui sous-tend la recherche présentée dans cette thèse s'énonce comme suit: la biodisponibilité des contaminants organiques durant leur transport en milieux poreux saturés s'exprime en terme de taux de biodisponibilité massique et toxique.

L'objectif principal consiste à quantifier ces taux dans différents contextes environnementaux ainsi que leur évolution dans le temps.

Afin de remplir cet objectif, il est nécessaire de développer une méthode théorique et expérimentale de quantification de ces taux basée sur une analyse originale des courbes d'élutions (premier manuscrit), de quantifier leurs évolutions en fonction de différentes

conditions environnementales (deuxième manuscrit) et enfin d'étudier leurs évolutions en fonction du temps (troisième manuscrit).

Pour ce faire, une méthodologie générale a été développée, basée sur l'étude de courbes d'élutions obtenues en colonnes de milieux poreux saturés.

3.4. Méthodologie générale

Les contextes environnementaux sus-mentionnés ont été retenus pour leur influence connue ou supposée sur la biodisponibilité, comme l'a montrée la revue de littérature: la capacité de rétention du contaminant par le milieu, la vitesse d'écoulement de l'eau et la capacité du milieu à biodégrader le contaminant. Le but étant de démontrer expérimentalement le nouveau concept des taux de biodisponibilité, une étude modèle (matériaux artificiels, consortium bactérien pré-activé au contaminant, etc.) a été développée, afin de contrôler la majorité des paramètres en jeu.

3.4.1. Les composantes de l'étude expérimentale

Pour réaliser cette étude, les composantes suivantes ont été retenues:

- un contaminant soluble et facilement quantifiable, le PCP,
- un milieu poreux saturé composé de sable standard amendé ou non,
- un agent de rétention du contaminant: la résine Amberlite XAD-4,
- un système permettant le transport du contaminant au travers du milieu poreux saturé: le montage en colonne,
- des organismes biologiques permettant la mesure des taux de biodisponibilité: un consortium bactérien pré-acclimaté au PCP et fixé sur du

sable standard, ainsi qu'une souche bactérienne luminescente et sensible au PCP en milieu aqueux (méthode Microtox).

3.4.1.1 *Suivi du PCP*

Le pentachlorophénol est utilisé dans les expériences décrites ci-après, seul, dissous dans le milieu salin minéral (MSM). La méthode de suivi indirecte du PCP dans l'effluent de la colonne consiste en une mesure de l'absorbance en ultra-violet à 319 nm. Cette longueur d'onde a été déterminée par séparation du PCP du MSM en HPLC (*High performance liquid chromatography*) et détection par balayage du spectre complet. Une figure de ce spectre est présentée en annexe. Bien que le pic principal se situe à 210 nm, le PCP est détecté, lorsqu'il est dissous sous forme de pentachlorophénolate dans le MSM à pH 7,15, à 319 nm (voir spectre du PCP en UV en annexe). Ceci permet d'éviter les interférences souvent rencontrées à 210 nm et dues à la présence de composés aromatiques provenant soit de la biodégradation incomplète du PCP, soit de la matière organique dans la colonne, soit de produits microbiens solubles. La méthode de séparation et détection du PCP par HPLC est décrite en annexe (protocole G12). Les différentes étapes de quantification de l'absorbance sont décrites au protocole 7B en annexe.

3.4.1.2 *Le milieu poreux saturé: sable standard et résine*

Le sable utilisé est standard, nettoyé de toute matière organique et de granulométrie uniforme. Le diamètre moyen des grains est de 250µm. Au cours des différentes expériences, le sable est soit utilisé seul, soit amendé de résine. La résine Amberlite XAD-4 est non-ionique et spécifique aux phénols en milieu aqueux, c'est la raison pour laquelle elle a été choisie. En effet, l'ajout contrôlé de résine dans le système permet de retenir plus ou moins de PCP et permet d'éviter les problèmes rencontrés lors de l'utilisation de matériaux d'aquifères naturels contenant plus ou moins de matière organique. Un des avantages de cette résine, outre sa capacité d'extraction des phénols

et donc du PCP de la phase aqueuse, réside dans sa structure physique.. En effet, elle se trouve sous forme de billes d'environ 300µm de diamètre, permettant un mélange intéressant avec le sable. De plus, son caractère poreux présente deux atouts supplémentaires: une surface d'échange très importante ($725 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) et une taille de pores de 50Å, suffisamment petite pour permettre la diffusion du contaminant sans permettre celle des micro-organismes. Des résines équivalentes ont déjà été utilisées dans des études de biodisponibilité en batch (Guerin et Boyd, 1997). Les résultats en terme de coefficient de partage (K_P) sont très élevés, par exemple le K_P (naphtalène / XAD-2) vaut 5870 L.kg⁻¹. Ceci permet l'utilisation de peu de résine pour atteindre des coefficients de partage du milieu poreux permettant l'obtention de courbes d'élution qui impliquent tout de même un retard suffisant. L'ajout de différentes quantités de résine au sable permettra de faire varier la capacité de rétention du milieu envers le contaminant.

3.4.1.3 Les organismes biologiques de mesure de la biodisponibilité

Comme indiqué plus haut, les organismes sondeurs de la biodisponibilité environnementale se doivent d'être, comme toute sonde biologique, sensibles au contaminant. Dans cette optique, le consortium de micro-organismes dégradeurs choisi a été extrait d'un sol contaminé au PCP (Bécaert *et al.*, 1999). Par la suite, cette biomasse a été stimulée au PCP en bioréacteur agité et aéré, par ajout séquentiel de PCP en phase aqueuse (Bécaert *et al.*, 1999). Enfin, du sable standard a été ajouté à la phase aqueuse seule et une autre étape de bioactivation a été effectuée afin de bénéficier d'un sable bioactif, sur lequel se sera fixée une partie de la biomasse totale (voir protocole 7A en annexe).

Concernant les mesures de toxicité, certaines limitations intrinsèques aux biotests généralement utilisées ont dû être prises en compte. En effet, beaucoup de tests développés dans le domaine de l'écotoxicologie requièrent de grandes quantités de milieu (solide ou liquide) afin de réaliser les essais. Le but recherché dans les

expériences ci-présentées consiste à créer des courbes d'élutions de contaminant au travers du milieu poreux saturé, mais aussi, des courbes d'élutions de la toxicité associée. Afin d'obtenir plusieurs points sur la courbe d'élution toxique, il était nécessaire d'utiliser un test requérant de faibles quantités (quelques millilitres) en sortie de colonne et suffisamment sensible au PCP. La méthode Microtox présente ces deux avantages et permet la réalisation des bioessais relativement rapidement après la collecte des échantillons (voir protocole 7E en annexe). De plus, cette bactérie marine, *Vibrio fisheri*, utilisée dans la méthode Microtox est très sensible au PCP en phase aqueuse (Knoke *et al.*, 1999; Cassels *et al.*, 2000).

3.4.1.4 *Le système de transport: le montage en colonne*

Le milieu poreux décrit ci-dessus est placé dans des colonnes de pré-chromatographie composé uniquement de téflon et de verre Kimax (voir protocole 7B en annexe). Le tout est saturé de milieu salin minéral (MSM, (Greer et Shelton, 1992)), tamponné à un pH de 7,15. L'écoulement du contaminant, dissout dans le MSM, au travers de la colonne est induit par une pompe péristaltique qui permet de maintenir un débit constant et de le faire varier d'un essai à l'autre. Tous les conduits liant la pompe à la colonne sont composés de téflon. La Figure 3.3 shématise le montage expérimental au centre duquel se retrouve la colonne. Les échantillons de phase aqueuse (7 mL) sont récupérés en sortie de colonne et analysés pour la concentration de PCP par spectrophotométrie UV à 319 nm et pour la toxicité mesurée par la méthode Microtox. Les courbes d'élutions massique et toxique sont ainsi générées, à partir d'élutions en échelon de PCP en entrée de colonne.

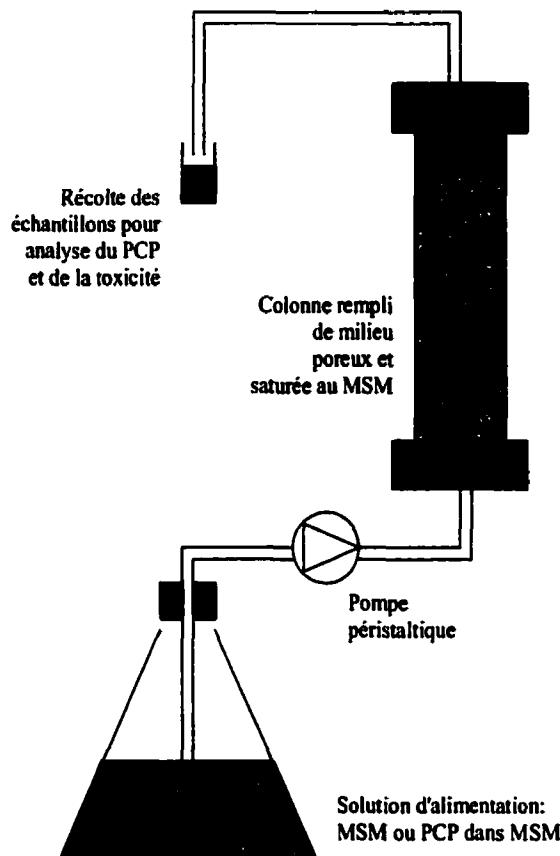


Figure 3.3: Shéma du montage expérimental

3.4.2. Modélisation des courbes d'élution massique

Les courbes d'élutions massiques obtenues à l'aide de ce dispositif expérimental ont été modélisées, et les paramètres du modèle ont été identifiés pour chaque expérience afin de pouvoir observer le lien entre ces paramètres, qui représentent les mécanismes régissant le devenir du contaminant, et les taux de biodisponibilités. Le modèle utilisé, intitulé modèle à double compartiment, a été préalablement développé par Angley et ses collaborateurs (Angley *et al.*, 1992) et est représenté de manière conceptuelle par le schéma de la Figure 3.4.

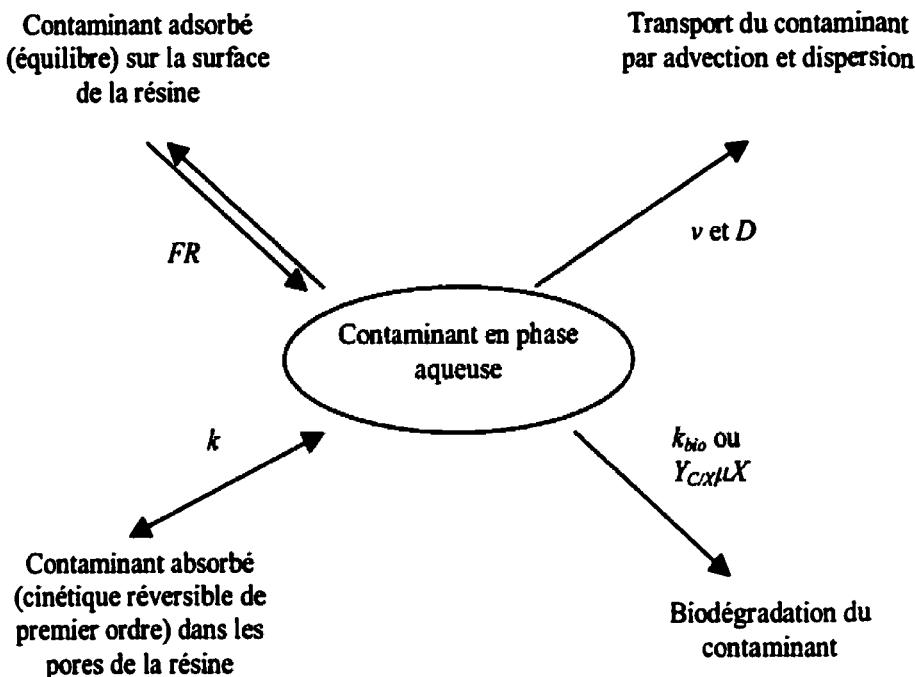


Figure 3.4: Schéma conceptuel du modèle utilisé pour les courbes d'élutions massiques

Le contaminant présent en phase aqueuse peut donc s'adsorber sous la forme d'un équilibre d'adsorption, régit par le facteur retard, R (version adimensionnelle du coefficient de distribution, K_D , en $\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$), ou s'absorber dans le second compartiment, ici les pores de la résine, selon une cinétique réversible d'ordre 1, caractérisée par la constante d'ordre 1 d'absorption, k , en s^{-1} . Toujours en phase aqueuse, le contaminant migre du fait de l'écoulement de l'eau, décrit par les mécanismes d'advection (vitesse réelle des particules d'eau, v , en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$) et de dispersion (coefficient de dispersion, D , en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Enfin, le contaminant peut être biodégradé par les micro-organismes présents sur le sable, à l'interface avec la phase aqueuse. Cette bioréaction peut être modélisée par une cinétique de premier ordre (utilisé dans le manuscrit 2 avec une constante de biodégradation de premier ordre, k_{bio} , en s^{-1}) ou par une cinétique de biodégradation liée à la croissance bactérienne (utilisé dans le manuscrit 3). Dans ce dernier cas, le taux de

croissance (μ , en s^{-1}) est pris en considération ainsi que le rendement en biomasse (Y_X en $mg\cdot mg^{-1}$) et la population bactérienne (X en $mg\cdot L^{-1}$).

Les équations différentielles partielles qui découlent de cette approche conceptuelle sont présentées dans les manuscrits 2 et 3.

3.5. Limites techniques de la méthode

La première limite technique de la méthode réside dans l'utilisation de sable inoculé et donc dans la présence des microorganismes sur les particules de sable. Cette caractéristique ne permet pas de prendre en considération le transport bactérien, et la possible augmentation du transport des contaminants par l'intermédiaire des microorganismes. Néanmoins, le suivi de la toxicité dans l'effluent permet, indirectement, de palier à cette limite et une augmentation de la toxicité due soit au contaminant, soit aux microorganismes pourrait y être détectée. Le caractère fixe des microorganismes a été vérifié par analyse des protéines contenues dans l'effluent (les seules sources de protéines étant les microorganismes) en utilisant la méthode micro-BCA (protocole 7C en annexe). Après inoculation du sable, l'effluent n'a jamais contenu plus de protéines que la limite de détection de la méthode, c'est à dire 0,5 $\mu g/mL$. Enfin, la fixation des bactéries doit être prise en compte lors de la modélisation du transport des contaminants et ceci a été effectué en posant l'hypothèse que les microorganismes se retrouvent dans la fraction d'eau immobile, retrouvée à la surface des particules de sable.

Une seconde limite technique de la méthode réside dans les différentes cinétiques en jeu. En effet, afin d'obtenir des courbes d'élution de contaminant qui permettent le calcul des taux de biodisponibilités intéressants, il est indispensable que ce dernier ne soit pas dégradé trop rapidement par rapport à l'écoulement, qu'il ne soit pas non plus trop retenu par la résine par rapport à l'écoulement. Ainsi, le domaine de validité de l'étude

diminue en fonction de ces considérations. Un écoulement trop rapide, par exemple dans les rocs fracturés, ou trop lent, par exemple dans les argiles ne permettront sans doute pas de générer des courbes d'élution utilisables.

La méthode de suivi du PCP, par spectrophotométrie, constitue aussi une limitation technique, étant donné la limite de détection associée à cette méthode et mesurée dans le cas du PCP sur du sable inoculé à 0,5 mg/L du fait des interférences générées par le milieu. Cette limite de détection diminue à 0,1 mg/L. Cette limite est supérieure aux concentrations rencontrées fréquemment au niveau des eaux souterraines contaminées au PCP, mais, pour l'étude modèle considérée dans cette thèse, la méthode suffit. Dans le cas où une précision plus grande est requise, la méthode de suivi par HPLC est conseillée.

3.6. Présentation des articles

Le premier manuscrit, qui suit ce présent chapitre, présente le développement de la méthode d'analyse des courbes d'élutions massique et toxique qui permet l'estimation des taux de biodisponibilités massique et toxique et s'intitule : «Development of a method to estimate the mass and toxic bioavailabilities of organic contaminants in dynamic systems». En date du 1^{er} septembre 2000, il est acceptable après révisions dans une publication technique spéciale de l'ASTM : *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Science, Policy, and Standardization – Implications for Environmental Decisions: Tenth Volume, ASTM STP 1403*, B. M. Greenberg, R. N. Hull, M. H. Roberts, Jr., and R. W. Gensemer, Eds., American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, 2001.

Le second manuscrit approfondit la quantification des taux de biodisponibilités avec l'introduction de la modélisation des courbes d'élution et une gamme plus complète d'étude. Il s'intitule : *Quantifying mass and toxic bioavailability rates of*

pentachlorophenol during transport through saturated porous media. Il a été soumis, en juillet 2000, à la revue : Environmental Science and Technology.

Enfin, le dernier manuscrit étudie l'évolution temporelle des taux de biodisponibilités. Il s'intitule : Effect of Biomass growth on the mass and toxic bioavailability rates of pentachlorophenol during continuous transport through saturated porous media. Il a été expédié, en septembre 2000, à la revue Environmental Science and Technology.

4. PREMIER MANUSCRIT: DEVELOPMENT OF A METHOD TO ESTIMATE THE MASS AND TOXIC BIOAVAILABILITIES OF PENTACHLOROPHENOL DURING ITS TRANSPORT THROUGH SATURATED POROUS MEDIA

4.1. Abstract

Bioavailability of organic contaminants in soil has recently been a focus of interest but a lack of knowledge of its behavior during contaminant transport through saturated porous media, such as aquifers, is observed. This research presents a method, based on a generally accepted definition of bioavailability, that quantifies mass and toxic bioavailabilities of organic contaminants during their transport in terms of bioavailability rates. Elutions of pentachlorophenol (PCP) were performed using inoculated laboratory columns at two different pore-water velocity and on two different media. Both PCP and the toxic response (Microtox) were monitored at the exit of the columns for quantification of the rates. Results show that the non-dimensional mass bioavailability rate decreased with increasing pore-water velocity (from 0.52 to 0.15) and with increasing retention (from 0.15 to 0.02). The non-dimensional toxic bioavailability rate decreased with increasing retention (from 0.59 to 0.22). Results indicate that this method shows a potential for quantifying contaminant bioavailability according to both outcomes: biodegradation and toxicity.

4.2. Introduction

Bioavailability of contaminants in the environment has become a topic of interest in the last few years (Baveye *et al.*, 1999), in two different fields of research.

Environmental engineers who are using biotechnology to remediate contaminated sites are often faced with limitations to contaminant biodegradation. Recent developments have shown that these limitations were mainly due to the sorption phenomena between the contaminant and the subsurface matrix (Weber Jr *et al.*, 1991). More precisely, slow sorption of the contaminant within the micropores of the natural particles are supposed to be the main mechanism limiting microbial degradation of the pollutant (Nam et Alexander, 1998). Secondly, environmental toxicologists have been focusing on contaminant bioavailability to superior organisms. They found that similar mechanisms are limiting contaminant bioavailability, mostly its sorption on sediments or soil organic matter (Hamelink *et al.*, 1994, Standley, 1997). An important aspect to be underlined in both approaches is that bioavailability is organism-dependent. Two different microorganisms, both degrading a specific contaminant, will lead to two different evaluations of the bioavailable fraction (Guerin and Boyd 1992). The same result was observed with superior organisms (Davies *et al.* 1999).

These two approaches to determine contaminant bioavailability in the environment have been brought together with the emergence of the risk-based approach to site remediation. In this approach, the knowledge and understanding of contaminant fate and transport, hence bioavailability, is required as well as the assessment of the result of the exposure between the contaminant and a targeted organism. The notion of risk is now directly associated with the contaminant bioavailability (Alexander 1995, Kelsey and Alexander 1997). However, differences in the definition of bioavailability tend to bring difficulties in the application of the concept and mostly in quantifying bioavailability.

4.2.1. Definitions of Bioavailability

The fact that bioavailability is organism-dependent makes it difficult to define. From the chemistry point of view, the knowledge of contaminant partitioning is sufficient to assess bioavailability, which is in fact a chemical availability. From the biology point of

view, bioavailability should include the contaminant uptake as well as the activity of all the metabolic enzymes (Baveye and Bladon 1999), which is pharmacological bioavailability. A general definition of the contaminant bioavailable fraction is usually given as the fraction found in the aqueous phase (Cuypers et al. 1999). This definition appears to be limiting when assessing bioavailability to superior organisms like earthworms and when assessing the bioavailability of very hydrophobic and almost non-soluble molecules like hexadecane, which is easily biodegradable in a soil. A refined definition would be the uptake flux of contaminant by the target organism (Baveye and Bladon 1999). Despite the fact that the uptake flux is not easily measured and quantified, this definition is very interesting because it introduces the concept of time in bioavailability which seems to be a key factor in the overall process. A more general definition of bioavailability was proposed by Hrudey et al. (1996) as the extent of organism exposure to the contaminant. The notion of exposure links the two approaches that were presented earlier in their common interest in the contaminant fate and transport. But, this definition is faced with a quantification problem.

4.2.2. Quantification of Bioavailability

The main method used to quantify bioavailability is based on the concentration of the contaminant in the aqueous phase. Such a concentration may be predicted from the knowledge of the contaminant partition coefficient (K_p) between water and a certain type of subsurface material. This partition coefficient is usually estimated between water and subsurface organic matter (K_{ow}). This thermodynamic datum gives an approximation of the equilibrium state that can be reached by the contaminant between the two phases. Another set of methods has been developed that are based on a relationship between the contaminant extractability and its uptake by organisms. Supercritical fluid extraction was carried out by Loibner et al. (1999) at two different levels, and the ratio of the amount obtained in the two cases was correlated with biodegradation and ecotoxicity measured on the samples. The same development of

chemical assays to assess bioavailability was done by Kelsey et al. (1997), but, this time, using organic solvents. These tests have shown good results for correlating biological responses and chemical extractability but it is not clear how such correlations may be used in different situations (contaminants and media) and with different biological receptors. Based on this instantaneous quantification approach, probes are being developed, either chemically based or even biologically based. Reversed-phase chromatography (C-18 probes) was used to model biopartitioning processes, mostly bioaccumulation (Hsieh and Dorsey 1995, van Loon et al. 1996). Whole-cell living biosensors are being developed to directly assess bioavailability of pollutants to degrading-microorganisms (Jaspers et al. 1999, Ripp et al. 2000). Bioconcentration or bioaccumulation are also usually used to assess bioavailability in terms of environmental toxicity (Morrison et al. 2000).

However, it is now clear that slow sorption mechanisms, driven by kinetic data, are responsible for the non-equilibrium partition observed between the contaminant in the aqueous phase and the solid phase (Pignatello and Xing 1996). Thus, bioavailability to any organism is regulated partly by these sorption-related mass transfer (Zhang et al. 1998). Bioavailability tends to be quantified by a ratio between the kinetics that appear to be the limiting factors to bioavailability: mass transfer of the contaminant to the cell and microbially-catalysed transformation of the contaminant. In non-dynamic systems or in systems where hydrodynamics are negligible, the bioavailability factor or number has been developed as the ratio of the biodegradation kinetic to the slow sorption kinetic (Chung et al. 1993, Bosma et al. 1997, Zhang et al. 1998). This effort in modeling bioavailability is based on a chemical engineering approach characterized by the use of the Thiele modulus, expressed as the ratio of two kinetics limiting a system (Ramaswami and Luthy 1997). This kinetic aspect of bioavailability has also been applied to the environmental toxicology side of the problem (Landrum et al. 1994). The authors proposed to quantify environmental bioavailability as the ratio of the contaminant uptake clearance to the encounter rate.

These kinetic approaches to bioavailability have not yet been applied to dynamic systems, such as groundwater, where hydrodynamic is not negligible. The research presented in this paper proposes a quantification method applicable to bioavailability of organic contaminants during their transport through saturated porous media, based on a generally accepted definition of environmental bioavailability.

4.3. Method Development

From what was described above, a general definition of bioavailability must be applicable to the two aspects of environmental bioavailability (biodegradation and ecotoxicity) and should also address the kinetical aspect of it. Such a definition, based on the one proposed by Hrudey et al. (1996) states bioavailability, not as the extent of exposure, but as the rate of exposure of an organism to the contaminant (Dudal et al. 1999a). When the organism is a contaminant-degrading microorganism, the response is an actual decrease in the contaminant mass over time: this is mass bioavailability. When the organism exposure to the contaminant leads to a toxic response, it is toxic bioavailability. Bioavailability is thus expressed in terms of a rate of exposure, but depending on the receptor, will be quantified as a rate of mass or toxic bioavailability. The definition given here takes into account the kinetic aspect of bioavailability and links the concept of rate to bioavailability. Hence, mass and toxic bioavailability rates are introduced.

When assessing contaminant fate and transport, dynamic studies are often carried out either on site or at the lab-scale, using flow-through columns. Contaminant is eluted through the columns at a certain concentration and monitored at the exit of the column. The results from such studies are contaminant breakthrough curves (BTC), which are helpful to understand the different mechanisms responsible for the shape of the curve. Hydrodynamic phenomena such as contaminant dispersion and advection, physico-chemical phenomena such as contaminant retardation and diffusion in pores and biological phenomena such as biodegradation or bioaccumulation all have a direct

impact on the breakthrough curves. In an attempt for an integrative analysis, two observations can be made on a BTC. First, there is its horizontal extent, integrating dispersion, advection and retardation as well as slow sorption mechanisms. The more outspread the curve is, the more retained the contaminant is and the slower it passes through the column. The horizontal extent can thus be seen as the residence time distribution of the contaminant in the column. Secondly, biological mechanisms such as biodegradation or bioaccumulation will act on the vertical extent of a BTC. The more biodegradation occurs within the section, more flat the curve will be. In order to translate mathematically these observations, two parameters are set up. The first parameter, extensively used in pharmacokinetic studies is the area under the curve (AUC), qualified as a robust parameter, for its good independance from experimental variations (Ritschel 1988). The AUC is directly linked to the vertical extent of a breakthrough curve. In the case of a contaminant eluting through a section of an aquifer or a column, the area under the curve obtained represents the fraction of contaminant that was able to migrate through the column without being biodegraded, thus without showing any mass bioavailability, whatever residence-time distribution was observed. The uneluted fraction of what was injected at the entrance of the section represents the mass bioavailable fraction of contaminant. The second mathematical parameter, describing the residence time distribution has to take into account the overall curve, not only the average distribution, in order to cope with asymmetric curves generated by slow sorption mechanisms. Thus, this parameter is set as the product of the average residence time with the variance of the residence time distribution.

The rate of biological exposure to the contaminant, defined as bioavailability, can then be quantified using these two parameters. As the uneluted fraction (1-AUC) is biodegraded during the overall time taken by the contaminant to pass through the section, the mass bioavailability rate is quantified as the ratio of the amount that was biodegraded to the time it took to biodegrade it, according to Equation 4.1.

$$\tau_{massBioA} = \frac{1 - AUC_{mass}}{\bar{t}_{mass} \sigma_{mass}^2} \quad (4.1)$$

where

AUC_{mas} = area under the contaminant breakthrough curve

t_{mas} = average of the contaminant residence-time distribution

σ^2_{mas} = variance of contaminant residence-time distribution.

The amount of contaminant that was able to migrate through the column could also be considered to be bioavailable. Indeed, if a superior organism is exposed to this effluent, it may lead to the expression of toxicity. Hence, on top of monitoring the mass of contaminant, a second breakthrough curve is built up by monitoring the toxic response of an organism placed at the exit of the column, imitating a groundwater resurgence at a well, lake or river. A toxic breakthrough curve is generated and the area under such curve is calculated leading to AUC_{tox} . The same quantification can be done to obtain the toxic bioavailability rate according to Equation 4.2.

$$\tau_{toxBioA} = \frac{AUC_{tox}}{\bar{t}_{tox} \sigma_{tox}^2} \quad (4.2)$$

where

AUC_{tox} = area under the toxicity breakthrough curve

t_{tox} = average of the toxicity residence-time distribution

σ^2_{tox} = variance of toxicity residence-time distribution.

