PolyPublie
Polytechnique Montréal

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
UNIVERSITÉ D'INGÉNIERIE

Titre: Title:	Évaluation de l'effet de la succion sur l'activité microbienne lors du traitement d'un sol contaminé au diesel par un procédé simulant la bioaspiration
Auteur: Author:	Elena Petre
Date:	1999
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence: Citation:	Petre, E. (1999). Évaluation de l'effet de la succion sur l'activité microbienne lors du traitement d'un sol contaminé au diesel par un procédé simulant la bioaspiration [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/8684/

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: PolyPublie URL:	https://publications.polymtl.ca/8684/
Directeurs de recherche: Advisors:	Réjean Samson
Programme: Program:	Non spécifié

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal

https://publications.polymtl.ca

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉVALUATION DE L'EFFET DE LA SUCCION SUR L'ACTIVITÉ MICROBIENNE LORS DU TRAITEMENT D'UN SOL CONTAMINÉ AU DIESEL PAR UN PROCÉDÉ SIMULANT LA BIOASPIRATION

ELENA PETRE
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)
AOÛT 1999

©Elena Petre, 1999.

National Library of Canada
Acquisitions and Bibliographic Services
395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale du Canada
Acquisitions et services bibliographiques
395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

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

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

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

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

0-612-49798-4

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

ÉVALUATION DE L'EFFET DE LA SUCCION SUR L'ACTIVITÉ MICROBIENNE LORS DU TRAITEMENT D'UN SOL CONTAMINÉ AU DIESEL PAR UN PROCÉDÉ SIMULANT LA BIOASPIRATION

présenté par : PETRE Elena

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

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

M. PERRIER Michel, Ph.D., président

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

M. Millette Denis, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. GREER Charles, Ph.D., membre

Je dédicace cet ouvrage
à la mémoire de mes défunts parents
et à mon cher ami, Khalid.

REMERCIEMENTS

Je remercie le professeur Réjean Samson, mon directeur de recherche et D[r] Louise Deschênes, pour la confiance qu'ils ont eue en moi, de m'avoir donné la possibilité d'évoluer dans un milieu pluridisciplinaire à travers un sujet de recherche des plus intéressants.
Je remercie tout particulièrement le D[r] Denis Millette, mon co-directeur de recherche pour sa collaboration prodigieuse et de m'avoir donné l'occasion de travailler à l'Institut de Recherche en Biotechnologie, un institut à la fine pointe de la biotechnologie appliquée à l'environnement.

Je tiens à exprimer ma gratitude au professeur Robert Chapuis, pour ses conseils scientifiques et techniques des plus fructueux surtout dans les moments les plus critiques du projet.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Antonio Gatien, pour son expertise et son savoirfaire techniques précieux et sa grande générosité et disponibilité indispensables à la réussite du projet. Ma gratitude va également à Robert Delisle, Jerôme Breton et Denis Bouchard, pour leur excellent soutien technique lors de la mise au point du dispositif expérimental du projet.

Je veux également remercier Claude Masson, pour m'avoir formée et appris certaines méthodologies microbiologiques et les bonnes pratiques de laboratoire. Et cela n'aurait pas été possible sans la collaboration étroite de toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Environnementale de l'Institut de Recherche en Biotechnologie.

Je remercie également Chantale Beaulieu et Danielle Ouellette pour avoir effectué les analyses chimiques dans les plus brefs délais et Elise Marcandella pour ses conseils.

Je ne peux pas oublier mes collègues et mes amis pour leur apport et leurs encouragements.

Et pas en dernier lieu, je remercie mon ami, pour sa patience et compréhension lors des périodes moins agréables et d'avoir veillé à ma réussite professionnelle.

RÉSUMÉ

La restauration des sites contaminés fait appel à différents traitements dont la bioremédiation demeure l'approche de traitement le plus populaire au Québec. Son succès s'explique en raison du coût des opérations qui s'avère plus faible que dans le cas des traitements physico-chimique ou thermique.
L'objectif de cette recherche a été de 1) caractériser le comportement hydrodynamique du diesel dans la zone vadose, 2) simuler au laboratoire les conditions retrouvées lors d'un traitement par bioaspiration et bioventilation et, 3) évaluer et comparer l'impact des conditions hydrodynamiques crée lors des deux traitements sur l'efficacité de la biodégradation.

Afin d'atteindre ces objectifs, trois grandes étapes ont été réalisées. Une première étape a consisté en la caractérisation préliminaire du point de vue géotechnique, physico-chimique et biologique ayant menée au choix du sol approprié à l'application des deux technologies de décontamination. Le sol étudié était de texture fine (conductivité hydraulique égale à 10^{-7} cm/s) contaminé au diesel à une concentration de 7800 mg/kg de sol sec. Ce dernier a été prélevé au niveau de la frange capillaire (teneur massique en eau de 20 %). Le sol prélevé a été jugé apte à la biorestauration puisqu'il présentait des caractéristiques microbiologiques adéquates, soit une densité des micro-organismes hétérotrophes totaux de 10^8 cell/g de sol et spécifiques au contaminant de 10^5 cell./g sol. L'effet de la concentration du contaminant et de l'ajout des nutriments sur l'activité de minéralisation d'un polluant témoin a été vérifié par des essais statiques en microcosmes. Une concentration en diesel supérieure à 20 000 mg/kg de sol sec s'est avérée toxique aux micro-organismes du sol. L'amendement du sol contaminé avec des nutriments a amélioré le taux de minéralisation du polluant témoin.
La deuxième étape fut consacrée à l'étude du comportement hydrodynamique du diesel dans la zone vadose à l'aide d'essais de rétention capillaire en eau et en diesel d'une part, à basse pression (pression atmosphérique en hautes colonnes en PVC d'une capacité d'environ 3700 cm^3) et d'autre part, à haute pression (pression supérieure à la pression

atmosphérique en cellules de rétention Tempe). A la fin des essais de rétention capillaire à basse pression, il a été observé que la hauteur d'ascension capillaire du diesel était plus élevée que celle de l'eau, soit 100 cm et 75 cm, respectivement et que la distribution de l'eau était plus régulière que celle de diesel. La teneur maximale en eau du sol était supérieure à la teneur maximale en diesel, soit 22 % et 18 %, respectivement. Il a été également possible de reproduire les conditions retrouvées lors d'un déversement de diesel dans la zone vadose et représenter ainsi la distribution des fluides y présents (air/diesel/eau). L'accumulation du diesel au-dessus de la frange capillaire d'eau était très évidente et la teneur maximale enregistrée fut d'environ 58 000 mg/kg de sol sec. A la fin d'essais de rétention capillaire à haute pression, il a été possible de déterminer la courbe caractéristique diesel-sol. A partir de cette courbe, un paramètre d'opération essentiel au traitement en mode de bioaspiration, soit la pression d'entrée d'air (i.e., déplacement du diesel des pores du sol) a été estimée (i.e., 0,2 atm.).

La troisième étape était d'évaluer la biodégradation du sol contaminé au diesel à saturation par deux traitements, soit la bioaspiration et la bioventilation à l'échelle de laboratoire. Cet objectif a été réalisé à l'aide d'essais dynamiques en colonnes d'acier inoxydable d'une capacité d'environ 1600 cm^3. Deux colonnes (duplicata) ont été affectées à l'étude de la biodégradation en mode de bioaspiartion, tandis qu'une autre colonne a été affectée à l'étude de la biodégradation en mode de bioventilation. L'effet du traitement en mode de bioaspiration sur le comportement hydrodynamique du diesel a été vérifié dans une colonne rendue abiotique par irradiation. Les résultats obtenus durant le suivi des deux technologies durant 50 jours ont démontré que la succion appliquée en mode de bioaspiration a engendré une diminution de la saturation résiduelle en diesel par drainage de 3 fois supérieure à celle observée en mode de bioventilation, soit 67 000 mg/kg en mode de bioaspiration et 20 900 mg/kg en mode de bioventilation. Cette diminution physique de la teneur en hydrocarbures a résulté en une activité microbiologique accrue en mode de bioaspiration. En effet, les taux moyens d'utilisation d'oxygène et de biodégradation calculés en conditions dynamiques ont été plus élevés pour le traitement en mode de bioaspiration, soit 0,60 %/jour et 0,51 mg/kg/jour,

respectivement comparativement à ceux en mode de bioventilation, soit 0,27 %/jour et 0,10 mg/kg/jour, respectivement. Également, le taux moyen d'utilisation d'oxygène horaire calculé en conditions statiques a été plus élevé pour le traitement en mode de bioaspiration, soit 1,15 %/heure que celui en mode de bioventilation, soit 0,69 %/heure.

D'après le taux moyen de biodégradation estimé lors des tests de respirométrie en conditions dynamiques, une masse relativement faible d'hydrocarbures, soit 25 mg/kg de sol a été dégradée en mode de bioaspiration et 5 mg/kg de sol en mode de bioventilation durant les 50 jours de traitement.

Le haut niveau de concentration en diesel ayant engendré une toxicité aux micro-organismes de biodégradation, le manque des nutriments et probablement, la courte période de traitement pourraient expliquer les faibles taux de biodégradation observés. L'opération du système à une succion plus élevée aurait pu palier à cette problématique puisque les essais ont démontré que l'application d'une succion accrue engendre le drainage d'une quantité considérable de contaminant. La concentration résiduelle inférieure qui en résulterait aurait fait en sorte que la toxicité et les besoins en nutriments seraient moindres.

ABSTRACT

The objective of this work was to: 1) characterise the hydrodynamical behaviour of diesel fuel in the vadose zone, 2) simulate, at laboratory scale, the conditions prevailing during bioslurping and bioventing and, 3) evaluate and compare the effect of hydrodynamics conditions created during the two treatments on the effectiveness of the biodegradation process.

This approach was accomplished in three phases. The first phase consisted of a preliminary geotechnical, physical, chemical and biological soil characterisation to insure that type of soil was appropriate for bioslurping and bioventing. The soil used for this work was a silty sand (hydraulic conductivity of 10^{-7} cm/s) collected at the level of the capillary fringe (20 % of moisture) and contaminated with diesel fuel (7800 mg/kg). The number of heterotrophic and diesel-degrading bacteria indicated that the indigenous microbial population had the ability to biodegrade hydrocarbons. Microbial activity assays conducted in microcosms demonstrated toxicity to the soil microorganisms at a contaminant concentration greater than 20 000 mg/kg of soil. It was also noteed that the mineralization activity significantly increased when nutrients were added.

The second phase dealt with the hydrodynamic behaviour of multiple phases (air, diesel and water), at low and high pressure in soil. This study was necessary because parameters such as distribution of phases in a spill case and the soil characteristics curves are of great interest for the applicability and feasibility of unsaturated zone remediation techniques. First, large PVC columns (3700 cm^3) were used to simulate the diesel and water capillary retention in the vadose zone with low pressure (atmospheric pressure). The height of the capillary rise of water (75 cm) was less than that of diesel (100 cm). The maximum water content was greater (22 %) than that of diesel content (18 %). It was also possible to reproduce a diesel spill in the soil column containing residual levels of water in order to observe the distribution of fluids (air, diesel and water) in the vadose zone. A diesel table developed above the water capillary fringe and, the water capillary zone (the part of the water capillary fringe where water saturation ratio is at or close to

1,0) was depressed and became thinner. The maximal concentration of diesel was approximately 58 000 mg/kg of dry soil. The forgoing assays were then repeated at high pressure (greater than the atmospheric pressure) and the capillary retention data used to determine the soil characteristic curves . The entry pressure (i.e., bubbling pressure), a very important operational parameter of bioslurping, was estimated at 0,2 atm.

In the third phase the biodegradation of soil contaminated to saturation with diesel was evaluated with two techniques, i.e., bioslurping and bioventing. Four stainless steel columns (1600 cm^3) were set up to model the conditions present when oxygen is passed through contaminated soil. Two separate columns (duplicates) were used to simulate the bioslurping process, and one column to simulate the bioventing process. In addition, one abiotic column was set up with irradiated soil to verify the effects of bioslurping on the soil hydrodynamic behaviour. To quantify the extent of biodegradation, the columns were monitored for physical (air permeability, moisture), chemical (contaminant concentration, nutrients) and biological (heterotrophic and diesel-degrading microbial enumeration, microbial activity) parameters. Active respiration studies were also conducted during the whole operational period to determine whether the microbial respiration occurred as a result of oxygen introduced by the aeration process. Static respirometric tests were also conducted by shutting down the venting system, and monitoring changes in soil gas CO_2 and O_2 composition at the pressure monitoring points of all columns. The results indicated that the amount of free product recovered with bioslurping was three times greater (i.e., 67 000 mg/kg) than with bioventing (20 900 mg/kg). Given the lower residual saturation achieved with bioslurping, biodegradation of the residual contaminants was enhanced due the lower oxygen and nutrients limitations. The assessment of oxygen utilisation and biodegradation rates was used as indirect evidence of the effectiveness of the two bioremediation strategies. The average oxygen uptake and biodegradation rates observed during the dynamic *in situ* respiration tests were greater during bioslurping (0,60 %/day and 0,51 mg/kg/day, respectively) compared with those measured during bioventing (0,27 %/day and 0,10 mg/kg/day, respectively). Also, the hourly average oxygen uptake estimated under static *in situ* respiration tests was

greater during bioslurping (1,15 %/hour) compared with that calculated during bioventing treatment (0,69 %/hour). In order to quantify biodegradation in terms of hydrocarbons depletion, the average biodegradation rate was used. A mass balance on oxygen based of hexadecane mineralization indicated that 25 mg hydrocarbons/kg of contaminated soil were mineralized using bioslurping and 5 mg hydrocarbons/kg of contaminated soil using bioventing technique after 50 days of treatment.

The high level of contamination, the low nutrients concentration, and the short period of operation explain the relatively low biodegradation rates observed. The application of a suction greater than 0,2 atm used in this study could reduce this problem because the assays have shown that the vacuum enhanced considerably the recover free product.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE....IV
REMERCIEMENTS....V
RÉSUMÉ....VII
ABSTRACT....X
TABLE DES MATIÈRES....XIII
LISTE DES TABLEAUX....XVIII
LISTE DES FIGURES....XX
LISTE DES ANNEXES....XXIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS....XXIV

CHAPITRE I: INTRODUCTION 1
1.1 Problématique 1
1.2 Hypothèse de recherche 4
1.3 Objectifs 4

CHAPITRE II: REVUE DE LITTÉRATURE 6
2.1 Migration d'un LNAPL lors d'un déversement en milieu poreux 6
2.2 Approche d'un programme de remédiation *in-situ* 8
2.3 Facteurs gouvernant l'efficacité des deux traitements 9
2.3.1 Facteurs d'ordre purement microbiologique 10
2.3.1.1 Écologie microbienne 10
2.3.1.2 Besoins en nutriments des micro-organismes 12
2.3.1.3 Présence d'accepteurs d'électrons 13
2.3.1.4 Potentiel hydrogène et potentiel redox 13
2.3.1.5 Température 14
2.3.1.6 Taux d'humidité 15
2.3.1.7 Cinétique de biodégradation 16
2.3.2 Facteurs reliés à la nature des contaminants 17

2.3.2.1 Composition des mélanges pétroliers 18
2.3.2.2 Degré de récalcitrance 19
2.3.2.3 Concentration critique entraînant une toxicité microbienne 21
2.3.2.4 Volatilité 21
2.3.2.5 Solubilité 22
2.3.2.6 Adsorption et absorption 22
2.3.2.7 Masse volumique et viscosité 24
2.3.2.8 Tension interfaciale 25
2.3.3 Propriétés hydrogéologiques du milieu poreux 26
2.3.3.1 Texture et structure de la zone vadose 26
2.3.3.2 Profondeur de la nappe phréatique 27
2.3.3.3 Porosité 27
2.3.3.4 Conductivité hydraulique et perméabilité 28
2.3.3.5 Hétérogénéité du milieu poreux 30
2.4 Notions d'écoulement tri-phasique 30
2.4.1.1 Mouillabilité 31
2.4.1.2 Distribution des phases 33
2.4.1.3 Courbes caractéristiques du sol 34
2.4.1.4 Saturation 36
2.4.1.5 Potentiel matriciel 38
2.5 Description des technologies de remédiation de la zone vadose 40
2.5.1 Bioventilation 40
2.5.1.1 Critères de design de la bioventilation 41
2.5.1.2 Avantages et désavantages du traitement par bioventilation 42
2.5.2 Bioaspiration 43
2.5.2.1 Critères de design de la bioaspiration 45
2.5.2.2 Avantages et désavantages du traitement par bioaspiration 46

CHAPITRE III: MATÉRIEL ET MÉTHODES 49
3.1 Caractérisation initiale du sol 50
3.1.1 Caractérisation de la contamination initiale du sol 51
3.1.1.1 Teneur en hydrocarbures pétroliers 51
3.1.1.2 Masse volumique du diesel 52
3.1.1.3 Viscosité 52
3.1.1.4 Tension interfaciale 53
3.1.2 Caractérisation géotechnique et physico-chimique du sol 53
3.1.2.1 Préparation du sol 54
3.1.2.2 Granulométrie 54
3.1.2.3 Densité des solides 54
3.1.2.4 Masses volumiques et porosité 55
3.1.2.5 Conductivité hydraulique 55
3.1.2.6 Teneur en eau 56
3.1.2.7 pH 56
3.1.2.8 Rapport C/N/P 57
3.1.3 Caractérisation de la flore indigène du sol 58
3.1.3.1 Essais de minéralisation en microcosme 58
3.1.3.2 Analyses microbiologique et génétique des micro-organismes du sol 59
3.1.3.2.1 Dénombrement bactérien par la méthode MPN 60
3.1.3.2.2 Dénombrement bactérien sur plaques de Pétri 60
3.1.3.2.3 Sondes génétiques 61
3.2 Comportement hydrodynamique des fluides dans le milieu poreux 62
3.2.1 Rétention capillaire à basse pression 63
3.2.1.1 Remontée capillaire en liquides (eau et diesel) 63
3.2.1.2 Déplacement des phases (eau par diesel) 65
3.2.2 Rétention capillaire de l'eau et du diesel à haute pression 65
3.3 Étude de la biodégradation du diesel en colonnes 67
3.3.1 Description du dispositif expérimental 67

3.3.2 Saturation des colonnes 68
3.3.3 Paramètres d'opération 69
3.3.4 Paramètres microbiologiques 70
3.3.4.1 Respirométrie sous conditions dynamiques 70
3.3.4.2 Respirométrie sous conditions statiques 71
3.3.4.3 Biomasse 71
3.3.5 Suivi des essais en colonnes 72

CHAPITRE IV: RÉSULTATS OBTENUS 74
4.1 Étude préliminaire 74
4.2 Caractérisation initiale du sol à l'étude 78
4.2.1 Contamination du sol 78
4.2.2 Propriétés géotechniques du sol 80
4.2.3 Paramètres chimiques 82
4.2.4 Paramètres microbiologiques 83
4.2.4.1 Biomasse 83
4.2.4.2 Activité de la biomasse 85

4.3 Comportement des fluides (air/diesel/eau) dans le milieu poreux 88
4.3.1 Rétention capillaire à basse pression 89
4.3.1.1 Remonté capillaire 89
4.3.1.1.1 Remontée capillaire en diesel 91
4.3.1.1.2 Remontée capillaire de l'eau 94
4.3.1.2 Déplacement des phases 95
4.3.2 Rétention capillaire à haute pression 98

4.4 Étude de la biodégradation du diesel en colonnes 102
4.4.1 Caractérisation des colonnes 103
4.4.2 Saturation en diesel 104
4.4.3 Suivi des colonnes 105
4.4.3.1 Paramètres d'opération des deux traitements 105
4.4.3.2 Paramètres physico-chimiques 106

4.4.3.2.1 Teneur en eau....106
4.4.3.2.2 Perméabilité à l'air....107
4.4.3.2.3 Teneur en hydrocarbures....108
4.4.3.2.4 pH....112
4.4.3.2.5 Nutriments....112
4.4.3.3 Paramètres microbiologiques....113
4.4.3.3.1 Comptes bactériens hétérotrophes totaux....113
4.4.3.3.2 Comptes bactériens spécifiques....115
4.4.3.3.3 Activité de la biomasse à la minéralisation du [1-^{14}C] hexadécane....117
4.4.3.3.4 Test de respirométrie en mode dynamique....119
4.4.3.3.5 Test de respirométrie en mode statique....122
4.4.4 Bilan de masse....125
CHAPITRE V: DISCUSSION GÉNÉRALE....126
CONCLUSIONS....130
RECOMMANDATIONS....132
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES....133
ANNEXES....145

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Dégradeurs d'hydrocarbures pétroliers 12

Tableau 2.2 : Composition du diesel #2..... 19

Tableau 2.3 : Quelques fractions composant le diesel et leurs propriétés 24

Tableau 2.4 : Quelques valeurs des tensions interfaciales à 20°C 26

Tableau 2.5 : Quelques valeurs de saturation résiduelle..... 37

Tableau 3.1 : Liste des paramètres d'analyse lors des essais en colonnes..... 73

Tableau 4.1 : Caractérisation préliminaire du sol 75

Tableau 4.2 : Propriétés de la contamination du sol, du produit libre et de l'eau..... 79

Tableau 4.3 : Paramètres géotechniques du sol 81

Tableau 4.4 : Valeurs de conductivités hydrauliques 81

Tableau 4.5 : Densité initiale des bactéries dans le sol ayant servi aux essais de 84

Tableau 4.6 : Paramètres indicateurs de minéralisation..... 87

Tableau 4.7 : Caractérisation des trois colonnes..... 89

Tableau 4.8 : Bilan de masse des liquides dans la colonne 3 96

Tableau 4.9 : Caractérisation des colonnes pour les essais de biodégradation 103

Tableau 4.10: Conductivité hydraulique initiale et moyenne au diesel mesurée..... 105

Tableau 4.11 : Taux d'humidité du sol des colonnes d'étude de la biodégradation..... 106

Tableau 4.12 : Contamination en C_{10}-C_{30} vs profondeur des colonnes 109

Tableau 4.13 : Masse de diesel récupéré 109

Tableau 4.14 : Variabilité des analyses des hydrocarbures 111

Tableau 4.15 : Concentration des COV (durant 50 jours) 111

Tableau 4.16. Variation de la porosité à l'air dans les colonnes 120

Tableau 4.17. Taux de respiration de l'hexadécane 121

Tableau 4.18 : Taux d'utilisation d'oxygène en mode statique 123

Tableau 4.19 : Valeurs du quotient respiratoire 124

Tableau 4.20 : Quelques valeurs des taux de biodégradation (Hinchee, 1994). 124

Tableau 4.21 : Masse de diesel biodégradé sur base d'hexadécane 125

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Description conceptuelle d'un déversement de LNAPL. 7

Figure 2.2 Distribution des phases dans le sous-sol (adapté de Cookson, 1995) 8

Figure 2.3 Diagramme des forces aux interfaces des fluides 25

Figure 2.4 Distribution des phases en milieu poreux 31

Figure 2.5 Mouillabilité d'un fluide 32

Figure 2.6 Exemple de ganglion de LNAPL emprisonné 33

Figure 2.7 Courbe caractéristique sol-eau typique pour un sol silteux 35

Figure 2.8 Effet de la bioventilation et de la bioaspiration sur la pression capillaire 39

Figure 2.9 Schéma typique du traitement par bioventilation 41

Figure 2.10 Comparaison entre les techniques conventionnelle et la bioaspiration 44

Figure 3.1 Plan de travail 50

Figure 3.2 Schéma typique d'un microcosme 59

Figure 3.3 Rétention capillaire à basse pression et déplacement des phases 63

Figure 3.4 Dispositif expérimental de la bioaspiration et de la bioventilation 68

Figure 4.1 Localisation du lieu de prélèvement et gradients théoriques: P_c et θ_w 75

Figure 4.2 Courbes de minéralisation de [1-^{14}C] hexadécane 77

Figure 4.3 Courbe granulométrique du sol 80

Figure 4.4 Courbes de minéralisation de [1-^{14}C] hexadécane sans ajout de MSM 85

Figure 4.5 Courbes de minéralisation de [1-^{14}C] hexadécane avec ajout de MSM 86

Figure 4.6 Représentation graphique des paramètres de réponses 86

Figure 4.7 Variation du poids des colonnes dans le temps 90

Figure 4.8. Taux de variation du poids des colonnes dans le temps 91

Figure 4.9 Teneur massique totale en liquides (eau et diesel) 92

Figure 4.10 Teneur en hydrocarbures fractionnés (rétention en diesel) 93

Figure 4.11 Profil des degrés de saturation (essai de rétention en diesel) 93

Figure 4.12 Profil des teneurs massiques (rétention en eau) 94

Figure 4.13 Profil des degrés de saturation (rétention en eau) 95

Figure 4.14 Profil de la teneur massiques (essai de déplacement) 97

Figure 4.15 Profil des teneurs massiques en diesel (essai de déplacement) 97

Figure 4.16 Profil des degrés de saturation (essai de déplacement) 98

Figure 4.17 Courbe caractéristique eau-sol (haute pression) 99

Figure 4.18 Courbe caractéristique eau-sol (désaturation du sol initial) 100

Figure 4.19 Courbe caractéristique diesel-sol (haute pression) 102

Figure 4.20 Conductivité hydraulique au diesel vs volume de pores circulé 104

Figure 4.21 Variation de la perméabilité à l'air du sol 108

Figure 4.22 Évolution de la contamination dans le sol durant les deux traitements 110

Figure 4.23 Évolution des comptes hétérotrophes totaux dans les colonnes 113

Figure 4.24 Comptes bactériens spécifiques *ndoB* 115

Figure 4.25 Comptes bactériens spécifiques *alkB* 116

Figure 4.26 Courbe de minéralisation de [1-^{14}C] hexadécane 118

Figure 4.27 Courbe de minéralisation de [1-^{14}C] hexadécane 118

Figure 4.28 Consommation de l'oxygène en mode dynamique 120

Figure 4.29 Production de dioxyde de carbone en mode dynamique 121

Figure 4.30 Evolution des concentrations en O_2/CO2 122

Figure 4.31 Evolution des concentrations en O_2/CO2 123

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I : RELATIONS DE CALCUL DE LA SATURATION EN FLUIDES.....146

ANNEXE II : PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX.....150

ANNEXE III : SUIVI DES DÉCOMPTES BACTÉRIENS.....188

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A	rapport entre le volume d'air et le volume de sol
C	carbone
c	rapport massique entre l'hydrocarbure et l'oxygène
C_f	concentration finale en oxygène de l'air
C_o	concentration initiale en oxygène de l'air
Σ	coefficient d'étalement du contaminant
Do	masse volumique de l'oxygène
g	accélération de la gravité
K	conductivité hydraulique au fluide
k	perméabilité du milieu
k_a	perméabilité à l'air du milieu
K_B	taux de biodégradation
K_{diesel}	conductivité hydraulique au diesel
K_{eau}	conductivité hydraulique à l'eau
Ko	taux d'utilisation de l'oxygène
K_{oc}	coefficient d'adsorption de l'octanol sur la matière organique
K_{ow}	coefficient de partition octanol/eau
L	longueur d'écoulement de liquide

M_e	masse d'eau dans le sol
M_o	masse de LNAPL dans le sol
M_t	masse totale du sol
N	azote total
n	porosité du milieu
n_{a1}	porosité à l'air au temps
n_{a4}	porosité à l'air après 15 jours de traitement
n_{ai}	porosité à l'air initiale
NTK	azote total Kjeldahl
P	phosphore total
P_a	pression d'air
P_b	pression d'entrée d'air
P_c	pression capillaire
P_c^{ao}	pression capillaire à l'interface air-LNAPL
P_c^{oe}	pression capillaire à l'interface LNAPL-eau
P_e	pression d'eau
P_{in}	pression d'air à l'entrée des colonnes
P_{nw}	pression du fluide non-mouillant
P_o	pression du composé organique

P_{out}	pression d'air à la sortie des colonnes
P_w	pression du fluide mouillant
Q	débit d'air entré
R_T	facteur de correction de la température
S	section transversale d'écoulement
S_a	degré de saturation en air
S_e	degré de saturation en eau
S_{el}	degré de saturation en eau libre
S_{er}	degré de saturation en eau résiduelle
S_o	degré de saturation en LNAPL
S_{ol}	degré de saturation en LNAPL libre
S_{or}	degré de saturation en LNAPL résiduel
S_t	degré de saturation total
V	volume de sol
V_e	volume d'eau dans le sol
$V_{e\ discontinu}$	volume d'eau immobilisé dans le sol
μ	viscosité cinématique de l'air
V_o	volume de LNAPL dans le sol
$V_{o\ discontinu}$	volume de LNAPL immobilisé dans le sol

V_p	volume des pores dans le sol
w_e	teneur massique en eau
w_o	teneur massique en LNAPL
ΔH	charge hydraulique
θ_e	teneur volumique en eau
θ_o	teneur volumique en LNAPL
ρ	masse volumique du sol sec
σ_{ea}	tension interfaciale eau-air
σ_{eo}	tension interfaciale eau-LNAPL
σ_{oa}	tension interfaciale LNAPL-air
ADN	acide désoxyribonucléique
ASTM	American Society for Testing and Materials
Ba1	colonne traitée en mode de bioaspiration
Ba2	colonne traitée en mode de bioaspiration
Bac	colonne abiotique traitée en mode de bioaspiration
BDI	indice de biodégradation
BPC	composés biphéniles polychlorés
Bv	colonne traitée en mode de bioventilation
C1	colonne servant à la rétention capillaire en diesel

C_{10}-C_{19}	hydrocarbures pétroliers avec une chaîne de 10 à 19 carbones
C_{10}-C_{30}	hydrocarbures pétroliers avec une chaîne de 10 à 30 carbones
C2	colonne servant à la rétention capillaire en eau
C_{20}-C_{29}	hydrocarbures pétroliers avec une chaîne de 20 à 29 carbones
C3	colonne servant au déplacement des phases (eau par diesel)
COT	carbone organique total
COV	composés organiques volatils
Dm1	variation du poids de la colonne 1
Dm2	variation du poids de la colonne 2
Dm3	variation du poids de la colonne 3
dt	variation du temps
GERLED	groupe d'étude et de restauration des lieux d'élimination de déchets
GERSOL	groupe d'étude et de restauration des sols contaminés
HC	bactéries hydrocarbonoclastes
HT	bactéries hétérotrophes totaux
JP	jet propellent
Lag	période d'acclimatation des micro-organismes
LNAPL	light nonaqueous phase liquid
MEF	Ministère de l'Environnement et de la Faune

MER	Ministère de l'Énergie et des Ressources
MMC	milieu minéral de type C
MPN	méthode du nombre le plus probable
MSM	milieu salin minéral
NBDI	indice normalisé de biodégradation
NRC	Conseil National de Recherche
NTK	azote total Kjeldahl
PCE	tetrachloroetylene
pH	potentiel de hydrogène
PVC	polychlorure de vinyle
Ravg	taux moyen de minéralisation
Rmax	taux maximal de minéralisation
S1	strate 1
S1+S2	mélange homogène des strates 1 et 2
S2	strate 2
UFC	unités formatrices des colonies
USDA	Ministère de l'Agriculture des États-Unis
USEPA	Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis
YTS	milieu de croissance bactérienne

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Le premier chapitre, intitulé l'introduction, présente la problématique de la pollution des terrains contaminés par des hydrocarbures pétroliers, ainsi que l'hypothèse de recherche et les objectifs proposés.

1.1 Problématique

Les hydrocarbures pétroliers sont des produits mondialement utilisés et ils présentent des multiples applications industrielles (e.g., chimique et pétrochimique, pharmaceutique, textiles, plastiques, production de pesticides, production de peinture, de laque et de solvants, préservation du bois, etc).

Depuis le début de la révolution industrielle, les activités humaines ont créé d'immenses quantités de produits chimiques qui ont été relâchés dans l'environnement, soit délibérément (i.e., à des fins agricoles et industrielles), soit accidentellement (i.e., manutention impropre, fuites, remblayages, décharges non-contrôlées, etc). Par conséquent, les régions qui ont été les berceaux de l'industrialisation sont actuellement aux prises avec des nombreux terrains contaminés par des hydrocarbures pétroliers. Cela constitue un frein considérable à la remise en valeur de ces terrains, donc un sérieux handicap au développement économique étant donné les coûts très élevés associés à leur restauration.

Aux Pays Bas, le coût estimé pour la réhabilitation des sols contaminés s'élève à plus de $30 milliards, dont le coût de restauration *ex situ* (excavation et amélioration des stations d'essence) représente approximativement $750 millions, tandis qu'en Allemagne, ce même coût s'élève à $100 milliards (Pijls et al., 1994). Au Canada, il existe à l'heure actuelle à peu près 100 000 sites contaminés. Le coût estimé pour la restauration des ces sites dans le cas où cet objectif est possible et désiré, s'élève à plus de $20 milliards

(Calder, 1997). Pour la seule région de Montréal, les coûts de restauration des terrains contaminés sont évalués à environ $3 milliards (Belles-Isles et Sarrailh, 1997).

Au Québec, afin de gérer le problème des sols contaminés, le Ministère de l'Environnement et de la Faune (MEF) a mis sur pied deux programmes (Samson, 1994). Le premier, créé en 1983, est le groupe d'étude et de restauration des lieux d'élimination des déchets dangereux (GERLED). L'objectif était de réaliser l'inventaire, la caractérisation et la restauration, si nécessaire, des lieux contaminés ou potentiellement contaminés. Ainsi, en avril 1991, un nombre de 346 lieux contaminés étaient identifiés. Le deuxième, créé en 1993, le groupe d'étude et de restauration des sols contaminés (GERSOL) avait comme but principal la réhabilitation des terrains contaminés en vue de permettre leur réutilisation d'une manière sécuritaire. En mai 1993, la banque de données des dossiers GERSOL comportait quelques 800 lieux.

La contamination des sols par des produits pétroliers, représente une sérieuse menace pour la qualité des eaux souterraines puisque quoique légèrement solubles, ils peuvent constituer une source de contamination à long terme (Hunt and Sitar, 1988, Lenhard et Parker, 1988).

Les cas de fuites de produits pétroliers ont vu leur nombre augmenter au cours des deux dernières décennies par suite de la corrosion des réservoirs souterrains en acier, installés en grand nombre dans les années 1950 et 1960. Au Québec, il existe actuellement plus de 50 000 réservoirs enfouis et très certainement, 20 000 d'entre eux laissent s'échapper des hydrocarbures dans le sol (Environnement Canada, 1999). Ces produits, en s'infiltrant par gravité dans le sol rejoignent plus ou moins rapidement la nappe phréatique causant ainsi sa contamination. La fuite de ces mêmes produits présente un autre danger, soit les explosions. Ainsi, les vapeurs produites à la suite d'une fuite souterraine peuvent s'accumuler dans les sous-sols, les caniveaux ou autres structures souterraines et produire une explosion. C'est d'ailleurs pourquoi le Ministère de l'Énergie et des Ressources (MER) exige que tous les réservoirs souterrains en acier, non

protégés contre la corrosion soient remplacés d'ici l'an 2001 (Environnement Canada 1999).

Nombreux sont les traitements préconisés pour la restauration des sols contaminés: 1) traitements thermiques (incinération, pyrolyse, désorption thermique à basse/haute température), 2) traitements physico-chimiques (lavage de sol, encapsulation/mise en décharge, solidification/stabilisation, vitrification *in situ*, extraction par des solvants, extraction sous vide), 3) traitements biologiques (biopiles, bioventilation, bioaspiration) et, 4) traitement passif ou atténuation naturelle. De toutes ces alternatives, les traitements biologiques jouissent de la meilleure perception au public, étant considérés comme écologiques et sécuritaires (Errampalli, 1997).

Jusqu'à présent, la restauration *in situ* d'un site contaminé par des hydrocarbures pétroliers légers (LNAPL : light non aqueous-phase liquid) s'effectuait en trois étapes, soit: 1) récupération de la phase flottante par pompage et traitement en surface, 2) bioventilation de la zone vadose afin de promouvoir la biodégradation aérobie et 3) si nécessaire, décontamination des eaux souterraines soit par pompage et traitement en surface soit par biotraitement *in situ* (Hoeppel et al., 1995). Depuis quelques années, une technologie communément appelée bioaspiration (i.e., bioslurping en anglais) permet à la fois de combiner les étapes de récupération des hydrocarbures pétroliers flottant à la surface de la frange capillaire et de biorestauration de la zone vadose (Baker et Bierschenk, 1995, Hoeppel et al., 1995, Leeson et al., 1995, Wickramanayake et al., 1996).

Les experts en remediation des sites contaminés par des hydrocarbures pétroliers sont tous d'accord pour dire que pour plusieurs sites, la technique de bioaspiration s'avère être une technique de remediation plus rapide, plus efficace et moins coûteuse que les techniques conventionnelles, notamment en terrains peu perméables. Cette technique rendra possible la décontamination des sites qui jusqu'à date se sont avérés difficile voire impossible à restaurer par des techniques conventionnelles (Baker et Bierschenk, 1995).

Bien que l'efficacité de la technologie à biodégrader les hydrocarbures dans la zone vadose ait été démontrée par des tests de respirométrie (Hoeppel et al., 1995), l'efficacité de cette méthode à biodégrader les hydrocarbures n'a pas vraiment été démontrée notamment au niveau de la frange capillaire pour ainsi réduire la masse de contaminants. En effet, il n'existe que peu de données disponibles dans la littérature sur les processus hydrodynamiques et microbiologiques se déroulant dans la zone vadose, de même que sur leur influence sur l'efficacité de ce procédé.

Ainsi, ce projet portera plus particulièrement sur la définition et la compréhension des processus hydrodynamiques et microbiologiques intervenant dans la zone vadose lors du traitement par bioaspiration et bioventilation d'un sol provenant d'un site contaminé au diesel.

1.2 Hypothèse de recherche

L'efficacité d'un processus de biodégradation dans un milieu poreux tri-phasique est à la fois tributaire de la microbiologie et des propriétés hydrodynamiques du milieu à traiter et des propriétés physico-chimiques du contaminant présent.

L'hypothèse sur laquelle se base la recherche est la suivante:

Comparativement au mode de bioventilation, la succion accrue en mode de bioaspiration d'un sol contaminé à saturation en diesel tend à réduire la quantité résiduelle de diesel au niveau de la frange capillaire, ce qui stimule les processus de biodégradation.

1.3 Objectifs

En partant de l'hypothèse de recherche ci-dessus mentionnée, les objectifs suivants ont été fixés:

1) Caractériser le comportement hydrodynamique du diesel dans la zone vadose;

2) Simuler au laboratoire les conditions retrouvées lors d'un traitement par bioaspiration et bioventilation;

3) Évaluer et comparer l'impact des conditions hydrodynamiques créé lors d'un traitement par bioventilation d'une part et par bioaspiration d'autre part sur l'efficacité de la biodégradation.

CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE

Le chapitre 2 présente les concepts théoriques pertinents pour cerner le cadre de la recherche, le domaine d'application et fournit les informations nécessaires à la compréhension du sujet et à son évolution. Une première section décrit la migration d'un contaminant dans la zone vadose, tandis qu'une deuxième section décrit l'approche d'un programme de remédiation. Les facteurs d'ordre microbiologique et hydrodynamique ainsi que l'écoulement tri-phasique présentant une grande importance pour la réussite de la faisabilité technique des technologies telles que la bioaspiration et la bioventilation sont présentés dans une troisième et quatrième partie respectivement. Finalement, une cinquième partie se consacre d'une part, à la description des deux technologies, (i.e., bioaspiration et bioventilation) et d'autre part, à une étude comparative de leurs fonctionnement et leurs limites d'application.

2.1 Migration d'un LNAPL lors d'un déversement en milieu poreux

Lorsque des hydrocarbures pétroliers sont relâchés dans l'environnement à la surface ou près de la surface du sol, ils migrent à travers la zone non-saturée, atteignant ou non la nappe phréatique suivant le volume du déversement. Ainsi, ils se déplacent suivant l'action conjuguée des forces de gravité et de viscosité sous forme de phase non-aqueuse, séparée de la phase gazeuse ou de la phase aqueuse déjà présentes dans le milieu poreux et, sont immobilisés à l'intérieur des pores par les forces capillaires. Dans le cas où ces composés sont plus légers que l'eau (LNAPL), ils se répandent latéralement et flottent au-dessus de la surface de la frange capillaire ou de l'eau souterraine (Hunt et Sitar, 1988, Wilson et al., 1990). La Figure 2.1, montre schématiquement la migration d'un LNAPL dans un milieu poreux.

Note : Pour fins de simplification et meilleure compréhension tout au long de ce mémoire les composés organiques non-aqueux plus légers que l'eau prennent l'abréviation anglaise, soit LNAPL.

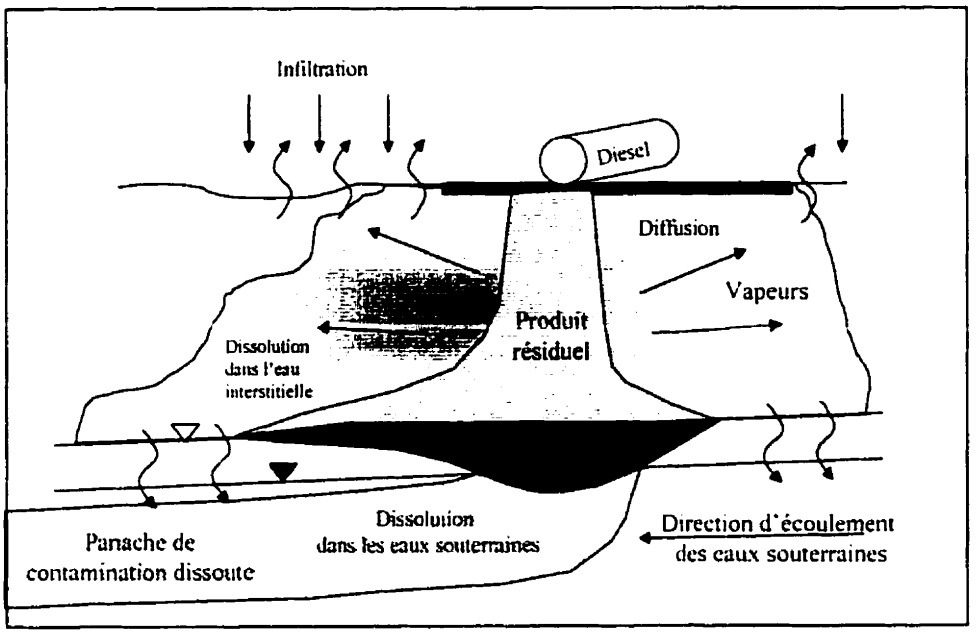


Figure 2.1 Description conceptuelle d'un déversement de LNAPL.

Comme l'indique la

Figure 2.2, le LNAPL s'y trouve sous plusieurs formes (Cookson, 1995):

1) phase libre, peu soluble et drainable, située au-dessus de la frange capillaire;

2) phase aqueuse, constituée de composés dissous dans l'eau souterraine ou dans l'eau interstitielle;

3) phase résiduelle, représentée par les composés adsorbés/absorbés ou emprisonnés dans la matrice solide, non drainable, se trouvant dans la zone non-saturée et saturée;

4) phase de vapeurs, constituée par la fraction volatilisée à l'intérieur de la zone vadose.

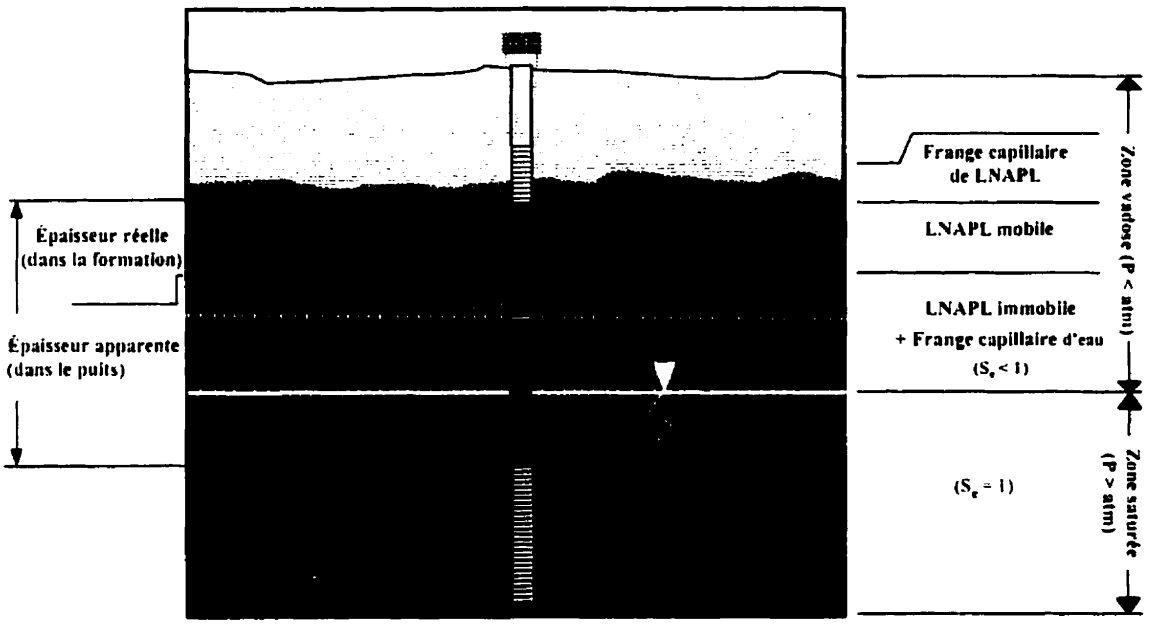


Figure 2.2 Distribution des phases dans le sous-sol (adapté de Cookson, 1995)

S_e - degré de saturation en eau, P – pression hydrostatique d'eau.

Il reste quatre composantes à traiter dont la phase aqueuse est la forme la plus assujettie aux règlements car, l'eau souterraine potable et contaminée pose un risque immédiat à la santé humaine. Les phases libre et résiduelle ne peuvent non plus être ignorées car, étant non drainables, elles constituent la majeure partie de la masse de contamination dans le sous-sol. De plus, quant à elle seule, la phase résiduelle dans la zone vadose peut entraîner des problèmes de sécurité et de santé humaine (i.e., contact direct ou explosion).

2.2 Approche d'un programme de remédiation *in-situ*

L'approche de remédiation *in situ* d'un site contaminé consiste généralement en trois étapes :

1. élimination de la source (e.g., remplacement des infrastructures défaillantes, excavation des sols fortement contaminés lorsque possible);

2. enlèvement du produit libre;
3. restauration des sols et eaux souterraines.

Il existe trois grandes catégories de technologies de biotraitement dans le domaine de la restauration *in situ* des terrains contaminés. La première catégorie s'adresse au traitement de la zone vadose, i.e., l'horizon de sol se situant immédiatement au-dessus de la nappe phréatique. Les technologies telles que l'extraction des vapeurs sous vide et la bioventilation sont généralement utilisées. La seconde catégorie comprend les technologies de remédiation des contaminants au niveau de la zone saturée telles que le pompage et le biotraitement en surface ou le barbotage et le biobarbotage *in situ*. Enfin, une troisième catégorie, mixte qui est destinée à traiter en même temps deux milieux différents (i.e., récupération du produit libre de la frange capillaire et remédiation de la zone vadose), soit la bioaspiration.

Dans le cadre de cette recherche, deux des technologies de restauration de la zone vadose, soit la bioventilation et plus particulièrement la bioaspiration sont analysées et discutées.

2.3 Facteurs gouvernant l'efficacité des deux traitements

L'application d'un procédé microbiologique pour la remédiation des sols et de la nappe phréatique contaminés s'est avérée être une bonne approche pour solutionner les problèmes environnementaux. Ainsi, les contaminants peuvent être éliminés d'une manière permanente par leur transformation et/ou minéralisation, évitant les traitements chimiques et physiques. Le potentiel métabolique des micro-organismes et les propriétés physiques et chimiques du contaminant déterminent la faisabilité des réactions de biotransformation.

Les contraintes écologiques de la biotransformation peuvent être microbiologiques et environnementales. Leur identification est requise pour l'évaluation de la faisabilité d'un traitement par voie microbiologique.

2.3.1 Facteurs d'ordre purement microbiologique

Les hydrocarbures pétroliers sont assimilés par une variété de micro-organismes (Austin et al., 1977, Britton, 1984). Cependant, les bactéries hétérotrophes représentent le groupe majeur étant responsable de la biodégradation de la plupart des composés organiques (Godsy, 1998). Ces bactéries sont à environ 80 % de type gramme positif (Chapelle, 1992).

La dégradation microbienne des hydrocarbures pétroliers est influencée par un grand nombre de facteurs, dont les facteurs microbiologiques (e.g., écologie microbienne, besoins en nutriments, cinétique de biodégradation, nature et récalcitrance des contaminants).

2.3.1.1 Écologie microbienne

Avant que les composés organiques puissent être dégradés ou transformés, un minimum de conditions doit être rencontré. Avant tout, les micro-organismes doivent être présents à l'endroit ou se trouve le contaminant et posséder la capacité de participer aux processus de dégradation ou de transformation. L'accepteur d'électrons doit aussi être présent et il peut être soit un composé organique, soit un composé inorganique. Pour la plupart des bactéries et champignons, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène moléculaire. Le produit final réduit durant la respiration aérobie est l'eau, et le composé final oxydé durant la production d'énergie est le dioxyde de carbone. En l'absence d'oxygène ou en conditions d'anoxie (e.g., zone capillaire et souterraine, strates et lentilles imperméables), certaines populations bactériennes respirent d'autres composés inorganiques, moins oxydés. Les accepteurs d'électrons les plus communs et les groupes bactériens associés sont: l'ion ferrique, Fe^{3+} (réducteurs du fer), l'ion sulfate, SO_4^{2-} (sulfato-réducteurs), et le dioxyde de carbone, CO_2 (méthanogènes).

