Influence de l'hétérogénéité physique des microenvironnements du sol sur les transformations microbiennes du carbone : exploration à l'aide d'un modèle de Boltzmann sur réseau

Laure Vogel

▶ **To cite this version:**

Laure Vogel. Influence de l'hétérogénéité physique des microenvironnements du sol sur les transformations microbiennes du carbone : exploration à l'aide d'un modèle de Boltzmann sur réseau. Sciences agricoles. AgroParisTech, 2015. Français. NNT : 2015AGPT0061 . tel-03117468

HAL Id: tel-03117468
https://pastel.hal.science/tel-03117468

Submitted on 21 Jan 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture Agriculture Alimentation Food Biologie Biology Environnement Environment Santé Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Sciences du sol

présentée et soutenue publiquement par

Laure VOGEL

le 10 novembre 2015

Influence de l'hétérogénéité physique des microenvironnements du sol sur les transformations microbiennes du carbone : exploration à l'aide d'un modèle de Boltzmann sur réseau

Directrice de thèse : **Patricia GARNIER**
Co-encadrante : **Valérie POT**

Jury

M. Jean-Raynald de DREUZY, Directeur de recherche, CNRS, UMR Géosciences, Rennes	Rapporteur
M. Steven SLEUTEL, Professeur, Université de Gent, Belgique	Rapporteur
M. Philippe BAVEYE, Professeur, AgroParisTech, UMR ECOSYS, Grignon	Examinateur
M. Sébastien FONTAINE, Chargé de recherche, INRA, UMR UREP, Clermont-Ferrand	Examinateur
M. Bertrand GUENET, Chargé de recherche, CNRS, UMR LSCE, Gif-sur-Yvette	Invité
M^{me} Patricia GARNIER, Chargée de recherche, INRA, UMR ECOSYS, Grignon	Directrice de thèse
M^{me} Valérie POT, Chargée de recherche, INRA, UMR ECOSYS, Grignon	Co-encadrante

AgroParisTech
ECOSYS
F78850 THIVERVAL-GRIGNON

Résumé

L'activité des microorganismes hétérotrophes contrôle la vitesse de décomposition de la matière organique du sol (MOS) et pourrait donc être déterminante dans la régulation du climat. La forte hétérogénéité spatiale des conditions abiotiques dans le sol est supposée influencer cette activité, en régulant notamment l'accessibilité des nutriments aux décomposeurs via des processus de transport (diffusion, convection) et de rétention (adsorption). L'échelle des microhabitats – soit celle des pores – apparaît donc pertinente pour étudier les processus de biodégradation dans le sol. Elle reste cependant inhabituelle à cause de difficultés expérimentales qui lui sont associées.

Un modèle spatialisé a été construit pour explorer les effets de conditions abiotiques hétérogènes dans les microenvironnements du sol sur la cinétique de biodégradation de substrats carbonés par des microorganismes – représentées ici par des bactéries immobiles. Il résulte du couplage entre un modèle de Boltzmann sur réseau (TRT-LBM [Ginzburg, 2005]) et un modèle biogéochimique de carbone. Il calcule des processus de transport – diffusion – et de biodégradation à l'échelle des pores, dans des milieux hétérogènes dont certaines propriétés structurales sont explicitement décrites, telles que l'architecture de la porosité (implémentée sous la forme d'images discrètes), la distribution de l'eau à saturation partielle et l'arrangement spatial des substrats et des décomposeurs – représentés ici par des bactéries immobiles. L'influence de ces différents facteurs a été évaluée en analysant la variabilité de la cinétique de biodégradation pour une gamme de scénarios décrivant des conditions abiotiques contrastées. Cette source de variabilité a pu être comparée aux incertitudes relevant de la description du métabolisme microbien. Enfin, des expérimentations manipulant la structure de milieux hétérogènes ont été réalisées pour confronter tendances simulées et observées.

Abstract

Heterotrophic microorganisms control soil organic matter (SOM) decomposition and may thus have a key importance in climate regulation. Heterogeneous abiotic conditions in soil microenvironments are thought to affect soil decomposers activity by controlling nutrient accessibility through solute transport (diffusion, advection) and sorption processes. Microhabitat – or pore – scale thus appears relevant to study biodegradation processes, but is also challenging to investigate by experimental means.

A discrete model was created to explore the effect of abiotic conditions in soil microenvironments on biodegradation kinetics. It results from the coupling of a zero-dimensional soil carbon model and a lattice Boltzmann model (TRT-LBM [Ginzburg, 2005]). It simulates diffusion and biodegradation at the pore scale, as affected by explicitly described structural factors, such as the 3D pore architecture (approximated by discrete images), water distribution under unsaturated conditions and the spatial arrangement of substrates and decomposers – viewed here as immobile bacteria. The model was tested in a range of scenarios depicting contrasted abiotic conditions. The variability in biodegradation kinetics was analyzed to infer the contributions of physical factors. This source of variability was compared to uncertainties associated to biological metabolism description. Finally, experiments manipulating structural factors were performed to confront observed and simulated trends.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers mes deux encadrantes, Valérie Pot et Patricia Garnier. Merci de m'avoir fait confiance en m'acceptant dans cette aventure. J'estime pleinement ma chance à cette heure, d'avoir pu explorer un sujet aussi riche et original que celui que vous m'a été confié. Merci de m'avoir guidée avec patience et bienveillance dans la découverte de ses multiples facettes, dont celles pour lesquelles j'étais tout-à-fait novice. J'ai vraiment apprécié la qualité de nos échanges. Je mesure les progrès que vous m'avez permis d'accomplir en me faisant confiance, tout en m'aiguillant toujours dans la bonne direction. J'ai souvent été frappée par la clairvoyance de vos jugements et conseils.

Je remercie vivement les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail, et notamment messieurs Jean-Raynald de Dreuzy et Steven Sleutel qui prennent la charge de rapporteurs. Merci à ce dernier en particulier de faire l'effort de me lire et m'écouter en français. Merci aussi à Sébastien Fontaine et Bertrand Guenet, examinateurs, et Philippe Baveye, président du jury. C'est un honneur de voir mon travail jugé par vous tous et j'espère qu'il en sera à la hauteur.

Je dois remercier beaucoup d'autres personnes pour leur contribution décisive dans cette thèse. Toutes les analyses statistiques présentées dans les chapitres 2 et 3 ont pu être réalisées grâce à l'aide et aux conseils de David Makowski. Je le remercie infiniment pour le temps et l'attention qu'il a accordé à mon travail. Les méthodes qu'il m'a transmises ont permis d'approfondir la connaissance du modèle et les interprétations de ses résultats de manière essentielle. J'ai également pu bénéficier de l'aide précieuse de Ruth Falconer pour les travaux en morphologie mathématique. Elle a accepté de se pencher sur mon travail et a elle-même réalisé certains calculs. Je remercie également les membres du comité de pilotage de ma thèse : Claire Chenu, Yves Coquet, Laure Vieublé, Isabelle Cousin et Gérald Debenest. Leurs réflexions et suggestions sont à l'origine de plusieurs apports substantiels à la démarche initialement prévue.

Je dois aussi beaucoup à tous ceux qui ont permis la réalisation des expérimentations, et notamment Laure Vieublé qui en a assuré la supervision. J'ai une pensée toute particulière pour Yolaine Delaunay, qui m'a apporté son appui technique en microbiologie. Je suis impressionnée et infiniment reconnaissante de son investissement, des efforts qu'elle n'a jamais comptés pour mener à bien nos travaux. Je remercie également Valérie Bergheaud qui m'a encadrée sur les méthodes de suivi radioisotopique, Christophe Labat pour son expertise et son aide en physique du sol, Jean-Noël Rampon qui sait toujours comment calmer les caprices des instruments de mesure et que je suis allée chercher quelques fois à la rescousse à ce titre. Merci enfin à toutes les personnes de l'Université de Hohenheim et à l'atelier de Grignon qui se sont impliquées dans la confection des microcosmes que j'ai utilisés. Merci aussi à Florian et Marc de leurs coups de main et conseils avisés pour les utiliser. Merci enfin à nouveau à Valérie, mon encadrante, qui s'est initiée aux techniques de microbiologie pour participer à la réalisation des incubations.

Je conserverai de nombreux bons souvenirs de ceux que j'ai côtoyés au sein de l'équipe sol de Grignon. La liste est longue et je regrette de ne pas m'étendre plus à leur sujet : Aurore, Myriam, Marie, Karen, Fiona, Paul-Émile, Vincent, Khaled, Yang, Amira, Nadler, Doanh, Sabrina, Laure, Karim, Jesus, Lætitia, Sohaib... Merci pour les moments qu'on a partagés au labo et en dehors. J'aurais aimé qu'il y en ait plus. Merci à Pierre, chef d'équipe toujours disponible pour aider les thésards en panique (par exemple au moment de rendre leur manuscrit) et pour la bonne humeur dont il fait preuve.

Merci à Alix, ma première collègue de bureau, qui m'a aidée à me faire une place ici, et m'a soutenue patiemment dans les moments de doute. Merci vraiment ! Merci à Florian, mon dernier collègue de bureau, dont j'ai apprécié la présence à la fois joviale et sereine, et qui me transmet en ce moment même ses ondes positives.

Je remercie enfin tous les thésards et assimilés, autochtones ou de passage, qui ont contribué à faire de Grignon un endroit si doux et chaleureux à mes yeux. Merci à Gaspard, Anna (merci pour le coup de pouce de dernière minute pour la mise en page), Karen, Guillaume, Marie, Aurore, Olivier, Damien, Clémence, Vincent, Yang, Cecilia, Marie, Élise... Je tiens vraiment à remercier toutes celles et ceux dans l'administration du campus qui ont le souci d'entretenir ce cadre si privilégié. Je pense notamment à Marie-Angèle Briand.

J'ai bien sûr un immense merci (les Kiki !) à adresser à celles dont j'ai partagé le quotidien avec bonheur pendant un peu plus d'une année : Anaïs, Julie et Ophélie. J'ai chéri chaque instant passé en votre compagnie. Merci aussi pour votre présence attentive ces derniers jours. Je n'oublierai pas.

Table des matières

Introduction **1**

1 Principes et structure du modèle couplé **29**
1.1 TRT-LBM : Modélisation des processus hydriques 30
1.1.1 Origine 30
1.1.2 Principe général de l'approche de Boltzmann sur réseau 30
1.1.3 Conditions aux limites 31
1.1.4 Application d'un terme source 32
1.1.5 Différentes approches LBM 33
1.1.6 Exemples d'applications du modèle TRT-LBM 35
1.2 Modélisation spatialisée de la biodégradation avec LBioS 43
1.2.1 Structure du module de biodégradation 44
1.2.2 Couplage du calcul des processus physiques et biologiques 47
1.2.3 Paramétrisation 49

2 Modélisation de l'influence de la structure sur la biodégradation **53**
2.1 Construction d'un plan d'expérience factoriel 54
2.1.1 Images des milieux poreux 54
2.1.2 Caractérisation morphologique 58
2.1.3 Saturation en eau 70
2.1.4 Initialisation de la biodégradation 74
2.2 Analyse de sensibilité globale 77
2.3 Résultats 78
2.3.1 Cinétiques de biodégradation du substrat 78
2.3.2 Analyse de sensibilité 86
2.4 Discussion et conclusion 89

3 Analyse des incertitudes et de la sensibilité du module de biodégradation **93**
3.1 Principes et choix des méthodes 96
3.1.1 Analyse d'incertitudes 96
3.1.2 Analyse de sensibilité 97
3.2 Démarche 98
3.2.1 Architecture du modèle 98
3.2.2 Versions du modèle 98
3.2.3 Origine des valeurs de paramètres 98
3.2.4 Distributions des paramètres 103
3.2.5 Conditions initiales 103
3.2.6 Analyse d'incertitudes par simulations Monte-Carlo 104
3.2.7 Analyse de sensibilité par ANOVA 105
3.3 Résultats 106
3.3.1 Effet de la structure du modèle 106
3.3.2 Effet du changement de distribution 117
3.3.3 Effet du changement des conditions initiales 118
3.4 Discussion 127
3.5 Conclusion 132

4 Étude expérimentale de la biodégradation en milieux homogènes et structurés 133
4.1 Matériel et méthodes . . . 134
4.1.1 Sol . . . 134
4.1.2 Prétraitement du sol . . . 134
4.1.3 Construction des milieux structurés . . . 135
4.1.4 Rétention hydrique . . . 135
4.1.5 Incubations en milieu liquide . . . 137
4.1.6 Incubations en suspension de sol . . . 138
4.1.7 Incubations en milieu structuré . . . 139
4.2 Résultats . . . 141
4.2.1 Rétention des milieux structurés . . . 141
4.2.2 Rinçage du carbone organique dissous natif des agrégats . . . 142
4.2.3 Cinétique de biodégradation en solution . . . 145
4.2.4 Cinétique de biodégradation en suspension de sol . . . 148
4.2.5 Cinétique de biodégradation en milieu structuré . . . 150
4.3 Discussion . . . 156

5 Confrontation entre modèle et expérimentation 159
5.1 Production des images des milieux d'incubation . . . 160
5.1.1 Généralités sur la microtomographie aux rayons X . . . 160
5.1.2 Acquisition des images discrètes des milieux . . . 162
5.1.3 Traitement des images . . . 163
5.2 Initialisation de la biodégradation . . . 168
5.3 Résultats . . . 172
5.3.1 Tendances simulées . . . 172
5.3.2 Confrontation des résultats simulés avec les résultats expérimentaux . . . 174
5.4 Discussion . . . 177

Conclusion 179

Bibliographie 187

Publications 195
Article 1 : Simulation de la bioiodégradation dans les macropores . . . 197
Article 2 : Visualisation et simulation des interfaces eau-air dans la porosité . . . 211

ANNEXES 227

Analyses d'incertitudes et de sensibilité 227

A Code source du programme réalisé pour l'analyse d'incertitudes 227

B Code source du programme réalisé pour l'analyse de sensibilité 229

C Résultats complémentaires des analyses d'incertitudes 231

Protocoles expérimentaux 233

D Protocole de rinçage du DOC du sol 233

E Composition du milieu d'incubation : Solution Cardiff 237

F Protocole d'incubation en milieu liquide 238

G Protocole d'incubation de sol en suspension 240

H Protocole d'incubation en milieu structuré **243**

I Méthodes de mesure utilisées **247**
I.1 Estimations de la biomasse bactérienne 247
I.1.1 Numération cellulaire 247
I.1.2 Mesure spectrophotométrique 247
I.2 Carbone organique en phase liquide 248
I.2.1 Dosage colorimétrique du glucose 248
I.2.2 Dosage du carbone organique dissous (^{14}C) 248
I.2.3 Dosage du carbone organique dissous (non marqué) 249
I.3 Dioxyde de carbone 249
I.3.1 Dosage du dioxyde de carbone radiomarqué ($^{14}CO_2$) 249
I.3.2 Dosage du dioxyde de carbone total ($^{12}CO_2$ + $^{14}CO_2$) 249
I.4 Carbone organique en phase solide 250
I.4.1 Dosage du carbone organique ^{14}C non extrait 250

J Etalonnage des dosages spectrophotométriques **251**

Introduction

Rôles de la matière organique du sol : pour la qualité agronomique du sol et dans le cycle du carbone à l'échelle mondiale

Le sol occupe un rôle central dans l'équilibre de l'écosystème à l'échelle planétaire du fait de sa position, à l'interface entre la lithosphère, l'hydrosphère, l'atmosphère et la biosphère. Le sol représente la pellicule à la surface des continents essentielle pour la société humaine en bien des égards (support pour la vie et la construction, production agronomique, épuration des eaux, régulation des crues et du climat, *etc.*) bien que souvent ignorée d'elle. Son évolution lente en fait cependant une ressource non renouvelable à l'échelle d'une vie humaine, et de plus en plus fragilisée sous l'action directe de l'homme (dégradations liées aux pratiques agricoles, mise en culture de sols forestiers, prairies et zones humides, imperméabilisation, pollutions, *etc.*) et soumise aux répercutions encore mal connues du changement climatique actuellement en cours.

Le sol est le produit de l'altération et du remaniement des roches superficielles sous l'action du climat et des êtres vivants (microorganismes, végétaux, faune du sol). Il reçoit naturellement tout au long de son évolution des apports organiques provenant des organismes qui s'y développent. L'association entre constituants minéraux et organiques est l'essence même de ce matériau, considéré comme le plus complexe sur Terre [Young et Crawford, 2004]. Ce mélange entre organique et minéral détermine l'organisation des particules élémentaires en agrégats. La richesse en matière organique du sol (MOS) est un facteur de qualité des sols, eu égard à ses rôles agronomiques et environnementaux. L'abondance en matière organique tend à augmenter la stabilité et la taille des agrégats [Tisdall et Oades, 1982]. Cette amélioration de la structure augmente la résistance aux stress mécaniques (compaction, érosion) et favorise la circulation des fluides (eau et air), déterminant ainsi en partie les conditions abiotiques du développement des végétaux et des autres organismes. La matière organique représente aussi une ressource en nutriments et en eau, de par sa composition intrinsèque (contenu en C, N et autres éléments essentiels) et sa nature colloïdale responsable de sa faculté à retenir et échanger cations, eau et composés hydrophobes avec la solution du sol.

A présent, la capacité des sols à accumuler de la matière organique est aussi considérée sous l'angle du bilan de carbone planétaire. Les sols contiennent plus de carbone (2300 milliards de tonnes) que l'atmosphère (800 milliards de tonnes) ou que la biomasse végétale (550 milliards de tonnes) [Riebeek, 2011]. La disproportion entre l'atmosphère et le sol en tant que réservoirs de carbone confère à ce dernier le pouvoir de tamponner une partie de l'excédent de carbone atmosphérique libéré par la combustion de ressources fossiles. Elle signifie aussi qu'un changement même minime dans la balance entre entrée et sortie dans le compartiment sol se répercuterait avec un effet amplifié sur l'atmosphère [Rustad et al., 2000].

Une contribution accrue du sol comme puits de carbone est soupçonnée d'avoir tempéré le changement climatique pendant les décennies précédentes [Balesdent et al., 2011]. Cet accroissement présumé du stockage de carbone dans les sols s'expliquerait par la hausse des flux entrants, via l'augmentation de la productivité primaire dans la biosphère (par fertilisation carbonée accrue et par l'allongement des périodes végétatives du fait du réchauffement) [Balesdent et al., 2011]. Il faut cependant étudier la sensibilité des flux sortants du sol (minéralisation de la MOS) en plus de celle des flux entrants (restitution de la biomasse) pour connaître le statut exact du sol vis-à-vis du stockage de carbone et prévoir son évolution en fonction de celle des variables climatiques (température, régime de précipitations).

La décomposition de la matière organique fait l'objet d'une littérature foisonnante, laissant toutefois de nombreuses zones d'ombre malgré plusieurs décennies de recherche sur le sujet. Ainsi, les mécanismes de stabilisation du carbone responsables de son accumulation dans le sol restent hypothétiques et leur contribution respective est inconnue. Les méthodes de datation du carbone ont révélé une très grande variabilité des temps de résidence des composés de la matière organique du sol (allant de la journée à plusieurs millénaires [Balesdent et al., 2011]) que l'on ne sait ni expliquer avec certitude, ni reproduire par modélisation. Une autre question, particulièrement préoccupante, concerne la sensibilité de la décomposition de la matière organique aux deux principales variables climatiques en cours d'évolution : la température et la disponibilité de l'eau.

La compréhension imparfaite des processus de stabilisation et de minéralisation de la matière organique explique la grande diversité des modèles de décomposition de la MOS et les écarts entre les sorties de ces modèles. De tels modèles apparaissent comme sous-unités de modèles globaux utilisés par les experts du GIEC pour dresser leurs scénarios d'évolution du climat. Les modules de sol sont reconnus comme source importantes d'incertitudes des sorties des modèles globaux [Friedlingstein et al., 2006]. Le progrès des connaissances sur les mécanismes de conservation et de libération de carbone par le sol et de leur sensibilité aux variables climatiques est donc plus que jamais souhaité.

Généralités sur la décomposition de la MOS et principaux concepts expliquant la conservation de la MOS

La minéralisation de la matière organique dans le sol est opérée par les microorganismes hétérotrophes du sol. Les composés les plus simples (monomères) peuvent être assimilés par les cellules et serviront à fournir de l'énergie et des molécules pour la synthèse de composés essentiels au métabolisme microbien (maintenance) ou à la réplication cellulaire (croissance). Les résidus de tissus organiques sont fragmentés et dispersés sous l'action de la mésofaune et des flux hydriques. Les polymères qui les constituent doivent être clivés en monomères pour pouvoir être assimilés par les cellules microbiennes. Leur hydrolyse nécessite l'intervention d'enzymes extra-cellulaires (membranaires ou excrétées). Ces enzymes peuvent être spécialement induites par les cellules ou ont pu être libérées antérieurement et avoir perduré et gardé leur activité dans le sol. La minéralisation peut suivre une voie directe (elle provoque alors la libération de molécules inorganiques uniquement) ou indirecte (elle passe par plusieurs réactions donnant plusieurs métabolites intermédiaires). La conservation temporaire du carbone – sa stabilisation – peut résulter de l'absence de transformation par les microbes, d'une dégradation inachevée ou d'une transformation des composés en formes moins facilement dégradables. Ainsi, la composante majoritaire de la MOS, l'humus, provient de la

polycondensation de métabolites microbiens et de molécules partiellement dégradées. Les produits de ces réactions ont des structures chimiques très variées et complexes et, qui plus est, forment différentes associations avec les constituants minéraux du sol.

La stabilisation du carbone dans les sols est une question encore mal élucidée aujourd'hui. Elle repose sur une multitude de facteurs biotiques et abiotiques à l'œuvre simultanément, difficiles à quantifier et même à identifier. Ces facteurs sont fréquemment replacés dans de grands mécanismes conceptuels (voir par exemple Paul [2015]), dont la définition exacte et l'importance relative accordée par les auteurs varie légèrement. Nous proposons maintenant un bref aperçu de l'état de l'art sur la stabilisation de la MOS, construit selon la distinction de quatre grands mécanismes : la récalcitrance, la stabilisation physique et chimique, la régulation par les besoins métaboliques des microorganismes et l'accessibilité physique.

Récalcitrance des composés organiques La notion de récalcitrance désigne la limitation de la biodégradabilité des composés organiques due à leur nature biochimique [Dungait et al., 2012]. Elle se manifeste lorsque l'on compare les cinétiques de biodégradation lors d'incubation de substrats de degrés de complexité chimique variés. La cinétique de minéralisation dans des incubations de sol dure pendant quelques jours pour le glucose, quelques mois pour la cellulose, quelques années pour la lignine [Balesdent et al., 2011]. La biodégradabilité de ces composés varie avec la taille, la nature et la diversité des sous-unités qui les composent et celle des liaisons entre ces sous-unités, impliquant différents types d'enzymes spécifiques. La faculté des composés organiques à être décomposés dépend donc en partie de la capacité des communautés microbiennes à fournir en abondance les cortèges enzymatiques appropriés. La récalcitrance est le premier concept avancé pour expliquer la persistance des composés humiques dans le sol. La complexité structurale et la diversité de ces molécules limitent encore aujourd'hui leur caractérisation et la connaissance de leurs voies de dégradation. Toutefois, la récalcitrance seule ne peut pas expliquer leur conservation dans le sol. La relation entre qualité biochimique et âge du carbone n'est pas clairement établie. En effet, chaque classe biochimique montre une valeur moyenne caractéristique (Mean Residence Time) mais aussi une très grande variance dans les temps de résidence pour un même échantillon de sol [Balesdent et al., 2011]. D'autre part, des composés de même nature, prélevés dans le même sol mais à des profondeurs différentes ont à la fois présenté des âges moyens très différents et une même rapidité à se dégrader au laboratoire [Fontaine et al., 2007].

Stabilisation chimique et physique des composés La stabilisation physico-chimique est un concept presque aussi ancien que celui de récalcitrance. L'existence d'associations entre constituants réactifs du sol (complexes argilo-humiques ou organo-minéraux) est invoquée depuis les débuts des sciences du sol et ont depuis été reconnues pour leur rôle dans l'agrégation et la fertilité chimique des sols (capacité d'échanges cationiques). L'interaction de molécules carbonées avec des constituants plus durables pourrait représenter un processus de stabilisation chimique [Berthelin et al., 2011]. Des liens plus ou moins forts entre molécules (liaisons hydrophobes, liaisons hydrogène, Van der Walls, ponts cationiques, liaisons covalentes) ont été observés. Ces interactions pourraient inhiber ou stimuler la capacité des microbes ou de leurs enzymes à transformer les molécules complexées.

Un autre processus impliquant lui aussi les argiles a été mis en évidence. Des résidus organiques se trouvant dans les pores très fins laissés entre les particules d'argiles pourraient être physiquement isolés de l'action des enzymes et des décomposeurs. On parle d'occlusion ou de protection physique.

Bien que le rôle des argiles dans la régulation de la décomposition soit souvent mentionné, le sens de cette régulation reste controversé. Ainsi l'adsorption de molécules réactives a tantôt montré un effet inhibiteur, tantôt promoteur de leur dégradation [Barré et al., 2014]. Le contact facilité entre le substrat et les bactéries en adhésion sur les parois des pores pourrait expliquer l'effet stimulant de l'adsorption sur la biodégradation.

Limitation par les besoins métaboliques des décomposeurs La minéralisation de la matière organique est impliquée dans plusieurs cycles biogéochimiques. Elle est donc à ce titre régie par des flux d'éléments générés par les êtres vivants d'un écosystème. Ces flux sont motivés par la satisfaction des besoins nutritifs des organismes et sont contraints par le bilan énergétique des réactions qu'ils engagent. Dans le sol, les besoins nutritifs des microorganismes du sol rythment la décomposition de la matière organique et lient ainsi les cycles du carbone avec ceux des autres macronutriments. Le couplage entre les cycles du carbone et de l'azote est abondamment étudié car il affecte les performances agronomiques (quantité d'azote disponible pour les plantes) et environnementales (lixiviation des nitrates, émission de gaz à effet de serre) des agroécosystèmes. Les microorganismes ajustent leurs flux de manière à conserver une composition élémentaire fixe. Ce fonctionnement homéostatique se traduit notamment par une **stœchiométrie** C-N déterminée génétiquement et peu variable au cours du temps. Le rapport C/N de la biomasse microbienne est compris entre 8 et 12. Les principaux substrats dont ils se nourrissent sont relativement appauvris en azote (les valeurs sont de 8 - 20 et 20 - 100 pour les humus et les matières organiques fraîches respectivement [Balesdent et al., 2011]). L'azote figure donc souvent comme facteur limitant de la décomposition de la MOS et de la dynamique du carbone.

Le métabolisme microbien est réglé par la stœchiométrie mais aussi par la **balance énergétique** des réactions cellulaires. Ce principe proscrit la dégradation de substrats dont la balance énergétique est négative, c'est-à-dire pour lesquels la dépense engendrée par la dégradation (notamment par la synthèse d'enzymes) est supérieure au gain énergétique rapporté par la consommation. Cet obstacle à la dégradation peut être levé en cas d'apport d'un substrat ayant une balance énergétique plus favorable. La dégradation du substrat apporté accélère la minéralisation de la ressource initiale, indiquant que celle-ci est limitée par l'énergie. Ce phénomène d'altération de la vitesse de minéralisation de la MOS par l'apport d'un substrat exogène, connu sous le nom de *priming effect* a été théorisé [Kuzyakov et al., 2000] et démontré [Fontaine et al., 2007] récemment. Fontaine et al. [2007] font du renouvellement en matière fraîche, inégal entre horizons superficiels et profond, le principal facteur expliquant la différence d'âge des composés carbonés qui s'y trouvent, après avoir exclu les hypothèses de conservation par la récalcitrance ou protection physique. Le phénomène de *priming effect* reçoit beaucoup d'attention dans la communauté scientifique. De nombreux travaux cherchent à quantifier son influence à différentes échelles temporelles et spatiales, voire même son importance dans la régulation du cycle du carbone global. Le *priming effect* est modulé selon les besoins nutritifs des microorganismes et interagit donc avec la contrainte de maintien de la stœchiométrie de la biomasse. Ainsi, l'énergie prodiguée par un substrat à fort rendement énergétique mais pauvre en azote (par exemple le glucose) peut être investie dans la dégradation de ressources moins labiles mais riches en nutriments (par exemple l'humus) [Craine et al., 2007].