The use of the product of the average time to the variance allows all the measured values of the distribution to be taken into account, differentiating two curves, similar in their average distribution time but exhibiting a very different range of values. This product is a better representative of the time of exposure between the contaminant and the biological receptor than the average residence time alone.

The actual values of the mass and toxic bioavailability rates may not be very easy to analyse. Hence, a non-dimensional version of these rates can be obtained by reporting them to extreme scenarios. For the mass rate, the best-case scenario is given when all of the contaminant is biodegraded within the section leading to an AUC_{mass} equal to 0 and when no retardation is observed (contaminant behaves like a non-reactive tracer through standard sand). This leads to the maximum mass bioavailability rate. The ratio between the mass bioavailability rate and its maximum value gives a non-dimensional mass bioavailability number, ranging from 0 to 1. The same process is carried out on the toxic bioavailability rate, this time to the worst-case scenario, where all of the contaminant is eluted through the section with no retention in the section (equivalent to an elution through standard sand). A non-dimensional toxic bioavailability number is thus obtained. The same reference medium is used (standard sand) allowing comparison between different data sets. Therefore, an experimental study at lab-scale was carried out to show how this method can be applied to different scenarios of contaminant fate and transport and to show the sensitivity of the method to changes in either retention capacity of the medium or in hydrodynamics.

4.4. Materials and Methods

Three columns were used in this study. Column 1 was a standard sand column on which the PCP elution was performed at 1 mL/min, Column 2 was a 0.2% resin-amended standard sand column used at the same flow rate and Column 3 was like Column 1 but the PCP elution was performed at half the flow rate, 0.5 mL/min. On each column, three elutions were performed: a non-reactive tracer test, an abiotic elution (NaPCP in the absence of microorganisms) and a biotic elution, after inoculation with PCP-degrading microorganisms. Step elutions of contaminant were performed, but the analysis, according to Equations 1 and 2, was carried out on the derivatives of the BTC, thus on the equivalent of a pulse elution. However, it is difficult, and often technically impossible to perform a true pulse elution on a column. Performing a step elution,

leading to a stable response, solves this difficulty. The derivative of this BTC is then computed and the mathematical analysis presented in equations 1 and 2 can be performed on this response, corresponding to an artificial pulse elution (Levenspiel, 1972). The integral of this derivative, the area under the curve, gives the fraction of contaminant that migrated through the column, while the primitive of this derivative would lead back to the step elution response. This extra mathematical step greatly enhances the accuracy of the method by allowing the analysis of a robust experimental response.

4.4.1. Production of PCP-Degrading Microorganisms

PCP-degrading microorganisms (coming from a sample of a PCP-contaminated soil) were grown by sequential addition of 90 % pure NaPCP (Omega Inc., Lévis, QC) in a fed-batch slurry bioreactor, using a mineral salt medium (MSM) at pH 7.15 (Greer et al. 1990). The aqueous phase from this slurry was then filtered through an 8 μ m Whatman (Millipore, Bedford, MA) filter paper. The remaining bacterial suspension was then bioactivated to obtain a richer suspension. This process was carried out in an aerated (5 L/min) amber glass jar (4 L) by sequential spikes of NaPCP at concentrations increasing from 5 to 25 mg/L. A higher concentration spike of NaPCP was added when the remaining concentration was less than 1 mg/L. In order to monitor NaPCP concentration in the suspension, 4mL-samples were taken daily, filtered through a 0.25 μ m filter, and analyzed in the UV-spectrophotometer at 319 nm.

4.4.2. Study Columns

The columns used for all the experiments were pre-chromatography ChromaflexTM columns (Kontes, Vineland, NJ), made of KimaxTM borosilicate glass and polytetrafluoroethylene (PTFE). The columns were 15cm long with a 4.8cm inside

diameter. Both ends included a 20 μm PTFE filter as well as a PTFE grid for bed support and accurate flow distribution. Model solids used for column packing consisted of standard Ottawa sand (Anachemia, Montreal, QC) and Amberlite XAD-4 resin (Sigma, St Louis, MO). This resin was used to accurately control the retention capacity and kinetics of the medium for the theoretical development of bioavailability quantification. PCP is very soluble at the pH of the experiments (7.15) and its hydrophobicity is thus reduced. The resin will specifically retain hydrophobic molecules from aqueous media. Its pore size is between 20 to 60 mesh with a specific area of 715 m^2/g and an average inside pore diameters of 50 \AA . 400 g of dry sand were solely used in Column 1 and 3, while 399 g were mixed with 1 g of resin prior to packing in Column 2, making it a 0.25 % of retentive matter column.

4.4.3. Column Hydrodynamics

The columns were packed with their composition of model solids and then saturated with MSM. Different masses were measured on each column: empty column, column with dry material, column filled with MSM and saturated column. Simple calculations performed on these masses allowed the estimation of the column saturation, the pore volume and the porosity. Pore water velocity, v , was fixed at 2.3×10^{-3} cm/s. The hydrodynamic elution was a step tracer test using $^3\text{H-H}_2\text{O}$ (25 mCi/g, Sigma, St Louis, MO) based MSM at a continuous inflow of 10 000 dpm. Fractions were collected at the exit of the column and counts per minute were monitored using a liquid scintillation counter (Wallac 1409). The test was carried out until the counts at the exit of the column were equal to the ones for the inflow.

4.4.4. Abiotic Breakthroughs

Abiotic breakthroughs were carried out and consisted of step elutions of PCP (continuous inflow of PCP at 25 mg/L in MSM) in the absence of PCP-degrading

microorganisms. Fractions were collected at the exit of the columns and, after filtration at 0.45µm (Millipore, Bedford, MA), the contaminant concentration was monitored by UV spectrophotometry at 319 nm. Abiotic breakthroughs were performed on Columns 1 and 2. As Columns 1 and 3 consisted of the same medium, their abiotic profiles were identical.

4.4.5. Biotic Breakthroughs

The same protocol as for the abiotic experiments (step elution of 25 mg/L PCP solution and monitoring of PCP) was used for the biotic elutions, but this time, the columns were inoculated with the PCP-degrading microorganisms prior to the elution. This was carried out by recirculating the suspension during 20 pore volumes (PV) followed by a flush during 2 PV to wash non-fixed cells (Herman et al. 1997). The biomass was monitored at the exit of the column during the flush by protein analysis using the micro-BCA (bicinchoninic acid) method (Pierce Chemicals, Rockford, IL). For this purpose, samples were centrifuged (13000 rpm for 10 minutes) and the deposit was washed with MSM in order to avoid interference between the reagent and PCP. After a second centrifugation, bacteria were lysed by using a 1%-triton (Union Carbide, Danbury, CT) solution, which is compatible with the reagent.

4.4.6. Toxicity Measurement

Toxicity of elution samples was assessed by using the Microtox® test (Azur Environmental, Carlsbad, CA). This test uses a bioluminescent marine bacterium (*Vibrio fisheri*) and measures the inhibition to luminescence caused by the presence of contaminant in the sample. Results are collected in terms of the logarithm of the EC10, expressed in percent of the sample that causes a 10% decrease of the bioluminescence. The minimum value is 100% leading to a non-dimensional toxicity (log EC10) of 2.

4.5. Results

Results are presented for the three columns in terms of contaminant fate and transport as well as toxicity elutions. Bioavailability is finally quantified according to the method presented above.

4.5.1. Pentachlorophenol Fate and Transport in the Columns

4.5.1.1 *Hydrodynamics*

The three columns were hydrodynamically similar, showing a porosity of 0.4, typical of sand columns. All experiments were performed with a saturation of 98±1%. The hydraulic conductivity was fixed with the flow rate and was calculated according to the porosity at a value of 2.3×10^{-3} cm/s for Columns 1 and 2 and 1.15×10^{-3} cm/s for Column 3. Pore volumes were 110 ± 2 mL. The symmetry of the tracer test response (results not shown) showed that neither flow-bypass nor dead volumes were observable. This implies that dissolved oxygen and nutrients were uniformly fed to the columns.

4.5.1.2 *Abiotic Controls*

Elutions of PCP in the absence of any degrading microorganisms were carried out to investigate PCP sorptive behavior towards the matrices. Figure 1 shows that no retardation was found when PCP was eluted through standard sand (Columns 1 and 3). The abiotic responses of these two columns are identical in the non-dimensional forms, as represented in Figure 1. Partitions as well as rate-limited sorption were observed when resin was added to the sand (Column 2).

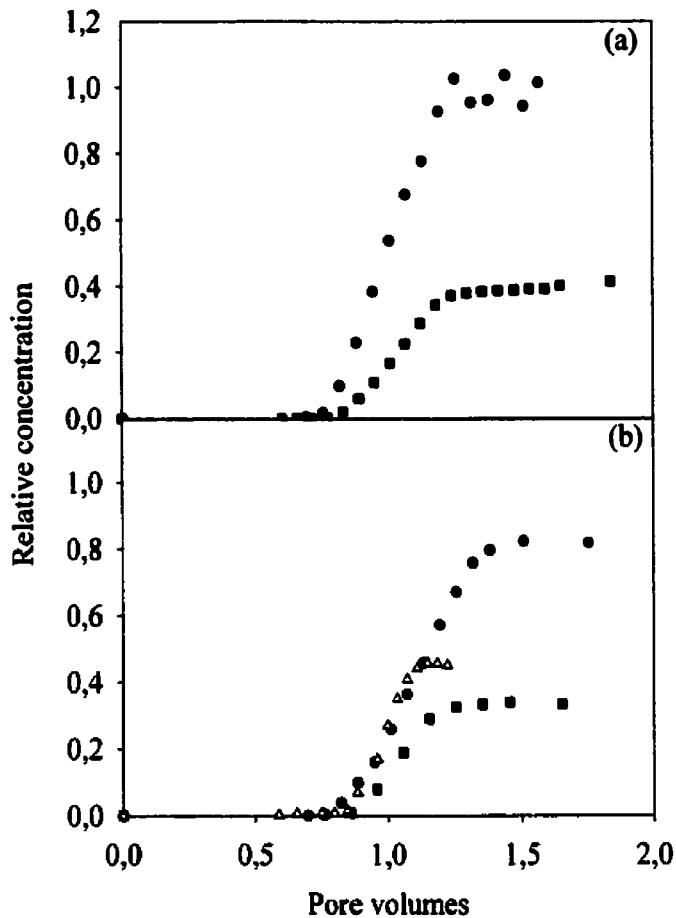


Figure 4.1: Abiotic and biotic breakthroughs for the three columns: column 1 and 3 (standard sand, 1 and $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) and column 2 (w./ resin, 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

a) (●) column 1 and 3 (■) column 2 and b) (●) column 1 (■) column 2 (△) column 3.

This resulted in a broken elution curve, with a first part similar in shape to the non-retarded curve and a second part that was linear and controlled by the rate-limited sorption (diffusion). Such a sorptive behavior is understandable when looking at the

structure of the resin. Indeed, its surface area is quite large ($715 \text{ m}^2/\text{g}$) and the size of its pores (50\AA) allows slow diffusion of the contaminant.

4.5.1.3 *Biotic Breakthroughs*

Results from PCP elutions after column inoculation with specific microorganisms are presented in Figure 1. No biomass was detected at the exit of the columns during the flush performed before the PCP elution. Both Columns 1 and 3 showed significant biodegradation: approximately 18% of PCP was degraded in column 1 while almost 55% of initial PCP was degraded in Column 3. This is a direct result of the competition between the two kinetics involved in these columns: biodegradation and hydraulic conductivity. In Column 2, little biodegradation was measured (the difference between the abiotic control and the biotic elution, 5 %) showing that microorganisms' access to the contaminant was limited by the presence of the resin. Here again, this result may be seen as a kinetic competition between biodegradation and rate-limited sorption.

4.5.2. Toxicity Elutions

Figure 4.2 presents the toxicity elution curves obtained for Columns 1 and 2. Toxicity responses to PCP elutions reveal that toxic pattern is closely related to the mass pattern for both columns. The lower the toxic breakthrough curve is, the higher the toxicity, because a smaller fraction of the sample is needed to reach 10% of decrease in the bioluminescence. For Column 1, despite the observed biodegradation, the toxicity reaches the maximum value (the one measured for the influent solution), while the retention action of the resin, limits the outcome in concentration as well as in toxicity, which stabilizes after 1.4 pore volumes.

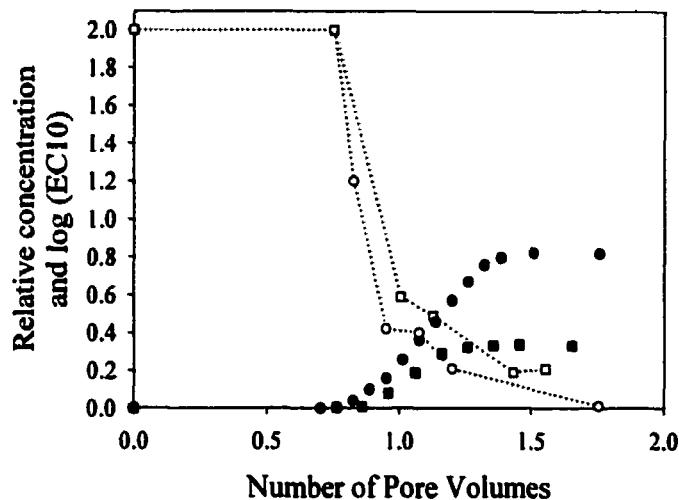


Figure 2 – Toxicity response to PCP elutions for Columns 1 and 2.

(●) Column 1, mass, (··○··) Column 1, toxic, (■) Column 2, mass, (··■··) Column 2, toxic

4.5.3. Quantification of Bioavailability Rates

From these biotic mass and toxic breakthroughs, derivatives are calculated and plotted, as non-dimensional breakthrough rates (per Pore Volume, Vp^{-1}) to allow calculation of the areas under the curves, according to Figure 4.3. The described steps are performed for the three columns and mass and toxic bioavailability rates are drawn from these calculations. These rates are then compared to the best or worst-case scenarios, in order to obtain non-dimensional bioavailability numbers, as explained in the method development section. The numbers are found in Table 4.1. In order to calculate the toxic bioavailability in column 2, results from the PCP and toxicity elutions for this column were linearly extrapolated to obtain the area under the curve. This extrapolation was motivated by the fact that PCP elution in the second phase of the curve is controlled by rate-limited sorption, exhibiting linear outflow of contaminant.

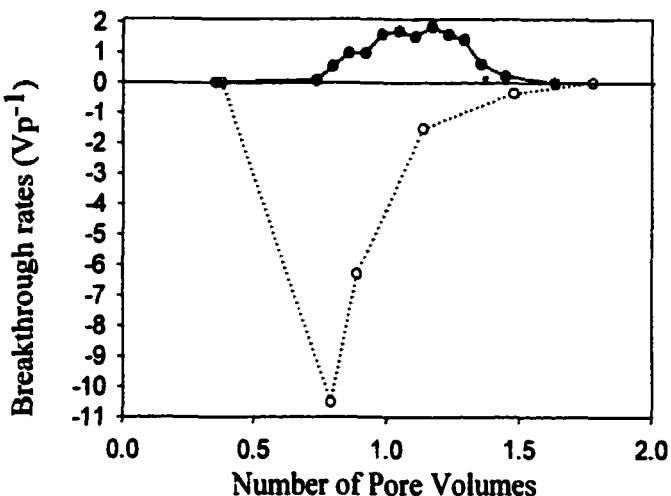


Figure 4.2 : Mass and toxic elution derivatives for Column 1.
 (-•-) mass and (··o··) toxic

Table 4-1 : Summary of bioavailability numbers.

	Column 1 (sand, 1mL/min)	Column 2 (w/ resin, 1mL/min)	Column 3 (sand, 0.5 mL/min)
massBioA	0.15	0.02	0.52
toxBioA	0.59	0.22	N.A.

Overall results show a great influence of a decrease in the pore-water velocity on mass bioavailability (from 0.15 to 0.52 for Columns 1 and 3, respectively). Contaminant retention by the medium led to a sharp decrease in mass bioavailability (from 0.15 to 0.02 for Columns 1 and 2, respectively) as well as for the toxic bioavailability (from 0.57 to 0.22 for Columns 1 and 2, respectively).

4.6. Discussion

Results obtained in terms of mass bioavailability (Table 1) show the two different kinetic competitions previously mentioned. If Column 1 is set as the standard, it is clear that a decrease in the flow rate favors biodegradation and thus mass bioavailability (from 0.15 to 0.52). Such a phenomenon was already observed (Angley et al. 1992) but has never been quantified in terms of bioavailability. Inversely, when resin is added to standard sand, mass bioavailability of the contaminant sharply decreases (from 0.15 to 0.02). Such a result is in total agreement to general studies of bioavailability showing that sorption of the contaminant leads to a decrease in biodegradation. These two kinetic competitions have been described previously by a set of non-dimensional numbers: the Damkohler numbers (Ramaswami and Luthy 1997). The knowledge of kinetic parameters can lead to the calculation of these numbers allowing to know what kinetic was limiting the overall process, hence bioavailability. In a similar manner, Chung et al. (1993) used a Thiele modulus as a non-dimensional number. Unfortunately, for those methods, no link was created between the numbers and the actual bioavailability. Bosma et al. (1997) created a bioavailability number (B_n), defined as the ratio between intraparticle diffusion and biodegradation rate and then quantified bioavailability from the knowledge of the kinetic parameters. Their B_n is in fact the equivalent of the mass bioavailability of this research, but estimated for static systems. The method described here quantifies mass bioavailability as a whole result of the three kinetics controlling the system (hydrodynamic, slow sorption and biodegradation) and quantifies a toxic bioavailability as well.

In terms of toxic bioavailability, the results from (Table 4.1) show an interesting aspect of the method based on the definition of bioavailability rates. Even though PCP concentration is rather low at the exit of Column 2, the overall rate of toxic bioavailability ends up being higher than for the standard Column 1 (0.72 compared to 0.57, respectively). This is due to the fact that a constant flow of PCP is coming out and over time leads to the equivalent of a chronic toxicity. A static look at the system would

have shown a decrease in the toxic bioavailability in the presence of a retention matrix (Kelsey and Alexander 1997), but when the hydrodynamics are also taken into account, the opposite result is obtained. The estimation of the resulting hazard would be quite different. Most of the research done on toxic bioavailability uses a contaminant distribution coefficient to assess the bioavailable fraction of pollutant. Research works correlate K_{OM} values to measured toxicity (Gobas et Zhang, 1994). Again, this method is based on a thermodynamic view of the phenomenon and is usually applicable to static or pseudo-static systems such as lakes or sediments (Standley 1997). The effect of hydrodynamics on toxic bioavailability is also seen in the difference between the results obtained for Columns 1 and 3. A decrease in the flow rate leads to a strong decrease in the toxic bioavailability rate (from 0.57 to 0.31).

On a more fundamental note, it is important to realize that bioavailability is organism dependent. Whatever the quantification method is, the organism exposed to the contaminant in its actual distribution (chemical availability) will express its version of what is bioavailable. In the research presented here, a focus was made to use contaminant-sensitive organisms in order to obtain a response in terms of environmental bioavailability (mass or toxic) that would be the most accurate. Indeed, if the organisms do not respond as soon as they are exposed to the contaminant, the gathered response will not be representative of environmental bioavailability. So, in order to get as close as possible to environmental bioavailability, sensitive organisms are needed to make the organism limitation, which is pharmacological bioavailability (Dickson et al. 1994), as negligible as possible. Therefore, to measure mass bioavailability, a microbial consortium that was stimulated with PCP prior to its inoculation within the columns, was used. In the same purpose, to measure toxic bioavailability, the Microtox test was used and proved to be very sensitive to the presence of PCP in the water. However, it is clear that other receptors would have led to different results in terms of bioavailability. Nevertheless, it seems important to probe bioavailability using biological receptors. A better approach would be to use a battery of receptors and gather a general response for environmental bioavailability from this group of receptors.

Another consequence of the fact that bioavailability is organism dependent is that the results obtained with this method and organisms exposure methods in general are not really comparable to results obtained with extraction methods simply because they do not measure the same thing: a biological availability on one side and a chemical availability on the other side. .

One limitation of the method presented here resides in the way the organism is exposed in order to gather the toxic bioavailability. The degrading microorganisms are inside the column and their response to contaminant exposure is a result of multiple micro-exposures dependent on time, leading to a clear evaluation of a bioavailability rate. However, the toxicity test used to measure toxic bioavailability requires a certain exposure time, identical for all samples. Hence, the notion of time created in the evaluation of the toxic bioavailability is less representative of the reality than for the mass bioavailability.

Research is presently being carried out to further investigate the link between the different kinetics controlling the contaminant fate and transport (hydrodynamic, physico-chemical and biological) and the mass and toxic bioavailabilities obtained with this method. Results in this direction may lead to the possible prediction of bioavailabilities.

5. LIEN ENTRE LE PREMIER ET LE DEUXIÈME MANUSCRIT

Le premier manuscrit a présenté le développement de la méthode, des points de vue conceptuel et expérimental, qui permet de quantifier les taux de biodisponibilité massique et toxique des contaminants durant leur transport en milieu poreux saturé. Cette méthode s'avère sensible aux différentes cinétiques qui régissent le devenir du contaminant. Un outil de quantification est donc disponible pour une étude plus poussée de la biodisponibilité.

Dans cette optique, le deuxième manuscrit va utiliser cet outil afin d'approfondir le lien entre les cinétiques du milieu et les taux de biodisponibilités. Ces mécanismes principaux sont: la capacité de rétention du milieu, la vitesse des particules de l'eau et la vitesse de biodégradation du contaminant par les micro-organismes. Afin de développer ce lien, la modélisation des courbes d'élutions massique et toxique est introduite. Cet autre outil va permettre d'estimer les paramètres cinétiques à partir des résultats expérimentaux. L'existence d'une corrélation entre les paramètres cinétiques et les taux de biodisponibilité représente l'hypothèse qui sous-tend ce deuxième manuscrit.

6. DEUXIÈME MANUSCRIT: QUANTIFYING MASS AND TOXIC BIOAVAILABILITY RATES OF PENTACHLOROPHENOL DURING TRANSPORT THROUGH SATURATED POROUS MEDIA

6.1. Abstract

Bioavailability is quantified here as the rate of exposure to the contaminant for two biological receptors: the contaminant-degrading microorganisms and toxic response-inducing organisms. These rates are quantified from the mathematical analysis of target contaminant (pentachlorophenol) breakthrough curves leading to non-dimensional mass (massBioA) and toxic (toxBioA) bioavailability numbers. To demonstrate the bioavailability rate concept, contaminant elutions were performed with columns packed with model solids (standard sand and a PCP-retaining resin, Amberlite XAD-4) under abiotic and biotic conditions. Three factors were tested: the PCP retention capacity of the medium, the porewater velocity and the biodegradation activity of the medium. Results show that the rate of bioavailability concept was successful for translating the complex kinetic competition into the rate of exposure of biological organisms to the contaminant. When the retention capacity of the medium is increased (0.2% and 0.4% resin amended), a sharp decrease in the non-dimensional bioavailability rates was observed, for both massBioA (from 0.056 to 0.005) and toxBioA (from 0.898 to 0.180 respectively). Porewater velocity and biodegradation activity also had significant impacts, but mostly on massBioA. A double kinetic ratio between the kinetics controlling the contaminant-medium interactions was strongly correlated ($R^2 > 0.99$) to massBioA and to the ratio massBioA/ toxBioA.

6.2. Introduction

Quantification of bioavailability of organic contaminants in the environment has become a major interest in the recent years (Baveye *et al.*, 1999). Better understanding of physicochemical interactions taking place between organic contaminants and the subsurface matrices led to a better knowledge of their mobility in soils and groundwaters (Luthy *et al.*, 1997). Research is now focusing on the responses of biological organisms to the distribution of contaminants within the phases of the soil, leading to some understanding of what bioavailability is and how to assess it.

In the field of site bioremediation, bioavailability of organic contaminants is usually understood to be the sum of factors integrating the different limitations to the biological degradation of contaminants (Ramaswami et Luthy, 1997), this is called here mass bioavailability. It is widely accepted that sorbed contaminant is not fully accessible to microbes, which results in a decrease in biodegradation rate and extent (Harms et Zehnder, 1995; Pignatello et Xing, 1996). For most contaminants, the physicochemical mechanisms responsible for these limitations are of two kinds: partition of the contaminant between the aqueous phase and the organic phase and diffusion into the organic matter (Gillette *et al.*, 1999) or into the nanopores of the particulate phase (Nam et Alexander, 1998). The response of the degrading microflora to the contaminant distribution, usually defined as bioavailability, has been proved to be organism-specific (Guerin et Boyd, 1992; Davies *et al.*, 1999).

The bioavailable fraction can also be regarded as the carrier of toxicity. In this point of view, the mechanisms responsible for bioremediation limitations are looked at as a way to decrease the overall toxicity linked to the presence of the contaminant (Alexander, 1995; Kelsey et Alexander, 1997). Target organisms susceptible to express toxicity when in contact with the contaminant can then be used to monitor what is called here toxic bioavailability (Umbreit *et al.*, 1986; Standley, 1997).

Bioavailability, as described above, has been mostly studied in contaminated soil or in slurry systems, but the influence of the dynamics of a contaminated flow on the

biological responses is not yet understood. Studies of bioavailability have used very different definitions (Baveye et Bladon, 1999), from the simple aqueous phase concentration of the contaminant, to the ratio of desorption rate to biodegradation rate (Bosma *et al.*, 1997). In this study, the integrative definition given by (Hrudey *et al.*, 1996) for bioavailability of contaminants in soil (as being the extent of exposure of biological organisms to the contaminant) was applied to a dynamic system. Bioavailability was then defined as the rate of exposure of a biological receptor to the contaminant. Here, the bioavailable contaminant is not associated to a fraction of the total contaminant concentration, but to the time of exposure to a specific receptor. The flow brings dissolved contaminant in and out of a section of the saturated medium by constantly modifying the partition equilibrium as well as the diffusion flux. Therefore, contaminant bioavailability during transport is expressed in terms of mass and toxic rates. The method to quantify these rates ($\tau_{massBioA}$ and $\tau_{toxBioA}$), reported in a previous study (Dudal *et al.*, 1999a), is based on the analysis of contaminant breakthrough curves (BTC) as well as toxic response breakthrough curves (respectively mass and toxic BTC's). Two parameters are drawn from each BTC: the area under the curve (AUC_{mass} and AUC_{tox}), indicating respectively the mass or toxic loss during transport, and a reference time, indicating the time of exposure for a biological receptor to the contaminant. According to equations 6.1a and 6.1b, the reference time is set as the product of the average residence time of the contaminant (\bar{t}_{mass}) or the toxicity (\bar{t}_{tox}) to the variance of the residence time distribution (σ^2_{mass} and σ^2_{tox}).

$$\tau_{massBioA} = \frac{1 - AUC_{mass}}{\bar{t}_{mass} \sigma^2_{mass}} \quad \text{and} \quad \tau_{toxBioA} = \frac{AUC_{tox}}{\bar{t}_{tox} \sigma^2_{tox}} \quad (6.1a) \text{ and } (6.1b)$$

The breakthrough curves used to calculate bioavailability rates are generated by exposing biological organisms to the contaminant during its transport through a saturated medium. This helps to accurately measure the environmental bioavailability (Hamelink *et al.*, 1994). To demonstrate the concept of bioavailability rates,

experiments were performed using various saturated porous media consisting of model solids (standard sand and a PCP-retaining resin) under either abiotic or biotic conditions. Different retention capacity, biodegradation activity as well as contaminant flow velocity were tested to determine bioavailability rates. Pentachlorophenol (PCP) was the target contaminant eluted. PCP can be found in groundwaters and its solubility depends on the pH of the solution. It is biodegradable but also has a strong toxic potential (Rao, 1978). Mass bioavailability was estimated by using a PCP-degrading bacterial consortium and toxic bioavailability was assessed by using the Microtox bioassay. Due to the absence of biological receptors in the groundwaters, the toxic bioavailability was assessed at the exit of the saturated medium, mimicking a groundwater point of resurgence.