Quant au contaminant, pour qu'il soit incorporé dans les réactions d'oxydoréduction, il doit servir soit de donneur, soit d'accepteur d'électron et la tendance de donner ou d'accepter des électrons dépend de ses propriétés chimiques (Godsy 1998).

L'activité microbienne est habituellement plus grande près de la surface et décroît avec la profondeur (Cookson, 1995). Les sols de surface ayant un contenu adéquat en carbone, oxygène et nutriments possèdent typiquement entre 10^7 et 10^9 micro-organismes par gramme de sol, dont 10^5-10^6 sont des micro-organismes hydrocarbonoclastes. La distribution des micro-organismes hydrocarbonoclastes reflète l'historique d'exposition de l'environnement au contaminant. Dineen et ses collaborateurs (1993) notent qu'après une exposition aux produits pétroliers, les hydrocarbonoclastes peuvent augmenter atteignant un nombre allant de 10^6 à 10^8. Il fut aussi rapporté que dans un écosystème pollué la proportion de micro-organismes hydrocarbonoclastes peut atteindre 100 % de la population totale existante (Atlas, 1981). Par ailleurs, des décomptes bactériens semblables à ceux obtenus en surface ont été rencontrés dans la zone capillaire (Chapelle, 1992, Wood, 1993). Des décomptes bactériens montrant moins de 10^3 micro-organismes par gramme de sol indiquent la présence de conditions toxiques (Cookson, 1995).

Austin et ses collaborateurs (1977) ont réalisé une étude sur la taxonomie et l'écologie des micro-organismes dégradeurs d'hydrocarbures pétroliers. Ainsi, 48 caractères différents du point de vue biochimique, cultural, morphologique et physiologique ont été testés sur 33 différents milieux de culture (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Dégradeurs d'hydrocarbures pétroliers

Groupe taxonomique	%
Pseudomonas spp.	27
Actynomycetes	21
Micrococcus spp.	20
Nocardia spp.	11
Coryneiformes	10
Enterobacteriaceae	6
Groupe non-identifié	4
S. natans	1

Cette classification est semblable aux données publiées par Britton (1984). Ainsi, il s'est avéré que le groupe de *Pseudomonas* est retrouvé fréquemment lors de la dégradation des n-alcanes, tandis que le groupe constitué de *Micrococcus* dégrade les chaînes carbonées, allant de C_7 à C_{18}. Par ailleurs, les champignons sont également reconnus pour la dégradation des chaînes d'alcanes allant de C_{10} à C_{18} (e.g., *Candida* et *Cryptococcus*; Leahy et Colwell, 1990).

2.3.1.2 Besoins en nutriments des micro-organismes

Les micro-organismes requièrent pour leur croissance une proportion d'éléments nutritifs majeurs (e.g., carbone, hydrogène, soufre, azote et phosphore) variant en fonction de leur diversité. Dans les sols contaminés par des composés organiques, le carbone et l'hydrogène ne sont pas limités parce que ceux-ci représentent leurs constituants majeurs, et le soufre est généralement en quantité suffisante pour la croissance. Par contre, l'azote et le phosphore sont les principaux éléments qui limitent la croissance. Le taux carbone/azote/phosphore (C/N/P) ordinairement considéré est de 300 à 100/10/1 à 0,5. Toutefois, ce taux peut varier dépendant de la nature du contaminant (Godsy, 1998).

2.3.1.3 Présence d'accepteurs d'électrons

Une dégradation rapide et complète a lieu en conditions aérobies pour la majeure partie des composés pétroliers (Cookson, 1995). C'est durant l'étape initiale du catabolisme que les micro-organismes incorporent l'oxygène moléculaire dans le substrat par des enzymes de type oxygénase (Atlas, 1981, Leahy et Colwell, 1990). Le taux de dégradation des hydrocarbures diminue avec la baisse de la concentration en oxygène. Cela engendre une persistance des hydrocarbures beaucoup plus longue dans les couches imperméables que dans les couches aérées d'un milieu poreux (Atlas, 1981). D'après un rapport de l'U.S.EPA (1991, 1995b), une concentration en oxygène dans la phase gazeuse plus faible que 5 % v/v limitera les processus de biodégradation des composés organiques.

Compte tenu du fait que l'écosystème du sol est très complexe, il est peu possible de démontrer que la diminution en oxygène représente le facteur limitant pour une activité microbienne donnée (Griffin, 1980). En effet, la disponibilité de l'oxygène dans le sol dépend du taux de consommation des micro-organismes, du type de sol, de la teneur en eau et de la présence des substrats utilisables qui peuvent en engendrer une diminution.

Des taux de minéralisation d'alcanes de 10 à 20 % ont été atteints en conditions anaérobies durant 35 jours, mais la minéralisation du naphtalène fut négligeable (0,4 %) dans ces mêmes conditions (Atlas, 1981).

2.3.1.4 Potentiel hydrogène et potentiel redox

Le pH affecte tant les micro-organismes (i.e., fonctions cellulaires, transport au niveau de la membrane) que l'équilibre des réactions catalysées. La majeure partie des bactéries croissent à un pH neutre ou légèrement alcalin (Riser-Roberts, 1992, Cookson, 1995). Les activités enzymatiques sont influencées par les variations de pH. Chaque enzyme travaille plus rapidement à un pH optimal spécifique. Si le pH s'éloigne de la valeur optimale, l'activité enzymatique diminue et l'enzyme peut être endommagée voire dénaturée (Prescott et al., 1995).

Les micro-organismes modifient fréquemment le pH de leur propre habitat en produisant des déchets métaboliques acides ou basiques. Par exemple, la dégradation des protéines et des acides aminés, rend le milieu alcalin (Prescott et al., 1995). Le pH est aussi affecté par la quantité d'anhydride carbonique dissoute dans l'eau et par l'équilibre du dioxyde de carbone avec les ions bicarbonate et carbonate. Le processus d'aération durant des traitements tels que la bioventilation et la bioaspiration peut enlever le dioxyde de carbone (gaz acide) dissous dans l'eau des pores et ainsi décroître les ions d'hydrogène et en conséquence, augmenter le pH du sol ($CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$; Sawyer et al., 1994).

Comme, les ions d'hydrogène sont impliqués dans le transport d'électron, le pH et le potentiel redox (Eh) sont interdépendants. D'une manière générale, un sol hautement contaminé est en conditions d'anoxie à cause de la respiration bactérienne. Dans ces conditions, d'autres accepteurs d'électrons seront favorisés, dont ceux qui possèdent le plus haut Eh en premier, l'ordre étant le suivant: NO_3, Fe^{3+}, SO_4^{2-}, CO_2. Suivant le Eh, plusieurs populations bactériennes pourront dégrader la même contamination à des moments différents (Godsy 1998).

2.3.1.5 Température

La température influence la dégradation des composés pétroliers par son effet tant sur la nature physique et chimique de la composition que sur le métabolisme de la communauté microbienne (Atlas, 1981). Le taux de biodégradation s'accroît avec la température, les écosystèmes exposés à des basses températures dégradent les hydrocarbures plus lentement. La température optimale pour la biodégradation aérobie des hydrocarbures pétroliers se situe entre 15°C et 30°C (Eglert et al., 1992). Cependant, plusieurs genres de micro-organismes hydrocarbonoclastes ont montré une grande tolérance aux fluctuations de température (e.g., 52 % des colonies cultivées sur un milieu solide ont poussé à 5°C, 78 % à 37°C et 50 % à 43°C) (Austin et al., 1997). En réalité, l'effet net de

la température sur la globalité du taux de biodégradation dépend des processus qui le limitent (Sturman et al., 1995).

2.3.1.6 Taux d'humidité

La teneur en humidité permet de s'assurer que la phase aqueuse entourant les particules de sol est suffisante pour maintenir une population active de micro-organismes. Plusieurs réactions biochimiques réalisées par les micro-organismes se produisent dans la phase aqueuse (Leahy et Colwell, 1990).

Les micro-organismes hydrocarbonoclastes agissent à l'interface hydrocarbure-eau. Cependant, de tels micro-organismes peuvent croître sur l'entièreté de la surface d'une gouttelette d'hydrocarbure, mais jamais à leur intérieur sans y avoir de l'eau entraînée (Atlas, 1981).

Dans les études de faisabilité des technologies de biorestauration des terrains contaminés, il est courant de remplacer le notion d'humidité optimale par la notion de capacité de rétention au champ. Pour des fins de biorestauration des sols contaminés, Cookson (1995) propose une teneur massique correspondant à une succion allant de 0,1 à 0,2 atm, tandis que Dupont (1993) suggère plutôt une succion de 0,3 atm. Plus récemment, Zacharias et Bohne (1997), ont proposé le remplacement de la capacité au champ par une approche de drainage interne, qui lui, tient compte de la nature du sol et de la profondeur de la nappe phréatique.

Une teneur en eau comprise entre 50 % et 80 % de la capacité de rétention au champ, ou 15 % sur une base de poids de sol sec, s'est avérée être optimale pour la biorestauration des sols contaminés (Cookson, 1995). Cependant, des tests réalisés sur le terrain durant un traitement par bioventilation d'un site contaminé par des hydrocarbures pétroliers semi-volatils ont démontré qu'une teneur en eau allant de 35 % à 50 % de la capacité de rétention au champ avaient accéléré le taux de biodégradation (Dupont et al., 1991).

2.3.1.7 Cinétique de biodégradation

Les variables qui contrôlent la cinétique de biodégradation peuvent être d'une part, des variables qui déterminent la disponibilité et la concentration du contaminant à dégrader et qui affectent la grandeur et l'activité de la population microbienne et d'autre part, des variables qui contrôlent directement le taux de réaction.

Les membres d'une population microbienne mixte ne sont généralement pas tous actifs de la même manière face à un substrat organique donné et cela est due à la spécialisation des espèces face au substrat qui lui, n'est pas également distribué ou disponible.

Il est impossible de distinguer entre les organismes actifs et dormants sans effectuer des tests de respirométrie (Lyman et al., 1990). Afin de relier les taux de respiration et de biodégradation aux mesures de concentration en contaminant obtenus durant un traitement par bioventilation/bioaspiration, une relation stœchiométrique est nécessaire pour chaque type de contaminant. Ainsi, la biodégradation aérobie (minéralisation) du diesel peut être représentée par les relations suivantes (Reisinger et al., 1995).

$$C_{10}H_{22} + 15{,}5O_2 = 10CO_2 + 11H_2O, \quad \text{n-décane} \qquad \text{Eq.[1]}$$

$$C_{16}H_{34} + 16{,}5O_2 + 1{,}6NH_3 = 1{,}6C_5H_7O_2N + 8CO_2 + 13{,}8H_2O \text{ hexadécane} \qquad \text{Eq.[2]}$$

(Biomasse)

En se basant sur ces équations globales de biodégradation, il en ressort qu'une quantité supérieure à 3 g d'O_2/g d'hydrocarbure est nécessaire pour leur minéralisation.

Une méthode d'estimation du taux de biodégradation est proposée par Ong et ses collaborateurs (1994). D'une part, le taux d'utilisation d'oxygène en conditions dynamiques peut être estimé comme suit:

$$K_0 = \frac{Q(C_0 - C_f)}{Vn} \qquad \text{Eq.[3]}$$

où :

K_0 – taux d'utilisation d'oxygène (%/jour);

Q – débit d'air entré (cm^3/jour);

C_0 – concentration initiale en oxygène (%);

C_f – concentration finale en oxygène (%);

V – volume de sol (cm^3);

n – porosité du milieu (cm^3/cm^3).

A partir du taux d'utilisation d'oxygène ci-dessus décrit, le taux de biodégradation peut être estimé en connaissant la masse volumique et la porosité du milieu à traiter:

$$K_B = \frac{-K_0 A D_o c}{100\%} \qquad \text{Eq.[4]}$$

où :

K_B – taux de biodégradation (mg/kg/jour);

K_0 – taux d'utilisation d'oxygène (%/jour);

A – rapport entre le volume d'air et le volume de sol (L/m^3);

D_0 – masse volumique de l'oxygène (kg/m^3);

c – rapport massique entre l'hydrocarbure et l'oxygène;

2.3.2 Facteurs reliés à la nature des contaminants

La disparition des hydrocarbures pétroliers dans l'environnement est largement déterminée par des facteurs abiotiques qui influencent le taux de croissance et l'activité enzymatique des micro-organismes. La compréhension et l'interprétation juste des facteurs abiotiques présente une grande importance quant au choix et à la faisabilité technique des technologies telles que la bioventilation et la bioaspiration.

L'état physique des hydrocarbures pétroliers a un effet important sur leur biodégradation car, ils contiennent souvent un mélange d'hydrocarbures qui présente des caractéristiques différentes.

2.3.2.1 Composition des mélanges pétroliers

La composition des mélanges pétroliers varie en fonction de leur origine, du mode de stockage, du traitement, de l'âge de la contamination ainsi que des mécanismes comme la volatilité, la solubilité et la biodégradation. A titre d'exemple, les carburants d'avion contiennent plus de 300 composés différents, la solution de préservation du bois en contient plus de 200 composés, dont 85 % hydrocarbures aromatiques polynucléaires, 12 % composés phénoliques et 3 % composés hétérocycles (Cookson, 1995). Quant au diesel, il contient un mélange de composés aliphatiques (45,9 %), alicycliques (34,3 %) et aromatiques hétérocycles (19,8 %) et un exemple de composition détaillée est donné au Tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Composition du diesel #2

Composante	Concentration (% v)	Composante	Concentration (% v)
C_{10} paraffines	0,9	C_{15} paraffines	7,4
C_{10} cycloparaffines	0,6	C_{15} cycloparaffines	5,5
C_{10} aromatiques	0,4	C_{15} aromatiques	3,2
C_{11} paraffines	2,3	C_{16} paraffines	5,8
C_{11}cyclo paraffines	1,7	C_{16} cycloparaffines	4,4
C_{11} aromatiques	1	C_{16} aromatiques	2,5
C_{12} paraffines	3,8	C_{17} paraffines	5,5
C_{12} cycloparaffines	2,8	C_{17} cycloparaffines	4,1
C_{12} aromatiques	1,6	C_{17} aromatiques	2,4
C_{13} paraffines	6,4	C_{18} paraffines	4,3
C_{13} cycloparaffines	4,8	C_{18} cycloparaffines	3,2
C_{13} aromatiques	2,8	C_{18} aromatiques	1,8
C_{14} paraffines	8,8	C_{19} paraffines	0,7
C_{14} cycloparaffines	6,6	C_{19} cycloparaffines	0,6
C_{14} aromatiques	3,8	C_{19} aromatiques	0,3

SOURCE: (Clewell, 1981).

2.3.2.2 Degré de récalcitrance

La capacité de dégradation des composés individuels est influencée par la composition de ces mélanges (Atlas, 1981).

Nombreuses sont les études qui se sont consacrées aux principales voies métaboliques conduisant à la dégradation des hydrocarbures pétroliers (Britton, 1984, Cookson, 1995). Il en découle que la voie métabolique la plus commune de dégradation des composés aliphatiques linéaires est l'oxydation du groupe méthyle terminal. Par contre, moins de conclusions sont faites quant à la dégradation des composés aliphatiques ramifiés. En ce

qui concerne la dégradation des hydrocarbures aromatiques pétroliers, deux mécanismes en sont responsables, l'oxydation du benzène et l'oxydation des groupes alkyle substitués (Cookson, 1995).

Les différentes populations peuvent varier dans leur dépendances relatives à l'attaque aux hydrocarbures afin d'effectuer leur dégradation. D'une manière générale, la dégradation des alcanes est inductive (i.e., induction des enzymes oxydatives), mais des évidences de répression catabolique ont été aussi signalées. Ainsi, les micro-organismes réalisent une pseudo-solubilisation (bioémulsification) en excrétant des enzymes extracellulaires ou surfactants qui sont supposés abaisser suffisamment la tension interfaciale pour permettre la formation des microémulsions et par conséquent, leur transformation (Britton, 1984, Foght et al., 1989).

Lorsque la biorestauration est choisie en tant que technologie de restauration des sols contaminés par des produits pétroliers, les aspects suivants doivent être pris en compte (Atlas, 1981, Britton, 1984, Cookson, 1995, Leahy et Colwell, 1990, Lyman et al., 1990):

1) les longues chaînes d'alcanes sont dégradées plus rapidement que les courtes chaînes ;

2) les hydrocarbures aliphatiques saturés sont dégradés plus rapidement que ceux qui sont non-saturés ;
3) les hydrocarbures ayant des chaînes ramifiées sont dégradés moins rapidement que les chaînes linéaires ;
4) la dégradation des hydrocarbures acycliques varient significativement suivant le type de substitutions et la complexité de leur structure ;
5) la facilité de dégradation tant aérobie qu'anaérobie des composés ayant un seul anneau de benzène est fonction du nombre, du type et de la position des substitutions ;
6) les hydrocarbures aromatiques ayant deux ou trois anneaux de benzène sont rapidement dégradés par un grand nombre des bactéries et champignons même sous

d'autres conditions que l'aérobie, tandis que ceux ayant un nombre d'anneaux de benzène supérieur à quatre, sont plus difficilement dégradés voire récalcitrants et le co-métabolisme y est requis.

2.3.2.3 Concentration critique entraînant une toxicité microbienne

Quant à la concentration en contaminant, elle peut jouer un rôle important dans la biodégradation. Par exemple dans le cas d'un sol contaminé par une boue huileuse, il a été démontré qu'une augmentation de la production en CO_2 avait lieu à des concentrations comprises entre 1,25 et 5 % d'hydrocarbures par poids du sol sec, aucune augmentation à des concentrations supérieures à 10 % et une diminution uniquement à partir de 15 % (Dibble et Bartha, 1979). D'une manière générale, des concentrations en contaminant inférieures à 8000 - 10 000 mg/kg de sol sec n'affectent pas d'une manière significative l'écoulement des fluides (e.g., eau et air) car à ce niveau, ils sont essentiellement immobiles et occupent moins d'espace dans les pores que l'eau (N.R.C, 1993). D'après un rapport de l'U.S.EPA, (1995c), des concentrations d'hydrocarbures pétroliers excédant 25 000 mg/kg de sol sec sont considérés toxiques pour les micro-organismes aérobies.

Donc, il semble que la valeur optimale de la concentration est spécifique au contaminant, à son exposition et à la composition des espèces de la population microbienne.

2.3.2.4 Volatilité

La volatilité représente la tendance d'un composé d'être transféré de la phase liquide en phase gazeuse et constitue une source de transfert des vapeurs (Mercer et Cohen, 1990).

Le transport de polluants dans la phase gazeuse représente une des plus importantes voies de distribution et d'atténuation des composés organiques dans la zone vadose (Ong et al., 1992). La volatilité est affectée principalement par la pression de vapeur et par la solubilité du composé dans l'eau. Par ailleurs, d'autres facteurs (e.g., concentration dans le sol, teneur en eau, mouvement de l'air dans le sol, adsorption, température, contenu en

carbone organique total, porosité, masse volumique du sol et contenu en argile) peuvent également l'influencer (Lyman et al., 1990). Le degré de volatilisation s'accroît avec l'aération et la pression de vapeur (Feenstra et Cherry, 1988). Une fois le composé volatilisé dans la phase gazeuse, il est transporté, condensé et eventuellement, relâché vers l'atmosphère (Mercer et Cohen, 1990). Le mouvement des vapeurs organiques dans la zone vadose est influencé par des réactions entre la phase des vapeurs et l'humidité. Des expériences sur le kérosène, ont démontré que l'adsorption des vapeurs diminue avec l'augmentation de la teneur en eau (Ong et al., 1992).

2.3.2.5 Solubilité

C'est le paramètre décisif dans les processus de migration et de transformation des contaminants (Schwille, 1984). A de faibles concentrations les hydrocarbures sont solubles dans l'eau, mais la plupart des déversements produisent des concentrations qui dépassent largement les limites de solubilité (Atlas, 1981). Les principaux facteurs qui influencent la solubilité sont la température, la présence des mélanges, la salinité et la matière organique dissoute. La solubilité de la plupart des composés organiques augmente avec la température et dépend du mélange et des concentrations des composés de ce mélange. Il a été démontré que la solubilité aqueuse des composés organiques décroît avec la salinité (Rossi et Thomas, 1981). Cependant, la présence de la matière organique dissoute (i.e., acides fulviques et humiques) augmente la solubilité des composés hydrophobiques dans l'eau (Lyman et al., 1990). Dans un mélange de composés organiques ayant des solubilités différentes, les composés les plus solubles vont se dissoudre plus rapidement et des résidus de plus faible solubilité vont rester derrière (Senn et Johnson, 1987).

2.3.2.6 Adsorption et absorption

L'adsorption réfère à la rétention des solutés présents dans une solution à la surface de particules de sol, tandis que l'absorption fait référence à la rétention des solutés à l'intérieur de la masse des particules solides (Alexander, 1994). L'absorption est

fonction d'une part, des propriétés physico-chimiques du sol (e.g., surface spécifique, nature et densité de charge, présence des surfaces hydrophobes et de matière organique) et d'autre part, des propriétés du contaminant (e.g., solubilité et forme ionique;Yong et al., 1992).

La tendance d'un composé chimique à se partager entre les solides et la phase aqueuse d'un système eau-sol est quantifiée par le coefficient d'adsorption (K_{oc}) similaire au coefficient de partition octanol/eau (K_{ow}) et il représente la quantité de carbone organique adsorbée aux particules du sol (Yong et al., 1992). Ce coefficient ne peut pas être mesuré expérimentalement, mais il existe des relations qui le lient au coefficient de partition octanol/eau, ce dernier étant défini comme la quantité de solutés dissoute en octanol. Plus il y de matière organique dans le sol plus les molécules hydrophobes seront adsorbés (Alexander, 1994).

Les hydrocarbures pétroliers présentent habituellement une faible solubilité dans l'eau, mais de grandes valeurs de K_{ow}. Les valeurs de log K_{ow} se situent entre -3 et 7. Ainsi, des composés hautement solubles dans l'eau (e.g., éthanol) présentent des valeurs de log K_{ow} inférieures à l'unité, tandis que des composés hydrophobes (e.g., BPC et ces congénères) ont des valeurs allant de 6 à 7 (Yong et al., 1992). Le Tableau 2.3, montre des valeurs de la solubilité, de la pression de vapeurs et du coefficient d'adsorption pour quelques fractions composant le diesel.

Tableau 2.3 : Quelques fractions composant le diesel et leurs propriétés

Type de composé	Solubilité (mg/l)	Pression de vapeurs (atm)	log K_{oc} (c/c)
Fractions aliphatiques			
C_{10}-C_{12}	$3,4\times10^{-2}$	$6,3\times10^{-4}$	5,4
C_{12}-C_{16}	$7,6\times10^{-4}$	$4,8\times10^{-5}$	6,7
C_{16}-C_{21}	$2,5\times10^{-6}$	$1,1\times10^{-6}$	8,8
Fractions aromatiques			
C_{10}-C_{12}	25	$6,3\times10^{-4}$	3,4
C_{12}-C_{16}	5,8	$4,8\times10^{-5}$	3,7
C_{16}-C_{21}	$6,5\times10^{-1}$	$1,1\times10^{-6}$	4,2
C_{21}-C_{35}	$6,6\times10^{-3}$	$4,4\times10^{-10}$	5,1

SOURCE: (Weisman, 1998)

De ce tableau, il ressort que plus la solubilité d'un composé diminue, plus la tendance du composé à s'absorber augmente (i.e., K_{oc} augmente).

2.3.2.7 Masse volumique et viscosité

Après la solubilité dans l'eau, la masse volumique est le paramètre le plus important relativement au sort des contaminants et varie principalement suivant la température. Il a été démontré qu'une différence de densité de 1 % influence le mouvement des fluides tant dans la zone vadose que dans la zone saturée (Schwille, 1984, Mackay, et al., 1985). Dans la plupart des cas, la masse volumique des composés organiques diffère de celle de l'eau de 10 à 50 % (e.g., 0,7 g/cm^3 pour l'essence, 0,8 - 0,85 g/cm^3 pour le diesel et 1,2 - 1,5 g/cm^3 pour des composés aliphatiques chlorés; Mercer et Cohen, 1990).

La viscosité détermine la vitesse des écoulements dans un milieu poreux et varie dans le temps (e.g., l'évaporation des composés volatils accroît leur viscosité; Schwille, 1984). Les composés très visqueux ne peuvent pas être facilement biodégradés faute d'un

contact entre le contaminant, les micro-organismes, les nutriments et l'accepteur d'électron (Norris, 1994).

2.3.2.8 Tension interfaciale

La tension interfaciale constitue le résultat de la différence entre l'attraction mutuelle des molécules semblables à l'intérieur de chaque fluide et l'attraction des molécules non-semblables à l'interface. La tension interfaciale eau-LNAPL est reliée à la pression capillaire à travers cette interface et représente un facteur de contrôle de la mouillabilité. La valeur de la tension interfaciale varie de zéro (i.e., liquides complètement miscibles) à 72 dynes/cm (i.e., tension superficielle de l'eau à 25°C). Ainsi, elle décroît avec l'augmentation de la température et peut être affectée par le pH, les agents tensioactifs, et les gaz en solution (Mercer et Cohen, 1990). La Figure 2.4, montre les tensions interfaciales agissant à l'interface d'une gouttelette d'un LNAPL en contact avec une interface eau-air, (Hofstee et al., 1997).

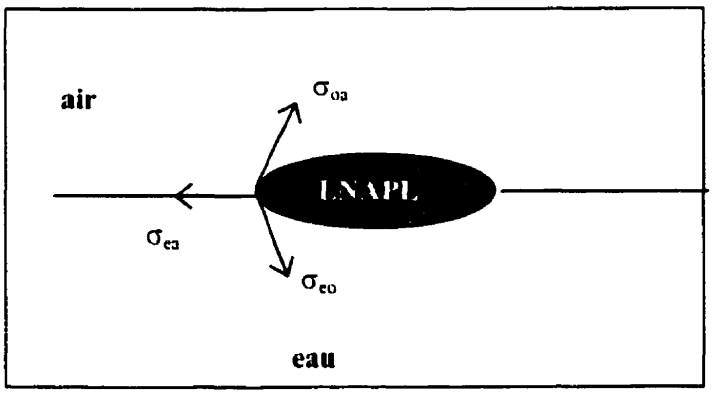


Figure 2.4 Diagramme des forces aux interfaces des fluides

σ_{ea}–tension superficielle d'eau; σ_{oa}–tension superficielle du LNAPL; σ_{eo}–tension interfaciale eau-LNAPL.

D'une manière générale, plus ces valeurs sont grandes, plus les pressions capillaires sont grandes et par conséquent, plus la saturation résiduelle est importante. Pour quelques contaminants, les valeurs de tensions superficielles (i.e., interface contaminant/air) et de tensions interfaciales (i.e., contaminant/eau) sont données dans le Tableau 2.4.

Tableau 2.4 : Quelques valeurs des tensions interfaciales à 20°C

Contaminants	Tension superficielle (dynes/cm)	Tension interfaciale (dynes/cm)
Kérosène	27	48
Benzène	28,9	35
Essence	21	50
Diesel	25	50

SOURCE: (Mercer et Cohen, 1990)

2.3.3 Propriétés hydrogéologiques du milieu poreux

Pour bien comprendre le transport multi-phasique ainsi que la distribution des micro-organismes dans un milieu poreux, tant la nature que d'autres caractéristiques géologiques, physiques et chimiques doivent être connus (Yong et al, 1992).

2.3.3.1 Texture et structure de la zone vadose

La texture correspond à la répartition des minéraux par catégorie de grosseur, indépendamment de la nature et de la composition de ces minéraux. La structure détermine la répartition de la matière solide et des vides dont certains sont occupés par des liquides, et d'autres, les plus grossiers, par des gaz. Les pores plus grossières ($d \geq 50$ µm) sont occupés par des gaz, les pores moyennes (50 µm à 10 µm) sont tantôt occupées par des liquides, tantôt par des gaz, les pores fines (10 µm à 0,2 µm) retiennent l'eau capillaire et les pores très fines ($d < 0,2$ µm) sont occupées par l'eau liée. L'ensemble des propriétés physiques et chimiques du sol est en liaison étroite avec la texture et la structure du sol (Duchaufour, 1991).

2.3.3.2 Profondeur de la nappe phréatique

La profondeur de la nappe phréatique doit être considérée et ce, pas uniquement en tant que caractéristique favorable ou défavorable à l'hydrodynamique, mais plus particulièrement dans la conception des approches d'assainissement de la zone vadose.

Par exemple, lorsque la nappe phréatique est à moins de 1,5 m de profondeur, les technologies du type bioventilation ou bioaspiration ne sont pas les plus appropriées puisque la remontée de l'eau résultant de l'application d'une succion au puits limite davantage l'épaisseur de la zone disponible pour la ventilation.

2.3.3.3 Porosité

La porosité est une des caractéristiques les plus importantes du point de vue interaction entre le contaminant et l'eau du sol et dépend surtout de la distribution des particules et de la structure du sol.

L'eau et l'air se partagent les pores dans la zone vadose; l'eau est retenue autour des particules du sol et dans les petites pores tandis que l'air occupe les pores les plus larges (Yong et al., 1992). Dans le cas d'un déversement de LNAPL, ce sont les pores les plus larges qui seront envahies par la contamination puis les plus fines. Ainsi, durant un processus de déplacement, l'eau avance plus rapidement dans de petites pores continus, tandis que le LNAPL suit ce front et déplace l'eau si la pression capillaire est suffisante (Chatzis, 1983). La distribution des pores et leur forme joue un rôle déterminant dans le déplacement et la rétention d'un contaminant à travers un milieu poreux.

2.3.3.4 Conductivité hydraulique et perméabilité

Une compréhension complète des écoulements et des transports multi-phasiques et multi-espèces (i.e., air, LNAPL, eau, nutriments) requiert une caractérisation de la conductivité hydraulique/perméabilité de ces phases. L'importance de cette caractérisation s'accroît avec la masse du contaminant et l'urgence de l'achèvement du processus de remédiation.

La conductivité hydraulique d'un matériau géologique est fonction de plusieurs facteurs, liés au milieu et aux fluides. Elle décroît typiquement avec l'augmentation de la masse volumique totale (Nielson, 1990).

Pour un matériau granulaire, l'expression générale de la conductivité hydraulique peut s'écrire ainsi (Loi de Darcy):

$$K = \frac{QL}{S\Delta H} \qquad \text{Eq.[5]}$$

où :

K – conductivité hydraulique (cm/s);

Q – débit du fluide (cm^3/s);

L – longueur d'écoulement (cm);

S – section transversale d'écoulement (cm^2);

ΔH – charge hydraulique (cm).

La conductivité hydraulique est liée à la perméabilité par la relation suivante:

$$K = \frac{k\rho g}{\mu} \qquad \text{Eq.[6]}$$

où :

k – coefficient de perméabilité (cm^2);
ρ – masse volumique du milieu (g/cm^3);
g – accélération de gravité (cm/s^2);
μ – viscosité cinématique du fluide (g/cm s).

La perméabilité à l'air du sol présente un intérêt particulier quant au potentiel de migration des contaminants et représente un paramètre de contrôle clé du mouvement des

composés volatils à travers la zone vadose (Dineen et al., 1993). Il a été montré que la perméabilité à l'air s'accroît avec la diminution de la teneur en eau durant un cycle de drainage. De plus, cette variation s'avère être plus prononcée à de hautes teneurs qu'à des teneurs plus faibles en eau et varie avec la texture des sols. Springer et ses collaborateurs (1997), ont développé une équation décrivant le flux d'air à travers un milieu poreux. Cette équation s'écrit comme suit:

$$k_a = Q_{out}\left\{\frac{2\mu L}{S}\cdot\frac{P_{out}}{P_{in}^2 - P_{out}^2}\right\} \qquad \text{Eq.[7]}$$

où :

k_a – perméabilité du milieu à l'air (cm^2);
Q_{out} – débit d'air à la sortie (cm^3/s);
μ – viscosité cinématique de l'air (g/cm s);
L – longueur d'écoulement (cm);
S – section transversale d'écoulement (cm^2);
P_{out} – pression d'air à la sortie (Pa);
P_{in} – pression d'air à l'entrée (Pa).

Pour le développement de cette équation, plusieurs suppositions ont été faites :

1. La perméabilité à l'air peut être dérivée de la loi de Darcy modifiée;
2. Il y a des conditions d'équilibre permanent dans le sol;
3. La diffusion de l'air à l'intérieur du sol est négligeable;
4. Il y a des conditions isothérmiques dans le sol;
5. Le contenu en eau est uniforme tout au long de l'axe de l'écoulement;
6. Il n'y a pas des macropores ou des poches d'air entre les parois des colonnes (i.e., dispositif de mesure de la perméabilité) et l'échantillon de sol;
7. L'effet de la gravité sur le flux d'air est négligeable;

8. Le comportement de l'air humidifié est semblable à celui du gaz idéal;
9. L'écoulement d'air au long des parois est négligeable.

2.3.3.5 Hétérogénéité du milieu poreux

Le transport des contaminants organiques du sous-sol est influencé tant par la cinétique des processus physiques, chimiques et biologiques que par l'hétérogénéité (i.e., anisotropie), les deux étant des variables spatiales et temporelles. La stratigraphie géologique naturelle constitue la première cause de l'hétérogénéité d'un milieu poreux. Lors d'un déversement de LNAPL dans un milieu poreux, cette hétérogénéité associée à la capillarité contrôle les mécanismes de déplacement et d'emprisonnement. Par conséquent, la connaissance des caractéristiques hydrogéologiques (e.g., conductivité hydraulique, rétention) et microbiologiques (e.g., activité et distribution des micro-organismes, toxicité) sont essentielles à la réussite d'un programme d'assainissement *in situ*.

2.4 Notions d'écoulement tri-phasique

De façon générale, un milieu poreux est constitué d'un ensemble des particules solides dérivées du socle rocheux et entourées de vides. Ces particules solides sont de petits grains de différents minéraux et matière organique tandis que les vides peuvent être remplis en proportions variables de la manière suivante: 1) d'eau (système mono-phasique), 2) d'air et d'eau (système bi-phasique) et lorsqu'il y a une contamination (e.g., LNAPL), les pores comportent trois phases: 1) une phase gazeuse, 2) une phase non-aqueuse (LNAPL) et 3) une phase aqueuse. La Figure 2.5, montre la distribution des ces phases.

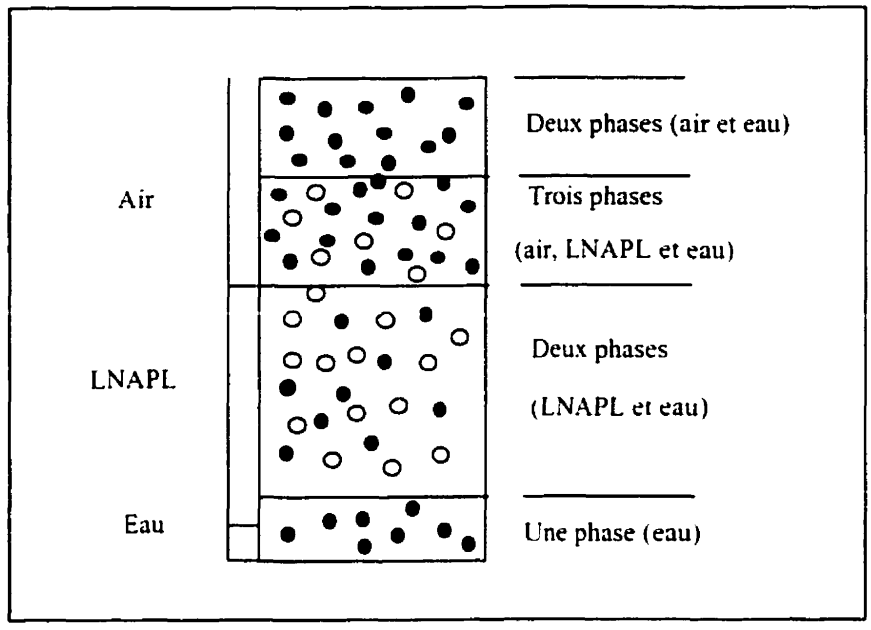


Figure 2.5 Distribution des phases en milieu poreux

L'écoulement tri-phasique à travers la zone non-saturée représente un volet important de l'hydrogéologie des contaminants et les concepts de base qui le gouvernent sont la mouillabilité, la distribution des phases et les courbes caractéristiques (i.e., relation entre le degré de saturation et la teneur volumique en liquides).

2.4.1.1 Mouillabilité

La mouillabilité du milieu poreux joue un rôle important dans les phénomènes de capillarité qui gouvernent la migration d'un LNAPL et subséquemment dans les efforts de récupération de ce dernier. Cette propriété décrit la tendance d'un fluide de s'étaler sur la surface solide en présence d'un autre fluide immiscible et, elle est souvent quantifiée à l'aide de l'angle de contact (Powers et Tamblin, 1995). Ainsi, un angle de contact compris entre 0° et 90° caractérise un milieu poreux ayant une très forte mouillabilité à l'eau, tandis qu'un angle de contact allant de 110° à 180° indique une forte mouillabilité pour un fluide organique (Mercer et Cohen, 1990, Powers et Tamblin, 1995). Un LNAPL, possède une mouillabilité intermédiaire entre l'eau, la phase

mouillante et l'air, la phase non-mouillante. La Figure 2.6, montre la variation de la mouillabilité en fonction de l'angle de contact.

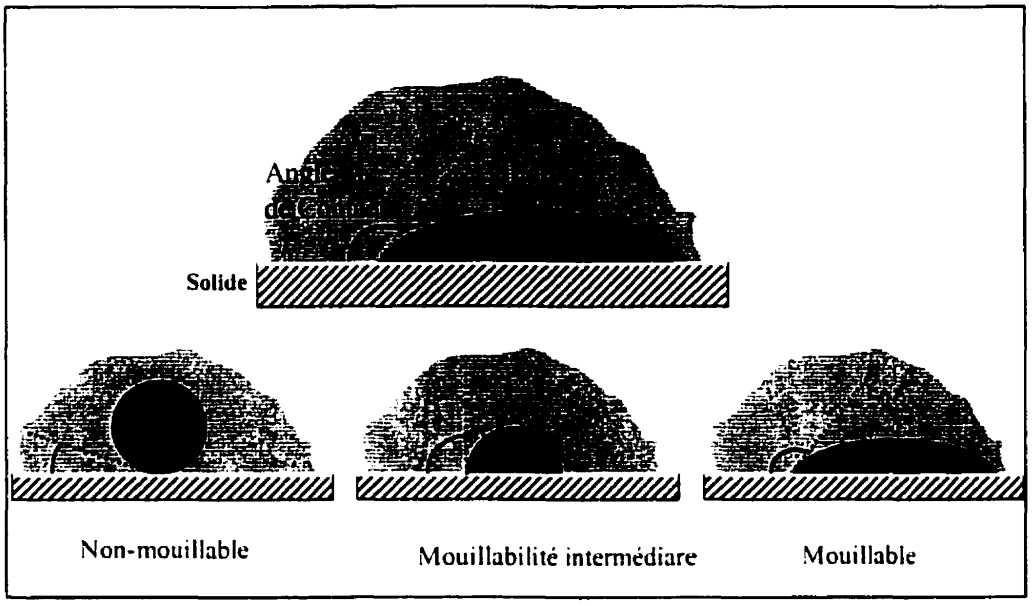


Figure 2.6 Mouillabilité d'un fluide

La tendance d'un liquide organique à s'étaler entre l'eau et l'air peut être prédite par un coefficient d'étalement, Σ (Wilson et al., 1990):

$$\Sigma=\sigma_{ea} - (\sigma_{eo}+\sigma_{oa}) \qquad \text{Eq.[8]}$$

où :

σ_{ea} – tension interfaciale eau-air (dynes/cm);
σ_{eo} – tension interfaciale eau-organique (dynes/cm);
σ_{oa} – tension interfaciale organique-air (dynes/cm).

Un coefficient d'étalement positif mène à la formation d'un film continu de liquide organique tout au long de l'interface eau-gaz (e.g., diesel) tandis qu'un coefficient

d'étalement négatif, (e.g., PCE) conduit à la formation de micro-lentilles en laissant ainsi, de larges portions de l'interface gaz-eau non-couvertes (Wilson et al., 1990).

2.4.1.2 Distribution des phases

L'apparition de films s'avère être le mécanisme le plus important d'invasion du liquide organique dans la zone vadose. D'une manière générale, le liquide organique avance en déplaçant le gaz (milieu non-saturé) ainsi que l'eau des pores (milieu saturé). Lorsqu'il y a des poches de liquide organique, il s'y forme un écoulement continu à travers le film. Dans le cas où les gorges des pores sont remplies de gaz, l'eau peut pénétrer dans les corps des pores soit en les contournant soit en les sautant, et par conséquent, des bulles de gaz peuvent être emprisonnées (Wilson et al., 1990). La Figure 2.7, montre une représentation bi-dimensionnelle d'un ganglion de LNAPL emprisonné dans deux systèmes différents : a) milieu poreux saturé en eau et b) milieu poreux saturé en air (Hunt et Sitar, 1988).

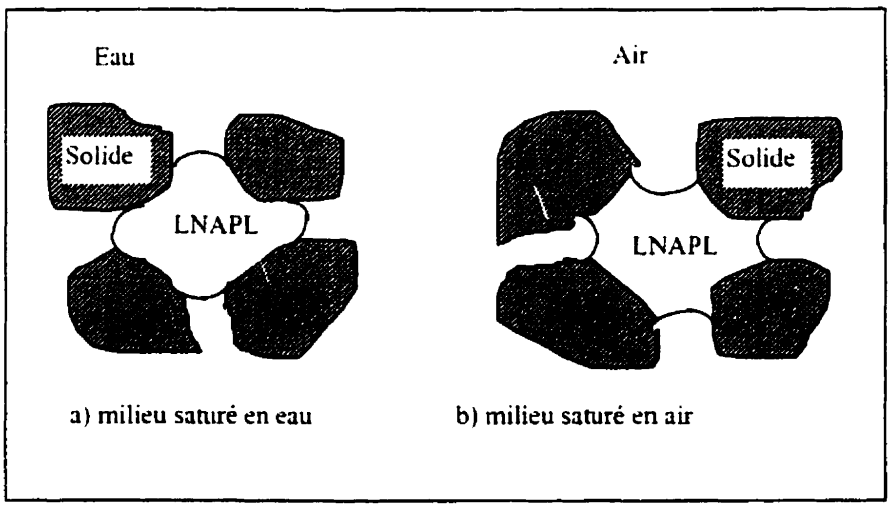


Figure 2.7 Exemple de ganglion de LNAPL emprisonné

Il est essentiel de souligner l'importance de la formation des films par le LNAPL dans la zone vadose (Wilson et al., 1990). Premièrement, ils exposent une grande surface à la phase gazeuse, rendant ainsi possible des techniques de restauration comme la

ventilation. Deuxièmement, ils exposent une très grande surface à la phase aqueuse, augmentant ainsi l'efficacité de la solubilité du composé organique. Finalement, la distribution des films et des poches de LNAPL peut influencer également les micro-organismes. Ainsi, lorsqu'il y a de larges pores remplis d'air, donc un accès rapide à l'oxygène, mais un très mince double film d'eau et de liquide organique, ce dernier ne pourra pas fournir les nutriments nécessaires aux micro-organismes. Par ailleurs, un milieu formé des gorges des pores remplies d'eau peut présenter un manque d'oxygène, car la présence du film de liquide organique va supprimer le transfert d'oxygène dans la phase aqueuse. Malgré tout, les changements transitoires de la saturation en fluides vont améliorer les conditions environnementales des micro-organismes aérobies.

2.4.1.3 Courbes caractéristiques du sol

La courbe caractéristique d'un sol (e.g., sol-eau) est définie comme étant la relation entre la teneur volumique en eau et la succion du sol (Williams, 1982, Fredlund et Xing ,1994). Cette relation est assujettie au phénomène d'hystérèse (Brooks et Corey, 1964, Fredlund et Xing, 1994). Elle peut être utilisée pour l'estimation des différents paramètres décrivant le comportement d'un milieu poreux non-saturé. Chaque sol possède sa propre courbe caractéristique et sa forme dépend de la répartition de la taille des pores du sol. La Figure 2.8, montre une courbe caractéristique sol-eau typique pour un sol silteux (d'après Fredlund and Xing, 1994).

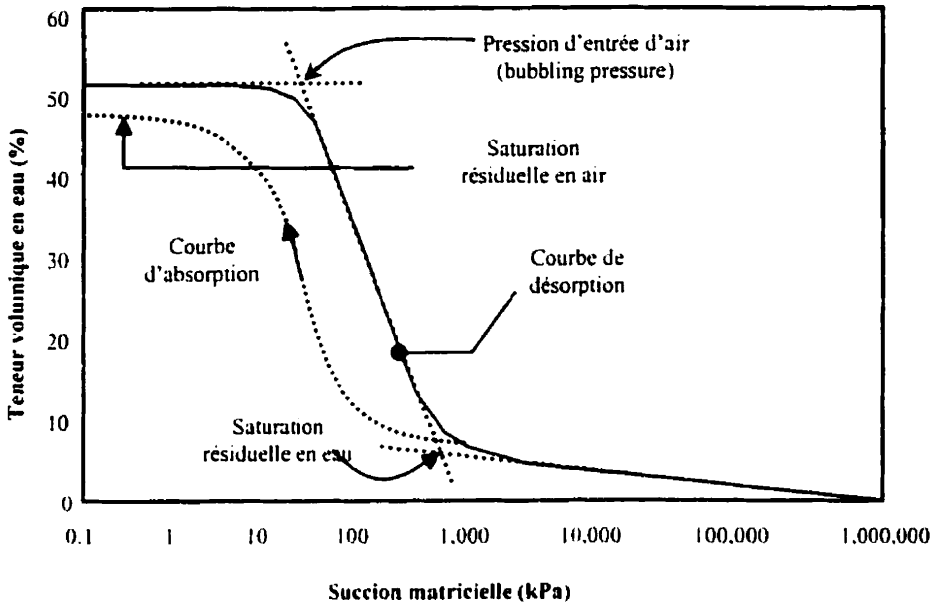


Figure 2.8 Courbe caractéristique sol-eau typique pour un sol silteux

Lorsque le milieu possède une autre phase que la phase aqueuse ou plusieurs phases, il peut y avoir d'autres courbes caractéristiques (i.e., sol-LNAPL). En supposant, que dans un milieu poreux comportant trois phases, le fluide ayant une mouillabilité intermédiaire s'étend à l'interface air-eau (e.g., diesel), il est possible d'obtenir une courbe caractéristique tri-phasique à partir de la courbe caractéristique bi-phasique (Hofstee et al., 1996).

Dans un sol saturé en équilibre avec une nappe d'eau libre, la pression hydrostatique et la succion sont nulles. Si une faible succion s'applique à l'eau dans un sol saturé, aucun écoulement ne se produit. Pendant que la succion s'accroît, une certaine valeur critique est dépassée pour laquelle les pores les plus larges commencent à ce vider. C'est la pression d'entrée d'air et elle est en général faible pour les sols à texture grossière et bien structurés, et plus grande pour les sols à texture fine. Au fur et à mesure que le succion s'accroît, la quantité de liquides drainée devient plus grande et un nombre supplémentaire des pores se vident du fait qu'ils ne peuvent retenir ces liquides contre la succion appliquée (Baker et Bierschenk, 1995, Brooks et Corey, 1964, Fredlund et Xing, 1994).

2.4.1.4 Saturation

L'état de saturation d'un sol par un fluide peut s'exprimer à l'aide de deux indicateurs, soit le degré de saturation et la teneur en fluide. Dans le cas d'un sol contaminé par un LNAPL, il est essentiel de distinguer entre les différentes composantes du degré de saturation et des teneurs massiques et volumiques respectivement. Les valeurs du degré de saturation varient d'un point à l'autre à l'intérieur d'un milieu poreux (Brooks and Corey, 1964). Ce paramètre est très important car, d'autres propriétés comme la pression capillaire, la perméabilité et par conséquent, l'écoulement des fluides en dépendent (Chevalier et Wallace, 1997, Mercer et Cohen, 1990 et van Genuchten, 1980). Quant à elle, la teneur en eau représente une variable très importante pour la biorestauration. Elle affecte la disponibilité des contaminants, le transfert des gaz, le niveau effectif de toxicité des contaminants, le mouvement et la croissance des micro-organismes et la distribution des espèces.

La compréhension et la prédiction des phénomènes qui régissent le mouvement d'un LNAPL dans la zone vadose sont critiques pour la prise de décisions quant aux technologies de décontamination (Schroth et al., 1995, Zalidis, et al 1991). Ce mouvement est affecté d'une part, par le volume de LNAPL relâché, la surface d'infiltration et la durée du déversement et d'autre part, par les propriétés du LNAPL et du milieu et les conditions d'écoulement (Feenstra et Cherry, 1988). Durant cette migration un certain volume demeure emprisonné dans une partie des pores et fractures du aux effets des tensions superficielles (Mercer et Cohen, 1990). De plus la stratification naturelle des couches grossières et des couches fines mène à la formation des lentilles qui provoquent l'étalement de LNAPL. A cette hétérogénéité spatiale s'ajoute l'effet de marnage du à la dynamique de la nappe (Hunt et Sitar, 1988). Ce volume de LNAPL immobilisé et discontinu par rapport au volume des pores représente la saturation résiduelle en LNAPL (Ostendorf et al., 1993, Wilson et Conrad, 1984) et elle peut occuper en moyenne de 15 % à 40 % des pores du sol (Wilson et Conrad, 1984). Dans un milieu non-saturé, sa valeur dépend de la présence d'autres fluides, de la géométrie des pores, de la surface mouillante des solides et de l'hétérogénéité du sol

(Wilson et al., 1990). Ainsi, il a été démontré qu'il y une relation linéaire directe entre la saturation résiduelle en LNAPL et la teneur en eau antérieure à la contamination (Steffy et al., 1997).