L'accessibilité physique Le sol est un milieu universellement qualifié d'extrêmement hétérogène. Cette hétérogénéité résulte de l'assemblage de ses constituants formant un réseau de pores de formes variées et de tailles s'échelonnant sur non moins de huit ordres de grandeur (du nano-

mètre au décimètre). L'hétérogénéité liée à l'agencement spatial de la matrice poreuse entraîne une distribution hétérogène des processus physiques (écoulement d'eau, transport de soluté), des conditions physico-chimiques (concentrations en solutés, pH, oxygénation, *etc.*) et des agents biologiques (abondance et diversité des microorganismes et des enzymes *etc.*), promouvant le maintien de nombreux microhabitats distincts [Foster, 1988; Nunan et al., 2003]. Les conditions dans le sol sont donc très différentes des conditions idéales d'homogénéisation parfaite dans lesquelles les processus microbiens sont généralement étudiés au laboratoire. La grande hétérogénéité des conditions biotiques et abiotiques restreint l'activité de biodégradation aux espaces et moments où toutes les conditions nécessaires pour soutenir l'activité microbienne se rencontrent.

Le concept d'accessibilité physique repose sur la description des paramètres et processus abiotiques qui déterminent localement la capacité des microorganismes à tirer leur énergie et nutriments par la dégradation de ressources. Le statut de l'eau dans le sol mérite une mention particulière dans la problématique de l'accessibilité physique [Bouckaert et al., 2013; Or et al., 2007]. En effet, la distribution de l'eau, résultant de la structure hétérogène de la porosité, est elle-même source d'hétérogénéité spatiale en conditions non-saturées, prédominantes dans le sol. De plus, cette distribution évolue au gré des échanges de masse et d'énergie entre le sol et le milieu extérieur. La distribution de l'eau et de son potentiel énergétique a une influence importante à plusieurs égards sur la vie microbienne du sol. Ses effets sont directs et indirects.

Le potentiel hydrique ψ est une variable macroscopique qui décrit l'état énergétique de l'eau dans les pores du sol par rapport à un état de référence (l'eau libre à pression atmosphérique, à 20°C, à une altitude donnée) [Musy et Soutter, 1991]. Le potentiel est une pression (p) et en possède les unités (pascal, bar). Il se converti aussi naturellement en charge hydraulique (h) pouvant être comparé à une hauteur d'eau (mètre). Le potentiel de l'eau se décompose en plusieurs termes traduisant des champs de force macroscopiques ou des forces résultant d'interactions moléculaires locales (équation 1).

$$\psi = \psi_g + \psi_p + \psi_c \tag{1}$$

Le potentiel gravitaire ψ_g est fonction de la gravité et ne dépend de la profondeur par rapport à l'altitude de référence. Le potentiel de pression ψ_p est tantôt positif en régime saturé, tantôt négatif en régime non saturé. A saturation, il est nommé potentiel de pression hydrostatique et exprime la surpression exercée par le poids de la colonne d'eau sur la matrice poreuse. En conditions non saturées, ψ_p traduit la dépression (ou tension) tendant à retenir l'eau contre les parois des pores par phénomène de capillarité. A ce propos, on approxime les pores dans les lois à l'échelle macroscopique à une série de capillaires (cylindres) parallèles. La rétention capillaire dépend de l'équilibre entre les forces adhésives (attraction des molécules d'eau par les parois solides) et les forces cohésives (attraction des molécules d'eau entre elles) par le biais de la tension superficielle (tension qui résulte du déséquilibre des forces cohésives à l'interface eau-air). Elle est contrôlée par la géométrie des pores, comme le désigne l'appellation de potentiel matriciel et comme l'exprime la loi de Jurin qui prévoit une hauteur d'ascension par dépression dans un capillaire h_J inversement proportionnelle à son rayon r (équation 2).

$$h_J = \frac{2\sigma \cos \alpha}{(\rho_l - \rho_g) g r} \tag{2}$$

où σ est la tension superficielle, g la gravité, α l'angle de contact et ρ_l et ρ_g les masses volumiques des phases liquide et gazeuse respectivement.

Enfin, la dernière composante du potentiel de l'eau est le potentiel chimique ψ_c, qui décrit la réduction de l'état énergétique de l'eau dans une solution concentrée, par exemple dans les sols salins. Il détermine par ailleurs les échanges osmotiques entre les tissus vivants et la solution du sol.

Les microorganismes représentent 0,5% de la masse du sol. La biomasse microbienne est essentiellement composées de bactéries et de champignons, mais comprend aussi des protozoaires et des virus [Paul, 2015]. La très grande diversité des métabolismes dans les deux premiers groupes leur permet de prendre part à de nombreuses fonctions dans des cycles biogéochimiques. La minéralisation du carbone organique est assurée par les bactéries hétérotrophes et par les champignons. Les premières sont des organismes aquatiques alors que les seconds ont un mode de vie aérien. L'eau a une première influence directe sur les conditions de vie des microorganisme puisque sa distribution définit les espaces colonisables par ceux-ci. La solution du sol constitue le milieu réactionnel dans lequel se déroulent les processus dont dépend leur développement. Au contraire, la phase aqueuse constitue plutôt un obstacle pour les champignons, limitant la progression de leurs hyphes. L'état énergétique de l'eau – son potentiel – a un autre effet direct sur le métabolisme cellulaire. Les organismes régulent leur potentiel cellulaire de manière homéostatique et doivent résister à l'équilibration du potentiel interne avec le potentiel de l'eau ambiant. Un des moyens à leur disposition consiste à ajuster la concentration osmotique interne, notamment en régulant la production de composés cytoplasmiques. Ce mécanisme a évidemment un coût métabolique et ne fonctionne plus au-delà d'une certaine limite. Ainsi, l'accumulation de composés cellulaires lors de conditions d'aridité ou de salinité extrêmes induit un effet toxique qui causerait une diminution graduelle de l'activité microbienne [Chowdhury et al., 2011].

L'eau a enfin un rôle indirect mais primordial grâce à sa fonction de solvant, c'est-à-dire d'agent de transport de solutés. Les microorganismes sont souvent trouvés sous la forme de microcolonies peu abondantes et isolées [Foster, 1988; Nunan et al., 2002]. Cette distribution non-uniforme implique une fréquente déconnexion spatiale entre substrats organiques et décomposeurs, qui fait dépendre la survie des premiers à des mécanismes de transport [Or et al., 2007]. Il peut s'agir de migration active de ces microorganismes vers une source de substrat par chimiotactisme [Van Loosdrecht et al., 1990], ou de transport passif du substrat (ou d'enzymes) par diffusion ou convection selon le régime hydrique. L'état énergétique de l'eau, notamment déterminé par les forces de rétention matricielle, contrôle la vitesse du transport en déterminant notamment la connectivité de la phase aqueuse entre décomposeurs et substrats. L'acheminement du dioxygène est lui aussi primordial. C'est l'oxydant indispensable des réactions aérobies, qui représentent pour les microorganismes hétérotrophes la voie d'acquisition d'énergie la plus efficace. En revanche, la présence d'oxygène est fatale aux microorganismes anaérobies stricts. La distribution de la phase aqueuse détermine celle de la phase gazeuse. La diffusion de l'oxygène dans l'eau est bien plus lente que dans l'air. La diffusion de l'oxygène dans l'eau peut limiter la décomposition par les microorganismes aérobies, lorsque la phase gazeuse est entrecoupée par la phase aqueuse. Enfin, les processus de transport dans l'eau du sol déterminent la vitesse d'homogénéisation des gradients des conditions physico-chimiques définissant l'habitat microbien (pH, potentiel redox).

Les effets multiples de l'eau sur l'activité des microorganismes émanent de processus intervenant à l'échelle de ces organismes mais ont des conséquences observables expérimentalement à des échelles macroscopiques. L'influence du statut hydrique sur la respiration du sol a été étudiée dès le début du XX$^{\text{ième}}$ siècle par Greaves et Carter [1920] et par beaucoup d'autres auteurs depuis. Tous

ces travaux font état d'une même tendance d'évolution de la respiration en fonction de l'humidité du sol (décrite en teneur en eau, potentiel ou indice de saturation) : la respiration démarrerait à une valeur seuil, augmenterait jusqu'à une valeur d'humidité optimale puis déclinerait jusqu'à la saturation totale de la porosité [Franzluebbers, 1999; Howard et Howard, 1993; Linn et Doran, 1984; Weihermüller et al., 2009]. Cette évolution est décrite dans le modèle conceptuel de Skopp et al. [1990] illustré dans la figure 1, qui donne une place importante aux effets de la structure à une échelle fine. La phase d'activité croissante serait due à l'augmentation de la vitesse de diffusion effective des nutriments, du fait de la diminution de la tortuosité dans la phase aqueuse à mesure celle-ci devient plus continue. Le déclin de l'activité serait quant-à-lui expliqué par l'apport limitant d'oxygène du fait du caractère discontinu de la phase gazeuse et de sa lente diffusion dans la phase aqueuse. Si les auteurs s'accordent généralement sur la description qualitative de cette évolution, ils peinent à trouver une expression quantitative commune. Cette absence de consensus est reflétée par la diversité des variables utilisées pour définir l'état hydrique et celle des valeurs seuil et optimales d'humidité. Pour certains auteurs, la relation entre état hydrique et activité microbienne n'est pas unique mais spécifique, fonction des particularités physico-chimiques (texture, teneur en carbone organique, capacité d'échange cationique [Myers et al., 1982]) ou la structure (distribution des tailles de pores [Thomsen et al., 1999]) des différents sols étudiés. D'autres proposent même une description statistique (ajustement de modèle de régression linéaire) pour intégrer la variabilité trouvée entre les différents échantillons de sol [Howard et Howard, 1993; Moyano et al., 2013]. Les succès limités dans la recherche d'une relation universelle entre état hydrique et activité microbienne du sol suggèrent que la variabilité observée à l'échelle macroscopique résulte de la variation des conditions de transport à l'échelle des pores [Baveye et al., 2011].

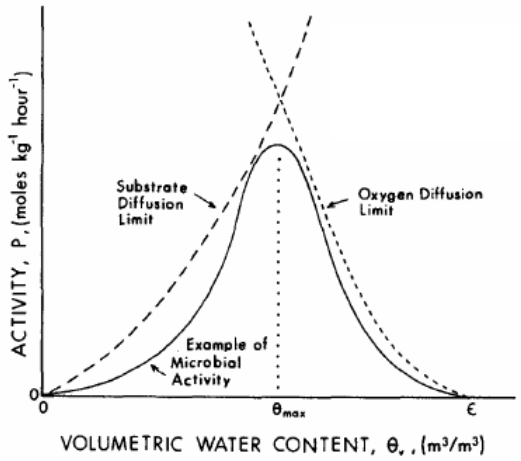


FIGURE 1 – **Modèle conceptuel de Skopp et al. [1990]** décrivant l'évolution de l'activité de microorganismes aérobies selon la teneur en eau.

Les processus de transport ont une place centrale dans le concept d'accessibilité physique car ils permettent l'interaction de composantes malgré leur déconnexion spatiale [Or et al., 2007]. Les mécanismes qui modifient la vitesse de transport (adsorption-désorption) ou induisent une immobilisation (stabilisation physico-chimique, occlusion) sont donc considérés comme importants à cet égard [Kemmitt et al., 2008]. Leur prise en compte dans leur contexte local, à l'échelle des pores du sol, permet d'envisager des effets nuancés voir opposés pour un même mécanisme (comme par exemple la sorption). Ainsi les processus qui ralentissent ou inhibent le transport peuvent

favoriser ou limiter l'accessibilité d'un substrat selon sa disposition par rapport aux décomposeurs.

Modélisation de la MOS, prise en compte des concepts expliquant la stabilisation du carbone du sol

La décomposition de la MOS est un phénomène d'une dynamique très variable étant donnée la diversité des processus et conditions qui l'influencent. Depuis les premiers modèles destinés à la simuler (par exemple, le modèle de Hénin et Dupuis [1945]), les modélisateurs n'ont eu de cesse de complexifier les modèles existants (pour représenter tel aspect particulier), de les simplifier (pour se concentrer sur quelques aspects essentiels) ou d'inventer de nouvelles approches. Cette remise en question continue pendant six décennies a suscité la conception de très nombreux modèles (au moins 250 recensés [Manzoni et Porporato, 2009]). Cette grande diversité est source de variabilité entre les sorties de ces modèles, et donc d'incertitudes. Malgré les spécificités propres à chacun, la plupart fonctionnent selon une logique commune et partagent les traits structuraux essentiels. Ils s'inspirent d'équations issues de quelques travaux fondateurs et en proposent un nombre limité de variantes.

Les modèles de décomposition de la MOS sont presque tous déterministes et processus-orientés [Manzoni et Porporato, 2009]. La matière organique y est séparée en compartiments discrets (ou pools), considérés homogènes en termes de nature, origine, propriétés fonctionnelles ou toute autre caractéristique discriminante. La masse de carbone (et éventuellement d'azote voire d'autres éléments) contenue dans ces pools évolue au cours du temps au gré de flux de transfert entre ces pools. La plupart de ces modèles sont adimensionnels, et décrivent le sol comme une entité physiquement homogène. Seules les variations temporelles sont calculées à l'aide d'équations différentielles ordinaires, impliquant une variable temps continue. Les évolutions sont en générales suivies à moyen (mois, saisons culturales ou années) ou long terme (décennies, siècles). Les échelles spatiales privilégiées sont macroscopiques (par exemple, l'échelle de la parcelle). Cette architecture est héritée du modèle de Hénin et Dupuis [1945].

Le modèle de Hénin et Dupuis [1945] Les premiers modélisateurs de la décomposition de la MOS s'intéressaient à son rôle dans la qualité agronomique des sols et voulaient connaître l'évolution globale de sa teneur pour une parcelle. La variation de la quantité de la MOS était alors calculée en considérant le bilan du carbone entrant et sortant à cette échelle. Le modèle de Hénin et Dupuis [1945] distingue deux pools : l'humus assimilé à la *MOS* et les matières organiques fraîches *MOF* apportées lors d'amendements. La variation temporelle de la MOS calculée selon l'équation 3 n'est fonction que de la vitesse d'humification des amendements (c'est-à-dire leur transformation en humus) et de celle de la minéralisation de la MOS (transformation en CO_2).

$$\frac{dMOS}{dt} = k_h MOF(t) - k_{dec} MOS(t) \tag{3}$$

où t représente le temps, k_h et k_{dec} les constantes de vitesse [T^{-1}] d'humification et de minéralisation. Les flux d'humification (terme à gauche dans l'équation 3) et de minéralisation (terme à droite dans l'équation 3) sont calculés selon des cinétiques d'ordre 1 de chaque pool source. Les valeurs estimées de leurs constantes de vitesse reflètent implicitement l'influence moyennée dans le temps de tous les facteurs censés affecter ces deux processus (qualité biochimique des composés organiques, climat, statut physiologique, abondance et diversité des décomposeurs, *etc.*).

Le modèle de Hénin et Dupuis [1945] est basé sur une approche empirique. Sa simplicité en fait un outil encore utilisé pour des applications agronomiques comme l'ajustement des amendements organiques au champ. Des approches plus sophistiquées ont été développées pour estimer plus précisément l'évolution de la MOS, en intégrant de manière plus mécaniste les facteurs supposés l'influencer.

Structure des modèles « conventionnels » de décomposition de la MOS

Diversification des pools organiques

La première voie suivie pour rendre les modèles plus mécanistes a consisté à diversifier les pools de substrats organiques, car la récalcitrance était alors le concept de régulation de la décomposition le plus en vogue. Les deux pools originels de Hénin et Dupuis [1945] (la *MOF* et la *MOS*) ont été dissociés en plusieurs compartiments dont la constante de vitesse traduit le degré de récalcitrance.

Les pools de MOF (litière) sont fractionnés selon leur composition biochimique, comme dans le modèle CENTURY de Parton et al. [1987] (figure 2) où le coefficient de partage de la litière est calculé selon la teneur en lignine. La MOS est décrite en deux (« carbone labile » - « carbone stable » dans le modèle AMG [Saffih-Hdadi et Mary, 2008]), trois (« pool rapide », « pool lent » - « pool passif ») pools de stabilité croissante, c'est-à-dire avec des constantes de vitesse décroissantes. On peut aussi trouver des pools parfaitement stables dont aucun flux n'entraine la variation au cours du temps (par exemple le pool « inerte » dans le modèle RothC de Jenkinson et al. [1990] ou le pool stable dans le modèle AMG [Saffih-Hdadi et Mary, 2008]).

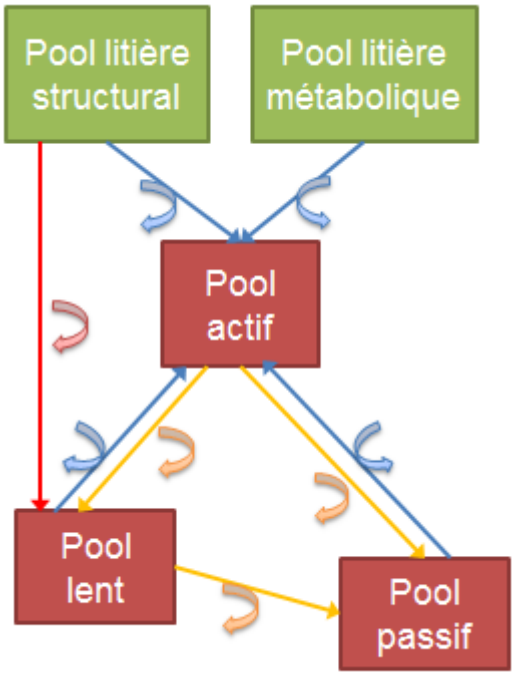


FIGURE 2 – **Schéma conceptuel du modèle CENTURY** d'après Parton et al. [1987]. Les flèches rondes symbolisent l'émission de CO_2. Les flux entrant et sortant de la biomasse sont marqués en bleu et orange respectivement. La flèche rouge représente un flux de stabilisation abiotique

Représentation de l'activité microbienne

Le modèle de Hénin et Dupuis [1945] représentait des flux d'humification et de minéralisation implicitement liés à l'activité des décomposeurs. Dans les modèles plus récents, l'activité des décomposeurs se matérialise par l'émission de CO_2 accompagnant la plupart sinon toutes les transformations. Le flux de décomposition d'un pool organique se calcule selon une cinétique d'ordre 1 du pool donneur et se partage en un flux d'humification (quantité affectée à un autre pool organique) et un flux de minéralisation (carbone respiré).

Dans certains modèles (par exemple Roth-C [Jenkinson et al., 1990], CENTURY [Parton et al., 1987] ou NC-Soil [Molina et al., 1983]), un compartiment spécial symbolise la biomasse microbienne. Ce pool garde cependant un fonctionnement similaire aux pools figurant les substrats : il reçoit et émet les mêmes types de flux, calculés selon une cinétique d'ordre 1.

Enfin, certains modèles comportent des flux purement abiotiques, par lesquels une partie d'un pool (MOF ou MOS) est transférée vers un pool plus stable (voir figure 2.

Limitations environnementales de l'activité microbienne

Le rôle des décomposeurs se manifeste aussi indirectement par le biais de facteurs environnementaux affectant leur activité. Les régulations figurant dans les modèles représentent des contraintes physiques, considérées à l'échelle macroscopique ou sont d'ordre nutritif (limitation de la nutrition carbonée par d'autres éléments limitants, traditionnellement l'azote).

Les facteurs limitants de nature physique sont représentés sous la forme de fonctions de régulation multiplicatives. Elles prennent une valeur comprise entre 0 (inhibition complète du flux en cas de contrainte physique majeure) et 1 (vitesse maximale du flux en conditions optimales) et multiplient tous les flux contrôlés par l'activité microbienne. La cinétique, dont les paramètres reflètent les conditions optimales du laboratoire, peut ainsi être ralentie en cas d'altération des conditions environnementales.

La température et l'humidité sont considérées comme les variables physiques les plus importantes dans la régulation de la décomposition de la MOS [Fang et Moncrieff, 1999]. Les fonctions correctives qui les représentent sont appliquées dans la plupart des modèles. On trouve aussi souvent des fonctions similaires pour prendre en compte l'effet stabilisant des argiles sur la MOS (par exemple CENTURY [Parton et al., 1987], Roth-C [Jenkinson et al., 1990], AMG [Saffih-Hdadi et Mary, 2008]). D'autres facteurs sont plus rarement représentés par de telles fonctions, comme l'oxygénation (Soil-CO_2 [Simunek et Suarez, 1993], PATCIS [Fang et Moncrieff, 1999]), où la contrainte spatiale au développement microbien liée à la densité cellulaire et à la surface de contact entre substrats particulaires et décomposeurs (CANTIS [Garnier et al., 2003]).

Les équations de ces fonctions prennent de nombreuses formes [Moyano et al., 2013; Paul et al., 2003; Rodrigo et al., 1997]. Les fonctions régulatrices de température sont souvent définies d'après la loi d'Arrhenius ou selon l'approche plus empirique du Q_{10} (c'est-à-dire un coefficient d'augmentation de l'activité pour une augmentation de 10°C par rapport à une température de référence) [Rodrigo et al., 1997]. Elles traduisent un effet stimulant de l'augmentation de la température.

Les fonctions correctives d'humidité sont basées sur des études expérimentales montrant l'évolution biphasique de l'activité avec l'augmentation de la saturation en eau (décroissance de l'activité de chaque côté d'un optimum). Comme ces études ne montrent pas de consensus sur les termes quantitatifs de la relation entre humidité et respiration, les équations qui s'y réfèrent varient entre les modèles, en termes de variables utilisées (teneur en eau, potentiel ou charge, indice de satura-

tion), de forme mathématique et de valeurs caractéristiques (seuil et optimum).

La régulation de la minéralisation du carbone par l'azote peut être représentée par une fonction multiplicative (CANTIS [Garnier et al., 2003]). Plus fréquemment, le contrôle du métabolisme microbien par la nutrition azotée est traité dans les modèles couplant les cycles du carbone et de l'azote (par exemple DAISY [Hansen et al., 1991], NC-Soil [Molina et al., 1983], DNDC [Li et al., 1994]). Dans ces modèles, chaque pool organique représente une quantité de C et une quantité de N et un ou plusieurs compartiments d'azote inorganique sont ajoutés. Le pool de biomasse reçoit une somme de flux organiques avec un rapport C/N plus ou moins éloigné de sa propre stœchiométrie. Les modèles imposent une valeur de C/N microbien fixe. Les flux entrants et sortants du pool de biomasse sont contraints par le maintien du C/N microbien fixe. Un excès d'azote dans les flux entrants dans la biomasse va déclencher un flux de minéralisation d'azote, alors que son défaut va induire le prélèvement d'azote minéral (flux d'immobilisation). Si la quantité d'azote minéral est insuffisante, les flux organiques (C et N) peuvent être inhibés, donc la cinétique de décomposition peut être réduite. Un C/N excessif peut être corrigé en augmentant la perte de carbone par la biomasse. La carence en azote stimule alors le flux de respiration et donc la décroissance de la biomasse [Schimel et Weintraub, 2003].

Remise en cause de l'approche « conventionnelle »

Les modèles de décomposition de la MOS modifiés d'après des travaux fondateurs de Hénin et Dupuis [1945] ont intégré les concepts alors les plus influents. Ils sont conçus pour simuler le devenir de composés de nature biochimique diverse, donc avec différents niveaux de récalcitrance. Les facteurs environnementaux les plus communément reconnus pour leur action limitante sur l'activité microbienne sont représentés (température, humidité), via des fonctions multiplicatives appliquées uniformément sur les flux d'origine microbienne. La régulation de l'activité des microorganismes par leur propre métabolisme est en partie traitée dans les modèles intégrant le couplage des cycles du carbone et de l'azote. Enfin, les fonctions multiplicatives macroscopiques peuvent être employées pour représenter le concept de stabilisation physico-chimique par les argiles et même certains aspects relatifs à la régulation par l'accessibilité physique (contrôle par la densité microbienne et la surface de contact avec les substrat, oxygénation, conditions hydriques).

Cette approche reste majoritaire à l'heure actuelle mais est de plus en plus vivement remise en question. L'une des principales critiques à son encontre concerne le traitement superficiel du rôle des décomposeurs et l'indépendance entre activité de décomposition et croissance microbienne. Ce type de modèles ne peut pas simuler les conséquences sur la cinétique de minéralisation de processus complexes dictés par les besoins métaboliques microbiens, tel le *priming effect*. Ce phénomène suppose une interaction entre vitesse de dégradation de pools substrats labiles et récalcitrants via la demande nutritive des microorganismes. Aucun mécanisme ne permet de simuler un tel couplage dans les modèles de l'approche conventionnelle. Les différents pools se dégradent selon une cinétique habituellement utilisée pour les processus physiques – décroissance radioactive – indépendamment les uns des autres. Ces modèles sont aussi attaqués sur leur capacité à reproduire l'effet des régulateurs abiotiques, notamment la température et le statut hydrique. Leur faible performance à simuler les conséquences sur la cinétique de fluctuations rapides des conditions hydriques a été montrée [Manzoni et Porporato, 2007]. Elle est liée à nouveau à l'absence de contrôle direct de la biomasse sur la cinétique de décomposition. L'utilisation de fonctions multiplicatives d'origine empirique est problématique à cause de la diversité de leurs expressions. Cette diversité est

une source majeure d'incertitudes et l'une des principales causes des écarts trouvés dans les sorties des différents modèles [Falloon et al., 2011; Rodrigo et al., 1997]. Le bien-fondé de ces fonctions macroscopiques est questionné avec l'émergence du concept d'accessibilité physique. La variabilité de l'effet des conditions hydriques constatée à l'échelle macroscopique pourrait être déterminée par les paramètres et processus à l'échelle de l'habitat microbien.

Ces critiques de nature diverse ont entraîné deux types d'évolution. Certains modélisateurs ont souhaité aller vers une description plus mécaniste du rôle des microorganismes dans la décomposition. Cela s'est tout d'abord traduit par une recherche de formalismes alternatifs à la cinétique d'ordre 1 décrivant la décroissance d'un substrat. Le désir de mieux intégrer les décomposeurs dans la dynamique de décomposition a aussi entraîné la représentation de nouveaux aspects du métabolisme microbien, comme le calcul des besoins énergétiques de maintenance ou la prise en compte du niveau variable d'activité de la biomasse et du phénomène de dormance, trait physiologique important dans le sol [Wang et al., 2014]. Enfin, des modèles spatialisés ont fait leur apparition pour étudier les aspects relatifs au contrôle de la biodégradation par l'accessibilité physique : distribution des microorganismes et substrats, distribution hétérogène de l'eau et de l'air, processus de transport, effet de la taille des pores, *etc.*

Formalismes liant biodégradation et croissance microbienne

Apports des lois de microbiologie classique

Les modélisateurs de la décomposition de la MOS se sont souvent inspirés des modèles de microbiologie classique qui décrivent la cinétique de croissance ou l'évolution de la vitesse d'une réaction enzymatique. Les cinétiques de ces deux types de processus montrent une bonne répétabilité lorsque les conditions sont simplifiées et strictement contrôlées (milieu liquide homogène, substrat et souche microbienne uniques, masses initiales connues, *etc.*), permettant d'estimer des paramètres cinétiques spécifiques à la souche microbienne et au substrat. Deux types de milieux d'incubation sont considérés : les milieux homogènes fermés (cultures en batch) et les milieux ouverts ou renouvelés (chémostat). Deux modèles élaborés au début du vingtième siècle sont encore aujourd'hui principalement appliqués : le modèle de cinétique de croissance bactérienne de Monod [1941] et le modèle de cinétique de réactions enzymatiques de Michaelis et Menten [1913]. Tous deux ont été établis de manière empirique selon la mesure de la vitesse d'apparition d'une variable produite (composé ou biomasse) en fonction de la vitesse de consommation d'un substrat.