6.3. Materials and Methods

6.3.1. Chemicals.

All the columns were saturated using a basal salt medium (BSM, (Greer et Shelton, 1992)) at pH 7.15. Pentachlorophenol (PCP) was added to the BSM as NaPCP (Sigma, 98% pure). Standard Ottawa sand (Anachemia, Montreal) was used as the main component of the solid phase and was amended by the PCP-retention resin: Amberlite XAD-4 (Sigma). The resin will specifically retain hydrophobic molecules from aqueous media. Its pore size was between 20 to 60 mesh with a specific area of $715 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ and an average inside pore diameters of 50Å. $^3\text{H-H}_2\text{O}$ (Sigma, 1 mCi.mL $^{-1}$) was diluted in BSM for performing the tracer tests.

6.3.2. Production of bioactive sand.

An amount of PCP-contaminated soil was sampled from a contaminated site. PCP-degrading microorganisms were grown from this sample by sequential addition of NaPCP in a fed-batch slurry bioreactor, using BSM at pH 7.15 (Bécaert *et al.*, 1999). This slurry was filtered through an 8 μm -Whatman filter paper to obtain a microorganism suspension. The suspension was then mixed with sterile standard sand (1/3 w/w) in the fed-batch aerated and agitated (200 rpm) bioreactor for enrichment by sequential addition of NaPCP at concentration increasing from 5 to 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. PCP monitoring was carried out on a daily basis: aqueous samples were centrifuged at 13000 rpm for 10 minutes and the supernatant was then filtered through an 0.45 μm filter paper (Millipore) to read its UV absorbance at 319 nm on a spectrophotometer (Varian). When the biodegradation rate was considered sufficient ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), the aqueous phase, containing a fraction of the total microorganism population, was leached from the sand and kept at 4°C for further activation of sterile sand. The fresh bioactive sand was ready for introduction in the columns.

6.3.3. Experimental set-up.

The nine columns used for all the experiments were pre-chromatography ChromaflexTM columns (VWR Canlab), made of KimaxTM borosilicate glass and polytetrafluoroethylene (PTFE). The columns were 15 cm long with a 4.8 cm inside diameter. Both endings included a 20 μm PTFE filter as well as a PTFE grid for bed support and accurate flow distribution. Model solids used for column packing consisted of standard sand either sterile for abiotic elutions or bioactive, and Amberlite XAD-4 resin.

All columns were packed with their composition of model solids (490 g), by sedimentation of the solids in BSM, section by section until complete saturation of the column. At the end of each experiment, column materials were dried and weighed to

allow the calculation of saturation. All experiments were performed with a water saturation of $99\pm0.5\%$ (v/v), evaluated by weighing empty and saturated columns as well as dry materials. Hydrodynamic characterization of the nine columns was performed using a step tracer test using $^3\text{H}-\text{H}_2\text{O}$ based BSM. Fractions were collected at the exit of the column and counts per minute (CPM) were monitored using a liquid scintillation counter (Wallac 1409).

Abiotic breakthrough curves were obtained by performing upward step elutions of PCP (13 mg.L^{-1} in BSM) on the columns containing non-bioactive materials (columns 1, 2 and 3). The PCP solution was fed at a rate of $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ using a Cole-Parmer peristaltic pump set up with a special teflon tubing head-pump. To avoid any limitations by dissolved oxygen, PCP was used at a concentration of 13 mg.L^{-1} . Fractions (4 mL) were collected at the exit of the columns and, after filtration on a $0.45\mu\text{m}$ - (Millipore), the PCP concentration was monitored by measuring its absorbance at 319 nm.

The same protocol was used for the biotic elutions (columns 4, 5, 6, 7 and 8). In this case, the columns were packed with bioactive materials. Prior to the contaminant breakthrough, two pore volumes of BSM were eluted through the biotic columns to discard non-attached cells. Columns 4, 5 and 6 are the same basic bioactive column. Once the biotic elution was carried out on column 4, the inflow contaminant solution was still fed to the column for a week. After that period, the column was washed with BSM overnight and a second biotic elution was performed at half the usual flow rate ($0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), leading to the results described on column 5. The column was then flushed overnight and a last biotic elution was carried out at the regular flow rate ($1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), leading to the superbioactive column, number 6.

A control experiment (column 9) was carried out to assess the distribution of the biodegradation activity within the column. This column was packed with bioactive sand in a pre-described manner and was sacrificed two pore volumes later. Material (90g) from three separate sections of the column (5 cm each) was placed in two replicate amber glass bottles where 250 mL of BSM was added as well as 13 mg.L^{-1} of PCP. Bottles were agitated at 200 rpm. Biodegradation kinetics were monitored for each

bottle using centrifugation and filtration as described earlier, and compared to the kinetics obtained with three bottles containing bioactive sand prior to column packing.

6.3.4. Toxicity measurement.

Toxicity of elution fractions (7 mL) was assessed by using the Microtox® test (Azur). This test uses a bioluminescent marine bacterium (*Vibrio fisheri*) and measures the inhibition to luminescence caused by the presence of contaminant in the sample. Salinity was adjusted to 2.5% w/w for every sample using sodium chloride. From each set of data, the EC10 (% of the contaminant solution necessary to induce a 10% decrease in the bioluminescence) was calculated using the Microtox software.

6.3.5. Modeling of mass breakthroughs.

Mass breakthrough curves were mathematically modeled using the dual compartment model developed by Angley *et al.*, (1992). This model allows the contaminant to partition itself onto the sorbing material as well as to be absorbed into the material with a first-order rate-limited sorption. Biodegradation of the contaminant is modeled as a first-order kinetic. This assumption is valid here considering the short time during which the elutions take place (around 3 hours) and the rather low concentration of PCP in the influent solution compared to what the adapted consortium was used to in the bioreactor. The dimensional form of the model is presented in equations 6.2a and 6.2b.

$$\frac{\partial C}{\partial t} + F \frac{\rho}{\theta} K_D \frac{\partial C}{\partial t} + (1 - F) \frac{\rho}{\theta} \frac{\partial S}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - v \frac{\partial C}{\partial z} - k_{bio} C \quad (6.2a) \text{ and } (6.2b)$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} = k[(1 - F)K_D C - S]$$

where C is the contaminant concentration in the aqueous phase (mg.L^{-1}), S is the PCP concentration in the sorbed phase (mg.kg^{-1}), t is the time (s), z is the axial distance (cm), ρ is the medium bulk density (kg.L^{-1}), θ is the medium porosity, F is the fraction of sorbed contaminant for which sorption is instantaneous, K_D is the contaminant-medium partition coefficient (L.kg^{-1}), D is the axial dispersion coefficient ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$), v is the porewater velocity (cm.s^{-1}), k_{bio} is the first-order biodegradation constant (s^{-1}) and k is the first-order reverse sorption rate (s^{-1}).

The dual-compartment model was chosen because of the structure of the resin: large specific area for partition and small pore size for kinetically-limited absorption. The numerical solution was obtained using the finite difference method on this set of distributed parameter equations (6.2a and 6.2b) followed by the resolution of the discretized equations using the Euler method. The initial and border conditions used on C and S are presented in equations 6.3a, b and c.

$$C(z = 0, t \geq 0) = C_0$$

$$C(z \geq 0, t = 0) = S(z \geq 0, t = 0) = 0 \quad (6.3a), (6.3b) \text{ and } (6.3c)$$

$$\frac{\partial C}{\partial z}(z \rightarrow \infty) = 0$$

Curve-fitting for parameter estimation from experimental data was carried out using a non-linear least-square method based on the Marcquardt-Levenberg algorithm. This step was performed independantly for the hydrodynamic tracer test (estimation of D), for the abiotic elution (estimation of F , K_D and k) and for the biotic elution (estimation of k_{bio}). The fitted mass elution curves were then derived to allow AUC_{mass} calculation by integrating the curve with the trapeze method.

6.4. Results and Discussion

6.4.1. Column hydrodynamic characteristics.

Hydrodynamic characteristics of all the columns used in this study are presented in Table 6.1. The column weight analysis allowed the estimation of the medium porosity, bulk density, mean residence time and hydraulic conductivity. Curve-fitting performed on tracer tests for each column gave an estimate of the axial dispersion. All these parameters show a strong plug-flow type hydrodynamic behavior, with a rather low dispersion. This is due first to the material used to pack the columns, the standard sand. The homogeneity of the sand particle size distribution (average porosity 0.35) does not allow the dispersion to reach high values. Secondly, because of the presence of microorganisms on the sand, packing of the columns could not be done using vacuum or strong tamping on the material. This resulted in less packed columns (average bulk density 1.75 kg.m^{-3}) showing less dispersion, with an average value of $1.30 \times 10^{-4} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$. Nevertheless, all of the hydrodynamic results mainly show the validity of comparing the columns with each other. Standard deviations of the parameters presented in table 1 are small over the 9 columns described (less than 8% overall), allowing the comparison of abiotic and biotic conditions.

6.4.2. Dynamic sorptive behavior of the model solids.

The model solids (standard sand and resin) used in this study were chosen for their different sorptive properties towards organic contaminants and specifically pentachlorophenol.

Table 6-1: Experimental conditions and hydrodynamic characteristics for each column

Column	Experiment conditions	Axial dispersion ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	Porosity	Bulk density ($\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Reduced hydraulic conductivity (s^{-1})	Mean residence time (min)
1	Sand	1.53×10^{-4}	0.36	1.70	1.71×10^{-4}	101.4
	Abiotic					
2	Sand +0.5g resin	1.00×10^{-4}	0.38	1.65	1.61×10^{-4}	101.1
	Abiotic					
3	Sand +1g resin	2.13×10^{-4}	0.36	1.70	1.71×10^{-4}	102.0
	Abiotic					
4	Bioactive sand	1.11×10^{-4}	0.34	1.76	1.81×10^{-4}	103.8
5	Bioactive sand	5.53×10^{-5}	0.34	1.76	9.0×10^{-5}	203.2
	Half flow-rate					
6	Superbioactive sand	1.11×10^{-4}	0.34	1.76	1.81×10^{-4}	125.3
7	Bioactive sand +0.5g resin	1.45×10^{-4}	0.36	1.70	1.71×10^{-4}	104.5
8	Bioactive sand +1g resin	8.63×10^{-5}	0.35	1.73	1.75×10^{-4}	99.9
9	Bioactive sand	1.36×10^{-4}	0.35	N.A.	1.75×10^{-4}	105.1
Average		1.30×10^{-4}	0.35	1.72	1.74×10^{-4}	105.0
Std.dev		0.36×10^{-4}	0.01	0.04	0.06×10^{-4}	7.4

Figure 6.1 shows the experimental and model-fitted results of breakthrough experiments carried out on the columns 1, 2 and 3. Standard sand, consisting of clean silica dioxide, shows no sorptive capacity for PCP, resulting in a sharp contaminant breakthrough with no retardation factor ($K_D = 1$). For columns 2 and 3, the dual compartment model described very well the experimental results and allowed the estimation of the parameters F , K_D and k (Table 6.2). These parameters clearly indicate that most of the

sorbed contaminants (99.97 and 99.94% for the columns 2 and 3 respectively) are located within the pores of the resin (50 Å diameter) where the absorption kinetic is the limiting mechanism.

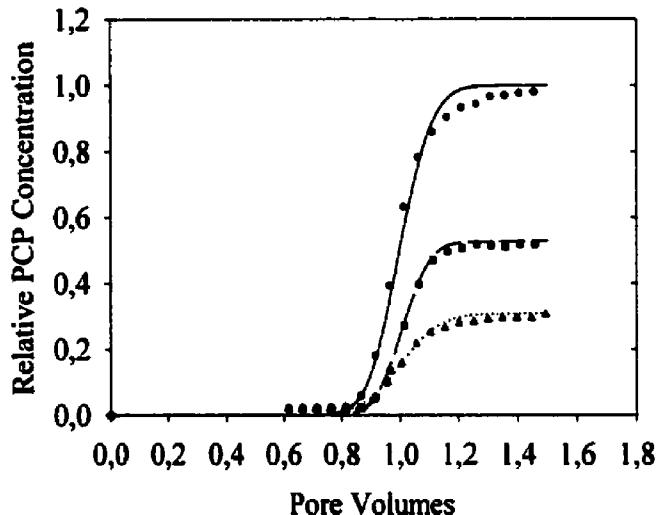


Figure 6.1: Abiotic PCP breakthrough curves (experimental and model-fitted) with the three different media: column 1, standard sand; column 2, 0.2% resin-amended sand and column 3, 0.4% resin-amended sand.

(●) column 1, experimental, (—) column 1, fitted (■) column 2, experimental (---) column 2, fitted (▲) column 3, experimental (....) column 3, fitted.

Despite PCP's high solubility at the pH of the experiment (7.15) and the small amount of resin used in the columns, the K_D found were $3.93 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $6.56 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$ for columns 2 and 3 respectively, indicating a clear uptake of the contaminant from the aqueous solution. Such values, reported to the fraction of resin used in the column, give an overall K_D for PCP on the Amberlite XAD-4 resin of $3700 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$. This result can be

compared to the K_D obtained by Guerin et Boyd, (1997) for naphtalene on Amberlite XAD-2 resin: 5870 L.kg⁻¹.

Table 6-2: Model parameters estimated from experimental results

Column	Experiment conditions	F	K_d (L.kg ⁻¹)	k (s ⁻¹)	k_{bio} (s ⁻¹)
1	Sand	1	1	0	0
	Abiotic				
2	Sand +0.5g resin	6.4×10^{-4}	3.93	6.51×10^{-6}	0
	Abiotic				
3	Sand +1g resin	3.4×10^{-4}	6.56	6.82×10^{-6}	0
	Abiotic				
4	Bioactive sand	0	0	0	1.15×10^{-5}
5	Bioactive sand	0	0	0	4.18×10^{-5}
	Half flow-rate				
6	Superbioactive sand	0	0	0	5.06×10^{-5}
9	Bioactive sand	0	0	0	2.25×10^{-5}

The absorption kinetic constants (k) were similar for the columns 2 and 3 (6.51×10^{-6} and 6.82×10^{-6} s⁻¹) which is in agreement with the fact that the resin used in the two columns led to a similar diffusion rate within the pores. The main difference between the two columns resides in the surface areas available to partition the contaminant.

6.4.3. Mass and toxic breakthroughs.

The presence of the resin was tested for Microtox response and did not show any effect (results not shown) and allowed the empirical modeling of toxic responses. Toxic elution curves were empirically modeled according to an average dose-response curve. Results clearly shows the sensitivity of the Microtox test for monitoring PCP-related toxicity in the columns (figure 6.2).

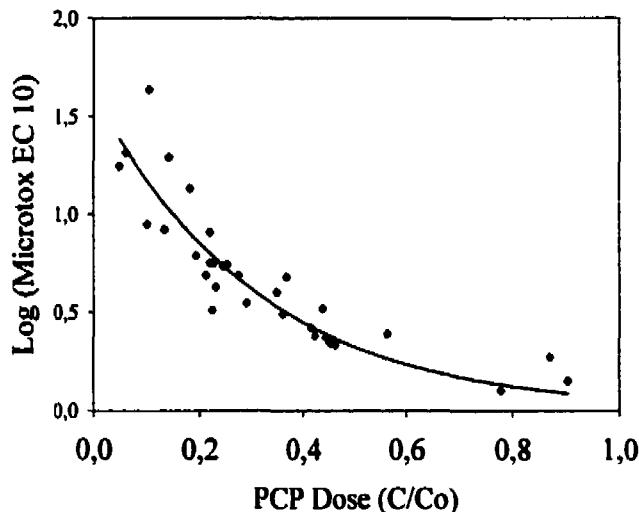


Figure 6.2: PCP Dose - Microtox EC10 response plot and toxic response empirical modeling.

(◆) experimental toxic response and (—) modeled response

Parameters of an exponential decay function were estimated from the experimental results, according to equation 6.4.

$$\text{Log(response)} = 0,65 \times 10^{-3} + 1,62 \times e^{-3,22 \times C/C_0} \quad (6.4)$$

This model allowed the fitting of the experimental toxic elution curves that were then derived to obtain the AUC_{tox} values. This step was performed, as for the AUC_{mass} , by integrating the derived curve using the trapeze method. The use of these two models allowed robust calculations of the parameters necessary to calculate mass and toxic bioavailability rates.

Mass and toxic breakthrough curves were analysed for columns 4, 5, 6, 7 and 8. Results from these elutions are presented in figure 6.3a and 6.4.

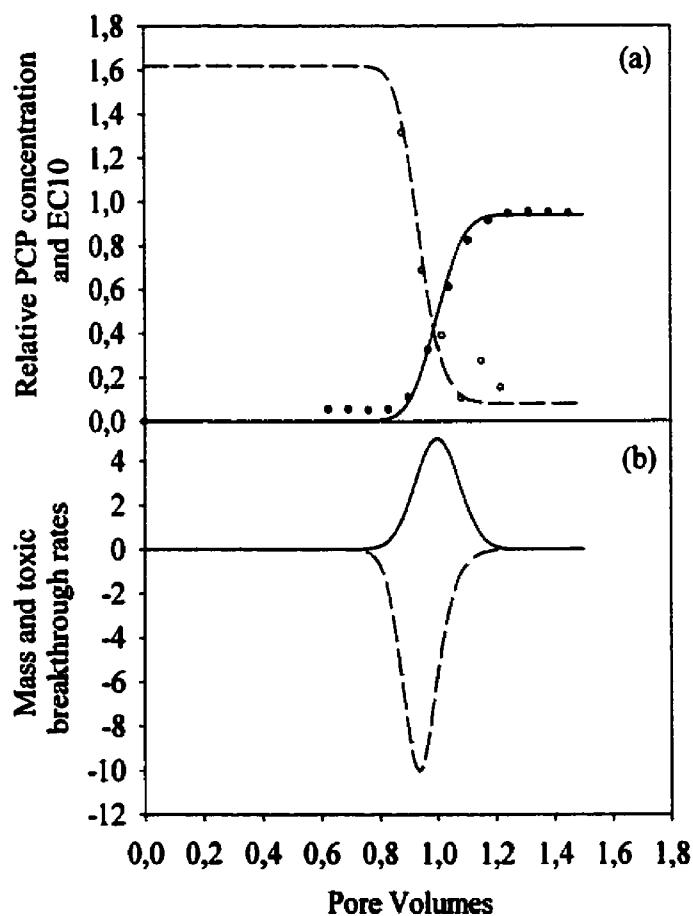


Figure 6.3: a) Breakthrough curves from column 4 (bioactive sand) and b) their derivatives for calculation of bioavailability rates.

a) experimental (●) mass and (○) toxic and model fitted (—) mass and (—) toxic and b) (—) mass and (—) toxic.

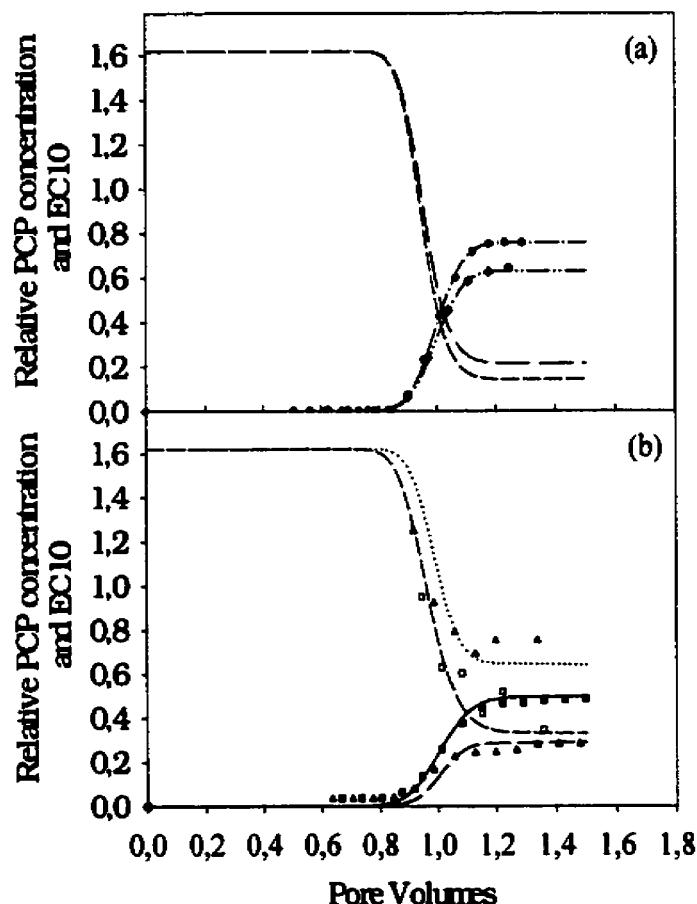


Figure 6.4: Mass and toxic breakthrough curves for a) columns 5 (standard sand at half flow rate) and 6 (superbioactive standard sand), and b) columns 7 (0.2% resin-amended bioactive sand) and 8 (0.4% resin-amended bioactive sand)

a) ● experimental mass, —··· fitted mass and ——— fitted toxicity, ● experimental mass, —··· fitted mass and —-- fitted toxicity, and b) ■ experimental mass, — fitted mass,

experimental toxicity, -- fitted toxicity,) ▲ experimental mass, —— fitted mass, ▽ experimental toxicity, ··· fitted toxicity.

When PCP concentrations are low, a high fraction of the solution is necessary to reach a 10% decrease in the bioluminescence, explaining the opposite aspects of the two elutions (mass and toxic). Toxicity breakthroughs are clearly related to the presence of PCP. The influence of microorganisms on bioavailability was assessed by comparing biodegradation kinetics obtained in bioactive columns 4 (figure 6.3a), 5 and 6 (figure 6.4a). First-order biodegradation kinetic constants (k_{bio}) were estimated and results are presented in Table 6.2. The freshly packed bioactive sand gave a k_{bio} of $1.15 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, while after a week of PCP feeding, the k_{bio} increased to $4.18 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ and after another day, to $5.06 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. This clearly indicates that, while there is no significant growth during the elution (around three hours), constant feeding of the column leads to a much higher microbial activity, resulting in a higher biodegradation rate in columns 5 and 6 than in column 4. This observation was expected and results are used for later bioavailability quantification.

The influence of porewater velocity was assessed by comparing columns 5 and 6. The results presented in figure 6.4a show that a longer exposure between microorganisms and the PCP leads to a higher fraction of PCP biodegraded. The translation of this expected result in terms of bioavailability rates is performed in the next section.

Because experiment with columns 4, 7 and 8 were carried out simultaneously to assess the influence of the retention capacity of the medium, biodegradation kinetic results from column 4 were used to model columns 7 and 8 (bioactive sand-resin medium). In the same manner, results from columns 2 and 3 (abiotic) were also used to model columns 7 and 8. Thus, the dual-compartment model was actually validated for these two columns (7 and 8). The good fittings observed indicate that the pre-estimated parameters (sorption and biodegradation separately) are valid for these two experiments and that no interactions occur between the microflora and the resin (figure 6.4b).

Column 9 was used to assess the evolution of the biodegradation activity along the column. Biodegradation activities obtained at three heights in column 9 showed no differences (results not presented) during the time course of the elutions. This adds some validity to the first-order assumption regarding biodegradation for his experiment.

6.4.4. Bioavailability during transport.

In order to accurately quantify bioavailability rates according to equations 1a and b, modeled mass and toxic breakthroughs were derived (figure 6.3b) and extrapolated when necessary (columns 5 and 6). The areas under the curves as well as the reference times were computed from these derivatives. This means that the bioavailability rate have to be looked at as an instantaneous response to a pulse of contamination in the medium. Step elutions were performed because their results are more robust, but the analysis was made on a response to a pulse contamination. To better understand the rates, they were analysed using the best or worst case scenarios. The best case scenario happens when all the contaminant injected is biodegraded despite a sharp breakthrough ($AUC_{mass} = 0$ and the reference time is the one obtained under abiotic conditions). The worst-case scenario happens when all the contaminant leaks through the column ($AUC_{tox} = 1$) with the same sharp breakthrough. Estimations of these non-dimensional bioavailability rates, or dynamic bioavailability numbers, are presented in Table 6.3. Three main factors were tested in this study: the retention capacity of the medium, the porewater velocity and the biodegradation capacity of the medium. Results show that both mass and toxic bioavailability decrease with an increase in the retention capacity of the medium (columns 4, 7 and 8): 0.056, 0.017 and 0.005 respectively for the mass bioavailability and 0.898, 0.510 and 0.180 respectively for the toxic bioavailability. These observations are in agreement with results obtained by Nam et Alexander, (1998) in static systems. Comparison of the biodegradation activity of the medium when increasing biodegradation capacity (columns 4 versus 6), indicate that mass bioavailability is sharply increasing (from 0.056 to 0.221) while toxic bioavailability is

rather stable (from 0.898 to 0.825). Finally, when the porewater velocity is reduced by 50% (column 6 versus 5), an increase in the mass bioavailability (from 0.221 to 0.335) and a decrease in the toxic bioavailability (from 0.825 to 0.765) were observed.

Table 6-3: Mass and toxic dynamic bioavailability results for each bioactive column

Column number	Experiment conditions	Mass BioA.	Toxic BioA.	Double kinetic ratio	Overall Bioavailability (mass/tox)
4	Bioactive sand	0.056	0.898	0.067	0.062
5	Bioactive sand	0.335	0.765	0.47	0.438
	Half flow-rate				
6	Super-bioactive sand	0.221	0.825	0.28	0.268
7	Bioactive sand +0.5g resin	0.017	0.510	0.027	0.033
8	Bioactive sand +1g resin	0.005	0.180	0.015	0.028

The influences of the different factors can be seen as kinetic competitions towards the contaminant. On one side, the flow carries the contaminant along, leaving short exposure time between the contaminant and the resin. On the other side, the biological receptor is in competition for the same contaminant. Bioavailability in dynamic system appears to be controlled by the kinetics describing the main mechanisms taking place within the medium: hydrodynamics, rate-limited sorption and biodegradation. Bosma *et al.*, (1997) came up with a similar conclusion for bioavailability in static system, where it was quantified as the ratio between rate-limited sorption and biodegradation kinetics. However, hydrodynamics cannot be considered in these static systems. Non-dimensional numbers have been developed to characterize

limiting mechanisms to bioavailability in static systems: the Damkholer numbers. They are defined in the chemical engineering field as the ratio between two kinetics. These numbers are usually utilized to compare diffusion in a film layer and the reaction rate at the interface (Chung *et al.*, 1993; Ramaswami *et al.* Luthy, 1997; Zhang *et al.*, 1998). Similarly, two of these Damkholer numbers can be expressed in the present study. First, a ratio between the biodegradation rate and the advection rate ($Da_1 = k_{bio} / K_H$) and second, a ratio between the biodegradation rate and the first-order sorption rate ($Da_2 = k_{bio} / k$). In each case the numerator favors mass bioavailability while the denominator penalizes it. Combining these two numbers lead to a double kinetic ratio according to equation 6.5. In the case where one kinetic is not active in the system, its value is set to 1.

$$\text{Double kinetic ratio} = Da_1 \times Da_2 = \frac{k_{bio}^2}{k \times K_H} \quad (6.5)$$

This double kinetic ratio represents the overall competition between the three kinetics and has been plotted against the results of mass bioavailability and those of the ratio between mass and toxic bioavailability stated as the overall bioavailability (Table 6.3). This overall bioavailability remains rather constant with increased retention (0.062, 0.033 and 0.028 for 0, 0.5 and 1g of resin added respectively) but is sharply increased with a more bioactive medium (from 0.062 to 0.268) and when the porewater velocity is divided by two (from 0.268 to 0.438). The plots clearly ($R^2 > 0.99$) indicate a strong correlation between these parameters (Figure 6.5). This shows clearly that mass bioavailability is controlled by the kinetics of the system and that, when the toxic response is directly related to the contaminant, the overall bioavailability (ratio of mass to toxic) is also related to this double kinetic ratio. This also indicates that the method used to estimate mass and toxic bioavailability rates is accurate and able to translate the complex kinetic situation into a rate of exposure of biological receptors to the contaminant.