Suite à des expériences de déplacement de phases, des valeurs de la saturation résiduelle ont été estimées dans différents milieux, soit bi-phasiques et tri-phasiques tant pour l'eau que pour des liquides organiques naturelles et synthétiques (Tableau 2.5).

Tableau 2.5 : Quelques valeurs de saturation résiduelle

Composé	Système	Milieu poreux	Saturation résiduelle
Eau	Vadose	sable silteux	0,14[1]
Eau	Vadose	sable	0,10[1]
n-Decane	Saturé	sable	0,18[2]
n-Decane	Vadose	sable	0,17[2]
Diesel	Saturé	sable	0,45[2]
Diesel	Vadose	sol (nd)	0,15[1]

D'après : 1 - Mercer et Cohen, 1990; 2 - Steffy et al., 1997

En effet, la connaissance de la saturation résiduelle présente un grand intérêt quelle que soit la technologie de restauration; premièrement, pour la mobilisation ou récupération hydraulique (e.g., extraction sous vide, lavage des sols avec ou sans agents tensioactifs), deuxièmement, pour la volatilisation dans la phase gazeuse (e.g., ventilation) et finalement, pour la dissolution dans la phase aqueuse (e.g., bioventilation et bioaspiration).

Les équations décrivant la saturation en fluides sont décrites à l'Annexe I (Chevalier et Wallace, 1997, Ostendorf et al., 1993).

2.4.1.5 Potentiel matriciel

Lorsque deux liquides immiscibles sont en contact, une surface courbe tend à se développer à leur interface. Les pressions mesurées dans les pores à proximité de l'interface de chaque phase ne sont pas égales:

$$P_c = P_{nw} - P_w \qquad \text{Eq.[9]}$$

où :

P_c – pression capillaire à l'interface;

P_{nw} – pression du liquide non-mouillable;

P_w – pression du liquide mouillable.

Cette différence représente la pression capillaire et dans un milieu non-saturé sa valeur est négative. Elle est directement proportionnelle à la tension interfaciale (i.e., angle de contact) et inversement proportionnelle au rayon de courbure (i.e., dimension des pores) de l'interface.

Dans un système tri-phasique, les deux types de pression capillaire sont représentées par les équations suivantes (Barnes et McWhorter, 1995):

$$P_c^{ao} = P_a - P_o$$
$$et \qquad \text{Eq.[10]}$$
$$P_c^{ow} = P_o - P_w$$

où :

P_c^{ao} – pression capillaire à l'interface air-organique (cm H_2O);

P_a – pression d'air (cm H_2O);

P_0 – pression du composé organique (cm H_2O);

P_c^{oe} – pression capillaire à l'interface organique-eau (cm H_2O);

P_e – pression d'eau (cm H_2O).

Par les méthodes traditionnelles de pompage, l'abaissement de l'eau vers le puits de récupération engendre le mouvement du produit libre, mais la présence du LNAPL sous pression négative dans la zone contenant les trois phases en constitue une restriction et il ne peut pas être mobilisé. Sous conditions de bioaspiration, le vide créé fait en sorte que la pression capillaire à l'interface air/LNAPL décroît radiallement autour du puits par rapport à la pression capillaire statique initiale. D'une manière similaire, la pression capillaire à l'interface LNAPL/eau est réduite par rapport à sa valeur initiale. A une succion donnée, la pression capillaire à l'interface air/LNAPL atteint une valeur égale à zéro et par conséquent, le LNAPL s'écoule vers le puits d'extraction. Alors, la pression capillaire à l'interface eau/LNAPL demeure supérieure à cette valeur, ce qui fait que l'eau ne s'écoule pas vers le puits. Si la succion d'air s'accroît davantage, la pression capillaire à l'interface eau/LNAPL atteint éventuellement elle aussi la valeur égale à zéro est toutes les trois phases s'écoulent librement vers le puits d'extraction (Barnes et McWhorter, 1995). La Figure 2.9, montre l'effet de la bioventilation et de la bioaspiration sur la pression capillaire dans la zone vadose.

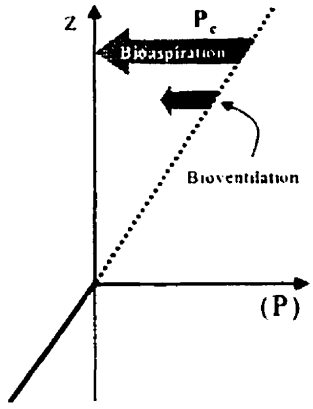


Figure 2.9 Effet de la bioventilation et de la bioaspiration sur la pression capillaire

P – pression hydrostatique; P_c – pression capillaire.

L'habilité des micro-organismes à se mouvoir et à métaboliser les contaminants dans le sol peut être reliée au potentiel matriciel qui est en étroite interaction avec la distribution des pores. A titre d'exemple, le mouvement des bactéries est négligeable dans les sols drainés entre 0,2 et 1 atm, et le métabolisme décroît rapidement dès que le potentiel matriciel s'accroît de 0,5 atm à 3 atm (Griffin, 1980). La majeure partie des métabolismes bactériens ont lieu à des valeurs du potentiel matriciel inférieures à 3 atm alors que les champignons supportent des valeurs bien supérieures (Cookson, 1995, Lyman et al., 1990).

2.5 Description des technologies de remédiation de la zone vadose

2.5.1 Bioventilation

A l'heure actuelle, la bioventilation représente l'un des traitements biologiques des sols de la zone vadose les plus appliqués et elle combine la technique de la ventilation et de la biorestauration pour le traitement des sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers. C'est une technique efficace pour augmenter le transfert d'oxygène dans la zone vadose et, elle est beaucoup plus versatile que la technique d'extraction sous vide car elle n'est pas limitée uniquement aux contaminants volatils (Rodriguez-Maroto et Gomez-Lahos, 1995).

L'objectif principal est de stimuler la dégradation microbienne par l'optimisation du transfert d'oxygène et ainsi, maximiser le temps de résidence de l'air dans le sol tout en minimisant la volatilisation (Dupont, 1993, Hoeppel et al., 1991).

Le débit d'air est alimenté à l'aide d'un système de pompage et de puits d'injection/extraction (Figure 2.10). La configuration et le nombre des ces puits varie largement en fonction des conditions spécifiques des sites et des objectifs poursuivis (e.g., ampleur de la zone contaminée, présence d'infrastructures dans le sous-sol, importance du suivi des émissions gazeuses; Hinchee, 1994). La Figure 2.10, montre une configuration conventionnelle de la technologie de bioventilation. Dans ce cas, l'air est

injecté à l'aide des puits d'injection implantés sur la périphérie de la zone contaminée, tandis que la récupération des vapeurs et le monitorage s'effectuent à l'aide des puits d'extraction, situés au centre de cette même zone. Afin de maintenir les conditions optimales de biodégradation, tant les nutriments que l'eau peuvent être administrés à la surface du sol par irrigation.

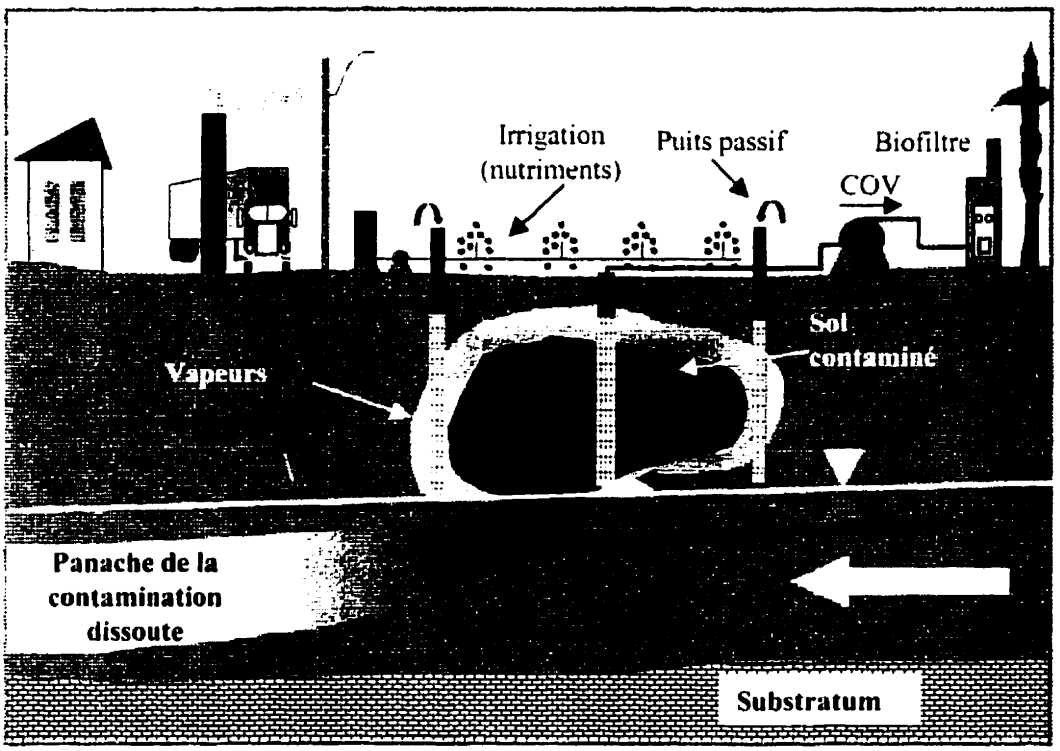


Figure 2.10 Schéma typique du traitement par bioventilation

2.5.1.1 Critères de design de la bioventilation

L'applicabilité et l'efficacité de la technologie de bioventilation dépendent de facteurs reliés au milieu et au contaminant à traiter ainsi qu'aux conditions d'opération:

1. perméabilité ≥ 1 Darcy (sable silteux; Norris, 1994);
2. absence de couches imperméables au niveau de la zone contaminée;
3. épaisseur de la zone vadose >1 m;

4. pression de vapeurs à 20°C <1 mm Hg (i.e., la plupart des composantes du diesel) (U.S. EPA (1995a);
5. constante de Henry < 100 atm;
6. pression négative typique appliquée en tête des puits: 8 à 250 cm H_2O (U.S.EPA, (1995);
7. débit d'air: 0,04 à 6,5 volumes de pores/jour (Dupont et al., 1991, Dupont, 1993) et 0,1 à 0,5 volumes de pores/jour (Wilson, 1995).

Nombreuses sont les études qui démontrent la réussite de cette technologie. Ainsi, des taux de biodégradation allant 15 % à 30 % voire 80 % (i.e., amendements en humidité et nutriments) ont été obtenus sur des sols sablonneux contaminés au carburant d'avion (JP-4) (Dupont et al., 1991, Hinchee et al., 1991, Hoeppel et al., 1991).

2.5.1.2 Avantages et désavantages de la bioventilation

La technologie de traitement par bioventilation est bien documentée sur les sites perméables. C'est une technique qui s'avère efficace en termes de coût relié à la durée de traitement et à l'équipement. Elle est moins destructive du point de vue opérationnel et peut fonctionner durant l'hiver. Le couplage avec les technologies de restauration de la nappe phréatique se fait très facilement.

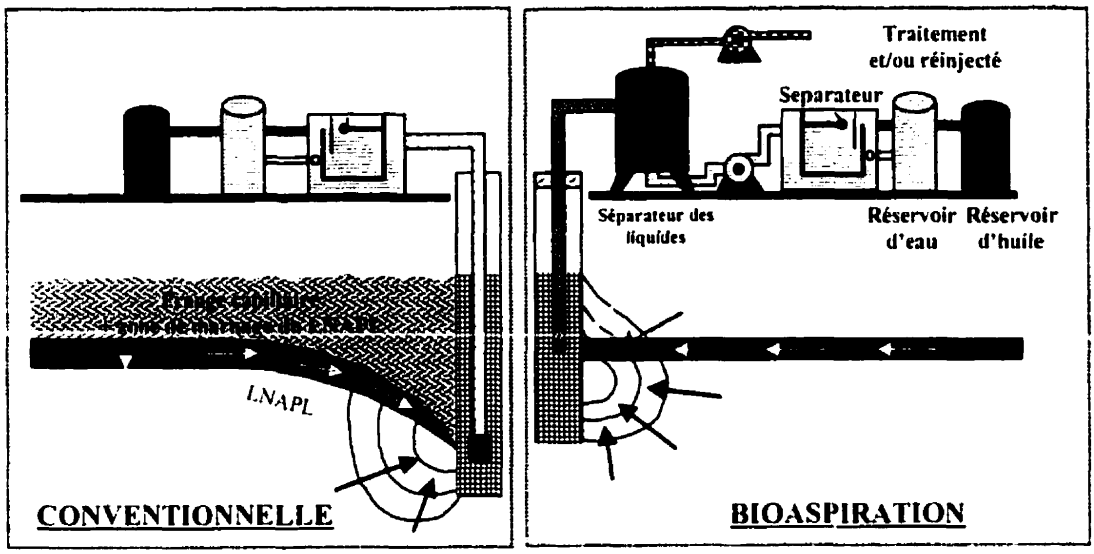
Une haute concentration initiale en contaminant peut être toxique, car il n'est pas possible de réduire la saturation résiduelle en contaminant essentiellement au niveau de la frange capillaire. Elle nécessite une durée de traitement plus longue pour des produits pétroliers plus lourds et nécessite un suivi et un traitement des COV.

2.5.2 Bioaspiration

Plusieurs sites sont contaminés par des produits pétroliers résiduels flottant à la surface de la frange capillaire. Dans la plupart des cas, la biorestauration peut être assez lente car, la bioémulsification, la dispersion et la diffusion de l'oxygène peuvent être entravés, particulièrement dans les grains les plus fins du sol (Hoeppel et al, 1995).

Une nouvelle approche, la bioaspiration, offre une solution de décontamination efficace en terme de coût pour le traitement de sols contaminés par des produits pétroliers. Elle associe la bioventilation et l'extraction sous vide communément utilisée dans l'assèchement lors des travaux géotechniques pour offrir une solution unique et intégrée à la récupération de produits pétroliers légers en phase libre de la frange capillaire et de l'eau souterraine tout en stimulant la biodégradation dans la zone vadose (Hoeppel et al., 1995, Kittel et al., 1994, Millette et al., 1997). Par conséquent, une bonne compréhension des deux techniques soit, l'extraction sous vide et la bioventilation est nécessaire afin de bien comprendre la technique de bioaspiration.

La technique de bioaspiration diffère de la technique d'extraction sous vide de la même manière que la technique de bioventilation diffère de la technique de ventilation. La bioaspiration utilise typiquement des pressions négatives beaucoup plus faibles que l'extraction sous vide et la récupération de l'eau souterraine est minimisée en plaçant le tuyau d'aspiration à proximité de l'interface entre la phase libre et le niveau de la nappe souterraine (Figure 2.12). D'ailleurs, elle est conçue pour augmenter la biodégradation *in situ* par bioventilation et, la récupération des vapeurs représente un côté non désirable (Hoeppel et al., 1995). Grâce au positionnement précis du lieu d'extraction et du tuyau d'aspiration à l'aide des sondes électroniques de détection des interfaces entre différents fluides, le mélange de contaminants en phase libre, d'eau et de vapeurs est extrait.



Tiré de Millette *et al.* (1997)

Figure 2.12 Comparaison entre les techniques conventionnelle et la bioaspiration

Lorsque ce mélange atteint la surface, chacune des ces phases est séparée et traitée par la suite. Des séparateurs de liquides à vide séparent l'air des liquides avant qu'ils atteignent la pompe à vide. Cela empêche la formation excessive des émulsions pouvant rendre la séparation difficile à faire. La séparation subséquente des hydrocarbures en phase libre et le traitement des contaminants en phase dissoute à l'intérieur du système, pour satisfaire aux normes de déversement de surface ou d'égout, peuvent être faits par l'application des technologies suivantes: séparation eau/huile, adsorption polymérique et/ou adsorption charbon/argile en phase liquide activée. Les gaz dégagés peuvent être traités si nécessaire, par biodégradation dans un biofiltre, par condensation, par adsorption au charbon ainsi que par oxydation catalytique ou thermique (SCG Industries Limited, 1996). Occasionnellement, l'effluent gazeux récupéré peut être réinjecté dans la partie supérieure de la zone vadose, là où il y a le plus grand nombre de populations dégradant les contaminants. Une fois l'extraction du produit libre effectuée, le système de succion peut être utilisé pour abaisser la nappe phréatique et capter les contaminants dissous dans l'eau souterraine. Cela engendre une exposition accrue de la zone vadose et favorise davantage le processus de biodégradation (SCG Industries Limited, 1996).

Par rapport aux techniques conventionnelles de pompage, qui créent un cône de dépression de l'eau souterraine pour abaisser verticalement les contaminants vers les puits, la bioaspiration crée d'une part un gradient de vide horizontal qui agit dans le plan où la perméabilité est habituellement plus grande (i.e., par la stratigraphie naturelle des couches horizontales) et d'autre part, un gradient de pression dans la zone saturée. De cette manière, l'emprisonnement du contaminant et l'étalement de la phase flottante sont grandement limités. En outre, la pression négative dans le puits pourrait diminuer la pression capillaire dans la frange capillaire et ainsi provoquer le drainage et la récupération des contaminants de cette zone et subséquemment, promouvoir la bioventilation et donc la biodégradation par le tirage du liquide dans la nappe phréatique, en dépit de l'épaisseur de la couche de liquide existante à proximité du puits. Dans ce cas une diminution de l'humidité dans la zone vadose peut causer une limitation de l'efficacité de la biodégradation, fait qui peut nécessiter une irrigation en surface et cela, plus particulièrement dans les zones arides (Baker, 1995).

La technologie de bioaspiration est largement utilisée sur des sites contaminés par des hydrocarbures pétroliers appartenant aux bases aériennes des États Unis.

Les essais de bioaspiration ont été faits premièrement dans le but de connaître les aspects pratiques du design du système, de l'installation et du fonctionnement ainsi que de la récupération de la phase libre. Deuxièmement, et dans la plupart des cas comme travaux futurs, se placent les investigations sur l'environnement créé par ce procédé i.e., la contribution des vapeurs récupérées par rapport au volume total afin d'effectuer le bilan de masse, le futur monitorage des succions et l'évaluation de la contribution du procédé à l'amélioration de la biodégradation et de la récupération de la phase libre.

2.5.2.1 Critères de design de la bioaspiration

L'applicabilité et l'efficacité de la bioaspiration dépendent des facteurs reliés au milieu et au contaminant à traiter, ainsi que des conditions d'opération et de maintenance et ces

dernières varient tout au long du traitement, dépendant de l'évolution des conditions des sites:

1. perméabilité de moyenne à faible (e.g., sable silteux, silt sablonneux);
2. épaisseur de la zone vadose ≥ 1 m;
3. composés organiques peu volatils (e.g., diesel);
4. pressions négatives typiques appliquées en tête de puits: 0,2 à 0,7 atm (Hoeppel et al., 1995) et 0,13 atm (Millette et al., 1997) suivant la pression d'entrée d'air du milieu à traiter;
5. débit d'air variable suivant la pression appliquée.

2.5.2.2 Avantages et désavantages de la bioaspiration

Comparée aux techniques conventionnelles de restauration, la technique de bioaspiration présente les avantages suivants (Baker et Bierschenk, 1995, Connolly et al., 1995, Hoeppel et al., 1995, Kittel et al., 1994, Leeson et al., 1995, SCG Industries Limited, 1996, Wickramanayake et al., 1996):

1. la technologie est conçue principalement pour la restauration des sols contaminés par des LNAPLs à proximité de la nappe phréatique et, l'objectif principal est de minimiser le rabattement de la nappe phréatique donc, la décharge de l'eau et les gaz extraits, d'où coût de traitement des effluents réduit ;
2. la technologie présente une grande efficacité pour les sols de texture fine à moyenne contenant des fortes concentrations en contaminants en phase libre ayant une viscosité moyenne à faible, plus au moins volatils ;
3. le système extrait efficacement le produit libre, l'eau et les gaz tout en ayant la capacité requise pour réduire voire éliminer la contamination du produit résiduel, ce qui constitue une amélioration technologique;
4. l'étalement des contaminants dans la zone saturée est minimisé;
5. le taux de récupération de la phase libre est nettement amélioré;

6. la récupération simultanée du produit libre, de l'eau et des gaz plutôt que successive engendrent des coûts moindres et une durée de traitement plus limitée;
7. le coût de l'infrastructure est réduit car une seule pompe est requise pour extraire les contaminants à partir des puits multiples;
8. le système peut être converti facilement en bioventilation une fois que la phase libre est complètement récupérée;

Une durée de traitement de deux à trois fois plus courte que les technologies successives de décontamination a été prédite à l'aide des modèles dans certains cas à une pression négative très faible, soit 0,05 atm (Parker, 1995).
L'application adéquate de la technologie de bioaspiration peut significativement accroître l'efficacité de la décontamination de 70 % par rapport aux technologies alternatives (Parker et Islam, 1998).

Étant une technologie nouvelle, il reste encore des mécanismes inconnus, ce qui engendre des nombreuses défaillances lors de l'application sur le terrain, dont quelques unes sont énumérées ci-dessous:

1. l'application d'une grande pression peut causer la montée d'eau souterraine, et l'humidité peut monter/descendre et saturer le sol autour du puits et ainsi réduire le flux d'air et par conséquent le taux de biodégradation;
2. l'assèchement de la zone vadose peut réduire le taux de biodégradation (Hoeppel et al., 1995);
3. sur certains sites, le système de succion peut extraire de grands volumes d'eau nécessitant un traitement;
4. la redistribution de l'eau et de LNAPL vers les puits d'extraction associée à l'augmentation de leur saturation peut causer une réduction significative de la perméabilité à l'air à proximité des puits et donc entraver l'aération;
5. l'aération active dans les puits d'extraction peut favoriser la formation de la biomasse et pour l'éviter autant que possible, la bioventilation doit débuter seulement après la récupération complète du produit libre (Baker, 1995);

6. la formation des émulsions dans l'eau extraite rend difficile la séparation des phases (Hoeppel et al., 1995);
7. difficile à implanter en présence d'infrastructures de surface.

CHAPITRE III : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce chapitre, divisé en trois parties, présente les méthodologies suivies pour atteindre les objectifs proposés. Une première partie fait référence aux méthodologies utilisées pour la caractérisation initiale du sol à l'étude du point de vue physico-chimique, géotechnique et biologique. La seconde partie présente les dispositif expérimentaux et les méthodologies mis au point pour quantifier les paramètres de migration des fluides dans un milieu poreux. La troisième partie présente la description du dispositif expérimental mis au point pour simuler les deux technologies de remédiation, soit la bioaspiration et la bioventilation en colonnes. Pour plus de détails, le lecteur est invité à se référer aux protocoles expérimentaux présentés à l'Annexe II.

Il est bien connu que la biorestauration implique des interactions complexes entre les processus physiques, chimiques et biologiques et requiert l'intégration des phénomènes opérant à des échelles allant de la grandeur d'une cellule microbienne, soit 10^{-6} m à celle d'un site contaminé, soit 10 - 1000 m^2. Ce projet traite, d'abord des expérimentations réalisées à micro-échelle. Ces expérimentations comprennent d'une part, les essais visant à déterminer la composition et l'activité du consortium bactérien (e.g., décompte bactérien, test de minéralisation en microcosme) et d'autre part, la stœchiométrie des réactions de transformation du contaminant (e.g., test de respirométrie en mode dynamique et statique). Le projet traite ensuite des essais à méso-échelle, soit un pont entre les essais à micro-échelle et ceux à l'échelle pilote de terrain. Ces essais sont réalisés en colonnes et visent le déplacement des phases, la rétention capillaire et la simulation de la bioaspiration et de la bioventilation.

Comme l'indique la Figure 3.1, le plan de travail regroupe trois grandes étapes. Une première étape vise à caractériser d'une manière globale le sol à l'essai. La seconde étape vise à évaluer et comparer l'effet de deux technologies de traitement comparées par la réalisation des essais en colonnes d'une durée de 50 jours. La troisième étape traite de

l'implication des résultats des essais en colonnes quant à l'implantation des deux technologies de traitements à l'échelle de terrain.

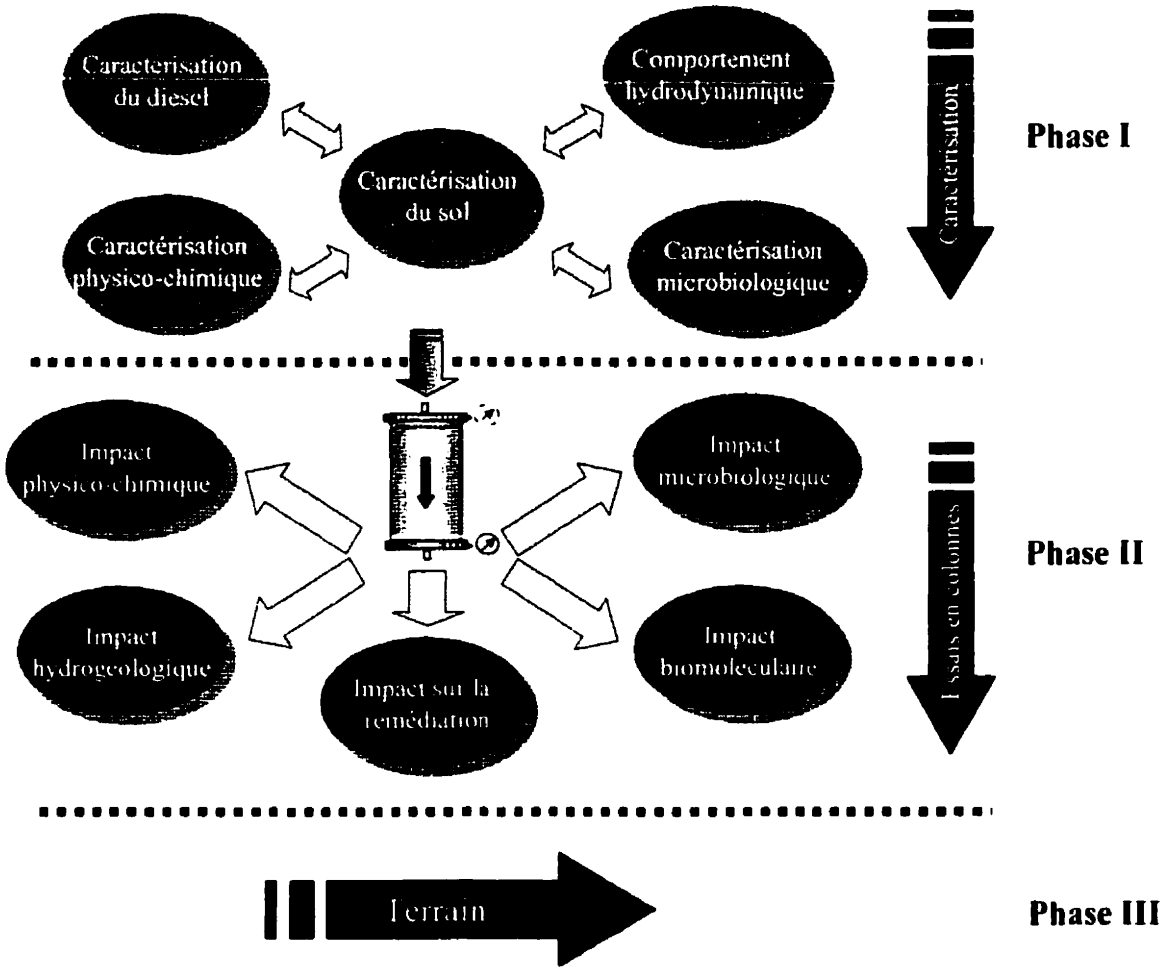


Figure 3.1 Plan de travail

3.1 Caractérisation initiale du sol

Avant de procéder à la simulation des traitements par bioaspiration et bioventilation d'un sol contaminé à saturation par un LNAPL, une caractérisation initiale du sol à l'étude est requise. Tel qu'indiqué tout au long du deuxième chapitre, nombreux sont les facteurs

qui influencent la réussite d'un traitement par voie biologique. Dans le cas du traitement par bioaspiration, il est intéressant d'avoir un sol à texture fine (i.e., conductivité hydraulique d'ordre de 10^{-7} cm/s) afin de se démarquer des autres technologies telles que la bioventilation et la récupération de LNAPL par rabattement de la nappe phréatique et pompage. Les résultats de la caractérisation ont permis le choix du sol pour le présent projet. Trois types de sol ont fait l'objet d'un criblage initial et deux furent rejetés, ne correspondant pas aux critères et objectifs de l'étude. Le sol retenu provient d'un site contaminé par des produits pétroliers situé dans la région de Trois Rivières (Québec). Le sol a été prélevé au mois d'octobre 1997 directement au-dessus de la nappe phréatique (i.e., dans la frange capillaire) à une profondeur d'environ 4,2 m par rapport à la surface du sol et ce, sur un profil de 80 cm d'épaisseur. La nappe phréatique se trouvait à 4,8 m de profondeur par rapport à la surface du sol.

Lors du prélèvement du sol sur le terrain, un volume de 20 L de produit libre a été récupéré, à partir du séparateur hydrocarbure-eau placé à la sortie du système de récupération déjà en place. Cela fut nécessaire afin de bien caractériser l'huile servant aux expériences ultérieures (i.e., test du potentiel de dégradation en fonction de différentes concentrations en diesel, réalisation des essais de déplacement des phases, de saturation et de rétention capillaire).

3.1.1 Caractérisation de la contamination initiale du sol

Les paramètres les plus importants considérés pour la caractérisation initiale de la contamination du sol sont la teneur en contaminant, la masse volumique, la viscosité et la tension interfaciale du produit libre.

3.1.1.1 Teneur en hydrocarbures pétroliers

Afin de connaître la teneur en hydrocarbures pétroliers C_{10}-C_{50}, des échantillons de sol furent analysés en triplicata au laboratoire Philip, Anjou, Québec, selon la méthode de dosage d'hydrocarbures pétroliers C_{10}-C_{50} fractionné, 410-HYD.1.0 du MEF. La

procédure consiste en la déshydratation de l'échantillon avec du sulfate de magnésium anhydre et l'extraction à l'hexane dans un bain à ultrason. Les composantes polaires de l'extrait sont adsorbées sur gel de silice et le surnageant est analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à l'ionisation de flamme.

Un échantillon de diesel fut également caractérisé selon la même méthode pour en connaître les fractions C_{10}-C_{50} et le degré d'altération.

3.1.1.2 Masse volumique du diesel

Ce paramètre fut déterminé en triplicata par gravimétrie. Un ballon gradué d'une capacité de 25 ml est pesé avant et après remplissage avec diesel. La différence de masse enregistrée et rapportée au volume permet d'évaluer la masse volumique.

3.1.1.3 Viscosité

La viscosité cinématique du diesel fut déterminée à l'aide du viscosimètre à quatre bulbes de dilution, modèle S599-50 (Cannon-Ubbelohde four-bulb shear dilution viscosimeter, Cannon Instrument Co) selon la méthode standard ASTM D 2162. Ce viscosimètre consiste en un ensemble des tubes dont, un canon muni d'un récipient d'alimentation, un tube de succion et un tube muni des quatre bulbes de volumes différents. D'abord, le récipient du canon est rempli de diesel et laissé pour acclimatation à l'air ambiant. Une succion est appliquée dans le tube à succion, ce qui fait que le diesel monte et remplit les quatre bulbes. Le temps d'écoulement durant le drainage est mesuré pour chaque bulbe à l'aide d'un chronomètre de grande précision. En utilisant les données de calibration propres au viscosimètre, la viscosité cinématique fut déterminée pour chaque bulbe et une moyenne fut faite.

3.1.1.4 Tension interfaciale

La tension interfaciale entre différents fluides (i.e., air/eau/LNAPL) est déterminée en mesurant la force nécessaire pour détacher l'anneau plan en platine-iridium de la surface du fluide ayant la tension de surface la plus grande. L'appareil utilisé est le tensiomètre de type Fisher Surface Tensiomat/Model 2V et les essais ont été réalisés selon la méthode ASTM D 971-91 et les instructions du manuel du fournisseur. Pour calculer la tension interfaciale, la force mesurée est corrigée par un facteur empiriquement déterminé et qui dépend de la force appliquée, des masses volumiques des fluides et des dimensions de l'anneau. Les essais furent effectués en triplicata sous conditions standards de non-équilibre et les mesures sont complétées dans un délai d'une minute après la formation de l'interface.

Ayant les valeurs des tensions interfaciales, il fut possible de calculer le coefficient d'étalement qui prédit l'aptitude du composé organique de se répandre ou non à l'interface air/eau selon l'équation [8], décrite dans la section 2.4.1.1.

3.1.2 Caractérisation géotechnique et physico-chimique du sol

La caractérisation géotechnique et physico-chimique du sol réfère à une série de paramètres, dits désormais routiniers nécessaires à la conception et l'optimisation d'un système de traitement *in situ* d'un sol par ventilation ou aspiration. Les paramètres fondamentaux évalués sont la granulométrie, la densité des solides, les masses volumiques humide et sèche, la conductivité hydraulique, la teneur en eau et la capacité de rétention au champ, le pH et le rapport C/N/P.

Une grande attention fut portée à la correction de la plupart des caractéristiques géotechniques et physiques du sol par des facteurs de correction tenant compte de la température à laquelle les essais se sont déroulé.

3.1.2.1 Préparation du sol

Avant de procéder à toute expérimentation, une étape primordiale consistant en la préparation du sol fut réalisée. Une quantité de sol estimée suffisante pour atteindre l'objectif du projet, soit 300 kg fut préparée. Premièrement, bien que l'humidité était assez élevée, soit approximativement 20 %, l'entièreté de sol fut tamisée à 5 mm, donc une première étape d'homogénéisation. Le sol fut ensuite brassé sur une bâche en PVC à l'aide d'une pelle en suivant la méthode de quartage et, les agglomérats furent brisés à la main autant que possible. Finalement, le sol fut passé à travers le séparateur de sol plusieurs fois pour une ultime étape d'homogénéisation. Le sol, ainsi préparé fut conservé dans la chambre froide à une température de 4°C tout au long du déploiement des expérimentations.

3.1.2.2 Granulométrie

La répartition de la taille des particules du sol fut obtenue par fractionnement sur des tamis de différentes ouvertures et par sédimentation de la suspension contenant la fraction fine en utilisant les méthodes standard ASTM suivantes: D 421, D 422, E 11 et E 100.

L'analyse complète de la granulométrie d'un échantillon représentatif de sol a consisté en trois étapes soit, le tamisage des particules de grosseur comprise entre 5 mm et 80 mm, le tamisage des particules de grosseur comprise entre 80 μm et 5 mm et la sédimentation des particules de grosseur inférieure à 80 μm.

3.1.2.3 Densité des solides

La densité des solides est utilisée pour les définitions et les relations du diagramme de phases dans le sol. Elle fut déterminée en duplicata selon les méthodes standard ASTM: C 127, D 422, D 4753, E 1, E 11 et E 288.

3.1.2.4 Masses volumiques et porosité

Les propriétés du sol comme, les masses volumiques et la porosité dépendent de la texture, de la structure et de la teneur en eau. Les masses volumiques humide et sèche, ainsi que la porosité du sol furent estimées lors de la mise en place du sol dans les colonnes. Ainsi, la détermination de la masse volumique du sol humide consiste à peser une quantité de sol, dépendant du volume total, à priori estimée (e.g., 150 g pour 1500 cm^3) et la déposer dans la colonne d'étude ayant un volume connu. La masse de sol humide divisée par le volume réfère à la masse volumique humide du sol en place. En ce qui concerne la masse volumique du sol sec, elle est déterminée après avoir calculé la teneur en liquides. En connaissant ces trois grandeurs, il fut possible de déterminer l'indice des pores et par conséquent, la porosité du sol.

3.1.2.5 Conductivité hydraulique

La conductivité hydraulique fut déterminée à quelques reprises. D'abord, pour la caractérisation initiale du système à l'étude afin de voir si le sol en question se prête aux deux techniques de restauration envisagée. Puis, à chaque fois que cela fut nécessaire, car cette caractéristique est fonction de la masse volumique totale et du volume d'air emprisonné dans les pores lors de la mise en place du sol (i.e., porosité à l'air).

Pour ce projet, la conductivité hydraulique fut déterminée en utilisant deux méthodes ASTM standards, soit la méthode triaxiale, D 5084-90 et la méthode à charge variable, D 5856-95. Premièrement, par la méthode triaxiale, deux états différents du sol (i.e., teneur massique en liquides variable, 5 % et 10 % respectivement) sont testés et ce, pour voir l'influence de la teneur initiale en eau massique sur la conductivité hydraulique à l'eau. Le sol est asséché à l'air ambiant pour diminuer la teneur massique initiale en liquides et une comparaison entre les deux états du sol est faite. Deuxièmement, des essais de conductivité hydraulique à charge variable en conditions de saturation couplés aux essais de déplacement des phases sont réalisés. Le sol est mis en place dans le perméamètre (i.e., colonne en Plexiglas de 20 cm de hauteur et 10 cm de diamètre intérieur) et puis,

saturé en eau/diesel du bas vers le haut à l'aide de deux burettes de 100 cm^3 attachées au perméamètre. La burette de gauche sert pour l'alimentation en liquide et celle de droite pour la récupération du liquide. La conductivité hydraulique à saturation est déterminée en mesurant les volumes de liquide entrés et sortis et les pertes de charge à travers l'échantillon de sol à de temps différents. Des gradients hydrauliques allant de 1 à 5 m/m et couvrant la plupart des conditions de terrain sont appliqués. L'échantillon de sol est considéré saturé lorsque le volume qui entre est égal au volume qui sort (i.e. la représentation graphique du volume entré vs le volume sorti est une droite à 45°) et lorsque la masse de l'échantillon demeure quasi-constante dans le temps.

3.1.2.6 Teneur en eau

La teneur en eau massique du sol fut déterminée par séchage dans l'étuve réglée à une température constante et uniforme de 105°C ± 5°C durant 24 heures, (ASTM D 2216-92 et D 2974-87). L'analyse fut réalisée en triplicata sur des échantillons de sol représentatifs (200 g de sol humide). Il est à noter que ces analyses furent reprises à chaque fois qu'un échantillon de sol était requis pour une expérience donnée.

3.1.2.7 pH

La mesure de pH est faite par la méthode ASTM D 4972-95. La procédure consiste à 1) assécher 10 g de sol à l'air ambiant durant 24 h, 2) tamiser avec un tamis d'ouverture de 2 mm, 3) poser dans un tube à centrifugation, 4) rajouter 10 ml d'eau distillée, 5) agiter le tube au Vortex (Ficher Vortex Génie 2™) durant une minute, 6) laisser décanter une période d'une heure et, 7) mesurer la pH du surnageant avec un pH-mètre (Accumet® model 25, pH/ion meter).

3.1.2.8 Rapport C/N/P

Le rapport C/N/P du sol à l'étude représente le rapport entre les concentrations en carbone, en azote et en phosphore. Ces analyses furent effectuées au laboratoire Zénon (Anjou, Québec).

Pour mesurer le carbone organique total (COT; matière organique existante dans le sol plus contamination), l'échantillon de sol asséché au préalable à 105°C est traité avec de l'acide sulfurique pour éliminer les carbonates et ensuite, soumis à une combustion catalytique. Durant les deux étapes, le dioxyde de carbone produit est capté et dosé. La quantité de dioxyde de carbone mesurée est proportionnelle à la quantité de COT contenu dans l'échantillon de sol.

L'azote total représente la somme de l'azote organique total, des nitrates et des nitrites. L'azote organique total est composé de l'azote total Kjeldahl (i.e., acides aminés, polypeptides et protéines) et l'azote ammoniacal. L'analyse du NTK consiste à transformer l'azote en sels d'ammonium par digestion de l'échantillon de sol à l'aide d'un mélange d'acide sulfurique, de sulfate de potassium et de sulfate mercurique. Ces sels sont décomposés dans une solution d'acide sulfurique dilué d'où l'azote ammoniacal est récupéré par distillation et mesuré par dosage acide-base (Standard Methods, 4500-Norg et 4500-NH_3.F.

L'analyse du phosphore représente une mesure des orthophosphates (i.e., H_2PO^{4-} et de HPO_4^{2-}) dans le sol. Ceux-ci sont le résultat de la transformation des complexes de phosphore contenu dans le sol par calcination. Leur récupération se fait avec de l'acide chlorhydrique et leur dosage par la méthode colorimétrique (MENVIQ.90.05/304-NTPT 1.1 et Standard Methods, 4500-PE.

3.1.3 Caractérisation de la flore indigène du sol

Cette étape consiste en l'évaluation de la présence, la densité et l'activité de la flore microbienne indigène du sol. Des essais de minéralisation d'un polluant témoin, des décomptes bactériens totaux et spécifiques furent faits.

3.1.3.1 Essais de minéralisation en microcosme

Premièrement, une série d'essais préliminaires en microcosmes furent réalisés afin de vérifier le potentiel hydrocarbonoclaste de la flore bactérienne indigène et également pour connaître la concentration maximale en hydrocarbure tolérée et l'effet de la teneur en nutriments. Un microcosme consiste en une bouteille sérologique de 120 ml ayant 20 g de sol humide contaminé au diesel à l'intérieur duquel une éprouvette en verre (Fisher Scientific) de 5 ml contenant 1 ml de solution 1N de KOH est insérée. Les microcosmes sont scellés à l'aide des septums étanches avec anneaux métalliques (Fisher Scientific) et incubés à une température d'environ 23°C à la noirceur. Un schéma de microcosme est présenté dans la Figure 3.2.

Les essais consistent à suivre la minéralisation de [1-^{14}C] hexadécane (pureté supérieure à 98%, activité spécifique égale à 2,2 mCi/mmol, Sigma, É.-U) dans le temps en récupérant régulièrement la solution de KOH radioactive dont la radioactivité est déterminée à l'aide du compteur à scintillation (Wallac, 1409, Turku, Finlande). L'activité initiale du contaminant témoin était de 96 575 dpm (désintégrations par minute) et le sol des essais était contaminé au diesel à une concentration variant entre 7800 et 55 000 mg/kg.

Les essais furent réalisés en triplicata pour le sol, le sol et 1 ml MSM (milieu salin minimal), le sol et 2 ml MSM et le témoin abiotique (0,4 % p/p d'azoture de sodium, Anachemia, Montréal, Québec).

L'influence du mélange du milieu (i.e., sol, diesel et MSM) sur le taux de minéralisation fut testée dans la série des microcosmes contenant la teneur initiale en contaminant, soit

7800 mg/kg. Un volume de 5 ml d'air fut injecté après chaque échantillonnage afin de maintenir des conditions aérobies tout au long des essais.

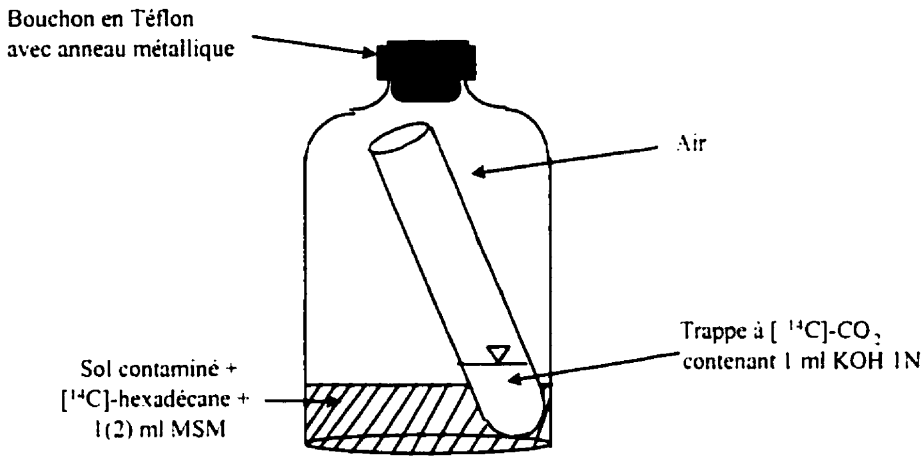


Figure 3.2 Schéma typique d'un microcosme

Le milieu salin minimal (MSM) est composé d'une part des différents sels (mg/l d'eau distillée): NaH_2PO_4: 883; K_2HPO_4: 2260; $(NH_4)_2SO_4$: 1100; $MgSO_4 \cdot 7H2O$: 200 et $NaNO_3$: 1000, et d'autre part, d'une concentration de 1 ml/l d'une solution de métaux en traces (mg/l): $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$: 0,3; $Al(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$: 0,77; $CuSO_4$: 0,17; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,19; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 2,78; $MnSO_4 \cdot H_2O$: 1,7; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$: 0,5 (Greer et al., 1990). Le pH de ce milieu est de 6,8.

3.1.3.2 Analyses microbiologique des micro-organismes du sol

Il était important de vérifier s'il y avait une relation entre l'activité (i.e., minéralisation du polluant), la présence et la densité des micro-organismes du sol. Pour ce faire, des analyses microbiologique et génétique furent réalisées. Ces analyses consistent à dénombrer les micro-organismes vivants présents dans le sol, et à vérifier s'ils possèdent, dans leur génome des similarités avec des gènes connus codant pour des enzymes responsables de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers. Les réactions enzymatiques sont essentielles à ce processus.

3.1.3.2.1 Dénombrement bactérien par la méthode MPN

Tout d'abord, les dénombrements de micro-organismes hétérotrophes totaux sont effectués par un test statique en milieu liquide, soit la méthode du nombre le plus probable (MPN) suivant le protocole A12 de l'Annexe II. Un échantillon de sol est dilué en série à l'aide des bouteilles à dilution de 150 ml et des aliquotes de chaque dilution sont prélevées et incubées dans un milieu de croissance dans des tubes de verre à bouchon vissé de 15 ml (cinq par dilution plus deux tubes de contrôle). Il est considéré qu'il y a croissance dans les tubes d'incubation lorsqu'un ou plusieurs organismes y sont présents (i.e., la turbidité du milieu liquide correspond à l'utilisation des hydrocarbures). Une estimation de la densité moyenne de micro-organismes hétérotrophes dans l'échantillon est déterminée d'après le nombre de tubes où il y a eu croissance pour chaque dilution et en se servant des tables de l'index MPN. Le milieu de croissance utilisé contient une solution saline 0,85 % dans l'eau distillée, soit NaCl 8,5 g/l et une solution des nutriments 0,8 % dans l'eau distillée, soit Nutient Broth 8 g/l.

Quant aux micro-organismes spécifiques, ils sont dénombrés d'une part, par la méthode MPN suivant le protocole P8A de l'Annexe II). Dans ce cas, le milieu de croissance est le milieu minéral C (MMC) qui est différent du milieu de croissance utilisé pour les dénombrements des micro-organismes hétérotrophes totaux. Un volume de 10 µl d'hexadécane froid est ajouté. La composition par litre d'eau distillée du milieu minéral C (MMC) est la suivante:Na Cl: 24g; Mg $SO_4.7H_2O$: 1g; KCl: 0,7g; KH_2PO_4: 2g; Na_2HPO_4: 3g; NH_4NO_3: 1g (Mills et al., 1978).

3.1.3.2.2 Dénombrement bactérien sur plaques de Pétri

Le dénombrement des micro-organismes hétérotrophes totaux, viables furent réalisés également sur un milieu nutritif de culture solide suivant le protocole expérimental PE26 C de l'Annexe II. Cela fut réalisé tant pour la caractérisation initiale de la flore bactérienne du sol d'étude que pour le suivi des deux traitements (i.e., bioaspiration et bioventilation) en colonnes. Une quantité d'environ 1 g de sol est diluée dans trois

volumes de solution de dilution (i.e., pyrophosphate de sodium $Na_4P_2O_7 \cdot 10 \cdot H_2O$, 0,1 % p/v dans l'eau; pH = 7,0). Ensuite, 1 ml de cette solution est transféré dans un premier tube de dilution (i.e., 9 ml de solution de dilution). La série de dilutions continue dépendant de la dilution à étaler sur les plaques de Pétri. Le milieu de croissance des plaques de Pétri est composé de YTS 250 (i.e., extrait de levures, tryptone et amidon, en proportion de 250 mg par litre d'eau ; Greer et al., 1993) et de gélose (15 g/L), ce dernier servant comme agent de solidification. Un volume de 0,1 ml de suspension prélevé des tubes de dilution est versé sur les plaques de Pétri respectives et étalé à l'aide d'un bâton en verre. Les plaques de Pétri inoculées sont incubées en position inversée à la température de la pièce. Le dénombrement des unités formatrices des colonies (UFC) se fait après deux semaines d'incubation. Les décomptes significatifs du point de vue statistique sont compris entre 30 et 300 colonies.

3.1.3.2.3 Sondes génétiques

Plusieurs études ont montré qu'il y a trois principaux groupes des micro-organismes responsables de la dégradation des hydrocarbures pétroliers (Atlas, 1981, Austin et al., 1977, Britton, 1984, Leahy et Colwell, 1990): le groupe le plus nombreux est constitué des *Pseudomonas*, suivi des *Actinomycetes* et ensuite, des *Micrococcus*. Il a été noté que les *Pseudomonas* spp. sont très compétents en la dégradation de n-alcanes, tandis que les *Micrococcus* spp. peuvent dégrader les chaînes carbonées C_7-C_{18}. C'est dans cette optique que les sondes biomoléculaires actuellement disponibles ont été développées pour la détection des micro-organismes se développant à partir d'hydrocarbures pétroliers.

Dans ce projet, les sondes *alkB* et *ndoB* sont utilisées. La sonde *alkB* est un fragment de 870 paires de bases de la région interne du gène *alkB* codant pour la formation de l'enzyme alcane-hydroxylase qui est impliquée dans la biodégradation des courtes chaînes d'alcanes de l'hexane au dodécane (C_6-C_{12}). Ce gène se trouve sur le plasmide OCT de *Pseudomonas oleovorans* (ATCC 29347; Nakai et al., 1983). Quant à elle, la

sonde génétique *ndoB* représente le 642-ème fragment d'une nucléotide de la séquence codant pour le gène *ndoB* qui constitue un des trois gènes codant pour l'enzyme naphtalène dioxygénase, responsable pour l'initiation de la réaction d'oxydation du naphtalène, témoin des hydrocarbures pétroliers aromatiques.