Loi de Monod [1941] La loi de Monod a été développée pour reproduire les cinétiques de croissance microbienne observées et décrites par Buchanan dès 1918. Cette cinétique comprend quatre phases : latence, croissance exponentielle, phase stationnaire et déclin. La phase de latence exprime le délai nécessaire aux microorganismes pour convertir le substrat en biomasse (impliquant des milliers de réactions cellulaires) perceptible alors que la croissance n'a pas encore démarré. Pendant la phase exponentielle qui suit, la biomasse croît en conditions d'excès de substrat. La croissance exponentielle prend fin lorsque le substrat limitant est épuisé. La biomasse atteint alors sa valeur maximale. La biomasse n'évolue plus (phase stationnaire) puis décroît par incapacité à subvenir aux besoins métaboliques nécessaires à sa maintenance.

La loi de Monod décrit les deux premières phases de croissance observées par Buchanan (latence et phase de croissance exponentielle). Elle calcule l'évolution du taux de croissance $\mu(t)$ de la

biomasse B en fonction de la concentration d'un substrat S [M.L^{-3}] selon l'équation 4.

$$\frac{dB}{dt} = \mu(t)B = \frac{\mu_{max}S}{K_s + S}B \tag{4}$$

Le taux de croissance effectif ($\mu(t)$) de grandeur [T^{-1}] évolue en fonction de la concentration en substrat et est déterminé par deux paramètres décrivant les capacités spécifiques de la souche à utiliser le substrat : μ_{max} [T^{-1}] (le taux de croissance optimale) et K_s, la constante de saturation [M.L^{-3}]. μ_{max} est défini d'après le temps de dédoublement de la biomasse et traduit la rapidité de la souche à convertir le substrat en conditions d'abondance. Le ratio μ_{max}/K_s renseigne sur l'efficacité de la souche à convertir le substrat présent en faibles concentrations.

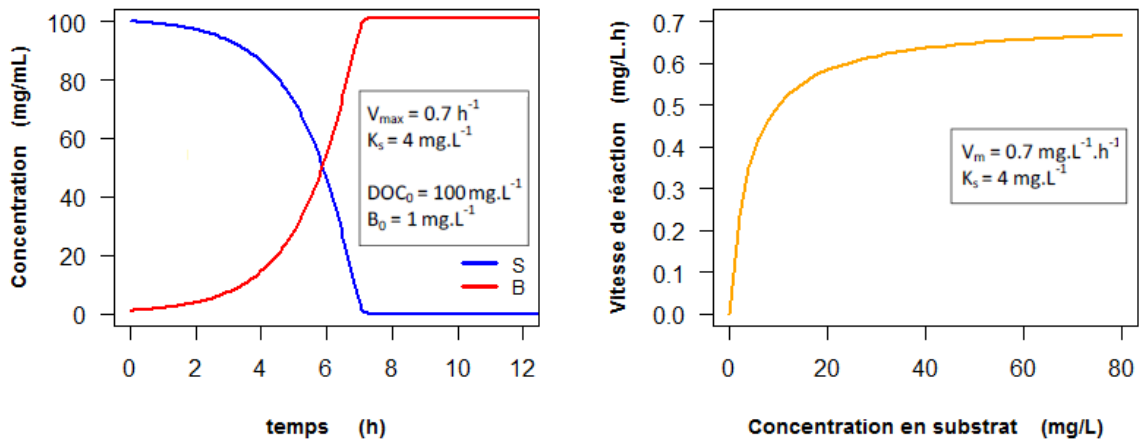
L'allure générale de la cinétique calculée selon la loi de Monod est illustrée dans la figure 3a. La biomasse et le substrat suivent deux sigmoïdes symétriques aboutissant à la conversion totale du substrat en biomasse.

Loi de Michaelis et Menten [1913] La loi de Michaelis-Menten décrit quant-à-elle la cinétique de réactions enzymatiques dans des conditions homogènes et pour une concentration en substrat en large excès par rapport à la concentration d'enzymes. La vitesse [M.L^{-3}.T^{-1}] de transformation du substrat S en un produit P est calculée selon la relation 5 illustrée dans la figure 3b.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{max}S}{K_M + S} \tag{5}$$

où V_{max} [M.L^{-3}.T^{-1}] est la vitesse maximale de la réaction et K_M la constante de Michaëlis-Menten [M.L^{-3}].

Les modèles de Monod et de Michaelis-Menten sont souvent confondus bien qu'ils ne simulent pas exactement les mêmes phénomènes : conversion d'un substrat en biomasse pour l'un, réaction enzymatique pour l'autre. Le modèle de Monod constitue un système à deux inconnues (la biomasse et le substrat) alors que la concentration de substrat ne varie qu'en fonction du temps dans la loi de Michaëlis-Menten.



(a) (b)

FIGURE 3 – **Cinétique de croissance bactérienne selon Monod [1941]** (a) **et cinétique d'une réaction enzymatique d'après la loi de Michaelis et Menten [1913]** (b). Les paramètres de l'exemple donné en (a) sont tirés de Lobry [1991]. L'exemple en (b) est fictif.

Principales équations de décomposition dans les modèles de carbone

Contrôle exclusif par le substrat

Pour commencer, rappelons le terme de décomposition dans les modèles s'inspirant du modèle de Hénin et Dupuis [1945] (équation 3) :

$$\frac{dS}{dt} = -k_{dec}S \tag{6}$$

où S est la concentration en substrat [M.L^{-3}] et k_{dec} une constante de vitesse [T^{-1}].

Contrôle exclusif par les décomposeurs

La disproportion entre le carbone microbien (2% de la MOS) et celui de la MOS suggère une ressource abondante pour les décomposeurs. La décomposition serait donc limitée par ces derniers, non par la source de substrat. Certains modèles traduisent cette idée en calculant la décomposition de la matière organique comme une fonction de la biomasse uniquement [Blagodatsky et al., 2010; Fontaine et Barot, 2005]. La décomposition de la matière organique suit alors une cinétique d'ordre 1 vis-à-vis de la biomasse B (équation 7).

$$\frac{dS}{dt} = -k_{dec}B \tag{7}$$

Parfois, le rôle régulateur des microorganismes est reconnu par le biais des enzymes qu'ils produisent. Le pool d'enzymes se substitue au pool de biomasse microbien (non représenté) [Sinsabaugh et Moorhead, 1994]. La décroissance du substrat est calculée selon l'équation 8, similaire à l'équation 7 si l'on suppose la quantité d'enzymes E proportionnelle à la biomasse B.

$$\frac{dS}{dt} = -k_{dec}E \tag{8}$$

D'autres modèles décrivent explicitement les enzymes et les microorganismes au sein de pools différents mais étroitement connectés [Schimel et Weintraub, 2003]. Il simule la stratégie d'acquisition et d'allocation du carbone (et de l'azote) par les microorganismes au moyen d'exoenzymes. La limitation de la décomposition et de la croissance tient du « retour sur investissement » pour les microorganismes, c'est-à-dire du bilan entre le coût métabolique de la synthèse d'enzymes et le gain représenté par l'assimilation des produits de leur activité. L'hydrolyse de la MOS calculée selon l'équation 9, prévoit un ralentissement de la vitesse de réaction à mesure que la concentration d'enzymes augmente et non celle du substrat, à l'opposé de la loi de Michaelis-Menten. Cette équation a été reprise dans plusieurs autres modèles faisant intervenir les enzymes dans la décomposition de la MOS [Lawrence et al., 2009; Moorhead et al., 2012] et discutée dans de nombreuses études [Manzoni et Porporato, 2009; Moorhead et Sinsabaugh, 2006].

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{k_{dec}E}{K_M + E} \tag{9}$$

Régulation conjointe du substrat et des décomposeurs

On trouve enfin des équations de la biodégradation exprimant la régulation de la biodégradation à la fois par le substrat et par les décomposeurs (ou leurs enzymes).

Parfois, les constantes de vitesse utilisées dans l'équation de la décomposition sont remplacées

par des termes fonction de la biomasse. Dans les travaux de Moorhead et Sinsabaugh [2006] ou de Gignoux et al. [2001], la biodégradation est calculée selon l'équation de Michaelis et Menten [1913] (5) mais dans laquelle les paramètres V_{max} et K_M varient selon B.

Une autre manière de procéder est d'utiliser la loi de Monod [1941]. L'équation 4 est appliquée dans plusieurs modèles de biodégradation [Blagodatsky et Richter, 1998; Ingwersen et al., 2008], notamment ceux qui traitent plus spécifiquement des processus microbiens dans la rhizosphère [Darrah, 1991; Raynaud et al., 2006; Toal et al., 2000; Zelenev et al., 2000]. En effet, la nature soluble des substrats tels que les exsudats racinaires ou les substances nutritives inorganiques est compatible avec les conditions d'application de la loi de Monod. L'équation de Monod induit un effet asymétrique entre les deux variables régulatrices : l'augmentation de la concentration en substrat provoque un effet de saturation, alors que celle de la biomasse entraîne une augmentation proportionnelle de la vitesse de réaction. Une variante de l'équation de Michaelis-Menten est parfois utilisée pour calculer l'hydrolyse de substrats polymériques dans les modèles décrivant la dynamique des enzymes (voir par exemple le modèle de Allison et al. [2010]). Le terme classique de Michaelis-Menten est multiplié par la concentration d'enzymes E (équation 10).

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{k_{dec} S}{K_M + S} E \tag{10}$$

L'équation 10 est comparable à l'équation de Monod (4) si la masse d'enzymes est considérée proportionnelle à la biomasse microbienne.

On notera également une variante de l'équation d'hydrolyse (11) dans le modèle de Schimel et Weintraub [2003], discutée notamment dans la revue de Wutzler et Reichstein [2008], dans laquelle l'équation 9 est multipliée par la concentration en substrat.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{k_{dec} E}{K_M + E} S \tag{11}$$

Une façon plus simple d'exprimer la double limitation de la biodégradation par le substrat et les décomposeurs est donnée dans l'équation 12 [Manzoni et Porporato, 2009; Wutzler et Reichstein, 2008].

$$\frac{dS}{dt} = -k_{dec} S B \tag{12}$$

Cette formulation peut être vue comme une approximation de la loi de Monod, lorsque la concentration de substrat est très faible (comme c'est en général le cas pour des substrats solubles dans le sol), c'est-à-dire lorsque S est très petit devant K_s.

Parmi la grande diversité des modèles traitant de la décomposition de la MOS, certains expriment la double limitation de la décomposition par des moyens originaux. Le modèle MIOR de Masse et al. [2007], basé sur principe d'ajustement de la demande à l'offre, fait intervenir les régulations par le substrat et les décomposeurs de manière alternée, grâce à un fonctionnement conditionnel. Ainsi, la décomposition est tantôt calculée en fonction de la biomasse et de la concentration de substrat, selon que l'offre (la quantité de substrat potentiellement décomposable) satisfasse ou non la demande (les besoins métaboliques des décomposeurs). Dans le modèle de Neill et Gignoux [2006], la réaction de biodégradation est déterminée par les interactions entre biomasse et substrat (prenant la forme de complexes), régulée selon une loi d'action de masse. La partition dynamique entre formes libre et complexée simule une emprise variable entre concentrations de substrat et de décomposeurs. Cette expression flexible de la double-limitation permet d'approcher les cinétiques de plusieurs formalismes, allant d'un contrôle exclusif de la biomasse (comme dans

l'équation 7) ou du substrat (comme dans l'équation 6) en passant par la loi de Monod (équation 4).

Pour finir, le lien entre croissance bactérienne et décomposition du substrat peut être opéré via un compartiment intermédiaire, le carbone organique dissous (DOC). Ce carbone sous forme labile constitue un pool extrêmement dynamique. Il est alimenté par le flux d'hydrolyse de la MOS et détermine la croissance de la biomasse car sa forme soluble en fait la seule source de carbone directement assimilable par les microorganismes. Ainsi, décomposition de la MOS et croissance microbienne sont intimement liées, malgré des équations de décomposition traduisant une limitation exclusive par le substrat (voir par exemple [Zhang et al., 2014]) ou par les décomposeurs (voir par exemple [Blagodatsky et al., 2010]). La structure des modèles qui traduisent ainsi le couplage de la MOS par un pool intermédiaire est dite séquentielle, en opposition avec la structure parallèle classique. Les modèle à structure séquentielle sont considérés plus pertinents pour représenter les interactions entre plusieurs pools de type *priming effect* [Blagodatsky et al., 2010]. Ils sont aussi plus mécanistes car ils distinguent les composés à ingestion directe de ceux qui nécessitent une étape d'hydrolyse (certains modèles décrivent même explicitement l'action catalytique et turn-over des enzymes [Grant et al., 1993; Schimel et Weintraub, 2003]). La formalisation de cette étape est importante dans le concept d'accessibilité physique puisqu'elle peut être limitée par le transport d'enzymes et du DOC si les substrats, la biomasse et les enzymes ont une distribution hétérogène [Kemmitt et al., 2008].

Conclusion

L'équation de biodégradation représente le cœur d'un modèle de décomposition de la MOS. Son choix a des conséquences cruciales sur le comportement du modèle et le rend plus ou moins apte à intégrer les concepts théoriques de régulation décrits précédemment.

- La plupart des modèles de décomposition compte au moins un pool microbien [Manzoni et Porporato, 2009] mais la décomposition des substrats est indépendante de son évolution dans les modèles basés sur les équations 3 et 5. Le phénomène de *priming effect* repose sur l'interaction des vitesses de minéralisation de différents substrats contrôlée par la satisfaction des besoins énergétiques des décomposeurs. Les modèles où le contrôle par la biomasse n'apparaît pas dans l'équation de décomposition sont donc incapables de reproduire le *priming effect* [Blagodatsky et al., 2010; Fontaine et Barot, 2005; Guenet et al., 2010], ce qui pourrait biaiser les prévisions à moyen et long termes des modèles globaux [Fang et Moncrieff, 2005; Todd-Brown et al., 2012]. De plus, l'analyse de la solution à l'équilibre des équations 6 et 5 montre une augmentation limitée ou une disparition de la MOS, en cas d'apports constants ou nuls de matière organique fraîche [Wutzler et Reichstein, 2008]. Cette tendance est démentie par les mesures de datation mettant en évidence des composés carbonés vieux de plusieurs millénaires dans les horizons profonds du sol où les apports en matière organique fraîche sont négligeables [Fontaine et al., 2007]. A plus court terme, les modèles formulant un contrôle exclusif du substrat sont également jugés moins performants que les autres pour rendre compte des fluctuations liées à la variation des conditions hydriques, toujours à cause du découplage entre croissance microbienne et décomposition [Manzoni et Porporato, 2007].

- La formulation du contrôle exclusif de la biodégradation par les décomposeurs (équations 7 et 8) permet de corriger ces défauts, et notamment de simuler le *priming effect* [Blagodatsky et al., 2010; Fontaine et Barot, 2005; Wutzler et Reichstein, 2008]. L'évolution du

système prend des trajectoires radicalement différentes, selon les paramètres de la physiologie microbienne. Elle peut aboutir, selon les apports en MOF, à la disparition de la MOS à la suite d'une consommation effrénée par les microorganismes, à sa stagnation, ou à son accumulation illimitée [Cambier et al., 2007; Fontaine et Barot, 2005; Wutzler et Reichstein, 2008]. La deuxième évolution (stagnation de la MOS) est compatible avec les observations de conservation du carbone dans le sol profond [Fontaine et Barot, 2005]. Les deux autres (épuisement ou accumulation illimitée de la MOS) sont en revanche improbables pour la matière organique du sol. Des facteurs autres que l'alimentation en carbone de la biomasse éviteraient leur survenue [Fontaine et Barot, 2005].

– Les modèles où la double-limitation de la décomposition apparaît sont jugés pertinents pour prendre en compte le *priming effect* et modéliser les processus microbiens à des échelles spatiales et temporelles fines, du fait de l'interdépendance des pools de décomposeurs et de substrat [Manzoni et Porporato, 2009]. Le comportement à long terme est plus nuancé et cohérent lorsque le contrôle par les décomposeurs et le substrat est simultané plutôt qu'exclusif de l'un ou l'autre. Les solutions à l'équilibre des équations 12, 4 et 11 prévoient une stagnation ou accumulation finie de MOS [Wutzler et Reichstein, 2008].

Raffinement de la description du métabolisme microbien

Calcul du métabolisme de maintenance

Bien estimer l'évolution de la biomasse est primordial dans les modèles où la croissance microbienne et la décomposition de la MOS sont couplées. La biomasse ne varie pas seulement en fonction de son alimentation en substrat (gain de carbone) mais aussi selon ses besoins métaboliques (pertes de carbone). Les flux de maintenance sont des flux sortant de la biomasse calculés uniquement en fonction de celle-ci.

Certains modèles dissocient ainsi la respiration de croissance de la respiration de maintenance [Wang et Post, 2012]. La respiration de croissance représente la fraction de carbone consommée non convertie en biomasse mais utilisée dans les fonctions métaboliques permettant la réplication cellulaire. La respiration de croissance $R_C(t)$ est calculée en fonction des flux de décomposition de chacun des X pools assimilés par la biomasse $Dec_x(t)$, d'après un rendement d'assimilation Y_x équivalent au coefficient d'efficience d'utilisation du carbone, CUE (équation 13).

$$R_C(t) = \sum_{x=1}^{X} (1 - Y_x) Dec_x(t) \tag{13}$$

La respiration de maintenance représente le carbone minéralisé pour assurer le métabolisme basal des microorganismes. La respiration de maintenance $R_M(t)$ est calculée indépendamment des flux d'apport de carbone, par une fonction d'ordre 1 de la biomasse (équation 14).

$$R_M(t) = k_r B \tag{14}$$

où k_r est la constante de vitesse de respiration de maintenance.

Un flux de mortalité est fréquemment calculé. Ce flux représente le déclin de la biomasse par la mort à proprement parler de cellules microbiennes, mais aussi par l'excrétion de métabolites

hors des cellules. La mortalité *M(t)* peut être décrite comme un flux de maintenance selon une constante de vitesse k_m que multiplie la biomasse (équation 15).

$$M(t) = k_m B \tag{15}$$

La mortalité peut aussi parfois être exprimée en fonction de la concentration en substrat, comme dans le modèle de [Zelenev et al., 2000], avec une équation de type Michaelis-Menten (équation 5). La mortalité accrue en cas de substrat limitant devient alors un moyen pour les microorganismes d'adapter leur niveau de consommation à la quantité de substrat disponible, en diminuant la biomasse totale.

Prise en compte de l'état physiologique, rôle du phénomène de dormance

Un autre moyen pour les microorganismes d'ajuster leurs besoins aux conditions ambiantes est d'adapter leur état physiologique. Les cellules peuvent gagner un état de dormance lorsque la ressource est insuffisante pour assurer leurs besoins de maintenance. La demande en carbone n'est pas réduite par la diminution de la biomasse totale mais par celle de la proportion de biomasse active. Cette stratégie serait très courante chez les microorganismes du sol, faisant face à une ressource très variable et généralement peu abondante [Konopka, 1999; Lennon et Jones, 2011; Wang et al., 2014]. Deux formes de tolérance à la privation de substrat peuvent être sous-entendues par le terme de dormance [Konopka, 1999]. L'état quiescent correspond à un mode de vie ralenti lorsque les besoins de maintenance ne peuvent plus être assurés. Des formes de résistance plus radicales de type spores peuvent être trouvées lors de conditions environnementales extrêmes et prolongées. Dans ce cas, le passage de la cellule à la spore (et *vice-versa*) engage des transformations physiologiques importantes (dessiccation, mécanismes visant à préserver le matériel génétique, *etc.*) et donc une dépense énergétique conséquente. La régénération des spores, même après une très longue période défavorable est considérée comme un moyen de dissémination des microorganismes [Lennon et Jones, 2011]. Certains auteurs ont intégré la dormance dans leurs modèles comme trait essentiel du métabolisme et de l'écologie microbienne dans le sol (voir par exemple la revue de Wang et al. [2014]). La biomasse est alors divisée en une partie active et une partie dormante. L'évolution de la proportion de biomasse active (ou dormante) est calculée selon la concentration globale de substrat. Pour Neill et Gignoux [2006], la fraction active représente la proportion de biomasse en interaction avec le substrat (complexes biomasse-substrat), calculée selon une loi d'action de masse. Blagodatsky et Richter [1998] introduisent quant-à-eux une variable spéciale d'état physiologique donnant la proportion de biomasse totale active dans une population, selon la concentration de substrat. Dans le modèle MIOR de Masse et al. [2007], la fraction dormante est calculée par différence entre l'offre en substrat et la demande métabolique, lorsque la première est limitante. Dans tous ces modèles, la transition entre état actif et dormant est parfaitement réversible et n'engendre aucune dépense énergétique. L'état dormant représenté correspond alors à un état quiescent selon Konopka [1999]. Dans le modèle de Konopka [1999] en revanche, la mise en dormance correspond à une transformation vers une forme de résistance avec un coût métabolique apparaissant dans le bilan de carbone cellulaire.

Approches spatialisées

Les modèles à compartiments classiques sont adimensionnels. L'espace dans lequel se déroulent les réactions microbiennes n'est pas représenté et est implicitement considéré comme homogène. Dans le sol, les conditions abiotiques sont loin d'être uniformes et cette hétérogénéité est supposée façonner les processus biologiques, selon l'hypothèse de contrôle par l'accessibilité physique. La prise en compte tardive de l'accessibilité physique dans des modèles spatialisés s'explique tout d'abord par la difficulté d'observer les microenvironnements *in situ* et celle de manipuler des caractéristiques physiques hétérogènes à une échelle pertinente pour les microorganismes. L'étude du concept d'accessibilité physique repose donc d'une part sur le développement de moyens d'observation et de protocoles d'incubation innovants mettant en jeu des conditions spatialisées, d'autre part sur la conception de modèles dont la structure permet d'intégrer des processus spatialisés.

Avancées expérimentales

Technologies d'imagerie appliquées à la visualisation des microenvironnements du sol

L'observation au microscope de lames minces de sol permet d'étudier la microstructure de la porosité du sol et de visualiser des microorganismes et des résidus organiques *in situ*. L'agencement spatial dans la porosité peut être observé sur une vaste gamme d'échelles. Les technologies de microscopie électronique (à transmission, *Transmission electron microscopy*, ou à balayage, *Scanning electron microscopy*) permettent de visualiser avec une grande netteté l'organisation à l'échelle des cellules bactériennes voire aux échelles plus fines [Chenu et Plante, 2006]. La visualisation de cellules et de tissus organiques est rendue possible par des traitements chimiques permettant de fixer les cellules et de marquer spécifiquement les différents tissus [Foster, 1988; Nunan et al., 2001; Vandevivere et Baveye, 1992]. L'observation au microscope permet d'obtenir des informations qualitatives sur la structure, l'état, la localisation d'éléments importants dans la description des microenvironnements et des microorganismes eux-mêmes. Toutefois, la vision en deux dimensions limite l'appréciation de la structure (en négligeant des caractéristiques essentielles comme la connectivité des objets) et complique les efforts de quantification. De plus, certaines composantes importantes dans la description des microhabitats, comme l'eau, ne peuvent pas être visualisées *in situ*.

Les technologies d'imagerie non-invasives permettent d'explorer sans la détruire la structure interne d'échantillon, en trois dimensions. Ces technologies reposent sur l'utilisation de sources de rayonnement de haute énergie, capables de pénétrer des objets de nature opaque, tels que la phase solide du sol. Une image 3D est reconstituée à partir d'une succession de projections en 2D prises à différents angles lors du scannage de l'objet. Les projections 2D sont composées d'un ensemble fini de pixels, chacun correspondant au signal modifié par une fraction de la surface scannée, enregistré dans un point de mesure des détecteurs. En conséquence, l'espace dans l'image finale est discrétisé en un ensemble de volumes élémentaires appelés voxels.

La technique non-invasive la plus couramment appliquée pour étudier la structure du sol est la tomographie aux rayons X. Les différentes phases d'un objet peuvent être séparées selon leur propension à atténuer l'intensité des rayons X, fonction de leur densité. Ainsi, les phases solides et poreuses peuvent facilement être différenciées grâce à leurs coefficients d'atténuation contrastés [Ketcham et Carlson, 2001].

L'eau et l'air ont des coefficients d'atténuation des rayons X moins dissemblables. Les interfaces

entre eau et air ont néanmoins pu être discernées par tomographie aux rayons X à une résolution de quelques microns [Pot et al., 2015]. Des agents de contraste sont parfois solubilisés dans l'eau pour mieux la distinguer de l'air [Van Loo et al., 2014]. Ils s'agit d'éléments métalliques aux coefficients d'atténuation élevés, facilement discernables des fluides et des minéraux du sol. Une autre méthode pour cartographier l'eau est la tomographie aux neutrons. Cette technologie est similaire dans son principe à la tomographie aux rayons X, mais la nature du rayonnement (les neutrons) rend la détection plus sensible aux contrastes entre l'eau et l'air.

La visualisation des matières organiques par des approches non-invasives reste plus délicate et différentes méthodes sont encore en cours d'élaboration. La distribution de la MOS en 3D peut être étudiée par tomographie aux rayons X grâce au perfectionnement des protocoles de marquage spécifique par des agents de contraste [Peth et al., 2014; Van Loo et al., 2014].

Les cellules et colonies bactériennes sont difficiles à extraire des autres phases du sol à cause de leur petite taille et de leur faible contraste avec l'eau. Pour l'instant, les tentatives d'observation de cellules *in situ* en 3D fructueuses ont été obtenues avec des techniques destructives incompatibles avec le suivi des processus microbiens (par exemple, la méthode de Ehrhardt et al. [2009] implique un traitement par imprégnation de résine). Inversement, le suivi du développement de cellules actives a été rendu possible par l'utilisation de milieux hétérogènes artificiels, aux propriétés optiques particulières dits « sols transparents » [Downie et al., 2012; Leis et al., 2005].

Biogéographie des microorganismes du sol, conditions abiotiques dans les microhabitats

La distribution des microorganismes n'est ni uniforme, ni aléatoire [Dechesne et al., 2003; Grundmann et al., 2001; Ladd et al., 1996] mais structurée par l'habitat [Hanson et al., 2012]. En conséquence, la taille des colonies et leurs distances de séparation varient en fonction d'agents structurants abiotiques [Nunan et al., 2002] et non seulement en fonction des capacités de dispersion des microorganismes [Hanson et al., 2012; Vos et al., 2013]. A l'échelle de la cellule, une distribution agrégée a été observée. Les cellules sont regroupées en microcolonnies [Foster, 1988; Nunan et al., 2002] dont la densité et la distance de séparation moyennes varient entre horizons superficiels et profonds, selon la richesse en nutriments [Nunan et al., 2002]. La distribution de microorganismes à des échelles plus grossières (infra-millimétrique à centimétrique) peut être analysée en dosant un marqueur génétique ou une activité spécifique après dissection d'un échantillon en agrégats de différentes tailles [Dechesne et al., 2003; Grundmann et al., 2001; Pallud et al., 2004] ou délimitation et cartographie de cubes élémentaires d'un échantillon [Monard et al., 2012; Vieublé-Gonod et al., 2006; Vieublé-Gonod et al., 2003]. La distribution des microorganismes apparaît également hétérogène à ces échelles, sous la forme de *hot-spots* de quelques centaines de microns pour des communautés de bactéries nitrifiantes [Grundmann et al., 2001]. Les grandeurs moyennes rapportées par ces auteurs sont de 250 μm pour le diamètre des amas et de 375 μm pour leur distance de séparation. Les bactéries dégradantes du pesticide 2,4-D ont été observées en colonies regroupées en amas plus ou moins larges et espacés selon la pratique antérieure d'amendements de ce pesticide [Pallud et al., 2004]. Les amas, de 100 à 300 μm, et séparés de 900 μm en moyenne, pour un sol non amendé, s'élargissent (diamètre de 500 μm à 2,25 mm) et se rapprochent (distance de 100 à 700 μm) après amendement en 2,4-D. Les *hot-spots* centimétriques ont été observés dans la dégradation du même pesticide [Monard et al., 2012; Vieublé-Gonod et al., 2006; Vieublé-Gonod et al., 2003].