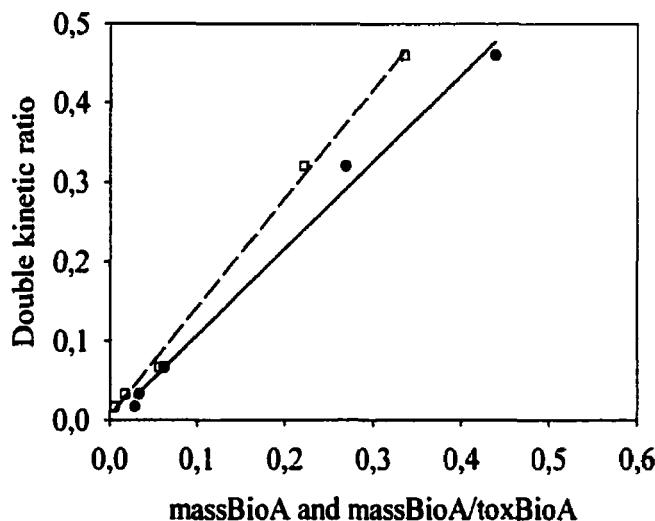


Figure 6.5: Correlation between the mass bioavailability and the double kinetic ratio and between the overall bioavailability and the double kinetic ratio.

(●) massBioA/toxBioA experimental, (○) massBioA experimental, (—) massBioA/toxBioA correlated, (---) massBioA correlated.

This definition of bioavailability for dynamic systems appears to be relevant and is totally compatible with the definition given for static system, which is the extent of exposure. Hence, when the water flow kinetic is brought to zero, dynamic systems become static and the rate of exposure is then expressed as the extent of exposure. Furthermore, such definition helps to understand some problems stated in different attempts to compare batch and column results (Zhao et Voice, 2000).

The use of the bioavailability rate concept led also to an interesting observation. When 1g of resin was amended to the bioactive sand (column 8), it resulted in a barely null mass bioavailability and very low toxic bioavailability. Nevertheless, the contaminant was able to migrate through the column and leach out at a small but regular rate ($2.17 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$). This observation can be described as non-mass bioavailable

transport. In this case, the rate of contaminant release was not strong enough to sustain biodegradation, but strong enough to induce a toxic bioavailability response.

But, when looking closer at the quantification methods, it is clear that the toxic bioavailability rate is quantified in a different way than the mass one. Indeed, the biological receptor (PCP-degrading microorganism) used to quantify the mass rate are spread over the column and they each "feel" the kinetic competition taking place at a specific location. But, for the estimation of the toxic rate, the pathway of exposure is always the same, because analysis was performed on the eluate. Hence, the toxic rate (in AUC_{tox} and $t_{tox} \times \sigma_{tox}^2$) does take into account the kinetics competition occurring within the column, but in a less direct way.

Research is currently being carried out to further investigate the evolution of bioavailability rates with aging contamination. The study is focusing on the time change in biological responses to step elutions, representing continuous contamination of the system.

7. LIEN ENTRE LE DEUXIÈME ET LE TROISIÈME MANUSCRIT

Le deuxième manuscrit a clairement mis en évidence le lien entre les taux de biodisponibilité massique et toxique avec les paramètres cinétiques du milieu. Cette corrélation renforce la notion de taux de biodisponibilités plutôt que d'ampleur. Néanmoins, les courbes d'élutions obtenues dans cette étude, bien que réalisées par échelon de PCP, ont en fait été analysées comme les résultats d'impulsion de contaminant. En effet, les courbes d'élutions obtenues ont été dérivées et les Aires sous les courbes ont été calculées à partir des courbes de vitesse d'élution. Le résultat, en terme de biodisponibilité, est une mesure instantanée des taux, correspondant à une réponse instantanée du système pristine à une contamination ponctuelle.

Le but du troisième manuscrit consiste à étudier les taux de biodisponibilité en fonction du temps. L'évolution temporelle de ces taux instantanés en taux intégraux va être suivie. Pour ce faire, la méthode de quantification des taux à partir des courbes d'élution va devoir être légèrement modifiée, puisque cette fois, de véritables échelons de contaminant vont être injectés dans les colonnes. L'hypothèse qui sous-tend ce troisième article est que les micro-organismes présents dans la colonne ont la possibilité de modifier la biodisponibilité à long terme, quelque soit la situation instantanée initiale. L'outil de modélisation va devoir lui aussi être modifié afin de tenir compte de la croissance bactérienne possible sur le contaminant biodisponible, croissance qui devrait permettre cette évolution temporelle positive, augmentation de la biodisponibilité massique et diminution de la biodisponibilité toxique.

8. TROISIÈME MANUSCRIT: EFFECT OF BIOMASS GROWTH ON THE RATES OF MASS AND TOXIC BIOAVAILABILITY DURING CONTINUOUS TRANSPORT OF PENTACHLOROPHENOL THROUGH SATURATED POROUS MEDIA

8.1. Abstract

This research aims at showing the importance of microbial growth on the quantification of the mass and toxic bioavailability rates during continuous contaminant transport in columns under different media conditions, including variations in flowrate, PCP retention and biodegradation capacity. Mass and toxic long-term breakthrough curves generated by performing step elutions of PCP allowed the calculation of time-vectors for both the mass and toxic bioavailability rates. The biodegradation activity of the packed material coming from the columns was monitored at different times and positions along the column axis. A growth-limited biodegradation coupled to dual-compartment sorption model succeeded in fitting the experimental results. The model predicted a ten-fold increase in the biomass population that was correlated to a similar increase in the mass bioavailability rate (from non-dimensional rate of 0.05 to 0.5 after 100 pore volumes, with or without the resin), resulting in a decrease of the toxic bioavailability rate. For all the columns studied, the ratio between the mass and toxic bioavailability rates increased over time while growth was occurring within the columns. These results coupled with the sharp increase in the biodegradation activity suggests that biomass growth acts as a competing kinetic able to reverse the slow sorption kinetic.

8.2. Introduction

The evolution of the bioavailable fraction of contaminant in soil as a function of time has been of greater interest over the last years (Hatzinger et Alexander, 1995; Kelsey et Alexander, 1997; Guthrie et Pfaender, 1998). This process, referred as aging of contamination in soil, leads to a decrease in accessibility for the contaminant-utilizing bacteria (mass bioavailability) as well as for the toxic response-inducing organisms (toxic bioavailability). These results, quantified or simply observed seem to be the general facts in soils.

The influence of groundwater-induced contaminant transport on bioavailability has not yet been the subject of many studies. Recent results have shown the usefulness of the bioavailability rate concept for quantifying exposures of biological organisms to the contaminant during transport (Dudal *et al.*, submitted). Studies looking at biodegradation during transport have shown the capacity for the indigenous microflora to grow despite the lower exposure time and thus to reduce the contamination level in the saturated media (Doong *et al.*, 1998; Brusseau *et al.*, 1999). The groundwater flow acts as a constant source of contaminant present at a rather low concentration, allowing microbial growth (McCarty *et al.*, 1984), but also increased mobility and potential toxicity. Thus, bioavailability, already proven to be kinetic dependent (Bosma *et al.*, 1997), has to integrate the microbial growth kinetic. Despite the relatively low bacterial yields generally observed on organic contaminants such as pentachlorophenol (Jacobson et Arvin, 1996), microbial growth occurs in subsurface systems and indigenous organic matter as well as organic contaminants can be used as carbon source (Borden et Bedient, 1986).

8.3. Theory.

In a previous study, bioavailability rates were quantified by analysing breakthrough curves as obtained from pulse elutions (Dudal *et al.*, submitted). This led to mass and toxic bioavailability numbers, representing instantaneous bioavailabilities. These instantaneous breakthrough curves gave the response of the system to a sudden contamination, allowing the immediate characterization of the system. Other scalar quantification of instantaneous bioavailability have been developed in unsaturated soils where hydrodynamics were not an important factor (Chung *et al.*, 1993; Bosma *et al.*, 1997).

In the current study, pulse elution analysis is replaced by real step elution analysis for the quantification of time-related bioavailability. The integral of the breakthrough curves generated by these step elutions will represent the integral response of the system to a contamination and thus will allow the quantification of a vector of bioavailability along time for both mass and toxic bioavailability rates. The integral time-dependent rates ($\tau_{massBioA}(t)$) are an integration of instantaneous bioavailability rates ($\tau_{massBioA}$) calculated in the previous study, according to equation 1.

$$\tau_{BioA}(t) = \int_{t_{initial}}^t \tau_{BioA} dt \quad (8.1)$$

These time-dependent rates are calculated from a step elution performed on a section of saturated porous medium according to equations 8.2a and 8.2b. The calculation process is the same as for the instantaneous form, but now, it is performed at any time along the mass or toxic response and corresponds to a mass balance carried out on the contaminant in the aqueous phase.

$$\tau_{massBioA}(t) = \frac{AUC_{mass}^{ref}(t) - AUC_{mass}(t)}{t_{exp}} \quad (8.2a)$$

$$\tau_{\text{toxBioA}}(t) = \frac{AUC_{\text{tox}}(t)}{t_{\text{exp}}} \quad (8.2b)$$

The mass bioavailability rate (τ_{massBioA}) in a step elution is then expressed as the fraction of contaminant biodegraded over the time of exposure (t_{exp}). Such a fraction is quantified as the amount of contaminant that entered the aqueous phase at the section at time t_{exp} , time of exposure (area under the incoming step elution curve: $AUC_{\text{mass}}^{\text{ref}}$) to which is subtracted the amount of contaminant eluted through the column without being biodegraded (area under the mass breakthrough curve: AUC_{mass}). In a similar manner, the time-dependent toxic bioavailability rate is expressed as the amount of toxicity coming out from the section during the time of exposure, t_{exp} , (area under the toxic elution curve: AUC_{tox}). The AUCs are calculated in non-dimensional concentration and toxicity and thus the calculated rates are non-dimensional. The $AUC_{\text{mass}}^{\text{ref}}$ represents the amount of contaminant coming into the aqueous phase of the considered section and is calculated as the area under the breakthrough curve obtained for the elution under abiotic conditions.

In order to investigate the effect of biomass growth on the evolution of the mass and toxic bioavailability rates an experimental design based on column studies was developed. Different medium conditions such as 1) the retention capacity, 2) the contaminant residence time and 3) the biodegradation capacity were studied.

8.4. Materials and Methods

The column-based experimental design is similar to the one used in a previous study (4). All the columns and their hydrodynamic characteristics are identical and presented in Table 1.

Table 8-1: Experimental conditions and hydrodynamics characteristics for each column

Column	Experiment conditions	Axial dispersion ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	Porosity	Bulk density ($\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Reduced hydraulic conductivity (s^{-1})	Mean residence time (min)
1	Sand Abiotic	1.53×10^{-4}	0.36	1.70	1.71×10^{-4}	101.4
2	Sand +0.5g resin Abiotic	1.00×10^{-4}	0.38	1.65	1.61×10^{-4}	101.1
3	Sand +1g resin Abiotic	2.13×10^{-4}	0.36	1.70	1.71×10^{-4}	102.0
4	Inoculated sand	1.11×10^{-4}	0.34	1.76	1.81×10^{-4}	103.8
5	Inoculated sand Half flow-rate	5.53×10^{-5}	0.34	1.76	9.0×10^{-5}	203.2
6	Inoculated sand (Reinjected)	1.11×10^{-4}	0.34	1.76	1.81×10^{-4}	125.3
7	Inoculated sand +0.5g resin	1.45×10^{-4}	0.36	1.70	1.71×10^{-4}	104.5
8	Inoculated sand +1g resin	8.63×10^{-5}	0.35	1.73	1.75×10^{-4}	99.9
A	Inoculated sand	9.34×10^{-5}	0.35	1.75	1.81×10^{-5}	100.2
B	Inoculated sand	7.44×10^{-5}	0.34	1.76	1.81×10^{-5}	102.3
C	Inoculated sand	9.30×10^{-5}	0.36	1.74	1.81×10^{-5}	105.8
D	Inoculated sand	1.36×10^{-4}	0.35	1.76	1.75×10^{-4}	105.1
Average		1.30×10^{-4}	0.35	1.72	1.74×10^{-4}	105.0
Standard deviation		0.36×10^{-4}	0.01	0.04	0.06×10^{-4}	7.4

The first eight columns (1 to 8) were used for assessing the influence of the three medium conditions on time-related bioavailabilities. PCP retention was controlled by

using Amberlite XAD-4 resin (Sigma) in the medium. This resin is designed for extracting chlorophenols from aqueous phases. PCP residence time was controlled by simply changing the flowrate and PCP biodegradation capacity was controlled by varying the extent of pre-activation of the biomass to the contaminant. Four other columns (A to D) were used to monitor the evolution of the biodegradation activity in the columns, as a function of time and position along the column axis. A general view of the experimental set-up is presented here, but all the details are available in Duda *et al* (*submitted*).

8.4.1. General experimental design.

Step elutions of pentachlorophenol (NaPCP at 13 mg.L⁻¹, 97%, Sigma) were performed on columns (Kimax and teflon, 15 cm long and 4.8 cm diameter) packed with model solids (Standard Ottawa sand, Anachemia Montreal, and Amberlite XAD-4 resin, Sigma) and basal salt medium (BSM (Greer et Shelton, 1992)) at a flow-rate of 1 mL.min⁻¹. The sand was used either abiotic (columns 1, 2 and 3) or inoculated with PCP-degraders (columns 4 to 8). The inoculated sand was previously prepared in a mixed aerated fed-batch bioreactor where sequential addition of PCP were carried out to obtain a sand-attached microflora able to degrade PCP. The consortium produced was mostly constituted of PCP degraders such as *Sphingomonas* sp. (Beaulieu *et al.*, 2000). Once inoculated, the sand was packed in the columns, either alone (column 4) or amended with resin (0.5g of resin in column 7 and 1g in column 8) by step additions of sand in BSM. The inoculated columns were first flushed with BSM for 2 pore volumes and the effluents generated were tested for the presence of microorganism by measuring protein concentration, using the micro-BCA (bicinchoninic acid) method (Pierce, Rockford, IL). The effluents of the columns were monitored twice daily for PCP concentration (UV spectrophotometry at 319nm) as well as for toxicity (Microtox method). This monitoring was carried out until effluent PCP concentration reached the detection limit of the spectrophotometric method (0.5 mg.L⁻¹). After that period, column

4 was flushed for 16 hours with BSM and the PCP influent solution was re injected at half the flow rate (column 5 at $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) until the effluent PCP concentration reached the detection limit. Then again, the column was flushed for 16 hours and a final step injection was performed (column 6) on this column.

8.4.2. Biodegradation activity monitoring.

Four control columns (A to D) were packed with inoculated sand in the same manner as described above for column 4. Each of these four columns was sacrificed at a given time (2.5h, 21.5h, 190h and 408h for columns A to D respectively). Each sacrifice consisted in stopping the elution, opening the column and in carefully separating the packed inoculated sand into three sections (representing each 5 cm of the total 15-cm column) after discarding the mobile water. Each of these samples was then divided into two replicates. Each replicate (average weight of 90 g) was placed in a 500mL amber glass bottle and was amended with 250 mL of BSM and $13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of PCP. A control bottle was prepared by replacing the inoculated sand with standard abiotic sand. All the bottles were agitated by rotation at 200 rpm. Disappearance of PCP from the aqueous phase was monitored daily by sampling 2 mL of liquid, centrifugating it at 13000 rpm and filtering the supernatant at $0.45 \mu\text{m}$. Absorbance was read on a UV spectrophotometer (Varian model DMR90) at 319 nm.

8.4.3. Breakthrough curves modeling.

To quantify the bioavailability rates and to link them with the kinetic parameters controlling the fate of the contaminant, all the mass and toxic breakthrough curves were modeled. It was shown in the previous study that toxic responses were directly correlated to the concentration of PCP found in the effluent (Dudal *et al.*, submitted). The presence of microorganisms and of the resin did not exhibit any influence on the

toxic response, allowing the empirical modeling of the toxic breakthrough curves based on the dose-response curve, according to equation 8.3.

$$\text{Log(response)} = 0.65 \times 10^{-3} + 1.62 \times e^{-3.22 \times C/C_0} \quad (8.3)$$

The set of equations used to model the mass breakthrough curves were derived from Borden and Bedient (1986), where a model was developed for the oxygen-limited biodegradation of hydrocarbons during transport. The first-order reverse sorption rate, used by Angley *et al.* (1992), was added to this model, leading to equations 8.4a, 8.4b, 8.4c and 8.4d under their dimensional forms. This model reflects that the contaminant fate and transport are governed by advection, dispersion, contaminant adsorption onto the resin surface, absorption into the resin pores, and growth-associated biodegradation. However, the system is limited with one constituent of the basal salt medium that elutes the contaminant through the column. The biomass is supposed to be present in the aqueous phase, but not supposed to migrate along the column. The concept of mobile and immobile water developed by Baveye and Valocchi (1989) is of used here to unite these two statements.

$$\frac{\partial C}{\partial t} + F \frac{\rho}{\theta} K_D \frac{\partial C}{\partial t} + (1 - F) \frac{\rho}{\theta} \frac{\partial S}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - v \frac{\partial C}{\partial z} - Y_x \mu_m X \frac{C}{K_c + C} \times \frac{L}{K_L + L} \quad (8.4a)$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} = k[(1 - F)K_D C - S] \quad (8.4b)$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \mu_m X \frac{C}{K_c + C} \times \frac{L}{K_L + L} \quad (8.4c)$$

$$\frac{\partial L}{\partial t} = D \frac{\partial^2 L}{\partial z^2} - v \frac{\partial L}{\partial z} - Y_L \mu_m X \frac{C}{K_c + C} \times \frac{L}{K_L + L} \quad (8.4d)$$

The variables are: C , the contaminant concentration in the aqueous phase ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), S , the contaminant concentration in the sorbed phase ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), X , the biomass concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), L , the limiting element concentration in the aqueous phase ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), t , the time (s) and z , the length along the column (cm). The hydrodynamic parameters are: v , the porewater velocity ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$) and D , the dispersion coefficient ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). The physico-chemical parameters are: ρ , the medium bulk density ($\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$), θ , the porosity and C_0 , the inlet PCP concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), K_D , the distribution coefficient for PCP between the aqueous phase and the resin ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$), F , the fraction of contaminant non-kinetically sorbed, and k , the reverse first-order sorption kinetic constant (s^{-1}). Finally, the growth-associated biodegradation parameters are: Y_X , the contaminant-biomass yield ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$), μ_m , the maximal growth rate (s^{-1}), K_C , the half-saturation constant for the contaminant ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), K_L , the half-saturation constant for the limiting factor ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and Y_L , the limiting element-biomass yield ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$).

This set of four coupled partial differential equations was first discretized using the finite difference method and then solved numerically using the Runge-Kutta order 4 method with the set of initial and boundary conditions expressed in equations 8.5.

$$C(t=0, z>0) = 0 \quad C(t>0, z=0) = 1 \quad \frac{\partial C}{\partial t}(z \rightarrow \infty) = 0 \quad (8.5a)$$

$$X(t=0) = X_0 = 1 \quad (8.5b)$$

$$S(t=0) = 0 \quad (8.5c)$$

$$L(t=0, z>0) = 0 \quad L(t>0, z=0) = 1 \quad \frac{\partial L}{\partial t}(z \rightarrow \infty) = 0 \quad (8.5d)$$

All the parameters were estimated from fitting the model-generated curves to the experimental breakthrough results using a non-linear regression method based on the Marcquardt-Levenberg algorithm. The hydrodynamic parameter D was estimated for each column after performing a non-reactive tracer test for that column, using a step elution of ${}^3\text{H}-\text{H}_2\text{O}$ based BSM. The ${}^3\text{H}$ containing effluent of this test was monitored

using a scintillation counter (Wallac 1409). The value obtained was then used directly for the estimation of the other parameters. Physico-chemical parameters, F , K_D and k , were determined from columns 2 and 3 and then used for columns 5 and 6 that contains respectively the same amount of resin. Finally, growth-associated biodegradation parameters (Y_X , μ_m , K_C , Y_L and K_L) were estimated for column 4 and then used in column 7 and 8 by slightly adjusting the original amount of biomass present in the column, X_0 . Concerning, column 5, X_0 was set as the vector of X given by the model at the end of the column 4 experiment and, in a similar manner, X_0 for column 6 was set as the final X vector given by the model for column 5. This was done to take into account the fact that column 5, followed column 4 and was followed by column 6 in the laboratory order of experiments.

8.5. Results and Discussion

8.5.1. Abiotic breakthrough curves (BTC).

Figure 8.1 shows the long-term elutions of PCP under abiotic conditions in the absence of PCP-retaining resin (column 1) and in its presence (column 2 with 0.5g of resin and column 3 with 1g). The sharp BTC obtained on the standard sand (column 1) clearly shows no retardation of the PCP by the sand. But, when resin is amended, it clearly extracts PCP from the aqueous phase, which then slowly saturates all the slow sorption sites. The plots of the absorbed contaminant (S) for both columns 2 and 3 (Figure 8.1) show this saturation process where non-dimensional values of S reach 1 after more than 120 pore volumes.

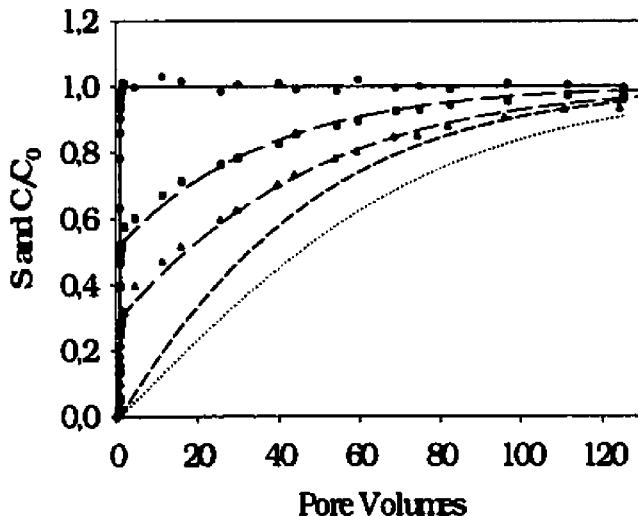


Figure 8.1: PCP step elutions performed under abiotic conditions on column 1 (standard sand), column 2 (standard sand amended with 0.5g of resin) and column 3 (Standard sand amended with 1 g of resin).

PCP elutions for (●) column 1, experimental, (—) column 1, fitted, (■) column 2, experimental, (— —) column 2, fitted, (▲) column 3, experimental, (— —) column 3, fitted and sorbed PCP for (---) column 2 and (---) column 3.

The double-compartment model was able to accurately fit the experimental results and parameters describing the retardation as well as the slow sorption kinetic were estimated (Table 8.2a). The values of F (fraction of contaminant undergoing equilibrium adsorption: 6.4×10^{-4} and 3.4×10^{-4}) indicate that sorption is kinetically limited. The first-order reverse sorption rate constant characterizing this kinetic is independent from the amount of resin added and has a value of $6.6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. This rather low kinetic constant compared to the hydrodynamic constant of $1.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, can be associated to the structure of the resin, where PCP has to migrate within the 50\AA diameter pores. Nevertheless, the

large resin specific area ($750 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) allows the effective removal of PCP from the aqueous phase and then its slow sorption within the pores.

Table 8-2: Model parameters estimated from experimental results

a. Abiotic Parameters

Column	Experiment conditions	F	K_d ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$)	k (s^{-1})
1	Sand Abiotic	1	1	0
2	Sand +0.5g resin Abiotic	6.4×10^{-4}	3.93	6.51×10^{-6}
3	Sand +1g resin Abiotic	3.4×10^{-4}	6.56	6.82×10^{-6}

b. Biotic Parameters

Column	Experiment conditions	Y_X ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)	μ_m (s^{-1})	K_C ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Y_L ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)	K_L ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
4 and A, B, C, D	Inoculated Sand	0.59	7.23×10^{-5}	6.5×10^{-3}	0.56	6.07
5	Inoculated sand Half Flow-rate	0.60	1.31×10^{-4}	6.5×10^{-3}	0.56	0.24
6	Inoculated sand (reinjected)	0.61	1.08×10^{-4}	6.5×10^{-3}	0.54	0.2
7	Inoculated sand + 0.5g resin	0.59	7.23×10^{-5}	6.5×10^{-3}	0.62	6.07
8	Inoculated sand + 1g resin	0.59	7.23×10^{-5}	6.5×10^{-3}	0.65	6.07

8.5.2. Mass and toxic integral breakthrough.

The elutions of PCP on biotic columns (4, 5, 6, 7 and 8) are presented in figures 8.2a, 8.2b and 8.2c, both for the mass and the toxic results. The PCP breakthrough for column 4 (inoculated sand) shows a sharp elution of contaminant at the early stage of the experiment, due to no retardation from the sand and a rather fast flowrate. After 5 pore volumes, the concentration of PCP in the effluent starts to decline but it takes more than 100 pore volumes to bring the concentration to the detection limit. An accelerating process that extracts the contaminant from the aqueous phase can only explain such a BTC. A first-order biodegradation kinetic constant, representing a constant rate of PCP disappearance would lead to a flat concentration profile in the effluent. Indeed, to obtain this plateau profile an equilibrium should be established between the hydrodynamic kinetic and the biodegradation kinetic. But here, the biodegradation rate is constantly increasing, which results in a reduction in PCP concentration. This suggests that the biodegradation kinetic overpasses the hydrodynamic kinetic. Similarly, despite the presence of the resin (columns 7 and 8, figure 8.2a), the rate of biodegradation is still able to increase and allows the PCP concentration to reach the detection limit. In these two cases, kinetic competitions occur between the flow dynamic and the slow sorption on one side and the biodegradation process on the other side. Hence, it appears that the only kinetic able to increase over time will win the competition and allow the toxicity generated by the sharp appearance of the PCP to be brought back to baseline values (figure 8.2b). When more microorganisms are present at the beginning of the elution (columns 5 and 6), and when the flowrate is divided by two (column 5), the competition is easier for the PCP degraders and it only takes them 3 or 10 pore volumes to succeed in the competition (figure 8.2c).

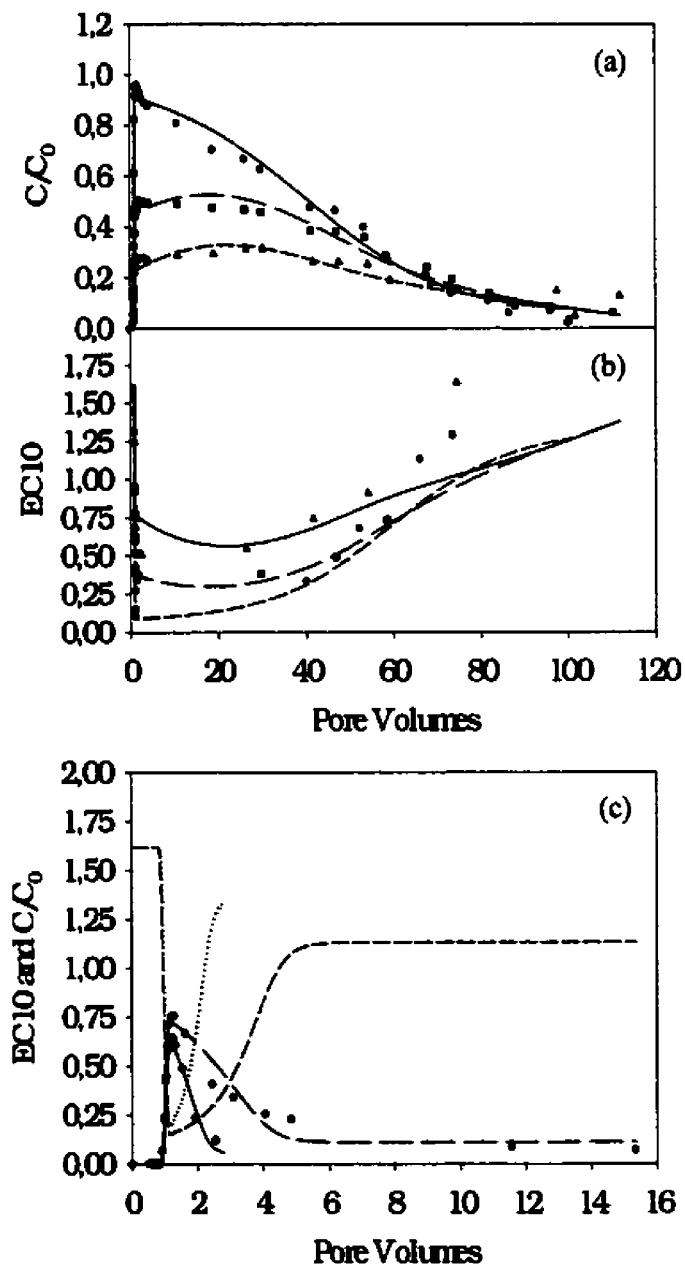


Figure 8.2: a) mass breakthrough curves (experimental and model-fitted) obtained with PCP step elutions performed under biotic conditions on: column 4 (inoculated sand), column 7 and 8 (inoculated sand amended with 0.5 and 1 g of resin respectively), b)

toxic breakthrough curves (experimental and fitted) obtained from the same columns and c) mass and toxic breakthrough curves obtained on columns 5 (inoculated sand, half flowrate) and 6 (inoculated and reinjected sand).