La procédure utilisée pour vérifier si l'ADN (acide désoxyribonucléique) des bactéries du sol est similaire à l'ADN des sondes, consiste à croître les micro-organismes du sol sur un milieu de culture solide (i.e., YTS 250), à transférer les colonies formées sur une membrane, à fixer l'ADN microbien et le mettre en contact avec les sondes marquées au phosphore-32. Si l'ADN marqué se fixe à l'ADN provenant des bactéries du sol, leur détection est possible par l'exposition d'une pellicule photographique et ainsi, la confirmation de la présence des micro-organismes ayant le potentiel de dégrader les hydrocarbures en question. Le détail de la méthodologie utilisée et présentée dans Greer et al., (1993).

Ces tests ont été effectués à l'Institut de Recherche en Biotechnologie dans le Groupe de Microbiologie Environnementale.

3.2 Comportement hydrodynamique des fluides dans le milieu poreux

L'objectif principal de cette phase du projet est de mieux comprendre les mécanismes contrôlant le mouvement, et plus particulièrement l'emprisonnement par capillarité des fluides dans la zone vadose.

Comme la prédiction de la saturation résiduelle dans un sol donné est incertaine (Wilson et al., 1990), il est bon de réaliser plusieurs expériences afin de corréler la teneur en saturation résiduelle aux propriétés du sol et au nombre des phases présentes (systèmes bi-phasique et tri-phasique en milieu non-saturé). L'approche utilisée consiste en des expériences de remontée capillaire des liquides et en déplacement quantitatif des phases à l'aide de hautes colonnes. Les expériences de remontée capillaire sont effectuées à basse

et à haute pression. La Figure 3.3, montre le dispositif expérimental mis au point pour réaliser ces appro

s.

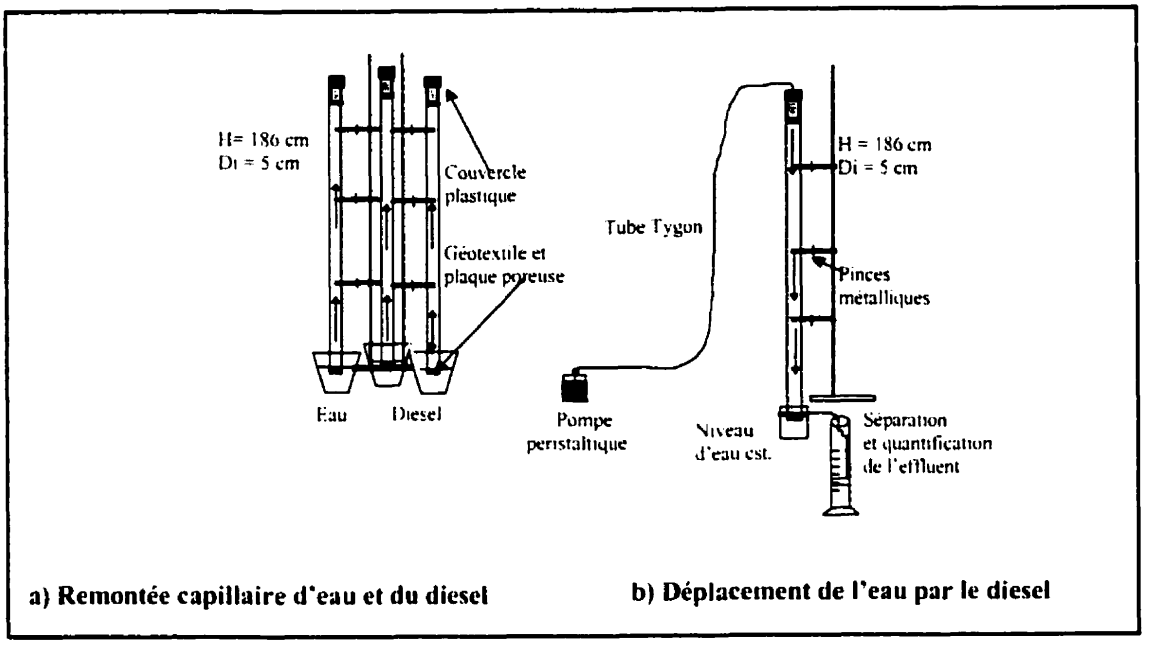


Figure 3.3 Rétention capillaire à basse pression et déplacement des phases

3.2.1 Rétention capillaire à basse pression

Ce test consiste d'une part, à caractériser la distribution de l'eau et du diesel à la saturation résiduelle dans un milieu poreux non-saturé grâce à la capacité intrinsèque de rétention et à obtenir les courbes de saturation et d'autre part, à étudier le comportement hydrodynamique des fluides (air, diesel et eau) par déplacement des phases.

3.2.1.1 Remontée capillaire en liquides (eau et diesel)

Le dispositif expérimental utilisé est composé de trois colonnes en PVC de 186 cm de long et de 5 cm de diamètre intérieur remplies de sol. Si le sol, tel quel (i.e., 20 %

d'humidité) est utilisé à cet essai, au lieu d'avoir une remontée capillaire, il aurait probablement un drainage ou un équilibre. Par conséquent, le sol est préalablement séché à l'air ambiant durant 24 h, afin de diminuer l'humidité à 5 %. Bien que désormais exploratoire, cette étude est réalisée en partant de l'hypothèse que ce même sol pourrait être originaire des horizons de surface (i.e., teneur résiduelle en eau) ou sous conditions de fort drainage (faible recharge de l'aquifère).

Pour interpréter les résultats obtenus, une étape de caractérisation du sol est nécessaire. Ces caractéristiques (i.e., hauteur et volume du sol dans les colonnes, masses volumiques humide et sèche, porosité, teneurs et degré de saturation en liquides) sont évaluées lors du montage et du démontage du dispositif par les méthodes et les relations de calcul propres à chacune, comme mentionné dans les sections 3.1.2.1, 3.1.2.3, 3.1.2.4, 3.1.2.6 et à l'Annexe I.

Afin de simuler le système bi-phasique air-eau deux colonnes sont saturées en eau, tandis que pour simuler le système bi-phasique air-diesel, une troisième colonne est saturée en diesel. Les colonnes remplies de sol ont été positionnées verticalement à l'aide de supports, tiges et pinces métalliques, les deux premières, au-dessus d'un récipient contenant de l'eau et la troisième, au-dessus d'un récipient contenant du diesel. La partie inférieure des colonnes est immergée dans les fluides respectifs sur une hauteur d'à peu près 5 cm. Les colonnes sont pesées à l'aide d'une balance d'une précision de 0,1 g au début de l'expérience à chaque heure durant le premier jour et à chaque jour par la suite, afin de déterminer l'évolution de la saturation en liquides (i.e., eau et diesel) en fonction du temps. La saturation est considérée terminée à l'équilibre des trois phases (air/diesel/eau) et plus précisément, lorsqu'un plateau des courbes (i.e., variation de la masse des colonnes et de la vitesse de pression en fonction du temps) s'établit. Une des deux colonnes saturées en eau sert pour l'étape de déplacement des phases, discutée dans la section suivante. Bien que la saturation soit terminée, les deux autres colonnes sont laissées en place pour voir le changement du degré de saturation durant la période de temps allouée au déplacement des phases.

3.2.1.2 Déplacement des phases (eau par diesel)

L'objectif de cet essai est d'étudier le comportement hydrodynamique des fluides (i.e., vitesse d'écoulement, répartition de la teneur massique en fluides sur la hauteur de la colonne) simulant les conditions d'un déversement de diesel dans un milieu poreux à saturation résiduelle en eau. Une des deux colonnes saturées en eau par remontée capillaire (section 3.2.1.1) sert à l'étude du déplacement de l'eau résiduelle par le diesel. Le déversement à lieu dans la partie supérieure de la colonne et, il est régulé par une pompe péristaltique Masterflex®de type standard. Au début, le débit correspond à un écoulement goutte à goutte (i.e., 1 cm^3/min). Il est ensuite réduit (i.e., 0,03 à 0,50 cm^3/min), car une lame de diesel se forme à la partie supérieure de la colonne. Le diesel déplace l'eau des pores du sol jusqu'à ce qu'un équilibre s'établit entre les trois phases du système (air/diesel/eau). L'effluent (i.e., eau et diesel) est récupéré et quantifié dans un cylindre gradué. Lorsque le volume de diesel qui entre dans la colonne est égal au volume de diesel récupéré, l'équilibre est considéré atteint et cela représente la fin de l'essai de déplacement. A ce moment, le processus de remontée capillaire dans les autres deux colonnes est arrêté.

Finalement, les trois colonnes sont segmentées et des échantillons composite sur une hauteur d'environ 10 cm sont prélevés de chacune. Ces échantillons sont analysés pour la détermination de la teneur massique en eau (séchage à 105°C) et en hydrocarbures selon les méthodes présentées dans les sections précédentes. Enfin, avec ses données, les profiles de saturation en fluides en fonction de la hauteur des colonnes (i.e., pression) sont représentés.

3.2.2 Rétention capillaire de l'eau et du diesel à haute pression

Le but principal de cet essai est de représenter les courbes caractéristiques de saturation eau-sol et diesel-sol à haute pression (i.e., simulation des conditions rencontrées durant l'application d'une pression dans la zone non-saturée). Et cela, afin de connaître deux facteurs d'une grande importance pratique pour le traitement *in situ* par bioaspiration,

sans lesquels les conditions opératoires du procédé ne peuvent pas être établies (i.e., pression d'entrée d'air, saturation résiduelle en eau et diesel respectivement).

Il y a plusieurs dispositifs à l'aide desquels cela peut ce faire. Cependant, suivant la texture et la structure du sol, la gamme de pressions à appliquer varie. Compte tenu du fait que le sol à l'étude est d'une texture fine, un système de haute pression (i.e., cellules Tempe) est utilisé. La gamme de pression à appliquer varie entre 0 et 5 atm voire 14 atm et les méthodes standard ASTM utilisées sont les suivantes: D 3152 - 72, D 421, D 698, D 2325.

Plusieurs essais ont été réalisés:

1. sol séché au préalable à l'air ambiant, 5 % d'humidité;
2. sol saturé en diesel (sol prélevé du perméamètre ayant servi à la détermination de la conductivité hydraulique au diesel à saturation en diesel);
3. sol tel quel (sol à l'étude), 20 % d'humidité.

Une cellule Tempe, consiste en une chambre de pression, un anneau cylindrique d'un volume approximatif de 100 cm^3. Des couvercles (i.e., tête et base) ferment étanchement la cellule et sont munis des ports d'entrée et de sortie d'air, des vapeurs et des liquides. La cellule est connectée à un système de pression contrôlé par un régulateur de pression positive. Le sol saturé en liquide (eau ou diesel) est mis en contact avec une plaque poreuse saturée au préalable par le même liquide, reposant sur un disque contenu dans un anneau, installé dans la chambre de haute pression. La partie inférieure de l'ensemble est maintenue à la pression atmosphérique à l'aide d'une ouverture servant à la sortie de l'effluent. Une pression appliquée dans la chambre et par conséquent, à la partie supérieure de la plaque poreuse crée un gradient de pression dans la colonne de sol. Un équilibre s'établit entre le sol saturé et l'eau présente dans la plaque poreuse. L'eau retenue à une tension plus faible que le gradient de pression à travers la plaque poreuse, est alors déplacée des pores de sol et expulsée à travers l'ouverture de drainage. Lorsque le liquide cesse de s'écouler de l'échantillon et de la plaque poreuse, l'équilibre est

atteint, habituellement 48 h, et la teneur en liquide correspondante est déterminée par gravimétrie. Une série de tests à des pressions variables est requise afin d'obtenir une courbe complète montrant la relation entre la pression capillaire et le degré de saturation.

A la fin de l'expérience, à l'aide d'une spatule, des échantillons sont prélevés, pesés et mis à l'étuve à 105°C pour une durée de 24 h pour déterminer la masse volumique sèche, et par conséquent, la teneur volumique en liquide et le degré de saturation (Annexe I).

3.3 Étude de la biodégradation du diesel en colonnes

Des essais en colonnes sont faits afin de reproduire et d'étudier la restauration biologique du sol contaminé au diesel par deux traitements, soit la bioaspiration et la bioventilation, ce dernier à titre de comparaison.

3.3.1 Description du dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé est composé d'un ensemble de quatre colonnes en acier inoxydable de 20 cm de hauteur et 10 cm de diamètre intérieur. Deux colonnes, soit Ba1 et Ba2 (i.e., duplicata), servent à l'étude de l'influence du traitement par bioaspiration (pression négative) sur la biodégradation du diesel, tandis qu'une troisième, soit Bac (abiotique), est affectée à l'étude de l'influence du traitement par succion sur les caractéristiques physico-chimiques et hydrodynamiques du système. Une quatrième colonne, soit Bv est destinée à reproduire le traitement par bioventilation (pression positive). Compte tenu du grand nombre d'éléments composant le dispositif ainsi que de leur fonction respective, le lecteur est tenu, pour plus de détails, à voir le protocole expérimental PE26B à l'Annexe II. La Figure 3.4, montre le schéma simplifié du montage expérimental utilisé.

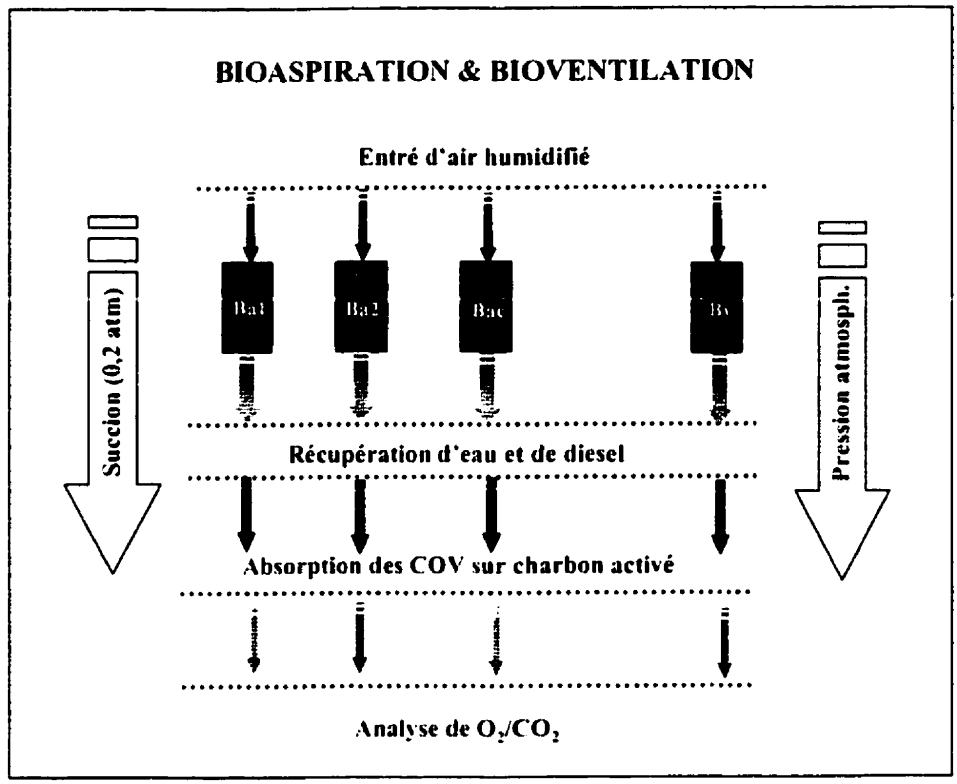


Figure 3.4 Dispositif expérimental de la bioaspiration et de la bioventilation

Ba1, Ba2 - colonnes traitées en mode de bioaspiration; Bac - colonne abiotique traitée en mode de bioaspiration; Bv - colonne traitée en mode de bioventilation.

Afin d'assurer la reproductibilité des résultats, les propriétés géotechniques du sol (section 3.1.2) ont servi comme paramètres indicateurs lors du remplissage et de la préparation des colonnes, i.e., toutes les colonnes ont eu autant que possible les mêmes caractéristiques géotechniques et physico-chimiques.

3.3.2 Saturation des colonnes

Après la caractérisation initiale, soit le temps d'échantillonnage t_i, les colonnes furent saturées en diesel par la méthode à charge variable. Un gradient hydraulique égal à 4 (m/m) a été appliqué car, une valeur de la conductivité hydraulique dans des conditions semblables fut préalablement déterminée (section 3.1.2.5).

La saturation a été considérée complète après deux essais de saturation (i.e., temps d'échantillonnage, t_1 et t_3, respectivement), totalisant ainsi un volume de diesel en équivalent de volumes de pores égal à 23, soit 15 L de diesel à travers chaque colonne. Tout au long de ces deux essais, la conductivité hydraulique du diesel a été mesurée. La saturation fut considérée terminée lorsque la conductivité hydraulique et la masse des colonnes ont demeuré quasi-constantes.

Les deux essais de saturation ont été entrecoupés par une durée de traitement de 11 jours, soit le temps d'échantillonnage t_2. Il est à noter que l'écoulement du diesel fut très lent en dépit du volume de pores disponible.

3.3.3 Paramètres d'opération

Les paramètres qui contrôlent la faisabilité technique des technologies telles que la bioaspiration et la bioventilation sont la pression et le volume d'air et la perméabilité à l'air du sol à traiter. C'est pourquoi, avant que le dispositif expérimental mis au point pour reproduire en colonnes ces deux technologies de remédiation ne soit validé, des essais préliminaires d'étanchéité et de fonctionnement furent effectués. D'après la littérature spécialisée, la gamme de pressions négatives appliquées pour le traitement par bioaspiration sur des sites contaminés, varie de 0,1 à 1 atm (Baker et Bierschenk, 1995, Hinchee et al., 1995). Cependant, après avoir représenté les courbes caractéristiques du sol, il en ressort que lorsque la pression est égale ou supérieure à 0,2 atm (i.e., pression d'entrée d'air) l'air circule et commence à déplacer les liquides dans les colonnes de sol. C'est la pression qui fut utilisée dans cette étude.

En ce qui concerne le traitement par bioventilation, la pression positive appliquée fut égale à la pression atmosphérique. Le débit d'air injecté pour les deux traitements fut égal à 2 ml/minute, soit l'équivalent à environ quatre volumes des pores/jour. Ce débit est régulé à l'aide d'une pompe péristaltique Masterflex®de type standard dans le cas du

traitement par bioaspiration et d'un régulateur de débit massique d'air, Mass-Flo™, opérant de 0-20 cm^3/min dans le cas du traitement par bioventilation.

Les mesures de pression à l'entrée et à la sortie des colonnes furent réalisées, en connectant le manomètre aux ports libres prévus à cette fin (i.e., en haut et en bas des colonnes) afin d'enregistrer les variations dans le temps. Pour avoir plus de précision, les pertes de charge dans les colonnes furent estimées à l'aide d'un différentiel en forme de U, d'une longueur d'un mètre et ayant de l'eau à l'intérieur sur une hauteur d'à peu près 50 cm. Cela fut nécessaire pour estimer l'évolution de la perméabilité à l'air du sol durant toute la période d'opération. Pour maintenir les conditions optimales d'humidité, l'air injecté dans toutes les colonnes fut au préalable humidifié. L'effluent passa à travers des récipients ayant le rôle de retenir la phase libre des liquides expulsés, avant qu'il n'ait parcouru les ampoules de charbon activés, installées en ligne, pour le captage des COV (composes organiques volatils) issus des colonnes.

3.3.4 Paramètres microbiologiques

Un critère important pour l'évaluation des performances réelles d'un système de remédiation est l'activité de respirométrie, soit une mesure du taux de biodégradation du contaminant. La cinétique de biodégradation du contaminant fut estimée en mesurant la consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone, les deux étant les paramètres principaux associés à l'enlèvement du substrat organique et à la croissance de la biomasse. La mesure de ces deux paramètres a été faite tant sous conditions dynamiques que statiques. A part la détermination du taux de biodégradation, ces deux paramètres ont donné aussi des informations sur l'effet de certaines mesures prises pour l'optimisation de la dégradation du contaminant.

3.3.4.1 Respirométrie sous conditions dynamiques

Ce test fut réalisé durant le processus d'aération des colonnes afin de vérifier si la concentration en oxygène devient un facteur limitant dans le processus de biodégradation.

Les mesures furent effectuées à l'aide d'un appareil analytique muni d'une sonde électrochimique pour mesurer la concentration en phase gazeuse d'oxygène et d'un détecteur infrarouge pour mesurer la concentration en phase gazeuse de dioxyde de carbone, type Nova Analytical, modèle 309BWP (Systems inc.). Les taux d'utilisation d'oxygène et de biodégradation, respectivement furent estimés à partir du modèle empirique décrit dans la section 2.3.1.7.

3.3.4.2 Respirométrie sous conditions statiques

Afin de réaliser ce test, l'aération des colonnes a été arrêtée durant une période de temps et les gaz du sol ont été prélevés à l'aide d'une seringue de la partie supérieure des colonnes et analysés par chromatographie en phase gazeuse. Deux essais de respirométrie furent effectués à l'intervalle de deux semaines. L'aération a été arrêtée pendant 12 heures et des échantillons de gaz du sol ont été pris à chaque heure et analysés afin d'estimer la consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone.

3.3.4.3 Biomasse

L'évolution de la biomasse a été effectuée par des décomptes des micro-organismes hétérotrophes totaux et spécifiques selon les méthodologies décrites dans la section 3.1.3.2.

L'activité de la biomasse a été testée par des tests de minéralisation. De façon à minimiser le volume de sol à prélever des colonnes et conséquemment à réduire l'impact de l'échantillonnage sur l'hydrodynamisme du système d'étude, les tests de minéralisation furent effectués en mini-microcosmes. Un mini-microcosme consiste en une bouteille sérologique de 10 ml auquel 1 g de sol, un mélange de solution d'hexadécane [1-^{14}C] et d'hexadécane froid, soit 2,2 µl et une trappe (tube en verre de 1,1 ml) contenant une solution de 0,5 ml KOH 1N sont ajoutés. Les bouteilles sont scellées avec des valves Mininert (Supelco, Canada) et incubées à la température de la pièce.

Comme dans la section précédente, le [1-^{14}C] hexadécane (pureté supérieure à 98%, activité spécifique égale à 2,2 mCi/mmol, Sigma, É.-U) fut utilisé comme composé témoin et l'activité totale était de 87 000 dpm (désintégrations par minute). Périodiquement, la solution radioactive de KOH est récupérée et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (Packard Tri-Carb model 2100 TR). De façon à maintenir des conditions aérobies tout au long des essais, de l'air est injecté après chaque deux échantillonnages.

Les essais furent réalisés en triplicata sur des échantillons de sol prélevés des quatre colonnes ainsi que sur un contrôle abiotique (0,4 % p/p d'azoture de sodium, Anachemia, Montréal, Québec). L'effet de l'ajout de nutriments (i.e., solution 20/20/20 (20 % nitrate d'ammonium, 20 % d'urée et 20 % phosphate de potassium, résultant en une addition de 250 mg N/kg de sol humide) fut également vérifié.

3.3.5 Suivi des essais en colonnes

Le type du milieu, les paramètres suivis et analysés ainsi que la fréquence des mesures (i.e., temps d'échantillonnage) durant toute la période d'opération des deux traitements, soit 50 jours, sont centralisés au Tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Liste des paramètres d'analyse lors des essais en colonnes.

Milieu	Catégorie	Paramètre	Temps d'échantillonnage						
			t_i	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_f
Sol	Physique	Bilan massique	✓						✓
		Perméabilité	C	C	C	C	C	C	C
		Teneur en eau	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Chimique	C_{10}-C_{50}	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		PH	✓						✓
		Nutriments	✓						✓
		COT	✓						✓
	Microbiologique	Comptes totaux	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		Sondes génétiques	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		Microcosmes	✓						
		Minimicrocosmes		✓		✓			
Gaz	Physique	Débit	C	C	C	C	C	C	C
		Pression	C	C	C	C	C	C	C
	Chimique	CO_2	D	D	D	D	D	D	D
		O_2	D	D	D	D	D	D	D
		COV							✓

Note : C – continu; D – discontinu (2 fois par semaine)

La signification des temps d'échantillonnage est comme suit :

t_i: temps initial, soit le remplissage des colonnes;

t_1: 1er essai de saturation en diesel;

t_2: 11 jours de traitement;

t_3: 2ème essai de saturation en diesel (début proprement dit des traitements ou temps zéro);

t_4: 14 jours après le début des traitements;

t_5: 41 jours après le début des traitements;

t_f: fin des traitements.

CHAPITRE IV : RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre, présenté en trois parties, présente les résultats obtenus et leur interprétation tout au long de l'avancement du projet. Dans un premier temps, les résultats d'une étude préliminaire ayant mené au choix du sol sont présentés. Ensuite, une caractérisation exhaustive du sol à l'étude du point de vue géotechnique, physico-chimique et biologique est présentée. Finalement, les résultats des essais de bioaspiration et de bioventilation obtenus durant la dernière partie du projet ayant mené à l'accomplissement des objectifs proposés sont présentés.

Il est essentiel de noter qu'une interprétation vraisemblable des résultats obtenus, n'aurait pas été possible sans qu'une corrélation avec le site de prélèvement n'ait été faite, bien que pour des raisons de recherche à micro- et méso-échelle, le sol fut remanié. Mentionons, qu'il est important de porter une plus grande attention à la signification relative et tendancielle de ces résultats plutôt qu'à leurs valeurs absolues.

4.1 Étude préliminaire

Afin d'atteindre les objectifs proposés, une étape préliminaire a été nécessaire pour obtenir une information quantitative du profil hydrique ainsi que de la densité et de l'activité des micro-organismes viables après le prélèvement du sol.

Le sol a été prélevé sur un profil d'environ 80 cm, sur deux profondeurs distinctes: strate 1 (s_1), située au-dessus de la nappe phréatique et, strate 2 (s_2), sus-jacente à la strate 1 situées à 4,2 m par rapport à la surface du sol. La Figure 4.1, situe schématiquement le lieu de prélèvement et montre les gradients typiques des profils hydrique et hydraulique associés.

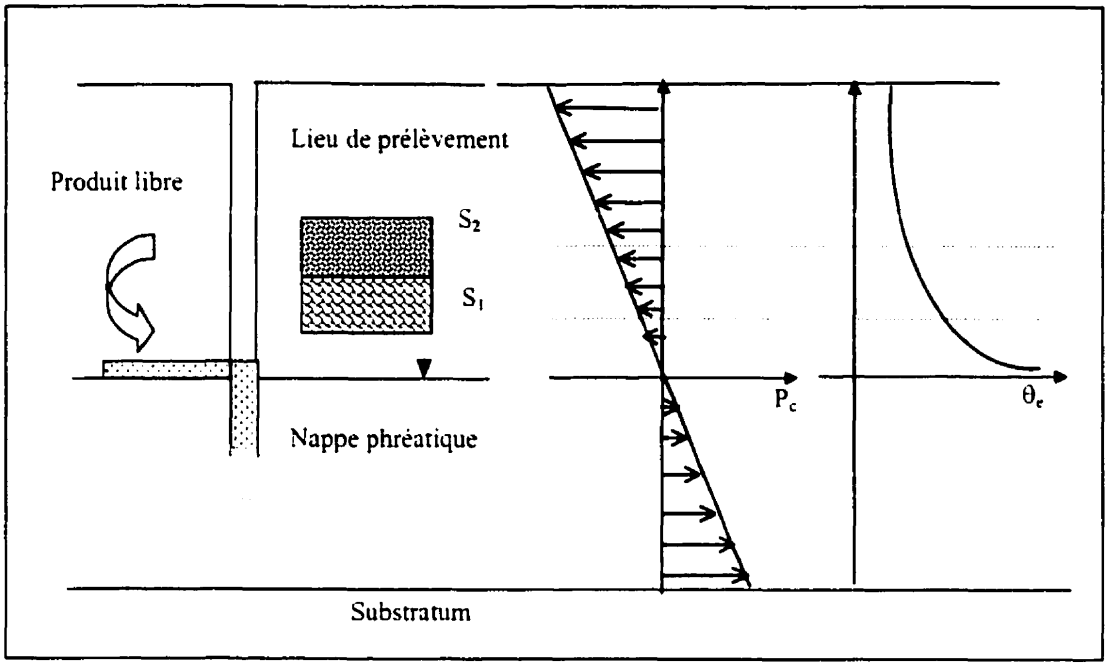


Figure 4.1 Localisation du lieu de prélèvement et gradients théoriques: P_c et θ_w

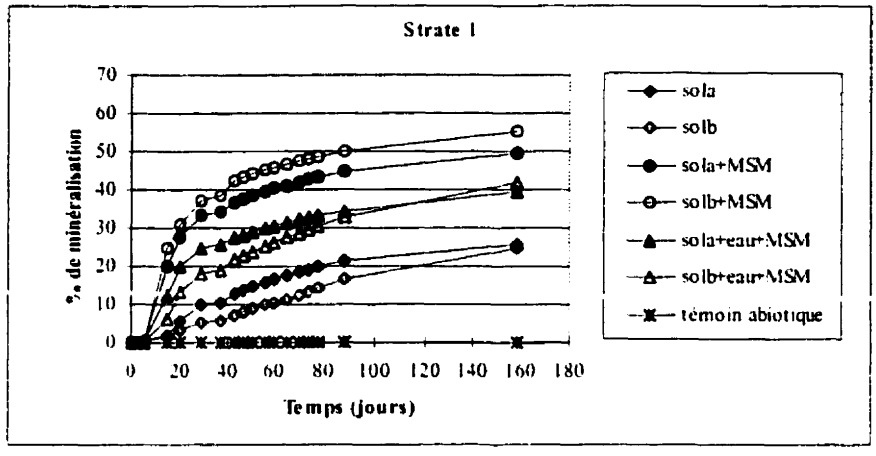
Le sol provenant de chaque strate fut homogénéisé et des échantillons représentatifs ont été pris et analysés (Tableau 4.1).

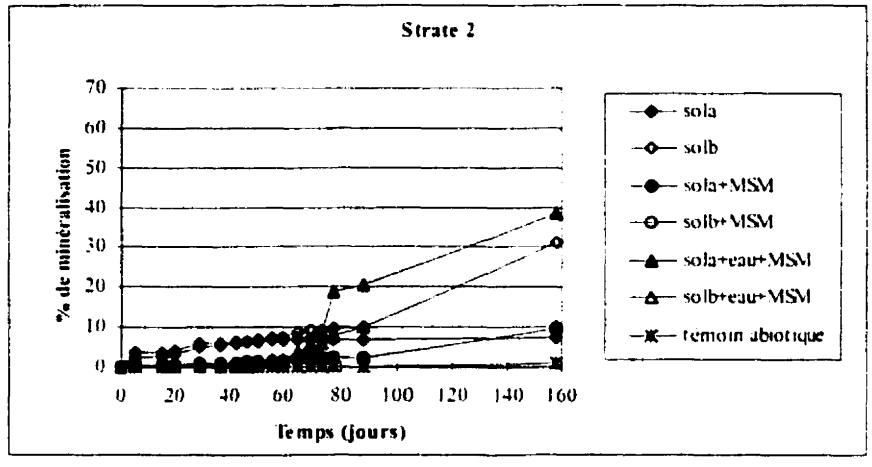
Tableau 4.1 : Caractérisation préliminaire du sol

Grandeur	s_1	s_2	s_1+s_2
C_{10}-C_{50} (mg/kg sol sec)	5900	7600	8000
Teneur massique en eau (%)	16	10	11,3
HT(cell./g sol) par MPN	3×10^5	5×10^6	$1,6 \times 10^7$
% de minéralisation sans MSM	25,8	7,3	18,1
% de minéralisation avec MSM	49,6	9,5	50,0

(s_1+s_2) – mélange de s_1 et s_2; HT – micro-organismes hétérotrophes totaux

Les résultats au Tableau 4.1 indiquent qu'il y a une population hétérotrophe moins nombreuse mais active au niveau de la zone du profil situé juste au-dessus de nappe. La différence d'activité enregistrée entre les deux strates peut être attribuée à la disponibilité des nutriments et probablement à la présence d'une population des bactéries hydrocarbonoclastes plus active et adaptée au niveau de la strate 1 qu'au niveau de la strate 2. Wood et ses collaborateurs (1993), dans une étude approfondie sur le terrain montrent que l'interface entre la zone non-saturée et la zone saturée est en effet une zone de haute activité microbienne due à la diffusion et à la convection des nutriments de l'eau souterraine. La présence d'une autre source de carbone plus disponible que la contamination (i.e., matière organique du sol) n'est pas écartée (la mesure du carbone organique total n'étant pas encore réalisée). L'évolution des trois courbes de minéralisation du polluant témoin correspondant aux trois types de sol (sol de la strate 1, sol de la strate 2 et mélange des sols de deux strates) est présentée à la Figure 4.2. Il est a noter que deux échantillons représentatifs de chaque type de sol (sola et solb) ainsi qu'un échantillon abiotique ont été suivis. L'effet de l'ajout d'eau (2 ml d'eau de robinet) et d'eau et nutriments (1 ml d'eau de robinet et 1 ml de MSM) fut vérifié pour chacun des échantillons. En effet, l'ajout des nutriments a amélioré le taux de minéralisation du conytaminant témoin d'environ 30 %, tandis qu'une plus faible concentration en nutriment mais la même teneur en eau n'a amélioré le taux de minéralisation que de 15 % (dans le cas du sol provenant de la strate 1). Les taux de minéralisation du sol de la strate 2 sont très faibles et variables. Cela peut s'expliquer par une non-représentativité ainsi que par une forte hétérogénéité de l'éachantillon de sol.





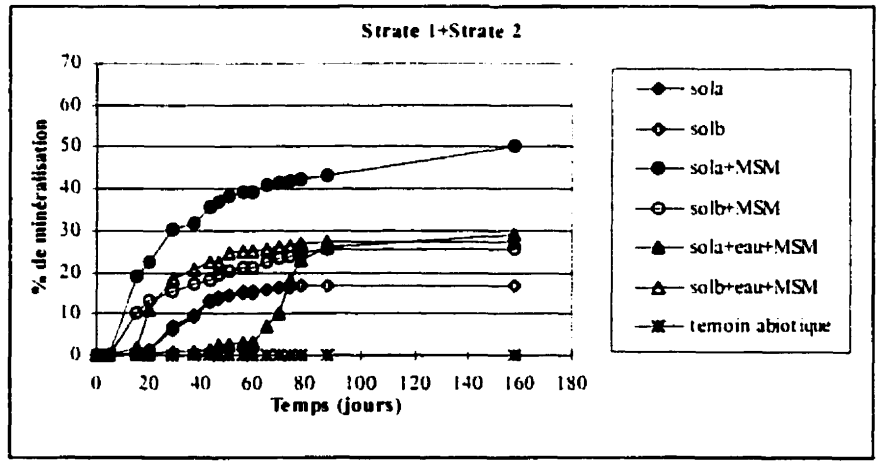


Figure 4.2 Courbes de minéralisation de [1-^{14}C] hexadécane

De cette étude préliminaire, il a été conclu que le sol se prête bien pour une étude de biodégradation dans les conditions requises pour un traitement par bioaspiration puisqu'il présentait une bonne activité microbiologique sur les substrats d'intérêt. La section suivante se consacre à sa caractérisation globale et plus exhaustive.

4.2 Caractérisation initiale du sol à l'étude

Cette section comporte les paramètres physico-chimiques et géotechniques du sol, ainsi que les paramètres microbiologiques mesurés selon les méthodes décrites dans le chapitre 3. L'interprétation des résultats obtenus a été faite sans tenir compte de l'historique de la contamination.

4.2.1 Contamination du sol

Tous les paramètres considérés pour la caractérisation de la contamination ont été mesurés à partir des échantillons représentatifs tant du sol (les deux strates mélangées et homogénéisées) que du produit libre. La teneur en contaminant a été déterminée en duplicata, tandis que la masse volumique, la tension interfaciale et la viscosité du produit libre ont été déterminées sur plusieurs échantillons à 24°C. L'analyse chimique du produit libre récupéré de la phase flottante, ainsi que de la contamination résiduelle dans la zone vadose a montré qu'il s'agit d'un mélange de deux classes d'hydrocarbures pétroliers, soit les C_{10}-C_{19} et C_{20}-C_{29}, dont le diesel en fait partie. La détermination de la viscosité cinématique a été effectuée, en considérant le diesel comme étant un fluide newtonien (Tableau 4.2).

Tableau 4.2 : Propriétés de la contamination du sol, du produit libre et de l'eau

Paramètre	Contamination résiduelle du sol (mg/kg)	Produit libre Récupéré (mg/L)	Eau
[C_{10}-C_{19}]	7250	675000	-
[C_{20}-C_{29}]	565	71700	-
Masse volumique (g/cm^3)	-	0,82 [0,8-0,85][1]	[0,998]
Viscosité cinématique (cs)	-	2,31-2,93	[0.935]
Viscosité dynamique (cp)	-	1,9-2,41 [1,1-3,5][1]	
Tension superficielle (dynes/cm)	-	27,2 [25][1,2]	72,7
Tension interfaciale (dynes/cm)	-	17,1[17][2]	-

[ ] valeurs tirées de la littérature

Le sol possède une concentration en hydrocarbures pétroliers allant de C_{10} à C_{30} d'environ 7800 mg/kg de sol sec. Le diesel récupéré de la phase flottante contient à peu près 25 % des composés en dehors du chromatogramme C_{10}-C_5, tandis que les valeurs mesurées des autres paramètres se trouvent pour la plupart dans la gamme de valeurs obtenues dans la littérature (Tableau 4.2).

A partir des valeurs des tensions interfaciales, le coefficient d'étalement du diesel à l'interface air-eau, (Σ) a été calculé à l'aide de l'équation [8] et sa valeur est de 28,4. Comme il s'agit d'une valeur positive, il en résulte que le diesel s'étale spontanément à l'interface air-eau sous forme de film continu (Wilson et al., 1990).

La nature capillaire d'un milieu poreux non-saturé est définie par les deux paramètres critiques, soit la tension interfaciale et l'angle de contact. Étant donné que les angles de contact aux interfaces fluide/fluide et fluide/solide n'ont pas été déterminés, il n'a pas été possible de définir la mouillabilité du milieu d'étude et ainsi, de calculer les valeurs approximatives des pressions capillaires s'exerçant aux interfaces fluide/fluide.

4.2.2 Propriétés géotechniques du sol

Selon le système de classification des sols de l'USDA (Duchaufour, 1991), la distribution en pourcentage des particules du sol (i.e., 5 % d'argile, 23,5 % silt, 70,5 % sable et 1 % gravier) réfère à un sable silteux et sa courbe granulométrique est montrée à la Figure 4.3.

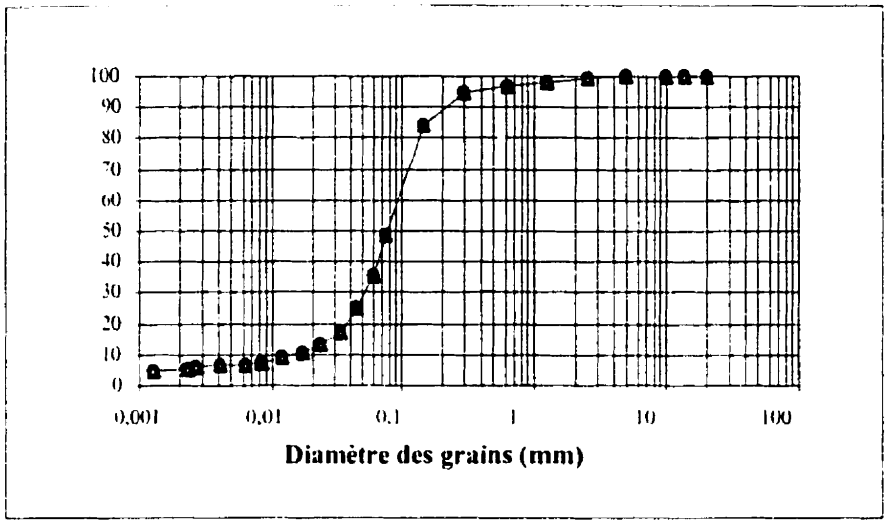


Figure 4.3 Courbe granulométrique du sol

Des caractéristiques comme les masses volumiques, la densité des grains solides et la porosité ont été mesurés sur plusieurs échantillons à 24°C et corrigées à la température de 20°C. Plusieurs teneurs initiales en liquides ont été testées (i.e., 4 %, 5,7 %, 10 % et 20 % respectivement). Un des sols asséchés à l'air, soit 5,7 % avait une teneur en diesel de 5200 mg/kg de sol sec, tandis que le sol à l'étude 7800 mg/kg de sol sec (Tableau 4.3).

Tableau 4.3 : Paramètres géotechniques du sol

Paramètres	Valeurs			
Masse volumique de l'eau d'essai (g/cm^3)	0,998			
Densité des grains solides (g/cm^3)	2,734			
Teneur en liquides (%)	4	5,7	10	20
Masse volumique du sol humide (g/cm^3)	1,744	1,749	1,938	1,995
Masse volumique du sol sec (g/cm^3)	1,677	1,654	1,762	1,672
Porosité (%)	38,7	39,5	35,6	38,8

L'influence de la teneur initiale en liquides du sol sur la conductivité hydraulique à saturation a été vérifiée d'une part, sur le sol asséché à l'air ambiant (i.e., 5,7 % et 10 % d'humidité) et d'autre part, sur le sol d'étude (i.e., 20 % d'humidité). Les valeurs moyennes des différentes conductivités hydrauliques obtenues, sont montrées au Tableau 4.4.

Tableau 4.4 : Valeurs de conductivités hydrauliques

Type d'essai	Teneur en liquides (%)	Charge (cm H_2O)	K_{diesel} (cm/s)	K_{eau} (cm/s)	Écart-type
1. Triaxiale	5,7	158	-	$5,5\times10^{-4}$	7×10^{-7}
	10	153	-	$2,0\times10^{-4}$	$3,1\times10^{-7}$
2. Charge variable	5,7	55	$2,0\times10^{-4}$	-	$2,2\times10^{-7}$
		73	-	$3,0\times10^{-4}$	$2,4\times10^{-6}$
3. Charge variable	20	59	$1,9\times10^{-7}$	-	$7,5\times10^{-10}$
		91	$2,1\times10^{-7}$	-	$3,7\times10^{-8}$
		112	-	$3,3\times10^{-7}$	$2,4\times10^{-8}$

A la fin du deuxième essai de conductivité hydraulique, deux échantillons représentatifs de sol ont été prélevés et analysés. Les résultats ont révélé une teneur massique en diesel d'environ 19 000 mg/kg de sol sec. Comme il peut être constaté, les valeurs de la

conductivité hydraulique à l'eau, ainsi qu'au diesel obtenues durant le troisième essai sont très faibles.

Quelque soit le type d'essai, aucune différence importante de conductivité hydraulique à l'eau pour une teneur initiale en liquides de 5 à 10 % ne fut observée. Par contre, lorsque la teneur initiale en liquides a augmenté à 20 %, la conductivité hydraulique tant à l'eau qu'au diesel a diminué de trois ordres de grandeurs. Cela peut s'expliquer d'une part, par la teneur elevée en eau (i.e., degré de saturation en eau proche de la saturation) ayant engendré l'emprisonnement de grands volumes d'air dans les pores lors de la mise en place du sol dans le perméamètre et d'autre part, par la tortuosité du réseau des pores ayant causé des discontinuités dans les flux des fluides (air, diesel, eau).

4.2.3 Paramètres chimiques

Afin de maintenir la croissance et l'activité des micro-organismes, les concentrations en nutriments du sol doivent être adéquates. Il est à rappeler qu'un rapport C/N/P oscillant entre 300/10/1 et 100/10/1 est habituellement adéquat pour une croissance optimale des micro-organismes (Cookson, 1995, Godsy, 1998). Comte tenu du fait que la mesure du carbone organique total du sol (matière organique plus contamination) n'a pas été validée, dans le rapport C/N/P uniquement la concentration en carbone provenant de la contamination a été prise en compte. Ainsi, le rapport C/N/P du sol fut estimé à 7800/79/1300 (i.e., 100/1/16). Donc, une déficience en macro-éléments nécessaires à une activité optimale de biodégradation est notée. La présence de la contamination dans le sol a pu provoquer des déséquilibres aux cycles naturels du carbone, de l'azote et du phosphore. Une faible teneur en azote total Kjeldahl (NTK) fut mesurée, soit 79 mg/kg. Les concentrations en nitrates et nitrites ont été en-dessous de la limité de détection de la méthode analytique, soit 1 mg/kg. D'une part, l'azote sous forme de nitrate, qui prend naissance dans les horizons de surface, est rapidement entraîné par les eaux d'infiltration vers la nappe phréatique, tandis que l'azote sous forme de nitrite, étant très instable, se transforme rapidement en nitrate. D'autre part, compte tenu que le sol provient des

horizons profonds, il est vraisemblable que la diffusion de l'oxygène y ait été limitée, ce qui a pu créer des conditions anoxies voire anaérobies, engendrant ainsi l'utilisation d'autres accepteurs d'électrons, parmi lesquels, le nitrate.

Bien qu'elle représente la forme d'azote la plus disponible aux micro-organismes, l'ammonique (i.e., ion d'ammonium, $NH4^+$ et le gaz ammoniacal, NH_3) n'a pas été mesuré.

La biodégradation des hydrocarbures pétroliers sous conditions dénitrifiantes a été démontrée par des recherches de laboratoire (Sturman et al., 1995).

La teneur en phosphore du sol est assez élevée (1300 mg/kg) et de nouveau, s'agissant d'un horizon profond, il est fort probable qu'il soit d'origine minérale (i.e., désintégration et décomposition des apatites, phosphorites). Cette forme de phosphore étant très insoluble dans la plupart des sols peut précipiter sous forme de phosphate de calcium ou de magnésium ce qui la rend immobile dans le sol.

La valeur du pH initial du sol est de 7,47 ce qui est favorable à la biodégradation.

4.2.4 Paramètres microbiologiques

La densité de la flore indigène du sol a été vérifiée par des dénombrements des micro-organismes hétérotrophes totaux et spécifiques par la méthode MPN et par la méthode de culture sur plaque de Pétri. L'activité de la biomasse a été vérifiée par des tests statiques de minéralisation d'un polluant témoin, en l'occurrence le diesel.

4.2.4.1 Biomasse

La présence et la densité des micro-organismes dans le sol ont été vérifiées par la méthode MPN ainsi que par la méthode de croissance sur plaques de Pétri. A partir de cette dernière, il a été possible de voir la présence et la densité des micro-organismes répondant positivement aux sondes génétiques *ndoB* et *alkB* (Tableau 4.5).

Tableau 4.5 : Densité initiale des bactéries dans le sol ayant servi aux essais de biodégradation en colonnes et comptant pour le temps initial, t_i

Caractéristique	Ba1	Ba2	Bac	Bv
MPN				
HT (cell./g sol)	$1,3\times10^{7}$	$6,1\times10^{6}$	$1,9\times10^{7}$	$6,1\times10^{8}$
HC (cell./g sol)	$1,95\times10^{4}$	$1,95\times10^{4}$	$2,07\times10^{4}$	$3,66\times10^{4}$
Plaques de Pétri				
HT (UFC/g sol)	$1,92\times10^{8}$	$2,53\times10^{8}$	-	$2,13\times10^{8}$
Ecartype	$1,90\times10^{7}$	$2,66\times10^{8}$		$2,34\times10^{7}$
alkB (UFC/g sol)	$1,73\times10^{6}$	$2,13\times10^{6}$	-	$1,73\times10^{6}$
Ecartype	$6,11\times10^{5}$	$6,11\times10^{5}$		$6,11\times10^{5}$
ndoB (UFC/g sol)	$2,67\times10^{5}$	$1,20\times10^{5}$	-	$4,00\times10^{5}$
Ecartype	$2,31\times10^{5}$	$1,06\times10^{6}$	-	$4,00\times10^{5}$

Ba1, Ba2 - colonnes traitées en mode de bioaspiration; Bac - colonne abiotique traitée en mode de bioaspiration; Bv - colonne traitée en mode de bioventilation; HT - hétérotrophes totaux; HC - hydrocarbonoclastes; *alkB* - enzyme alcane-hydroxylase; *ndoB* - enzyme naphtalène dioxygénase; UFC - unités formatrices de colonies.

La variabilité des décomptes hétérotrophes totaux observée par la méthode MPN peut être due à l'hétérogénéité des échantillons analysés car il s'agissait du même sol au même moment de prélèvement. Les décomptes bactériens totaux ainsi que spécifiques obtenus par la méthode de culture en milieu solide (plaques de Pétri) sont supérieurs à ceux obtenus par la méthode de culture en milieu liquide (MPN). Cela corrobore aux résultats obtenus lors des études comparatives de plusieurs méthodes dont les deux utilisées dans cette étude (Walker et Colwell, 1976). Des études additionnelles menées par Austin et ses collaborateurs (1977) ont montré que ce n'est pas l'entièreté des micro-organismes apparaissant sur un milieu solide qui sont capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers. De plus, il a été montré que la méthode utilisant un milieu liquide minimal avec ajout d'un composé organique spécifique représente la méthode la plus efficace pour

le dénombrement des micro-organismes dégradant les composés organiques dans un environnement estuairien et marin (Mills et al., 1978).

4.2.4.2 Activité de la biomasse

L'effet de la concentration en diesel du sol (7800 à 50 000 mg/kg) et de l'ajout de MSM sur le taux de minéralisation de [1-^{14}C] hexadécane a été vérifié par des essais en microcosmes pour une période d'incubation de 102 jours. Du diesel récupéré de la phase flottante du site fut ajouté dans les échantillons de sol pour ainsi donner des concentrations variant de 7800 (i.e., concentration initiale en diesel du) à 50 000 mg/kg de sol sec. Les courbes de minéralisation obtenues sans et avec du MSM sont illustrées aux Figure 4.4 et Figure 4.5, respectivement.