De nombreuses études cherchent des relations entre taille de pores et colonisation/activité microbiennes [Bouckaert et al., 2013; Ranjard et Richaume, 2001; Strong et al., 2004]. Deux domaines

contrastés se distinguent en termes de conditions de vie pour les microorganismes : l'un constitué par des micropores (pores de diamètre inférieur à 10 μm d'après la classification de Luxmoore [1981]), l'autre dominé par les méso- et macropores. Les bactéries du sol sont préférentiellement retrouvées dans les pores de 2 à 6 μm de diamètre [Foster, 1988; Ranjard et Richaume, 2001], alors que les hyphes de champignons occupent plutôt les macropores [Foster, 1988]. La distribution de l'eau est le principal facteur avancé pour expliquer cette répartition des microorganismes selon la taille des pores [Bouckaert et al., 2013; Thomsen et al., 1999]. En effet, en régime non saturé, les micropores sont caractérisés par une occupation plus importante, moins variable dans le temps et l'espace de la phase aqueuse que les macropores. Ils offrent ainsi des conditions plus stables pour la survie des bactéries et un accès plus constant aux nutriments [Ranjard et Richaume, 2001]. La microporosité favoriserait également la survie des bactéries en limitant l'accès de leurs prédateurs (nématodes, protozoaires) [Foster, 1988; Ladd et al., 1996].

Les macropores présentent également des caractéristiques avantageuses pour l'activité microbienne [Ranjard et Richaume, 2001] : l'approvisionnement en substrats solubles et en oxygène y est plus efficace que dans les micropores et les résidus organiques « frais » y sont plus abondants. Les macropores auraient une influence significative sur la décomposition de la MOS, au moins par un effet indirect (en améliorant l'approvisionnement en oxygène dans les micropores), sur la décomposition de la MOS [Bouckaert et al., 2013]. La proximité et la nature des substrats organiques est un facteur important de la distribution des microorganismes [Ladd et al., 1996]. La distribution des différents composés organiques est décrite comme hétérogène bien que la présence de la MOS soit constitutive du milieu sol. Les particules purement organiques ou minérales sont rares. Les particules organiques libres sont représentées par les résidus organiques frais. Leur taille relativement importante et leur origine les rend plus fréquents dans les macropores et dans les horizons superficiels. Les substrats solubles sont eux aussi plus concentrés en surface du sol (du fait de la proximité de débris en décomposition et par l'influence de la rhizophère) et dans les macropores par le phénomène de transport préférentiel. De manière générale pour le sol superficiel et profond, la MOS est majoritairement présente en association avec la fraction granulométrique des argiles, soit par adsorption, soit par occlusion dans des microagrégats très petits ($\leq 2\mu$m) et très stables [Chenu et Plante, 2006].

Mise en évidence du rôle de l'accessibilité physique sur l'activité microbienne

Les différentes manifestations de l'hétérogénéité dans le sol à l'échelle des microorganismes posent la question des conséquences d'une telle hétérogénéité sur le fonctionnement microbien. Des travaux récents ont testé cette hypothèse en manipulant un ou plusieurs facteurs abiotiques à des échelles fines. Différentes sortes de microcosmes ont été utilisés pour explorer les effets de la structure de manière contrôlée.

Certains travaux imposent des conditions initiales de déconnexion spatiale entre substrats et décomposeurs, rendant l'activité et le développement microbiens entièrement dépendants d'un processus de transport. Des milieux poreux artificiels ont été utilisés pour isoler l'influence de processus de transport de solutés ou de la dispersion de microorganismes. Des cellules de flux (*flow cell*) ont été utilisées pour observer par microscopie l'effet d'apports localisés de substrats sur le développement de biofilms en régime hydrodynamique continu. La dispersion de la biomasse s'est trouvée déterminée par le transport de solutés [Dupin et al., 2001; Knutson et al., 2005; Thullner et al., 2002], initiée aux zones de mélange entre substrats essentiels (donneurs et accepteurs d'électrons) [Knutson et al., 2005; Thullner et al., 2002]. L'impact de la diffusion a été étudié

spécifiquement dans des systèmes statiques interdisant la migration des microorganismes. Dechesne et al. [2008] ont utilisé un milieu composé de deux couches de gélose séparées, l'une contenant un substrat soluble et l'autre inoculée en surface par deux souches bactériennes, et ont constaté que la diffusion limitée du substrat conditionnait la vitesse de croissance et la coexistence des deux souches. De la même façon, les expérimentations de Kim et al. [2008] dans des dispositifs microfluidiques (*microfluidic device*) montrent que la survie de souches bactériennes isolées dans des chambres distinctes, seulement reliées par des nanocanaux permettant la diffusion de métabolites essentiels, s'est avérée déterminée par la distance de séparation entre ces souches. Pinheiro et al. [2015] ont testé différentes modalités de positionnement d'un substrat soluble (le 2,4D) et de microorganismes dans des microcosmes contenant des agrégats stérilisés et compactés dans une colonne. La diffusion limitée du substrat a provoqué une réduction extrême de la minéralisation avec des conditions initiales de déconnexion spatiale. La déconnexion spatiale peut être causée par le placement du substrat et des décomposeurs dans des classes de taille de pore distinctes, grâce à des protocoles d'apports avec modification du potentiel matriciel [Ruamps et al., 2011]. Shaw et al. [2002] ont ainsi placé un substrat soluble dans les micropores et des bactéries dans les macropores d'un sol préalablement stérilisé. Ils ont observé que la diffusion retardée par l'adsorption du pesticide 2,4-DCP limitait fortement sa vitesse de dégradation.

En conditions de saturation partielle, la connectivité de la phase aqueuse limite la diffusion des solutés et la dispersion des microorganismes. Modifier le potentiel hydrique permet d'observer les conséquences sur l'activité microbienne de la connectivité. Le potentiel matriciel a été modulé dans des microcosmes contenant du sable [Treves et al., 2003], un mélange de fractions minérales [Carson et al., 2010] et de sol tamisé [Chowdhury et al., 2011]. L'activité microbienne s'est trouvée réduite [Chowdhury et al., 2011] et la diversité favorisée [Carson et al., 2010; Treves et al., 2003] avec la diminution du potentiel hydrique. Ces deux effets sont attribués à la faible connectivité de la phase aqueuse qui tendrait à isoler les colonies microbiennes et à diminuer la pression de compétition pour la consommation des ressources [Vos et al., 2013].

Méthodes numériques spatialisées

Quelques éléments sur les origines des modèles spatialisés

Des modèles spatialisés sont apparus dans différents champs disciplinaires pour explorer l'influence de l'hétérogénéité spatiale. L'espace est divisé en unités élémentaires où sont calculés les processus selon les conditions locales, exprimées dans les variables d'état dans chaque unité spatiale. Ces calculs sont opérés à des pas de temps réguliers. Les variables d'espace et de temps sont donc discrètes.

Les différentes approches discrètes se distinguent par leur domaine d'origine et leur démarche. Certaines ont une démarche descendante (*top-down*). Les équations différentielles classiques développées pour les milieux continus homogènes sont approximées selon des schémas numériques conçus pour un espace discrétisé (par exemple, les méthodes des différences finies ou des volumes finis). Ce type d'approches est notamment utilisé dans les modèles traitant des processus hydrodynamiques dans les milieux poreux. Dans d'autres approches, le comportement d'un ensemble émerge des interactions de ses composantes microscopiques (démarche ascendante ou *bottom-up*). Le développement des sciences informatiques a permis l'apparition de méthodes algorithmiques telles que les automates cellulaires ou les systèmes multi-agents. Dans la première approche, un quadrillage régulier définit des cellules spatiales, les automates, caractérisées par un état fonction

de l'état de cette cellule au pas de temps précédent et de celui des cellules voisines [Chopard et Droz, 1998]. Cette méthode capable d'engendrer des comportements complexes à partir d'un petit nombre de règles simples, s'est révélée avantageuse dans l'étude des dynamiques spatiales et temporelles de populations en écologie, dont l'exemple précurseur est le *Jeu de la vie de Conway* [Gardner, 1970], qui définit des règles de survie dans une cellule en fonction de l'occupation dans les cellules voisines. En physique, la vision d'interactions microscopiques gouvernant des lois macroscopiques avait été adoptée depuis longtemps déjà. Cette vision est aux fondements de disciplines comme la physique statistique. Les automates cellulaires se sont présentés comme un nouveau moyen de revisiter la théorie cinétique des gaz, élaborée d'après les travaux de Maxwell et Boltzmann à la fin du XIX$^{\text{ème}}$ siècle. Les modèles de gaz sur réseau sont une classe d'automates cellulaires apparue dans les années 1980. Le mouvement macroscopique d'un gaz y est simulé à partir des collisions de particules élémentaires identiques, en chaque nœud d'un réseau. Les modèles de gaz sur réseau ont donné naissance à la méthode de Boltzmann sur réseau dans laquelle des variables continues représentant une probabilité de présence d'une particule remplacent les variables booléennes décrivant la présence ou l'absence d'une particule. La méthode de Boltzmann sur réseau est désormais réputée pour sa performance et sa praticité dans l'approximation des lois fondamentales en mécanique des fluides [Aidun et Clausen, 2010]. Les systèmes multi-agents, dont les modèles individu-centrés (*Individual-based modeling*, IBM) sont des méthodes algorithmiques plus flexibles que les automates cellulaires développées notamment en écologie. Elles permettent de reproduire des réseaux structurés résultant d'interactions spécifiques d'objets de nature diverse entre eux et avec leur environnement [Bousquet et Le Page, 2004].

Modèles représentant l'environnement physique à l'échelle des pores

Ces différentes approches discrètes permettent de prendre en considération la distribution hétérogène et dynamique des entités microscopiques considérées (particules de fluides, individus d'une population) et sont adaptées à l'étude de processus dans des milieux discontinus, dont l'agencement des phases représente une nouvelle source d'hétérogénéité spatiale. La géométrie du milieu poreux peut être implémentée dans les modèles de façon à calculer des processus à l'échelle du pore. Dans les modèles de réseau de pores, la géométrie de milieux poreux est reconstruite sous une forme synthétique, ne partageant que la distribution statistique de quelques traits jugés pertinents (rayon de pores, nombre de coordination, *etc.* [Joekar-Niasar et al., 2010]). Dans l'approche morphologique, on cherche au contraire à approximer la topologie de la porosité à l'aide d'objets mathématiques élémentaires [Hilpert et Miller, 2001], par exemple des sphères connectées inscrites dans l'espace poral [Monga et al., 2008]. Le mode de discrétisation de l'espace des modèles à automates cellulaires et de Boltzmann sur réseau facilite l'implémentation de la topologie avec ces méthodes. Le découpage de l'espace en un maillage régulier est similaire à celui qui est imposé par les méthodes d'imagerie non-invasives, comme la tomographie aux rayons X. Après transformation de l'image brute en image binaire, les voxels de celle-ci sont naturellement définis comme unités de calcul du modèle.

Premières applications des modèles spatialisés à la description de processus microbiens

L'étude du fonctionnement microbien par des modèles spatialisés a tout d'abord été réservée à des problématiques spécifiques pour lesquels la dimension spatiale a toujours été perçue comme incontournable : les phénomènes de colonisation des milieux poreux par le mycélium fongique et

par les biofilms.

Les phénomènes de colonisation de la porosité par les champignons sont souvent simulés avec des modèles individu-centrés (où les individus représentent des segments d'hyphes) [Boswell, 2008; Falconer et al., 2012; Knudsen et al., 2006]. Cette approche s'avère la plus commode pour modéliser la migration d'agents biologiques, ainsi que les phénomènes complexes d'allocation dynamique des ressources internes caractéristiques des champignons. La contrainte spatiale exercée par la topologie de la porosité sur la croissance de la biomasse a pu être modélisée en implémentant des images tomographiques d'échantillons de sol à un modèle de type IBM [Cazelles et al., 2013]. La limitation de la colonisation par la phase aqueuse a pu être simulée en intégrant la topologie de cette phase obtenue par simulation préalable de la distribution eau/air à l'équilibre à l'aide d'un modèle de Boltzmann sur réseau [Falconer et al., 2012].

L'étude des procédés dépendant des biofilms nécessite quant-à-elle une compréhension approfondie des interactions entre développement microbien et propriétés physiques des milieux poreux. Le développement des biofilms est étudié dans des milieux poreux artificiels aux motifs géométriques réguliers ou dans des milieux poreux naturels à l'architecture plus complexe. Les modèles de réseau de pores sont fréquents [Suchomel et al., 1998; Thullner et Baveye, 2008], mais des modèles à automates cellulaires [Picioreanu et al., 1998] et des modèles de Boltzmann sur réseau sont aussi représentés [von der Schulenburg et al., 2009; Yang et al., 2011]. Le couplage entre le transport convectif d'un substrat soluble et l'expansion de la biomasse y est opéré. Ces modèles simulent de plus la rétroaction du développement microbien sur les processus hydrodynamiques (diminution du volume de pore, baisse de la conductivité hydraulique ou de la perméabilité par phénomène de *bioclogging*). Le raffinement de la description de la cinétique de croissance revêt donc une certaine importance dans ces modèles. La croissance est le plus souvent modélisée d'après l'équation de Monod (4) [Picioreanu et al., 1998; Suchomel et al., 1998; Thullner et Baveye, 2008; Yang et al., 2011] considérant alors les microorganismes comme une population homogène, ou par la représentation du comportement autonome des cellules bactériennes, via le couplage avec un IBM [von der Schulenburg et al., 2009].

Les modèles spatialisés comme moyen d'étude du concept d'accessibilité physique

Ces différents modèles appliqués à des problématiques ciblées de l'activité microbienne dans les milieux poreux, ont mis en évidence les possibilités des méthodes spatialisées dans l'exploration du rôle de l'accessibilité dans l'activité microbienne de biodégradation dans le sol. De nouveaux modèles ont été développés pour étudier les différentes hypothèses relatives au contrôle de l'activité microbienne par l'accessibilité. Ainsi, le modèle multi-agents de Masse et al. [2007] met en question la notion de déconnexion spatiale entre décomposeurs et substrats. L'intensité de la décomposition de la MOS est déterminée par la distance entre entités de substrat et de microorganismes réparties de manière hétérogène dans un milieu 3D continu. D'autres modèles attribuent aux phénomènes de transport un rôle central dans le contrôle par l'accessibilité. L'influence du transport est souvent illustrée dans des systèmes simplifiés. Les milieux les plus simples prennent la forme de quadrillages en 2D [Folse III et Allison, 2012; Long et Or, 2009] ou réseaux de pores réguliers [Gharasoo et al., 2012; Knutson et al., 2005; Long et Hilpert, 2008]. Des scénarios mettant en œuvre des distributions, conditions physiques et biologiques contrastés peuvent y être facilement testés. L'effet de la diffusion d'un substrat sur la migration de bactéries par chimiotactisme est étudié par Long et Hilpert [2008], à l'aide d'un modèle de Boltzmann sur réseau. La biomasse est traitée comme une espèce fluide, à la manière du substrat soluble. Dans les modèles de Long et Or [2009] ou de Folse III et Allison

[2012], dans lesquels la croissance et la migration de plusieurs types bactériens est simulée par l'approche IBM, une structuration spatiale des communautés émerge selon la stratégie d'acquisition des ressources diffusant dans le milieu. L'hétérogénéité liée aux caractéristiques physiques du milieu est figurée de manière théorique dans les modèles de Long et Or [2009] ou de Gharasoo et al. [2012]. Dans le premier, des valeurs de teneur en eau et de rugosité de surface différentes entre les pixels affectent les vitesses de diffusion et de migration. Gharasoo et al. [2012] font varier la distribution de taille de pores homogène et hétérogène de leur milieu simplifié. Ils constatent l'importance du transport préférentiel dans la cinétique de biodégradation d'un substrat transporté par convection-dispersion.

Certains travaux témoignent de l'ambition des modélisateurs de décrire les processus de décomposition dans le sol de manière encore plus mécaniste. Les efforts pour améliorer la description ciblent alors la description de l'activité microbienne et la reproduction des caractéristiques structurales du sol. Les substrats organiques sont séparés en un pool de carbone insoluble et un pool de carbone organique dissous (DOC) résultant de l'hydrolyse du premier pool [Monga et al., 2014; Resat et al., 2012]. La production, la diffusion et l'activité des enzymes impliquées dans cette hydrolyse sont parfois explicitement décrites [Folse III et Allison, 2012; Resat et al., 2012]. Monga et al. [2008] ont choisi une approche morphologique pour simuler la décomposition dans l'espace poral d'échantillons de sol, discrétisé en un ensemble de primitives géométriques (des sphères) calculées à partir d'images tomographiques. Ils explorent le rôle de la saturation en eau dans l'accessibilité en simulant au préalable la distribution de l'eau et de l'air dans les sphères. L'activité microbienne de décomposition entre deux sphères adjacentes ne peut avoir lieu que si elles sont hydrauliquement connectées [Monga et al., 2008] et la croissance microbienne est dépendante du transport du DOC dans la phase aqueuse dans la dernière version du modèle [Monga et al., 2014]. La diminution de la saturation entraîne par conséquent une réduction de l'activité microbienne simulée.

Conclusion

L'accessibilité est le dernier, parmi les concepts invoqués dans le contrôle de la dynamique du carbone du sol à avoir reçu considération. Son étude est donc encore à ses débuts. Cette exploration est difficile à mener expérimentalement puisqu'elle fait intervenir des conditions hétérogènes à une échelle représentative de l'habitat microbien. Les modèles représentent donc un moyen d'investigation privilégié dans cette question. Des méthodes spatialisées variées ont récemment fait leur apparition. Elles ont apporté de premières évidences du rôle de l'accessibilité dans la décomposition de la MOS. Toutefois, les résultats encore peu nombreux offrent une vision parcellaire du rôle de l'accessibilité et sont souvent issus de scénarios mettant en œuvre des conditions idéalisées, peu représentatives de l'organisation spatiale complexe dans les sols. Un cadre plus général et plus complet doit être défini, à partir de résultats d'études abordant l'influence de différents facteurs biotiques et abiotiques en interaction et dans un milieu à l'organisation spatiale complexe. Des technologies non-destructives telles que la tomographie aux rayons X permettent d'obtenir une image discrétisée de l'architecture poreuse de sol non remanié. Ce type d'images, montrant un degré de complexité morphologique plus élevé que les milieux virtuels des modèles à réseau de pores, peut être exploité par des modèles à approche multi-agents [Falconer et al., 2012], morphologique [Monga et al., 2014] ou Boltzmann sur réseau [Long et Hilpert, 2008].

L'approche morphologique donne une vision compacte de l'espace poral, car la conversion de l'ensemble de voxels initial en primitives géométriques permet de réduire le nombre d'unités de calcul. Cette propriété garantit une grande efficacité de calcul – les simulations durent quelques

minutes à quelques heures alors qu'elles peuvent prendre plusieurs jours avec une approche lattice Boltzmann [Pot et al., 2015] – laissant la possibilité d'explorer de plus grands volumes qu'avec un modèle LB. En revanche, les processus physiques sont simulés avec une précision moindre à cause d'une discrétisation plus grossière de l'espace poral. La distribution de l'eau et de l'air obtenue par un modèle morphologique s'est avérée moins exacte que celle simulée par un modèle LB dans une étude comparant les deux approches [Pot et al., 2015]. Les systèmes multi-agents sont réputés pour l'adaptabilité de leur structure [Gras et al., 2011] permettant de représenter une grande variété de processus, biologiques en particulier, et de définir l'environnement de multiples façons. L'espace peut ainsi être discrétisé en un réseau de voxels et les calculs opérés dans une image obtenue par tomographie aux rayons X d'échantillons de sol [Cazelles et al., 2013; Falconer et al., 2012]. En revanche, une telle méthode ne permet pas de simuler les processus physiques selon leurs lois fondamentales. Falconer et al. [2012] ont ainsi utilisé un modèle de Boltzmann sur réseau pour reproduire la distribution de l'eau et de l'air avant de simuler le développement fongique avec un modèle multi-agents.

Démarche et objectifs de la thèse

Cette thèse est dédiée à l'élaboration d'un modèle décrivant explicitement le contrôle de la biodégradation dans le sol par des facteurs physiques à l'échelle des pores, afin d'explorer l'hypothèse de contrôle de l'activité biologique par l'accessibilité physique. L'accent porté sur les régulateurs physiques de l'activité microbienne nous a poussés à choisir l'approche Boltzmann sur réseau. En effet cette méthode nous paraît avantageuse par sa précision, sa simplicité dans l'implémentation de milieux poreux complexes et parce-qu'elle offre la possibilité de reproduire avec la même plateforme une variété de processus hydriques. Le modèle sur lequel nous nous basons (TRT-LBM de Ginzburg et al. [2008a]) permet de reproduire des processus à l'œuvre dans différents régimes hydriques : séparation de phases (permettant d'obtenir la distribution de l'eau à l'équilibre en régime non saturé), transport diffusif en régime hydrostatique non saturé, transport convectif en régime hydrodynamique saturé, sorption, dégradation. Les travaux de développement dont il fait encore l'objet laissent entrevoir une gamme d'utilisations encore plus étendue dans le futur ; un objectif à moyen terme concerne en particulier le couplage du transport convectif dispersif en régime hydrodynamique non saturé. Un tel modèle paraît donc particulièrement approprié pour dépeindre finement le rôle central de l'eau et des phénomènes de transport dans la régulation abiotique de l'activité microbienne.

Le travail entrepris dans cette thèse a consisté en premier lieu à coupler le modèle TRT-LBM à un modèle de biodégradation à compartiments, non spatialisé. Ce modèle de biodégradation devait présenter une structure et un comportement relativement simple, pour faciliter l'interprétation des sorties du modèle couplé et souligner les effets attribués aux aspects physiques plutôt qu'aux caractéristiques purement biologiques. Néanmoins, nous avons cherché à rendre ce module de biodégradation aussi pertinent que possible au regard des concepts de régulation autres que l'accessibilité physique :

- l'équation de biodégradation traduit la double régulation du substrat et de la biomasse (loi de Monod, équation 4)
- la structure du module est séquentielle. Le pool de carbone organique dissous (DOC) représente un compartiment intermédiaire central dans l'activité de biodégradation

– l'état physiologique (donc la dormance) peut être pris en compte de manière facultative
– des pools de composés avec différents degrés de récalcitrance peuvent être intégrés

Les principes et les caractéristiques du modèle couplé sont décrits en détail dans le **premier chapitre**.

Nous avons utilisé cet outil pour investiguer les régulations abiotiques de l'activité de biodégradation à l'échelle du pore en testant le modèle dans une multitude de configurations. L'objectif du travail relaté dans le **deuxième chapitre** est de mettre en évidence et de quantifier les effets sur la cinétique de biodégradation de plusieurs facteurs jouant simultanément à une échelle locale. Les quatre facteurs impliqués sont la morphologie de la porosité, l'indice de saturation en eau, la distribution et la physiologie des microorganismes. Pour satisfaire l'objectif de quantification, nous avons cherché des moyens de caractériser les propriétés physiques de nos milieux poreux et nous avons construit nos scénarios selon un plan factoriel complet se prêtant à une analyse statistique dans le but de déterminer les contributions respectives des différents facteurs et termes d'interaction entre plusieurs facteurs.

Nous avons ensuite entrepris d'explorer le comportement mathématique du module de biodégradation et d'estimer les incertitudes qui lui sont associées. Ces incertitudes sont en effet moins bien cernées que celles qui découlent du calcul des processus hydriques par la méthode de Boltzmann sur réseau. Les incertitudes et la sensibilité du modèle biologique seul (sans influence des conditions physiques) ont été analysées à partir de scénarios issus d'échantillonnage des paramètres selon des méthodes globales. Ce travail est décrit dans le **troisième chapitre**.

Les incertitudes des paramètres étudiées dans le chapitre 3 proviennent en partie de la difficulté d'isoler les processus biologiques de l'influence implicite de conditions physiques hétérogènes dans les expérimentations d'incubation classiques. Modèles et expérimentations doivent être pensés conjointement pour que les connaissances provenant des uns nourrissent la réflexion sur les autres et *vice-versa*. Un autre objectif dans cette thèse était de mettre au point des méthodes expérimentales adaptées à l'échelle et aux conditions de notre modèle. Les expérimentations ont été conçues pour servir à la paramétrisation et la validation du modèle. Les méthodes et les résultats expérimentaux sont présentés dans le **quatrième chapitre**.

Pour clore cette thèse (**cinquième** et dernier **chapitre**), nous avons tenté de reproduire les conditions de l'expérimentation de validation à l'aide de notre modèle. Les systèmes expérimentaux employés avaient une structure hétérogène construite selon un protocole particulier. Nous avons retranscrit cette structure dans le modèle en acquérant des images tomographiques de ces milieux poreux et en réalisant le traitement de ces images en vue de leur implémentation dans le modèle. Nous nous avons comparé les variables de biodégradation observées et simulées. Les écarts constatés ont donné l'occasion de discuter de la pertinence des caractéristiques des systèmes expérimentaux et modélisés.

Chapitre 1

Modélisation de la biodégradation couplée à la diffusion de substrats carbonés : principes et structure du modèle utilisé

Ce chapitre présente la structure du modèle spatialisé conçu pour simuler la biodégradation affectée par les conditions abiotiques hétérogènes à l'échelle des pores. Nous avons choisi une approche de Boltzmann sur réseau permettant de calculer des processus physiques variés selon leurs lois fondamentales tout en intégrant facilement la structure 3D de milieux complexes, par l'implémentation aisée d'images discrètes issues de technologies d'imagerie non-invasives. Nous introduirons dans ce chapitre quelques principes de la méthode sur Boltzmann sur réseau, puis nous décrirons le modèle particulier que nous avons utilisé : le TRT-LBM pour *Two-relaxation-time Lattice Boltzmann Model* de Ginzburg [2005].

Dans cette thèse, le modèle TRT-LBM est utilisé pour deux domaines d'application importants dans la description des conditions abiotiques dans les microhabitats : le transport de solutés et la séparation de phase, permettant d'obtenir la distribution de l'eau et de l'air dans la porosité à saturation partielle. Nous donnerons quelques exemples d'utilisation du modèle TRT-LBM pour la simulation de différents processus physiques en régimes hydrostatique et hydrodynamique.

La tâche qui a constitué le point de départ de cette thèse est le couplage du TRT-LBM avec un module biogéochimique de carbone. Le modèle couplé – appelé LBioS pour *Lattice Boltzmann model for Biodegradation affected by soil Structure* – peut simuler simultanément le transport diffusif d'un substrat et sa consommation par des bactéries. Nous présenterons les équations du modèle de biodégradation ainsi que les caractéristiques propres au couplage des deux modèles comme la spatialisation des décomposeurs et des substrats et la coordination des calculs de transport et de biodégradation à l'échelle du voxel ou site. Nous finirons par la question de la paramétrisation du modèle et la conversion nécessaire des paramètres macroscopiques en valeurs compatibles avec la méthode de calcul discrète.