- a) PCP elutions for (●) column 4, experimental and (—) fitted, (■) column 7, experimental and (—) fitted and (▲) column 8, experimental and (—) fitted,
- b) EC10 elutions for (●) column 4, experimental and (—) fitted, (■) column 7, experimental and (—) fitted and (▲) column 8, experimental and (—) fitted,
- c) PCP elutions for (◆) column 5, experimental and (—) fitted, (●) column 6, experimental and (—) fitted and EC10 fitted for (..) column 5 and (—) column 6.

8.5.3. Limited-growth dual-compartment sorption model.

In order to model these data, and to explain the increase in the biodegradation rate, bacterial growth has to be taken into account. The model presented earlier was used to fit the experimental data for the 5 inoculated columns and the results are presented on figures 2a and 2c. A simple non-limited Monod approach for growth-associated biodegradation was first tried, but did not allow the correct fit of the data (results not shown). The model was then modified to take into account a limitation to growth by any constituent of the BSM, including dissolved oxygen (Borden et Bedient, 1986). The fit obtained for the biotic BTC were good ($R^2 > 0.97$) but somehow did not represent the data as well as for the abiotic results. This may be due to some problems, when using a Monod type model on flow-through systems where more than a single species is present (see later). The parameters estimated from this model are given in Table 2. A first fit was found on the inoculated sand (column 4). From that fit, a very low affinity constant between the biomass and the contaminant ($6.5 \times 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$) was used for all the columns, reflecting on the presence of pre-acclimated biomass. A maximum growth rate of 0.26 h^{-1} was found for column 4 and was used for column 7 and 8, containing the same inoculated sand. After 100 pore volumes (on column 5), the μ_m went up to 0.4 h^{-1} . The

yields (Y_X and Y_L) were set constant throughout the different experiments. Values of approximately 0.6 for Y_X are comparable to the one obtained in a similar study of biodegradation of benzoate during transport: 0.65 (Brusseau *et al.*, 1999). The rather high value of this yield on PCP could be explained by the pre-activation of the microflora to the contaminant. The main upset resides in the affinity constant between the biomass and the limiting element, K_L . Its value was constant for columns 4, 7 and 8 (different resin content, but carried out simultaneously), but no fit was found by applying this value to columns 5 and 6 (both carried out after Column 4 was performed) and it had to be reduced to 0.24 and 0.20 respectively in order to fit the experimental results.

8.5.4. Growth-associated biodegradation.

In order to experimentally measure the increase in the biodegradation rate over time, step elutions of PCP were performed on columns A, B, C and D. Each column was stopped and opened at different times (2.5, 21.5, 190 and 408 h) to measure the biodegradation activity at three levels (0-5, 5-10 and 10-15 cm). Such indirect monitoring of the microbial growth was favoured instead of direct counting, due to the fact that the microorganisms were attached to the sand (All columns were washed with MSM for two pore volumes prior to PCP injection). Analytical methods for biomass extraction from solid phase followed by plate counting are not precise enough to monitor growth in such systems. Instead, considering the pre-acclimation of the biomass to the contaminant, the evolution of the biodegradation activity was assumed to be related to microbial growth. A biodegradation activity index was calculated from the batch biodegradation results (not shown) and was defined as the maximum slope of the PCP disappearance curve (obtained at the point of inflection) divided by the time to reach this point. Results for these experiments are presented in figure 3a.

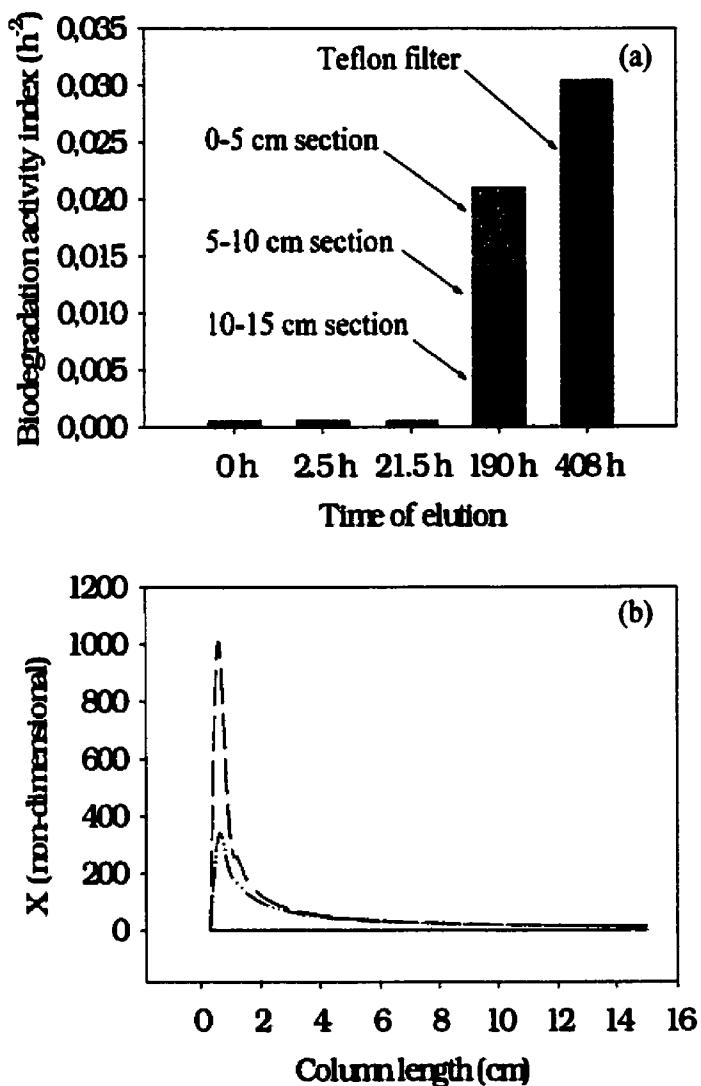


Figure 8.3: a) Experimental biodegradation activity index evolving with time and column length and b) Model-generated profiles of biomass within the column at different time of elution.

b) model-generated profile after (—) 2.5h, (....) 21.5 h, (-·-) 190h and (--) 408h.

When opening the last column (after 408 h), it was noticed that the Teflon support at the entrance of the column was colonized by the biomass. A similar batch biodegradation experiment was performed with this filter. Results clearly show no increase in biodegradation rate for the first 25 hours, but after 8 days, a clear increase uniformly spread over the column was observed. At the end of the experiment (408 h or 100 pore volumes), the biomass had developed mainly near the contaminant source, colonizing the Teflon support. These experimental results were confirmed by the model's prediction (figure 3b). Here again, the biomass profile is flat and low for the first 25 hours and then slowly deform to increase the biomass population near the source of contaminant. After 408 hours, most of the activity was located in the first centimetre of the column. Such a result causes difficulties in the application of the Monod-type model for this flow-through system. Even when taking into account the fact that the X_0 vector for column 5 is the ending vector for column 4, the yield coefficients (Y_X and Y_L) should also be a function of the column length (Z) because their non-dimensional forms include the expression of X_0 .

The Monod equation, suited for single species and completely mixed systems, allows here the non-limited growth near the entrance of the column, when, in the reality, limitations in the population should arise. Unfortunately, the Contois model, that describes these kinds of limitations did not exhibit any correct fit for the experimental results.

8.5.5. Growth-associated bioavailability.

The results presented clearly show that growth is occurring within the column, thus the question arises to know the influence of this growth on the mass and toxic bioavailability of PCP. In order to understand this influence, one column (column 8) where a competition between the three kinetics takes place was chosen. The mass and toxic BTCs from this column are found on figure 4a.

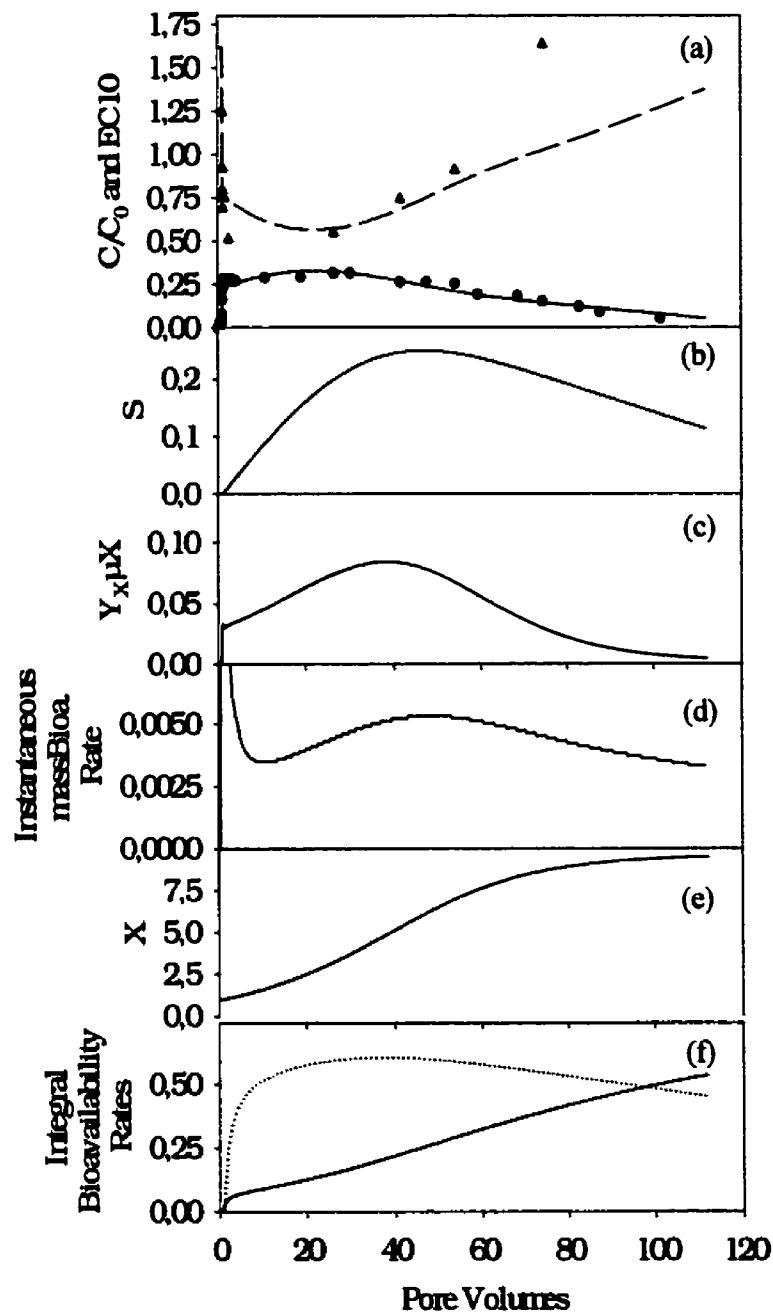


Figure 8.4: Time evolution of the variables related to bioavailability, for column 8 (inoculated sand amended with 1 g of resin): a) mass and toxic breakthrough curves (experimental and fitted), b) sorbed contaminant, c) instantaneous biodegradation rate,

- d) instantaneous bioavailability rate, e) integral biomass growth and f) mass and toxic integral bioavailability rate.
- a) PCP elutions for column 8 (●) experimental and (—) fitted and EC10 elutions for column 8 (▲) experimental and (—) fitted,
- f) (—) integral rate of mass bioavailability and (....) integral rate of toxic bioavailability.

When looking at the time-evolution of the sorbed non-bioavailable contaminant (S , figure 4b) compared to the equivalent abiotic column (column 3, figure 1a), it is clear that the growth of the PCP-degrading biomass is strong enough to reverse the sorption process and to bring back the sorbed contaminant to the aqueous phase, where it is biodegraded. The biomass acts as a sink for the contamination compared to the resin that acts as a sponge. This sink theory on bioavailability, was developed by Baveye and Bladon (1999) to explain the organism-specific characteristic of bioavailability. A contaminant will be more bioavailable if the exposed organism acts as a better sink towards it. This concept can be observed when looking at figures 4c and 4d. The group of parameters $Y_X \mu X$ (figure 4c) represents the instantaneous rate of biodegradation (equation 4a) and indicates the capacity of the medium at any time to degrade the contaminant present in the aqueous phase and thus to reverse the sorption process. This biodegradation capacity can be related to the instant rate of mass bioavailability calculated according to equation 1.

When the combination of the growth rate and the biomass population is the strongest (strongest sink), the instant mass bioavailability rate is the highest and declines when growth weakens due to depletion of substrate in the aqueous phase. As soon as some PCP enters the immobile water from the sorbed site, it is readily biodegraded.

When looking at the bioavailability rates from the long-term point of view, the mass and toxic bioavailability rates can be monitored along time (figure 4f). It can be observed that the integral rate of mass bioavailability is controlled by the biomass (figure 4e). A ten-fold increase in the biomass population leads to a ten-fold increase in

the mass bioavailability rate (from a non-dimensional rate of 0.05 to 0.5). Biomass can be considered the integral variable of the growth-associated biodegradation rate. The constant increase of the biomass population allows the constant increase in the mass bioavailability rate and also allows pulling down the toxic bioavailability rate (from 0.6 to 0.4). It was known that bacteria were able to modify the bioavailability behaviour in their surrounding environment by, for example, producing surfactants (Déziel *et al.*, 1996), but growth can become a competing kinetic able to modify the contaminant bioavailability.

The ratio between the mass and toxic bioavailability rates was calculated for the 5 different inoculated columns (figure 5).

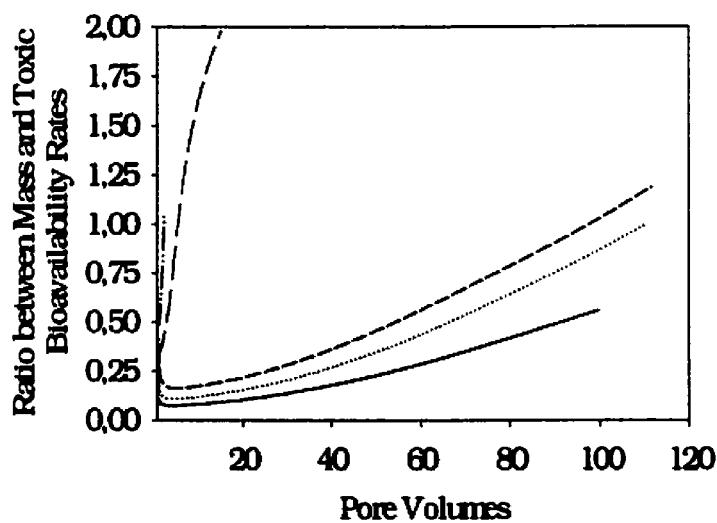


Figure 8.5: Time-evolution of the ratio between the mass and toxic bioavailability rates for all the inoculated columns (4 to 8).

(—) column 4, (.....) column 5, (- -), column 6, (----) column 7, (—) column 8

For every situations faced in these experiments, the ratio between mass and toxic bioavailability rates increased significantly over the time, due to biomass growth. It is interesting to note that the resin influences the situation in terms of bioavailability: the ratio for column 8 (1g of resin) is higher than for column 7 (0.5g of resin) which is higher than for column 4 (no resin). This again supports the fact that the resin acts as a sponge and allows the retention of PCP from the flowthrough water for later releasing it in the immobile water phase where more biomass is present and able to degrade it.

Obviously, the situations presented here are far from field conditions, but they help to understand the kinetic control for instantaneous and long-term bioavailabilities, both for mass and toxic point of views. The reverse sorption kinetic allows the contaminant desorption and does not take into account sorption irreversibility (Richnow *et al.*, 1997) that would lead to a competing sink for the contaminant. Moreover, on the microbiological side, inherent recalcitrance (Huesemann, 1997) could be a strong limitation to biodegradation and therefore limit the efficiency of the biological sink. Despite the growth-associated increase in the ratio between the mass and toxic bioavailability rates, the contaminant was able to leach through the systems for up to 120 pore volumes, representing, in a real situation, a potential hazardous effluent with high migration capacity. The toxicity measured in these experiments was directly correlated with contaminant concentration. In the case of a real contamination, secondary metabolites, co-contaminants, soluble microbial products may be produced and increase the toxic response compared to the correlated values (Ross *et al.*, 1998).

The positive influence of the flow through dynamics on long-term bioavailabilities observed in this study differs from the observations made for aging contamination in soils (Kelsey *et al.*, 1997). The use of water to increase bioavailability was shown to be positive in slurries (White *et al.*, 1998), mostly due to its action on the physical-chemical aspect of contaminant distribution. This flowthrough study shows that the water flow constantly feeds the biomass with low concentration of contaminant, allowing growth and faster degradation of the contaminant, thus increasing the mass bioavailability. Indeed, non-dimensional mass bioavailability rate estimated at 0.05 for

column 4 in the pulse elution study (Dudal *et al.*, submitted), increased by ten folds to reach 0.5 after 100 pore volumes. Nevertheless, the increased mobility has two main outcomes, clearly shown in figure 4f: a possible increase in the mass bioavailability, but a definite increase in the toxic bioavailability. When the contaminant-degrading biomass is limited for any reason and can not compete effectively at the kinetic level, the contamination will become a threat. In all cases, long-term bioavailabilities have to be regarded in terms of the competing kinetics taking place in the environment: hydrodynamics, slow sorption and limited-growth-associated biodegradation. Site characterization should consider these kinetic data in order to accurately assess the mass and toxic fate of the contaminants.

9. DISCUSSION GÉNÉRALE

La recherche sur la problématique de biodisponibilité environnementale telle que définie par Hamelink *et al.*, (1994) s'est développée selon deux principaux axes. Les biologistes ont développé des bioessais utilisant des organismes biologiques sensibles aux différents contaminants afin d'estimer la biodisponibilité et donc le potentiel d'action des contaminants dans le milieu considéré sur la chaîne alimentaire. Parallèlement, les microbiologistes ont cherché à estimer le potentiel d'action de dégradation des contaminants par les microorganismes présents sur les sites contaminés. Ils sont eux aussi parvenus à la problématique de biodisponibilité, le contaminant étant bien souvent inaccessible aux microorganismes. De l'autre côté, les chimistes ont tenté de répondre à ces problématiques de biodisponibilité en cherchant à prédire le comportement et le potentiel de migration des contaminants dans le milieu considéré, ce grâce à l'aide de la connaissance de plus en plus précise des différents mécanismes gouvernant les interactions entre les contaminants et les matrices solides (Weber JR *et al.*, 1991; Pignatello et Xing, 1996). Les biologistes et les microbiologistes ont alors pu récemment utiliser, chacun de leur côté, ces données chimiques de plus en plus précises, généralement thermodynamique, afin de prédire la concentration de contaminant retrouvée dans la phase aqueuse, considérée comme biodisponible. Cette fraction biodisponible pouvait alors être reliée à une réponse biologique en terme de fraction biodégradable ou fraction génératrice de danger.

Les dix dernières années ont vu d'une part la rencontre de ces approches, et d'autre part, l'intégration de plus en plus importante de données cinétiques dans la problématique de biodisponibilité. Tout d'abord, Alexander et ses différents travaux sur les véritables dangers liés aux contaminations des sols ont permis la prise en considération de multiples récepteurs biologiques, tant à des fins de biodégradation que de toxicité (Kelsey et Alexander, 1997). Simultanément, aux Etats-Unis et au Canada, les normes

de contaminations, basées sur des critères chimiques de concentration maximale, étaient remises en question, pour tenter de développer des approches de sites contaminés par analyse de risque, en se posant la question : quel problème cette contamination pose-t-elle véritablement? (Alexander, 1995). Afin de répondre à cette question, la démarche d'analyse de risque se doit de quantifier le danger associé à la contamination présente ainsi que les différentes voies d'exposition des organismes récepteurs à la contamination. De plus, le concept d'atténuation naturelle a récemment connu un essor exceptionnel. Ce concept vise à démontrer la capacité intrinsèque d'un site contaminé à s'auto-restaurer, sans poser un risque non acceptable pour le milieu (Christensen *et al.*, 1994; Ritz, 1996). Il a été bien montré que de nombreux sites contaminés aux produits pétroliers pouvaient se placer dans de telles approches, du fait de la grande biodégradabilité de ces produits. D'autres recherches concernant l'applicabilité de cette approche pour des sites contaminés à des produits plus récalcitrants ont montré les limites de l'atténuation naturelle, l'approche par analyse de risque restant néanmoins applicable sur de tels sites.

L'intégration de données et mécanismes cinétiques dans la problématique de la biodisponibilité est le deuxième facteur important de ces dix dernières années dans la recherche sur la biodisponibilité (Chung *et al.*, 1993; Harms et Zehnder, 1995; Bosma *et al.*, 1997; Ramaswami et Luthy, 1997; Nam et Alexander, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Cette intégration a permis d'expliquer les deux phases temporelles de la biodisponibilité : initialement élevée puis de plus en plus faible. Les cinétiques chimiques de sorption lente ont été comparées aux cinétiques de prise en charge par les organismes récepteurs pour apporter une nouvelle quantification de la biodisponibilité, plus juste et permettant de décrire son évolution au cours du temps.

C'est dans la continuité de ces deux nouvelles approches (intégration du devenir massique et toxique ainsi que des mécanismes cinétiques) que se situe cette thèse. La biodisponibilité y est vue comme un potentiel d'action sur les organismes récepteurs, quels qu'ils soient, et contrôlée par les mécanismes cinétiques régissant le devenir du contaminant. Le concept de taux de biodisponibilité massique et toxique représente une

suite des travaux pré-cités. Le caractère intégrateur de ces deux taux face à la complexité des interactions entre le contaminant et le milieu récepteur présente des avantages et des inconvénients. Comme toute intégration de facteurs, le degré de liberté diminue à chaque diminution du nombre de paramètres et cela conduit à une perte d'informations. Mais, ce défaut devient une qualité lorsque la complexité de la situation est telle que l'information est diffuse et difficile à gérer. La connaissance de toutes les interactions entre le contaminant et le milieu récepteur mène à l'élaboration de modèles de transport complexes et qui ont tout de même du mal à décrire la réalité. Dans ces cas, la possibilité d'intégrer cette complexité dans un nombre de variables restreint, à partir de tests relativement simples devient intéressante. Le détail des mécanismes, nécessaires à la compréhension du devenir massique exact est certes perdu, mais une connaissance plus globale est acquise, qui peut servir lors de l'estimation du danger lié à cette contamination. Par exemple, le rapport entre les taux toxique et massique donne une idée du danger lié au transport du contaminant dans le milieu considéré, ainsi que l'évolution de ce danger à long terme. Dans le cas de contaminations complexes, notamment avec des contaminants difficiles à étudier (par exemple dioxines et furanes), cette méthode peut apporter des réponses quant au danger associé à l'écoulement. Le caractère intégrateur des tests de toxicité, qui seraient alors utilisés, non seuls, mais en batterie, peuvent apporter une connaissance du danger lié à ces contaminations. De même, la complexe compétition que se livrent les microorganismes entre eux, au sein des consortia, peut elle-aussi être intégrée dans une réponse globale de biodisponibilité massique lors du transport. Le rapport inverse à celui présenté plus haut (taux massique sur taux toxique) apporte lui une première estimation de la capacité du milieu poreux saturé à s'auto-restaurer, sans poser un danger non-acceptable. Ce début d'estimation de l'applicabilité de l'atténuation naturelle en eaux souterraine semble prometteuse dans le cas des contaminations complexes, où la démonstration de la diminution de masse du contaminant lors de l'écoulement reste difficile à faire. Enfin, la difficulté de transposition en dynamique des données obtenues en batch trouve, par cette méthode, une ébauche de solution.

Les limites de la méthode, outre le caractère intégrateur qui représente une perte d'information, une simplification de la situation, sont principalement les suivantes. Tout d'abord, la différence de quantification entre le taux massique et le taux toxique. En effet, le taux massique est mesuré à l'aide de microorganismes placés sur les particules de sable à l'intérieur de la colonne. La réponse est certes récoltée en sortie de colonne, mais elle intègre les micro-réponses provenant de tous les recoins de la colonne. Ainsi, la quantification du taux massique tient correctement compte du véritable taux d'exposition de l'organisme au contaminant. Par contre, le taux toxique est mesuré en sortie de colonne et relié à la concentration du contaminant, dans le cas modèle de cette thèse où un seul contaminant est présent. Les organismes sondeurs utilisés pour la quantification toxique (les bactéries de la méthode Microtox) ne sont pas disposés sur les particules de sable au sein de la colonne. La réponse toxique tient donc indirectement compte du véritable taux d'exposition, par l'intermédiaire de la concentration du contaminant. De plus, l'utilisation de la méthode Microtox nécessite des temps d'exposition fixes entre le contaminant et *Vibrio fisheri* (5 ou 15 minutes). Cela limite aussi la possibilité de sonder le véritable taux de biodisponibilité toxique. Il serait nécessaire d'utiliser un bioessai qui pourrait être fixé dans la colonne et qui donnerait ce véritable taux. Une alternative consisterait à utiliser une seconde colonne en parallèle ou en série dans laquelle seraient disposées des moules. Ces organismes, retrouvés aussi en eaux douces, ont la particularité, très intéressante dans le cas étudié, de filtrer l'eau. L'eau s'écoule au travers de la moule et cet organisme en retire ces éléments nutritifs et potentiellement des contaminants présents dans l'eau. Cette méthode pourrait quantifier véritablement le taux d'exposition toxique par mesure du contaminant restant en sortie de colonne. La modélisation de ces nouvelles courbes d'élutions toxiques, en tenant compte de la prise en charge par les moules, du retard, etc, permettraient de plus, une compréhension plus grande des phénomènes de toxicité en milieu dynamique.

Une autre limite, d'ordre plus technique, réside dans l'utilisation des microorganismes fixés. Leur transport n'est pas pris en considération, bien qu'il puisse représenter un facteur important dans le transport des contaminants (Doong *et al.*, 1998). De même,

l'utilisation du système à plus long terme (voir troisième article) tend à une modification importante de la répartition bactérienne dans le milieu poreux saturé, qui doit être accompagnée d'un relargage de microorganismes, accentuant leur transport en phase aquifère. Les complications engendrées par ce fait en terme de modélisation des courbes d'élutions massique devront aussi être considérées. L'approche de la croissance en système dynamique non parfaitement mélangé par le modèle de Monod pose clairement des problèmes, quant à la répartition axiale de la croissance. Une forme plus générale et adaptée aux écoulements en milieu poreux saturés pourrait être utilisée afin de mieux rendre compte de ces aspects (Baveye et Valocchi, 1989).