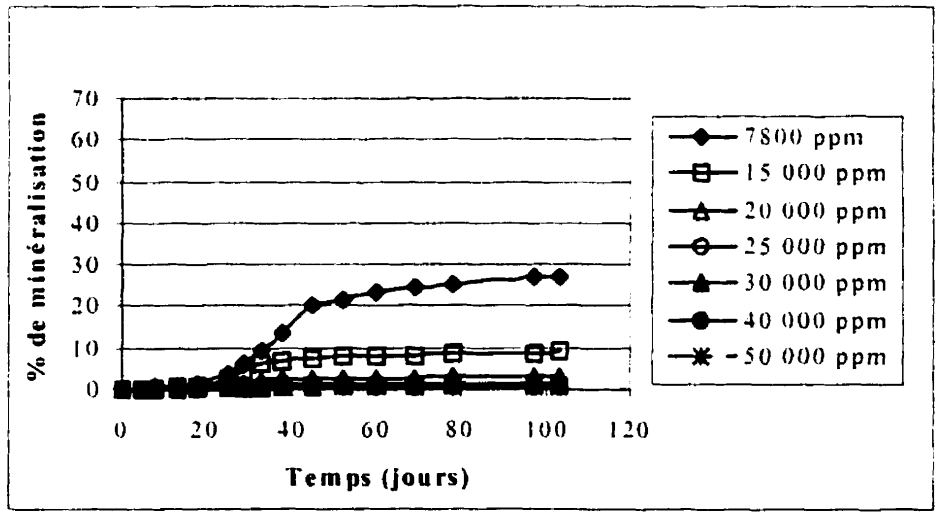


Figure 4.4 Courbes de minéralisation de [1-^{14}C] hexadécane sans ajout de MSM

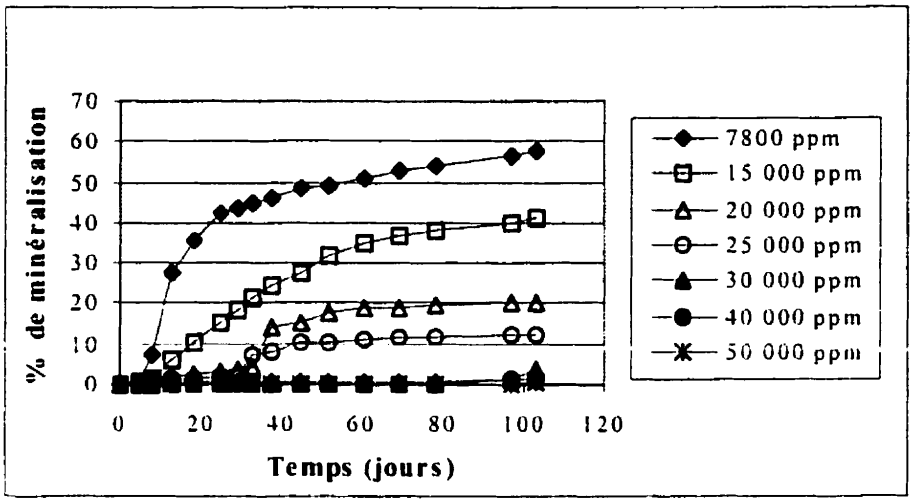


Figure 4.5 Courbes de minéralisation de [1-^{14}C] hexadécane avec ajout de MSM

Les réponses de minéralisation obtenues ont été qualitativement interprétées en utilisant des paramètres indicateurs de l'aptitude du consortium bactérien à dégrader le contaminant témoin (Millette et al., 1995; Tableau 4.6). Afin de bien comprendre cette interprétation, une courbe typique de minéralisation, ainsi que ses paramètres de reponse sont montrés à la Figure 4.6; tirée de Millette et al., (1995).

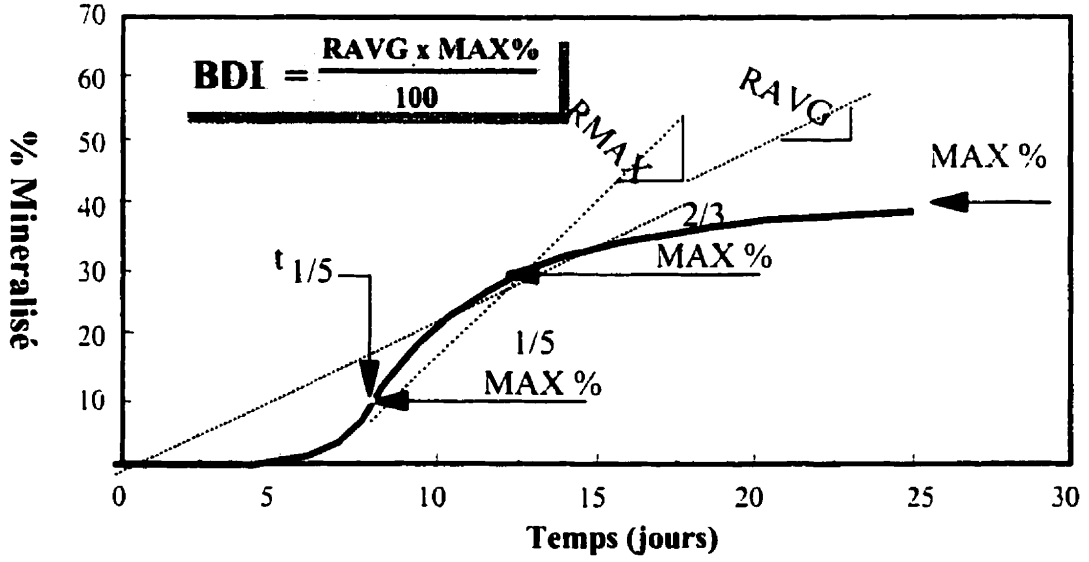


Figure 4.6 Représentation graphique des paramètres de réponses

La signification des paramètres de réponse est la suivante:

Max - % final de radioactivité cumulée comme $^{14}CO_2$ de la radioactivité ajoutée;

Lag - le temps requis pour atteindre 1/5Max %;

Rmax - le taux de minéralisation entre Lag et 2/3Max %;

Rmoy - taux moyen de minéralisation entre 0 % et 2/3Max %;

BDI – indice de biodégradation;
NBDI – indice normalisé de biodégradation.

Tableau 4.6 : Paramètres indicateurs de minéralisation

Milieu	C_{10}-C_{50} (mg/kg)	Lag (jour)	Max (%)	Rmax (%jour^{-1})	Rmoy (%jour^{-1})	BDI	NBDI
Sol	7800	24	27,3	0,4	0,28	0,08	1
	15 000	27	8,6	0,12	0,08	0,01	0,13
	20 000	40	3,2	0,04	0,03	0,00	0,00
	25 000	illimité	1,95	0,03	0,02	0,00	0,00
	30 000	illimité	1,03	0,01	0,01	0,00	0,00
	40 000	illimité	0,48	0,01	0,00	0,00	0,00
	50 000	illimité	0,40	0,01	0,00	0,00	0,00
Sol + MSM	7800	8	54,9	0,8	0,56	0,31	1
	15 000	17	44,3	0,61	0,43	0,19	0,61
	20 000	23	16,7	0,23	0,16	0,03	0,1
	25 000	29	12,0	0,17	0,12	0,01	0,03
	30 000	37	2,52	0,03	0,02	0,00	0,00
	40 000	illimité	1,16	0,02	0,01	0,00	0,00
	50 000	illimité	1,10	0,02	0,01	0,00	0,00

D'habitude, l'indice normalisé de biodégradation est calculé par rapport au témoin (i.e., sol non-contaminé). Dans ce cas, il a été calculé par rapport au niveau de la contamination initiale, soit 7800 mg/kg pour mettre en évidence l'effet de l'ajout de contaminant dans le même sol.

Sans exceptions, l'effet positif de l'ajout des nutriments s'est clairement fait sentir sur les pourcentages maximaux de minéralisation et sur la période d'acclimatation (lag). Les faibles pourcentages de minéralisation mesurés peuvent dénoter soit une inhibition par le substrat soit une incorporation cellulaire du substrat, mais cette dernière n'a pas été estimée. L'existence d'une source de carbone plus disponible que le contaminant n'est pas écartée. Par ailleurs, la période d'acclimatation (lag) s'est avérée être directement proportionnelle à la concentration en diesel car les autres facteurs (e.g., température, aération, nutriments) étaient égaux. Cela peut s'expliquer par une inhibition par le substrat ayant engendré une inhibition du système enzymatique intracellulaire/extracellulaire et par conséquent, une faible prolifération de la population microbienne.

Il peut être conclu qu'une concentration en diesel supérieure à 20 000 mg/kg (i.e. l'index de biodégradation nulle, sans ajout des nutriments) s'est avérée toxique pour la flore microbienne du sol ayant fait l'étude dans ce projet.

4.3 Comportement des fluides (air/diesel/eau) dans le milieu poreux

Comme il a déjà été mentionné dans le chapitre 3, cette partie du projet vise à mieux comprendre les mécanismes contrôlant le mouvement, et plus particulièrement l'emprisonnement par capillarité des fluides (air/eau/diesel) dans la zone vadose. Il est essentiel de spécifier que les facteurs microbiologiques n'ont pas été considérés durant cette étude hydrodynamique.

Afin d'atteindre le but fixé, deux types d'étude ont été réalisés : 1) essais de rétention capillaire et déplacement des phases à basse pression et, 2) essais de rétention capillaire à haute pression. Les deux types d'essais ont permis de produire les courbes caractéristiques eau-sol et diesel-sol respectivement. Celles-ci sont très importantes pour la réussite technique des deux technologies de restauration étudiées. Il est à souligner que les deux types d'étude sont complémentaires. Ainsi, l'étude de rétention capillaire à basse pression est plus précise que celle réalisée à haute pression car elle est plus proche

des conditions naturelles de la zone vadose, tandis que l'étude de rétention capillaire à haute pression fournit les informations nécessaires à une bonne compréhension des phénomènes lorsqu'une pression importante s'y applique.

4.3.1 Rétention capillaire à basse pression

Premièrement, à l'aide des essais en hautes colonnes simulant un milieu poreux non-saturé, la distribution des fluides a été déterminée. Deuxièmement, par déplacement des phases dans ce même milieu poreux non-saturé, il a été possible d'étudier le comportement hydrodynamique des fluides

4.3.1.1 Remonté capillaire

La distribution des fluides correspondant aux systèmes air-eau et air-diesel a été estimée par des essais de remonté capillaire. Pour caractériser ces systèmes et interpréter les résultats obtenus, une étape de caractérisation initiale du sol et des fluides a été nécessaire et les résultats sont centralisés au Tableau 4.7.

Tableau 4.7 : Caractérisation des trois colonnes

Caractéristique	Colonne 1	Colonne 2	Colonne 3
Hauteur colonne (cm)	186	248	186
Hauteur du sol (cm)	163,8	212,2	165,4
Masse du sol (g)	6055,2	7557,1	5783,9
Teneur massique en eau (%)	4,39	4,28	4,08
C_{10}-C_{50} (mg/kg)	5200	5200	5200
Porosité (%)	39,32	40,86	42,43
Masse vol. sol sec (g/m^3)	1,660	1,602	1,576
Masse vol. sol humide (g/cm^3)	1,742	1,678	1,648

La teneur en hydrocarbures, C_{10}-C_{50} a été déterminée sur un échantillon représentatif du sol asséché à l'air ambiant et ayant servi au remplissage des trois colonnes à l'étude. Par conséquent, cette valeur a été considérée égale dans toutes les trois colonnes.

Selon la méthodologie décrite, les trois colonnes remplies de sol furent mises en présence de deux phases libres de la manière suivante: la colonne 1 en présence de diesel et les colonnes 2 et 3 en présence de l'eau. Un duplicata de l'expérience de rétention capillaire en eau fut réalisé car une de deux colonnes (i.e., colonne 2), après avoir atteint l'équilibre, allait être soumise au déplacement des phases (déplacement de l'eau par le diesel). Ainsi, la colonne 3 a servi comme témoin pour vérifier une éventuelle imbibition supplémentaire d'eau.

L'équilibre des phases fut considéré atteint dans les trois colonnes lorsque leur masse demeurait constante dans le temps (Figure 4.7) et par conséquent, les taux de variation des poids dans le temps (i.e., les vitesses de pression) s'approchaient des valeurs nulles (Figure 4.8).

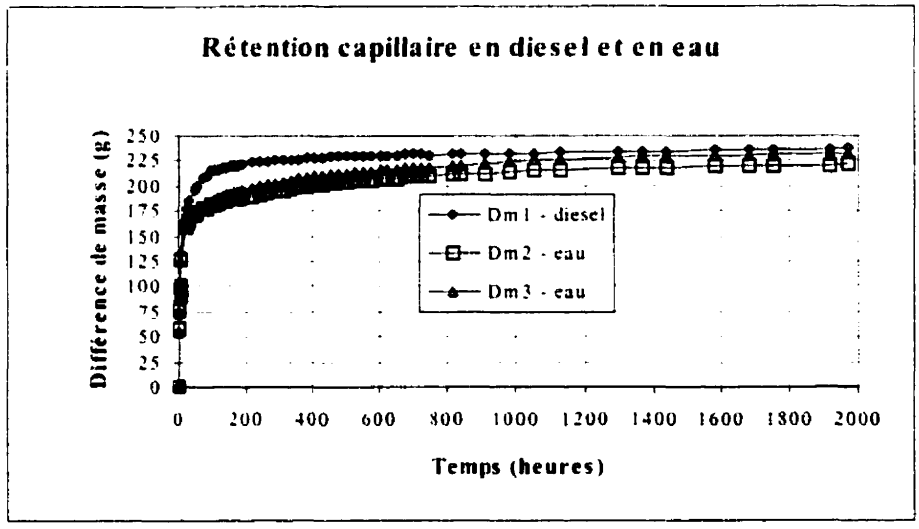


Figure 4.7 Variation du poids des colonnes dans le temps

Dm_1, Dm_2 et Dm_3 – variation de la masse des colonnes 1, 2 et 3, respectivement

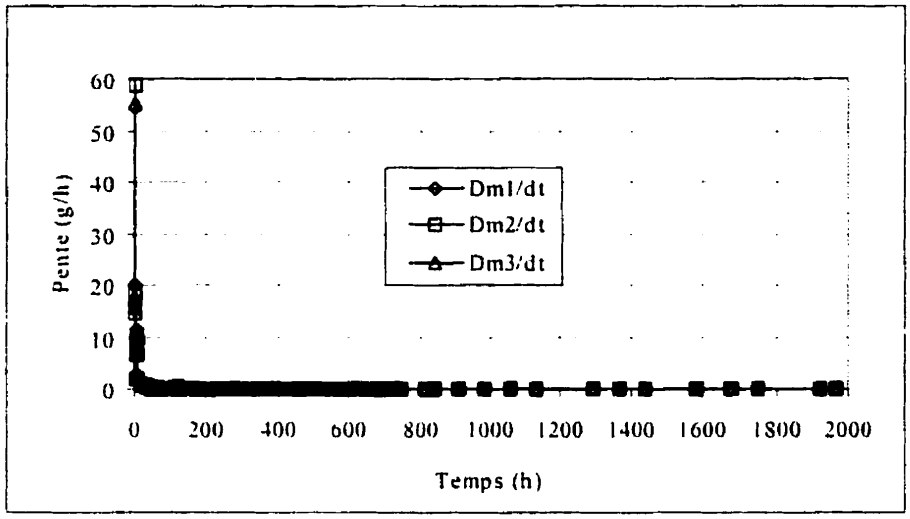


Figure 4.8. Taux de variation du poids des colonnes dans le temps

dt – variation du temps.

Bien que les trois colonnes aient atteint l'équilibre après une durée de 1968 heures, elles ont été laissées en contact avec leurs phases libres respectives et cela, tout au long de l'étude de déplacement des phases d'une durée supplémentaire de 40 jours. A la fin de cette dernière étude, les colonnes furent désassemblées et des échantillons composites ont été pris à l'intervalle régulier de 10 cm et analysés pour les teneurs massiques respectives. Tous les résultats obtenus sont représentés graphiquement ci-après. Ces résultats ont été analysés en fonction des études réalisées par Abdul, (1988) et Wilson et ses collaborateurs (1990).

4.3.1.1.1 Remontée capillaire en diesel

La réponse globale de cette expérience a permis de produire la courbe caractéristique diesel-sol. Les informations qui peuvent être tirées au premier abord sont la hauteur capillaire (i.e., imbibition) et la distribution du diesel en fonction de la hauteur de la colonne.

Le sol utilisé dans cet essai (i.e., colonne 1) a retenu une quantité de diesel égale à 220,9 g jusqu'à l'équilibre. Le profil de la teneur massique totale incluant la teneur massique

initiale du sol (i.e., 4,39 % eau et 0,52 % diesel) et la teneur massique en diesel qui s'y est rajoutée est montré à la Figure 4.9.

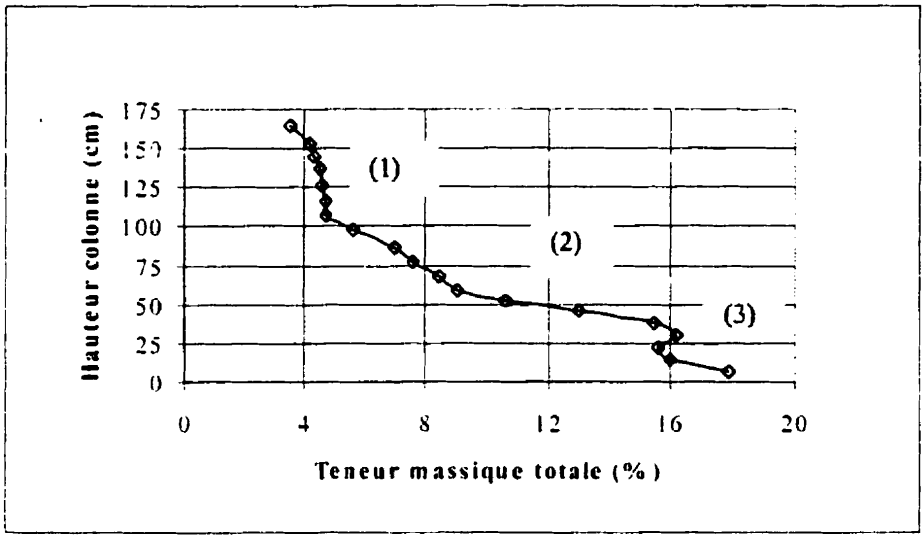


Figure 4.9 Teneur massique totale en liquides (eau et diesel)

zone (1) - teneur initiale en liquides du sol (4,39 % d'eau et 0,52 % de diesel)

zone (2) - augmentation de la teneur en diesel du sol (début de la frange capillaire de diesel jusqu'à la zone capillaire de diesel);

zone (3) - teneur maximale en diesel du sol (i.e., zone capillaire).

D'après l'examen de ce profil, trois zones peuvent être démarquées : zone 1, qui représente la teneur initiale en eau et en diesel du sol; zone 2, qui montre une augmentation de la teneur massique en diesel et elle constitue la frange capillaire de diesel; zone 3, nommée la zone capillaire de diesel qui se caractérise par une teneur maximale en diesel, soit environ 18 %. La hauteur capillaire (i.e., frange capillaire plus zone capillaire) est estimée à 100 cm. La réponse de l'analyse des hydrocarbures C_{10}-C_{50} fractionnée à la fin de l'essai de rétention capillaire en diesel montre implicitement la même distribution (Figure 4.10).

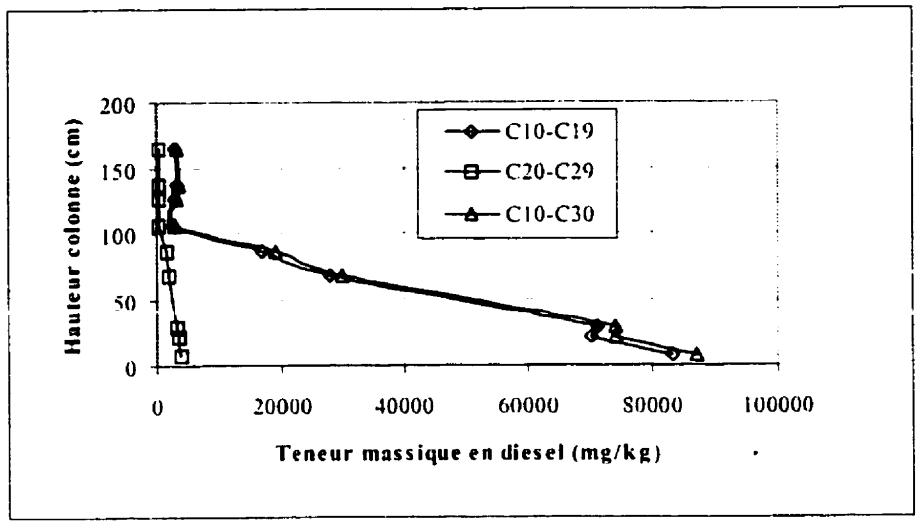


Figure 4.10 Teneur en hydrocarbures fractionnés (rétention en diesel)

Enfin, les degrés de saturation suivent logiquement les profils de teneurs massiques en fluides. Comme l'indique la Figure 4.11, 45,2 % du volume des pores a été occupé par le diesel, tandis que 35,9 % des pores sont restés remplis d'air. Cela peut s'expliquer d'une part, par la présence de pores de petit diamètre ce qu'y rend l'envahissement du diesel difficile et d'autre part, par le manque d'affinité du diesel pour la matrice solide, traduite par sa mouillabilité intermédiaire.

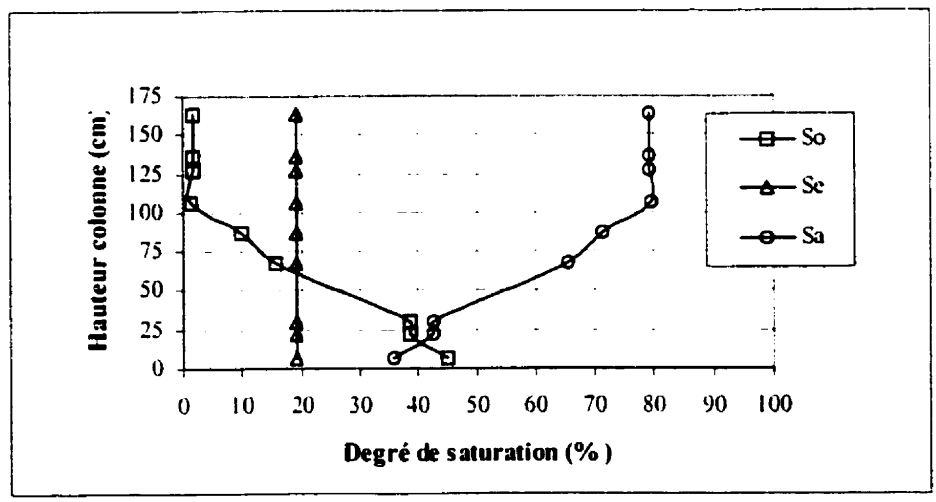


Figure 4.11 Profil des degrés de saturation (essai de rétention en diesel)

S_o – degré de saturation en liquide organique (diesel); S_e – degré de saturation en eau; S_a – degré de saturation en air

4.3.1.1.2 Remontée capillaire de l'eau

La réponse de cette expérience est traduite par la courbe caractéristique eau-sol. Les deux colonnes utilisées ont montré le même comportement jusqu'à l'équilibre. Ainsi, une quantité d'eau semblable, fut imbibée (i.e., 237,3 g – colonne 2 et 229,4 g - colonne 3), mais cette différence est associée à la différence de porosité résultée lors de la mise en place du sol. Compte tenu du fait que la colonne 2 a été soumise à l'étude de déplacement des phases seule la colonne 3 a servi à montrer le processus d'imbibition de l'eau. La Figure 4.12, montre la courbe caractéristique eau-sol obtenue. Celle-ci est assez semblable à la courbe caractéristique diesel-sol. Cependant, la distribution de l'eau est plus régulière sur la hauteur capillaire (i.e., frange capillaire plus zone capillaire). Pour ce type de sol et dans les conditions spécifiques précisées, l'eau est maintenue dans les pores sur une hauteur capillaire d'environ 75 cm représentant, dont la zone capillaire s'étend sur une hauteur variant de 10 à 25 cm. La teneur massique maximale en eau est d'environ 22 %.

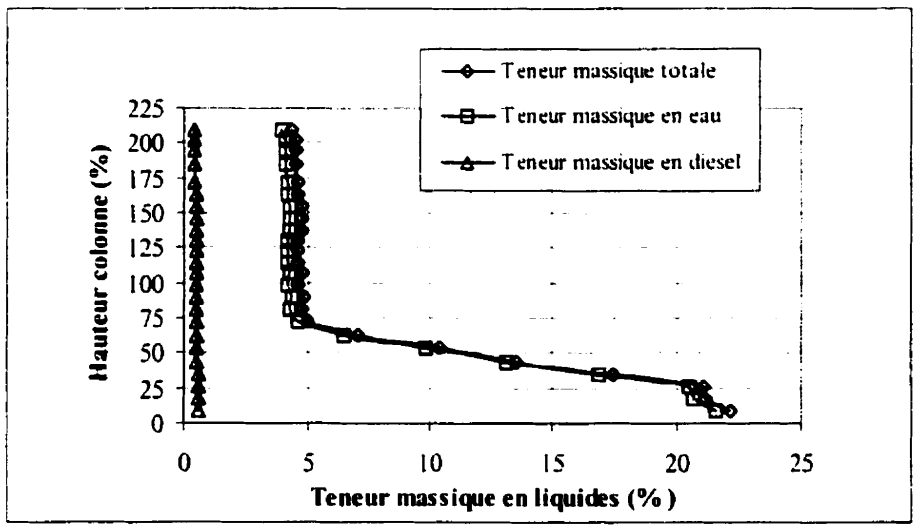


Figure 4.12 Profil des teneurs massiques (rétention en eau)

La variation des degrés de saturations correspondants est montrée dans la Figure 4.13.

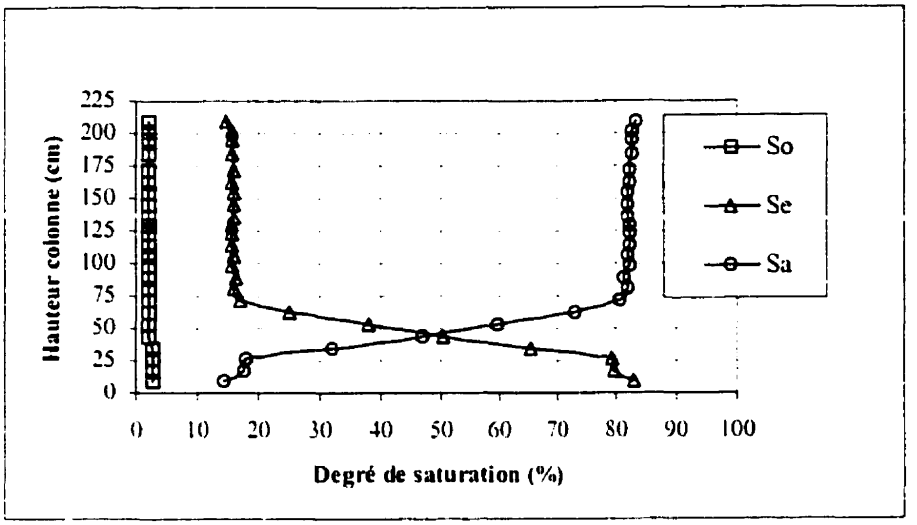


Figure 4.13 Profil des degrés de saturation (rétention en eau)

4.3.1.2 Déplacement des phases

Durant cette étude, il a été possible de représenter les conditions d'un déversement de diesel dans un milieu poreux non-saturé (i.e., colonne 2) à saturation résiduelle en eau.

L'injection du diesel fut faite à un débit moyen de 0,45 cm^3/min durant les premières 24 h et ensuite, de 0,20 cm^3/min jusqu'à la fin de l'essai, totalisant ainsi un volume de diesel équivalant à trois volumes de pores, soit 4 L. Compte tenu des interruptions d'alimentation, il n'a pas été possible de calculer rigoureusement une vitesse d'écoulement et ainsi une conductivité hydraulique associée. Toutefois, les volumes d'eau déplacée et de diesel à la sortie ont été mesurés. L'équilibre fut considéré atteint après 40 jours lorsque les volumes de diesel injecté et récupéré furent égaux et que le poids de la colonne demeura constante, et cela durant une période d'environ 15 jours. Les analyses chimiques effectuées après le désassemblage de la colonne ont fourni des résultats pouvant être corrélés au bilan de masse globale, dont les composantes se trouvent au Tableau 4.8.

Tableau 4.8 : Bilan de masse des liquides dans la colonne 3

Composante	Valeur (g)
Masse totale d'eau	484,6
Masse initiale d'eau	261,5
Masse d'eau retenue par remontée capillaire	223,1
Masse d'eau déplacée par le diesel lors du déplacement	156
Masse d'eau restant dans la colonne après le déplacement	328,6
Masse de diesel restant dans la colonne après le déversement	387,1
Masse initiale de diesel	30,1

La Figure 4.14, montre la répartition de l'eau et du diesel en fonction dans la colonne. Comme l'indique la courbe de teneur massique en diesel, le diesel migre verticalement tout en suivant la courbe caractéristique eau-sol jusqu'à ce qu'il atteigne la surface de la zone capillaire d'eau en laissant derrière un volume emprisonné correspondant à sa phase résiduelle. Au début, le diesel est sous tension comme l'eau l'est également, mais au fur et à mesure que le volume déversé s'accroît, il atteint la frange capillaire en eau et déplace une partie qui avance sous forme d'un front humide devant lui. Une certaine accumulation est notée et cela constitue la phase flottante, où le diesel se trouve sous une pression positive. Cette accumulation engendre une diminution de l'épaisseur de la zone capillaire jusqu'à ce qu'elle disparaisse et il arrive à la surface de l'eau.

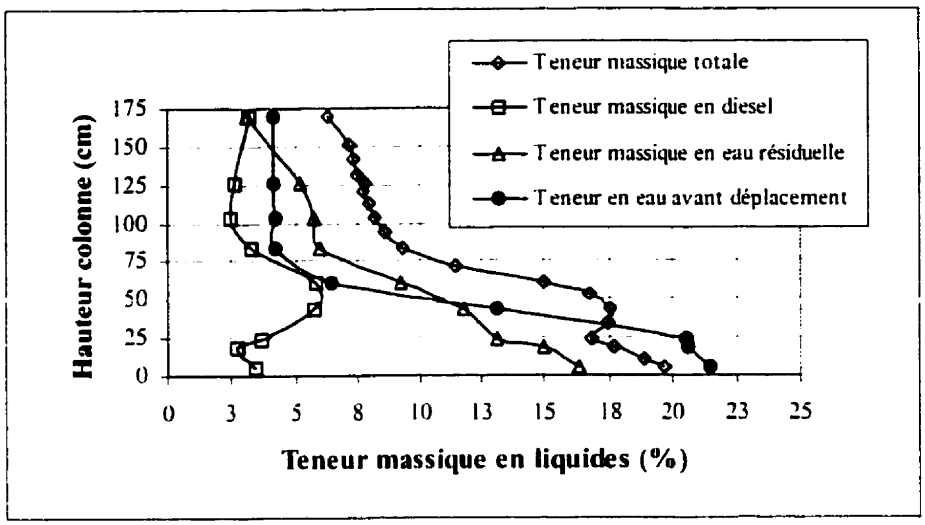


Figure 4.14 Profil de la teneur massiques (essai de déplacement)

La Figure 4.15, montre la distribution des fractions massiques de diesel en fonction de la hauteur. On peut observer le profil d'accumulation du diesel dans la frange capillaire en eau ainsi que la diminution de la teneur en eau dans cette zone. La Figure 4.16, illustre les degrés de saturation qui en découlent.

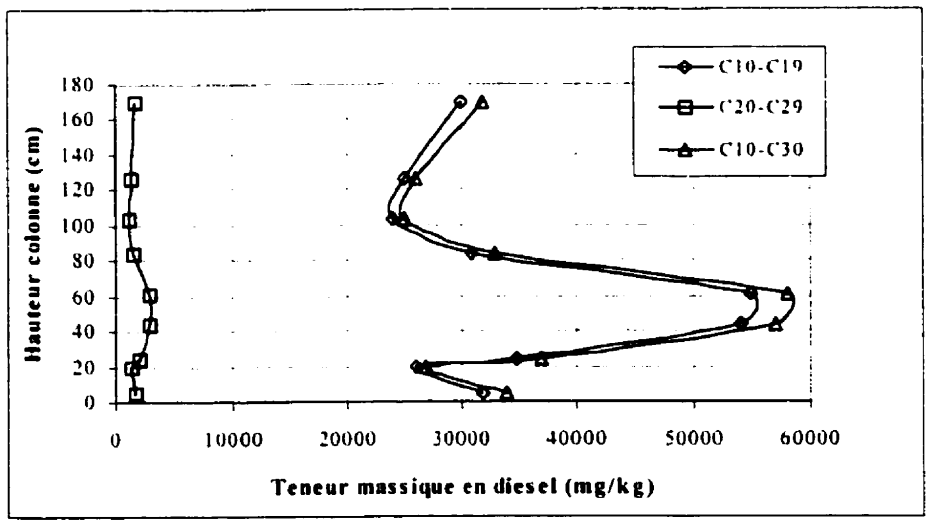


Figure 4.15 Profil des teneurs massiques en diesel (essai de déplacement)

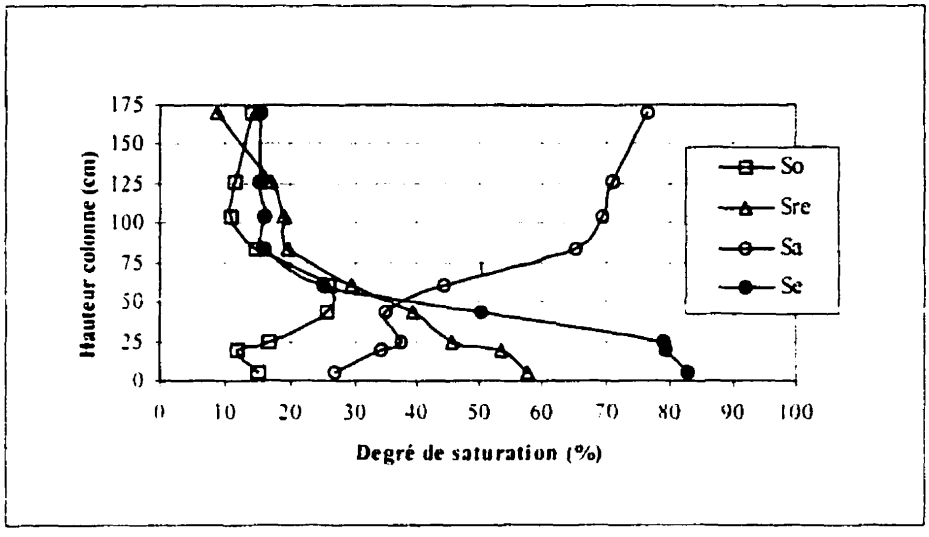


Figure 4.16 Profil des degrés de saturation (essai de déplacement)

Se - degré de saturation en eau avant son déplacement par le diesel; S_{re} - degré de saturation en eau résiduelle (l'eau demeurée après le déplacement par le diesel).

Les hauteurs approximatives d'ascension capillaire en diesel et en eau obtenues font partie de la gamme typique à ce type de sol (Fetter, 1993). Quant à eux, les degrés de saturation des trois phases sont variables dans la zone vadose et leurs valeurs relatives corroborent à des valeurs de la littérature. Ainsi, la valeur du degré de saturation en LNAPL dans un système tri-phasique varie généralement de 10 à 20 % dans le cas d'un milieu poreux mouillant à l'eau, (Mercer et Cohen, 1990, Wilson et al., 1990, Steffy et al., 1997).

4.3.2 Rétention capillaire à haute pression

Il est essentiel de rappeler l'importance des courbes caractéristiques dans l'étude de l'écoulement tri-phasique dans un milieu poreux non-saturé. Deux caractéristiques clé peuvent être tirées, soit la pression d'entrée d'air et la saturation résiduelle. Il faut noter que l'interprétation de ces courbes caractéristiques du sol fut faite en s'inspirant principalement des études entreprises par Fredlund et Xing (1994) et Springer et ses collaborateurs (1997).

Trois séries de courbes caractéristiques ont été déterminées en duplicata et ce, en mode de désorption (i.e., drainage). Une première série a consisté à vérifier le sol asséché à l'air ambiant ayant servi tant à la détermination de la conductivité hydraulique qu'aux essais de remontée capillaire en eau et en diesel a basse pression (5,7 % d'humidité initiale). La Figure 4.17, montre la courbe de caractéristique eau-sol obtenue dans le cas du sol ayant eu une teneur initiale en humidité de 5,7 %.

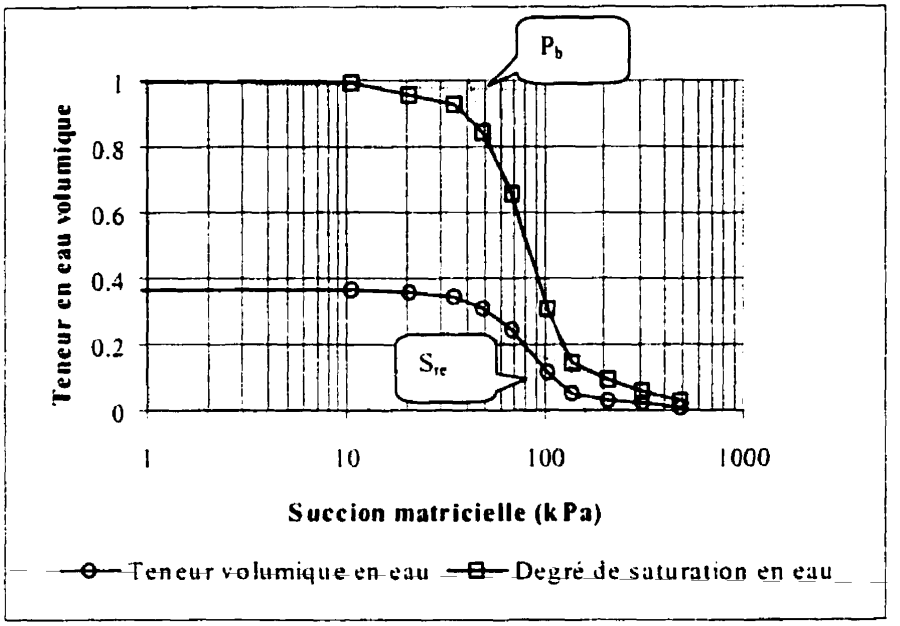


Figure 4.17 Courbe caractéristique eau-sol (haute pression)

Teneur initiale en liquides 5,7 %; γs = 1,721 g/cm^3

D'après l'interprétation de Fredlund et Xing, (1994), la pression d'entrée d'air (P_b) nécessaire à déplacer l'eau des pores est égale à 4,5 m H_2O, tandis que la valeur de la teneur volumique en eau correspondant à cette pression est estimée à 30 %. La teneur résiduelle en eau (S_{re}) est de 18 % (Figure 4.17). Ces valeurs corroborent avec les valeurs de la littérature (Fredlund et Xing, 1994, Mercer et Cohen, 1990). Comme ce fut le cas des courbes caractéristiques à basse pression, elle peuvent être divisées en trois

zones. Une première zone, qui s'étend entre le sol étant sec et la saturation résiduelle en eau où théoriquement, la perméabilité à l'air du milieu doit atteindre sa valeur maximale. La deuxième zone est comprise entre la saturation résiduelle en eau et la pression d'entrée d'air, tandis que la troisième zone s'étend entre la pression d'entrée d'air et la saturation complète en eau. Dans cette zone, l'excès d'eau fait qu'il n'y ait pas des pores interconnectés remplis d'air pouvant créer un écoulement continu d'air (i.e., perméabilité à l'air inexistante).

Les deux autres essais furent réalisés sur le sol à l'étude. Ainsi, un essai fut effectué sur le sol à partir uniquement de sa saturation initiale en liquides, soit 22 % car il était proche du degré de saturation maximal, soit 0,94 (94 %). L'allure de la courbe de désaturation obtenue est montrée à la Figure 4.18.

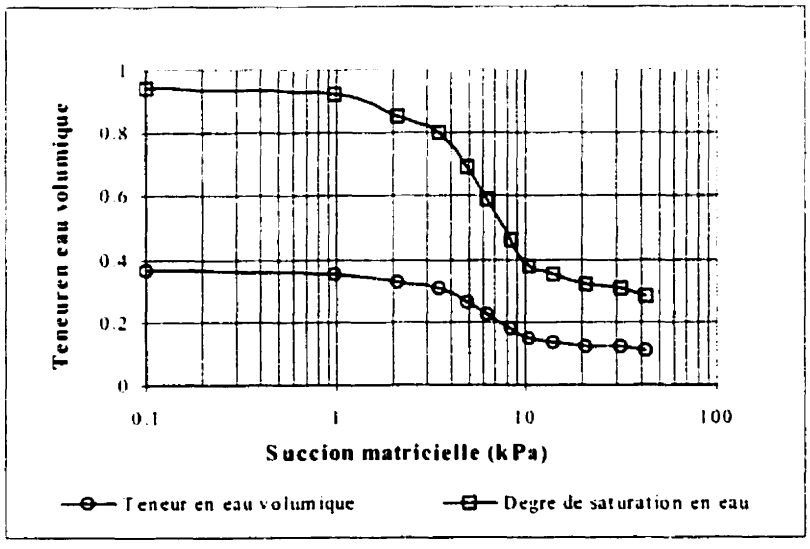


Figure 4.18 Courbe caractéristique eau-sol (désaturation du sol initial)

Teneur initiale en liquides 22 %; $\gamma s = 1{,}682$ g/cm^3

La valeur de la pression d'entrée d'air est estimée à 2,8 m H_2O, tandis que la valeur de la teneur volumique en eau correspondant à cette pression est de 35 %. On observe que le sol à l'étude possède un degré de saturation en eau proche de la saturation, soit 95 %. La

teneur volumique en eau correspondant à ce degré de saturation est de 0,37. Cette valeur corrobore avec la valeur maximale obtenue pour un sol de ce type. Ainsi, Zacharias et Bohne (1997), lors d'une étude des courbes caractéristiques eau-sol des plusieurs types de sol, notent une teneur volumique maximale en eau de 0,3796 pour un sol s'approchant du type du sol à l'étude, contenant de 5 à 8 % argile et de 10 à 25 % silt). Le degré de saturation résiduelle en eau (S_{re}) est de 29 %, et il peut être obtenu en appliquant au sol une succion matricielle égale à 40 m H_2O.

La valeur de la capacité de rétention au champ i.e., teneur volumique en eau correspondant à une succion matricielle de 0,3 atm, selon Dupont (1993) est estimée sur la courbe caractéristique eau-sol ci-dessus représentée, à 0,30 (i.e., 17,83 % en termes de teneur massique en eau).

A partir de la valeur de la capacité de rétention au champ, il a été possible d'estimer le taux d'humidité optimal nécessaire au maintien d'un taux optimal de biodégradation du contaminant. Dupont et ses collaborateurs (1991), lors d'un traitement par bioventilation, propose un taux d'humidité optimal allant de 35 à 50 % de la capacité de rétention au champ, soit entre 6,24 et 8,92 %. D'après Cookson (1995), cela se trouve entre 50 et 80 % de la capacité de rétention au champ, soit entre 8,82 et 14,26 %.

Le troisième essai de rétention capillaire à haute pression a consisté à déterminer la courbe caractéristique diesel-sol (saturation/désaturation de diesel) du sol à l'étude (22 % d'humidité). Le sol testé fut le sol saturé en diesel ayant servi à la détermination de la conductivité hydraulique au diesel. La courbe obtenue est montrée à la Figure 4.19.

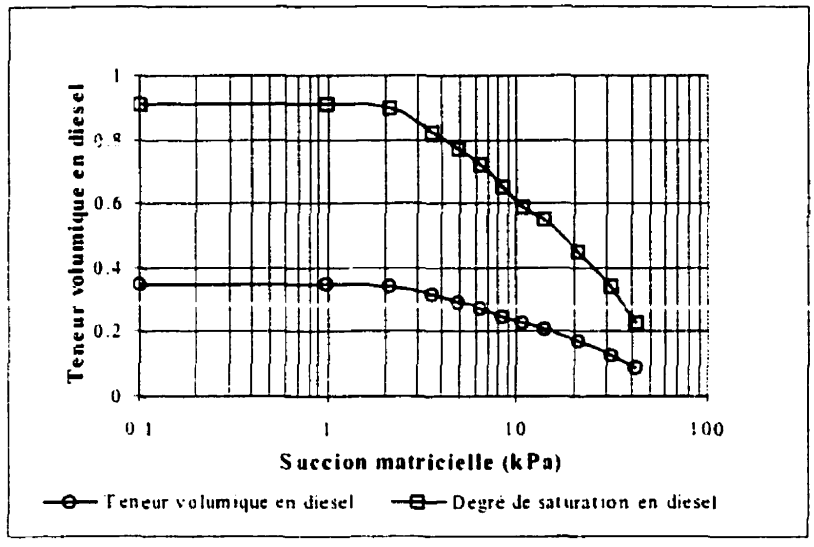


Figure 4.19 Courbe caractéristique diesel-sol (haute pression)

Teneur initiale en liquides 22 %; γs = 1.631 g/cm^3

L'allure de la courbe diffère des autres, antérieurement représentées, et cela pourrait être due à la présence des trois phases. La pression d'entrée d'air est estimée à 2 m H_2O, tandis que la teneur volumique correspondant à cette pression est de 34 %. C'est la valeur de la pression négative qui sera appliquée lors des essais de biodégradation en colonnes en mode de bioaspiration du présent projet. Le degré de saturation résiduelle en diesel est estimée à 23 %, et il est peut être obtenu en appliquant au sol une succion matricielle égale à 40 m H_2O.

Compte tenu de la longue durée de ces essais (24 jours) et du nombre limité de cellules de rétention Tempe, il n'a pas été possible de réaliser plusieurs essais permettant ainsi de tirer d'autres conclusions.

4.4 Étude de la biodégradation du diesel en colonnes

L'efficacité des techniques de biorestauration *in situ* de la bioaspiration et de la bioventilation à biodégrader le diesel a été étudiée et comparée en effectuant des essais en colonnes. Les paramètres suivis et jugés comme étant des plus importants ont été d'une

part, les paramètres d'opération (pression et débit d'air injecté dans les quatre colonnes) et d'autre part, les paramètres physico-chimiques (taux d'humidité, perméabilité à l'air et concentration en contaminant) et microbiologiques (densité et activité de la population microbienne, taux d'utilisation d'oxygène et de production de dioxyde de carbone). La corrélation des ces paramètres a permis l'estimation du taux de biodégradation du diesel durant la période d'opération des deux types de traitements.

4.4.1 Caractérisation des colonnes

Lors de la mise du sol dans les colonnes, plusieurs caractéristiques géométriques et géotechniques nécessaires au suivi expérimental ont été déterminées et leurs valeurs respectives sont présentées dans le Tableau 4.9.

Tableau 4.9 : Caractérisation des colonnes pour les essais de biodégradation

Caractéristique	Ba1	Ba2	Bac	Bv
Diamètre intérieur (cm)	10,15	10,16	10,15	10,15
Hauteur du sol (cm)	20,32	20,25	20,11	19,57
Masse de sol humide (g)	2990,9	2971,6	2906,8	2975,1
Masses volumiques (g/cm^3)				
Sol humide	1,818	1,811	1,785	1,878
Sol sec	1,542	1,546	1,555	1,59
Porosité (%)	44	43	44	42

Ba1 et Ba2 – colonnes traitées en mode de bioaspiration; Bac – colonne abiotique traitée en mode de bioaspiaration; Bv – colonne traitée en mode de bioventilation.

Il est important de noter que la variabilité des données entre les colonnes est assez faible. Mentionnons qu'une hétérogénéité minimale est désirable puisque des telles hétérogénéités dans la structure du sol et un moindre changement peuvent avoir une influence dramatique sur le comportement des fluides d'un milieu poreux (Wilson et al., 1990).

4.4.2 Saturation en diesel

Les colonnes de sol ont été saturées en diesel à l'aide des deux essais. Tout au long des ces essais, la variation de la conductivité hydraulique du diesel en fonction du volume de diesel injecté (exprimé en termes de volume de pores) à été suivie et les résultats obtenus sont représentés graphiquement à la Figure 4.20.