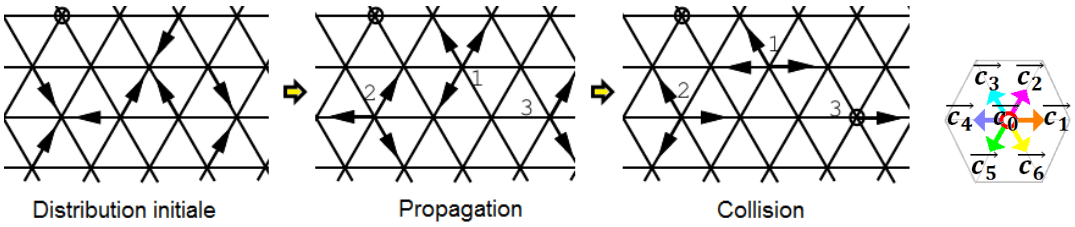
1.1 Simulation des processus hydriques par la méthode de Boltzmann sur réseau

1.1.1 Origine : théorie cinétique des gaz

L'approche de Boltzmann sur réseau s'inspire de la théorie cinétique des gaz formalisée par Ludwig Boltzmann [1872]. Les gaz, puis par extension les fluides, sont décrits comme un ensemble de particules élémentaires. Elles sont en mouvement (« vol libre ») et effectuent des collisions dites élastiques entre elles : il n'y a pas de transfert de matière ou d'énergie interne mais uniquement un changement de direction. Un nombre infini de particules se déplacent dans une infinité de directions à une infinité de vitesses différentes. Le comportement macroscopique d'un fluide que nous percevons représente la moyenne de ces interactions à l'échelle microscopique.

1.1.2 Principe général de l'approche de Boltzmann sur réseau

Les fluides sont également regardés à une échelle micro- (ou mésoscopique) dans les modèles de l'approche LBE (*lattice Boltzmann Equation*). Les fluides sont discrétisés en particules appelées populations ($\vec{f}$). L'espace est discrétisé sous la forme d'un réseau : maillage régulier dans D dimensions. Le temps est traité lui aussi de manière discrète. Les populations se trouvent sur les nœuds du réseau (ou sites $\vec{r}$) et sont affectées en chaque site à un des Q vecteurs de vitesse microscopique ($\vec{c_q}$ avec $0 \leq q < Q$). Q est défini par le nombre de premiers voisins d'un nœud plus lui-même. Le vecteur $\vec{c_0}$ représente la vitesse nulle, la population f_0 est donc immobile sur le site $\vec{r}$. A chaque pas de temps se succèdent une étape de collision et une étape de propagation. L'indice q pour $q = 1, \ldots, Q-1$, détermine la direction du site premier voisin vers lequel la population f_q va être transférée à la suite de la collision, lors de la propagation. L'évolution des distributions de populations en un pas de temps est donnée en exemple pour un réseau D2Q7 dans la figure 1.1.



(a) (b)

FIGURE 1.1 – **Évolution des distributions de populations** (a.)**et vitesses microscopiques** (b.) dans un réseau D2Q7 L'illustration en (a.) est issue de [Pot, 2011].

La distribution des populations résultant de la collision des populations f_q en un site $\vec{r}$ est transcrite dans l'équation d'évolution microdynamique (equation 1.1) [Dubois, 2007].

$$f_q(\vec{r} + \vec{c_q}, t+1) - f_q(\vec{r}, t) = \sum_{q=1}^{Q} S\left(f_q(\vec{r}, t) - f_q^{eq}(\vec{r}, t)\right) \tag{1.1}$$

Le terme de droite représente l'opérateur de collisions. Le terme de gauche représente l'étape de propagation avec la translation de la population f_q du site $\vec{r}$ vers le site voisin $\vec{r} + \vec{c_q}$ au pas de temps suivant $(t+1)$.

Lors de la collision, la distribution des populations f_q est résolue par linéarisation autour de leur valeur à l'équilibre f_q^{eq}. S est une matrice de dimension Q^2. Elle est composée des valeurs propres de l'opérateur de collision (λ_q). Les coefficients λ_q sont liés aux temps de relaxation du modèle τ_q par la relation $\lambda_q = -\frac{1}{\tau_q}$. Les valeurs propres λ_q doivent être comprises dans l'intervalle $]-2;0]$ pour rester dans le domaine de stabilité du modèle [Dubois, 2007].

La réorganisation des populations en chaque site est réglée de manière à respecter les lois physiques macroscopiques générales et spécifiques au phénomène étudié. Ainsi, la matrice de collision est construite de manière à respecter la loi de la conservation de la masse (équation 1.2) et de la quantité de mouvement (equation 1.3).

$$\sum_{q=0}^{Q-1} S = 0 \tag{1.2}$$

$$\sum_{q=0}^{Q-1} S\vec{c_q} = 0 \tag{1.3}$$

Les fonctions de distribution à l'équilibre f_q^{eq} vers lesquelles convergent les populations f_q sont déterminées de manière à retrouver les solutions des lois régissant les processus de transfert. Leur expression générale est donnée dans l'équation 1.4 [He et al., 1997].

$$f_q^{eq} = t_q^* \left[\rho\, cs^2 + \vec{c_q}.\vec{u} + \frac{3}{2}(\vec{c_q}.\vec{u})^2 - \frac{1}{2}\vec{u}.\vec{u} + O(u^3) \right] \tag{1.4}$$

ρ et $\vec{u}$ représentent respectivement la densité et la vitesse macroscopique. cs^2, le carré de la vitesse du son, est un paramètre libre dans le modèle. Sa valeur est généralement fixée à $\frac{1}{3}$. Les paramètres t_q^* sont les facteurs de poids qui redistribuent la quantité de masse et de mouvement sur un site. Ils sont déterminés de manière à respecter les conditions énoncées dans la relation 1.5 [Ginzburg et al., 2008b].

$$\sum_{q=1}^{Q-1} t_q^* c_{q_\alpha} c_{q_\beta} = \delta_{\alpha\beta}, \quad \forall\alpha,\beta, \qquad\qquad 3\sum_{q=1}^{Q-1} t_q^* c_{q_\alpha}^2 c_{q_\beta}^2 = 1 \quad \alpha \neq \beta \tag{1.5}$$

Les indices α et β représentent deux directions du plan cartésien. δ est le symbole de Kronecker.

Les correspondances nombreuses entre grandeurs microscopiques et macroscopiques rendent le changement d'échelle aisé. Ainsi, l'expression de la densité ρ et de la quantité de mouvement macroscopiques $\vec{j}$ en chaque site d'après les fonctions de distributions locales sont données dans les équations 1.6 et 1.7.

$$\rho = \sum_{q=0}^{Q-1} f_q(\vec{r},t) \tag{1.6}$$

$$\vec{j} = \rho\vec{u} = \sum_{q=0}^{Q-1} \vec{c_q}\ f_q(\vec{r},t) \tag{1.7}$$

1.1.3 Conditions aux limites

Représentation de la phase solide

Les sites sont régulièrement disposés aux nœuds d'un réseau orthogonal. Pour représenter l'architecture d'un milieu poreux, ces sites se voient affectés dans des classes aux règles de calcul

spécifiques. On différencie tout d'abord les "sites fluides" représentant la porosité des "sites solides" représentant la phase solide. Dans chacune des catégories, les sites à l'interface sont distingués des autres ("sites fluides frontière" et "sites solides frontière"). Ce sont ces "sites frontière" qui sont concernés par le calcul des conditions aux limites. Des processus particuliers comme les phénomènes de sorption ou des interactions entre le fluide et les surfaces (forces attractives ou répulsives de type hydrophobe) peuvent également être simulés exclusivement sur ces sites.

Traitement des frontières

Plusieurs types de conditions aux limites existent : limites de périodicité, limites de rebond et d'anti-rebond et la réflexion spéculaire. Dans le cas des limites de périodicité, les populations sortantes des sites à une extrémité du réseau sont réinjectées aux sites situés à l'opposé, sur l'autre bord.

Avec les conditions de rebond et d'anti-rebond, le bilan de masse est équilibré localement. Lorsque le rebond est appliqué, les populations quittant les sites à l'interface et rencontrant la barrière sont renvoyées à ce même site dans les vitesses opposées. Avec ce type de conditions, on peut simuler l'effet barrière de la phase solide pour la progression des particules et leur renvoi vers la phase fluide.

La réflexion spéculaire peut s'appliquer dans un réseau comprenant des vitesses diagonales (ex : D2Q9, D3Q19). Les populations sortantes vers la frontière sont renvoyées vers la phase fluide dans la direction perpendiculaire. Cela permet de reproduire le glissement du fluide contre la paroi.

1.1.4 Application d'un terme source

Des processus autres que le transfert des particules reproduit par les collisions microscopiques peuvent être traités via un terme source (Q_q), apparaissant dans l'équation d'évolution 1.8.

$$f_q(\vec{r}+\vec{c_q},t+1) = f_q(\vec{r},t) + \sum_{q=1}^{Q} S\left(f_q(\vec{r},t) - f_q^{eq}(\vec{r},t)\right) + Q_q \tag{1.8}$$

Le terme source peut représenter une force $\vec{F}$. Il peut être question de forces d'interactions locales (par exemple de type van der Waals) ou d'un champ de force s'appliquant en tout point de l'espace. Ces forces se traduisent par un transfert de masse entre les vitesses d'un même site entraînant un déséquilibre local. Le terme source s'exprime alors selon la relation 1.9.

$$Q_q = t_q^* \vec{c_q} \cdot \vec{F} \tag{1.9}$$

Le terme source peut aussi reproduire des réactions générant ou consommant localement de la matière. C'est le cas par exemple lorsqu'on simule la dégradation d'un soluté non conservatif. Le terme source prend alors la forme suivante (équation 1.10) :

$$Q_q = t_q^* M_q \tag{1.10}$$

où M_q est la masse consommée ou générée.

1.1.5 Différentes approches de la méthode de Boltzmann sur réseau

Approche BGK

Dans l'approche BGK (*lattice Bhatnagar-Gross-Krook*) la collision des populations est rythmée par un seul temps de relaxation τ. La matrice de collision s'écrit alors $S = \lambda I$ avec I la matrice identité [Dubois, 2007].

Approche MRT

Dans l'approche MRT (pour *Multiple Relaxation Time*), on définit des moments physiques déterminés localement d'après les fonctions de distribution. On distingue des moments conservés et des moments non conservés. Les premiers sont invariants lors de la collision car toujours à l'équilibre. Ils déterminent des variables macroscopiques (ici, les moments associés à la masse et à l'impulsion). Les moments non conservés relaxent quant à eux vers leur valeur d'équilibre [d'Humières, 2002].

La matrice S est diagonalisée à partir d'une matrice de transformation M (equation 1.11).

$$\hat{S} = M \cdot S \cdot M^{-1} \tag{1.11}$$

$\hat{S}$ s'écrit alors $\hat{S} = diag(\lambda_0, \lambda_1, ..., \lambda_{Q-1})$.

Les moments comme les distributions sont classés en un vecteur de longueur Q, qui peut être déterminé en chaque site. Le vecteur des moments m est composé des valeurs m_q et f représente le vecteur des populations des valeurs f_q. M est la matrice d'application qui lie les fonctions de distributions et les moments (équation 1.12).

$$m(\vec{r}, t) = M \cdot f(\vec{r}, t) \qquad \text{et} \qquad f(\vec{r}, t) = M^{-1} \cdot m(\vec{r}, t) \tag{1.12}$$

Le vecteur des moments est donc la projection du vecteur des fonctions de distribution dans l'espace des moments.

La redistribution des populations est déterminée par la relaxation des moments hors équilibre pour lesquels $\lambda_q \neq 0$. On définit un vecteur m^{eq} pour les moments à l'équilibre liés aux distributions à l'équilibre par la relation 1.13, analogue à la relation 1.12.

$$m^{eq}(\vec{r}, t) = M \cdot f^{eq}(\vec{r}, t) \qquad \text{et} \qquad f^{eq}(\vec{r}, t) = M^{-1} \cdot m^{eq}(\vec{r}, t) \tag{1.13}$$

L'équation d'évolution (1.8) peut s'écrire sous la forme donnée dans l'équation 1.14 prenant en compte la relaxation des moments.

$$f_q(\vec{r} + \vec{c_q}, t + 1) = f_q(\vec{r}, t) + \sum_{q=1}^{Q} M^{-1} \cdot \hat{S} \left(m_q(\vec{r}, t) - m_q^{eq}(\vec{r}, t) \right) + Q_q \tag{1.14}$$

Approche TRT

Le modèle TRT (*Two-Relaxation-Time*) est une variante des modèles à temps de relaxation multiple (MRT) qui utilise les propriétés de symétrie du réseau [Ginzburg et al., 2008b]. Les populations de vitesses opposées ($\vec{c_q}$ et $\vec{c_{\bar{q}}}$) sont regroupées par paires appelées liens et la matrice de collisions est divisée en une partie symétrique et une partie anti-symétrique. Les populations (f_q) sont redéfinies comme suit (équations 1.15 - 1.17) :

$$f_q^+ = \frac{f_q + f_{\bar{q}}}{2} \qquad \text{et} \qquad f_q^- = \frac{f_q - f_{\bar{q}}}{2} \qquad \text{pour} \qquad q = 0, 1, \ldots, (Q-1)/2 \tag{1.15}$$

$$f_0 = f_0^+ \qquad \text{et} \qquad f_0^- = 0 \tag{1.16}$$

$$f_q = f_q^+ + f_q^-, \qquad q = 0, 1, ..., Q-1 \tag{1.17}$$

L'expression de f_q^+ (1.15) représente la moyenne des particules sur un lien. La masse est donc associée à la partie symétrique. En revanche, les particules présentes sur deux vitesses opposées sont retranchées les unes aux autres dans la relation définissant f_q^-. Quand les masses sont équilibrées entre les vitesses opposées, on a donc $f_q^- = 0$ d'où une quantité de mouvement nulle. L'impulsion est donc associée à la partie anti-symétrique.

Dans le schéma TRT, les moments de masse et de quantité de mouvement sont conservés. Par conséquent, on obtient les relations 1.18 et 1.19.

$$\rho = \sum_{q=0}^{Q-1} f_q^+ = \sum_{q=0}^{Q-1} f_q^{eq+} \qquad \text{avec} \qquad \sum_{q=0}^{Q-1} f_q^{eq-} = 0 \tag{1.18}$$

$$J_\alpha = \sum_{q=0}^{Q-1} \vec{c}_{q\alpha} f_q^- = \sum_{q=0}^{Q-1} \vec{c}_{q\alpha} f_q^{eq-} \qquad \text{avec} \qquad \sum_{q=0}^{Q-1} \vec{c}_{q\alpha} f_q^{eq+} = 0 \qquad \alpha = 1, \ldots, D \tag{1.19}$$

La conservation de moments associés à la partie symétrique et à la partie anti-symétrique entraîne l'égalité des valeurs propres λ_{q+} et λ_{q-}, chacunes entre elles [Ginzburg, 2005].

L'étape de collision est donc gouvernée par uniquement deux paramètres $\lambda_e = \lambda_q^+$ et $\lambda_o = \lambda_q^-$. Les temps de relaxation ($\tau_e = -\frac{1}{\lambda_e}$ et $\tau_o = -\frac{1}{\lambda_o}$) sont paramétrés d'après des grandeurs physiques qui dépendent du fluide et du processus simulé. λ_e et λ_o doivent être compris dans l'intervalle]-2 ;0[pour rester dans le domaine de stabilité du modèle. On définit de plus le paramètre Λ_{eo} appelé "Magic" [d'Humières et Ginzburg, 2009] d'après la relation 1.20.

$$\Lambda_{eo} = \frac{4}{3} \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{\lambda_e} \right) \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{\lambda_o} \right) \tag{1.20}$$

La valeur du paramètre Λ_{eo} détermine l'exactitude des simulations. L'ajustement des valeurs propres se fait de manière à obtenir une des valeurs de Λ_{eo} préconisée par [d'Humières et Ginzburg, 2009].

L'équation d'évolution du schéma TRT est présentée dans l'équation 1.21.

$$f_q(\vec{r} + \vec{c_q}, t+1) = f_q(\vec{r}, t) + \lambda_e \left(f_q^+(\vec{r}, t) - f_q^{eq+}(\vec{r}, t) \right) + \lambda_o \left(f_q^-(\vec{r}, t) - f_q^{eq-}(\vec{r}, t) \right) + Q_q \tag{1.21}$$

Les distributions à l'équilibre f_q^{eq+} et f_q^{eq-} sont définies dans les équations 1.22 - 1.23.

$$f_0^+ = \rho \sum_{q=1}^{Q-1} f_q^{eq+} \tag{1.22}$$

$$f_q^{eq-} = t_q^* \sum_{\alpha=1}^{D} J_\alpha \vec{c_{q\alpha}}, \qquad q = 1, ..., Q-1 \qquad \alpha = 1, \ldots, D \tag{1.23}$$

$$f_q^{eq+} = t_q^*(cs^2\rho \ + \ g_s Eq^+), \qquad q = 1, ..., Q-1 \tag{1.24}$$

Eq^+ est un terme correctif de la diffusion numérique. g_s prend une valeur de 1 ou 0. Des erreurs liées à la diffusion numérique peuvent se propager lorsque les termes inertiels de l'équation de Navier-Stokes sont importants, c'est-à-dire pour les écoulements turbulents. Dans ce cas, g_s vaut 1. Lorsque l'on simule des écoulements de Stokes ou de la diffusion (où les termes inertiels sont négligés) le terme correctif n'est pas nécessaire et $g_s = 0$.

1.1.6 Applications d'un modèle TRT-LBM à des problèmes de séparation de phase et de transport de soluté

Des trois approches présentées, l'approche BGK représente l'alternative la plus simple. Elle est couramment utilisée pour simuler l'écoulement et le transport. Toutefois, elle montre des instabilités et une caractéristique contraire au comportement physique : la perméabilité du milieu poreux y est dépendante de la viscosité du fluide [d'Humières et Ginzburg, 2009]. Les schémas MRT corrigent cette dépendance artificielle grâce aux multiples temps de relaxation (dont une partie seulement est liée aux propriétés physiques du fluide) et sont plus stables car ils rajoutent des degrés de liberté au modèle [Pan et al., 2006]. Le schéma TRT garde le niveau d'exactitude physique de l'approche MRT mais se rapproche du niveau de simplicité et de performance de calcul de l'approche BGK [Genty et Pot, 2013]. Nous avons donc choisi le modèle TRT décrit par Ginzburg [2005] pour simuler les phénomènes physiques à l'échelle des pores du sol.

Pour cette thèse, le modèle a été utilisé pour deux applications physiques différentes dans des milieux poreux en 3 dimensions : la séparation de phase et la diffusion.

TRT-LBM pour la séparation de phase

Le modèle TRT-LBM peut être utilisé en diphasique pour reproduire la répartition des phases liquide et gazeuse de l'eau à l'équilibre pour un indice de saturation prescrit, S_w, correspondant à un taux d'occupation de la porosité par la phase aqueuse. Des forces attractives entre les particules de fluides (forces cohésives) vont provoquer la dissociation d'une phase initiale thermodynamiquement instable en deux phases, l'une plus dense (phase liquide) que l'autre (phase gazeuse).

Un schéma D3Q19 a été utilisé avec des conditions aux limites de rebond. Cette configuration compte des vitesses orthogonales et diagonales au modules différents ($||\vec{c_q}|| = 1$ pour les premières et $||\vec{c_q}|| = \sqrt{2}$ pour les secondes). Les poids sont $t_q^* = \frac{1}{6} \cdot cs^2$ pour les vitesses orthogonales et $t_q^* = \frac{1}{12} \cdot cs^2$ pour les vitesses diagonales où cs est la vitesse du son prenant une valeur de $\frac{1}{\sqrt{3}}$. Le facteur de poids de la vitesse nulle est ajusté de manière à obtenir 1 en sommant t_q sur toutes les vitesses : $t_0^* = 3 - \sum_{q=1}^{Q-1} t_q^*$.

La valeur propre de la partie symétrique (λ_e) est déterminée d'après la viscosité cinématique ν (équation 1.25) [Ginzburg, 2005].

$$\nu = -cs^2 \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{\lambda_e} \right) \tag{1.25}$$

Le paramètre "Magic" Λ_{eo} est fixé à $\frac{1}{4}$ [d'Humières et Ginzburg, 2009]. Cette valeur permet d'obtenir des profils de vitesses de Poiseuille exacts [Pot, 2011]. λ_e est déduit de la viscosité cinématique ν (équation 1.25) pour laquelle la valeur de $\frac{1}{6}$ a été arbitrairement choisie. On a alors $\lambda_e = -1$. λ_o se déduit des valeurs de Λ_{eo} et λ_e. On trouve ici $\lambda_o = -\frac{8}{7}$.

La relation 1.25 entre le temps de relaxation et un paramètre macroscopique physique, la viscosité cinématique [$L^2.T^{-1}$], permet de faire correspondre les unités physiques aux unités réseau et lie les résolutions en temps et en espace (relation 1.26).

$$\nu_{LB}\left(\frac{L_{LB}^2}{T_{LB}}\right) = \nu_P\left(\frac{L_P^2}{T_P}\right) \qquad \text{d'où} \qquad T_P = \frac{\nu_{LB}.L_P^2.T_P}{\nu_P.L_{LB}^2} \tag{1.26}$$

ν_P et ν_{LB} représentent le coefficient de viscosité cinématique en grandeurs physiques et grandeurs réseau respectivement. T_P est le pas de temps en secondes équivalent au pas de temps réseau T_{LB} de 1 "tu" (*lattice time unit*). L_P est la résolution en espace pouvant être donnée par la résolution d'images source (par exemple tomographique) correspondant à la longueur d'une maille du réseau (1 "lu" ou *lattice length unit*).

Les forces provoquant la séparation de phase et déterminant l'attraction / la répulsion entre le fluide et la phase solide sont prises en compte dans le terme source de l'équation d'évolution (1.21) [Genty et Pot, 2013]. L'expression du terme source est donnée par l'équation 1.27. Elle comprend trois forces de nature différente. $\vec{F_G}$ et $\vec{F_W}$ sont deux forces locales. La première décrit les interactions cohésives entre les particules de fluide et les secondes les interactions attractives et répulsives entre particules et surfaces. Enfin, le terme $\vec{F_g}$ représente le champ de gravité.

$$Q_q = t_q\left(\vec{c_q}\cdot\vec{F_G} + \vec{c_q}\cdot\vec{F_W} + \vec{c_q}\cdot\vec{F_g}\right) \tag{1.27}$$

Les forces cohésives fluide - fluide sont contrôlées par le paramètre G d'après la formulation de Shan et Chen [1993] (équation 1.28).

$$\vec{F_G} = -\psi(\vec{r},t)\sum_{q=0}^{Q-1} t_{q_{F_G}} G\psi(\vec{r}+\vec{c_q},t)\vec{c_q} \tag{1.28}$$

ψ est une fonction arbitraire de ρ ici elle est donnée pour $\psi(\rho) = 1 - \exp(-\rho(\vec{r},t))$. Les facteurs de poids $t_{q_{F_G}}$ redistribuent les populations sur les différentes vitesses, à la manière des coefficients t_q^*. Les valeurs de $t_{q_{F_G}}$ sont de 0 pour la vitesse nulle, 2 pour les vitesses orthogonales et 1 pour les vitesses diagonales.

L'équation d'état de l'eau approximée par un modèle de Boltzmann D3Q19 d'après Shan et Chen [1993] (1.29) est :

$$P = cs^2\rho + 18cs^2G\psi^2(\rho) \tag{1.29}$$

La courbe de cette fonction définie par l'équation 1.29 avec $G = -0.16$ est montrée dans la figure 1.2. Les valeurs des densités de la phase gazeuse ρ_g et de la phase liquide ρ_l sont déduites par construction de Maxwell. La fonction passe par deux points d'inflexion. Le maximum de la fonction définit la valeur caractéristique nommée P_{max}. Le minimum est ici négatif. On prend alors $P_{min} = 0$. Les deux parties ascendantes de la courbe d'état comprises entre P_{min} et P_{max} représente les deux gammes de densités stables coexistant à une pression donnée. La gamme de faible densité définit la phase gazeuse $[\rho_{g_{min}};\rho_{g_{max}}]$ et la gamme de plus forte densité définit la phase liquide $[\rho_{l_{min}};\rho_{l_{max}}]$. La plus faible épaisseur de l'interface (3 lu) a été obtenue pour $G = -0,16$ [Genty et Pot, 2013]. Cette valeur sera conservée pour le travail relaté par la suite.

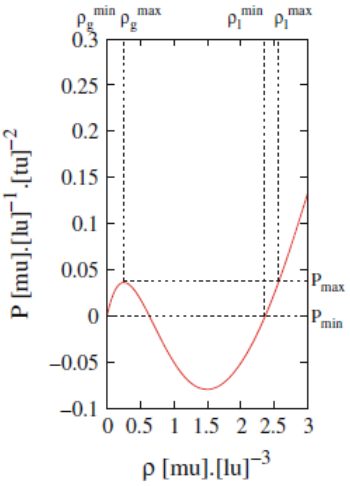


FIGURE 1.2 – **Diagramme de phase de l'eau** d'après l'équation 1.29 avec $G = -0,16$. Figure issue de l'article de Genty et Pot [2013].

Les modèles de Boltzmann sont sans bruit au sens statistique. La dissociation en deux phases ne se fait pas pour une densité initiale parfaitement homogène. On génère un déséquilibre en initialisant une zone (pouvant se réduire à un site) à une densité légèrement différente du reste. Les densités à l'équilibre simulées après séparation de phase permettent de retrouver des valeurs des deux classes de densités comprises dans les gammes théoriques $[\rho_{g_{min}}; \rho_{g_{max}}]$ et $[\rho_{l_{min}}; \rho_{l_{max}}]$ (figure 1.3a).

L'expression des forces d'interactions fluide - solide $\vec{F_W}$ (équation 1.30) est analogue à celle de $\vec{F_G}$. Les facteurs de poids $t_{q_{F_W}}$ et $t_{q_{F_G}}$ sont d'ailleurs de valeurs identiques. Le paramètre W détermine ces forces en lien avec l'hydrophobicité de la paroi.

$$\vec{F_W} = -\psi(r,t) \sum_{q=0}^{Q-1} t_{q_{F_W}} W \psi(r + \vec{c_q}, t) \vec{c_q} \tag{1.30}$$

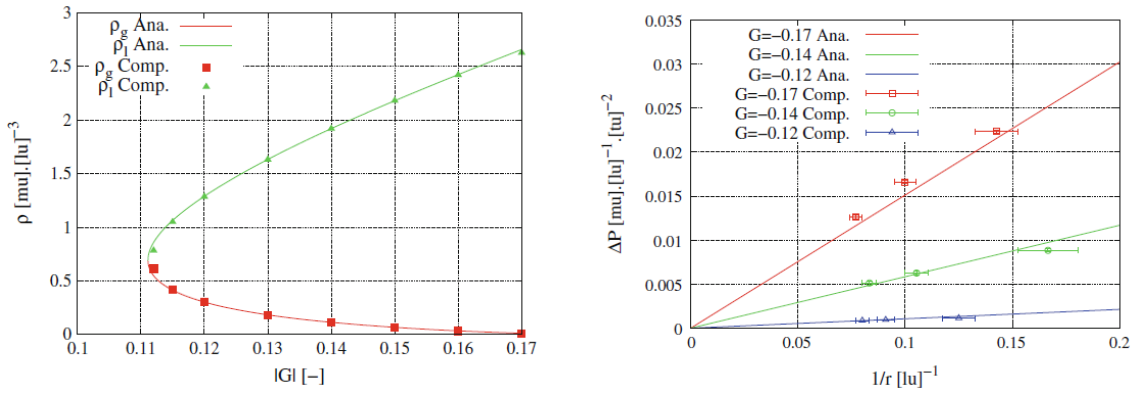
Des liens entre les paramètres G et W des équations 1.28 et 1.30 et des lois qui régissent les interactions des trois phases dans les milieux poreux ont été démontrés [Shan et Chen, 1993]. L'exactitude des distributions eau-air simulées a été vérifiée d'une part en reproduisant ces lois physiques dans des milieux simples [Genty et Pot, 2013], d'autre part en confrontant des distributions simulées et observées par tomographie dans des images d'espace poral du sol [Pot et al., 2015].

La différence de pression entre liquide et gaz ΔP est inversement proportionnelle au rayon de courbure R de l'interface d'après la loi de Young-Laplace (équation 1.31) comme illustré par les droites en figure 1.3b.