Une autre limite de la méthode, évidente du point de vue technique, réside dans l'obtention même des courbes d'élutions. Les cinétiques étudiées (écoulement, sorption lente et prise en charge par les organismes) doivent être à des niveaux compétitifs afin de pouvoir générer des courbes dont pourront être extraits les paramètres d'aire sous la courbe et de temps d'exposition. Un écoulement trop rapide (par exemple en roc fracturé) ou trop lent (en aquifère d'argile principalement) ne permettront pas d'utiliser cette méthode. Néanmoins, dans ces cas, la problématique de biodisponibilité n'est sans doute pas aussi primordiale. Par contre, pour le cas des rocs fracturés, une fois la contamination ralentie, par exemple par l'application de barrières biologiques, la problématique de biodisponibilité massique et toxique reprend toute son importance et la méthode décrite ici peut alors s'appliquer, sachant que l'écoulement aura été ralenti. De plus, les résultats obtenus dans le second manuscrit, montrant les liens entre les taux de biodisponibilité et les paramètres cinétiques du système, permettront peut-être de s'affranchir de la génération des courbes d'élution à plus long terme. Bien que corrélation ne soit pas causalité, la description des phénomènes de biodisponibilité à l'aide des paramètres cinétiques reste une voie à suivre tout en s'assurant de l'existence ou de l'absence du lien entre concentration et toxicité. En effet, les mécanismes cinétiques ne permettront pas de prédire un comportement global de toxicité, seules des mesures directes le pourront.

Pour finir, il peut être intéressant de revenir au schéma général de la biodisponibilité proposé au cours de l'introduction, à la figure 1.1. Cette approche conceptuelle place la biodisponibilité environnementale entre la disponibilité chimique et les réponses des organismes biologiques. Quelque soit l'angle d'approche, il semble que la véritable biodisponibilité environnementale soit hors d'atteinte. Les estimations, basées sur les données physico-chimiques aussi précises que possible, n'apportent que l'aspect disponibilité, oubliant le bio-. L'utilisation d'organismes biologiques, approche utilisée dans cette thèse, se heurte à la grande spécificité du monde biologique et les réponses en terme de biodisponibilité ne peuvent que varier d'un organisme à l'autre, du point de vue massique comme du point de vue toxique. La biodisponibilité absolue n'existe-t-elle donc pas ? Probablement pas. Comment alors estimer une biodisponibilité relative ? De manière plus pragmatique, par l'utilisation d'une batterie d'organismes sondeurs indigènes ou potentiellement récepteurs. L'estimation de la biodisponibilité pourra suivre une méthodologie générale standardisée, basée sur l'étude cinétique des mécanismes qui contrôlent le devenir des contaminants, mais le choix des organismes se devra d'être spécifique au site étudié et aux points de résurgence possibles des eaux. De plus, une méthode permettant d'intégrer les différents résultats de toxicité environnementale sera nécessaire. L'utilisation de batteries de bioessais dans le but de quantifier la réponse toxique génère de nombreux résultats difficilement analysables dans leur ensemble. Des nouvelles approches vont devoir être développées, qui vont permettre de tenir compte de ces différentes réponses et d'en déduire une évaluation du danger cohérente. La grande variabilité du monde vivant représente une problématique commune aux domaines des sciences de la vie et de telles méthodes pourront apporter une alternative intéressante à la réduction physico-chimique du monde vivant effectuée dans de nombreuses approches. Dans le domaine ci-étudié de décontamination des sites, les outils d'analyse de la biodiversité représentent une avenue novatrice très prometteuse dans ce cadre. La biodisponibilité pourra alors se définir, de manière plus étendue et plus conceptuelle, comme le potentiel de modification de la biodiversité du site.

10. CONCLUSION

Ce travail de recherche expérimentale et conceptuelle sur la biodisponibilité des contaminants organiques lors de leur transport en milieu poreux saturés a mené au développement des aspects suivants:

- une approche de la biodisponibilité qui permet d'intégrer à la fois le devenir du contaminant en terme de perte de masse et en terme de toxicité associée. Les termes de biodisponibilité massique et biodisponibilité toxique ont été générés dans cette thèse,
- une définition de la biodisponibilité lors du transport des contaminants, comme étant le taux d'exposition des récepteurs biologiques aux contaminants. Cette définition est compatible à celle apportée dans les systèmes en pseudo-équilibre, comme étant l'étendue de l'exposition,
- une méthode théorique de quantification basée sur une analyse originale des courbes d'élution massique et toxique desquelles sont extraits deux principaux paramètres: l'aire sous la courbe et le temps d'exposition,
- une méthode expérimentale de quantification, incluant l'utilisation de matériaux modèles (sable standard, résine de rétention spécifique du contaminant, consortium bactérien préactivé au contaminant) permettant la compréhension de la biodisponibilité lors du transport,
- l'introduction des concepts de biodisponibilité instantanée et biodisponibilité intégrale et les méthodes de quantification adaptée à chacune,
- un outil de modélisation des courbes d'élutions massique et toxique, incluant les mécanismes de transport (advection et dispersion), physico-chimique (double compartiment d'ad- et d'absorption) et microbiologique (biodégradation d'ordre 1 ou liée à la croissance limitée).

Ces différents développements théoriques et expérimentaux ont permis d'obtenir les résultats suivants:

- la démonstration du caractère cinétique de la biodisponibilité des contaminants au cours de leur transport,
- la corrélation entre un double nombre de Damkholer comprenant les paramètres cinétiques du système (conductivité hydraulique, cinétique réversible d'absorption et cinétique de biodégradation) et les taux instantanés de biodisponibilité,
- l'influence des microorganismes et principalement de leur cinétique de croissance sur les taux de biodisponibilités instantanés et intégraux, la croissance ayant permis une augmentation majeure du taux de biodisponibilité massique liée à une diminution du taux de biodisponibilité毒ique,
- la corrélation entre le taux de biodégradation instantané et les taux de biodisponibilité instantanés ainsi que entre la croissance intégrale de la population bactérienne et les taux de biodisponibilité intégraux.
- La compréhension du rôle des microorganismes et de leur moyen d'action dans une situation de compétition d'accès au substrat.

L'étude "modèle" (conditions contrôlées, matériaux artificiels, contaminant unique, etc.) menée au cours de cette thèse a permis une meilleure compréhension de la dynamique de la biodisponibilité, mais une telle approche s'éloigne de la réalité et de sa complexité inhérente. Sur les bases de ce qui a été appris, les recommandations se concentrent sur un retour progressif vers la réalité des sites contaminés. Ainsi, les étapes subséquentes sont proposées:

- utilisation de contamination mixtes et complexes, incluant l'huile de dissolution du PCP, la présence de métaux, etc,

- montage en colonnes en série, permettant d'étudier à la suite, la dissolution du PCP de son huile et sa biodisponibilité dans une section aval de l'aquifère, moins contaminée,
- utilisation d'un biotest de toxicité qui puisse sonder plus profondément la biodisponibilité toxique, directement au niveau de la matrice solide, pendant le transport, et non à la sortie de la colonne,
- développement d'une batterie d'essais spécifiques aux sites étudiés et à leurs contaminations.

Néanmoins, certains aspects devraient rester inchangés, notamment le découplage des interactions physico-chimiques et microbiologiques ainsi que le calcul des taux de biodisponibilités basés sur les paramètres extraits des courbes d'élutions: l'aire sous la courbe et le temps d'exposition. Ces paramètres découlent de la définition des taux et sont comparables entre les courbes d'élutions toxique et massique.

11. RÉFÉRENCES

- Al-Bashir, B., Hawari, J., Samson, R. et Leduc, R. (1994). Behavior of nitrogen-substituted napthalenes in flooded soil - Part II. effect of bioavailability on biodegradation kinetics. Water Research, **28**, 1827-1833.
- Alexander, M. (1995). How toxic are toxic chemicals in soil ? Environmental Science and Technology, **29**, 2713-2717.
- Alexander, R. R. et Alexander, M. (1999). Genotoxicity of two polycyclic aromatic hydrocarbons declines as they age in soil. Environmental Toxicology and Chemistry, **18**, 1140-1143.
- Alexander, R. R. et Alexander, M. (2000). Bioavailability of genotoxic compounds in soils. Environmental Science and Technology, **34**, 1589-1593.
- Alleman, B. C., Logan, B. E. et Gilbertson, R. L. (1995). Degradation of pentachlorophenol by fixed films of white rot fungi in rotating tube bioreactors. Water Research, **29**, 61-67.
- Ames, T. T. et Gruke, E. A. (1995). Group contribution method for predicting equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environmental Science and Technology, **29**, 2273-2279.
- Angley, J. T., Brusseau, M. L., Lamar Miller, W. et Delfino, J. J. (1992). Nonequilibrium sorption and aerobic biodegradation of dissolved alkylbenzenes during transport in aquifer material: column experiments and evaluation of a coupled-process model. Environmental Science and Technology, **26**, 1404-1410.

- Arsenault, R. D. (1976). Pentachlorophenol and contained chlorinated dibenzodioxins in the environment. Washington, D.C., American Wood-Preservers' Association.
- Ball, W. P. et Roberts, P. V. (1991). Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material. 2. Intraparticle diffusion. Environmental Science and Technology, 25, 1237-1249.
- Baveye, P. et Bladon, R. (1999). Bioavailability of organic xenobiotics in the environment: a critical perspective. Bioavailability of organic xenobiotics in the environment - Practical consequences for the environment. P. Baveye, J.-C. Block and V. V. Goncharuk, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Baveye, P., Block, J.-C. et Goncharuk, V. V., Eds. (1999). Bioavailability of organic xenobiotics in the environment - Practical consequences for the environment. ASI, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Baveye, P. et Valocchi, A. (1989). An evaluation of mathematical models of the transport of biologically reacting solutes in saturated soils and aquifers. Water Resources Research, 25, 1413-1421.
- Beaulieu, M., Bécaert, V., Deschênes, L. et Villemur, R. (*in press*). Evolution of bacterial diversity during enrichment of PCP-degrading activated soils. Microbial Ecology.
- Bécaert, V., Beaulieu, M., Gagnon, J., Villemur, R., Deschênes, L. et Samson, R. (1999). Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of soil contaminated with wood-preservation compounds. Bioremediation of Nitroaromatic and Halogenated Compounds. B. C. Alleman and A. Leeson, Battelle Press, Columbus, OH.

Borden, R. C. et Bedient, P. B. (1986). Transport of dissolved hydrocarbons influenced by oxygen-limited biodegradation. 1. Theoretical development. Water Resources Research, 22, 1973-1982.

Bosma, T. N. P., Middeldorp, P. J. M., Schraa, G. et Zehnder, A. J. B. (1997). Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. Environmental Science and Technology, 31, 248-252.

Boyd, S. A., Mikesell, M. D. et Lee, J.-F. (1989). Chlorophenols in soils. Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils, SSSA, Madison, WI.

Brusseau, M. L. (1992). Nonequilibrium transport of organic chemicals: the impact of pore-water velocity. Journal of Contaminant Hydrology, 9, 353-368.

Brusseau, M. L., Hu, M. Q., Wang, J.-M. et Maier, R. M. (1999). Biodegradation during contaminant transport in porous media. 2. The influence of physicochemical factors. Environmental Science and Technology, 33, 96-103.

Brusseau, M. L. et Rao, P. S. C. (1991). Nonequilibrium sorption of organic chemicals: elucidation of rate-limiting processes. Environmental Science and Technology, 25, 134-142.

Cassels, N. P., Lane, C. S., Depala, M., Saeed, M. et Craston, D. H. (2000). Microtox testing of pentachlorophenol in soil extracts and quantification by capillary electrochromatography (CEC). Chemosphere, 40, 609-618.

Chapelle, F. H. (1993). Groundwater Microbiology and Geochemistry, John Wiley & Sons, New York, NY.

Chiou, C. T. (1989). Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. B. L. Sawhney and K. Brown, SSSA, Madison, WI.

Chiou, C. T., Porter, P. E. et Schmedding, D. W. (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environmental Science and Technology, 17, 227-231.

Christensen, T. H., Kjeldsen, P., Albrechtsen, H.-J., Heron, G., Nielsen, P. H., Bjerg, P. L. et Holm, P. E. (1994). Attenuation of landfill leachate pollutants in aquifers. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 24, 119-202.

Chung, G.-Y., McCoy, B. J. et Scow, K. M. (1993). Criteria to assess when biodegradation is kinetically limited by intraparticle diffusion and sorption. Biotechnology and Bioengineering, 41, 625-632.

Chung, N. et Alexander, M. (1998). Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils. Environmental Science and Technology, 32, 855-860.

Compte-Sponville, A. (1996). L'être-Temps. Quelques réflexions sur le temps de la conscience. Le temps et sa flèche, E. Klein et M. Spiro, Champs-Flammarion, Paris.

Crawford, R. L. et Mohn, W. W. (1985). Microbiological removal of pentachlorophenol from a soil using a *Flavobacterium*. Enzyme Microbial Technology, 7, 617-620.

Crocker, F. H., Guerin, W. F. et Boyd, S. A. (1995). Bioavailability of naphthalene sorbed to cationic surfactant-modified smectite clay. Environmental Science and Technology, 29, 2953-2958.

Cull, M. R., Dobbs, A. J., Goudot, M. et Schultz, N. (1984). Polychlorodibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in technical pentachlorophenol - Results of a collaborative analytical exercise. Chemosphere, 13, 1157.

Cuypers, M. P., Grotenhuis, J. T. C. et Rulkens, W. H. (1999). Prediction of PAH bioavailability in soils and sediments by persulfateoxidation in. *In Situ and On Site Bioremediation*, San Diego, CA.

Davies, N. A., Edwards, P. A., Lawrence, M. A. M., Taylor, M. G. et Simkiss, K. (1999). Influence of particle surfaces on the bioavailability to different species of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol. Environmental Science and Technology, 33, 2465-2468.

Deschênes, L., Lafrance, P., Villeneuve, J. P. et Samson, R. (1995). The effect of an ionic surfactant on the mobilization and biodegradation of PAHs in a creosote-contaminated soil. Hydrological Sciences, 40, 471-484.

Déziel, E., Paquette, G., Villermur, R., Lépine, F. et Bisailon, J.-G. (1996). Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology, 62, 1908-1912.

Dickson, K. L., Giesy, J. P., Parrish, R. et Wolfe, L. (1994). Closing Remarks - Summary and Conclusions. Bioavailability. Physical, Chemical and Biological Interactions. J. L. Hamelink, P. F. Landrum, H. L. Bergman and W. H. Benson, CRC Press, Boca Raton, FL.

- Divincenzo, J. P. et Sparks, D. L. (1997). Slow sorption kinetics of pentachlorophenol on soil: concentration effects. Environmental Science and Technology, 31, 977-983.
- Doong, R.-A., Wu, S.-C. et Chen, T.-F. (1998). Modeling transport and fate of chlorinated hydrocarbons governed by biotic transformation in porous media. Water Research, 32, 39-46.
- Dudal, Y., Deschênes, L. et Samson, R. (1999a). Quantifying mass and toxic bioavailability rates of organics in saturated porous media. Bioremediation of Nitroaromatics and Haloaromatic Compounds. B. C. Alleman and A. Leeson, Columbus, OH.
- Dudal, Y., Deschênes, L. et Samson, R. (1999b). Quantifying the intrinsic bioremediation potential and the hazard index of organic xenobiotics in aquifers based on their bioavailability rates, Bioavailability of organic xenobiotics in the environment - Practical consequences for the environment. P. Baveye, J.-C. Block and V. V. Goncharuk, KLUWER Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Dudal, Y., Samson, R. et Deschênes, L. (2000). Non-Bioavailable transport of pentachlorophenol through saturated porous media. Groundwater Research. P. L. Bjerg, P. Engesgaard and T. D. Krom, Balkema, Rotterdam.
- Dudal, Y., Samson, R. et Deschênes, L. (Submitted). Quantifying mass and toxic bioavailability rates of pentachlorophenol during transport through saturated porous media. Environmental Science and Technology.
- Edgehill, R. U. (1996). Degradation of pentachlorophenol (PCP) by *Arthrobacter* strain ATCC 33790 in biofilm culture. Water Research, 30, 357-363.

Edgehill, R. U. et Finn, R. K. (1983). Microbial treatment of soil to remove pentachlorophenol. Applied and Environmental Microbiology, 45, 1122-1125.

Engebretson, R. R., Amos, T. et Von Wandruszka, R. (1996). Quantitative approach to humic acid associations. Environmental Science and Technology, 30, 990-997.

Ensminger, L. E. et Giesecking, J. E. (1942). Soil Science, 53, 205.

Escher, B. I. et Schwarzenbach, R. P. (1996). Partitioning of substituted phenols in liposome-water, biomembrane-water and octanol-water systems. Environmental Science and Technology, 30, 260-270.

Fetter, C. W. (1993), Contaminant Hydrogeology. Maxwell Macmillan Canada Inc., Don Mills, ON.

Freeman, D. H. et Cheung, L. S. (1981). A gel partition model for organic desorption from a pond sediment. Science, 214, 790-792.

Freeze, R. A. et Cherry, J. A. (1979). Groundwater. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.

Gamerdinger, A. P., Lemley, A. T. et Wagenet, R. J. (1991). Nonequilibrium sorption and degradation of three 2-chloro-s-triazine herbicides in soil-water systems. Journal of Environmental Quality, 20, 815-822.

Gebefugi, I., Parlar, H. et Korte, F. (1979). Occurrence of pentachlorophenol in enclosed environments. Ecotoxicology and Environmental Safety, 3, 269-300.

Gillette, J. S., Luthy, R. G., Clemett, S. J. et Zare, R. N. (1999). Direct observation of polycyclic aromatic hydrocarbons on geosorbents at the subparticle scale. Environmental Science and Technology, 33, 1185-1192.

Glick, B. R. et Pasternak, J. J. (1994), Molecular Biotechnology. Principles & Applications of Recombinant DNA. ASM Presss, Washington, D.C..

Gobas, F. A. P. C. et Zhang, X. (1994). Interactions of organic chemicals with particulate and dissolved organic matter in the aquatic environment. Bioavailability. Physical, Chemical and Biological Interactions. J. L. Hamelink, P. F. Landrum, H. L. Bergman and W. H. Benson, CRC Press, Boca Raton, FL.

Gordon, A. S. et Millero, F. J. (1985). Adsorption mediated decrease in the biodegradation rate of organic compounds. Microbial Ecology, 11, 289-298.

Greer, L. E. et Shelton, D. R. (1992). Effect of inoculant strain and organic matter content on kinetics of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation in soil. Applied and Environmental Microbiology, 58, 1459-1465.

Guerin, W. F. et Boyd, S. A. (1992). Differential bioavailability of soil-sorbed naphtalene to two bacterial species. Applied and Environmental Microbiology, 58, 1142-1152.

Guerin, W. F. et Boyd, S. A. (1997). Bioavailability of naphtalene associated with natural and synthetic sorbents. Water Research, 31, 1504-1512.

Guthrie, E. A. et Pfaender, F. K. (1998). Reduced pyrene bioavailability in microbially active soils. Environmental Science and Technology, 32, 501-508.

Haderlein, S. B., Weissmahr, K. W. et Schwarzenbach, R. P. (1996). Specific adsorption of nitroaromatic explosives and pesticides to clay minerals. Environmental Science and Technology, 30, 612-622.

Hale, D. D., Reineke, W. et Wiegel, J. (1994). Chlorophenol degradation. Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals. G. Rasol Chaudry, Diosconides Press, Portland, OR.

Hamelink, J. L., Landrum, P. F., Bergman, H. L. et Benson, W. H. (1994), Bioavailability. Physical, Chemical and Biological Interactions. CRC Press, Boca Raton, FL.

Harms, H. et Zehnder, A. J. B. (1995). Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran. Applied and Environmental Microbiology, 61, 27-33.

Hassett, J. J. et Banwart, W. L. (1989). The sorption of nonpolar organics by soils and sediments. Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. B. L. Sawhney and K. Brown, SSSA, Madison, WI 53711.

Hatzinger, P. B. et Alexander, M. (1995). Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. Environmental Science and Technology, 29, 537-545.

Herman, D. C., Lenhard, R. J. et Miller, R. M. (1997). Formation and removal of hydrocarbon residual in porous media: effects of attached bacteria and biosurfactants. Environmental Science and Technology, 31, 1290-1294.

Hrudey, S. E., Chen, W. et Rousseaux, C. G. (1996). Bioavailability in environmental risk assessment. CRC Presss, Boca Raton, FL.

Hsieh, M.-M. et Dorsey, J. G. (1995). Bioavailability estimation by reverse-phase liquid chromatography: high bonding density C-18 phases for modeling biopartitioning processes. Analytical Chemistry, 67, 48-57.

Huesemann, M. H. (1997). Incomplete hydrocarbon biodegradation in contaminated soils: limitations in bioavailability or inherent reclacitrance? Bioremediation Journal, 1, 27-39.

Hutzler, N. C., Crittenden, J. C., Gierke, J. S. et Johnson, A. S. (1986). Transport of organic compounds with saturated groundwater flows: experimental results. Water Resources Research, 22, 285-295.

Jackson, D. R. et Bisson, D. L. (1990). Mobility of polychlorinated aromatic compounds in soils contaminated with wood-preserving oil. Journal of the Air and Waste Management Association, 40, 1129-1133.

Jacobsen, B. N. et Arvin, E. (1996). Biodegradation kinetics and fate modelling of pentachlorophenol in bioaugmented activated sludge reactors. Water Research, 30, 1184-1194.

Jafvert, C. T., Westall, J. C., Grieder, E. et Schwarzenbach, R. P. (1990). Distribution of hydrophobic ionogenic organic compounds between octanol and water: organic acids. Environmental Science and Technology, 24, 1795-1803.

Jarvinen, K. T., Melin, E. S. et Puhakka, J. A. (1994). High-rate bioremediation of chlorophenol-contaminated groundwater at low temperatures. Environmental Science and Technology, 28, 2387-2392.

Jaspers, M. C. M., Totevova, S., Demnerova, K., Harms, H. et Van Der Mer, J. R. (1999). The use of whole-cell living biosensors to determine the bioavailability of pollutants to microorganisms. Bioavailability of organic xenobiotics in the environment - Practical consequences for the environment. P. Baveye, J.-C. Block and V. V. Goncharuk, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Kaiser, L. E. et Valdmanis, I. (1982). Apparent octanol/water partition coefficients of pentachlorophenol as a function of pH. Canadian Journal of Chemistry, 60, 2104-2106.

Karickhoff, S. W. (1980). Sorption kinetics of hydrophobic pollutants in natural sediments. Contaminants and Sediments. R. A. Baker, Ann Arbor Press, Ann Arbor, MI.

Karickhoff, S. W., Brown, D. S. et Scott, T. A. (1979). Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. Water Research, 13, 241-248.

Kelsey, J. W. et Alexander, M. (1997). Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds. Environmental Toxicology and Chemistry, 16, 582-585.

Kelsey, J. W., Kottler, B. D. et Alexander, M. (1997). Selective chemicals extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. Environmental Science and Technology, 31, 214-217.

Kitunen, V. H., Valo, R. J. et Salkinoja-Salonen, M. S. (1987). Contamination of soil around wood-preserving facilities by polychlorinated aromatic compounds. Environmental Science and Technology, 21, 96-101.

Knezovich, J. P. (1994). Chemical and biological factors affecting bioavailability of contaminants in seawater. Bioavailability. Physical, Chemical and Biological

Interactions. J. L. Hamelink, P. F. Landrum, H. L. Bergman and W. H. Benson, CRC Press, Boca raton, FL.

Knoke, K. L., Marwood, T. M., Cassidy, M. B., Liu, D., Seech, A. G., Lee, H. et Trevors, J. T. (1999). A comparison of five bioassays to monitor toxicity during bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil. Water, Air, and Soil Pollution, 110, 157-169.

Knox, R. C., Sabatini, D. A. et Canter, L. W. (1993). Subsurface Transport and Fate Processes. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

Kopinke, F.-D., Porschmann, J. et Stottmeister, U. (1995). Sorption of organic pollutants on anthropogenic humic matter. Environmental Science and Technology, 29, 941-950.

Kukkonen, J. et Oikari, A. (1991). Bioavailability of organic pollutants in boreal waters with varying levels of dissolved organic material. Water Research, 25, 455-463.

Lafrance, P., Marineau, L., Perreault, L. et Villeneuve, J.-P. (1994). Effect of natural dissolved organic matter found in groundwater on soil adsorption and transport of pentachlorophenol. Environmental Science and Technology, 28, 2314-2320.

Laine, M. M. et Jorgensen, K. S. (1996). Straw compost and bioremediated soil as inocula for the bioremediation of chlorophenol-contaminated soil. Applied and Environmental Microbiology, 62, 1507-1513.

Landis, W. G. et Yu, M.-H. (1995). Introduction to Environmental Toxicology. Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems. CRC Press, Boca Raton, FL.

Landrum, P. F., Hayton, W. L., Lee II, H., McCarty, L. S., Mackay, D. et McKim, J. M. (1994). Synopsis of discussion session on the kinetics behind environmental bioavailability. Bioavailability. Physical, Chemical and Biological Interactions. J. L. Hamelink, P. F. Landrum, H. L. Bergman and W. H. Benson, CRC Press, Boca Raton, FL.

Landrum, P. F., Reinhold, M. D., Nihart, S. R. et Eadie, B. J. (1985). Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoporeia Hohi* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter. Environmental Toxicology and Chemistry, 4, 459-467.

Lee, L. S., Bellin, C. A., Pinal, R. et Rao, P. S. C. (1993). Cosolvent effects on sorption of organic acids by soils from mixed solvents. Environmental Science and Technology, 27, 165-171.

Lee, L. S. et Rao, P. S. C. (1996). Impact of several water-miscible organic solvents on sorption of benzoic acid by soil. Environmental Science and Technology, 30, 1533-1539.

Lee, L. S., Rao, P. S. C. et Brusseau, M. L. (1991). Nonequilibrium sorption and transport of neutral and ionized chlorophenols. Environmental Science and Technology, 25, 722-729.

Lee, L. S., Rao, P. S. C., Nkedi-Kizza, P. et Delfino, J. J. (1990). Influence of solvent and sorbent characteristics on distribution of pentachlorophenol in octanol-water and soil-water systems. Environmental Science and Technology, 24, 654-661.

Levenspiel, O. (1972). Chemical Reaction Engineering. John Wiley & Sons Inc., New York, NY.

Lin, J.-E. et Wang, H. Y. (1991). Degradation of pentachlorophenol by non-immobilized, immobilized and co-immobilized *Arthrobacter* cells. Journal of fermentation and bioengineering, 72, 311-314.

Logan, B. E., Alleman, B. C., Amy, G. L. et Gilbertson, R. L. (1994). Adsorption and removal of pentachlorophenol by white rot fungi in batch culture. Water Research, 28, 1533-1538.

Loibner, A. P., Holzer, M., Szolar, O., Boller, V. et Braun, R. (1999). Sequential supercritical fluid extraction for predicting biodegradation rates and ecotoxicological impact of PAHs in soil. in. *In Situ and On Site Bioremediation*, San Diego, CA.

Luehrs, D. C., Hickey, J. P., Nilsen, P. E., Godbole, K. A. et Rogers, T. N. (1996). Linear solvation energy relationship of the limiting partition coefficient of organic solutes between water and activated carbon. Environmental Science and Technology, 30, 143-152.

Luthy, R. G., Aiken, G. R., Brusseau, M. L., Cunningham, S. D., Gschwend, P. M., Pignatello, J. J., Reinhard, M., Traina, S. J., Weber Jr, W. J. et Westall, J. C. (1997). Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. Environmental Science and Technology, 31, 3341-3347.

Mayer Jr., F. L., Marking, L. L., Bills, T. D. et Howe, G. E. (1994). Physicochemical factors affecting toxicity in freshwater: hardness, pH, and temperature. Bioavailability, Physical, Chemical and Biological interactions. J. L. Hamelink, P. F. Landrum, H. L. Bergman and W. H. Benson, CRC Press, Boca Raton, FL.

McCarty, P. L., Reinhard, M. et Rittman, B. E. (1981). Trace organics in groundwater. Environmental Science and Technology, 15, 40-51.