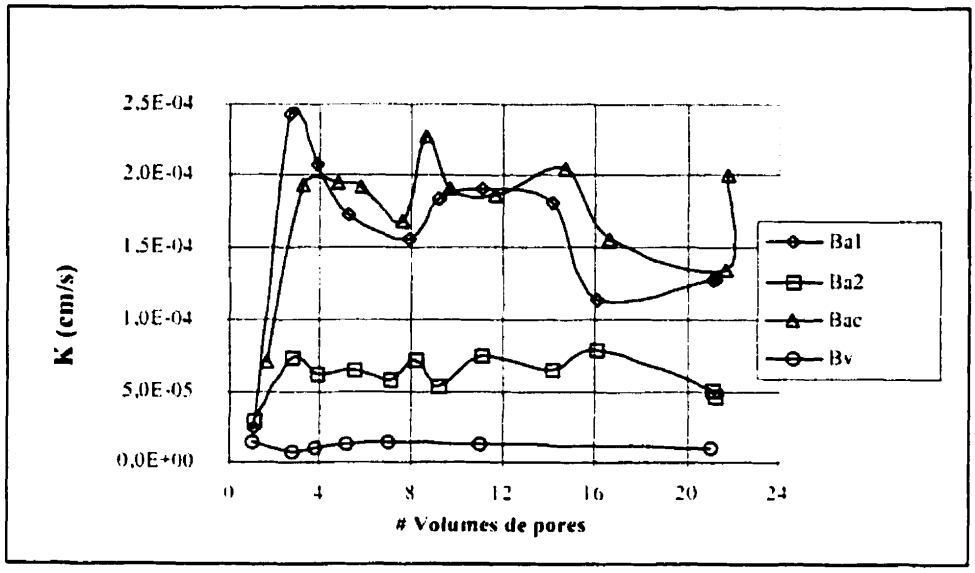


Figure 4.20 Conductivité hydraulique au diesel vs volume de pores circulé

Comme l'indique le graphique, la conductivité hydraulique au diesel a très peu varié tout au long des essais de saturation. Une bonne corrélation est remarquée quant à la valeur de la conductivité hydraulique initiale des colonnes Ba1, Ba2 et Bv qui est quasiment égale tandis que la colonne Bac (i.e., abiotique) montre une conductivité hydraulique légèrement supérieure, ce qui pourrait paraître logique compte tenu du fait qu'elle est dépourvue des films bactériens. Le Tableau 4.10, présente les valeurs de la conductivité hydraulique initiales et les valeurs moyennes enregistrées durant la période de saturation ainsi que les écart-types enregistrés. Les valeurs sont normalisées à 20°C ($K_{diesel\ 20}$ =

$R_T K_{diesel}$, avec R_T égal à 0,910, facteur de correction pour T = 24°C, température de l'essai).

Tableau 4.10: Conductivité hydraulique initiale et moyenne au diesel mesurée

Caractéristique	Ba1	Ba2	Bac	Bv
K_{diesel} initiale (cm/s)	$2,71 \times 10^{-5}$	$5,05 \times 10^{-5}$	$1,22 \times 10^{-4}$	$2,55 \times 10^{-5}$
K_{diesel} moyenne (cm/s)	$1,06 \times 10^{-4}$	$5,14 \times 10^{-5}$	$1,32 \times 10^{-4}$	$1,14 \times 10^{-5}$
Ecartype	$7,12 \times 10^{-5}$	$2,46 \times 10^{-5}$	$6,16 \times 10^{-5}$	$6,89 \times 10^{-6}$

4.4.3 Suivi des colonnes

La réalisation d'un essai préliminaire a permis d'une part, la validation du dispositif expérimental et d'autre part, l'établissement des paramètres d'opération, soit la pression et le débit d'air.

Afin d'estimer la biodégradation du sol contaminé au diesel à saturation, une série de paramètres physico-chimiques (i.e., taux d'humidité, concentration en contaminant, pH, teneur en nutriments et taux de volatilisation) et microbiologiques (i.e., densité et activité des micro-organismes et taux de biodégradation) ont été mesurés ou calculés.

Au total, quatre colonnes ont été opérées. Trois colonnes ont été traitées en mode de bioaspiration (i.e., un duplicata, Ba1 et Ba2 et un témoin abiotique, Bac) et une colonne en mode de bioventilation, Bv. La durée des deux traitements fut de 50 jours. Tout au long de cette période, sept échantillonnages de sol ont été réalisés et l'évolution des tous les paramètres mesurés ou calculés est donnée sous forme de graphiques.

4.4.3.1 Paramètres d'opération des deux traitements

Les paramètres d'opération furent la pression et le débit d'air, et ils ont été gardés constants durant toute la période d'opération des deux traitements. Une pression négative égale à 2 m H_2O a été appliquée aux trois colonnes traitées en mode de bioaspiration. Ce

fut la valeur de la pression d'entrée d'air déterminée lors des essais de rétention capillaire à haute pression (i.e., courbe caractéristiques de saturation diesel-sol; section 4.3.2). Une pression égale à la pression atmosphérique a été appliquée à la quatrième colonne traitée en mode de bioventilation. Quant au débit d'aération, celui-ci fut de 2 ml/min, ce qui correspond à 4 volumes de pores/jour. Cette valeur fait partie de la gamme de débits d'air appliqués lors des traitements en mode de bioventilation à pleine échelle, soit entre 0,11 et 6,5 volumes de pores par jour (Dupont et al., 1991).

4.4.3.2 Paramètres physico-chimiques

4.4.3.2.1 Teneur en eau

Lors de l'essai de saturation des colonnes en diesel (t_1), un certain pourcentage d'eau des pores du sol a été déplacé par le diesel. A la fin de cet essai, ce pourcentage ne variait pas d'une manière significative d'une colonne à l'autre (i.e., Ba1-0,7 %, Ba2-0,78 %, Bac-0,81 % et Bv-0,72 %). Normalement, ces pourcentages doivent être le résultat de la différence des pourcentages entre les temps d'échantillonnage t_i et t_1 respectivement (Tableau 4.11), mais les valeurs présentées sont des valeurs estimées lors des analyses des hydrocarbures C_{10}-C_{30} (i.e., par séchage au four à 105°C). L'hétérogénéité du sol et l'interférence de la contamination dans l'évaluation de ces taux d'humidité pourrait expliquer la différence observée.

Tableau 4.11 : Taux d'humidité du sol des colonnes d'étude de la biodégradation

Humidité (%)	t_i	t_1	t_2	T_3	t_4	t_5	t_f
Ba1	17,9	16,5	14	15	14,4	14,1	13,5
Ba2	17,9	15,6	12	14	14,6	13,6	13,2
Bac	18,2	14,7	16	15	13,6	12,8	12,6
Bv	18,7	16,6	12	13	12,4	12,8	13,2

t_i - caractérisation initiale; t_1 - après le premier essai de saturation en diesel; t_2 - après 11 jours de traitement; t_3 - après le deuxième essai de saturation en diesel; t_4 - après 14 jours de traitement; t_5 - après 41 jours de traitement; t_f - fin des deux traitements.

Comme l'indique le Tableau 4.11, le taux d'humidité a légèrement varié. A la fin des deux traitements, il faut remarquer que les valeurs du taux d'humidité se retrouvent dans la plage des valeurs d'humidité requises pour un processus de biodégradation, soit 8,8 et 14,3 % d'eau (section 4.3.2). L'analyse des échantillons prélevés sur toute la hauteur à la fin des traitements a montré que le taux d'humidité était uniforme sur toute la hauteur de chacune des colonnes.

4.4.3.2.2 Perméabilité à l'air

La mesure de la perméabilité à l'air fournit des informations importantes quant à la réussite d'un traitement par voie biologique. Premièrement, sa diminution pourrait signifier un colmatage (i.e., biomasse, fraction fine sédimentée, précipitation des métaux) ou un tassement. Cela entraîne une diminution de l'efficacité de la circulation des nutriments et de la diffusion d'oxygène. Deuxièmement, son augmentation pourrait porter l'attention sur l'apparition des chemins préférentiels et sur la dessiccation du milieu. Comme l'indique le graphique de la Figure 4.21, la perméabilité à l'air dans les trois colonnes traitées en mode de bioaspiration a varié en moyenne de deux ordres de grandeur.

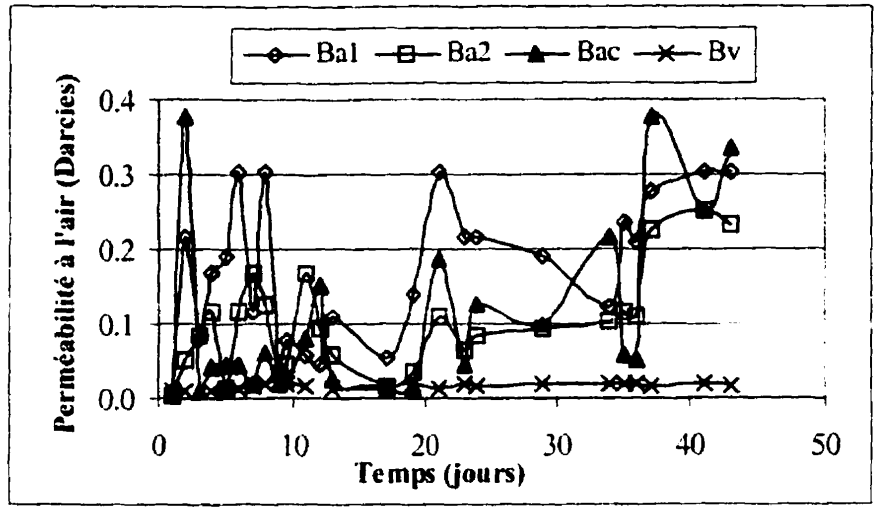


Figure 4.21 Variation de la perméabilité à l'air du sol

Les grandes fluctuations de perméabilité observées sont dues à la mesure instantanée des pertes de charges dans les colonnes entrant dans le calcul. Cela est remarqué uniquement dans le cas des colonnes fonctionnant en mode de bioaspiration où le débit d'air fut régularisé à l'aide d'une pompe péristaltique. Quant à la colonne fonctionnant en mode de bioventilation, la perméabilité à l'air est plus faible, ce qui est logique compte tenu de sa faible porosité à l'air. Lorsque la perméabilité à l'air descend plus bas que 0,1 Darcy, le courant d'air traverse principalement des chemins préférentiels (Hinchee, 1995).

Ces valeurs témoignent de la grandeur typique de la perméabilité à l'air d'un sol de type sable silteux, soit entre 0,1 et 1 Darcy (Hinchee, 1995).

Comme la colonne Bac n'est pas demeurée abiotique, il n'a pas été possible de vérifier l'impact du traitement en mode de bioaspiration sur les propriétés physico-chimiques et hydrodynamiques du milieu à traiter.

4.4.3.2.3 Teneur en hydrocarbures

Afin de vérifier le devenir du contaminant, des échantillons de sol ont été prélevés des colonnes à la même profondeur, soit entre 5 et 10 cm à la partie supérieure (i.e., entrée de

l'air) à des différents temps. Au temps d'échantillonnage final, l'analyse des échantillons composite à des hauteurs différentes a montré que les concentrations en hydrocarbures augmentaient légèrement avec la profondeur (Tableau 4.12).

Tableau 4.12 : Contamination en C_{10}-C_{30} vs profondeur des colonnes

Profondeur (cm)	Ba1 (mg/kg)	Ba2 (mg/kg)	Bac (mg/kg)	Bv (mg/kg)
0 – 5	19 000	20 000	19 000	40 000
5 – 10	20 000	17 000	17 000	44 000
10 – 15	19 000	17 000	22 000	47 000
15 – 20	22 000	25 000	30 000	52 000

Il n'a pas été possible d'effectuer un bilan de masse précis sur le contaminant par gravimétrie à cause des changements de poids des composantes des colonnes (i.e., pierre poreuse, joints d'étanchéité, colle, connexion, etc.). Cependant, si ces interférences étaient considérées comme égales pour toutes les colonnes, la quantité de diesel expulsée des colonnes fonctionnant en mode de bioaspiration a été supérieure à celle de la colonne traitée en mode de bioventilation (Tableau 4.13).

Tableau 4.13 : Masse de diesel récupéré

Colonne	Masse de diesel (mg/kg)
Ba1	61 400
Ba2	71 800
Bac	47 500
Bv	20 900

L'évolution de la concentration en hydrocarbures pétroliers à des différents périodes lors de l'opération des deux traitements est donnée à la Figure 4.22.

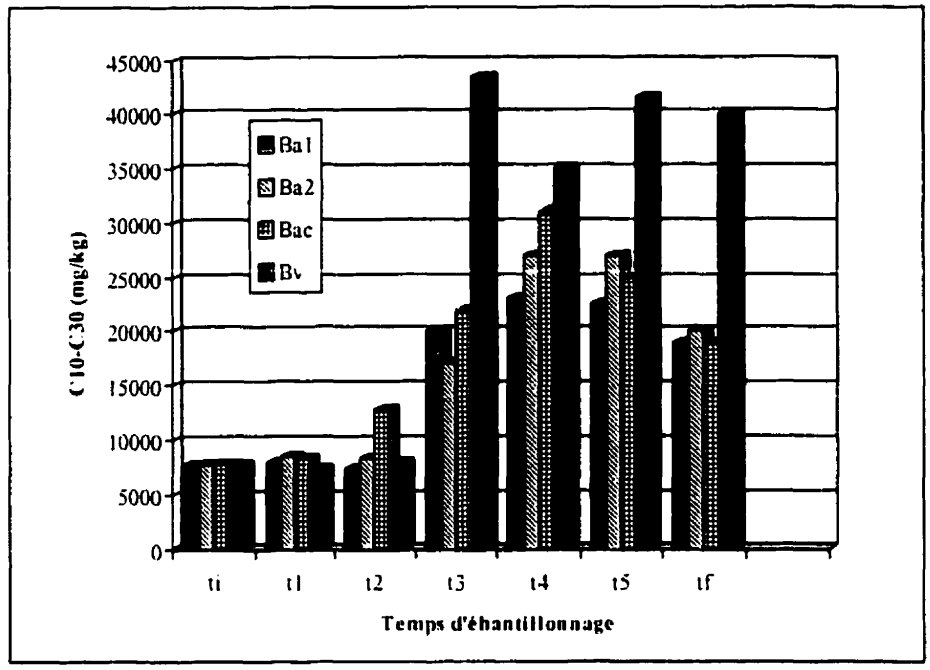


Figure 4.22 Évolution de la contamination dans le sol durant les deux traitements

Un des résultats inattendus de cette étude fut la grande variabilité des résultats de l'analyse de la concentration en contaminant du sol. Une telle variabilité a été également notée par Vanderby, (1998) lors d'une étude d'optimisation de la technique de bioventilation. Mentionnons qu'à partir du deuxième essai de saturation (t_3), pour des raisons de logistique il fut décidé de faire les analyses à l'interne (i.e., Laboratoire de chimie analytique de l'IRB). A notre grande surprise, nous avons observé une différence notable dans les niveaux de concentration pour toutes les colonnes au même point de prélèvement de sol (Tableau 4.14) bien qu'apparemment, les mêmes méthodes analytiques furent utilisées. Cela pourrait expliquer en partie le bas niveau de concentration mesuré après le premier essai de saturation (t_1). Des aspects tenant de l'hétérogénéité du sol en place et du volume élémentaire représentatif requis pour que les analyses soient considérées plus fiables ne sont pas écartés. Une telle variabilité a été notée également par Vanderby, (1998) lors d'une étude de la technique de bioventilation.

Tableau 4.14 : Variabilité des analyses des hydrocarbures C_{10}-C_{30} au même point de prélèvement

Colonne	Laboratoire externe	Laboratoire de l'IRB
Sol initial	7800	8800
Ba1	12 000	20 000
Ba2	14 000	17 000
Bac	10 000	22 000
Bv	16 000	16 000

Les fractions volatilisées de la contamination du sol ont été évaluées en faisant circuler l'effluent gazeux des colonnes à travers des tubes contenant du charbon de noix de coco. Les hydrocarbures retenus étaient désorbés et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme.

Les résultats d'analyse révèlent l'identification de fractions volatilisées qui s'apparentent tantôt à un mélange de diesel et essence tantôt à l'essence. Les concentrations des hydrocarbures pétroliers perdus par volatilisation durant les 50 jours de traitement sont données dans le Tableau 4.15.

Tableau 4.15 : Concentration des COV (durant 50 jours)

Colonne	COV (mg/kg de sol sec)
Ba1	1700
Ba2	1600
Bac	1400
Bv	1500

Compte tenu des interférences avec les fractions volatiles des composés de l'essence, présentes elles aussi dans le sol (600 mg/kg de sol sec), il n'a pas été possible de calculé un taux de volatilisation propre au diesel.

4.4.3.2.4 pH

L'analyse du pH est importante car ce paramètre permet d'évaluer s'il y a déséquilibre nutritionnel. L'opération à long terme d'un système de traitement des sols dépend essentiellement du maintient d'un pH optimum par le contrôle du pouvoir tampon du sol. Pour toutes les colonnes le pH initial du sol fut de 7,47, valeur qui se trouve dans la plage estimée optimale (Cookson, 1995). A la fin des deux traitements, des échantillons de sol composite prélevés sur la hauteur des colonnes (i.e., 0-5 cm, 5-10 cm, 10-15 cm et 15-20 cm) ont démontré que la valeur de pH a augmenté, atteignant une valeur moyenne de 9,3 pour les colonnes Ba1, Ba2 et Bv et une valeur moyenne de 8,9 pour la colonne Bac.

L'augmentation du pH peut s'expliquer d'une part, par l'élimination des déchets métaboliques basiques lors des étapes intermédiaires de biodégradation et d'autre part, par la production d'ammoniaque (Prescott et al., 1993). L'enlèvement du dioxyde de carbone de la solution du sol par le processus d'aération pourrait également expliquer cette augmentation de pH (Sawyer, et al., 1994).

4.4.3.2.5 Nutriments

Comme il a déjà été mentionné lors de la caractérisation initiale du sol, la teneur en macro-nutriments a été évaluée en terme de C/N/P comme étant égale à 100/1/16 mg/kg de sol sec. Rappelons que les teneurs en nitrates et nitrites étaient en deçà de leur limite de détection respective, soit 1 mg/kg. Comme il peut être constaté, bien que déficitaire par rapport à la teneur en carbone total (rapport optimal de 100 à 300/10/1), il n'y a pas eu apport d'une autre source inorganique d'azote. Cette décision a été prise compte tenu du fait que sur le terrain les techniques actuelles ne permettent pas un apport de nutriments directement au niveau de la frange capillaire. A la fin des traitements, les teneurs en nitrates et nitrites mesurées furent en deçà de leur limite de détection respective, soit 1 mg/kg, tandis que la teneur en azote total Kjeldahl a été de 96 mg/kg pour la colonne Ba1 traitée en mode de bioaspiration, de 66 mg/kg pour la colonne Bac abiotique traitée aussi en mode de bioaspiration et de 80 mg/kg pour la colonne Bv traitée en mode de

bioventilation. Notons qu'il y a eu une conservation sinon une légère augmentation de la teneur en azote total Kjeldahl. Par exemple, dans la colonne traitée en mode de bioaspiration cette augmentation corrobore avec le taux de biodégradation noté qui fut supérieur à celui enregistré dans la colonne traitée en mode de bioventilation. Quant à la teneur en orthoposphates, à la fin des traitements elle fut en deçà de la limite de détection, soit 2 mg/kg. Bien que supérieure à la teneur optimale au début des traitements, elle a diminué ce qui dénote que le phosphore a été consommé en totalité et qu'il n'y a pas eu de régénération durant la période de traitement.

4.4.3.3 Paramètres microbiologiques

4.4.3.3.1 Comptes bactériens hétérotrophes totaux

La densité des micro-organismes hétérotrophes totaux présents dans le sol des colonnes a été évaluée par des dénombrements sur des échantillons de sol prélevés à des temps différents durant toute la période d'opération des deux traitements. L'intégralité des dénombrements bactériens se trouve à l'Annexe III, tandis que leur évolution est présentée à la Figure 4.23.

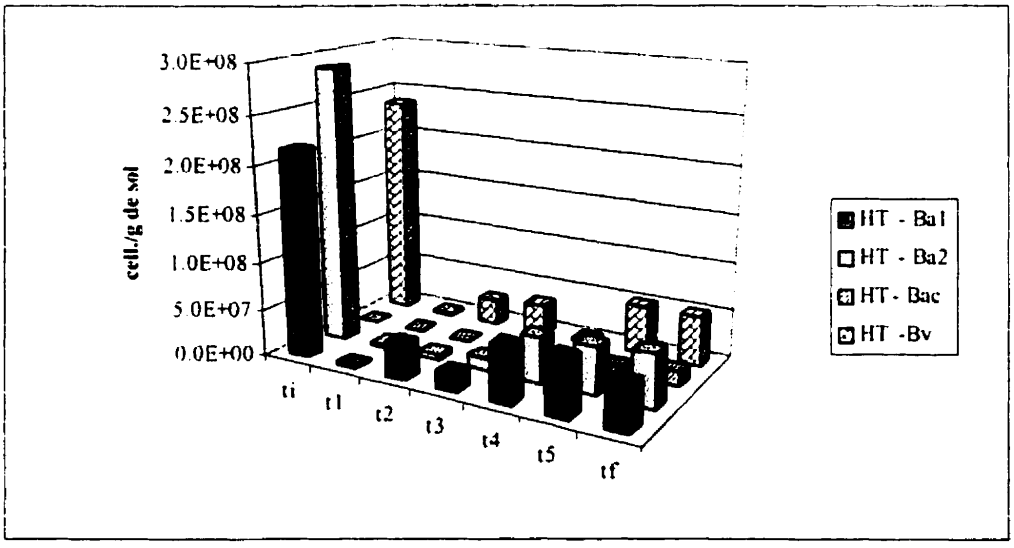


Figure 4.23 Évolution des comptes hétérotrophes totaux dans les colonnes

La caractérisation microbiologique initiale a montré la présence d'une concentration importante de micro-organismes, soit $2,47\times10^{8}$ cell./g de sol. Le milieu de croissance utilisé s'est avéré excellent pour les hétérotrophes totaux aérobies. Cependant, après le premier essai de saturation la population des micro-organismes totaux a baissé de deux ordres de grandeur et ce, dans toutes les colonnes. Bien que la concentration en contaminant n'ait presque pas changée, il semble que le passage du diesel ait entraîné un lessivage des micro-organismes dont, probablement ceux en suspension dans l'eau du sol vivant dans les portions plus grossières et perméables du milieu poreux (i.e., gorges des pores) par où le diesel est suspecté de circuler sélectivement durant sa migration (Wilson, 1990).

Après une période d'aération de 11 jours, la population bactérienne a augmenté d'un ordre de grandeur. Il est intéressant de voir que cette même population bactérienne n'a pas été affectée après le deuxième essai de saturation en dépit de l'augmentation de la concentration en contaminant. Il s'agit probablement de micro-organismes ou de bactéries majoritairement localisées dans les pores fines où le diesel prend plus de temps à les envahir. Dans des telles pores, l'eau est plus fortement retenue et plus difficile à déplacer par le diesel. La population microbienne a continué à s'accroître durant les 50 jours de traitement dans toutes les colonnes. Malgré tout, la densité initiale n'a cependant plus été atteinte. Aucune différence notable ne fut observée entre la population des colonnes Ba1, Ba2 ($4,59\times10^{7}$ et $5,45\times10^{7}$ cell./g, respectivement) fonctionnant en mode de bioaspiration et celle de la colonne Bv fonctionnant en mode de bioventilation ($5,12\times10^{7}$cell./g).

Contrairement aux attentes, après une période de traitement de 15 jours suivant le deuxième essai de saturation en diesel, une flore bactérienne s'est développée dans la colonne Bac abiotique (i.e., irradiée) traitée en mode de bioaspiration ($6,21\times10^{6}$ cell./g). Il parait peu plausible que l'irradiation n'ait été pas suffisante. La récontamination par les manipulations faites lors des échantillonnages de sol pour le suivi de la biodégradation ainsi que par l'air ambiant (durant l'aération) qui n'a pas été filtré est plus

probable. Il est important de souligner que la morphologie des colonies développées dans la colonne Bac était fort différente de celle des colonies développées dans les autres colonnes. La prolifération d'une souche résistante et active pourrait être attribuée à un environnement propice en nutriments causé par la lyse d'autres types de souches après l'irradiation et par conséquent, à un manque de compétition. Il a été également observé qu'à peu près les mêmes colonies répondaient positivement aux deux sondes génétiques utilisées. Jusqu'à la fin du traitement, la population bactérienne hétérotrophe a augmenté d'un ordre de grandeur étant plus faible que celle des autres colonnes ($1{,}51\times10^{7}$ cell./g).

4.4.3.3.2 Comptes bactériens spécifiques

Après le premier essai de saturation en diesel, les résultats des sondes biomoleculaires démontent une baisse d'environ deux ordres de grandeur pour les souches répondant positivement à la sonde génétique *ndoB* (de $1{,}2\times10^{6}$ à $2{,}67\times10^{4}$ cell./g de sol, en mode de bioaspiration et de 4×10^{5} à $5{,}33\times10^{3}$ cell./g de sol, en mode de bioventilation). Après un processus d'aération de 11 jours ces mêmes souches ont augmenté d'un ordre de grandeur (Figure 4.24).

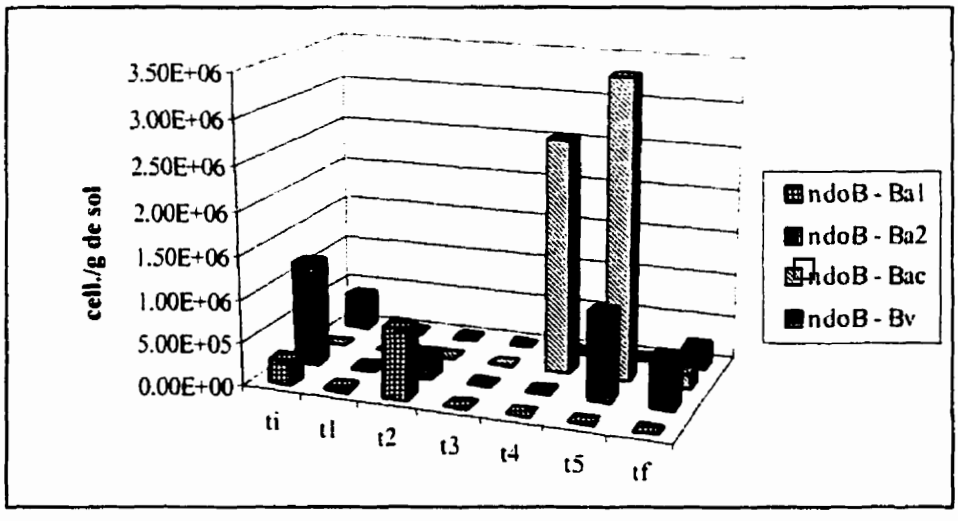


Figure 4.24 Comptes bactériens spécifiques *ndoB*

Quant à la sonde génétique *alkB*, il n'y a pas eu des réponses positives ni après le premier essai de saturation ni après 11 jours de traitement. Après le deuxième essai de saturation, il n'y a pas eu des réponses positives pour aucune des deux sondes génétiques (Figure 4.25).

Quant à la colonne Bac, le même ordre de grandeur a été observé tant pour les micro-organismes hétérotrophes totaux ($6{,}21\times10^{6}$cell./g de sol; Figure 4.23) que pour les micro-organismes répondant positivement aux deux sondes génétiques *ndoB* et *alkB* ($2{,}68\times10^{6}$ et $4{,}52\times10^{6}$ cell./g de sol, respectivement; Figure 4.25). De plus, les mêmes colonies répondaient positivement aux deux sondes génétiques utilisées.

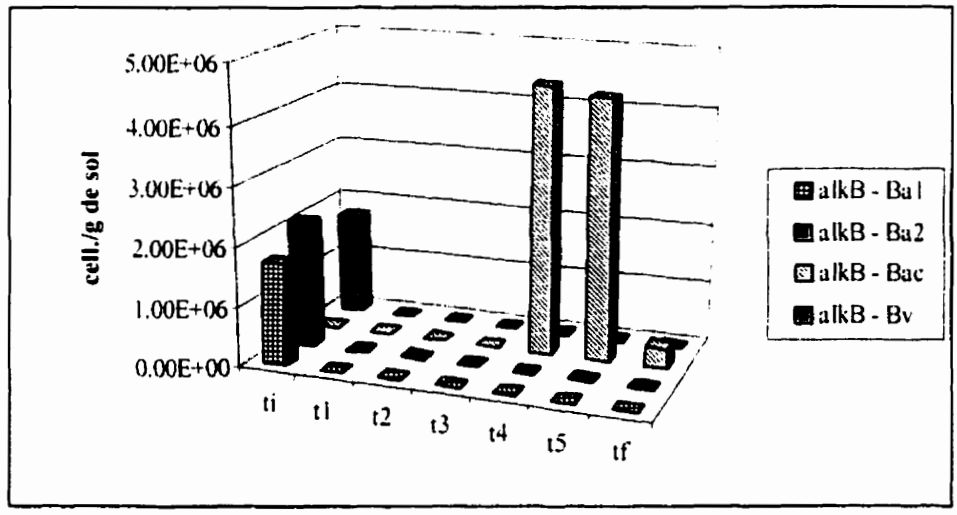


Figure 4.25 Comptes bactériens spécifiques *alkB*

Afin d'expliquer la baisse de viabilité des hydrocarbonoclastes dans les autres colonnes, il faut analyser la technique utilisée pour leur détection, soit la technique d'hybridation. Par exemple, l'échantillon de sol analysé pourrait posséder un niveau de population plus bas que la limite de détection de la technique (Whyte et al., 1999). La toxicité causée par le niveau élevé de la contamination pourrait également entrer en compte et alors, la compétition avec les non-dégradeurs. Les micro-organismes du sol ont pu également

emprunter d'autres voies métaboliques pour la dégradation de diesel ques celles dans lesquelles les deux enzymes (*alkB* et *ndoB*) sont impliquées.

Quelques facteurs influençant la technique d'hybridation du point de vue méthodologie expérimentale ont été soulevés par Sayler et Layton (1990). D'abord, il s'agit du type de milieu de culture utilisé pour faire croître les micro-organismes avant de les soumettre à la technique d'hybridation. Probablement, les micro-organismes hydrocarbonoclastes ayant survécu à la saturation en diesel du sol n'y sont plus cultivables (i.e., après avoir subi le stress de la saturation en diesel), bien que lors de la caractérisation initiale de la flore microbienne existante dans le sol, les hydrocarbonoclastes étaient présents. Il est à ajouter le fait que la spécificité est grandement contrôlée par la précision de l'hybridation et les conditions de lavages durant la procédure expérimentale.

4.4.3.3.3 Activité de la biomasse à la minéralisation du [1-^{14}C] hexadécane

L'aptitude des micro-organismes du sol à minéraliser [1-^{14}C] hexadécane a été mesurée sur des échantillons de sol provenant des colonnes après les deux essais de saturation en diesel en mini-microcosmes.. Un premier test a été réalisé sur des échantillons de sol prélevés des colonnes suite au premier essai de saturation en diesel et la durée d'incubation fut de 170 jours. Les taux de minéralisation ont été variables, soit entre 6,8 et 18 % pour le sol provenant des colonnes Ba2 et Bv, respectivement et moins de 1% pour le contrôle abiotique, soit la colonne Bac. L'ajout d'eau (i.e., 12 % p/p) après une certaine période d'incubation n'a pas influencé de façon importante le taux de minéralisation, tandis que l'ajout de nutriments (i.e., 250 mg N/kg de sol humide sur une base massique) dans le sol provenant de la colonne Ba1 a amélioré le taux de minéralisation plus de 30 % (Figure 4.26). La disponibilité des nutriments plutôt que l'absence des micro-organismes hydrocarbonoclastes a pu contribuer à la variabilité de l'activité de minéralisation observée.

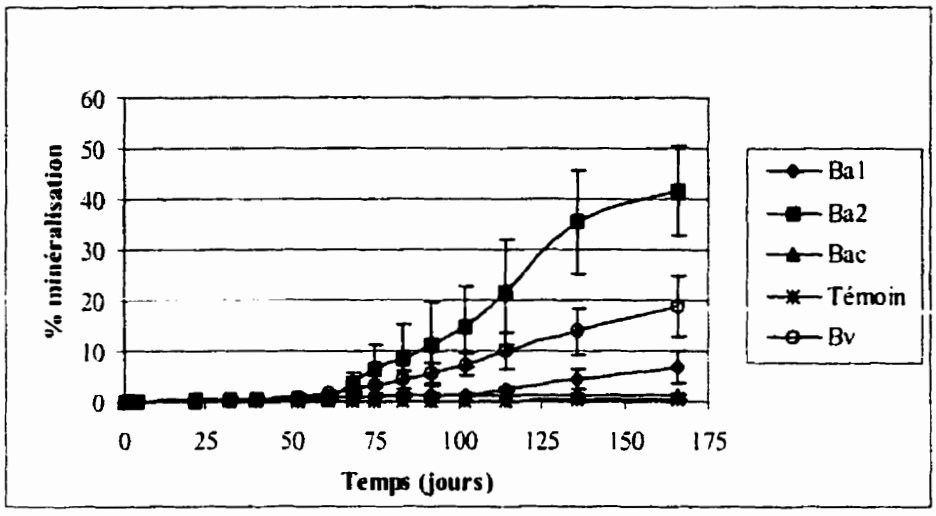


Figure 4.26 Courbe de minéralisation de [1-^{14}C] hexadécane
-premier essai de saturation en diesel

Un deuxième test a été effectué sur des échantillons de sol prélevés après le deuxième essai de saturation. Après 140 jours d'incubation, des taux de minéralisation plus faibles que 1% furent enregistrés (Figure 4.27).

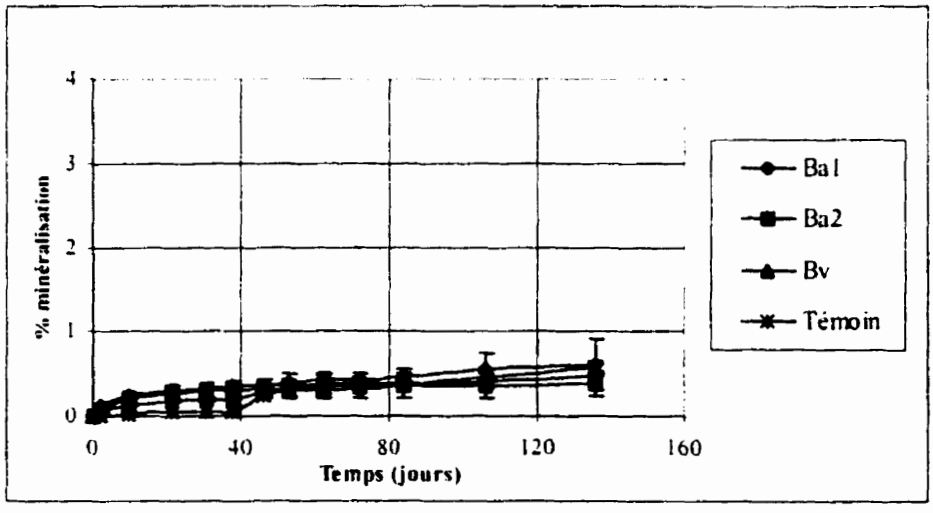


Figure 4.27 Courbe de minéralisation de [1-^{14}C] hexadécane
-deuxième essai de saturation en diesel

En dépit du nombre des hétérotrophes totaux mesuré après le deuxième essai de saturation, la concentration élevée en contaminant (i.e., supérieure à 20 000 mg/kg) s'est avérée toxique en termes de minéralisation du contaminant témoin, en l'occurrence, le [1-^{14}C] hexadécane. Le faible degré de minéralisation du substrat peut indiquer que ce sont plutôt les micro-organismes non-dégradeurs qui ont été stimulés durant les deux traitements.

Dans la présente étude, aucune corrélation significative n'a pu être établie entre l'activité de minéralisation du polluant témoin et le nombre de micro-organismes hétérotrophes totaux.

4.4.3.3.4 Test de respirométrie en mode dynamique

Premièrement, des mesures d'oxygène et de dioxyde de carbone dans le gaz à la sortie des colonnes furent effectuées à une fréquence de deux fois par semaine durant toute la période des traitements. Les taux journaliers d'utilisation d'oxygène ont été calculés sur une base d'hexadécane (i.e., témoin du diesel). La porosité à l'air est un paramètre important qui entre dans le modèle empirique d'estimation du taux de biodégradation. Ainsi, il a été montré que les conditions anaérobies débutent à des valeurs de porosité à l'air plus faibles que 10-20 % (Lyman et al., 1990). Pour chaque colonne, la porosité à l'air à été récalculée après le deuxième essai de saturation, t_3 et après 15 jours de traitement, soit à la fin de la récupération des liquides, t_4 (Tableau 4.16). Les valeurs de porosité prises en compte pour le calcul du taux d'utilisation d'oxygène ont été celles correspondant aux conditions d'après 15 jours de traitement. Et comme il sera vu plus loin, cela ne représente pas une grande approximation car, la perméabilité à l'air n'a pas beaucoup changé durant la période d'opération des traitements.

Tableau 4.16. Variation de la porosité à l'air dans les colonnes

Colonne	n_{a1}	n_{a3}	n_{a4}
Ba1	0,36	0,39	0,34
Ba2	0,38	0,40	0,36
Bac	0,44	0,45	0,39
Bv	0,31	0,33	0,18

n_{ai} – porosité à l'air au temps initial; n_{a3} – porosité à l'air au temps après l'essai de saturation en diesel; n_{a4} – porosité à l'air au temps après 15 jours de traitement

La production de dioxyde de carbone a été estimée en considérant que l'adsorption sur les particules du sol et la production anaérobie comparée à la production aérobie sont négligeables (Wood et al, 1993):

L'évolution des deux paramètres biochimiques (i.e., O_2/CO_2) pour les quatre colonnes (i.e., Ba1, Ba2, Bac, traitées en mode de bioaspiration et Bv, traitée en mode de bioventilation) est présentée graphiquement à la Figure 4.28 et Figure 4.29).

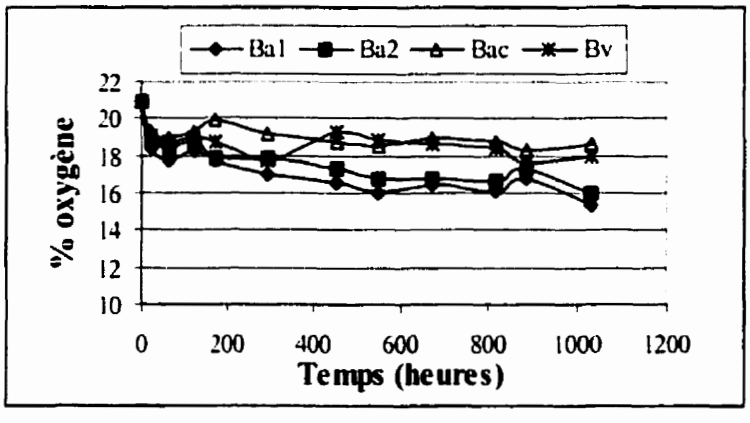


Figure 4.28 Consommation de l'oxygène en mode dynamique

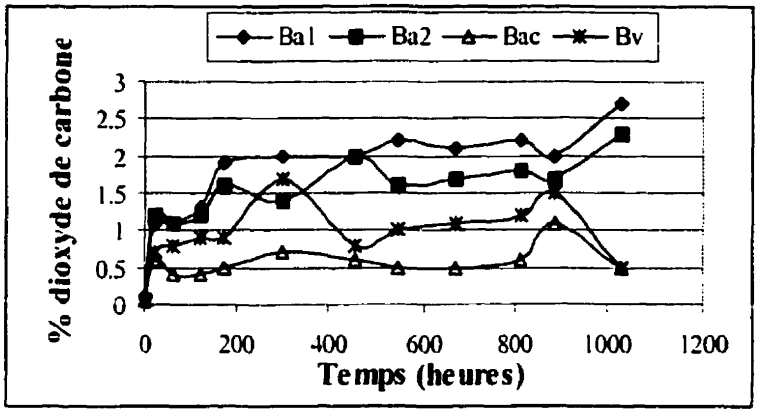


Figure 4.29 Production de dioxyde de carbone en mode dynamique

Les valeurs du taux de biodégradation ont toutes été calculées sur base de données d'utilisation en oxygène, car cette mesure semble être plus consistante et sensible que la production de dioxyde de carbone (Dupont et al., 1991, Hinchee et Ong, 1992, Leeson et al., 1995). La minéralisation de l'hexadécane fut utilisée comme témoin représentatif du diesel. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 4.17.

Tableau 4.17. Taux de respiration de l'hexadécane

Colonne	K_O (%/jour)	K_B (mg/kg/jour)
Ba1	0,62	0,52
Ba2	0,57	0,51
Bac	0,35	0,33
Bv	0,27	0,10

K_O – taux d'utilisation d'oxygène;

K_B – taux de biodégradation de l'hexadécane.

La demande en oxygène dans les colonnes fonctionnant en mode de bioaspiration (i.e., en moyenne 0,60 $\%O_2$/jour) est supérieure à celle enregistrée dans la colonne traitée en mode de bioventilation (i.e., 0,27 % O_2/jour). Bien que des bactéries spécifiques (i.e., répondant positivement aux sondes génétiques *ndoB* et *alkB*) n'aient pas été détectées dans les colonnes Ba1, Ba2 et Bv, les taux de respiration enregistrés dans ces colonnes

pourraient être attribués à l'utilisation d'une autre source de carbone disponible (e.g., matière organique) par les micro-organismes ayant survécu à la saturation en diesel.

En dépit de la flore microbienne spécifique détectée et quantifiée dans la colonne abiotique (Bac), la demande en oxygène fut inférieure à celle enregistrée dans les colonnes traitées également en mode de bioaspiration (Ba1 et Ba2) et ce, de 40 %. Cela pourrait s'expliquer par le manque d'une population mixte dans le sol.

4.4.3.3.5 Test de respirométrie en mode statique

Deux tests de respirométrie en mode statique ont été effectués durant 10 et 14 heures respectivement (i.e., pas plus car la concentration en oxygène aurait baissé en déca de 5 %) et ce, à un intervalle de deux semaines l'un de l'autre. Les résultats obtenus sont présentés aux Figure 4.30 et Figure 4.31, respectivement.

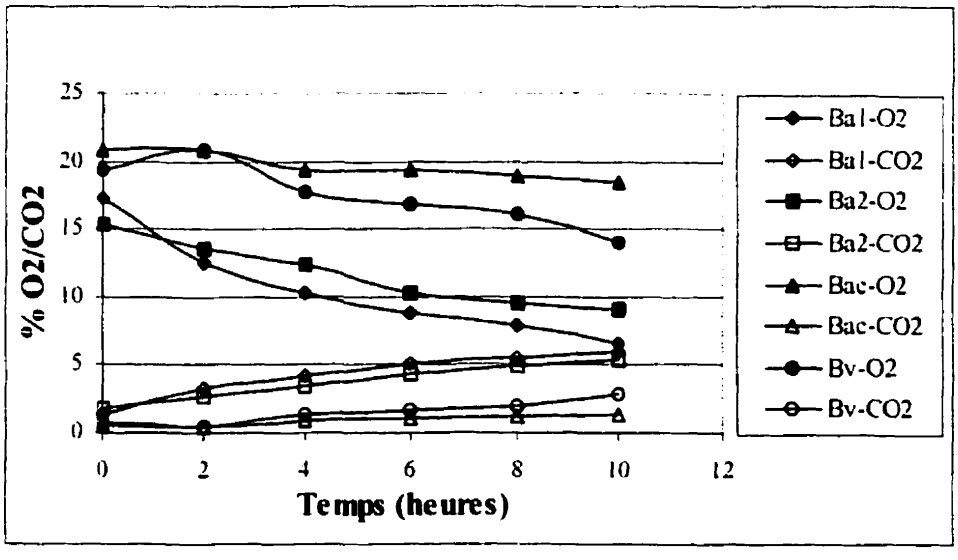


Figure 4.30 Evolution des concentrations en O_2/CO2
-premier test de respirométrie en mode statique

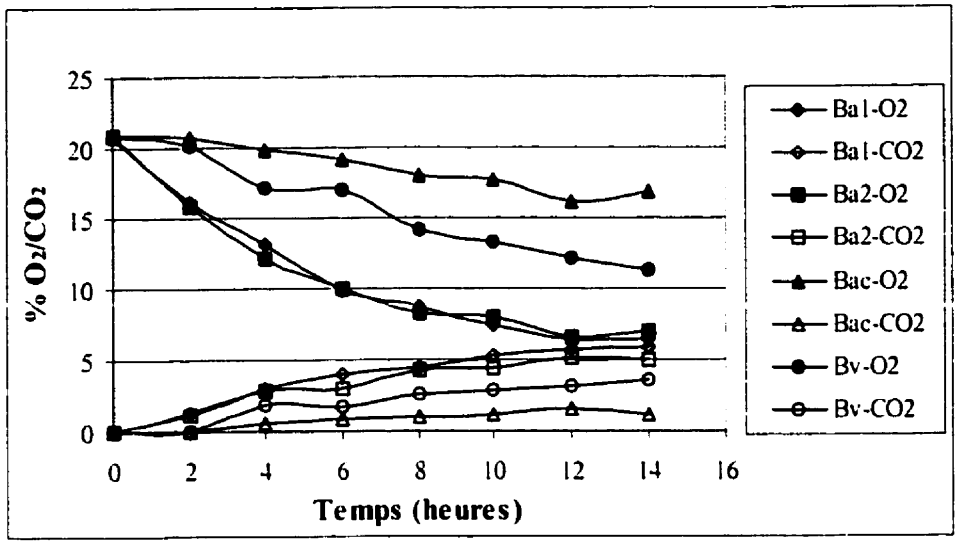


Figure 4.31 Evolution des concentrations en O_2/CO2
-deuxième test de respirométrie en mode statique

Les valeurs du taux d'utilisation d'oxygène horaire estimées durant ces deux tests de respirométrie en conditions statiques sont présentées dans le Tableau 4.18.

Tableau 4.18 : Taux d'utilisation d'oxygène en mode statique

Colonne	Taux d'utilisation d'oxygène, K_o (mg/kg heure)	
	Test 1	Test 2
Ba1	1,87	1,32
Ba2	1,58	1,33
Bac	0,35	0,43
Bv	0,44	0,44

Les deux tests répétés de respirométrie montre que la biodégradation aérobie continue et le taux d'utilisation d'oxygène se maintient quasi-constant entre les deux.

Un quotient respiratoire (i.e., efficacité de biodégradation) horaire, soit le rapport entre le pourcentage de dioxyde de carbone produit et le pourcentage d'oxygène consommé a été calculé (Tableau 4.19).

Tableau 4.19 : Valeurs du quotient respiratoire

Colonne	Quotient respiratoire, CO_2/O_2	
	Test 1	Test 2
Ba1	0,41	0,40
Ba2	0,44	0,37
Bac	0,52	0,31
Bv	0,41	0,38

Mentionnons qu'un quotient de respirométrie de 0,85 dénote une minéralisation complète des hydrocarbures aromatiques et la quantité de biomasse créée est négligeable (Leeson et al., 1995).

Les données des deux types de tests respirométriques (i.e., dynamique et statique) démontrent que les valeurs du taux d'utilisation d'oxygène des colonnes traitées en mode de bioaspiration sont plus élevées que celles des autres colonnes et que les taux de biodégradation sont comparables aux données publiées dans la littérature (Tableau 4.20).

Tableau 4.20 : Quelques valeurs des taux de biodégradation (Hinchee, 1994).

Contaminant	K_O (%/h)	K_B (mg/kg/jour)	Type d'échelle
JP-4	> 0,52	> 10	Pleine échelle
JP-4	0,1 - 1,0	2 - 20	Échelle pilote
Diesel	0,42	8	Échelle pilote
Diesel	nd	0,2 - 20	Pleine échelle

Il est difficile de trouver une corrélation entre les décomptes bactériens, l'activité de minéralisation et les valeurs du taux de biodégradation et, la relation entre le taux de

biodégradation et les propriétés du sol n'est pas très forte. Quelques faibles relations ont pu être trouvées mais ce, uniquement à l'aide des modèles statistiques (Leeson et al., 1995)

4.4.4 Bilan de masse

La masse de diesel (sur une base d'hexadécane) biodégradé lors de l'essai durant 50 jours a été estimée à partir des valeurs moyennes du taux de biodégradation obtenues durant le test de respirométrie dynamique (Tableau 4.21).

Tableau 4.21 : Masse de diesel biodégradé sur base d'hexadécane

Colonne	Masse de diesel biodégradé (mg/kg)
Ba1	26
Ba2	25,5
Bac	16,5
Bv	5

Comme l'indique le tableau ci-dessus, les taux de biodégradation enregistrés durant les 50 jours de traitement furent assez faibles. Notons que le traitement en mode de bioaspiration a engendré des taux de biodégradation supérieurs que celui en mode de bioventilation.

Le haut niveau de concentration en diesel ayant engendré une toxicité aux micro-organismes de biodégradation, le manque des nutriments et probablement, la courte période de traitement pourraient expliquer les faibles taux de biodégradation observés.

CHAPITRE V : DISCUSSION GÉNÉRALE

L'hypothèse sur laquelle s'est basée cette recherche fut la suivante :

Comparativement au mode de bioventilation, la succion accrue en mode de bioaspiration d'un sol contaminé à saturation en diesel tend de réduire la saturation résiduelle au niveau de la frange capillaire, ce qui stimule le processus de biodégradation.

En effet, les résultats obtenus ont montré une diminution de la saturation résiduelle en diesel en mode de bioaspiration comparativement au mode de bioventilation. Évidemment, toutes les conditions portaient à croire que le déplacement des phases ayant engendré l'élimination de l'excès du diesel des pores du sol entraînerait une meilleure diffusion de l'oxygène et des nutriments et de lors une stimulation de l'activité microbienne. Mais, les résultats ont plutôt montré le contraire (i.e., plus de respiration mais pas nécessairement une forte activité).

Afin de comprendre ce qui a pu diminuer voire éliminer l'activité de minéralisation du contaminant, nous devons revoir le début de la recherche, soit la caractérisation initiale du système d'étude. Celle-ci a montré que la flore microbienne indigène du sol était adaptée et apte à la biodégradation de la contamination présente dans le sol (7800 mg/kg). En effet, plus de 55 % du polluant témoin fut minéralisé en 100 jours et le nombre des hétérotrophes totaux atteignait $2{,}47\times10^{8}$cell./g de sol. Cependant, une concentration supérieure à 20 000 mg/kg en contaminant avait diminué l'activité microbienne du sol. De plus, le fait que l'ajout des nutriments ait engendré un meilleur taux de minéralisation du polluant témoin indique que la présence et la disponibilité des nutriments pourraient être des facteurs limitants.