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R} \tag{1.31}$$

où σ, le coefficient de proportionalité, est la tension superficielle. Les points représentant les valeurs simulées pour trois valeurs initiales de densité sont proches des valeurs théoriques pour une valeur donnée du paramètre G (figure 1.3b). La valeur de σ se déduit de G d'après Shan et Chen [1993].

La géométrie des interfaces est déterminée par l'angle de contact de l'eau θ contre les parois solides. θ résulte de l'interaction entre les tensions interfaciales liquide-solide (σ_{sl}), solide-gaz (σ_{sg})



(a) (b)

FIGURE 1.3 – **Détermination de la densité des phases fluides par le paramètre *G*.** Densités à l'équilibre des phases liquide et gazeuse à l'équilibre (a.) et relation de Young-Laplace (b.) Comparaison de valeurs théoriques et simulées pour différentes valeurs de G. Figures issues de l'article de Genty et Pot [2013].

et liquide-gaz ou tension superficielle (σ) (équation 1.32).

$$\cos(\theta) = \frac{\sigma_{sg}\sigma_{sl}}{\sigma} \tag{1.32}$$

L'angle de contact dépend des propriétés de mouillabilité de la surface, donc des forces attractives ou répulsives qu'exerce la surface sur les fluides, exprimées dans la relation 1.30 via le paramètre W. L'angle de contact est dans une moindre mesure influencé par G contrôlant l'attraction des particules fluides entre elles. La relation 1.33 donne une approximation de l'angle de contact en fonction de W et G [Shan et Chen, 1993].

$$1 + \cos(\theta) = \frac{2W}{G} \tag{1.33}$$

La figure 1.4 montre l'influence de W sur l'angle de contact. Pour deux valeurs différentes de W, on reproduit l'aplatissement d'une goutte d'eau sur une surface parfaitement mouillante avec θ quasi - nul ou un angle de contact compris dans l'intervalle $90° < \theta < 180°$ pour le cas hydrophobe.

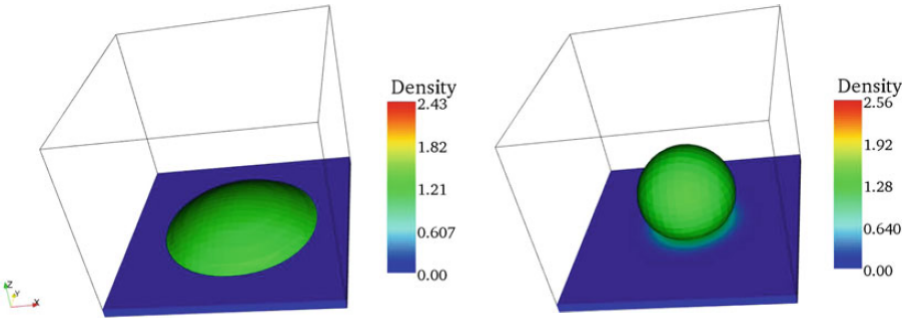


FIGURE 1.4 – **Effet du paramètre W de la mouillabité d'une surface.** Gouttes d'eau sur une paroi pour $W = 0.12$ (à gauche) et $W = 0.04$ (à droite). Figure issue de [Genty et Pot, 2013]

On prendra par la suite $W = 0.15$. Cette valeur permet de reproduire une mouillabilité parfaite des surfaces solides par la solution du sol ($\theta = 0$) selon l'approximation classiquement admise en physique du sol [Musy et Soutter, 1991].

Enfin, la gravité est un champ de force exercé dans la direction verticale. Une petite quantité de masse est transférée entre vitesses opposées d'un même site, de haut en bas. La force $\vec{F_g}$ est calculée dans le réseau d'après l'équation 1.34 où g est la constante d'accélération et $\vec{Z}$ le vecteur unitaire selon l'axe vertical.

$$\vec{F_g} = -\rho g \vec{Z} \tag{1.34}$$

TRT-LBM pour le transport de soluté

L'équation générale de convection-dispersion (1.35) décrit le transport de solutés dans les milieux poreux.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\vec{\nabla} \cdot (\vec{u}C) + \vec{\nabla} \cdot (D\vec{\nabla}C) + Q \tag{1.35}$$

où C [M.L^{-1}] est la concentration du soluté, $\vec{u}$ [L.T^{-1}]la vitesse de pore, D [L^2.T^{-1}] le coefficient de dispersion hydrodynamique et Q un terme source pouvant représenter un apport ou la dégradation d'un soluté non-conservatif.

Le soluté transporté par le mouvement de la solution à la vitesse $\vec{u}$ est décrit dans le terme de convection $-\vec{\nabla} \cdot (\vec{u}C)$. Le terme $\vec{\nabla} \cdot (D\vec{\nabla}C)$ décrit un phénomène diffusif. En conditions hydrodynamiques, il représente la dispersion du soluté due à des vitesses de flux non-uniformes dans des pores hétérogènes en taille et en forme. Le coefficient D est alors appelé coefficient de dispersion hydrodynamique D_h. En conditions hydrostatiques, la phase aqueuse a atteint sa distribution à l'équilibre. Le terme convectif s'annule (car $\vec{u} = 0$) et le terme $\vec{\nabla} \cdot (D\vec{\nabla}C)$ représente la diffusion du soluté dans la phase aqueuse immobile tendant à l'homogénéisation des gradients de concentration. D représente alors le coefficient de diffusion effectif D_e. La phase solide et la phase gazeuse à saturation partielle constituent un obstacle que les molécules doivent contourner. La tortuosité (le rapport entre la longueur du milieu et la distance parcourue par le soluté) prend sa valeur maximale théorique de 1 pour de l'eau libre et diminue lorsque l'hétérogénéité de la phase liquide augmente du fait de la complexité du réseau poreux et du caractère discontinu de la phase aqueuse à saturation partielle.

Pour le transport de soluté, une configuration D3Q7 avec des conditions aux limites de rebond est utilisée. La concentration est donnée par la densité ρ calculée en chaque site comme la somme des populations f_q (équation 1.6). Les six vitesses microscopiques des populations en mouvement sont alors dans des directions orthogonales uniquement. Les poids sont $t_q^* = \frac{1}{2}$ pour les vitesses non-nulles et le poids de la vitesse nulle est ajusté à $t_0^* = 3 - \sum_{q=1}^{Q-1} t_q^*$.

Le paramètre de relaxation λ_o est déterminé d'après le coefficient de la diffusion moléculaire D_m du soluté simulé par la relation 1.36 où $cs = \frac{1}{\sqrt{3}}$.

$$D_m = -cs^2 \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{\lambda_o} \right) \tag{1.36}$$

La valeur de $D_m = 0,5$ lu^2.tu^{-1} a été choisie car elle garantit le plus faible écart avec les solutions analytiques des équations de convection-dispersion. Le paramètre "Magic" Λ_{eo} est fixé à une valeur de $\frac{1}{32}$ assurant des conditions optimales de stabilité du modèle [d'Humières et Ginzburg, 2009]. Pour $D_m = \frac{1}{2}$ on a $\lambda_o = -\frac{1}{2}$. λ_o n'est pas paramétré d'après une grandeur physique. Il est déduit d'après la relation 1.20 pour $\Lambda_{eo} = \frac{1}{32}$. On a alors $\lambda_e = -\frac{64}{33}$.

Le coefficient de la diffusion moléculaire permet de faire la conversion entre les unités réseau et les unités physiques d'après la relation (1.37).

$$T_P = \frac{D_{m_{LB}}.L_P^2.T_P}{D_{m_P}.L_{LB}^2} \tag{1.37}$$

où $D_{m_{LB}}$ [$L^2.T^{-1}$] est exprimé en $lu^2.tu^{-1}$ et D_{m_P} en unités physiques.

Nous avons imposé une vitesse macroscopique $\vec{u}$ en tout point du maillage qui reproduit le déplacement de l'eau selon une loi de Poiseuille. Au centre du pore, $\vec{u}$ équivaut à la vitesse maximum de Poiseuille v_{max} avec $v_{max} = -\frac{\Delta p R^2}{4\nu L}$ où R est le rayon du pore, L la longueur de la portion et Δp le gradient de pression entre les deux extrémités de cette portion.

Les figures 1.5 - 1.7 montrent des résultats de transport de soluté simulé par le TRT-LBM dans un pore rectiligne en 2D (X = 1000 lu, Y = 5 lu) saturé. Un *pulse* de concentration (C_0 = 1 $mu.lu^{-3}$) a été injecté sur une largeur d'un site au milieu du pore (X_0 = 500 lu) en début de simulation. Les concentrations à différents temps t sont comparées aux solutions analytiques en 1D. La figure 1.5 présente un cas de convection-dispersion en conditions hydrodynamiques. Le pic de concentration se déplace à la vitesse moyenne de l'eau $\bar{u}$ = 0.01 $lu.tu^{-1}$ et s'étale par dispersion hydrodynamique.

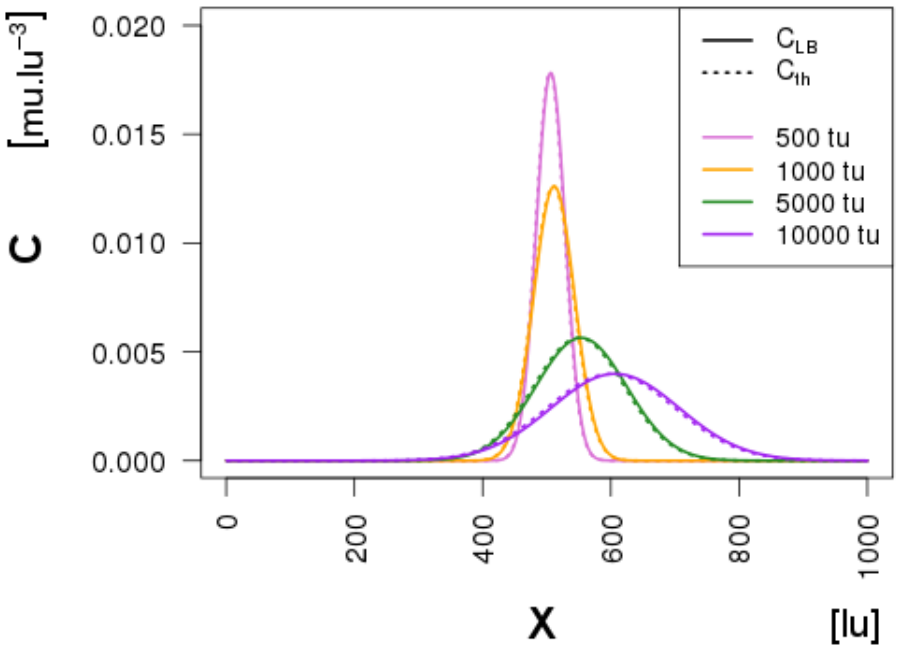


FIGURE 1.5 – **Evolution d'un *pulse* d'un soluté conservatif par convection-dispersion** dans un pore rectiligne saturé.

La solution analytique de la dispersion-convection est donnée dans l'équation 1.38.

$$C_{th} = \frac{C_0}{2\sqrt{\pi D_m t}} \exp -\frac{[(X - X_0(\bar{u}t)]^2}{4D_m t} \tag{1.38}$$

Dans la figure 1.6 illustrant le cas hydrostatique, le pic de concentration décroît sous l'effet de la diffusion réglée par le coefficient de diffusion moléculaire $D_m = 0.5$ $lu^2.tu^{-1}$.

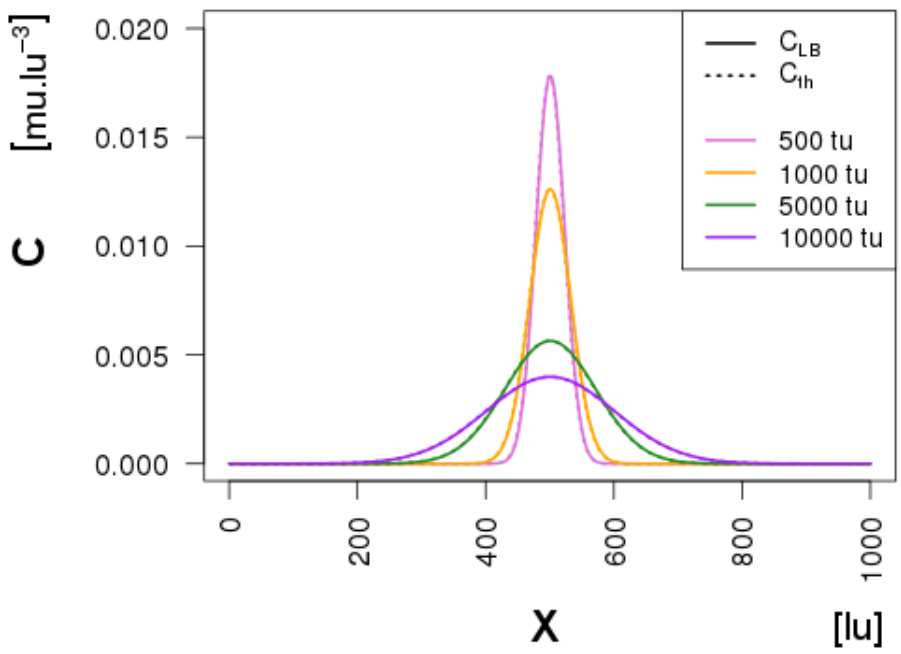


FIGURE 1.6 – **Évolution d'un *pulse* d'un soluté conservatif par diffusion** dans un pore rectiligne saturé.

La diffusion a pour solution analytique l'équation 1.39.

$$C_{th} = \frac{C_0}{2\sqrt{\pi D_m t}} \exp - \frac{(X - X_0)^2}{4 D_m t} \tag{1.39}$$

Lorsque le soluté est réactif, un coefficient de retard R traduisant la rétention temporaire du soluté par adsorption sur la phase solide apparait dans l'équation du transport du soluté 1.38. Le formalisme le plus simple pour simuler l'interaction du soluté avec la paroi solide est d'appliquer un coefficient de partage K_D, ou coefficient de distribution à l'équilibre.

L'équation de convection-dispersion pour un soluté réactif s'écrit alors :

$$\frac{\partial C}{\partial t}(1 + \frac{\rho_b K_D}{\theta}) = -\vec{\nabla} \cdot (\vec{u} C) + \vec{\nabla} \cdot (D \vec{\nabla} C) + Q \tag{1.40}$$

où ρ_b et θ sont respectivement la masse volumique apparente et la teneur en eau volumique du milieu poreux et où R vaut $1 + \frac{\rho_b K_D}{\theta}$.

La rétention temporaire d'une partie du soluté sur la matrice peut être prise en compte pendant le calcul des conditions aux limites de rebond. Elle peut être appliquée localement avec des taux spécifiques à la surface (par exemple pour différencier paroi minérale et dépôts organiques).

La sorption est réglée par deux flux opposés calculés selon une cinétique d'ordre 1 représentant l'adsorption (déterminée par le taux k_c) et la désorption (taux k_s). Les populations réactualisées après le calcul des conditions aux limites sur les "sites fluides frontière" et la distribution de populations sorbées sur les "sites solides" voisins $s(\vec{r}, t)$ s'écrivent comme suit (équations 1.41 - 1.42).

$$f_q(\vec{r}, t+1) = f_q(\vec{r} + \vec{c_q}, t+1) - k_c f_q(\vec{r} + \vec{c_q}, t+1) + k_s s(\vec{r} + \vec{c_q}, t) \tag{1.41}$$

$$s(\vec{r}+\vec{c_q},t+1) = s(\vec{r}+\vec{c_q},t) + k_c f_q(\vec{r}+\vec{c_q},t+1) - k_s s(\vec{r}+\vec{c_q},t) \tag{1.42}$$

Les taux k_c et k_s [T^{-1}] déterminant les flux d'adsorption et de désorption sont réglés en sorte d'obtenir un équilibre rapide entre les concentrations en solution et adsorbée. Les flux opposés d'ordre 1 miment ainsi l'effet d'un coefficient de partage (K_D). Le coefficient de distribution à l'équilibre K_D se retrouve d'après la relation 1.43 [Pot, 2011].

$$K_D = \frac{1}{cs^2 t^*_{q_c}} \frac{k_c}{k_s} \qquad \text{soit} \qquad K_D = \frac{1}{6}\frac{k_c}{k_s} \tag{1.43}$$

où $cs = \frac{1}{\sqrt{3}}$ et $t^*_{q_c}$ est le poids pour les vitesses sortant des "sites fluides" vers les sites de la phase solide. $t^*_{q_c} = \frac{1}{2}$ pour un réseau à vitesses orthogonales uniquement.

La conversion des taux k_{c_P} et k_{s_P} en paramètres réseau prend en compte le volume d'eau (représenté par le nombre de "sites fluides", NF) et la surface de la phase solide à son contact (nombre de "sites solides frontière", NBS).

Si Δ_M est la masse totale de soluté dans la phase aqueuse s'adsorbant à la paroi en un pas de temps Δ_t on a :

$$\Delta_{M_P} = k_{c_P} \times C \times \Delta T_P \qquad \text{et} \qquad \Delta_{M_{LB}} = k_{c_{LB}} \times C \times \frac{1}{6}\frac{NBS}{NF} \times \Delta T_{LB} \tag{1.44}$$

où les indices P et LB sont utilisés pour désigner des unités physiques ou réseau.

On déduit alors $k_{c_{LB}}$, puis $k_{s_{LB}}$:

$$k_{c_{LB}} = 6 \times \frac{k_{c_P} T_P NF}{T_{LB} NBS} \qquad \text{et} \qquad k_{s_{LB}} = \frac{1}{6}\frac{k_{c_{LB}}}{K_D} \tag{1.45}$$

La figure 1.7 montre les concentrations en solution obtenues pour un soluté réactif dans le même milieu poreux et après l'ajout du même *pulse* que dans les exemples précédents, en conditions hydrostatiques. Le k_D est de 3 $\mathrm{lu}^3.\mathrm{lu}^{-3}$ et $D_m = 0.5$ $\mathrm{lu}^2.\mathrm{tu}^{-1}$. L'écart entre solution analytique et concentrations simulées tend à diminuer avec le temps, à mesure que la distribution du soluté entre phases liquide et solide se rapproche de la distribution à l'équilibre où le partage selon le coefficient k_D est atteint.

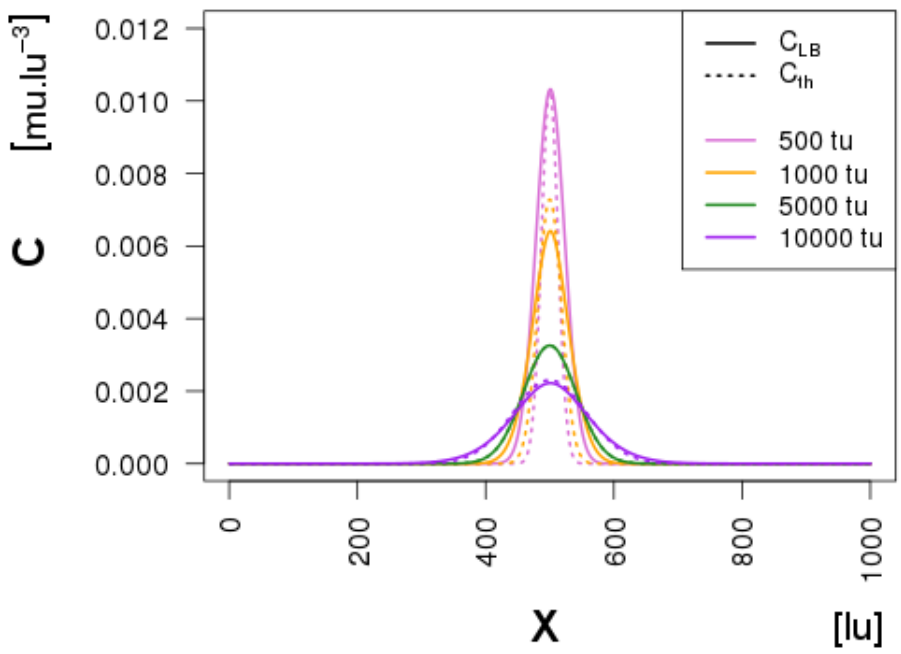


FIGURE 1.7 – **Évolution d'un *pulse* d'un soluté réactif par diffusion** dans un pore rectiligne saturé

L'équation 1.46 donne la solution analytique de la diffusion d'un soluté réactif.

$$C_{th} = \frac{C_0}{2R\sqrt{\frac{\pi D_m t}{R}}} \exp - \frac{(X - X_0)^2}{\frac{4D_m t}{R}} \tag{1.46}$$

Dans la version actuelle du modèle TRT-LBM, la dispersion d'un soluté ne peut pas être reproduite en même temps que l'évolution des interfaces eau / air lors d'un écoulement à saturation partielle. Nous avons choisi de simuler la biodégradation couplée au transport de substrats carbonés, à différents degrés de saturation et à l'équilibre hydrostatique plutôt que de simuler un transport convectif en régime permanent et à saturation complète. Nous prenons ainsi en compte un facteur important de la structure sur l'activité microbienne selon nos hypothèse tout en nous rapprochant de conditions représentatives du sol. En effet, dans le sol, la saturation est souvent partielle et la vitesse d'écoulement de l'eau lente. De plus, le degré de saturation est un facteur unanimement reconnu pour influencer l'activité des microorganismes et fréquemment manipulé lors d'incubations. Une étape de mise à l'équilibre à différents potentiels hydriques est alors souvent réalisée.

1.2 Modélisation spatialisée de la biodégradation avec le modèle LBioS

Un module traitant de la décomposition de la matière organique a été implémenté dans le modèle TRT-LBM simulant la diffusion dans le cadre de cette thèse. Le couplage permet de spatialiser les agents de la décomposition (décomposeurs et substrats organiques) dans le milieu poreux et de reproduire précisément les phénomènes de transport qui les relient et dont dépendent les taux

effectifs des transformations. Le modèle TRT-LBM ainsi modifié a été rebaptisé LBioS (*Lattice Boltzmann model for Biodegradation affected by soil Structure*).

1.2.1 Structure du module de biodégradation

La structure du module calculant la décomposition de la matière organique est illustrée dans la figure 1.8. Cette structure est comparable aux modèles macroscopiques classiques de turnover du carbone dans les sols [Shaffer et al., 2001]. Son fonctionnement repose sur l'allocation dynamique de masses de carbone dans des pools ou compartiments, via des flux entre ces pools.

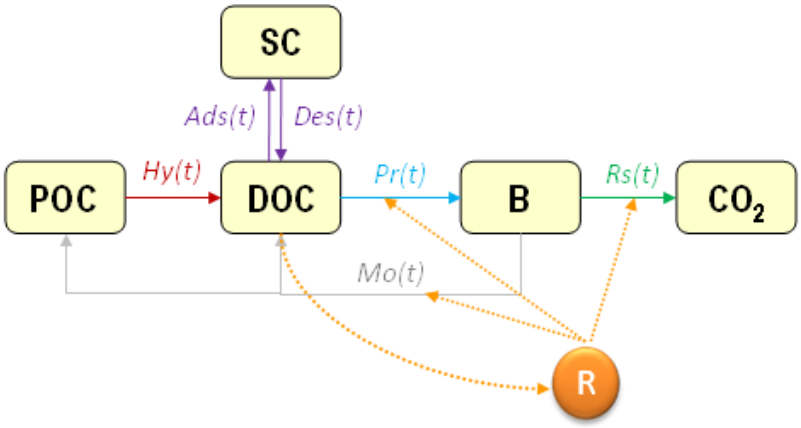


FIGURE 1.8 – **Schéma conceptuel du module de biodégradation de LBioS.**

Seul le carbone est quantifié. Les pools sont exprimés en masses de carbone par unité de volume [M.L^{-3}]. L'influence d'autres facteurs limitant l'activité des décomposeurs (comme l'azote ou l'oxygène) n'est pas prise en compte. Une situation optimale en ces égards est supposée dans ce travail.

Les traits essentiels de ce modèle sont :

i. la partition des pools organiques basée sur leur biodisponibilité
ii. le rôle moteur du pool de décomposeurs dans la dynamique de transformation des substrats carbonés
iii. la prise en compte de l'état physiologique des décomposeurs, fonction de l'abondance des nutriments

i. Les pools de carbone se distinguent par les mécanismes qui déterminent l'accessibilité du carbone vis-à-vis des décomposeurs. Le carbone organique dissous (DOC) est le seul pool potentiellement assimilable par les décomposeurs. Son prélèvement est en partie contrôlé par sa diffusion vers ces derniers. Les pools de carbone organique particulaire (POC) et de carbone adsorbé (SC) nécessitent quant à eux une étape préalable d'hydrolyse pour le premier et de désorption pour le second.

ii. Les bactéries (B) forment un pool à part dont le fonctionnement contrôle la dynamique de décomposition. Les champignons ne sont pas pris en compte. Une description mécaniste de leur

mode de vie alourdirait considérablement la structure du modèle (voir par exemple Falconer et al. [2012]). De plus, le processus de diffusion des substrats est moins déterminant pour eux, étant donnée la capacité des hyphes à se déplacer à la rencontre des substrats.

Le pool de bactéries contrôle les flux de prélèvement, de respiration et de mortalité.

Le flux de prélèvement de DOC par la biomasse $Pr(t)$ [M.L^{-3}.T^{-1}] suit une loi de Monod [1941] (équation 1.47).

$$Pr(t) = \frac{v_{DOC}\ DOC(t)}{DOC(t) + k_{DOC}}\ B(t) \tag{1.47}$$

où $DOC(t)$ et $B(t)$ sont les concentrations de carbone organique dissous et de biomasse [M.L^{-3}], v_{DOC} le taux maximal de prélèvement [T^{-1}] et k_{DOC} la constante de demi-saturation [M.L^{-3}].

La loi de Monod [1941] décrit à l'origine la croissance d'une population microbienne homogène en milieu liquide [Lobry, 1991]. Les conditions pour lesquelles ce formalisme a été trouvé divergent donc fondamentalement de celles d'un milieu poreux triphasique comme le sol, imposant le morcellement des populations en petites entités et des variations locales des paramètres physico-chimiques et des concentrations en nutriments. Une approche individu-centrée (IBM) aurait été une alternative séduisante, car elle pourrait reproduire le comportement de petites unités indépendantes se différenciant selon les concentrations locales de substrat. Nous avons cependant préféré l'approche plus simple d'un modèle à compartiments, pour pouvoir ensuite découpler plus facilement les effets physiques et biologiques lors de l'analyse des résultats.

Le flux de respiration des bactéries $Rs(t)$ [M.L^{-3}.T^{-1}] est calculé d'après l'équation 1.48 où k_r est le taux de respiration [T^{-1}].

$$Rs(t) = k_r\ B(t) \tag{1.48}$$

La respiration n'est pas calculé selon un rendement d'assimilation (souvent noté Y) comme dans de nombreux modèles de décomposition de la MOS (par exemple CENTURY [Parton et al., 1987], RothC [Jenkinson et al., 1990] ou NCSoil [Molina et al., 1983]). On trouve plus rarement la respiration exprimée seulement en fonction de la biomasse (par exemple Masse et al. [2007] ou Monga et al. [2008]). L'influence des substrats organiques est alors indirecte, en contribuant à l'augmentation de la masse de bactéries.