McCarty, P. L., Rittmann, B. E. et Bouwer, E. J. (1984). Microbiological processes affecting chemical transformations in groundwater. Groundwater Pollution Microbiology. G. Bitton and C. P. Gerba, John Wiley & Sons, New York, NY.

Mihelcic, J. R. et Luthy, R. G. (1991). Sorption and microbial degradation of naphthalene in soil-water suspensions under denitrification conditions. Environmental Science and Technology, 25, 169-177.

Mikesell, M. D. et Boyd, S. A. (1986). Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 52, 861-865.

Morrison, D. E. et Alexander, M. (1997). Biodegradability of nonaqueous-phase liquids affects the mineralization of phenanthrene in soil because of microbial competition. Environmental Toxicology and Chemistry, 16, 1561-1567.

Morrison, D. E., Robertson, B. K. et Alexander, M. (2000). Bioavailability to earthworms of aged DDT, DDE, DDD, and Dieldrin in soil. Environmental Science and Technology, 34, 709-713.

Mueller, J. G., Lantz, S. E., Ross, D., Colvin, R. J., Middaugh, D. P. et Pritchard, P. H. (1993). Strategy using bioreactors and specially selected microorganisms for bioremediation of groundwater contaminated with creosote and pentachlorophenol. Environmental Science and Technology, 27, 691-698.

Nam, K. et Alexander, M. (1998). Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability: tests with model solids. Environmental Science and Technology, 32, 71-74.

Nkedi-Kizza, P., Brusseau, M. L., Rao, P. S. C. et Hornsby, A. G. (1989). Nonequilibrium sorption during displacement of hydrophobic organic chemicals and ^{45}Ca through soil columns with aqueous and mixed solvents. Environmental Science and Technology, 23, 814-820.

Nzengung, V. A., Voudrias, E. A., Nkedi-Kizza, P., Wampler, J. M. et Weaver, C. E. (1996). Organic cosolvent effects on sorption equilibrium of hydrophobic organic chemicals by organoclays. Environmental Science and Technology, 30, 89-96.

Otte, M.-P., Gagnon, J., Comeau, Y., Matte, N., Greer, C. W. et Samson, R. (1994). Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/creosote contaminated soils. Applied Microbiology and Biotechnology, 40, 926-932.

Pignatello, J. J., Ferrandino, F. J. et Huang, L. Q. (1993). Elution of aged and freshly added herbicides from a soil. Environmental Science and Technology, 27, 1563-1571.

Pignatello, J. J., Johnson, L. K., Martinson, M. M., Carlson, R. E. et Crawford, R. L. (1985). Response of the microflora in outdoor experimental streams to pentachlorophenol: compartmental contributions. Applied and Environmental Microbiology, 50, 127-132.

Pignatello, J. J., Martinson, M. M., Steiert, J. G., Carlson, R. E. et Crawford, R. L. (1983). Biodegradation and photolysis of pentachlorophenol in artificial freshwater streams. Applied and Environmental Microbiology, 46, 1024-1031.

- Pignatello, J. J. et Xing, B. (1996). Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. Environmental Science and Technology, 30, 1-11.
- Ramaswami, A. et Luthy, R. G. (1997). Measuring and modeling physicochemical limitations to bioavailability and biodegradation. Manual of Environmental Microbiology. C. J. Hurst, ASM Press, Washington, D.C..
- Rao, K. R. (1978). Pentachlorophenol - Chemistry, Pharmacology, and Environmental Toxicology. Plenum Presss, New York, NY.
- Rebhun, M., Kalabo, R., Grossman, L., Manka, J. et Rav-Avha, C. (1992). Sorption of organics on clay and synthetic humic-clay complexes simulating aquifer processes. Water Research, 26, 79-84.
- Rehbun, M., De Smedt, F. et Rwetabula, J. (1996). Dissolved humic substances for remediation of sites contaminated by organic pollutants. Binding-desorption model predictions. Water Research, 30, 2027-2038.
- Rice, C. P. et O'Keefe, P. (1995). Sources, pathways, and effects of PCBs, dioxins, and dibenzofurans. Handbook of Ecotoxicology. D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton Jr. and J. Cairns Jr., CRC Press, Boca Raton, FL.
- Richnow, H. H., Seifert, R., Hefter, J., Link, M., Francke, W., Schaefer, G. et Michaelis, W. (1997). Organic pollutants associated with macromolecular soil organic matter: mode of binding. Organic Geochemistry, 26, 745-758.
- Rijnaarts, H. H. M., Bachmann, A., Jumelet, J. C. et Zehnder, A. J. B. (1990). Effect of desorption and intraparticle mass transfer on the aerobic biomineralization of alpha-

hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil. Environmental Science and Technology, 24, 1349-1354.

Ripp, S., Nivens, D. E., Ahn, Y., Werner, C., Jarrell IV, J., Easter, J. P., Cox, C. D., Burlage, R. S. et Sayler, G. S. (2000). Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control. Environmental Science and Technology, 34, 846-853.

Ritschel, W. A. (1988). Pharmacokinetic and biopharmaceutical aspects in drug delivery. Drug Delivery Devices. Fundamentals and Applications. P. Tyle, Marcel Dekker Inc., New York, NY.

Ritz, S. M. (1996). States speak out on natural attenuation. Soil & Groundwater Cleanup, 18-27.

Robertson, B. K. et Alexander, M. (1998). Sequestration of DDT and dieldrin in soil: disappearance of acute toxicity but not the compounds. Environmental Toxicology and Chemistry, 17, 1034-1038.

Robinson, K. G., Farmer, W. S. et Novak, J. T. (1990). Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. Water Research, 24, 345-350.

Robinson, K. G. et Novak, J. T. (1994). Fate of 2,4,6-trichloro-(¹⁴C)-phenol bound to dissolved humic acid. Water Research, 28, 445-452.

Ross, N., Deschênes, L., Bureau, J., Clément, B., Comeau, Y. et Samson, R. (1998). Ecotoxicological assessment and effects of physicochemical factors on biofilm development in groundwater conditions. Environmental Science and Technology, 32, 1105-1111.

- Sabijic, A. (1987). On the prediction of soil sorption coefficients of organic pollutants from molecular structure: application of molecular topology model. Environmental Science and Technology, 21, 358-366.
- Schellenberg, K., Leuenberger, C. et Schwarzenberger, R. P. (1984). Sorption of chlorinated phenols by natural sediments and aquifer materials. Environmental Science and Technology, 18, 652-657.
- Schenk, T., Muller, R. et Lingens, F. (1990). Mechanism of enzymatic dehalogenation of pentachlorophenol by *Arthrobacter* sp. strain ATCC 33790. Journal of Bacteriology, 172, 7272-7274.
- Schwarzenbach, R. P., Gschwend, P. M. et Imboden, D. M. (1993). Environmental Organic Chemistry. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Seagren, E. A., Rittmann, B. E. et Valocchi, A. J. (1993). Quantitative evaluation of flushing and biodegradation for enhancing in situ dissolution of nonaqueous-phase liquids. Journal of Contaminant Hydrology, 12, 103-132.
- Spurlock, F. C. et Biggar, J. W. (1994). Thermodynamics of organic chemical partition in soils. 1. Development of a general partition model and application to linear isotherms. Environmental Science and Technology, 28, 989-995.
- Standley, L. J. (1997). Effect of sedimentary organic matter composition on the partitioning and bioavailability of dieldrin to the oligochaete *Lumbriculus variegatus*. Environmental Science and Technology, 31, 2577-2583.

- Steen, W. C., Paris, D. F. et Baughman, G. L. (1980). Effects of sediment sorption on microbial degradation of toxic substances. Contaminants and Sediments. R. A. Baker, Ann Arbor Press, Ann Arbor, MI.
- Steinberg, S. M., Pignatello, J. J. et Sawhney, B. L. (1987). Persistence of 1,2-dibromoethane in soils: entrapment in intraparticle micropores. Environmental Science and Technology, 21, 1201-1208.
- Todd, D. K. (1980). Groundwater Hydrology. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Traina, S. J., McAvoy, D. C. et Versteeg, D. J. (1996). Association of linear alkylbenzenesulfonates with dissolved humic substances and its effect on bioavailability. Environmental Science and Technology, 30, 1300-1309.
- Umbreit, T. H., Hesse, E. J. et Gallo, M. A. (1986). Bioavailability of dioxin in soil from a 2,4,5-T manufacturing site. Science, 232, 497-499.
- Valo, R., Kitunen, V., Salkinoja-Salonen, M. et Raisanen, S. (1984). Chlorinated phenols as contaminants of soil and water in the vicinity of two finnish sawmills. Chemosphere, 13, 835-844.
- van Loon, W. M. G. M., Wijnker, F. G., Verwoerd, M. E. et Hermens, J. L. M. (1996). Quantitative determination of total molar concentrations of bioaccumulatable organic micropollutants in water using C18 empose disk and molar detection techniques. Analytical Chemistry, 68, 2916-2926.
- Voice, T. C. et Weber Jr, W. J. (1983). Sorption of hydrophobic compounds by sediments, soils and suspended solids - I Theory and background. Water Research, 17, 1433-1441.

- Weber, J. B. et Coble, H. D. (1968). Microbial decomposition of diquat adsorbed on montmorillonite and kaolinite clays. Journal of agriculture and food chemistry, 16, 475-478.
- Weber JR, W. J., McGinley, P. M. et Katz, L. E. (1991). Sorption phenomena in subsurface systems: concepts, models and effects on contaminant fate and transport. Water Research, 25, 499-528.
- Weinbach, E. C. (1957). Biochemical basis for the toxicity of pentachlorophenol. Proceedings of the National Academy of Science, 43, 393-397.
- Westall, J. C., Leuenberger, C. et Schwarzenbach, R. P. (1985). Influence of pH and ionic strength on the aqueous-nonaqueous distribution of chlorinated phenols. Environmental Science and Technology, 19, 193-198.
- White, J. C. et Alexander, M. (1996). Reduced biodegradability of desorption-resistant fractions of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and aquifer solids. Environmental Toxicology and Chemistry, 15, 1973-1978.
- White, J. C., Kelsey, J. W., Hatzinger, P. B. et Alexander, M. (1997). Factors affecting sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils. Environmental Toxicology and Chemistry, 16, 2040-2045.
- White, J. C., Quinones-Rivera, A. et Alexander, M. (1998). Effect of wetting and drying on the bioavailability of organic compounds sequestered in soil. Environmental Toxicology and Chemistry, 17, 2378-2382.

- Wilkes, H., Wittich, R.-M., Timmis, K. N., Fortnagel, P. et Francke, W. (1996). Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins by *Sphingomonas* sp. Strain RW1. Applied and Environmental Microbiology, 62, 367-371.
- Wu, S.-C. et Gschwend, P. M. (1986). Sorption kinetics of hydrophobic organic compounds to natural sediments and soils. Environmental Science and Technology, 20, 717-725.
- Xing, B. et Pignatello, J. J. (1997). Dual-mode sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinyl chloride) and soil organic matter. Environmental Science and Technology, 31, 792-799.
- Zhang, W.-X., Bouwer, E. J. et Ball, W. P. (1998). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants: effects and implications of sorption-related mass transfer on bioremediation. GWMR, Winter 1998, 126-138.
- Zhao, X. et Voice, T. C. (2000). Assessment of bioavailability using a multicolumn system. Environmental Science and Technology, 34, 1506-1512.
- Zwiernik, M. J., Quensen III, J. F. et Boyd, S. A. (1999). Residual petroleum in sediments reduces the bioavailability and rate of reductive dechlorination of Aroclor 1242. Environmental Science and Technology, 33, 3574-3578.

12. ANNEXES

Annexe 1 : Protocole 7A

	
PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole # :7A	Nombres de pages :3
Version :1	Date :23/02/2000
Auteurs : <u>Yves Dudal</u>	
Approuvé par :	Signatures : <u>Louise Deschênes</u> Date : <u>1-sept 2000</u>
<u>Louise Deschênes</u>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>
<p>Titre : Bioactivation d'un sable standard par un consortium bactérien provenant d'un sol contaminé, pour la biodégradation du PCP</p> <p>Mots clés : bioactivation, PCP, sable standard</p>	

1. OBJECTIF(S) :

Rendre un sable standard bioactif envers le PCP

2. MATÉRIELS :

Milieu salin minimal

Bouteille ambrée

Montage du projet de Valérie (PE16E)

Solution de NaPCP à 10g/L dans NaOH 0,25M

Boe activée provenant d'un site contaminé au PCP (cf projet Valérie, PE16E)

Spectrophotomètre UV-visible et cuvettes de lecture compatible UV

Module de filtration avec filtres à 0,45µm et seringues gastight en verre et téflon

Buchner et filtre cellulose à 8µm

Tamis à 90µm

Pipette en verre de 5mL

Centrifugeuse Eppendorf à 13000 rpm et tubes eppendorf (1,5 ou 2 mL)

3. MÉTHODOLOGIE :

Préparer 1 litre de milieu salin minimal (MSM) selon la composition suivante, en grammes :

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,883
K ₂ HPO ₄	2,257
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,096
NaNO ₃	1,001

À cette solution est ajoutée 1 mL/L de la solution suivante de composition, en mg/L :

Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	291
AlK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	474
CuSO ₄	160
ZnSO ₄ .7H ₂ O	288
FeSO ₄ .7H ₂ O	2780

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Page 3

MnSO ₄ .H ₂ O	1690
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	482
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	2362

Bien mélanger la boue activée initiale et la passer sur le tamis à 90µm. Récupérer la boue plus légère et la filtrer à 8µm sous vide à l'aide du buchner. Il est nécessaire de changer régulièrement de filtre. Essayer d'obtenir environ 300 mL de solution contenant des micro-organismes en suspension. Diluer cette solution à l'aide de milieu salin minimal jusqu'à remplir la bouteille ambree au 4/5^{ème}. À ce moment, la concentration en microorganismes est très faible, du fait des filtrations séquentielles, donc la bioactivation qui suit doit démarer en ajoutant une concentration faible de PCP. Une concentration comprise entre 1 et 5 mg/L est bienvenue. La disparition du PCP est suivie par prise journalière d'échantillon d'environ 3 mL qui est filtré à 0,45µm à l'aide du module de filtration. Le filtrat est récupéré dans une cuvette de lecture UV et passé au spectrophotomètre pour lecture à 319 nm. Dès que le PCP a disparu du milieu, rajouter une concentration supérieure et ainsi de suite jusqu'à l'obtention du degré de bioactivation voulu.

Une fois la bioactivation en phase liquide effectuée, 3,3 L de cette phase sont transvasés dans le contenant de 10 L du montage de Valérie (PE 16) et 2 kg de sable standard sont rajoutés. L'agitation est réglée à 250 rpm et 4,5L/min d'air humide sont injectés dans le mélange biphasique. Du PCP est rajouté pour poursuivre l'activation. 2 jours plus tard, la phase aqueuse est retirée du milieu et du MSM frais est rajouté au sable. 3mL de la solution de PCP à 10g/L sont ajoutés afin de redémarrer une bioactivation pour le sable. En effet, les microorganismes se répartissent entre la phase aqueuse et la phase solide, mais préféablement dans la phase aqueuse ; ainsi, à chaque changement de phase aqueuse, une grande partie des microorganismes est extraite du milieu et la concentration de PCP à rajouter par la suite doit être relativement faible (5 ppm). Le suivi du PCP dans ce réacteur biphasique se fait de la manière suivante : 4 mL de phase aqueuse sont pris à l'aide d'une pipette de 5mL en verre ; les 4mL sont réapris dans 3 tubes eppendorf qui sont centrifugés à 13000rpm ; les surnageants des 3 tubes sont récupérés dans une même seringue et le tout est filtré à 0,45µm puis analysé en UV à 319 nm. Un exemple de schéma à suivre pour une bioactivation du sable suffisante est le suivant :

jour 1 : ajout de 5 mL : DO=0,310
 jour 2 : DO=0,275 ajout de 3 mL : DO=0,400
 jour 3 : DO=0,215 ajout de 10 mL : DO=0,670
 jour 4 : DO=0,137 ajout de 20 mL : DO=1,173
 jour 5 : DO=0,318 ajout de 35 mL : DO=1,860
 jour 6 : DO=0,519 ajout de 35 mL : DO=1,970
 jour 7 : DO=0,215 le sable est bioactif

Le total de PCP ajouté est de 108 mL pour un volume de 3,3L. La valeur de 110 mL pour 3,3L semble être le maximum à ne pas dépasser afin de garder un rapport C/N non inhibiteur pour les microorganismes.

4. RÉFÉRENCES :

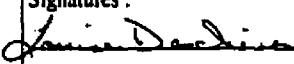
PE16E

5. RECOMMANDATIONS :

La méthode est très efficace lorsque la concentration cellulaire n'est pas trop importante. Dès lors qu'un certain seuil est passé, la biodégradation se fait beaucoup plus lentement, sans doute du à une limitation d'un des nutriments du milieu (rapport C/N trop fort). La solution est alors de diluer la solution de bioactivation avec du MSM dans une autre bouteille ambrée. Une augmentation quasi immédiate du taux de biodégradation est alors observable.

6. ANNEXES :**7. RÉFÉRENCES :**

Annexe 2 : Protocole 7B

		
PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL		
Protocole # : 7B	Nombres de pages : 4	
Version : 1	Date : 23/02/2000	
Auteurs : <u>Yves Dudal</u>		
Approuvé par :	Signatures :	Date :
<u>Louise Deschênes</u>		<u>13/02/2000</u>
<input type="checkbox"/>		
.	<input type="checkbox"/>	
	<input type="checkbox"/>	
Titre : Obtention de courbes d'élutions hydrodynamique, abiotique et biotique		
Mots clés : Elution, colonne, traçage, retard, sorption, biodegradation, milieu poreux saturé		

1. OBJECTIF(S) :

Obtenir des courbes d'élutions de contaminant organique au travers d'un milieu poreux saturé.

2. MATÉRIELS :

Colonne Chromaflex de pré-chromatographie (VWR Canlab)

Tubes en tygon avec recouvrement inférieur en téflon (SE-200 PlasticMiller), ID=1/8 po

Connecteurs type QuickConnect (interrupteurs de débit) en métal (Fisher), 2 mâles, 2 femelles

Pompe péristaltique Masterflex avec tête spéciale pour tubes en téflon + tube spéciale tête

Solution de tritium dans du MSM à environ 5000 cpm

Solution de PCP à 14 mg/L dans du MSM

Sable standard bioactivé par un consortium bactérien (cf PE7A)

Vials à scintillation et compteur à scintillation

Seringue verre-téflon et module de filtration avec filtres à 0,45µm

Spectrophotomètre UV-visible et cuvettes compatibles UV

3. MÉTHODOLOGIE :

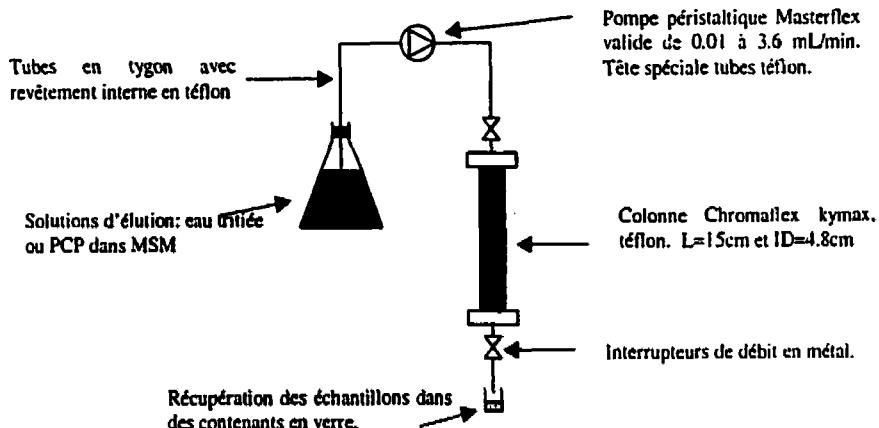
La première étape consiste à saturer la colonne avec le milieu poreux étudié. Dans le cas d'un échantillon de sol ou de matériel géologique d'aquifère, il est recommandé de laver l'échantillon au MSM puis de le sécher dans un four à 105°C pendant 24h avant de l'introduire dans la colonne.

Monter le dispositif expérimental tel que présenté sur la figure suivante.

La saturation de la colonne se fait par la méthode de sédimentation. En effet, l'utilisation de sable bioactif pour les élations biotiques implique de travailler à partir de matériau humide. De ce fait, les élations hydrodynamiques et abiotiques seront effectuées de la même manière à des fins de comparaison. La colonne est montée et fermée en bas. Environ 5 mL de MSM sont ajoutés pour tapisser le fond de la colonne, puis le matériau humide est ajouté à la spatule, de 2 cm en 2 cm. Les bulles d'air sont éliminées en remuant le mélange saturé à l'aide de la spatule. Une fois arrivé en haut de colonne, l'extrémité supérieure est mise en place, en gardant le quickconnect en position ouverte afin de laisser s'échapper le liquide et éviter ainsi des pressions néfastes. La circulation de MSM est introduite par le bas afin de chasser les dernières bulles d'air en haut de colonne. Une fois la colonne bien en charge, la circulation est intervertisse pour s'effectuer de haut en bas. La pompe doit être calibrée pour délivrer un débit constant de 1 mL/min.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Page 3



Le test de traçage consiste à injecter sous forme d'un échelon de concentration une solution de tritium dans du MSM. La solution est préparée afin d'obtenir environ 5000 cpm. La colonne est déconnectée et le tube d'entrée est amorcé avec le MSM tritier pendant 2 fois son volume. Une fois l'échelon bien créé, le tube est connecté à la colonne : c'est le temps 0 du test de traçage. À partir de ce moment, des échantillons de 2 mL sont récupérés de manière régulière en sortie de colonne dans des vials à scintillation. 10 mL de cocktail sont ajoutés dans les vials et ces derniers sont passés au compteur à scintillation sous le protocole tritium. Une fois le traçage terminé (presque 2 volumes de pores), la solution de MSM tritier est remplacée par du MSM normal afin de rincer la colonne pour la nuit suivante. Le lendemain, elle est prête pour l'élution en condition abiotique.

L'élution abiotique consiste à faire passer un échelon de contaminant, ici le PCP, au travers de la colonne, sans présence dans le milieu poreux saturé de microorganismes capables de dégrader ce contaminant. Autrement dit, toute la masse de contaminant injecté doit être retrouvée en sortie de colonne. La même procédure que pour le test de traçage est suivie à la différence près que la solution injectée est, cette fois, une solution de PCP à 14 mg/L (pas de limitations par le transfert d'oxygène le long de la colonne) dans du MSM. Des échantillons de 6 mL sont récupérés en sortie de colonne de manière régulière dans des vials à scintillation. 3,5mL de ces 6 mL sont pris à la seringue et filtré par le module de filtration à 0,45µm puis récupérés dans une cuvette compatible UV pour lecture de la DO à 319 nm au spectrophotomètre. Les 2,5 autres mL sont voués à la mesure de la toxicité (cf PE7E).

En vue de l'élution biotique, le sable standard bioactif humide obtenu par le PE7A est introduit dans une colonne et saturé par la méthode de sédimentation : ajout de sable humide de 2cm en 2 cm après avoir mis du MSM en fond de colonne (environ 5mL). Pendant 2 Vp, la colonne est lessivée avec du MSM, puis l'élution au PCP peut débuter.

L'élution biotique se déroule de la même manière que l'abiotique mais ici, tout le PCP ne

Fichier :

Mis à jour : 17 janvier 2000

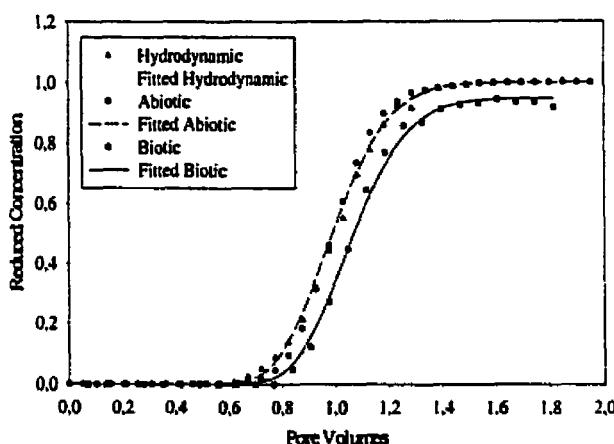
sera sans doute pas récupéré.

4. RÉFÉRENCES :

PE7A, PE7E

5. RECOMMANDATIONS :

Le graphique suivant montre le résultat des trois éluations obtenues sur une colonne de billes de verre. Les résultats expérimentaux sont les points.



Le contrôle du débit de la pompe est majeur pour l'obtention de résultats comparables. Bien vérifier la calibration de la pompe avant et après chaque élution.

Lors d'éluations qui durent plusieurs jours, voire plusieurs semaines, la colonne alimentée par le haut a tendance à se désaturer, ce qui est à éviter. Pour contrer ce problème, il est possible de procéder à une circulation en sens inverse, de bas en haut. Les résultats sont identiques et la désaturation n'intervient pas.

6. ANNEXES :

7. RÉFÉRENCES :

Annexe 3 : Protocole 7C

		PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole # : 7C	Nombres de pages : 3		
Version : 1	Date : 23/02/2000		
Auteurs : <u>Jean-François Ménard</u> <u>Yves Dugal</u>			
Approuvé par :	Signatures :		Date :
<u>Louise Deschênes</u>			<u>15/02/2000</u>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

Titre : Suivi de la biomasse bactérienne par le dosage des protéines (méthode à l'aide de l'acide bicinchononique, BCA) après extraction par lyse cellulaire.

Mots clés : analyse protéique, BCA, lyse cellulaire, phase aqueuse

1. OBJECTIF(S) :

Posséder une méthode simple et rapide de suivi bactérien pour des milieux de culture ne contenant que du MSM et du PCP. Cette méthode est basée sur l'hypothèse que la seule source de protéines présentes dans les échantillons sont les bactéries qui s'y trouvent. Elle n'est aussi applicable que pour des milieux aqueux.

2. MATÉRIELS :

- 1 mL d'échantillon contenant le MSM, le PCP et les bactéries, dans un vial pour micro-centrifugeuse de 1.5 mL
- micro-centrifugeuse
- micro-pipette de 500 à 5000 μ L avec tips
- 1.2 mL de MSM
- 1.2 mL d'une solution de Triton X-100® à 1% v/v, un détergent anionique
- 1 vortex
- 1 tube de verre de 4 mL
- 1 mini-dispensette de 50 mL
- 1 micro-pipette de 1 mL avec tips
- 1 mL de Working Reagent (Pierce Micro BCA Protein Assay Reagent Kit) pour l'analyse par BCA
- 2 racks pour tubes à essai
- bain d'eau à 60°C
- cuvette (metacrylate)
- spectrophotomètre Varian DMS 90 (lecture de l'absorbance à 562 nm)
- solution stock de Bovine Serum Albumine (Pierce Micro BCA Protein Assay Reagent Kit) pour la courbe étalon

3. MÉTHODOLOGIE :

La première étape est une centrifugation de l'échantillon à 13000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu est jeté et le culot est resuspendu manuellement dans 1.2 mL de MSM pipetté avec la micro-pipette de 500 à 5000 μ L, i.e étape de lavage de l'échantillon pour éliminer le reste du PCP ainsi que les protéine extra-cellulaires (le même tip est utilisé pour plusieurs échantillons).

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Page 3

Après une deuxième centrifugation à 13000 rpm pendant 10 min., le surnageant est à nouveau jeté et le culot est resuspendu par vortex (intensité maximale) pendant 1 min. dans 1.2 mL de la solution de Triton X-100® 1% v/v, pipeté avec la micro-pipette de 500 à 5000 µL, i.e étape d'extraction des protéines bactériennes par lyse cellulaire (le même tip est utilisé pour plusieurs échantillons).