Deuxièmement, la simulation d'un déversement du diesel dans le sol saturé à la saturation résiduelle en eau a montré que 26 % du volume des pores du sol était occupé par le diesel. Cela indique d'une part, que ce type de sol possédait une grande capacité de stockage et d'autre part, que l'évolution de la contamination (i.e., diminution par drainage

hydraulique et/ou biotransformation voire minéralisation) était importante. L'effort de diminution de la saturation résiduelle en diesel par l'application d'une succion en mode de bioaspiration a engendré le changement d'une variété des facteurs environnementaux localisés (locaux) et il semble donc que l'activité de biodégradation s'est avéré être contrôlé par les caractéristiques hydrogéologiques plutôt que par l'aptitude inhérente de la communauté microbienne. Cette considération est importante et apparaît logique lorsque l'on considère la problématique que représente la distribution de la saturation résiduelle en contaminant, en l'occurrence un LNAPL, dans un milieu poreux en présence des trois phases. Wilson et ses collaborateurs (1990) ont réalisé une étude complète sur la migration multi-phasique et les mécanismes de transport associés lors du déversement d'un contaminant (LNAPL) dans la zone vadose. Des photomicrographiques effectués à l'échelle des pores ont montré la complexité de la distribution de la saturation résiduelle du contaminant dans la matrice du sol. La distribution de la saturation résiduelle apparaît principalement sous forme des films, mais aussi sous forme d'anneaux pendulaires, de gouttes et de poches emprisonnées dans des gorges ainsi que dans les corps des pores. Ces différentes formes étaient dépendantes de la présence d'autres fluides, de la géométrie des pores, de l'affinité pour la matrice solide et de l'hétérogénéité spatiale du sol. Cependant, l'apparition de films s'est avérée être le mécanisme le plus important d'invasion d'un LNAPL dans la zone vadose. D'une manière générale, le LNAPL avance en déplaçant le gaz et/ou l'eau des corps et des gorges des pores. Lorsqu'il y a des poches de LNAPL, elles s'accumulent et s'interconnectent pour former un écoulement continu à travers le film, ce qui rend possible le drainage par extraction (succion). Dans le cas où les gorges des pores sont remplies de gaz, l'eau peut les contourner ou sauter au-dessus pour pénétrer finalement dans les corps des pores. Dans ces conditions, des bulles de gaz sont emprisonnées dans les corps des pores mais également à l'intérieur des gouttes de contaminant.

Il est essentiel de souligner l'importance de la formation des films par le LNAPL dans la zone vadose. Premièrement, ils exposent une grande surface à la phase gazeuse, rendant ainsi possible des processus comme par exemple la ventilation. Deuxièmement, ils

exposent une très grande surface à la phase aqueuse, augmentant ainsi l'efficacité de la solubilité du LNAPL.

Quant aux micro-organismes, ils vivent soit en suspension dans l'eau libre des pores soit attachés aux parois des pores à l'interface entre le solide et l'eau. Ainsi, leur présence et leur activité dépendent des conditions locales. La distribution des films et des poches de LNAPL peut donc influencer l'activité des micro-organismes. Lorsqu'il y a de larges pores remplis d'air, donc un accès rapide à l'oxygène, mais un très mince double film d'eau et de LNAPL, ce dernier ne pourra pas fournir les nutriments nécessaires aux micro-organismes. Par ailleurs, un milieu formé des gorges des pores remplies d'eau peut occasionner un manque d'oxygène, car la présence du film de LNAPL va supprimer le transfert d'oxygène dans la phase aqueuse. La redistribution et possiblement la séquéstration des fluides (air, diesel, eau) et des nutriments (tels que présents) dans les micro- et nano-pores lors du déplacement du diesel a probablement fort changé la distribution et leur accès aux micro-organismes du sol (Hatzinger et Alexander, 1997). La migration des micro-organismes a pu également être influencée par la distribution spatiale de la saturation résiduelle en diesel.

Les changements transitoires de la saturation résiduelle en fluides ont toutefois amélioré les conditions environnementales des micro-organismes aérobies. En effet, des taux moyens de respiration atteignant 0,79 mg O_2/kg heure en mode dynamique et 1,53 mg O_2/kg heure en mode statique ont été observés dans les colonnes ayant fonctionné en mode de bioaspiration, tandis que dans la colonne ayant fonctionné en mode de bioventilation ceux-ci furent de 0,2 mg O_2/kg heure en mode dynamique et 0,44 mg O_2/kg heure.

L'étude de la littérature scientifique couplée aux observations effectuées tout au long du suivi des deux traitements nous amènent à conclure que la présence de phases multiples, l'hétérogénéité spatiale, les limitations du transport de masse et les mécanismes de transfert interphasique ont conduit à une modification de la biodisponibilité (i.e, des nutriments, d'eau, d'oxygène) ce qui a causé la diminution de l'activité microbienne.

Ainsi, la diminution de la biodisponibilité des macro-éléments et de l'eau s'est avéré être plus importante que la biodisponibilité du contaminant.

En conclusion, nous avons observé que le processus de biodégradation implique des interactions biologiques, physico-chimiques et hydrogéologiques très complexes. La connaissance et la compréhension des changements des facteurs environnementaux (cinétique microbienne, cinétique d'absorption/adsorption, biodisponibilité, transport, transfert de masse, colmatage) pouvant avoir lieu dans un milieux poreux en présence des trois phases représentent une nécessité impérieuse quant à la réussite d'une technique de remédiation des sites contaminés.

CONCLUSIONS

Le but de cette recherche était d'évaluer l'effet de la succion sur l'activité microbienne lors du traitement d'un sol contaminé au diesel par un procédé simulant la bioaspiration.

Pour rencontrer cet objectif, il a été décidé de comparer deux technologies de biorestauration *in situ* de la zone vadose, soit la bioaspiration et la bioventilation. Ces technologies ont été sélectionnées puisqu'à l'exception de la pression appliquée au puits, des telles technologies possèdent des conditions similaires d'opération. La bioventilation survient sous des conditions de pression atmosphérique ou faiblement sub-atmosphérique, alors que la bioaspiration s'effectue sous une succion intermédiaire. Des essais au laboratoire en colonnes ont été réalisées afin de comparer ces deux technologies.

Cette étude s'est divisée en trois grandes parties : 1) caractérisation physico-chimique et microbiologique du sol, 2) développement d'un dispositif expérimental et des méthodologies permettant de caractériser le sol notamment au niveau de l'écoulement tri-phasique (i.e., air/diesel/eau) et, 3) conception et développement d'un dispositif expérimental et des procédures permettant de simuler les conditions rencontrées lors des deux traitements et leur comparaison tant en termes d'élimination de masse d'hydrocarbure que d'efficacité de biodégradation de la contamination.

La caractérisation du sol à l'étude, en microcosme, a permis de vérifier l'effet de la concentration du contaminant et de l'ajout des nutriments sur l'activité de minéralisation d'un polluant témoin. Les essais ont démontré qu'une toxicité aux micro-organismes survient à des concentrations en diesel supérieures à 20 000 mg/kg de sol sec et que l'ajout de nutriments résulte en une augmentation de l'activité de minéralisation.

La détermination des courbes caractéristiques des systèmes bi- et tri-phasiques (i.e., relation entre la teneur en liquides et la pression) a permis d'estimer un paramètre clé de l'écoulement tri-phasique essentiel à la conception d'un traitement en mode de bioaspiration, soit la pression d'entrée d'air en deçà de laquelle le diesel ne serait pas

mobilisé. Pour le type de sol à l'étude, la succion appliquée à la matrice du sol doit être supérieure à 0,2 atm.

Le suivi des deux technologies durant 50 jours de traitement a permis de démontrer que la succion appliquée en mode de bioaspiration a engendré un degré d'élimination de masse d'hydrocarbure 3 fois supérieure à celui observé en mode de bioventilation. Cette diminution physique de la teneur en hydrocarbures a résulté en une activité microbiologique accrue en mode de bioaspiration. En effet, les taux moyens d'utilisation d'oxygène et de biodégradation calculés en conditions dynamiques ont été plus élevés pour le traitement en mode de bioaspiration, soit 0,60 %/jour et 0,51 mg/kg/jour, respectivement comparativement à ceux en mode de bioventilation, soit 0,27 %/jour et 0,10 mg/kg/jour respectivement. Également, le taux moyen d'utilisation d'oxygène horaire calculé en conditions statiques a été plus élevé pour le traitement en mode de bioaspiration, soit 1,15 %/heure que celui en mode de bioventilation, soit 0,69 %/heure.

D'après le taux moyen de biodégradation estimé lors des tests de respirométrie en conditions dynamique, une masse relativement faible d'hydrocarbures, soit 25 mg/kg de sol a été dégradée en mode de bioaspiration et 5 mg/kg de sol en mode de bioventilation durant les 50 jours de traitement.

Le haut niveau de concentration en diesel ayant engendré une toxicité aux micro-organismes de biodégradation, le manque des nutriments et probablement, la courte période de traitement pourraient expliquer les faibles taux de biodégradation observés. L'opération du système à une succion plus élevée pourrait corriger ces lacunes puisque la concentration résiduelle inférieure qui résulterait ferait en sorte que les besoins en nutriments et la toxicité seraient moindres.

RECOMMANDATIONS

Les recommandations ci-après sont de deux natures, soit au niveau des méthodologies et deuxièmement, concernant le design de la technologie de bioaspiration en soi.

Comme les résultats du suivi analytique de la concentration en contaminant n'ont pas été concluant du processus de biodégradation survenu, il est recommandé qu'un bilan massique des liquides par gravimétrie soit fait. Alors, les composantes du dispositif expérimental utilisé doivent être rigoureusement caractérisées du point de vue massique et faire en sorte que chaque composante puisse être individuellement caractérisée durant le suivi du traitement.

Quant aux paramètres d'opération de la technologie en mode de bioaspiration, il est recommandé qu'une succion supérieure à 0,2 atm soit appliquée au puits dans le cas de remédiation d'une frange capillaire ayant des conditions semblables à la présente étude (i.e., saturée en diesel et perméabilité à l'air de l'ordre de 10^{-9} cm^2). En effet l'augmentation de la succion diminuera la toxicité du contaminant aux micro-organismes du sol et par conséquent, augmentera l'efficacité de la biodégradation du même contaminant.

Comme l'oxygène n'a pas été l'élément limitant de la biodégradation du diesel, il est recommandé que des études se fassent sur l'effet conjugué de l'ajout des nutriments et de l'eau sur le taux de respirométrie et ce, en tenant compte de la problématique qu'engendre le choix et l'implantation d'un système d'alimentation en nutriments et en eau. Le suivi du taux de respiration sous différentes conditions environnementales permettra d'optimiser davantage ces deux technologies de bioremédiation de la zone non-saturée.

RÉRÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABDUL, S. (1988). Migration of petroleum products through sandy hydrogeologic systems. Ground Water Monitoring Review 8(4), 73-81.

ALEXANDER, M. (1994). Biodegradation and Bioremediation. Academic Press. NY.

ATLAS, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, an environmental perspective. Microbiological Reviews 45(1), 180-209.

AUSTIN, B., CALOMIRIS, J.J., WALKER, J.D. et COLWELL, R.R. (1997). Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. Appli. Environ. Microbiol. 34(1), 60-68.

BAKER, R.S. (1995). One-, two-, and three-phase flow during free-product recovery. In Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons-Bioremediation 3(6); HINCHEE, R.E., KITTEL, J.A., et REISINGER, H.J. Battelle Press, 349-359.

BAKER, R.S. et BIERSCHENK, J. (1995). Bioslurping LNAPL contamination. A cheaper, faster, better solution. ENSR Insight 4, 1-4.

BARNES, D.L. et McWHORTER, D.B. (1995). Mechanics of vacuum recovery of hydrocarbons. In Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons-Bioremediation 3(6); HINCHEE, R.E., KITTEL, J.A. et REISINGER, H.J. Battelle Press, 361-370.

BELLES-ISLES, J.C. et AYOTTE, P. (1997). Les critères d'évaluation de la contamination des sols du Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec sont-ils sécuritaires ou trop contraignants? Sixième symposium et exposition sur la restauration des eaux souterraines et des sols contaminés-Sommaires exécutifs. Montréal, Qc.

BRITTON, L.N. (1984). Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In Microbial degradation of organic compounds; GIBSON, T.D. Marcel Dekker, NY, 89-130.

BROOKS, R.H. et COREY, A.T. (1964). Hydraulic properties of porous medium. Hydrology Paper 3, Colorado State University (Fort Collins), 1-10.

CALDER, L.M. (1997). Site remediation and risk assessment in Canada. Current activities and a vision for the 21st century - A perspective from the canadian petroleum products industry. Sixième symposium et exposition sur la restauration des eaux souterraines et des sols contaminés. Sommaires exécutifs. Montréal, Qc.

CHAPELLE, F.H. (1993). Ground-water microbiology & geochemistry. John Wiley & Sons Inc. NY, 174-207.

CHATZIS, I. (1983). Magnitude and detailed structure of residual oil saturation. SPEJ, avril, 311-326.

CHEVALIER, L.R. et WALLACE, R.B. (1997). Aqueous phase permeability in the region of discontinuous NAPL. Journal of soil contamination 6(4), 409-424.

CONNOLY, D., GIBBS, B. et KEET, B. (1995). Bioslurping applied to a gasoline and diesel spill in fractured rock. In Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons-Bioremediation 3(6); HINCHEE, R.E., KITTEL, J.A. et REISINGER, H.J. Battelle Press, 371-377.

COOKSON, J.T. Jr. (1995). Bioremediation Engineering-Design and application. McGraw-Hill, Inc.

DIBBLE, J.T. et BARTHA, R. (1979). Reabilitation of oil-inundated agricultural land-A case history. Soil Sci. 128, 56-60.

DINEEN, D., SLATER, J.P., HICKS, P., HOLLAND, J. et CLENDENING, L.D. (1993). *In situ* biological remediation of petroleum hydrocarbons in unsaturated soils. In Principles and practices for petroleum contaminated soils; CALABRESE, E.J. et KOSTECKY, P.T. Lewis Publishers, 453-463.

DUCHAUFOUR, PH. (1991). Pédologie. Sol, végétation, environnement. Paris.

DUPONT, R.R., DOUCETTE, W.J. et HINCHEE, R.E. (1991). Assessment of *in situ* bioremediation potential and the application of bioventing at fuel contaminated site. In *In situ* bioreclamation, 263-282.

DUPONT, R.R. (1993). Fundamentals of bioventing applied to fuel contaminated sites. Environmental Progress 12(1), 45-53.

EGLERT, C.J., KENZIE, E.J. et DRAGUN, J. (1992). Bioremediation of Petroleum Products in Soil In Principles and practices for petroleum contaminated soils; CALABRESE, E.J. et KOSTECKI, P.T. Lewis Publishers, 113-118.

ENVIRONNEMENT CANADA (1999). http://www.gouv.ca.

ERRAMPALLI, J., TREVORS, J.T., LEE, H., LEUNG, K., CASSIDY, M., KNOKE, K., MARWOOD, T., SHAW, K., BLEARS, M. et CHUNG, E. (1997). Bioremediation-A perspective. Journal of soil contamination 6(3), 207-218.

FEENSTRA, S. et Cherry, J.A. (1988). Subsurface contamination by dense non-aqueous phase liquid (DNAPL) chemicals. Paper presented at the international groundwater symposium of the international association of hydrogeologists, Halifax, NS, May 1-4.

FETTER, C.W. (1993). Contaminant hydrogeology. Macmillan Publishing Company, NY, 202-243.

FOGHT, J.M., GUTNICK, D.L. et WESTLAKE, D.W.S. (1989). Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. Appli. Environ. Microbiol. 55(1), 36-42.

FREDLUND, D.G. et XING, A. (1994). Equations for the soil water characteristic curve. Can. Geotech. J. 31, 521-532.

GODSY, M (1998). Microbiological and geochemical degradation processes. http://bordeaux.uwaterloo.ca/biol447new/epadocs/microbiological.htm

GREER, C.W., HAWARI, J. et SAMSON, R. (1990). Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. Arch. Microbiol. 154, 317-322.

GREER, C., MASSON, L., COMEAU, Y., BROUSSEAU, R. et SAMSON, R. (1993). Application of molecular biology techniques for isolating and monitoring pollutant-degrading bacteria. Water Poll. Res. J. Canada 28(2), 275-287.

GRIFFIN, D.M.(1980). Water potential as selective factor in the microbial ecology of soils. Soil Science Society of America, 141-151.

HATZINGER, P.B. et ALEXANDER, M. (1997). Biodegradation of organic compounds sequestered in organic solids or in nanopores within silica particules. Environmental Toxicology and chemistry 16(11), p2215.

HINCHEE, R.E., ONG, S.K. et HOEPPEL, R.E. (1991). A field treatability test for bioventing. Proceedings of the air and waste management association, Paper, 91-19.4. Vancouver, BC.

HINCHEE, R.E., DOWNEY, D.C., DUPONT, R.R., AGGARWAL, P.K. et MILLER R.N. (1991). Enhancing biodegradation of petroleum hydrocarbons through soil venting. Journal of Hazardous Materials 27, 315-325.

HINCHEE, R.E. et ONG, S.K. (1992). A rapid *in situ* respiration test for measuring aerobic biodegradation rates of hydrocarbons in soil. J. Air Waste Manag. Assoc. 42(10), 1305-1312.

HINCHEE, R.E. (1994). Bioventing of petroleum hydrocarbons. In Handbook of bioremediation; NORRIS, HINCHEE, BROWN, MCCARTY, SEMPRINI, WILSON,

KAMPBELL, REINHARD, BOUWER, BORDEN, VOGEL, THOMAS et WARD. Lewis Publishers, 39-59.

HOEPPEL, R.E., HINCHEE, R.E. et ARTHUR, M.F. (1991). Bioventing soils contaminated with petroleum hydrocarbons. Journal of Industrial Microbiology 8, 141-146.

HOEPPEL, R.E., KITTEL, J.A., GOETZ, F.E., HINCHEE, R.E. et ABBOTT, J.E. (1995). Bioslurping technology applications at naval middle distillate fuel remediation sites. In Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons-Bioremediation 3(6); HINCHEE, R.E., KITTEL, J.A. et REISINGER,H.J., Battelle Press, 389-400.

HOFSTEE, C., DANE, J.H. et HILL, W.E. (1996). Three fluid retention in porous media involving water, PCE and air. Journal of contaminant hydrology 25, 235-247.

HUNT, J.R., SITAR, N. et UDELL, K.S. (1988). Nonaqueous phase liquid transport and cleanup. Analysis of mechanisms. Water resources research, 24(8), 1247-1258.

KITTEL, J.A., HINCHEE,R.E., HOEPPEL, R et MILLER, R. (1994). Bioslurping-vacuum enhanced free product recovery coupled with bioventing-A case study. In Petroleum hydrocarbons and organic chemicals in groundwater. Prevention, detection, and remediation. National Groundwater Association, Dublin, OH, 255-270.

LEAHY, J.G. et COLWELL, R.R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews 54(3), 305-315.

LEESON, A., KITTEL, J.A., HINCHEE, R.E., MILLER, R.N., HAAS, P.E. et HOEPPEL, R.E. (1995). Test plan and technical protocol for bioslurping. In Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons-Bioremediation 3(6); HINCHEE. R.E., KITTEL, J.A., et REISINGER, H.J. Battelle Press, 335-347.

LEESON, A., KUMAR, P., HINCHEE, R.E., DOWNEY, D., VOGEL, C.M., SAYLES, G.D., et MILLER, R.N. (1995). Statistical analyses of the U.S. air force bioventing

initiative results. In *In situ* aeration: Airsparging, bioventing and related remediation process-Bioremediation 3(2); HINCEE, R.E., MILLER, R.N. et JOHNSON, P.C. Battelle Press, 223-235.

LYMAN, W.J., REEHL, W.F. et ROSENBLATT, D.H. (1990). Handbook of chemical property estimation methods-Environmental behavior of organic compounds. American Chemical Society,Washington, DC.

MACKAY, M.C., ROBERTS, D.M. et CHERRY, J.A. (1985) Transport of organic contaminants in groundwater. Environ. Sci. Technol. 19(5), 384-392.

MERCER, J.W. et CHOEN, R.M. (1990). A review of immiscible fluids in the subsurface-Properties, models, characterization and remediation. Journal of Contaminant hydrology 6, 107-163.

MILLETTE, D., BARKER, J.F., COMEAU, Y., BUTLER, B.J., FRIND, E.O., CLÉMENT, B. et SAMSON R. (1995). Substrate interaction during aerobic biodegradation of creosote-related compounds: A factorial batch experiment. Environ. Sci. Technol. 29, 1944-1952.

MILLETTE, D., THIBAULT, R., CHARLEBOIS, S., SAMSON, R et ORBAN, H.J. (1997). Bioslurping pilot test in a silty low-permeability soil. Sixième symposium et exposition sur la restauration des eaux souterraines et des sols contaminés. Sommaires exécutifs. Montréal, Qc.

MILLS, A.L., BREUIL, C. et COLWELL, R.R. (1978). Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method. Can. J. Microbiol. 24, 552-557.

NAKAI, C., KAGAMIYAMA, H., NOZAKY, M., NAKAZAWA, T., INOUYE, S., EBINA, Y. et NAKAZAMA, A. (1983). Complete nucleotide sequence of the

metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. J. Biol. Chem. 258, 2923-2928.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1993). *In situ* bioremediation. When does it work? National Academy Press, Washington, DC.

NIELSON, D.M. (1991). Practical handbook of groundwater monitoring. Lewis Publishers.

NORRIS, R.D. (1994). *In situ* bioremediation of soils and groundwater contaminated with petroleum hydrocarbons. In Handbook of bioremediation; NORRIS, HINCHEE, BROWN, MCCARTY, SEMPRINI, WILSON, KAMPBELL, REINHARD, BOUWER, BORDEN, VOGEL, THOMAS et WARD. Lewis Publishers, 17-37.

ONG, S.K., CULVER, T.B., LION, L.W. et SHOEMAKER, C.A. (1992). Effects of soil moisture and physical-chemical properties of organic pollutants on vapor-phase transport in the vadose zone. Journal of Contaminant Hydrology 11, 273-290.

ONG, S.K., LEESON, A., HINCHEE, R.E., KITTEL, J., VOGEL, C.M., SAYLES,G.D., et MILLER, R.N. (1994). Cold climate applications of bioventing. In Hydrocarbon Bioremediation; HINCHEE, R.E., ALLEMAN, B.C., HOEPPEL, R.E. et MILLER, R.N. Lewis Publishers, 444-453.

OSTENDORF, D.W., RICHARDS, R.J. et BECK F.P. (1993). LNAPL retention in sandy soil. Ground Water 31(2), 285-292.

PARKER, J.C. (1995). Bioslurping enhances free product recovery. Technique combines bioventing with vacuum enhancement. http://www.gvi.net/soils/Oct.1995/bioslurp.html.

PARKER, J.C. et ISLAM, M. (1998). Cost effectiveness of selected remediation technologies and design protocols. Environmental Systems & Technologies Inc., Blacksburg, Virginia. In Proceedings 4th International Symposium on *In situ* and on *site* bioremediation. http://www.esnt.com/neworld.htm.

PIJLS, C.G.J.M, URLINGS, L.G.C.M, van VREE, H.B.R.J et SPUIJ, F (1994). Applications of *in situ* soil vapor extraction and air injection. In Air sparging for site remediation; Hinchee, R.E., 128-136.

PRESCOTT, HARLEY et KLEIN (1995). Microbiologie. DeBoeck-Wesemael S.A., Bruxelles.

REISINGER, H.J. (1995). Hydrocarbon bioremediation–An overview. In Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons-Bioremediation 3(6); HINCHEE, R.E., KITTEL, J.A. et REISINGER, H.J. Battelle Press, 2-9.

REISINGER, H.J., JOHNSTONE, E.F. et HUBBARD, Jr. P. (1995). Hydrocarbon bioremediation–Cost effecttiveness and feasibility comparison of bioventing vs. conventional soil venting. In Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons-Bioremediation 3(6); HINCHEE, R.E., KITTEL, J.A., et REISINGER, H.J. Battelle Press, 41-57.

RISER-ROBERTS, E. (1992). Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites. CRC Press, Inc.

RODRIGUEZ-MAROTO, J.M et GOMEZ-LAHOZ, C. (1995). Bioventing. In Modeling of *in situ* techniques for treatment of contaminated soils. Soil vapor extraction, sparging, and bioventing; WILSON, D.J. Technomic Publishing Company, inc.

ROSSI, S.S. et THOMAS, W.H. (1981). Solubility behavior of three aromatic hydrocarbons in distilled water and natural seawater. Environ. Sci. Technol. 15, 715-716.

SAMSON, R. (1994) Biorestauration des sites contaminés 2-Les technologies *in situ*. Centre québécois de valorisation de la biomasse, la filière biomasse. Sainte Foy, 17 p.

SAWER, C.N., McCARTY, P.L. et PARKIN, G.F. (1984). Chemistry for environnmental engeneering. 4th Edition, 482 p.

SAYLER, G.S. et LAYTON, A.C. (1990). Environmental application nucleic acid hybridization. Rev. Microbiol. (44), 625-648.

SCG industries limited (1996). Bioaspiration-extraction et traitement multiphase par vide. Centre pour l'avancement des technologies environnementales, Saint John, NB.

SCHROTH, M.H., ISTOK, J.D., AHEARN, S.J. et SELKER, J.S. (1995). Geometry and position of light nonaqueous phase liquid lenses in water-wetted porous media. Journal of Contaminant hydrology 19, 269-287.

SCHWILLE, F. (1984). Migration of organic fluids immiscible with water in the unsaturated zone. In Pollutants in porous media–the unsaturated zone between soil surface and groundwater; YARON, B., DRAGON, G., et GOLDSCHMID, J. Springer Verlag.

SENN, R.B. et JOHNSON, M.S. (1987). Interpretation of gas chromatographic data in subsurface hydrocarbon investigations. Ground Water Monit. Rev. 7(1), 58-63.

SPRINGER, D.S., LOAIGICA, H.A., CULLEN, S.J. et EVERETT, L.G. (1997). Air permeability of porous materials under controlled laboratory conditions. Ground water 36(4), 558-565.

STEFFY, D.A., BARRY, D.A. et JOHNSON, C.D. (1997). Influence of antecedent moisture content on residual LNAPL saturation. Journal of soil contamination 6(2), 113-147.

STURMAN, P.J., STEWART, P.S., CUNNINGHAM, A.B., BOUWER, E.J. et WOLFRAM, J.H. (1995). Engineering scale-up *in situ* bioremediation processes, a review. Journal of contaminant hydrology 19, 171-203.

SWINDOLL, M.C., AELION, C.M. et PFAENDER, F.K. (1988). Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and the adaptation response of susurface microbial communities. Appli. Environ. microbiol. 54(1), 212-217.

U.S.EPA (1991). Innovative treatment technologies-Overview and guide to information sources. Office of solid waste and emergency response, Technology information office. U.S.Environmental Protection Agency, Washington, DC.

U.S.EPA (1995b). Bioventing principles and practice volume II, bioventing design. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

U.S.EPA (1995b). Bioventing principles and practice volume II, bioventing design, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

U.S.EPA (1995c). How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites-a guide for corrective action plan reviewers. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

VANDERBY, P. (1998). Développement d'une stratégie de contrôle pour le procédé de bioventilation *in situ*. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Maîtrise ès Sciences Appliquées. Département de génie chimique, Ecole Polytechnique de Montréal.

Van GENUCHTEN, M.TH. (1980). A closed equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. Soil Sci. Am. J. 44, 892-898.

WALKER, J.D., et COLWELL, R.R. (1976). Enumeration of petroleum degrading microorganisms. Appli. Environ. Microbiol. 31, 198-207.

WEISMAN, W.H. (1998). Total petroleum hydrocarbon criteria working group-A risk based approach for the management of total petroleum hydrocarbons in soil. Journal of soil contamination 7(1), 1-15.

WHYTE, L.G., GREER, C.W. et INNISS, W.E. (1996). Assessement of the biodegradation potential of psychotrophic microorganisms. Can. J. Microbiol. 42, 99-106.

WHYTE, L.G., BOURBONNIERE, L., BELLEROSE, C et CHARLES, W. (1999). Bioremediation assessement of hydrocarbon-contaminated soils from the high arctic. Bioremediation Journal 3(1), 69-79.

WICKRAMANAYAKE, G.B., KITTEL, J.A., HOEPPEL, R., WALKER, A., DRESCHER, E. et GIBSS, J.T. (1996). Best practices manual for bioslurping. Technical memorandum TM-2191-ENV. Naval facilities engineering service center, Port Hueneme, Californie 93043-4301.

WILLIAMS, P.J. (1982). The surface of the Earth, an introduction to geotechnical science. Longman Inc., NY.

WILSON, J.L. et CONRAD, S.H. (1984). Is physical displacement of residual hydrocarbons a realistic possibility in aquifer restoration? In Conference on petroleum hydrocarbons and organic chemicals in groundwater-Prevention, detection, and restoration. The Intercontinental Hote, Houston, Texas, 274-298.

WILSON, J.L., CONRAD, S.H., MASON, W.R., PEPLINSKI, W. et HAGAN, E. (1990). Laboratory investigation of residual liquid organics from spills, leaks, and the disposal of hazardous wastes in groundwater. EPA/600/6-90/004.

WOOD, B.D., KELLER, C.K. et JOHNESTONE, D.L. (1993). *In situ* measurement of microbial activity and controls on microbial CO_2 production in the unsaturated zone. Wat. Resour. Res. 29, 647-659.

WURDEMANN, H., LUNDD, N.C. et GUDEHUS, G. (1995). Assessement of a biological *in situ* remediation. In *In situ* aeration: Airsparging, bioventing and related remediation process; HINCEE, R.E., MILLER, R.N. et JOHNSON, P.C.-Bioremediation 3(2). Battelle Press, 237-245.

YONG, R.N., MOHAMED, A.M.O. et WARKENTIN, B.P. (1992). Principles of contaminant transport in soils.

ZACHARIAS, S. et BOHNE, K.(1997). Replacing the field capacity concept by an internal drainage approach. A method for homogeneous soil profiles. http://hintze-online.com/sos/1997/articles/art2/.

ZALIDIS, G.C., ANNABLE, M.D., WALLACE, R.B., HAYDEN, N.J. et VOICE, T.C. (1991). A laboratory method for studying the aqueous phase transport of dissolved constituents from residually held NAPL in unsaturated soils columns. Journal of Contaminant Hydrology 8, 143-155.

ANNEXES

ANNEXE I: RELATIONS DE CALCUL DE LA SATURATION EN FLUIDES

Saturation en eau

- Teneur massique en eau

$$w_e = \frac{M_e}{M_t}$$

où :

w_e – teneur massique en eau (g/g);

M_e – masse d'eau (g);

M_t – masse totale du sol (g)

- Teneur volumique en eau

$$\theta_e = \frac{V_e}{V_t}$$

où :

θ_e – teneur volumique en eau (m^3/m^3, %);

V_e – volume d'eau (m^3);

V_t – volume total (m^3).

- Degré de saturation en eau

$$S_e = \frac{V_e}{V_p} = \frac{\theta_e}{n} \qquad S_e = S_{cr} + S_{el}$$

où :

n – porosité (%);

S_{er} – saturation résiduelle en eau (%);

S_{el} – saturation en eau libre (%).

- Saturation résiduelle en eau

$$S_{er} = \frac{V_{e\ discontinu}}{V_p}$$

où :

$V_{e\ discontinu}$ – volume d'eau immobilisé (m^3);

V_p – volume des pores (m^3).

Saturation en LNAPL

- Teneur massique en LNAPL

$$w_o = \frac{M_o}{M_t}$$

où :

w_o – teneur massique en LNAPL ou organique (g/g);

M_o - masse de LNAPL (g).

- Teneur volumique en LNAPL

$$\theta_o = \frac{V_o}{V_t}$$

où :

θ_o - teneur volumique en LNAPL (m^3/m^3);

V_o - volume de LNAPL (m^3).

- Degré de saturation en LNAPL

$$S_o = \frac{V_o}{V_p} = \frac{\theta_o}{n} \qquad S_o = S_{or} + S_{lo}$$

où :

S_o - degré de saturation en LNAPL (%);

S_{or} - saturation résiduelle en LNAPL (%);

S_{ol} - saturation en LNAPL libre (%);

$$S_{ro} = \frac{V_{o\ discontinu}}{V_p}$$

où :

$V_{o\ discontinu}$ – volume de LNAPL immobilisé (m^3).

Degré de saturation total

$$S_t = S_e + S_o + S_a$$

où :

S_a – saturation en air (m^3)

ANNEXE II : PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

Biopro

ORIGINAL

PROTOCOLE STANDARD D'OPÉRATION	
Protocole#:A12	Pages:8
Version:1	Date:28-août-96
	Signatures:
Auteurs:Pascale Picard	
Approuvé par: Sandra Estelle	Date: 97/04/03

Titre:
Dénombrement total de micro-organismes hétérotrophes par la méthode du nombre le plus probable (NPP)
Mots clés:
dénombrement, nombre le plus probable, NPP, MPN, hétérotrophes

1.00 Domaine d'application

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

2.00 Principes de la méthode

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

3.00 Matériel

- solution saline 0.85 % dans l'eau distillée, soit NaCl 8.5 g/L

- Nutrient Broth (Becton Dickinson, MD, USA)
- eau distillée (pH 7)
- bouteilles à dilution de 150 mL (1 par dilution), et bouchons
- tubes de verre à bouchon vissé de 15 mL (5 par dilution + 2 pour les contrôles), et bouchons
- pipettes stériles de 10 mL
- vortex
- dispensettes 10 et 25 mL (dispensette 25 mL à emprunter au local A-660.1)
- micropipette 1000 µL
- embouts à micropipette stériles

Pour un dénombrement sur un échantillon de sol, il faut en plus :
- matériel pour déterminer le taux d'humidité (pso A7)
- 30 billes de verre de 3 mm de diamètre (glass beads solids, Fisher) par échantillon
- une cupule en aluminium et deux spatules par échantillon
- agitateur Wrist Action (Burrel, PA, USA)
- balance (Mettler Toledo PB302)
- éthanol 70%

4.00 Mode Opératoire

Un schéma opératoire est présenté en annexe.

4.01 Choix du nombre de dilutions

Si la densité de micro-organismes dans l'échantillon est inconnue, il faudra effectuer 7 dilutions de la suspension primaire (donc 8 bouteilles à dilution identifiées 10^0 à 10^{-7}, et 5x8 tubes identifiés de 10^{-1} à 10^{-6} plus 2 tubes de contrôle).

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

Tableau 4.1 dilutions à effectuer suivant la plage de densité microbienne lorsqu'elle est connue

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

4.02 Préparation des tubes

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

4.03 Préparation des dilutions en série

Pour un échantillon de sol

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

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

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

Pour un échantillon aqueux

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

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

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

4.04 Inoculation des tubes

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

1- brasser la bouteille 10^{0} pendant 10 secondes
- pipeter 1 mL à la micropipette, en continuant de brasser
- placer dans un tube identifié 10^{-1}

Répéter cette opération dans les quatre autres tubes identifiés 10^{-1} ⇒ on obtient les 5 aliquots de la dilution 10^{-1}.
Évidemment, si la plage de densité de micro-organismes est connue et qu'on n'a pas besoin des tubes10^{-1}, on ne les fait pas!

2- reboucher les tubes, et les agiter 3 secondes au vortex
3- changer d'embout et répéter les points 1 et 2 avec chaque autre bouteille à dilution : avec la bouteille 10^{-1} on obtient les 5 tubes 10^{-2}, et ainsi de suite
4- incuber tous les tubes à 30°C, y compris les deux contrôles, pendant 7 jours ou jusqu'à ce que les résultats ne changent plus avec le temps

4.05 Décontamination des tubes après lecture des résultats

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

5.00 Calculs

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

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

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

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

Tableau 5.1 Exemple de tableau de résultats

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

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

3- noter l'index NPP correspondant à cette combinaison à l'aide de la table 5.2.

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

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

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

5- On exprime les résultats en fait en nombre de micro-organismes par mL de liquide, ou par g SEC de sol, connaissant le taux d'humidité du sol déterminé en début d'expérience.

Tableau 5.2 Index NPP avec une limite de confiance de 95% selon les combinaisons de résultats positifs, lorsque 5 tubes par dilution sont utilisés

Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits		Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper			Lower	Upper
0-0-0	< 2	—	—	4-2-0	22	9.0	56
0-0-1	2	1.0	10	4-2-1	26	12	65
0-1-0	2	1.0	10	4-3-0	27	12	67
0-2-0	4	1.0	13	4-3-1	33	15	77
				4-4-0	34	16	80
1-0-0	2	1.0	11	5-0-0	23	9.0	86
1-0-1	4	1.0	15	5-0-1	30	10	110
1-1-0	4	1.0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-1	6	2.0	18	5-1-0	30	10	120
1-2-0	6	2.0	18	5-1-1	50	20	150
				5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1.0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2.0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2.0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3.0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3.0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5.0	29	5-3-2	140	60	360
3-0-0	8	3.0	24	5-3-3	170	80	410
3-0-1	11	4.0	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4.0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6.0	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6.0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7.0	40	5-4-4	350	160	820
4-0-0	13	5.0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7.0	45	5-5-1	300	100	1300
4-1-0	17	7.0	46	5-5-2	500	200	2000
4-1-1	21	9.0	55	5-5-3	900	300	2900
4-1-2	26	12	63	5-5-4	1600	600	5300
				5-5-5	≥1600	—	—

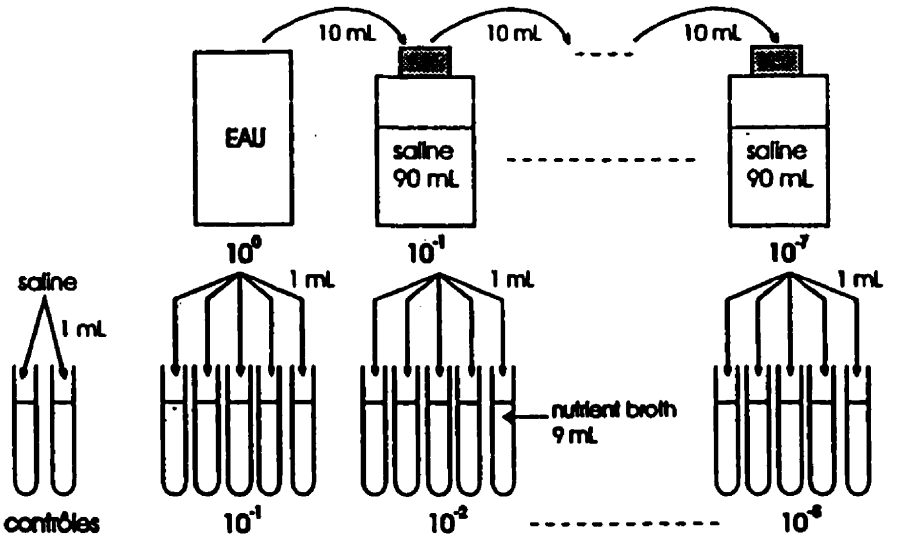
(source : Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, APHA, AWWA, WEF, ed., 18th edition, 1992)

6.00 Limites de la méthode

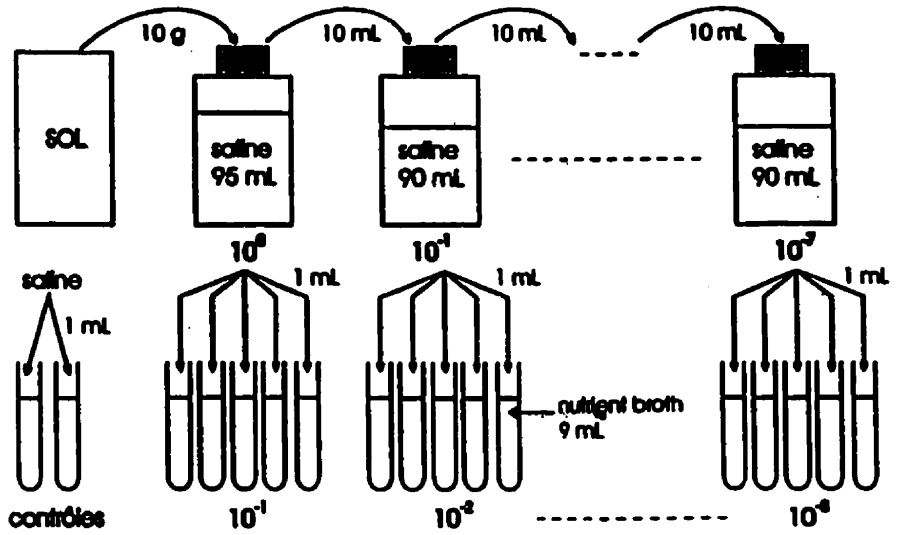
La précision de la méthode est assez faible, mais elle a l'avantage d'être une méthode statistique. Si un échantillon contient 100 micro-organismes/100 mL, la probabilité que les cinq tubes de dilution 10^{-1} donnent tous des résultats négatifs (*i.e.* aucune croissance) est de 1%.

Annexe : Schéma opératoire

Échantillon d'eau



Échantillon de sol



Cette méthode tend à surestimer la densité bactérienne réelle.

Il y aura sous-estimation du nombre de micro-organismes si certains facteurs inhibant la croissance de la biomasse sont présents, ou encore si les bouteilles ne sont pas suffisamment brassées pour homogénéiser les différentes dilutions avant l'inoculation dans les tubes.

7.00 Références

APHA, AWWA, WEF, ed., 1992. Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 18th edition.

Cochran W. G., 1950. Estimation of bacterial density by means of the «most probable number», *Biometrics*, june 1950.

8.00 Notes

Autoclavage des tubes et des bouteilles : on peut ne pas visser complètement les bouchons et les fermer correctement à la sortie de l'autoclave, mais il y a un risque d'évaporation durant l'autoclavage. Si au contraire les bouchons sont bien fermés, il y a un risque de bris. Le mieux est de choisir une fois pour toutes une des 2 méthodes et de l'appliquer constamment. Une méthode encore meilleure serait d'autoclaver les tubes et bouteilles vides et de les remplir stérilement avec les solutions autoclavées à par. Cependant, la dispensette ne s'autoclave pas, ce qui rend le remplissage à la pipette fastidieux!

Le délai standard entre le recueillement d'un échantillon aqueux sur le site et l'analyse est idéalement inférieur à 30 heures, en conservant l'échantillon à 4°C.

L'extraction des micro-organismes du sol dans la suspension primaire peut nécessiter un temps d'agitation supérieur à 30 minutes si les micro-organismes sont très attachés (par ex. sur un sol argileux).

Il arrive que la croissance soit rapide et qu'une lecture puisse s'effectuer après 48 heures d'incubation. Cependant, il est préférable de confirmer ce résultat en faisant une nouvelle lecture après les 7 jours d'incubation.

La méthode est réalisable avec 3 tubes par dilution au lieu de 5, mais la précision en est affectée (voir pour plus de détails «Standard Methods for the examination of Water and Wastewater). De plus la table d'index est différente de celle indiquée dans ce protocole.

Biopro

ORIGINAL

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Protocole #: P8A
Version: 1

Pages: 5
Date: 10-09-96
Signatures:

Auteurs: Pascale Picard

Approuvé par: Manon Leduc **Date:** 8 avril 1997

Titre:
dénombrement des hétérotrophes et des micro-organismes hydrocarbonoclastes dans des sols contaminés aux hydrocarbures du site de Havre-aux Maisons (Iles de la Madeleine), par la méthode du nombre le plus probable (NPP)
Mots clés:
dénombrement, NPP, hétérotrophes, hydrocarbonoclastes, hexadécane

1.00 Objectif(s)
L'objectif est d'évaluer d'une part le nombre total d'hétérotrophes et d'autre part le nombre de microorganismes pouvant dégrader les hydrocarbures (micro-organismes hydrocarbonoclastes), dans huit sols provenant du site de Havre-aux Maisons. Le but final du projet est de déterminer s'il y a une possibilité d'atténuation naturelle sur ce site.

2.00 Matériels et Méthodes

2.01 Matériel
- matériel du pso A12. Il faut compter 61 tubes par sol, soit 61x8 = 488 tubes, mais seulement 8 bouteilles à dilution de 150 mL

Il faut en plus pour le dénombrement sélectif des hydrocarbonoclastes :
- micropipette 200 µL et un embout approprié
- n-hexadécane (Sigma)
- $MgSO_4 7H_2O$ (Anachemia)
- KCl (Anachemia)

- KH_2PO_4 (Anachemia)
- K_2HPO_4 (Anachemia)
- NH_4NO_3 (Anachemia, labo A-674)
- eau pure (resistivité 18.2 MΩ/cm ; labo de génie civil)

2.02 Méthode

La méthode est semblable à celle du pso A12 à ceci près :

- Extraction des microorganismes des sols : les bouteilles de 150 mL ont été agitées environ 40 minutes au Wrist Action. Ces suspensions primaires servent pour inoculer les tubes pour les deux types de dénombrement.

- Méthode de dilution : pour chaque sol et pour chacun des deux dénombrements, la suspension primaire est brassée manuellement puis 1 mL est recueilli à la micropipette et placé dans un tube identifié 10^{-1} contenant 9 mL du milieu de croissance spécifique au dénombrement. La procédure est répétée pour les quatre autres tubes 10^{-1}. Chaque tube 10^{-1} est agité au vortex et va servir d'inoculum pour le tube 10^{-2} de sa série, en prélevant 1 mL. Les dilutions successives de tube à tube sont effectuées jusqu'à la dilution 10^{-6} pour les hétérotrophes totaux et la dilution 10^{-5} pour les hydrocarbonoclastes.

- Dénombrement sélectif des hydrocarbonoclastes : le milieu d'incubation est différent du milieu indiqué pour les hétérotrophes totaux. La source de carbone est un hydrocarbure. L'hexadécane est choisi comme hydrocarbure type.

Les tubes sont remplis de 9 mL de solution minérale, puis 50 µL d'hexadécane sont micropipetés dans chaque tube. Les tubes sont alors autoclavés 25 minutes. Deux contrôles supplémentaires consistent en deux tubes de dilution 10^{-1} sans hexadécane, afin de vérifier la possibilité de croissance sur un milieu sans hydrocarbure (car la matière organique du sol peut servir de source de carbone et donc favoriser la croissance de micro-organismes non spécifiquement hydrocarbonoclastes).

pH 7.0

Solution minérale (par litre d'eau pure) : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g; KCl, 0.7 g; KH_2PO_4, 2 g; K_2HPO_4, 3.7 g; NH_4NO_3, 1 g (Mills *et al.*, 1978; milieu MMC sans NaCl)

3.00 Conservation des échantillons

L'expérience a été effectuée dans les 24 heures suivant l'échantillonnage. Les pots contenant le reste des sols ont ensuite été conservés à 4°C.

4.00 Résultats

4.01 Identification des différents échantillons de sol

S1 = SOF-16,0
S2 = FISSURE-2
S3 = MSF-15,0
S4 = SEF-16,0
S5 = SOF-17,0
S6 = MEF-15,0
S7 = SSF-17,0
S8 = SEF-17,0

4.02 Résultats

Tableau 4.1 Taux d'humidité des sols et masses sèches ajoutées dans les bouteilles à dilution :

sol	taux d'humidité (g sec/g humide)	masse sèche (g sec)
S1	0.8517	8.69
S2	0.8290	8.33
S3	0.8419	8.42
S4	0.8419	8.47
S5	0.8336	8.35
S6	0.8647	8.65
S7	0.8625	8.67
S8	0.8424	8.43

Les tubes ont été mis à incuber à 30°C. L'observation des tubes a été effectuée régulièrement jusqu'à un résultat stable. Le NPP est calculé d'après la table dans le pso A12. Pour le décompte des hydrocarbonoclastes, un résultat positif a été indiqué par la formation d'une émulsion d'hexadécane à la surface du tube (au lieu d'avoir deux phases bien séparées) et des particules de biofilm autour des bulles ou près de l'émulsion. Les micro-organismes hydrocarbonoclastes ont en effet des propriétés émulsifiantes (Zajic *et al.*, 1974).

Tableau 4.2 Dénombrement des hétérotrophes totaux (après 4 jours d'incubation)

sol	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	combinaison de positifs	NPP/100 mL	NPP/g sec
S1	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	5-1-0	$3.0\ 10^{3}$	$3.4\ 10^{4}$
S2	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5	5-5-1	$3.0\ 10^{4}$	$3.6\ 10^{5}$
S3	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5-5-5	$> 1.6\ 10^{7}$	$> 1.9\ 10^{8}$
S4	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5	0/5	5-5-1	$3.0\ 10^{3}$	$3.5\ 10^{4}$
S5	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5	5-5-1	$3.0\ 10^{4}$	$3.6\ 10^{5}$
S6	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	5-4-1	$1.7\ 10^{5}$	$2.0\ 10^{6}$
S7	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	5-5-3	$9.0\ 10^{6}$	$1.0\ 10^{8}$
S8	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	5-2-0	$5.0\ 10^{4}$	$5.9\ 10^{5}$

Tableau 4.3 Dénombrement sélectif des hydrocarbonoclastes (après 32 jours d'incubation)

sol	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-1} sans hexad.	combinaison de positifs	NPP/100 mL	NPP/g sec
S1	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	1/2	5-3-0	$8.0\ 10^{4}$	$9.2\ 10^{3}$
S2	5/5	5/5	3/5	0/5	0/5	0/1	5-3-0	$8.0\ 10^{3}$	$9.6\ 10^{2}$
S3	5/5	5/5	5/5	3/5	3/5	1/2	5-3-3	$1.7\ 10^{5}$	$2.0\ 10^{4}$
S4	5/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/2	5-3-0	$8.0\ 10^{2}$	$9.4\ 10^{1}$
S5	5/5	5/5	1/5	1/5	0/5	1/2	5-1-1	$5.0\ 10^{3}$	$6.0\ 10^{2}$
S6	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	2/2	5-4-1	$1.7\ 10^{4}$	$2.0\ 10^{3}$
S7	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	1/2	5-5-2	$5.0\ 10^{5}$	$5.8\ 10^{4}$
S8	5/5	5/5	3/5	0/5	0/5	1/2	5-3-0	$8.0\ 10^{3}$	$9.5\ 10^{2}$

Une croissance a été observée sur la majorité des contrôles sans hexadécane, après une période d'incubation supérieure à 17 jours (avant, aucune croissance n'était visible). Ceci indique que la matière organique du sol a pu servir de source de carbone à des micro-organismes non hydrocarbonoclaste. Ainsi, l'observation de croissance dans les tubes de dilution 10^{-1} et probablement 10^{-2} peut être due à des micro-organismes autres que hydrocarbonoclastes, surévaluant le nombre d'hydrocarbonoclastes dans l'échantillon. Il faut à ce moment éviter d'utiliser ces dilutions pour le calcul du NPP. Cependant, la croissance dans les tubes 10^{-1} avec hexadécane a été beaucoup plus rapide que dans les tubes sans hexadécane (5 tubes positifs sur 5 après seulement 7 jours d'incubation). Il est donc possible que l'interférence due à la matière organique soit minime. Il n'en a pas été tenu compte dans le calcul des NPP de cette expérience.