Le flux de mortalité $Mo(t)$ [M.L^{-3}.T^{-1}] est également calculé selon une cinétique de premier ordre via le taux de mortalité k_m [T^{-1}] (équation 1.49).

$$Mo(t) = k_m\ B(t) \tag{1.49}$$

Le flux de mortalité comptabilise à la fois les déchets des cellules mortes de nature particulaire (résidus membranaires, organites, acides nucléiques, *etc.*) et soluble (cytoplasme), et des métabolites (solubles ou insolubles) excrétés par les cellules vivantes. Pour prendre en compte ces composés variés, à la fois solubles et insolubles, le flux se divise en une proportion p_m à destination du pool de POC, le reste $(1 - p_m)$ gagnant le pool de DOC (équation 1.50).

$$Mo(t) = (1 - p_m)Mo(t)\ + p_m Mo(t) \tag{1.50}$$

Le flux entrant dans le pool de POC $[p_m Mo(t)]$ est appelé flux d'humification dans certains modèles (par exemple Garnier et al. [2008]). Il traduit la néosynthèse de matière organique du sol par la transformation microbienne de substrats organiques « frais ». Le carbone une fois transféré au pool de POC n'est alors plus directement disponible pour l'assimilation par les bactéries. Les quantités affectées au pool de DOC $[(1 - p_m)Mo(t)]$ peuvent être quant à elles servir immédiate-

ment à la croissance bactérienne. On parle alors de flux de recyclage microbien.

iii. Le fonctionnement des communautés microbiennes du sol est marqué par un taux moyen faible et des variations locales d'activité [Wang et al., 2014]. Les transitions des états actif à dormant seraient une adaptation à la répartition fragmentée des ressources. L'ajustement de l'état physiologique permet d'optimiser l'utilisation de ressources fluctuant largement dans le temps et l'espace. La dormance permet aux colonies de ne pas s'éteindre malgré des concentrations en nutriments insuffisantes pour couvrir leurs besoins nutritifs et de reprendre leur croissance lorsque les conditions redeviennent favorables.

La répartition hétérogène du niveau d'activité, conséquence de celle de l'accès aux nutriments est supposée influencer localement la cinétique de dégradation des substrats. A l'échelle macroscopique, la dormance pourrait aussi avoir un impact important sur les cinétiques des processus microbiens du sol, ce qui justifierait la généralisation de sa représentation dans les modèles de décomposition [Wang et al., 2014].

Pour les diverses façons d'inclure la dormance, le calcul de l'état physiologique selon Blagodatsky et Richter [1998] a été adopté (équation 1.51).

$$\frac{dR(t)}{dt} = \frac{v_{DOC}\ DOC(t)}{k_{DOC} + DOC(t)} \left(\frac{DOC(t)}{k_i + DOC(t)} - R(t) \right) \tag{1.51}$$

où $R(t)$ [-] représente l'état physiologique et k_i la constante d'inhibition de l'état physiologique. Il varie de 0 à 1 en fonction des concentrations locales en DOC et correspond à la fraction de la colonie active. Les flux gouvernés par le pool de bactéries sont multipliés par ce facteur $R(t)$. En cas de concentrations limitantes, le prélèvement des ressources encore présentes dans le milieu est ralenti et les pertes de carbone par la biomasse par respiration et mortalité sont elles aussi réduites.

Le carbone insoluble contenu dans le pool de POC est converti en carbone organique dissous par hydrolyse selon le flux de transformation $Hy(t)$ [M.L^{-3}.T^{-1}] (équation 1.52).

$$Hy(t) = k_H\ POC(t)\ \frac{\rho_b}{\theta} \tag{1.52}$$

$POC(t)$ est une concentration référée à la masse de sol [M.M^{-1}]. La quantité gagnant la phase liquide via le flux $Hy(t)$ est convertie en masse par volume d'eau en prenant en compte la masse volumique apparente ρ_b [M.L^{-3}] et la teneur en eau volumique θ [L^3.L^{-3}].

L'hydrolyse est uniquement réglée par la constante de premier ordre k_H [T^{-1}]. Les enzymes extracellulaires ne sont prises en compte ni explicitement, en ajoutant un pool d'enzymes diffusant jusqu'aux substrats insolubles, ni implicitement en appliquant à l'hydrolyse une cinétique de type Michaëlis-Menten. Le choix d'une cinétique d'ordre 1 se justifie par l'hypothèse que les enzymes extracellulaires sont omniprésentes dans le sol et que les concentrations de substrats sont suffisamment faibles pour que l'on n'observe pas de phénomène de saturation.

Les composés carbonés constituant le pool de DOC peuvent avoir une affinité pour la phase solide et être temporairement retenus sur les parois des pores. Les flux d'adsorption et de désorption [M.L^{-3}.T^{-1}] sont calculés selon les équations 1.53 et 1.54 respectivement, où $SC(t)$ [M.M^{-1}] est la concentration de carbone adsorbé, k_c et k_s [T^{-1}] les taux d'adsorption et de désorption.

$$Ads(t) = k_c\ DOC(t) \tag{1.53}$$

$$Des(t) = k_s \; SC(t) \; \frac{\rho_b}{\theta} \tag{1.54}$$

Les équations différentielles ordinaires des différents pools sont récapitulées ci-dessous :

$$\begin{aligned} \frac{dDOC(t)}{dt} = -\frac{v_{DOC} DOC(t)}{k_{DOC} + DOC(t)} R(t) B(t) \;\; + \;\; k_m (1 - p_m) R(t) B(t) \\ + \;\; (k_H POC(t) \;+\; k_s SC(t)) \frac{\rho_b}{\theta} \;\; - \;\; k_s DOC(t) \end{aligned} \tag{1.55}$$

$$\frac{dB(t)}{dt} = \left(\frac{v_{DOC} \; DOC(t)}{k_{DOC} + DOC(t)} \;\; - \;\; k_r - k_m \right) \; R(t) \; B(t) \tag{1.56}$$

$$\frac{dPOC(t)}{dt} = -k_H \; POC(t) \;\; + \;\; p_m \; k_m \; B(t) \; R(t) \; \frac{\theta}{\rho_b} \tag{1.57}$$

$$\frac{dSC(t)}{dt} = k_C \; DOC(t) \; \frac{\theta}{\rho_b} \;\; - \;\; k_S \; SC(t) \tag{1.58}$$

$$\frac{dCO_2(t)}{dt} = k_r \; R(t) \; B(t) \tag{1.59}$$

1.2.2 Couplage du calcul des processus physiques et biologiques

Le pool de DOC représente le soluté dont la diffusion dans la phase aqueuse est simulée par le TRT-LBM. Le DOC est transporté dans les "sites fluides" en redistribuant la masse totale en un site en populations sur les différentes vitesses via les poids t_q^*.

$$f_q(\vec{r}, t) = t_q^* \; cs^2 \; DOC(\vec{r}, t) \qquad q = 0, \; ... \; Q - 1 \tag{1.60}$$

Le pool de DOC peut être constitué d'une masse injectée dans le milieu en début de simulation. Les bactéries constituent un puits (par le flux de prélèvement, équation 1.47) et une source de DOC (par le flux de mortalité, équation 1.49). Leur influence est donc retranscrite dans le terme source pour le modèle de transport Q_q.

Nous avons choisi de représenter les bactéries dans notre modèle comme des organismes immobiles, vivant à l'interface des phases liquide et solide. Certains éléments dans la littérature vont en la faveur d'un tel mode de vie pour les bactéries. Les bactéries du sol se trouveraient majoritairement attachées aux particules solides [Van Loosdrecht et al., 1990], comme le suggèrent les difficultés expérimentales d'extraction des cellules de la phase solide [Riis et al., 1998] et l'omniprésence de gels excrétés par les bactéries ayant un rôle de maintien et de protection : les polysaccharides extracellulaires [Foster, 1988; Ladd et al., 1996]. Cependant, les bactéries peuvent aussi plus rarement se trouver sous la forme de cellules libres [Foster, 1988]. Elles peuvent alors être transportées passivement, par diffusion ou convection dans la phase aqueuse [Van Loosdrecht et al., 1990], ou même être véhiculées par d'autres organismes. Le transport de cellules sur des hyphes de champignons serait ainsi un moyen important de propagation des bactéries, leur permettant d'atteindre des taux de propagation d'environ 1 cm par jour [Kohlmeier et al., 2005]. Certaines souches ont également la capacité de migrer activement par attraction (substance nutritive) ou répulsion (substance toxique) selon le phénomène de chimiotactisme. Dans cette première version du modèle LBioS, nous négligerons tout mouvement des bactéries, quel qu'en soit le mécanisme.

La masse de bactéries est initialisée sur des "sites fluides frontière". La croissance reste localisée

sur les sites initialisés, pouvant entraîner une forte densité de biomasse sur ces sites lorsque la croissance est importante. Aucun mécanisme d'expansion spatiale de la biomasse n'a pour l'instant été inclus.

La contribution du métabolisme bactérien au terme source, dans les "sites fluides frontière" concernés, s'écrit (équation 1.61) :

$$\Delta_B(Q_q(\vec{r},t)) = t_q^* \; cs^2 \; (-Pr(\vec{r},t) \; + \; (1-p_m) \; Mo(\vec{r},t)) \tag{1.61}$$

Selon le concept de protection physique de la matière organique discuté dans la littérature [Barré et al., 2014; Chenu et al., 2001], la matière organique se trouvant à l'intérieur des agrégats est rendue inaccessible à la décomposition. Nous avons suivi cette hypothèse pour placer le pool de POC uniquement à la surface des pores, dans les "sites solides frontière".

L'hydrolyse de la matière organique particulaire libère du DOC dans le milieu (équation 1.52). Les quantités de POC converties en DOC sont transférées au "site fluide frontière" premier voisin. Il faut alors rajouter au terme source la contribution de l'hydrolyse (équation 1.62) :

$$\Delta_{Hy}(Q_q(\vec{r},t)) = t_q^* \; cs^2 \; Hy(\vec{r} + \vec{c_{q_f}}, t) \tag{1.62}$$

où $\vec{c_{q_f}}$ représente la vitesse sur le site "fluide frontière" dirigée vers le "site solide" porteur de POC.

De la matière organique particulaire peut aussi être formée à proximité des bactéries par le flux de mortalité. Un transfert de masse indépendant du calcul de la diffusion est opéré. La quantité produite dans un "site fluide frontière" hébergeant de la biomasse est transférée au "site solide" voisin lors du calcul des conditions aux limites (équation 1.63).

$$\Delta POC(\vec{r} + \vec{c_{q_f}}, t) = p_m \; Mo(\vec{r},t) \tag{1.63}$$

Enfin, les phénomènes de sorption entre les "sites fluides" et "solides frontière" sont calculés d'après les équations 1.53 et 1.54 relatées dans la section 1.1.6 en même temps que les conditions aux limites de rebond.

Le terme source lié à la biodégradation s'écrit donc (équation 1.64) :

$$Q_q(\vec{r},t) = \Delta_B(Q_q(\vec{r},t)) + \Delta_{Hy}(Q_q(\vec{r},t)) \tag{1.64}$$

Le modèle spatialisé LBioS est conçu pour étudier les conséquences des facteurs abiotiques dans l'environnement proche des bactéries sur la dynamique de décomposition dans un milieu poreux dans son ensemble. Les résultats que nous souhaitons obtenir sont les cinétiques de décomposition, c'est-à-dire l'évolution des différents pools au cours du temps à l'échelle d'un milieu. Il faut donc sommer les quantités de chaque pool sur le nombre total de sites susceptibles de contenir ce pool. Le CO_2 est sommé sur le nombre de sites où il est émis par les bactéries puis la masse totale est cumulée à chaque pas de temps. L'activité bactérienne moyenne dans un milieu peut éventuellement être représentée : il s'agit de la moyenne de l'état physiologique R sur tous les sites porteurs de bactéries.

1.2.3 Paramétrisation du module de décomposition dans LBioS

Origine des paramètres

La plupart des paramètres cinétiques (v_{DOC}, k_{DOC}, k_r, k_m) et les masses initiales de carbone (DOC_0, B_0) proviennent de l'étude de modélisation de Monga et al. [2014]. Notre module de décomposition est identique au leur, à l'exception de l'état physiologique qui n'est pas calculé dans le module de Monga et al. [2014]. Les paramètres ont été optimisés à partir des données expérimentales de minéralisation de fructose de Coucheney [2009]. Au cours de cette incubation, une souche bactérienne pure (*Arthrobacter sp.*) et le substrat ont été apportés dans du sable stérile, à une teneur en eau volumique $\theta = 0,33$ cm.cm^{-3}. Les concentrations initiales du substrat et de la biomasse dans la phase aqueuse étaient de 0,62 mgC.cm^{-3} et 1,31.10^{-6} mgC.cm^{-3}.

Les valeurs des paramètres impliqués dans le calcul de l'état physiologique, k_i et R_0 (la valeur initiale de l'état physiologique) ont été reprises de Ingwersen et al. [2008]. Dans cette étude, les cinétiques de décomposition d'une litière sont simulées pour deux valeurs de constante d'inhibition, k_{i_r} et k_{i_K}. Ce deux valeurs de constante d'inhibition sont spécifiques de groupes de décomposeurs différents dans le modèle de Ingwersen et al. [2008]. Les stratèges r ont des effectifs (ou une biomasse) très variables grâce à une croissance rapide et une mortalité importante pour s'adapter à des fluctuations rapides des ressources. Ce groupe correspond à des « décomposeurs précoces » qui utilisent préférentiellement des composés labiles au temps de résidence ordinairement très court dans le sol, comme par exemple le DOC ou la cellulose. Ce groupe comprend la majorité des bactéries hétérotrophes du sol d'après Ingwersen et al. [2008]. La valeur de constante d'inhibition k_{i_r} lui est attribué. Les groupes à stratégie K dominent dans des conditions environnementales plus stables. Ils ont un développement plus lent car ils utilisent des substrats plus durables mais moins énergétiques comme les composés ligneux ou humifiés par exemple. Dans le modèle de Ingwersen et al. [2008], le groupe de stratèges K appelé « décomposeurs tardifs » correspond aux champignons du sol et est caractérisé par la valeur k_{i_K}. Comme seul le groupe des bactéries est décrit dans notre modèle, la valeur k_{i_r} a été choisie.

La valeur initiale de l'état physiologique (R_0) est de 10%, comme pour le groupe des bactéries dans l'article de Ingwersen et al. [2008]. Le sol est caractérisé par un faible niveau moyen d'activité microbienne à cause de la relative rareté des ressources et de leur répartition fragmentée [Wang et al., 2014]. La proportion de biomasse active dans les sols a été estimée entre 5 et 20% (18.8 % ± 8.8 pour Van de Werf et Verstraete [1987], entre 5 et 20 % pour Stenström et al. [2001] ou 18 % ± 15 pour Lennon et Jones [2011]). La valeur initiale choisie est donc comprise dans les intervalles relatés par ces auteurs.

Conversion et dimensionnalisation des paramètres

Les masses initiales, désignées de manière générique m_0, sont fixées de manière à respecter les concentrations C_0 appliquées expérimentalement, selon la relation 1.65.

$$m_{0_P} = C_{0_P}\, V\, \theta \tag{1.65}$$

L'indice P dans l'équation 1.65 désigne des grandeurs physiques. Les masses doivent ensuite être converties en unités de masse « réseau » (m_{LB}), en fonction de la résolution en masse M_P (équation 1.66).

$$m_{0_{LB}} = m_{0_P}\, M_P \tag{1.66}$$

La conversion des constantes de vitesses (k_{x_P} en [T^{-1}]) ne dépend que de la durée réelle T_P d'un pas de temps réseau (équation 1.67).

$$k_{x_{LB}} = k_{x_P}\, T_P \tag{1.67}$$

Les constantes k_{DOC} et k_i représentent des concentrations dans la phase liquide [$\mathrm{M.L}^{-3}$]. Leur conversion en unités réseau dépend de la résolution en masse M_P et de la résolution en espace L_P (équation 1.68).

$$k_{x_{LB}} = k_{x_P} \frac{L_P^3}{M_P} \tag{1.68}$$

La constante k_i est exprimée en masse de carbone par masse de sol frais dans les travaux de Ingwersen et al. [2008]. Dans notre modèle, la diffusion du substrat et sa consommation par les bactéries se localisent dans la phase aqueuse. Il faut donc transformer la constante d'origine k_{i_I} en [$\mathrm{M.M}^{-1}$] en une concentration k_{i_T} en [$\mathrm{M.L}^{-3}$] (équation 1.69) par le biais de la masse volumique apparente ρ_{b_I} du milieu d'incubation de Ingwersen et al. [2008].

$$k_{i_T} = k_{i_I} \times \rho_{b_I} \tag{1.69}$$

k_{i_T} est ensuite converti en unités réseau selon la relation 1.68 où k_{x_P} prend la valeur de k_{i_T}.

Pour vérifier la cohérence de notre méthode de dimensionnalisation des paramètres nous avons tenté de simuler la cinétique de minéralisation de Monga et al. [2014] avec notre modèle de décomposition utilisé d'une part indépendamment du modèle TRT-LBM *i.* et d'autre part dans sa version couplée au TRT-LBM *ii.*.

i. Pour utiliser le modèle de décomposition en adimensionnel, nous avons retranscrit les équations de la section 1.2.1 dans un logiciel à interface graphique (ModelMaker). Nous avons pris les valeurs de paramètres cinétiques de Monga et al. [2014] estimés d'après l'incubation de Coucheney [2009] (table 1.1).

ii. Nous avons calculé la même cinétique avec LBioS dans un milieu homogène (un parallélépipède de 3x3x1 voxels, comptant un "site fluide" et huit "sites solides"). Les valeurs $L_P = 10\mu$m et $Dm_{LB} = 0,5$ $\mathrm{lu}^2.\mathrm{tu}^{-1}$ ont été choisies comme résolution spatiale et coefficient de diffusion moléculaire. La résolution en temps prend alors la valeur $T_P = 7,429.10^{-2}$ s. Nous avons choisi une résolution en masse $M_P = 1$ mgC. Les paramètres macroscopiques ont été convertis en unités réseau (voir table 1.1).

Nous avons ensuite procédé de la même manière en intégrant cette fois le calcul de l'état physiologique R, bien que nous ne disposons pas de données expérimentales sur cette variable. Le but de cette seconde démarche se borne à vérifier la bonne dimensionalisation des paramètres impliqués dans le calcul de R. Les deux valeurs de la constante d'inhibition k_i, k_{i_r} et k_{i_K} ont été testées.

Les cinétiques obtenues avec le modèle adimensionnel (*i.*) et avec le modèle couplé (*ii.*) sans le calcul de R sont illustrées dans la figure 1.9. Elles sont identiques aux résultats de Monga et al. [2014] et identiques entre elles. Les résultats du modèle adimensionnel et du modèle couplé sont les mêmes également lorsque l'état physiologique est pris en compte (figures 1.10a - 1.10b). Cela

Symbole	Définition	Valeurs physiques	Valeurs réseau	Références
D_M	Coeff. diff. mol. du DOC	$6,73.10^{-6}$ cm^2.s^{-1}	0,5 lu^2.tu^{-1}	[GRC, 1986]
v_{DOC}	Taux max. de prélèvement	$1,97.10^{-4}$ s^{-1}	$1,46.10^{-5}$ tu^{-1}	[Monga et al., 2014]
k_{DOC}	Constante de saturation	5.10^{-4} mgC.cm^{-3} eau	5.10^{-13} mu.lu^{-3}	[Monga et al., 2014]
k_r	Taux de respiration	$2,31.10^{-6}$ s^{-1}	$1,72.10^{-7}$ tu^{-1}	[Monga et al., 2014]
k_m	Taux de mortalité	$1,74.10^{-5}$ s^{-1}	$1,29.10^{-6}$ tu^{-1}	[Monga et al., 2014]
DOC_0	Masse initiale de DOC	0,62 mgC	$6,20.10^{-10}$ mu	[Monga et al., 2014]
B_0	Biomasse initiale	$1,31.10^{-6}$ mgC	$1,31.10^{-15}$ mu	[Monga et al., 2014]
T_{max}	Durée	604800 s	8140608 tu	
θ	Teneur en eau	0,33 cm.cm^{-3}	0,11 lu.lu^{-3}	[Coucheney, 2009]
V	Volume	1 cm^3	9 lu^3	[Coucheney, 2009]
R_0	État physio. initial	0.1 [-]	0.1 [-]	[Ingwersen et al., 2008]
k_{i_k}	Cste inhibition (physio.)	$6,07.10^{-2}$ mgC.g^{-1}	$6,07.10^{-11}$ mu.lu^{-3}	[Ingwersen et al., 2008]
k_{i_R}		2,80 mgC.g^{-1} sol	$2,8.10^{-9}$ mu.lu^{-3}	[Ingwersen et al., 2008]

TABLE 1.1 – **Paramètres du module de décomposition de LBioS.** Remarque : les valeurs physiques et réseau ne correspondent pas aux mêmes masses pour DOC_0 et B_0 dans le but de garder des concentrations égales dans des milieux de volumes différents.

confirme l'exactitude des relations de conversion des paramètres (1.65 - 1.69) et l'indépendance de ces derniers vis-à-vis des paramètres macroscopiques θ et V.

Lorsque le niveau d'activité est constant et optimal (lorsque $R = 1$), les 16 premières heures de la cinétique correspondent à la phase de latence (figure 1.9). La biomasse augmente ensuite rapidement et atteint son maximum à environ 24 heures. Le DOC est intégralement consommé en ce laps de temps. Pendant le reste de la simulation, la biomasse décline d'environ 100% à 30%. Le carbone quittant la biomasse est transféré au pool de CO_2.

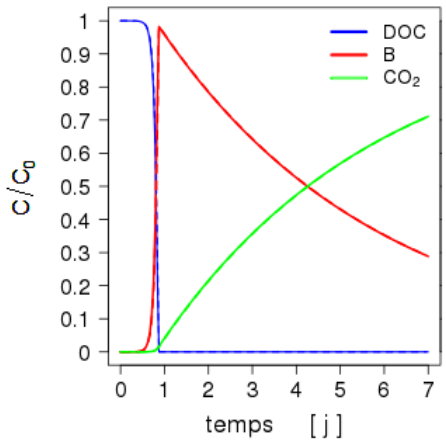
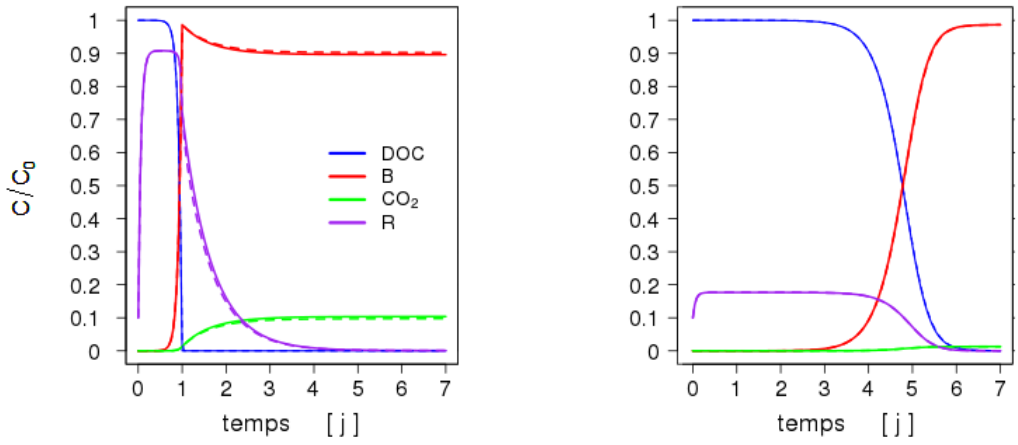


FIGURE 1.9 – **Cinétique de biodégradation du fructose** d'après Monga et al. [2014] obtenues avec le modèle de décomposition dans sa version adimensionnelle (traits pleins) et intégré dans LBioS (traits tiretés).

Lorsque l'état physiologique peut varier, pour le cas de « décomposeurs précoces » défini par la constante k_{i_r}, la cinétique de consommation du substrat est similaire au cas précédent au début de la simulation (jusqu'à la fin de la phase de croissance exponentielle). Le niveau d'activité passe très

rapidement de sa valeur initiale de 10% à une valeur proche de 100%, traduisant des conditions quasi-optimales de disponibilité du substrat (voir figure 1.10a). La phase de croissance exponentielle cause alors l'épuisement du substrat. La biomasse atteint sa valeur maximum (proche de la totalité du carbone injecté). La raréfaction du substrat entraîne la baisse brutale de l'activité microbienne pour tendre vers zéro à quatre jours. Cette réduction de R altère sensiblement le partage entre carbone stocké dans la biomasse et libéré par respiration (figure 1.10a). La respiration est intense pendant le bref intervalle où à la fois B et R sont importants, puis atteint un plateau à une valeur faible (10% du carbone injecté). Le reste du carbone est durablement stocké dans la biomasse à 100% à l'état dormant en fin de cinétique du fait de l'absence du substrat.



(a) (b)

FIGURE 1.10 – **Influence de la variation du niveau d'activité microbienne et de la valeur de** k_i sur la cinétique de biodégradation du fructose. Les cas de « décomposeurs rapides » (caractérisés par k_{i_r}) et de « décomposeurs lents » (caractérisés par k_{i_K}) sont illustrés en a. et b. Les traits pleins montrent les résultats du modèle adimensionnel, les traits tiretés ceux du modèle LBioS.

La dynamique de transformation est lourdement affectée par la prise en compte de l'état physiologique, dès les premiers temps lorsque la valeur de k_i est plus élevée (k_{i_K}, pour des « décomposeurs tardifs », figure 1.10a). L'activité des « décomposeurs tardifs » est beaucoup moins stimulée que celle de « décomposeurs précoces » à concentrations initiales égales. Elle plafonne à un niveau inférieur à 20% pour les premiers, contre 90% pour les seconds. La croissance est à la fois retardée et ralentie par cette faible valeur de R : elle devient perceptible à partir du troisième jour et se poursuit jusqu'au sixième jour. La concentration en substrat et le niveau d'activité diminuent progressivement jusqu'à 0. L'activité réduite tout au long de la simulation est responsable d'une très faible production de CO_2. L'intégralité du carbone injecté est converti en biomasse à la fin de la simulation.

Chapitre 2

Modélisation et quantification des effets de la structure du sol sur la biodégradation d'un substrat carboné soluble

Le modèle LBioS décrit dans le chapitre précédent a été conçu pour reproduire des phénomènes de décomposition spatialisés et dépendants du transport de soluté. Dans ce modèle, l'hétérogénéité physique peut être générée de trois façons : par l'implémentation de milieux dont la structure est hétérogène, par la simulation de conditions de saturation partielle (impliquant l'occupation irrégulière de la porosité par la phase aqueuse), et par le placement des substrats organiques et des décomposeurs de manière non uniforme.

Ce nouveau chapitre présente l'application du modèle LBioS à la biodégradation d'un substrat organique dans des images tomographiques de sol. La cinétique de biodégradation a été comparée dans de multiples scénarios dans lesquels substrat et décomposeurs sont apportés avec les mêmes masses initiales. Seuls les trois descripteurs structuraux suggérés précédemment (architecture du milieu poreux, degré de saturation et arrangement spatial du substrat et des décomposeurs) ont été modulés de manière à générer des conditions physiques contrastées. L'impact éventuel de ces facteurs d'hétérogénéité physique a également été comparé à un facteur invariant dans l'espace ayant montré une influence considérable sur la cinétique de biodégradation d'un substrat soluble dans le chapitre précédent (section 1.2.3). Ce facteur implique la variable d'état physiologique R qui règle la réponse du métabolisme bactérien aux fluctuations d'abondance de la ressource.

Le sol est considéré comme le matériau le plus complexe sur terre, du fait de son architecture et de la multiplicité des processus et des échelles impliqués. Notre modèle ne peut évidemment prendre en compte qu'une petite partie de cette complexité. La gamme de tailles de pores dans le sol s'étend sur sept ordres de grandeur, allant du nanomètre au centimètre. La discrétisation de l'espace liée aux techniques d'imagerie et à la méthode de Boltzmann sur réseau donne accès à une gamme restreinte de tailles de pores, quelle que soit la résolution choisie. Les voxels représentent des entités élémentaires, homogènes par nature et en termes de processus calculés. Ainsi, les pores plus petits que la résolution sont ignorés au sein des "voxels solides". La discrétisation cause aussi des imprécisions dans la modélisation des interfaces eau/air – les voxels à la frontière étant ou

totalement vides ou totalement pleins d'eau – ce qui peut causer des erreurs dans la simulation des chemins de diffusion en ajoutant ou supprimant artificiellement des connexions au sein d'une phase.