Les protéines ainsi extraites, se trouvant dans le surnageant obtenu après une troisième centrifugation à 13000 rpm pendant 10 min., sont ensuite dosées selon le protocole fourni par la compagnie Pierce. Le protocole en tube à essai est utilisé. Les étapes à suivre sont les suivantes :

1. Prélever 1 mL du surnageant avec la micro-pipette de 1 mL et le mettre dans le tube de verre de 4 mL (un tip neuf pour chaque échantillon)
2. Ajouter 1 mL de Working Reagent avec la mini-dispensette de 50 mL
3. Mélanger par vortex léger pendant 10 secondes
4. Placer le tube dans le bain d'eau à 60°C pendant 60 minutes
5. Mélanger à nouveau par vortex léger pendant 10 sec.
6. Verser dans une cuvette et lire l'absorbance à 562 nm (blancs : 1 mL solution Triton X-100® + 1 mL Working Reagent)

Le dosage est fait par comparaison à une courbe étalon réalisée avec différentes concentrations de BSA dans la solution de Triton X-100®, en triplicats.

4. RÉFÉRENCES :

Instructions, Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Product No. 23235), Pierce, Rockford, IL

5. RECOMMANDATIONS :

La solution de Triton X-100® à une concentration de 1% v/v est compatible avec la méthode BCA utilisée. Cette concentration permet d'extraire la très grande majorité des protéines en une seule opération d'extraction comme le démontre les résultats suivants :

Comparaison entre la quantité de protéines extraites par une ou deux étapes d'extraction au Triton X-100®, à partir de 1 mL du consortium bactérien bioactifé (PE Valérie)

Tableau 1 : mesure de l'absorbance à 562 nm (méthode BCA et spectrophotomètre Sequoia-Turner 390)

Echantillons	Réplicats de lecture
--------------	----------------------

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Page 4

Blanc (solution de Triton X-100® 1% v/v)	0,000		
1 ^{er} tube, 1 ^{re} extraction	0,065	0,067	0,064
2 ^e tube, 1 ^{re} extraction	0,061	0,068	0,064
3 ^e tube, 1 ^{re} extraction	0,060	0,062	0,075
1 ^{er} tube, 2 ^e extraction	0,000	0,006	0,001
2 ^e tube, 2 ^e extraction	0,004	0,000	0,033
3 ^e tube, 2 ^e extraction	0,002	0,002	0,004

Ainsi l'absorbance obtenue après une 2^e extraction est pratiquement nulle, indiquant qu'il ne reste pratiquement plus de protéines à extraire après la 1^{re} étape d'extraction. La valeur obtenue pour le troisième réplicat du 2^e tube après la 2^e extraction est très probablement due à une erreur.

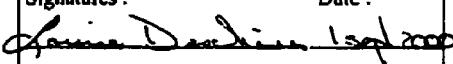
Les courbes étalon obtenues pour des solutions de différentes concentrations de BSA, préparées à partir de la solution stock de Pierce (Product No. 23209) sont les suivantes :

Suivant le protocole en tube à essai

6. ANNEXES :

7. RÉFÉRENCES :

Annexe 4 : Protocole 7E

	
PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole # : 7E	Nombres de pages : 3
Version : 1	Date : 23/02/2000
Auteurs : <u>Yves Dudal</u>	
Approuvé par :	
<u>Louise Deschênes</u>	
<input type="checkbox"/>	Signatures : 
<input type="checkbox"/>	Date : 15/09/2000
<input type="checkbox"/>	
Titre : Évaluation de la toxicité d'échantillons liquide provenant d'élutions de PCP à l'aide de la méthode Microtox	
Mots clés : Microtox, élution, phase liquide, PCP	

1. OBJECTIF(S) :

Évaluer la toxicité en sortie de colonne lors d'élution au PCP

2. MATÉRIELS :

Échantillons liquides de 2,5 mL minimum

Appareil de mesure Microtox

Cuvettes de lectures spécifiques à l'appareil

Tubes de 10 mL en verre

Pipette de 1 mL et de 5 mL

Solution de PCP dans MSM à 25 ppm

Solution de reconstitution Microtox

Solution de dilution Microtox (eau déionisée et NaCl 2%)

Fioles de bactéries lyophilisées Microtox

Bain réfrigéré à 15°C

Dispensette de 10µL

3. MÉTHODOLOGIE :

La méthode décrite ici est utilisée pour évaluer la toxicité d'échantillons provenant des élutions abiotiques et biotiques (cf PE7B).

La première précaution à prendre consiste à l'ajustement de la salinité de l'échantillon à tester. En effet, Microtox utilise une bactérie luminescente d'origine marine qui doit se trouver dans un milieu ayant une teneur saline comprise entre 2 et 4%. La teneur saline du MSM est d'environ 0,5% et la première étape du protocole se doit donc d'ajuster la salinité de l'échantillon en rajoutant entre 50 et 60 mg de NaCl pour 2,5 mL d'échantillon provenant de l'élution.

La deuxième précaution réside dans l'établissement d'une contrôle du test. Celle-ci consiste à évaluer la toxicité d'une solution fixe (25 mg/L de PCP) à chaque fois qu'une nouvelle fiole de bactéries lyophilisées est utilisée. La stabilité dans le temps de la carte de contrôle permet de valider chaque série de résultat. L'établissement de 5 points au minimum sur cette carte de contrôle est nécessaire avant de tester tout échantillon que ce soit.

La connaissance de la concentration minimale avec effet observé (CMEO) obtenue lors de l'élaboration de la carte de contrôle permet d'estimer, avant d'effectuer le test, le nombre de dilutions séries nécessaires pour atteindre cette concentration pour un échantillon

donné. En effet, la connaissance de la courbe d'élation massique du PCP permet de savoir à peu près la toxicité attendue.

En fonction de cette estimation, l'échantillon à salinité ajustée est dilué, de façon seriée, afin que la CMEO soit bien encadrée. Par exemple si le nombre de dilutions séries nécessaires pour atteindre la CMEO est estimé à 5, les 6 dilutions suivantes pourront être choisies : 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 2, 3, 4, 5, 6, 7. L'essentiel étant de pouvoir visualiser clairement la CMEO. L'échantillon est dilué comme convenu à l'aide de la solution de dilution dans les tubes en verre qui sont ensuite placés dans un bain réfrigéré à 15°C.

L'appareil est mis sous tension et des tubes de lecture Microtox sont placées dans les 15 trous d'incubation à 15°C et dans le trou à 5°C. Une fois la température stable (lire sur l'appareil), 1 mL de la solution de reconstitution est placé dans le tube à 5°C et 0,5 mL de solution de dilution sont placés dans chaque tube à 15°C. Sortir une fiole de bactéries lyophilisées du congélateur et l'ouvrir doucement car sous vide puis y verser d'un seul coup le tube contenant la solution de reconstitution à 5°C. Mélanger rapidement en tournant la fiole 3 ou 4 secondes puis réverser le contenu de la fiole dans le tube, le replacer à 5°C. À l'aide d'une pipette à 500µL, mélanger par 20 aspirations successives le contenu du tube. Pipetter 10µL de cette solution dans chacun des 15 tubes incubés à 15°C. Mélanger à l'aide d'aspirations consécutives avec une pipette de 250µL. Attendre 15 min. Lire la luminescence de ces 15 tubes en ajustant le premier à une lecture de 90. Les 15 lectures devraient être relativement proches. Immédiatement, injecter 0,5 mL de chaque dilution de l'échantillon se trouvant dans le bain réfrigéré dans deux des tubes incubés (duplicata) selon le schéma suivant :

Dilution 1	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 2	Dilution 3
Dilution 6	Témoin	Témoin	Témoin	Dilution3
Dilution 6	Dilution 5	Dilution 5	Dilution 4	Dilution4

Mélanger à l'aide d'aspirations consécutives avec une pipette de 0,5 mL. Attendre 5 min. Refaire une lecture des 15 tubes. Effectuer une dernière lecture après 15 min. Les résultats se présentent donc sous la forme de trois tableaux correspondant à celui ci-dessus et représentant les lectures au temps 0, 5min et 15min de contact bactéries-échantillon. Le logiciel Microtox permet à partir de ces trois tableaux de déterminer la concentration minimale avec effet observé.

4. RÉFÉRENCES :

Microtox TM System Operating Manual, 1982, Beckman Instruments, Inc., Carlsbad, CA 92008

5. RECOMMANDATIONS :

6. ANNEXES :**7. RÉFÉRENCES :**

Annexe 5 : Protocole G12

Protocole: , Version: , Page: 1, c/windows/ps0.doc, 96-06-07



PROTOCOLE STANDARD D'OPÉRATION	
Protocole#: G12 Version: 2.0	Pages: Date: 1-nov-96 Signatures:
Auteurs: Gontran Bage Christine Gauthier	
Approuvé par:	Date:
Titre: Analyse chromatographique du pentachlorophénol par HPLC selon la méthode PCP long Mots clés: HPLC, High Performance Liquid Chromatography, Calibration, Pentachlorophénol	

1.00 Domaine d'application

Ce protocole s'applique à l'analyse d'échantillons contenant du pentachlorophénol. Cet analyse se fait à l'aide d'un HPLC. Ce protocole n'est valide que pour des échantillons de PCP en solution aqueuse ou dans du méthanol.

2.00 Principes de la méthode**3.00 Matériel**

Pour la calibration

- PCP pur solide
- balance
- ballon de 10 ml

Protocole: , Version: , Page:2,c/windows/ps0.doc, 96-06-07

- méthanol (CH₃OH)
- 5 vials ambrés de 1,8 ml avec bouchons en Teflon
- seringue en verre de 1000µl pour les standards
- seringue en verre de 100µl pour les standards

Pour l'échantillonnage

- filtre Millipore type FH 0,5µm (en Teflon)
- support à filtre Millipore XX302500
- seringue en verre de 10 ml
- autant de vials ambrés de 1,8 ml avec bouchon en Teflon qu'il y a d'échantillons à prendre

Pour l'analyse au HPLC

- bouteille de 4 L de méthanol
- bouteille de 4 L d'eau pure
- bouteille de 4 L d'acétonitrile
- bouteille de 4 L vide pour les déchets
- pipette pasteur
- acide H₂PO₄
- hélium comprimé
- colonne CSC-spherisorb-ODS1, diamètre des particules: 3 µm et longueur de la colonne: 30 cm (Cat. No: 2202-303).

4.00 Mode Opératoire

Note: Le méthanol utilisé dans cette procédure doit provenir des bouteilles ambrées entreposées dans le cabinet anti-feu et non des flacons laveurs rangés près des lavabos.

1 Préparation des standards pour la calibration

- 1.1 Vérifier s'il reste un standard de PCP 500 ppm au réfrigérateur à 4°C et qu'il date de moins d'un mois. Si oui, passer au point 1.7.
- 1.2 Pesar 5,0 mg de PCP pur.
- 1.3 Rincer le ballon de 10 ml au méthanol.
- 1.4 Verser les 5,0 mg de PCP dans le ballon.
- 1.5 Ajouter 10 ml de méthanol.
- 1.6 Mélanger le tout pour obtenir un standard de 500 ppm de PCP (le PCP est rapidement dissous dans le méthanol).
- 1.7 Identifier 5 vials pour les standards de calibration de 50, 10, 5, 1, 0.1 ppm (en précisant la date et les initiales de l'utilisateur).
- 1.8 Effectuer les dilutions suivantes dans les cinq vials. À chaque fois, rincer trois fois les seringues avec du méthanol ou la solution à diluer.
 - 100 µl de 500 ppm dans 900 µl de méthanol pour obtenir 50 ppm.
 - 100 µl de 50 ppm dans 900 µl de méthanol pour obtenir 5 ppm.

Protocole: , Version: , Page:3,c/windows/ps0.doc, 96-06-07

- 20 µl de 500 ppm dans 980 µl de méthanol ou
 200 µl de 50 ppm dans 800 µl de méthanol pour obtenir 10 ppm.
 100 µl de 10 ppm dans 900 µl de méthanol pour obtenir 1 ppm.
 100 µl de 1 ppm dans 900 µl de méthanol pour obtenir 0.1 ppm.
- 1.9 Rincer trois fois les deux seringues au méthanol avant de les ranger.
 - 1.10 Transvider le surplus de standard 500 ppm de PCP dans un contenant de volume adéquat et opaque, de préférence fermé par une valve Mininert afin d'éviter les pertes et de faciliter la prise d'échantillons. Le surplus servira de standard pour de nouvelles calibrations effectuées durant le prochain mois.
 - 1.11 Ranger le standard 500 ppm au réfrigérateur à 4°C.

2 Prise et préparation des échantillons

- 2.1 Assembler le porte-filtre et le filtre comme indiqué à la figure 1.0 à l'aide des pinces et des clés. À noter que la figure 1.0 contient un pré-filtre (5) que l'on n'utilise pas.
- 2.2 Rincer trois fois la seringue avec la solution à analyser.
- 2.3 Prendre plus de 5 ml de l'échantillon avec la seringue.
- 2.4 Enlever l'aiguille de la seringue, la placer sur le porte-filtre et placer ce dernier sur la seringue.
- 2.5 Saturer le filtre avec les premiers millilitres de la solution et rejeter le premier millilitre sortant.
- 2.6 Injecter environ 1.5 ml dans un vial spécialement identifier.
- 2.7 Enlever le porte-filtre de la seringue et de l'aiguille.
- 2.8 Retirer le filtre à l'eau et le jeter.
- 2.9 Rincer trois fois au méthanol la seringue, l'aiguille et le porte-filtre; si l'échantillon contient beaucoup de matière solide, on peut les rincer au préalable à l'eau en s'assurant de bien recueillir les déchets.
- 2.10 Recommencer pour chaque échantillon.

3 Utilisation du HPLC

Note: Avant de débuter une analyse au HPLC toujours vérifier le contenu de la bouteille à déchets, la remplacer par une vide bien identifiée si nécessaire et ranger la pleine dans le cabinet anti-feu.

- 3.1 Vérifier s'il y a assez d'eau acidifiée (bouteille A), de méthanol (bouteille B et D) et d'acétonitrile (bouteille C) pour la durée de l'analyse; si oui passer au point 3.5. De plus, la bouteille reliée à la seringue doit également être vérifiée régulièrement, elle contient du méthanol.
- 3.2 Pour remplacer l'eau acidifiée, prendre une bouteille d'eau pure (water accusolve) et l'acidifier à l'aide de quelques gouttes de H_2PO_4 (vérifier le pH, environ 3.5)
- 3.3 Si une des 4 bouteilles doit être changée, la dégazée à l'hélium durant au moins 20 minutes avant de procéder à la mise en marche de l'appareil.

Protocole: , Version: , Page:4,c/windows/ps0.doc, 96-06-07

- 3.4 Lors du remplacement des bouteilles (sauf pour la D), toujours prendre une bouteille de 4 L neuve qui n'a pas été ouverte afin d'éviter l'accumulation inutile d'un dépôt sur les filtres de l'appareil.
- 3.5 Avant de mettre l'appareil en marche dégazer les solvants à l'hélium durant au moins 20 minutes. Toujours s'assurer de bien fermer l'hélium lorsque l'appareil n'est pas en utilisation.

Effectuer les prochaines étapes sur l'ordinateur de contrôle du HPLC et illustrées à la figure 2.0.

- 3.6 Sur le bureau de l'ordinateur, cliquer sur l'icône Tsp PC 1000 (1) et ouvrir *système PCP* (2).
- 3.7 Parmi les icônes apparaissant au bas de l'écran, ouvrir *System control* (3).
- 3.8 Désactiver le contrôle de l'ordinateur sur le HPLC en choisissant *System* (4) dans le menu déroulant, puis *System control Options* (5) et finalement *No system control* (6).

Effectuer les prochaines étapes sur le HPLC.

- 3.9 Purger les tuyaux d'alimentation.
 - 3.9.1 Sur le système de commande du P4000
 - 3.9.1.1 Choisir *Purge*
 - 3.9.1.2 Choisir l'alimentation A, B, C ou D à l'aide des touches + ou -, puis appuyer sur *enter*.
 - 3.9.1.3 Ajuster le débit à 3 ml/min, puis appuyer sur *enter*; s'il y a des bulles qui demeurent dans les lignes, augmenter le débit afin de les faire circuler.
 - 3.9.1.4 Le temps est toujours mis à 0 et donc contrôler de façon manuelle, appuyer de nouveau sur *enter* tout en ouvrant la valve noire au-dessus de la pompe.
 - 3.9.1.5 Vérifier qu'il n'y ait plus de bulles dans les lignes et appuyer sur *Stop* tout en fermant la valve noire.
 - 3.9.1.6 Répéter l'opération pour toutes les alimentations.
 - 3.9.1.7 Choisir *Status*.
 - 3.9.2 Sur le système de commande du AS3000.
 - 3.9.2.1 Choisir *Menu*.
 - 3.9.2.2 Choisir *Commande*, puis *Flush sample syringe*.
 - 3.9.2.3 Inscrire le volume 2500µl à l'aide des touches + et -.
 - 3.9.2.4 Choisir *Enter*.
 - 3.9.2.5 Après le nettoyage de la seringue, choisir *Status*.
 - 3.9.2.6 Réactiver le contrôle de l'ordinateur sur le HPLC en choisissant *Full System Control* (7) dans *System control options* (5).

Les étapes suivantes s'effectuent sur l'ordinateur de contrôle du HPLC.

- 3.10 Ouvrir *Acquisition* (8).
- 3.11 Dans le menu déroulant *Method*, ouvrir la méthode *Pcp départl.aqm* dans C:\TSP\Système PCP\Methods, cette méthode fait circuler seulement du méthanol dans la colonne afin de bien préparer cette dernière.

Protocole: , Version: , Page:5,c/windows/ps0.doc, 96-06-07

- 3.12 Fermer *Acquisition*.
- 3.13 Ouvrir *System control* (3).
- 3.14 Initialiser la méthode *PCP départ1.agm* en choisissant *Init method* (9) dans le menu déroulant *System* (4).
- 3.15 Laisser cette méthode jusqu'à ce que la température du four soit de 55°C et celle de la chambre à échantillon soit de 5°C.
- 3.16 Dans *Aquisition* (8), ouvrir la méthode *Pcp départ2.agm* dans C:\TSP\Système PCP\Methods, cette méthode fait circuler 70% de méthanol et 30% d'eau acidifiée dans la colonne.
- 3.17 Fermer *Acquisition*.
- 3.18 Ouvrir *System control* (3).
- 3.19 Initialiser la méthode *PCP départ2* en choisissant *Init method* (9) dans le menu déroulant *System* (4).
- 3.20 Laisser cette méthode environ 20 minutes afin de bien s'assurer que la colonne est remplie de cette phase mobile.
- 3.21 Placer les 5 calibrations (50, 10, 5, 1, 0.1 ppm) puis les échantillons sans la chambre à échantillon.
- 3.22 Ouvrir *Sample Queue* (10). Cette fenêtre est illustrée à la figure 3.
- 3.23 Dans le menu déroulant *Sequence* (1), ouvrir *New Sequence* (2).
- 3.24 Donner un nom à la séquence (3), et inscrire le nom de l'utilisateur (4).
- 3.25 Remplir les informations de la séquence selon la méthode décrite aux points suivants.
- 3.26 Commencer par les calibrations, de la plus forte à la plus faible, puis les échantillons (5).

Tray position : Position de l'échantillon dans la chambre (ex. A01)

Vial Type : S: Échantillon (*Sample*)

C: Calibration

Calibration level : (Pour les calibrations seulement)

Concentration	Sample Description	Calibration level	Sample Name
50 ppm	50 ppm	5	Calibration 01
10 ppm	10 ppm	4	Calibration 02
5 ppm	5 ppm	3	Calibration 03
1 ppm	1 ppm	2	Calibration 04
0.1 ppm	0.1 ppm	1	Calibration 05

Sample name :

pour les échantillons : *Sample numéro*
pour les calibrations : voir *Calibration level*

Sample description :

pour les échantillons : un nom représentatif
pour les calibrations : voir *Calibration level*

Sample Amount et Sample factor : (pour les calibrations seulement)

Sample amount=1

Sample factor= 1

Injection volume et injection/vial :

Inj vol = 10.0

Inj/vial = 1 (ou plus selon le nombre d'injections requis)

Protocole: . Version: . Page:6,c/windows/ps0.doc. 96-06-07

- 3.27 Après le dernier échantillon, réinscrire les 5 calibrations de la même manière que décrite ci-haut en ajoutant “ -2 ” après les noms des échantillons dans *Sample name* (ex. : calibration 01-2).
- 3.28 Avant d'effectuer une analyse, toujours injecter 2 ou 3 échantillons de 50 ppm afin de bien saturer la colonne et de vérifier si la colonne est en bon état.
- 3.29 Dans la zone *Method* (6), vérifier que la méthode d'acquisition, le calcul et le rapport indiquent *PCP Long*, sinon les modifier en cliquant sur la boîte correspondante.
- 3.30 Une fois terminer, cliquer sur *Queue* (7) et la séquence d'analyse apparaîtra dans la boîte *Queue* (9).
- 3.31 Insérer un arrêt total de l'appareil après l'analyse en choisissant *Queue shutdown* (8), dans le menu déroulant *Sequence* (1), Shutdown apparaîtra également dans la boîte *Queue* (9). Cette étape est importante car la colonne doit toujours baigner dans le méthanol lorsque non utiliser afin d'éviter de l'abîmer inutilement.
- 3.32 Fermer *Sample Queue* (retour à la figure 2).
- 3.33 Ouvrir *Acquisition* (8).
- 3.34 Ouvrir la méthode *PCP Long.Aqm* dans *C :|Tsp\System pcp\Methods*.
- 3.35 Fermer *Acquisition*.
- 3.36 Ouvrir *System control* (3) et choir *Baseline Monitor* (11) dans le menu déroulant *System* (4).
- 3.37 Lorsque la ligne du potentiel en fonction du temps est constante et de pente nulle désactiver *Baseline Monitor* (11).
- 3.38 Débuter l'analyse en cliquant sur le bouton *Play* (12) dans le haut de la fenêtre *Data acquisition : système PCP*.
- 3.39 Créer un gabarit (cette étape est utile lorsqu'une séquence est appelée à être analysée souvent, ex. On peut créer un gabarit pour les calibrations).
 - 3.39.1 Créer la séquence tel qu'indiqué aux points 3.25 à 3.31.
 - 3.39.2 Dans le menu déroulant *Template* (10) de la figure 3, choisir *Save as...* et indiquer un nom représentatif du template créer.
 - 3.39.3 Pour récupérer le gabarit lors d'une analyse future, choisir *Open* dans le menu déroulant *Template* (10) et faire les modifications nécessaires.
 - 3.39.4 Une fois terminer, cliquer sur *Queue* (7) et la séquence d'analyse apparaîtra dans la boîte *Queue* (9).
- 3.40 Analyse des résultats.
 - 3.40.1 Lorsque l'appareil est utilisé sur une base régulière, les échantillons pour effectuer les courbes de calibrations sont fabriqués une fois par semaine. Afin de vérifier si la courbe de calibration est toujours valide, injecter un échantillon de 50 ppm avant de réaliser une analyse quelconque.
 - 3.40.2 Ouvrir l'icône *Results* (14)
 - 3.40.3 Sélectionner l'icône *Open Sequence* () montré à la figure 4. La boîte *Open Sequence Results* apparaît alors à l'écran.
 - 3.40.4 Choisir la séquence désirée et cliquer sur *Open*. Les résultats sont présentés tels qu'illustre à l'annexe A.

Protocole: . Version: . Page: 7, c/windows/psd.doc. 96-06-07

- 3.40.5 Vérifier l'allure de la courbe de calibration en choisissant l'icône *Select report* (), puis *Calibration Report*. La courbe de calibration est considérée comme acceptable seulement si le $R > 0.9997$. Plus le R est petit et plus l'erreur relative est grande.
- 3.40.6 Le temps nécessaire pour analysée une les échantillons formant une courbe de calibration étant long (environ 10 heures), une seule courbe sera donc analysée par semaine. Cependant, afin de s'assurer de la satbilité de cette variante, un échantillon de 50 ppm est analysée avant chaque nouvelle séquence pour être ensuite comparé à la courbe de calibration (pour une comparaison rapide, regarder les aires sous la courbe).
 - 3.40.6.1 Associer des résultats à une courbe de calibration analysée séparément.
 - 3.40.6.2 Fermer la fenêtre *System PCP* en cliquant sur la petit carré en haut à droite de l'écran () .
 - 3.40.6.3 Ouvrir la fenêtre *Data Reprocessing* () apparaissant sur le bureau de l'ordinateur.
 - 3.40.6.4 Ouvrir l'icône *Reprocess* () .
 - 3.40.6.5 Dans le menu déroulant *Results* (), choisir *Open* () puis ouvrir la séquence contenant la courbe de calibration la plus récente (moins d'une semaine).
 - 3.40.6.6 Dans le menu déroulant *Results* (), choisir *Merge* () puis ouvrir la séquence contenant les échantillons à analyser. Les échantillons se retrouveront alors à la fin de la deuxième courbe de calibration.
 - 3.40.6.7 Sélectionner les échantillons à l'aide de la souris puis les replacer avant la deuxième courbe de calibration.
 - 3.40.6.8 Une fois terminer, cliquer sur *Queue* () et la séquence d'analyse apparaîtra dans la boîte *Queue* () .
 - 3.40.6.9 Retourner à la fenêtre *Data Reprocessing* pour débuter l'analyse cliquer sur le bouton *Play* () dans le haut de la fenêtre *Data acquisition : système PCP*.
 - 3.40.6.10 Les nouveaux résultats seront inscrits dans un fichier du même nom que la séquence contenant la courbe de calibration avec une nouvelle extension .RMS. Ces fichiers demeurent toujours rattachés au fichiers originaux, c'est pourquoi il est important de ne pas effacer les originaux.
- 3.40.7 Modification d'une intégration de façon graphique.
 - 3.40.7.1

5.00 Calculs

Ne s'applique pas à ce protocole.

6.00 Limites de la méthode

Protocole: , Version: , Page:8,c/windows/ps0.doc, 96-06-07

Ce protocole est utilisé uniquement pour préparer et analyser des échantillons contenant du pentachlorophénol en solution aqueuse ou en solution dans du méthanol.

7.00 Références

**Operation and maintenance instruction OM044
PC1000 System software version 3.0 Reference Manual**

8.00 Notes

La pression maximale dans la colonne ne doit pas dépasser les 4000 PSI. Si elle venait à dépasser cette limite, il faudrait voir à changer le fritz. Voir la personne responsable pour cette manutention. De plus, la pression normale de la colonne doit se situer entre 1500 et 2500 psi.

Il est important de faire un "shutdown" du logiciel au moins une fois par semaine en choisissant *Shutdown* (13) sur le bureau de l'ordinateur (figure 2). De plus, un "backup" des fichiers doit être fait au moins une fois par moins (ou plus selon l'utilisation du HPLC) afin de libérer de l'espace mémoire et d'éviter ainsi des problèmes liés à la gestion du logiciel. Des cassettes de backup sont disponibles auprès de Pierre ou Manon.

Pour tous problèmes technique ou mécanique insolubles, contacter les gens de TSP. Notre contact en date du 19 juin 1997: M. André Pageau 689-3309.

Annexe 6 : Schéma de la méthode de séparation et de détection du PCP par HPLC

PCP (2,4-D & 2,3,5,6-tetrachlorophenol)
(min. 0.1ppm avec loop 10uL)

Count

DATE:
DEMANDEUR:

HPLC #3: SPECTRA-PHYSICS: SP8800 (pompe)
SP8780XR (injecteur automatique)
SP8440XR (detecteur UV/ Visible)
SP4200 (integrateur)

CONDITIONS: volume d'injection: 10ul
colonne: CSC-S ODS-1 (250mmx46mm) 3um
solvants: 70:30 MeOH:H₂O acidifiée (ajuster le pH à 3.5 avec H₃PO₄ conc. i.e. 6 gttes /L)
debit: 0.7 ml/min
temps: 25 min
température: 55 C
detection: 210nm, range:0.64
integration: at = 2 cs = 0.5
pression: 2400psi

Annexe 7 : Spectre du PCP en ultra-violet