Tableau 4.4 Récapitulatif des dénombrements

sol	hétérotrophes totaux/g sec	hydrocarbonoclastes/g sec
S1	$3.4\ 10^{4}$	$9.2\ 10^{3}$
S2	$3.6\ 10^{3}$	$9.6\ 10^{2}$
S3	$> 1.9\ 10^{6}$	$2.0\ 10^{4}$
S4	$3.5\ 10^{2}$	$9.4\ 10^{1}$
S5	$3.6\ 10^{3}$	$6.0\ 10^{2}$
S6	$2.0\ 10^{4}$	$2.0\ 10^{3}$
S7	$1.0\ 10^{6}$	$5.8\ 10^{4}$
S8	$5.9\ 10^{3}$	$9.5\ 10^{2}$

5.00 Recommandations

- La solution minérale pour les hydrocarbonoclastes a été difficile à préparer. On a fait cette solution dix fois plus concentrée et les sels ne se dissolvaient pas. Il faudrait peut-être la préparer non concentrée directement pour éviter ce problème. Il est possible qu'alors la solution ne précipite pas ensuite dans les tubes.

- Il est possible d'ajouter 100 µL d'hexadécane au lieu de 50 dans les tubes pour accélérer la croissance.

6.00 Limites de la méthode

Le décompte des hydrocarbonoclastes par la méthode du NPP a été effectué dans le laboratoire pour la première fois. Aucun contrôle sur pétri n'a été réalisé, ne permettant pas une comparaison de la méthode utilisée.

7.00 Références

Mills, A. L., Breuil, C. et Colwell, R. R. (1978), Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method, *Can. J. Microbiol.*, 24, 552-557.

Zajic, J. E., Supplisson, B. et Volesky, B. (1974), Bacterial degradation and emulsification of no 6 fuel oil, *Env. Sci. & Technol.*, 8 (7), 664-668.

8.0 Notes

Le milieu minéral pour le décompte des hydrocarbonoclastes a précipité dans les tubes. Les tubes ont été alors inversés trois fois tous les deux jours environ afin d'homogénéiser la solution le plus possible.

Biopro

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE26 A	**Pages:**
Version: 1	**Date Début:**
	Date fin
Auteurs: Elena Petre	
Approuvé par:	**Signatures:** **Date:** 21/ 06/98
Titre: Essais de rétention capillaire et de déplacement des fluides (eau et diesel) dans des grandes colonnes en PVC **Mots clés:** rétention capillaire, teneur résiduelle,	

OBJECTIF

Le but de ce protocole est de décrire la procédure utilisée pour l'estimation de la capacité intrinsèque de rétention en eau et en diesel du sol et d'obtenir ainsi les courbes de saturation versus pression capillaire. Le déplacement du diesel par l'eau est également étudié. Par conséquent, les valeurs de deux caractéristiques du sol, très importantes pour la réalisation de la troisième phase du projet, soit la saturation résiduelle en eau et en diesel sont déterminées. Les objectifs sont les suivants :

1. Déterminer la valeur de la saturation résiduelle en eau dans un milieu poreux non-saturé que représente la zone vadose
2. Déterminer la valeur de la saturation résiduelle en diesel dans un milieu poreux non-saturé que représente la zone vadose

3. Étudier le comportement des fluides (air, diesel et eau) dans le milieu poreux non-saturé que représente la zone vadose

Pour ce faire, un système de 3 colonnes de 186 cm de long et de 5 cm de diamètre intérieur est mis au point. Ces colonnes sont réalisées des tubes en PVC de 62 cm de long et filetés. Une première colonne est saturée en eau par remontée capillaire (système air-eau). Une deuxième colonne est saturée en diesel également par remontée capillaire (système air-diesel). Ces essais donnent les courbes caractéristiques de saturation en eau et en diesel (pression capillaire vs degré de saturation en eau et en diesel respectivement) correspondant aux systèmes air-eau et air-diesel respectivement. Dans une troisième colonne, le comportement de deux fluides est étudié simulant les conditions d'un déversement de diesel dans un milieu poreux, en l'occurrence, le déplacement du diesel par l'eau (système air-diesel-eau)

Pour caractériser le système d'étude et interpréter les résultats obtenus, une étape préliminaire de caractérisation du sol et des fluides est nécessaire. Les résultats de cette caractérisation sont illustrés dans les tableaux 1, 2 et 3 correspondant à chacun de trois objectifs.

MATÉRIEL

- deux colonnes constituées de tubes en PVC de 62 cm de long et 5 cm de diamètre intérieur filetés ayant une hauteur totale de 186 cm servant pour la détermination de la saturation résiduelle en eau et en diesel respectivement;
- une colonne constituée de tubes en PVC de 62 cm de long et 5 cm de diamètre intérieur filetés ayant une hauteur de 248 cm servant pour l'étude du déplacement de l'eau par le diesel par gravité;
- 1 plaque (support), 3 tiges et 6 pinces métalliques pour le soutien des colonnes en position verticale;
- 3 récipients d'alimentation en eau et en diesel respectivement prévus des couvercles pour minimiser l'évaporation des deux fluides;
- 3 filtres fins en géotextile (5 mm de diamètre) pour prévenir le déplacement du sol;
- 3 filtres fins en géotextile (5 mm de diamètre) humectés placés à la partie supérieure des

colonnes pour minimiser l'évaporation;

- 3 bouchons filetés en plastique pour couvrir la partie supérieure des colonnes afin de minimiser l'évaporation;
- 1 balance mécanique d'une précision de 0.1g pour pouvoir peser une colonne entière (16kg);
- 3 plaques poreuses en céramiques (5mm de diamètre) ;
- 1 pompe péristaltique standard (Masterflex®) ;
- 1 tête de pompe pour un tube #14 (D_i = 1,6 mm), débit de 0,06 – 6 ml/min avec moteur de 1 à 100 rpm ;
- 4m de tube Masterflex®spécial pour le transport des carburants et lubrifiants, Tygon (série 06401) ;
- 1 récipient de collecte de fluides d'une forme cylindrique et d'un diamètre un peu plus grand que celui de la colonne prévu d'un trop plein ;
- cylindre gradué (capacité de 250 ml) pour la séparation et la quantification des deux fluides (eau et diesel) ;
- fluides (eau distillée et diesel) ;
- 20 kg de sol passant le tamis de 5 mm.

MÉTHODOLOGIE

Les tubes en PVC constituant les colonnes sont lavés et rincés avec de l'eau distillée. Ensuite, ils sont assemblés et pesés sans sol à l'aide d'une balance de 0.1g de précision. Le remplissage de colonnes s'effectue de la manière décrite ci-dessous.

Le sol est préalablement séché à l'air ambiant durant un jour afin de l'amener à une teneur en eau d'à peu près 5 %; le séchage est accéléré à l'aide d'un ventilateur. Ensuite, il est bien homogénéisé et laissé se reposer pour 12 heures dans un récipient fermé afin d'uniformiser l'humidité. Avant de passer au remplissage des colonnes, des échantillons de sol sont prélevés afin d'analyser la teneur en diesel résiduelle, C_{10}-C_{50} après le séchage du sol et l'humidité. Les résultats de ces analyses sont données dans les tableaux caractérisant les colonnes trouvés dans

les annexes de ce protocole.

Les tubes de bases sont munis à la partie inférieure des filtres en géotextile (5 mm de diamètre) et des pierres poreuses (5 mm diamètre). Le pourtour des pierres poreuses sont pourvus des bandes de silicone pour bien les étanchéifiés à l'intérieur des tubes de base. Ensuite, ils sont attachés à l'aide d'une pince sur un support métallique posant sur un carton afin d'éviter que les pierres poreuses se brisent suite à l'application de coups lors du compactage du sol dans les tubes. Le sol est placé en couches successives ayant à peu près la même hauteur, donc à peu près le même poids du sol ajouté. Chaque couche de sol est compactée à l'aide d'un cylindre en acier inoxydable pesant 4553,2 g par un nombre de 4-5 coups. Une fois que le premier tube est rempli, un deuxième est fileté. Le filet est graissé au préalable avec une graisse minérale pour bien se fileter. L'opération se poursuit jusqu'au remplissage total de chaque colonne. Un espace d'approximativement 10 cm est laissé à la partie supérieure pour l'uniformité de la pression de l'air atmosphérique. Les données enregistrées lors de l'opération de remplissage sont illustrées dans les tableaux 1, 2, et 3, trouvés dans les annexes.

Les teneurs en humidité sont déterminées en triplicata également à la fin du remplissage de chaque colonne. Les valeurs moyennes sont illustrées dans les mêmes tableaux.

De cette manière des paramètres physiques du sol (masse volumique humide et sèche, porosité, essai Proctor, humidité) peuvent être comparés afin de bien caractériser et interpréter les résultats obtenus pour chaque colonne.

Le remplissage des colonnes s'est fait aussi rapidement que possible pour éviter la volatilisation des fractions volatils du diesel et ainsi perdre une proportion des composés organiques volatils.

Deux colonnes sont soumises à un processus d'imbibition d'eau et une autre à une imbibition en diesel. La remontée capillaire (imbibition) évite l'emprisonnement de l'air dans les pores du sol, et comparée au drainage, les propriétés du sol en place ne varient pas dans le temps. Les colonnes remplies de sol sont positionnées verticalement à l'aide de supports, tiges et pinces métalliques. Les deux premières, au-dessus d'un récipient contenant de l'eau et la troisième, au dessus d'un récipient contenant du diesel. Les trois récipients seront fermés à l'aide de couvercles pour prévenir l'évaporation d'eau et du diesel respectivement. Les niveaux des fluides y sont maintenus constants durant l'expérience. La partie inférieure des colonnes est immergée dans les fluides sur une hauteur d'à peu près 5 cm, soit la partie filetée. Les colonnes sont pesées à l'aide d'une balance d'une précision de 0,1g au début de l'expérience et ensuite, chaque jour afin de

déterminer la courbe de saturation en fluides (eau et diesel) en fonction du temps. Le moment et le degré de saturation sont déterminés à l'équilibre des trois phases (air, diesel et eau), ça veut dire lorsqu'un plateau de la courbe va s'y établir.

A ce moment, les expériences de remontée capillaire prendraient fin si le troisième objectif, soit le déplacement de l'eau par le diesel ne serait étudié.

Pour ce faire, une de deux colonnes saturées en eau sert à l'étude du déplacement de l'eau par le diesel, simulant ainsi ce qui se peut se passer sur un terrain lorsqu'il y a un déversement en surface. Elle est alimentée en diesel par la partie supérieure à l'aide d'une pompe péristaltique Masterflex®de type standard ayant une tête spécifique au tube Masterflex® #14. Le débit correspond à un écoulement goutte à goutte (il est à déterminer); le diesel va déplacer l'eau des pores du sol jusqu'à ce qu'un équilibre s'établit entre les trois phases du système (air/diesel/eau). La partie inférieure de la colonne est maintenue dans l'eau (niveau constant afin de simuler la nappe phréatique et ainsi, prévenir la désaturation de la colonne à la pression atmosphérique qui agirait à la partie inférieure. Le mélange des deux fluides (eau et diesel) est récupéré à la base de la colonne dans le récipient de collecte et qui à le niveau d'eau initial (volume initial d'eau connu). Ce récipient est muni d'un orifice servant comme trop plein auquel un tube en Tygon spécial est connecté et, qui conduit l'effluent dans un cylindre gradué. L'eau et le diesel récupérés sont séparés et quantifiés. Lorsque le volume de diesel rentré dans la colonne est égal au volume récupéré, l'équilibre dans la colonne est considéré atteint et cela représente la fin du déplacement.

Durant toute cette période de déplacement de l'eau par le diesel, les deux autres colonnes demeurent toujours en imbibition (eau et diesel respectivement). De cette manière, il est possible de voir quel sera le volume d'eau pris par la colonne en eau durant ce processus. Par conséquent, il est prudent de laisser également la colonne d'imbibition en diesel en marche pour avoir les mêmes temps de départ et d'arrêt des toutes les trois colonnes. .Par soustraction des quantités récupérées de celles à l'entrée, les teneurs résiduelles en eau et en diesel dans la colonne sont déterminées. Finalement, les colonnes sont segmentées et des échantillons composite sur une hauteur d'environ 10 cm sont prélevés et analysés. Ainsi, les profiles de saturation en fluides en fonction de la hauteur sont représentés; par gravimétrie après séchage au four dans le cas de la colonne saturée en eau et par des analyses des hydrocarbures C_{10}-C_{50} (GC/FID) pour les colonnes saturées en diesel.

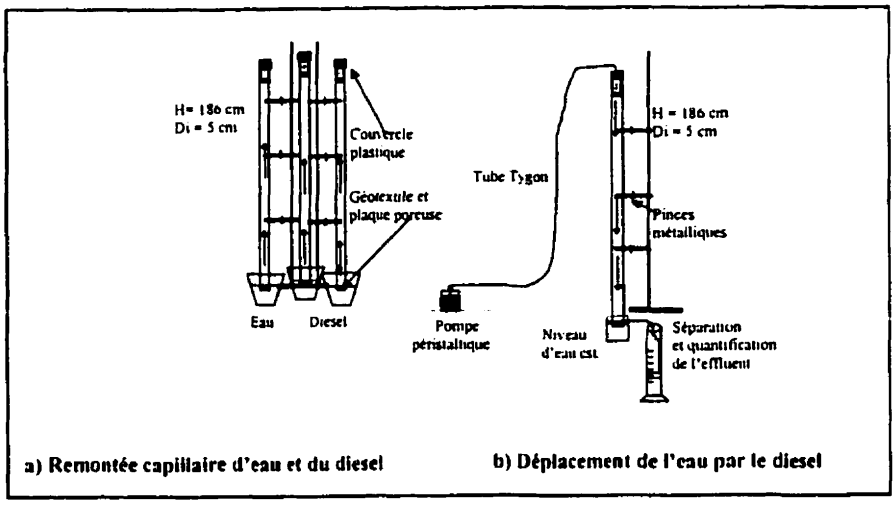


Figure 1: Montage expérimental pour la détermination de la capacité de rétention du sol :

Annexes: Caractérisation du dispositif

Colonne 1: Système bi-phasique AIR-DIESEL

But: Déterminer la saturation résiduelle en diesel à l'équilibre (forces visqueuses + forces de gravité = forces de capillarité) par imbibition; niveau du diesel maintenu constant dans le récipient d'alimentation.

Caractéristiques initiales du système:

Hauteur de la colonne	186 cm
Hauteur du sol dans la colonne	163,8 cm
poids de la colonne+sol	8280,2 g
poids du sol dans la colonne	6055,2 g
teneur en eau	4,39 %
teneur en diesel	C_{10}-C_{20} : 4600 mg/kg
	C_{20}-C_{30} : 510 mg/kg
	C_{10}-C_{50} : 5200 mg/kg
Volume de pores	1367,82 cm^3
indice de pores	0,648
Porosité	39,32%
masse volumique de sol sec	1660 kg/m3
masse volumique de sol humide	1742 kg/m3
densité relative	2,734

Dès que l'équilibre dans la colonne est atteint, la colonne sera désassemblée et la concentration en diesel en fonction de la hauteur de la colonne (pression capillaire) sera estimée par des analyses des hydrocarbures C_{10}-C_{50}. Suite à cette analyse, la variation des deux fractions composant le diesel sera observée.

Caractéristique obtenue: Saturation résiduelle en eau ***Sre***

Colonne 2: Système biphasique AIR-eau

But: Déterminer la saturation résiduelle en eau à l'équilibre (forces visqueuses + forces de gravité = forces de capillarité) par imbibition; niveau de l'eau maintenu constant dans le récipient d'alimentation.

Caractéristiques initiales du système:

Hauteur de la colonne	186 cm
Hauteur de sol dans la colonne	165,4 cm
poids de la colonne +sol	8194,7 g
poids du sol dans la colonne	5783,9 g
teneur en eau	4,08 %
teneur en diesel	C_{10}-C_{20} : 4600 mg/kg
	C_{20}-C_{30} : 510 mg/kg
	C_{10}-C_{50} : 5200 mg/kg
Volume de pores	1490.39cm3
indice de pores	0.737
Porosité	42,43 %
masse volumique de sol sec	1576 kg/m3
masse volumique de sol humide	1648kg/m3
Densité relative	2,734

Dès que l'équilibre dans la colonne est atteint, la colonne sera désassemblée et la concentration en eau en fonction de la hauteur de la colonne (pression capillaire) sera estimée par pesage et séchage au four. Une analyse des hydrocarbures C_{10}-C_{50} sera faite sur deux échantillons composites prélevés de la colonne afin de voir s'il y des changements par rapport à la teneur initiale en diesel.

Caractéristique obtenue: Saturation résiduelle en diesel Sor (o – organique)

Colonne 3: Système tri-phasique AIR-DIESEL-EAU

But:

1. Étudier l'emprisonnement du diesel et le déplacement de l'eau résiduelle (obtenue au préalable par imbibition) par le diesel. La pression en eau dans la colonne est maintenue constante en la maintenant dans le récipient d'alimentation en eau.

2. Déterminer la saturation résiduelle en eau et la saturation en diesel à l'équilibre (forces visqueuses + forces de gravité = forces de capillarité) après le drainage du diesel.

Caractéristiques initiales du système:

Hauteur de la colonne	248 cm
Hauteur du sol dans la colonne	212,2 cm
poids de la colonne+sol	10391,8 g
poids du sol dans la colonne	7557,1 g
Teneur initiale en eau	4,28 %
Teneur en diesel	C_{10}-C_{20} : 4600 mg/kg
	C_{20}-C_{30} : 510 mg/kg
	C_{10}-C_{50} : 5200 mg/kg
Volume de pores	1841,51 cm^3
indice de pores	0,691
Porosité	40,86 %
masse volumique de sol sec	1602 kg/m3
masse volumique de sol humide	1678 kg/m3
Densité relative	2,734
Teneur en eau résiduelle	à noter à la fin

Dès que l'équilibre dans la colonne est atteint, la colonne sera désassemblée et la teneur en eau et en diesel seront estimées en fonction de la hauteur de la colonne (pression capillaire) par des analyses des hydrocarbures C_{10}-C_{50} (Humidité totale – [C_{10}-C_{50}] = humidité en eau).

Caractéristiques obtenues: Saturation résiduelle en eau Ser et saturation en diesel

Biopro

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE26 B	**Pages:**
Version: 1	**Date Début:**
	Date fin
Auteurs: Elena Petre **Approuvé par:**	**Signatures:** **Date:** 21/06/98

Titre: Évaluation de la biodégradation d'un sol contaminé à la saturation en diesel durant la bioaspiration et la bioventilation. Essais en colonnes à l'échelle de laboratoire

Mots clés: biodégrdation, bioaspiration, bioventilation, taux de biodégradation

OBJECTIF

Caractériser le potentiel microbiologique du sol à l'étude afin de valider le concept de biodégradation lors d'un traitement par bioaspiration et bioventilation.

Afin de pouvoir réaliser cet objectif une première étape des essais préliminaires a été effectuée pour la définition du système d'étude. Cela a consisté en la :

- Détermination des propriétés initiales physiques, géotechniques et chimiques du sol,
- Caractérisation initiale du potentiel de dégradation de la flore microbienne indigène du sol,
- Caractérisation initiale de la contamination du sol.

Le dispositif expérimental utilisé pour l'étude de la remédiation biologique d'un sol contaminé à saturation en diesel est composé d'un ensemble de 4 colonnes en acier inoxydable, affectées de la manière suivante:

- Ba1, Ba2: Etude de l'influence du traitement par bioaspiration (pression négative) sur la biodégradation du diesel dans le système d'étude,
- Bac : Etude de l'influence du traitement par succion (pression négative) sur les caractéristiques physico-chimiques du système (colonne abiotique),
- Bv : Etude de la dégradation du diesel dans le système d'étude dans des conditions de bioventilation (pression positive) et cela, uniquement à titre de comparaison.

La gamme de pressions négatives pour le traitement par bioaspiration proposée dans la littérature spécialisée est de 1 à 0,1atm (Hoeppel et al., 1995). A partir des résultats des essais de rétention capillaire, il fut conclu qu'une pression égale ou supérieure à 0,2 atm (i.e., pression d'entrée d'air, Pb - bubbling pressure) déplace les liquides (eau/diesel) présents dans le milieu. Par conséquent, la pression négative à appliquer est égale à 0,2 atm (i.e., 6 psig).

Pour le traitement par bioventilation, une pression positive égale à la pression atmosphérique est appliquée.

Dans les deux traitements, le débit d'air est égal à 2 ml/minute, soit une valeur d'environ 4 volumes des pores/jour. Ce débit est régulé à l'aide d'une pompe péristaltique dans le cas du traitement par bioaspiration et d'un régulateur de débit dans le cas du traitement par bioventilation.

Quant au témoin abiotique, il est difficile de les créer sans affecter l'entièreté des caractéristiques du système d'étude. Toutefois, une colonne, soit la colonne Bac constitue la colonne abiotique, stérilisée à l'aide de $HgCl_2$ (0,5 % p) dans laquelle l'influence du traitement par succion sur les propriétés physico-chimiques du milieu poreux pourra être estimée.

Afin d'assurer la reproductibilité des résultats, les propriétés géotechniques du sol déterminées durant la première phase du projet servent comme paramètres indicateurs lors du remplissage et de la préparation des colonnes, i.e., toutes les colonnes auront autant que possible les mêmes caractéristiques géotechniques et physico-chimiques. Les aspects suivants ont été pris en compte :

- pour minimiser les effets des parois, la longueur de la colonne est deux fois le diamètre,

- pour bien distribuer le liquide à l'entrée et à la sortie, les couvercles des colonnes sont pourvues des cannelures,
- pour prévenir la ségrégation radiale des particules de sol et ainsi les chemins préférentiels une méthode uniforme de compaction est utilisée.

En ce qui concerne les caractéristiques microbiologiques, des essais (i.e., décompte bactérien des hétérotrophes totaux et spécifiques, minimicrocosmes) sont faits pour chaque colonne au début, durant les deux traitements et à la fin des traitements.

La cinétique de la biodégradation est estimée en mesurant la consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone en mode dynamique, les deux étant des paramètres principaux associés à l'enlèvement du substrat organique et à la croissance de la biomasse. Des tests de respirométrie en mode statique (arrêt de l'aération des colonnes) seront faits.

MATÉRIEL

- source de pression positive et négative (l'air et le vide de l'école) ;
- 4 colonnes en acier inoxydable de 20 cm de hauteur et 10 cm de diamètre intérieur, Acier Vaudreuil ;
- 8 rondelles en acier inoxydable de 10 cm de diamètre et de 0,85 cm d'épaisseur prévues d'orifices, Acier Vaudreuil;
- 4 plaques poreuses en céramiques de 10 cm de diamètre et 0,6 cm d'épaisseur (bubbling pressure = 1bar, i.e., ≈ 10 m d'eau en traction) ;
- filtres fins en géotextiles ou métalliques (maille 0,2 mm), pour prévenir le déplacement du sol ;
- 8 plaques carrées en acier inoxydables de 15 cm de côté et 1,2 cm d'épaisseur servant de couvercles ;
- deux ports sont prévus pour chaque plaque, (lieu des connexions des entrés et sorties respectivement) ;
- 8 connecteurs femelle en acier inoxydable SS-QC4-B-4PM, Laurentian valve & fittings ;
- 8 connecteurs mâle en acier inoxydable, SS-QC4-D-400, Laurentian valve & fittings ;
- 9 connecteurs femelle en laiton, B-QC4-B-4PM, Laurentian valve & fittings ;

- 2 connecteurs femelle en laiton, B-400-7-4, Laurentian valve & fittings ;
- 8 raccords cannelés, SS-4-HC-A-401, Laurentian valve & fittings ;
- 8 bouchons (plugs) ¼ NPT, SS-4-P , Laurentian valve & fittings ;
- 2 manomètres allant de -30 psi à +30 psi, précision +/-1%, Labcor ;
- 1 erlenmeyer (1800 ml) servant comme récipient d'humidification de l'air à l'entrée de la colonne traitée en bioventilation ;
- 1 bouteille en verre résistante à la pression (20 l) servant comme récipient d'humidification de l'air à l'entrée des trois colonnes traitées en bioaspiration ;
- 2 pierres à air, (e.g., type A-964) servant comme diffuseurs d'air dans l'eau contenue tant dans l'erlenmeyer que dans la bouteille en verre, Magasin d'animalerie;
- 1 régulateur de pression avec filtre à air, Canada Panel ;
- tube «Tygon» avec parois internes en Téflon, type SE-200 ¼ 1/8 pour la connexion des colonnes, Miller;
- 1 connexion en croix, type B-400-4 pour la connexion de trois colonnes à l'air d'entrée (1/4po de Di), Laurentian valve & fittings ;
- 6 connexions en Té, type B-400-3 pour la connexion des colonnes à la source de pression et à l'analyseur O_2/CO_2, Laurentian valve & fittings ;
- 8 valves à trois voies, type E-30600-10 avec les joints appropriés: mâle, type E-30504-12 et femelle, type E-06359-62, Labcor ;
- 4 récipients (e.g.,fioles biométriques) adaptés et servant à la collecte des liquides récupérés des colonnes durant les traitements) ;
- 8 bouchons en caoutchouc, 4 type 10 et 4 type 8 pour fermer les fioles biométriques ;
- 1 régulateur de débit massique d'air, type Mass-Flo™ controller, opérant de 0-20cm^3/min, précision +/-1% pour réguler le débit d'air, MKS Instruments inc. ;
- 1 débitmètre à bulle de savon;
- 1 pompe péristaltique opérant de 0-100 rpm munie de trois têtes # 14 (Di = 1,6 mm, plage de débits : 0,21-21 ml/minute) pour la régulation du débit dans les trois colonnes affectées au traitement par bioaspiration,
- balance mécanique d'une précision de 0,1g pour le pesage des colonnes (capacité de 16 kg) ;

- 1 appareil analytique muni d'une sonde électrochimique pour mesurer la concentration en phase gazeuse d'oxygène et d'un détecteur infrarouge pour mesurer la concentration en phase gazeuse de dioxyde de carbone, type Nova Analytical Systems inc. modèle 309BWP ;
- 1 ordinateur PC avec le logiciel LABVIEW et une carte d'acquisition de données ;
- 1 convertisseur analogue digital ;
- tubes de charbon activé, type ORBO-32 pour l'absorption des composés organiques volatils (COV), Supelco Canada.

MÉTHODOLOGIE

Préparation et remplissage des colonnes

Avant de procéder à la mise du sol en colonnes, les opérations suivantes s'effectuent :

- laver bien les colonnes et ensuite les rincer avec de l'eau purifiée;
- placer les filtres au-dessous de la colonne de sol pour prévenir la pertes des particules fines;
- saturation préalable des plaques céramiques poreuses en diesel;
- placer les plaques poreuses et les filtres à la partie inférieure des colonnes,
- pesage des colonnes sans sol.

Le sol bien homogénéisé est mis en colonnes en couches successives d'une manière que la masse volumique en place soit à peu près identique pour chacune. Cette caractéristique engendre un même indice de pores donc, une même porosité. Cela est réalisé de la manière suivante :

- peser une quantité de sol de 150 g de sol comptant pour une première couche;
- compacter le sol à l'aide d'un cylindre de compactage en acier inoxydable (poids de 2318,3 g) en appliquant un nombre de 7 - 8 coups;
- scarifier les 2 premiers mm de la couche pour bien faire le lien avec la couche suivante et procéder de la même manière comme pour la première couche jusqu'au remplissage des colonnes;
- obtenir une densité sèche et une porosité constantes (i.e., la densité représente l'indicateur de reproductibilité entre les couches de sol et par conséquent, entre les colonnes).

Note:Le remplissage des colonnes se fait aussi rapidement que possible pour éviter la volatilisation des fractions volatiles du diesel et ainsi perdre une proportion des composés organiques volatils.

- pesage des colonnes remplies de sol.

Validation du dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est testé afin de valider son fonctionnement et d'établir les paramètres d'opération (i.e., débit et pression d'air). D'abord, des tests d'étanchéité du montage sont effectués :

1. sur la colonne vide ;
2. sur la colonne vide + connexions (tubes, valves) ;
3. sur la colonne remplie de sol + connexions ;
4. sur la colonne remplie de sol + connexions + erlenmeyer d'humidification de l'air ;
5. sur la colonne remplie de sol + erlenmeyer d'humidification + appareil de mesure des gaz.

Le débit volumique d'air de chaque colonne est vérifié tant à l'entrée qu'à la sortie à l'aide d'un débitmètre à bulle de savon (25 ml).

Il est à souligner que la teneur en eau du sol d'étude est assez élevée (20 %), vu qu'il provient de la frange capillaire, où le degré de saturation s'approche de la valeur unitaire. Par conséquent, la teneur en eau est suffisante sinon, trop élevée.

Saturation des colonnes en diesel

Compte tenu des objectifs du projet, les quatre colonnes sont soumises à un processus de saturation en diesel. Pour ce faire, elles sont connectées à deux burettes (100 cm^3) : une d'entrée, pour l'alimentation en diesel et l'autre, de sortie pour la récupération du diesel. Une charge hydraulique variant de 45 à 80 cm colonne d'eau est appliquée à chaque colonne. Les colonnes sont considérées saturées lorsque les volumes de diesel à l'entrée sont égaux aux volumes de diesel à la sortie (une représentation graphique du volume entré vs le volume sorti montre une droite à 45°) et de plus, lorsque les masses des colonnes demeurent assez constantes dans le temps. A la saturation la conductivité hydraulique au diesel est mesurée. Un volume de diesel équivalent à plus de 25 volumes de pores sera appliqué.

Suivi expérimental

Des échantillons de sol 20 g (10 g pour les analyses des hydrocarbures C_{10}-C_{50} et 10 g pour des analyses microbiologiques) sont prélevés à la partie supérieure de chaque colonne (profondeur de

7-10 cm) à l'aide des spatules en acier inoxydables sous conditions stériles (dans la hotte microbiologique). Les endroits de prélèvement varient à chaque échantillonnage sur la section transversale des colonnes, mais tout en gardant la même profondeur. L'espace libre formé par les prélèvements de sol est atténué en nivelant le sol autour de l'endroit et ensuite compacté.

Durant la période d'opération du dispositif, tant la consommation d'oxygène que la production de dioxyde de carbone sont suivis à l'aide de l'analyseur O_2/CO_2 auquel les colonnes peuvent être raccordées séquentiellement à l'aide des connexions en Té et des valves à trois voies. Ces valeurs permettent de tirer les informations suivantes :

- temps d'acclimatation (Lag),
- temps d'initiation de la consommation en O_2 et/ou production de CO_2,
- temps de terminaison ou de déclin de la croissance,
- taux de respirométrie (taux de biodégradation du contaminant),
- facteurs limitants la biodégradation,
- optimisation de la biodégradation.

Les trois colonnes destinées au traitement par bioaspiration sont raccordées au système de vide de l'école par la partie inférieure, tandis que la quatrième est raccordée à la pression atmosphérique. L'air est d'abord humidifié et ensuite, régulé à 2ml/minute à l'aide de la pompe péristaltique dans les trois colonnes de bioaspiration et à l'aide d'un régulateur de débit massique dans la colonne de bioventilation. Il entre par les orifices pratiqués à la partie supérieure des colonnes et ensuite, passe à travers les récipients étanches de récupération des liquides expulsés des colonnes (i.e., fioles biométriques).

Afin de réaliser le bilan de masse pour chaque colonne, durant les traitements les COV issus sont absorbés sur charbon activé dans des ampoules insérées en ligne pour les quatre colonnes.

Par des mesures de pressions à l'entrée et à la sortie des colonnes à l'aide des manomètres et d'un différentiel à l'eau, il est possible d'estimer la perméabilité à l'air du milieu. Des régulateurs de pression (positive et négative) sont installés pour les deux traitements. L'évolution de la perméabilité à l'air du milieu se calcule avec la relation suivante (Springer et al., 1997) :

$$k_a = Q_o \left\{ \frac{2\mu L}{A} \cdot \frac{P_o}{P_i^2 - P_o^2} \right\}$$

où :

k_a – perméabilité du milieu à l'air (cm^2);

Q_0 – débit d'air à la sortie (cm^3/s);

μ – viscosité cinématique de l'air (g/cm s).

L – longueur d'écoulement (cm);

A – section transversale d'écoulement (cm^2);

P_o – pression d'air à la sortie (Pa);

P_i – pression d'air à l'entrée (Pa).

Plusieurs temps d'échantillonnage (i.e., temps d'arrêt) sont proposés pour le suivi de l'efficacité du processus de biodégradation. Le tableau 1, montre les paramètres physico-chimiques et microbiologiques suivis et leur fréquence durant la période d'opération des deux traitements.

Tableau 1. Liste des paramètres d'analyse lors des essais en colonnes.

Milieu	Catégorie	Paramètre	Temps d'échantillonnage						
			t_i	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_f
Sol	Physique	Bilan massique	✓						✓
		Perméabilité	C	C	C	C	C	C	C
		Teneur en eau	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Chimique	C_{10}-C_{50}	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		Ph	✓						✓
		Nutriments	✓						✓
		COT	✓						
	Microbiologique	Comptes totaux	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		Sondes génétiques	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
		Microcosmes	✓						
		Minimicrocosmes		✓		✓			
Gaz	Physique	Débit	C	C	C	C	C	C	C
		Pression	C	C	C	C	C	C	C
	Chimique	CO_2	D	D	D	D	D	D	D
		O_2	D	D	D	D	D	D	D
		COV							✓

Note : C – continu; D – discontinu (2 fois par semaine)

La signification des temps d'échantillonnage est comme suit :

t_i: temps initial, soit le remplissage des colonnes;

t_1: 1er essai de saturation en diesel;

t_2: 11 jours de traitement;

t_3: 2ème essai de saturation en diesel (début proprement dit des traitements);

t_4: 14 jours après le début des traitements;

t_5: 41 jours après le début des traitements;

t_f: fin des traitements.

Lorsque les courbes de consommation de O_2 et de production de CO_2 montrent un palier (facteurs limitants la biodégradation) les traitements sont arrêtés.

La figure 1, présente le montage expérimental utilisé pour l'atteinte de l'objectif fixé.

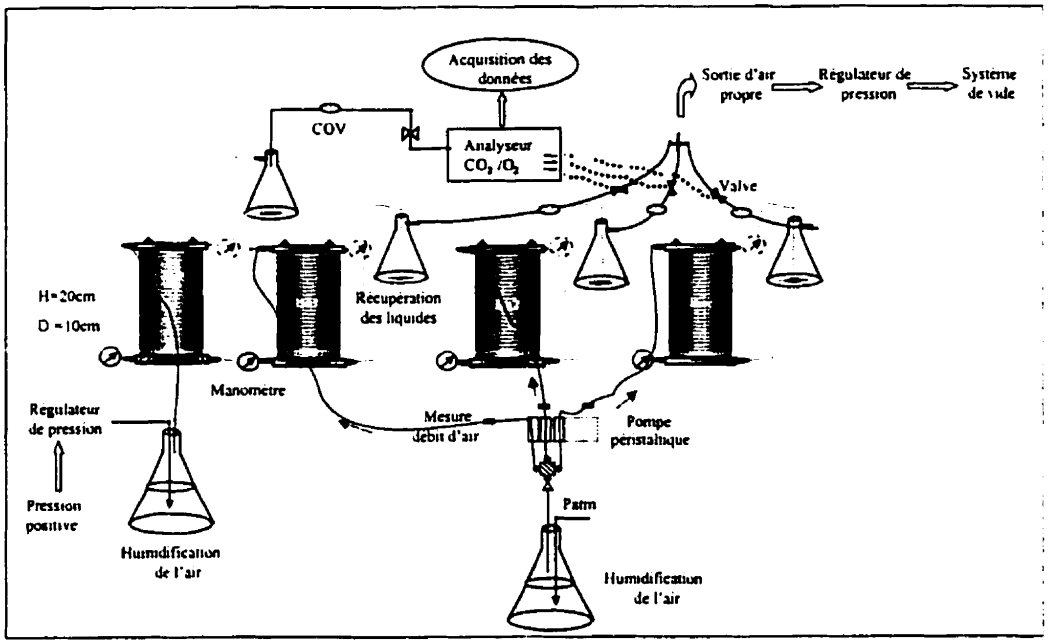


Figure 1. Dispositif expérimental pour vérifier la biodégrdation durant les traitements de bioaspiration et bioventilation

Bilan de masse

Le taux de biodégradation dans les quatre colonnes est estimé par le modèle empirique basé sur la cinétique d'ordre zéro d'utilisation d'oxygène, elaboré par Ong et al., (1994). D'une part, le taux d'utilisation d'oxygène en conditions dynamiques peut être estimé comme suit:

$$K_0 = \frac{Q(C_0 - C_f)}{Vn}$$

où :

K_0 – taux d'utilisation d'oxygène (%/jour);

Q – débit d'air entré (cm^3/jour);

C_0 – concentration initiale en oxygène (%);

C_f – concentration finale en oxygène (%);

V – volume de sol (cm^3);

n – porosité du milieu (cm^3/cm^3).

A partir du taux d'utilisation d'oxygène ci-dessus décrit, le taux de biodégradation peut être estimé en connaissant la masse volumique et la porosité du milieu à traiter:

$$K_B = \frac{-K_0 A D_o C}{100\%}$$

où :

K_B – taux de biodégradation (mg/kg/jour);

K_0 – taux d'utilisation d'oxygène (%/jour);

A – rapport entre le volume d'air et le volume de sol (l/m^3)

D_0 – masse volumique de l'oxygène (kg/m^3);

C – rapport massique entre l'hydrocarbure et l'oxygène;

RÉFÉRENCES

HOEPPEL, R.E., KITTEL, J.A., GOETZ, F.E., HINCHEE, R.E. et ABBOTT, J.E. (1995). Bioslurping technology applications at naval middle distillate fuel remediation sites. In, Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons, R.E. Hinchee, J.A. Kittel, and H.J. Reisinger, Bioremediation 3(6). Battelle Press, 389-400.

Biopro

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	
Protocole #: PE26 C	**Pages:**
Version: 1	**Date Début:**
	Date fin
Auteurs: Elena Petre **Approuvé par:**	**Signatures:** **Date**: 23/03/99

Titre: Dénombrement de la population bactérienne vivante, extraite d'un sol contaminé par des hydrocarbures pétroliers et cultivée sur un milieu nutritif solide.

Mots clés: dilution, étalement, plaques de Pétri, décompte

OBJECTIF

L'objectif de ce protocole est de déterminer la population bactérienne vivante, extraite d'un sol contaminé par des hydrocarbures pétroliers légers (e.g., diesel), diluée et inoculée sur un milieu nutritif solide appropriée, en l'occurrence, YTS 250 (i.e., Yeast – extrait de levures, Tryptone - tryptone et Starch – amidon, en proportion de 250 mg/L d'eau de chacun).

MATÉRIEL

- 5 g de sol ou moins (i.e., 1-2 g), s'il y a une limitation en sol;
- spatules ;
- tubes de 50 ml (25 mm × 150 mm) ;
- tubes de dilution () ;
- billes de verre (3 mm de diamètre) ;
- pyrophosphate de sodium $Na_4P_2O_7 \bullet H_2O$, (0,1 % w/v) ;
- chlorure de sodium NaCl (0,85 % w/v) ;

- extrait de levure ;
- tryptone ;
- amidon ;
- agar ;
- deux erlenmeyers ;
- pipettes stériles de 1 ml et 5 ml ;
- un bêcher ;
- un cylindre gradué ;
- un barreau aimanté ;
- plaque chauffante agitatrice ;
- eau de robinet ;
- balance mécanique d'une précision de 0,01 g.

MÉTHODOLOGIE

Il est à mentionner que le déploiement de l'expérience doit avoir lieu à l'intérieur d'une hotte microbiologique.

Préparation des dilutions successives

Le tube de culture contenant 2,5 g de billes de verre est d'abord stérilisé par autoclavage. La solution à dilution consiste en un mélange de pyrophosphate de sodium $Na_4P_2O_7 \bullet 10\ H_2O$, 0,1 % p/v dans l'eau (pH = 7,0). Cela donne une dilution de l'échantillon de 1:4. De cette solution, une partie est gardée pour la dilution originale du sol dans le tube de culture et une partie pour la préparation des tubes de dilution. Les tubes de dilution contenant 9 ml de solution et la bouteille contenant la solution à dilution pour le tube 50 ml sont ensuite stérilisés par autoclavage.

L'échantillon de sol est prélevé du système d'étude et gardé sur glace. La série de dilution doit être faite aussi rapidement que possible. Une quantité de 5 g de sol ou moins (1-2 g) est prélevée à l'aide des spatules stérilisées à l'alcool et à la flamme et ensuite, mise dans le tube de culture. Il est important de noter que durant le déploiement de l'expérience tant le tube de culture que les tubes de dilution contenant le sol sont gardés aussi sur glace. Un volume de solution de dilution égal à trois fois la quantité de sol est ajouté dans le tube de culture. Par la suite, le tube de culture

contenant le sol, les billes en verre et la solution de dilution est agité au vortex durant 2 minutes exactement à haute vitesse. A l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de cette solution est transféré dans un premier tube de dilution. La série de dilutions continue dépendant de la dilution qui sera étalée sur les plaques de Pétri. Par exemple, pour un sol modérément contaminé, il est usuellement utilisé l'étalement de 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4} sur un milieu non-sélectif et 10^{-1}, 10^{-2} et 10^{-3} sur un milieu sélectif. Dans le cas où le site n'est pas connu, il est bon d'effectuer les quatre dilutions, soit 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4}. Par contre, pour un sol non-contaminé et riche en matière organique, il est mieux d'étaler des dilutions plus grandes, soit 10^{-3}, 10^{-4} et 10^{-5}. Par ailleurs, si le sol est amendé avec des nutriments ou bioaugmenté, la série de dilutions sera en concordance ajustée.

Préparation du milieu nutritif solide

Le milieu de croissance est composé de YTS 250 (i.e., 250 mg/L) et d'agar (15 g/L), ce dernier servant aussi comme agent de solidification.

Les deux erlenmeyers, le bêcher et le cylindre gradué sont d'abord bien lavés pour éliminer toute trace de savon. Le bêcher contenant 250 ml d'eau de robinet et un barreau aimanté est posé sur une plaque agitatrice et chauffante (à très faible température, pour accélérer la dissolution des composants du milieu). Lorsque l'eau est un peu chauffée, les trois composants (i.e., extrait de levure, tryptone, et amidon), en proportion de 250 mg sont versés dans le bêcher et après quelques minutes le restant de 750 ml d'eau de robinet. Dans chaque erlenmeyer sont mis 8,5 g d'agar. Ensuite, le mélange préparé dans le bêcher est partagé en deux à l'aide du cylindre gradué et versé dans les deux erlenmeyers. Ceux derniers sont bouchés à l'aide de bouchons en thermo-mousse couverts par du papier en aluminium, stérilisés par autoclavage et ensuite, refroidis dans un bain d'eau à 50°C.

Les plaques de Pétri sont préparées en conditions stériles i.e., sous la hotte microbiologique. Le goulot de l'erlenmeyer est passé à la flamme avant et après la préparation de chaque plaque de Pétri. Ensuite, les plaques de Pétri contenant le milieu nutritif sont laissées refroidir et ensuite, conservées à l'envers durant 3 jours avant de procéder à l'étalement. Cela assure une surface sèche qui prendra moins de temps pour l'absorption.

Étalement des plaques de Pétri

Les plaques de Pétri ainsi préparées, sont numérotées en y mettant le numéro de l'échantillon, la dilution (e.g., 10^{-2}, 10^{-3}) et la date. Le tube de dilution est agité durant 10-15 sec avant de prélever l'échantillon à étaler. Les plaques sont effectuées en triplicata pour chaque dilution. Un volume de 0,3 ml est prélevé du tube de dilution en question à l'aide d'une pipette de 1 ml stérile et, un tiers (i.e.,0,1 ml) est versé au centre de la surface de chaque plaque constituant le triplicata. Il faut s'assurer que la surface des plaques ne soit pas endommagée ou percée et il ne faut pas la toucher avec la pipette pour pas l'endommager. Ainsi, la pipette doit être tenue aussi verticalement que possible lorsque le volume de 0,1 ml de suspension est versé. Les plaques de Pétri sont posées chacune à son tour au centre du disque rotatif et la suspension présente au centre est étalée à l'aide d'un bâton en verre dit "de hockey", au préalable trempé à l'alcool et passé à la flamme avant et après chaque étalement. Le bâton est laissé à refroidir avant son utilisation. Il doit légèrement glisser sur la surface tout en faisant tourner le disque rotatif afin de créer une répartition uniforme de la suspension sur toute la surface de la plaque. Dans le cas où les plaques de Pétri sont utilisées pour l'enlèvement des colonies nécessaires aux sondes biomoléculaires, il est fortement recommandé de ne pas étaler la suspension très loin vers les bords des plaques mais, à l'intérieur de la membrane ayant un diamètre de 82 mm.

L'étalement doit être continué jusqu'à ce que la surface est asséchée et cela est indiqué par l'adhésion du bâton à la surface. Si la plaque n'a pas été étalée jusqu'à son assèchement, les colonies ne pourront pas être comptées car, plusieurs d'entre elles rentreront dans le liquide restant sur la surface.

Les plaques de Pétri ainsi inoculées doivent être incubées en position inversée à la température de la pièce.

Le décompte des colonies se fait deux fois: une fois après une semaine d'incubation, et une autre fois après deux semaines d'incubation, en laissant ainsi le temps aux colonies plus lentes de croître. Le premier décompte se fait avec une couleur indélébile pour pas que les colonies soient recomptées durant un subséquent décompte où une autre couleur est utilisée.

Les décomptes significatifs de point de vue statistique sont ceux compris entre 30 et 300 colonies. Les résultats des décomptes des unités formatrices de colonies (UFC) sont enregistrés sur chaque plaque correspondant à une dilution donnée.

RÉSULTATS

Les décomptes obtenus sont donnés sous forme de UFC/plaque et afin de les calculer, il faut tenir compte de la première dilution faite (i.e., une masse de sol et 3 volumes de solution à dilution), soit 4, du facteur 10 (i.e., 0,1 ml de suspension étalée sur chaque plaque) et de la dilution. A titre d'exemple, pour une dilution 10^{-4}, le résultat sera :

CFU/g de sol = 4×10×10000 CFU/plaque

Il est à noter que dans le cas où l'enlèvement des colonies est envisagé pour la réalisation des sondes biomoléculaires, un nombre supérieur des colonies devra être utilisé (i.e., 100 - 600) afin d'avoir une meilleure chance d'obtenir des nombres significatifs (colonies répondant positivement), en sachant qu'elles se trouvent en une faible proportion (parfois inférieur à 1 % de toutes les colonies présentes sur plaque).

RÉFÉRENCES

GREER, C, MASSON, L., COMEAU, Y., BROUSSEAU, R. et SAMSON, R. (1993). Application of molecular biology techniques for izolating and monitoring pollutant-degrading bacteria. Water Poll. Res. J. Canada, 28 (2), 275-287.

ANNEXE III : SUIVI DES COMPTES BACTÉRIENS TOTAUX ET SPÉCIFIQUES DURANT LES DEUX TRAITEMENTS

(CFU/g de sol)	t_i	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_f
HT-Ba1	2,16E+08	3,07E+06	3,56E+07	1,88E+07	5,77E+07	5,76E+07	4,59E+07
HT-Ba2	2,89E+08	3,47E+06	5,20E+06	1,30E+07	4,64E+07	4,96E+07	5,45E+07
HT-Bac	nd	2,86E+05	nd	nd	6,21E+06	7,28E+06	1,51E+07
HT-Bv	2,35E+08	1,75E+06	2,68E+07	3,16E+07	3,01E+06	5,11E+07	5,12E+07
***ndoB*-Ba1**	2,67E+05	2,80E+04	8,00E+05	-	-	-	-
***ndoB*-Ba2**	1,20E+06	2,67E+04	2,67E+05	-	-	1,00E+06	5,73E+05
***ndob*-Bac**	nd	-	nd	nd	2,68E+06	3,41E+06	1,60E+05
***ndoB*-Bv**	4,00E+05	5,33E+03	-	-	-	-	2,31E+05
***alkB*-Ba1**	1,73E+06	-	-	-	-	-	-
***alkB*-Ba2**	2,13E+06	-	-	-	-	-	-
***alkB*-Bac**	nd	nd	nd	nd	4,52E+06	4,40E+06	3,32E+05
***alkB*-Bv**	1,73E+06	-	-	-	-	-	-

Ba1, Ba2 – colonnes traitées en mode de bioaspiration;

Bac – colonne abiotique, traitée en mode de bioaspiration;

Bv – colonne traitée en mode de bioventilation;

HT – hétérotrophes totaux;

ndoB – enzyme alcane-hydroxylase;

alkB – enzyme naphtalène-dioxygénase.