En plus de ces biais méthodologiques, nous avons délibérément choisi des conditions simples – comme par exemple, le choix d'un unique substrat soluble et sans interaction avec la matrice, apporté en un seul point et une seule date – et fait certaines hypothèses simplificatrices sur la diversité et le mode de vie des microorganismes décomposeurs. Les agents de la biodégradation dans notre modèle sont exclusivement des bactéries, toutes dotées des mêmes propriétés métaboliques : elles sont notamment incapables de mouvement. L'immobilité des décomposeurs et de la phase aqueuse (régime hydrostatique) s'oppose à une vision dynamique des processus, probablement plus représentative des conditions du sol. De plus, de nombreux paramètres et processus physico-chimiques susceptibles d'influencer la biodégradation n'ont pas été intégrés au modèle. Adopter un traitement relativement simple du fonctionnement biologique dans un premier temps permet de mettre l'accent sur les effets de structure, en dégageant l'influence des processus purement biologiques.

Ces deux types de limites (subies ou choisies) réduisent la comparabilité entre les systèmes physiques et leur version modélisée, dans une mesure difficile à estimer. Le modèle est vu ici comme un outil à but heuristique et non prédictif. L'objet du travail présenté dans ce chapitre n'est donc pas d'extrapoler les résultats obtenus aux échantillons de sol dont ils sont l'image. Nous avons néanmoins développé une stratégie quantitative, en trouvant des moyens de mesurer des caractéristiques physiques des milieux en amont et l'influence des différents facteurs sur la dynamique biologique en aval.

Les interactions possibles entre différents facteurs rendent l'effet de la structure difficile à prévoir. Il fallait donc trouver un moyen de démêler l'influence des différents facteurs. Les quatre facteurs représentés dans ce chapitre (Géométrie, Saturation, Localisation et Physiologie des décomposeurs) ont été déclinés en plusieurs modalités contrastées. L'ensemble des scénarios créés représente toutes les combinaisons possibles de ces modalités. Ils constituent ainsi un plan d'expérience factoriel complet sur lequel peut être appliqué une analyse de sensibilité globale. La variance totale des résultats peut être décomposée en contributions de chacun des facteurs et des interactions de facteurs.

La démarche mise en œuvre lors de ce travail doit répondre à deux objectifs :

- explorer les capacités de notre modèle à reproduire des effets de la structure sur l'accessibilité donc la biodégradation d'un substrat
- trouver des moyens de quantifier les effets de la structure sur la dynamique de biodégradation

2.1 Construction d'un plan d'expérience factoriel

2.1.1 Acquisition et transformation des images de milieux poreux

Échantillonnage et tomographie du sol

La géométrie en 3D d'un milieu poreux complexe est facilement décrite dans les modèles de Boltzmann sur réseau grâce à la manière dont est discrétisé l'espace en sites sur un réseau orthogonal. L'arrangement de ces sites peut dériver d'images tomographiques transformées en images binaires : les voxels sont affectés à une catégorie de sites du modèle selon leur valeur de densité (par exemple, "solide" pour les parois des pores ou "fluide" pour la porosité). Des images tomo-

graphiques de sol obtenues dans le cadre de travaux antérieurs de Elyeznasni et al. [2012] ont été utilisées pour ce cas d'application à un milieu poreux complexe. Le sol provient d'une parcelle de l'essai agronomique QualiAgro situé à Feucherolles (Yvelines, France) sur la valorisation de Produits Résiduaires Organiques. La parcelle est cultivée en succession maïs - blé et conduite en labour conventionnel. Le sol est un albéluvisol à la texture limono-argileuse (19% argiles, 75% limons, 6% sables). Le sol avait été collecté dans une placette amendée en compost d'un mélange de déchets verts et de boues de station d'épuration et est fertilisée en azote minéral. Le prélèvement a été réalisé à l'aide d'un cylindre (hauteur 6 cm, diamètre 5 cm) au droit d'une interbande de labour et de manière à préserver la structure (figure 2.1). Cette zone avait été choisie car elle est très hétérogène en termes de porosité. L'interbande de labour représente l'ancienne surface du sol enfouie par le labour et contenant la plupart des résidus de culture [Manichon et Roger-Estrade, 1990]. Elle a donc une porosité importante qui contraste avec celle, plus faible, des volumes de sol environnants. La porosité prend une orientation verticale/oblique causée par le labour.

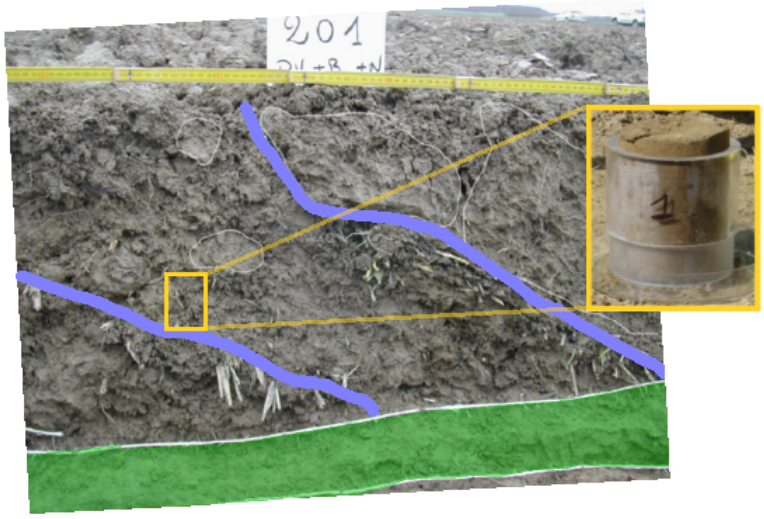


FIGURE 2.1 – **Emplacement de la colonne de prélèvement** (rectangle jaune) **dans le profil cultural.** La colonne a été prélevée au droit de l'une des interbandes de labour (soulignées en bleu). La règle matérialise la surface du sol et la zone verte indique la semelle de labour.

Production de l'image discrète de l'échantillon

La colonne prélevée avait été scannée avec un tomographe de paillasse (l'appareil μSIMCT du centre SIMBIOS, University of Abertay, Dundee, Royaume-Uni) à 90 keV et 112 mA. La reconstruction à partir des images brutes avait été opérée à l'aide du logiciel `CT-Pro Reconstruction`. La taille de l'échantillon entraîne une résolution de 68 μm. L'image cylindrique a été tronquée en un cube de 712^3 voxels, soit 113,5 cm^3.

L'image tomographique brute compte de 256 niveaux de gris qui correspondent à différentes valeurs de coefficient d'atténuation des rayons X traversant l'échantillon de sol. Cette image doit être segmentée, c'est-à-dire transformée en une image binaire. Les voxels sont groupés en deux classes correspondant à la phase solide ou à la porosité, selon leur valeur en référence à un seuil. La valeur du signal sur l'image brute dépend de la nature du matériau, mais aussi de la qualité de l'image et des conditions choisies lors de son acquisition [Baveye et al., 2010]. Les voxels peuvent donc être faussement attribués à l'une des deux phases. Différentes méthodes automatisées ont été développées pour limiter ces erreurs d'affectation des voxels [Baveye et al., 2010; Iassonov et al.,

2009]. Dans l'étude de Elyeznasni et al. [2012], la segmentation a été réalisée « manuellement » à l'aide du logiciel `ImageJ`. Le seuil a été fixé en comparant l'image en niveaux de gris avec celle d'une lame mince du même échantillon. Une valeur de densité de 18 a été choisie car elle minimise l'écart entre ces deux images. Nous avons conservé cette valeur de seuillage pour notre étude.

La porosité de l'image segmentée est de 0,11. Cette valeur de porosité est à distinguer de la porosité totale de l'échantillon de sol. La porosité de l'image est dépendante de la résolution choisie. Les pores de diamètre inférieur à 68 μm sont de fait absents de l'image segmentée. La valeur de 0,11 ne prend donc en compte que la part détectable de la macroporosité des échantillons. Une valeur de porosité totale supérieure à la macroporosité – 0,14 – a ainsi été estimée par Elyeznasni et al. [2012] par la mesure de la teneur en eau à saturation, pour un échantillon comparable à l'échantillon tomographié.

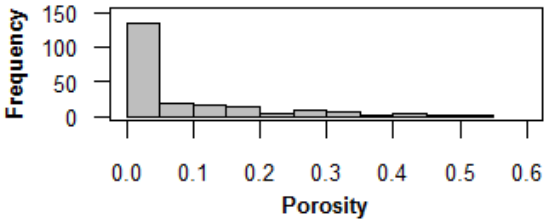


FIGURE 2.2 – **Histogramme de porosité** des 216 cubes de 100^{-3} voxels constituant l'image discrète entière de l'échantillon prélevé.

Modifications de l'image segmentée

Nous avons subdivisé l'image originale en 216 cubes de 100^3 voxels, la taille de l'image originale de 600^3 voxels étant trop importante pour être traitée au vu des capacités de stockage mémoire actuelles. Les 216 cubes se sont montrés très variables en termes de valeur de porosité, obtenant un coefficient de variation de 1,06. L'histogramme des valeurs de porosité des 216 cubes est représenté en figure 2.2. La gamme rencontrée est très large, allant d'environ 1% à plus de 50%, plus de la moitié se concentrant dans la classe de porosité la plus faible (0-5%). Bien qu'issus de la même image, les 216 cubes montrent une grande diversité morphologique s'appréciant à la fois entre les cubes ou entre des zones contrastées au sein d'un même cube. On trouve ainsi des zones dominées par des motifs irréguliers, déchiquetés, alors que d'autres sont occupées par de vastes volumes poreux homogènes.

Les images brutes de la porosité ont été retravaillées de manière à supprimer tous les pores artificiellement isolés, pour ne tenir compte que des volumes poreux participant à la diffusion. Les pores peuvent apparaître déconnectés sur l'image car reliés par des connections trop petites pour être détectées à la résolution de travail. Il peut aussi s'agir de pores coupés du fait des bordures posées aux faces des cubes.

Pour ne conserver qu'une phase poreuse intégralement connectée, un algorithme de recherche de proche en proche a été programmé et intégré au code du modèle LBioS. Cet algorithme se déplace de voisin en voisin depuis un point d'essaimage et enregistre chaque voxel appartenant à la même phase dans les images segmentées (ici la porosité). Nous avions donc au préalable défini visuellement une zone de la porosité proche de la surface dans chaque cube et reporté les coordonnées d'un point d'essaimage à l'aide du logiciel de visualisation 3D `ParaView`.

Les images ainsi retravaillées peuvent à présent être implémentées dans le modèle LBioS et

figurer les milieux poreux où sont calculés les processus physiques et biologiques. Nous souhaitions investiguer les effets de la structure sur la dynamique de biodégradation dans un nombre limité de milieux poreux. Pour sélectionner trois milieux aux caractéristiques contrastées, nous avons calculé des indicateurs utilisés dans la littérature pour quantifier certaines de leurs propriétés morphologiques. Dans les étapes suivantes de ce travail, nous avons étudié l'effet des conditions de diffusion sur les processus bactériens en apportant systématiquement le substrat en un *pulse* sur le premier plan des cubes et se propageant vers des bactéries réparties le long de l'axe vertical. Les propriétés des cubes et les processus, bien que se déroulant en trois dimensions, seront donc regardées préférentiellement dans la direction verticale. Pour être comparées entre elles, les images sélectionnées devront donc toutes présenter une porosité continue sur toute la profondeur. Les images dont la phase poreuse se déconnecte entre les faces opposées du cube selon Z ont donc été éliminées, ne laissant que 61 images sur les 216 d'origine. Le calcul des indicateurs morphologiques décrits ci-dessous s'est avéré très long. Nous avons donc décidé de le réserver à une sélection restreinte d'images. Dix images ont été tirées aléatoirement parmi les 61 cubes de manière à couvrir la majorité de la gamme de valeurs de porosité. Les dix milieux poreux sont nommés G_1 à G_{10} par ordre de porosité croissante. Ils sont illustrés dans la figure 2.3.

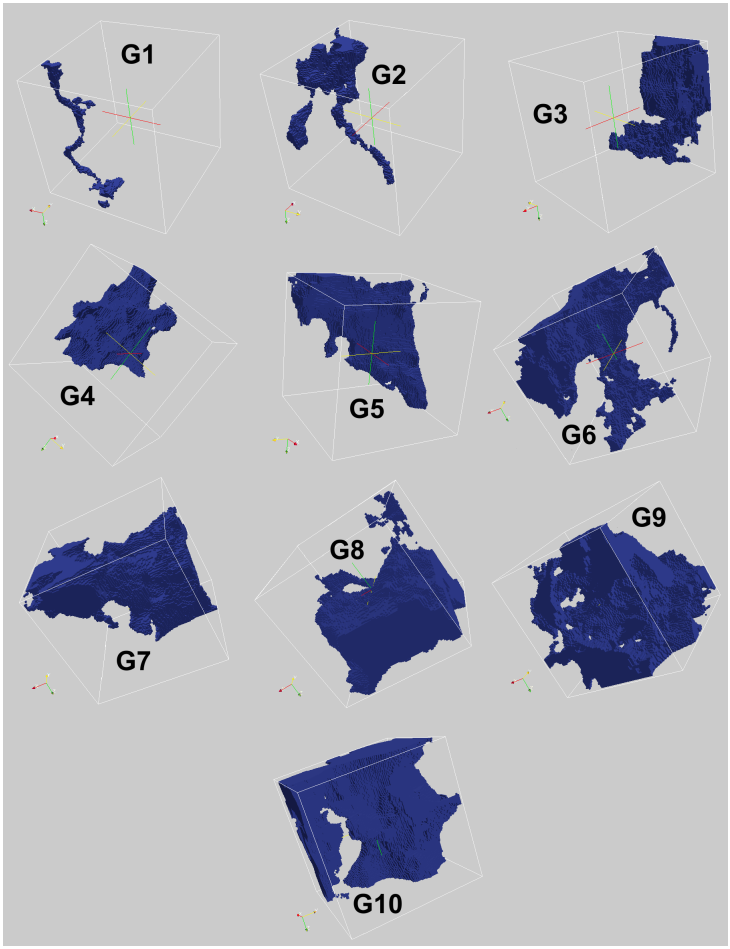


FIGURE 2.3 – **Vues en pseudo-3D des 10 cubes sélectionnés pour la caractérisation morphologique.** La phase porale est représentée en bleu. La phase solide n'est pas représentée.

2.1.2 Caractérisation morphologique des milieux poreux

Plusieurs indicateurs en morphologie mathématique quantifient les propriétés géométriques des milieux poreux et peuvent être reliés aux fonctions dans ces milieux [Dullien, 1992; Perret et al., 1999]. Certains de ces estimateurs sont particulièrement pertinents en terme de transport dans des réseaux de macropores, comme la tortuosité, le rayon hydraulique minimal, le nombre de coordination, la connectivité, la surface spécifique [Perret et al., 1999], la distribution des tailles de pores [Vogel, 1997]. La tortuosité est le rapport entre la distance géodésique minimale, c'est-à-dire la distance effectivement parcourue et la distance apparente entre deux points. Elle renseigne donc directement sur la longueur des chemins de diffusion. Le rayon hydraulique minimal indique les gorges, zones critiques pour la rétention (pression capillaire maximale) et le transport de soluté (ralentissement maximal de la diffusion). Le nombre de coordination représente la somme du nombre de branches se rejoignant dans tous les nœuds d'un réseau. Un nombre de coordination élevé suggère un réseau complexe, morcelé en nombreuses entités, sans toutefois donner une idée de l'abondance des liens entre ces entités.

Le genre $\mathcal{G}$ et la connectivité $\mathcal{C}$ estiment justement dans quelle mesure les différentes parties d'un réseau poreux sont connectées entre elles, déterminant la facilité d'un soluté à se déplacer entre deux points du réseau.

La connectivité représente le nombre de chemins indépendants entre deux points, soit le nombre de boucles non-redondantes dans un objet [Dullien, 1992; Perret et al., 1999]. Le genre est le nombre de coupes qui peuvent être faites dans un objet sans qu'une partie soit déconnectée du reste du réseau. Les valeurs du genre et de la connectivité sont équivalentes selon le théorème de Barrett et Yust [1970]. La figure 2.4 illustre les concepts de genre et de connectivité sur des objets simples. Les chemins tracés en jaune, bleu et vert suivent les boucles des objets et servent à déterminer la connectivité. Les traits rouges représentent les coupes que l'on peut pratiquer dans ces boucles sans dissocier des parties de l'objet. Ils servent donc à déterminer le genre. On ne compte qu'une boucle dans les objets (a) et (b) et l'on ne peut y faire qu'une seule coupe. La connectivité vaut 1, tout comme le genre. L'objet (c) compte trois boucles dont deux (en jaune et en bleu) sont redondantes avec une troisième (en vert). La connectivité $\mathcal{C}$ est égale à 2 et on peut faire des coupes en deux endroits différents ($\mathcal{G} = 2$). Dans l'objet (d), trois des six boucles sont non-redondantes ($\mathcal{C} = 3$) et trois coupes peuvent être réalisées sans déconnecter une partie de l'objet ($\mathcal{G} = 3$).

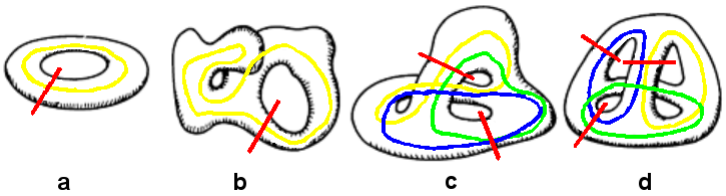


FIGURE 2.4 – **Illustrations des concepts de connectivité et de genre** d'après MacDonald et al. [1986].

Pour caractériser les dix images et en choisir trois, trois indicateurs ont été calculés : la caractéristique d'Euler-Poincaré (EPC) en fonction de la distribution des tailles de pores, la distribution des distances géodésiques (dont peut être déduite la tortuosité) et la surface spécifique. Tous les trois renseignent sur le degré de complexité des milieux poreux. Les résultats des deux premiers (EPC et distances géodésiques) peuvent être interprétés en termes de conditions pour le transport.

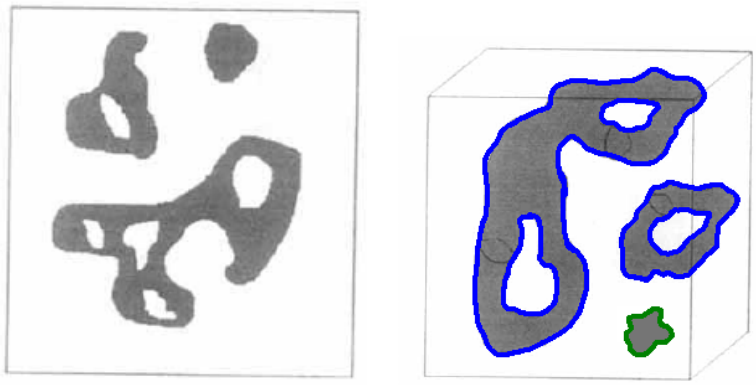
La surface spécifique (le rapport entre la surface et le volume d'un objet) renseigne dans notre cas sur l'étendue des surfaces disponibles comme support pour les bactéries.

Caractéristique d'Euler-Poincaré

La caractéristique d'Euler-Poincaré (notée ϵ) ou nombre d'Euler est une grandeur adimensionnelle qui donne une idée de la multiplicité des chemins pour relier différents points d'un réseau, en intégrant à la fois la connectivité et le degré d'isolation des parties du réseau. Dans l'expression générale du nombre d'Euler (équation 2.1), la connectivité (ou nombre de boucles non-redondantes) $\mathcal{C}$ est comptée en négatif alors que le nombre d'éléments déconnectés $\mathcal{N}$ est compté en positif. Une caractéristique d'Euler-Poincaré négative et élevée en valeur absolue est donc indicatrice d'un réseau dont les différentes parties sont bien reliées entre elles.

$$\epsilon = \mathcal{N} - \mathcal{C} \tag{2.1}$$

La détermination du nombre d'Euler (alors noté ϵ_2) est simple pour une section 2D, comme cela peut être constaté en étudiant la figure 2.5a. $\mathcal{N}$ correspond au nombre d'objets dans la section – c'est-à-dire le nombre de réseaux poreux déconnectés – , ici égal à trois, et la connectivité au nombre de trous dans ces objets, égal à cinq. Par conséquent, $\epsilon_2 = 3 - 5 = -2$.



(a) (b)

FIGURE 2.5 – **Détermination du nombre d'Euler en 2D (a.) et 3D (b.)** d'après Vogel [1997]

En trois dimensions, on fait la distinction parmi les éléments déconnectés (en positif), entre les parties séparées du réseau (comptabilisées dans $\mathcal{N}$) et les cavités complètement isolées (comptabilisées dans $\mathcal{H}$). La caractéristique d'Euler-Poincaré en 3D ϵ_3 s'écrit donc :

$$\epsilon_3 = \mathcal{N} - \mathcal{C} + \mathcal{H} \tag{2.2}$$

Les deux objets surlignés en bleu dans la figure 2.5b représentent deux parties indépendantes du réseau poreux ($\mathcal{N} = 2$). Ils sont reliés aux bords du cube donc sont comptés dans $\mathcal{N}$ et non dans $\mathcal{H}$. L'objet surligné en vert est supposé fermé de tous côtés par les parois de la phase solide. Il est donc comptabilisé dans $\mathcal{H}$ qui vaut ici 1. Enfin, on visualise trois boucles non-redondantes ($\mathcal{C} = 3$), d'où une valeur nulle pour ϵ.

La difficulté de délimiter des objets dans un milieu complexe et en trois dimensions rend le calcul du nombre d'Euler problématique. Deux méthodes ont été proposées dans la littérature pour contourner cette difficulté : la méthode des dissecteurs [Vogel, 1997] et la méthode des fonctions de

Minkowski [Vogel et Schlüter, 2010]. Toutes deux sont des méthodes algorithmiques fonctionnant sur des images binarisées.

Dans la méthode des dissecteurs, à l'origine développée sur des séries de lames minces, la caractéristique d'Euler-Poincaré est calculée sur des séquences d'images 2D (équation 2.1). Le dissecteur, qui constitue l'intersection de deux images adjacentes, permet d'obtenir le nombre d'Euler en 3D.

Les fonctions de Minkowski (m_k où $k = 1, \cdots, D$ pour un espace à D dimensions) sont les $D+1$ nombres qui mesurent les propriétés géométriques d'un objet [Vogel et Schlüter, 2010]. Pour un espace à 3 dimensions, le nombre d'Euler peut être déduit du nombre m_3 calculant la courbure totale de l'objet étudié (ici la phase poreuse). Chacun des nombres m_k peut-être déterminé par une analyse locale des arrangements de "voxels fluides" et de "voxels solides" sur des cubes élémentaires de 2^3 voxels. Il existe $2^8 = 256$ configurations possibles. Un algorithme balaie l'image et extrait les fréquences de chaque configuration. Les fonctions de Minkowski s'écrivent toutes sous la forme $m_k = \omega_k \sum_{p=0}^{255} l_k(p) f(p)$ où p est une configuration, $f(p)$ sa fréquence, $l_k(p)$ un coefficient qui représente la contribution spécifique de la configuration p à la fonction k et ω_k le poids spécifique de la fonction k.

La méthode des fonctions de Minkowski est compliquée à implémenter. Nous avons donc développé un code calculant la caractéristique d'Euler-Poincaré selon la méthode des dissecteurs. Nous avons cependant sollicité la collaboration d'une spécialiste en analyse d'image utilisant la méthode des fonctions de Minkowski, Ruth Falconer (University of Abertay, Dundee, Écosse), pour vérifier si les deux méthodes donnent des résultats semblables.

Dans l'approche des dissecteurs, les milieux poreux sont tout d'abord transformés en séquences de sections 2D. Un algorithme de recherche de proche en proche délimite et compte les objets homogènes sur chacune des sections traitées par paires. Un dissecteur est construit à partir de chaque paire de section correspondant à l'intersection de deux sections adjacentes. L'intersection est réalisée avec l'opérateur logique `"AND"`.

La caractéristique d'Euler-Poincaré (ϵ_3) pour le volume correspondant à deux sections adjacentes (X_i et X_{i+1}) est calculée d'après la relation 2.3 où $X_i \cap X_{i+1}$ est le dissecteur.

$$\epsilon_3 = \frac{1}{2} \left(\epsilon_2(X_i) + \epsilon_2(X_{i+1}) - 2\epsilon_2(X_i \cap X_{i+1}) \right) \tag{2.3}$$

Les éléments connectés d'une section à l'autre apparaissent dans l'intersection des deux, alors que les éléments non-connectés n'apparaissent que dans l'une ou l'autre des sections. On obtient la caractéristique d'Euler-Poincaré en 3D pour tout le volume en sommant ϵ_3 sur le nombre total NZ de paires de sections adjacentes (équation 2.4).

$$\epsilon_3 = \sum_{i=1}^{NZ} \frac{1}{2} \left(\epsilon_2(X_i) + \epsilon_2(X_{i+1}) - 2\epsilon_2(X_i \cap X_{i+1}) \right) \tag{2.4}$$

La valeur obtenue est sans dimension. Il est aussi possible d'exprimer la caractéristique d'Euler-Poincaré volumique, en rapportant le résultat de l'équation 2.4. Sa dimension est alors [L^{-3}].

Distribution des tailles de pores La distribution des tailles de pores est une propriété déterminant les processus de rétention, d'écoulement et de transport de solutés dans les milieux poreux. Il est donc intéressant d'extraire cet indicateur et de le mettre en relation avec d'autres caractéristiques morphologiques ou hydrodynamiques. La détermination de la distribution des tailles de pores représente également une étape du calcul du nombre d'Euler-Poincaré dans les méthodes de

Vogel [1997] et Vogel et Schlüter [2010]. En analysant conjointement la distribution de tailles de pores et la courbe d'EPC d'une même image, on peut déduire en quoi les pores de chaque classe contribuent à connecter les parties du réseau ou s'ils représentent au contraire des éléments majoritairement isolés. Il est aussi possible de discerner des motifs morphologiques déterminants pour les propriétés de transport. Ainsi, la présence de gorges est indiquée par une brusque augmentation de la constante d'Euler-Poincaré [Vogel, 1997].

La distribution des tailles de pores d'une image segmentée est inférée grâce à une série d'ouvertures binaires croissantes. L'ouverture binaire désigne la succession de deux opérations morphologiques élémentaires – l'érosion puis la dilatation – pratiquée avec un élément structurant identique. Un élément structurant est une forme géométrique basique (ici, une sphère discrétisée) dont les contours définissent les voxels à enlever lors de l'érosion ou ajouter lors de la dilatation, par conversion des 1 en 0 et inversement. L'ouverture binaire est donc réalisée sur l'image d'origine avec des sphères de diamètre croissant. L'intervalle compris entre les diamètres des sphères de chaque étape définit une classe de taille de pore. L'ouverture binaire lisse les contours des objets. Les motifs les plus fins disparaissent à mesure que la taille de l'élément structurant augmente. En procédant à une série d'opérations d'ouverture avec des sphères de taille croissante, on réduit la porosité en éliminant les étroitures comprises dans le diamètre de la sphère. La proportion de chaque classe de taille de pores est donnée par la variation du volume poreux entre chaque étape d'ouverture.

Nous avons réalisé l'ouverture binaire sur les séquences de sections 2D, à l'aide des filtres `Maximum 3D` et `Minimum 3D` du logiciel d'analyse d'images `ImageJ`. Nous avons procédé une série d'étapes d'ouverture en incrémentant le rayon de l'élément structurant de la taille d'un voxel (1 lu) jusqu'à refermer entièrement la porosité et ainsi couvrir toute la gamme de taille de pores des images.

Nous avons vérifié la cohérence de notre méthode sur un réseau géométrique régulier pour lequel on peut facilement compter les différents objets et obtenir un nombre d'Euler-Poincaré théorique d'après la relation 2.2. Nous avons construit un empilement de sphères de 10 lu de rayon. Chaque arrête comprend quatre sphères entières bordées de deux demi-sphères. Des murs solides sont posés sur trois des six faces du cube. La géométrie de cet empilement de sphères est illustrée dans la figure 2.6.

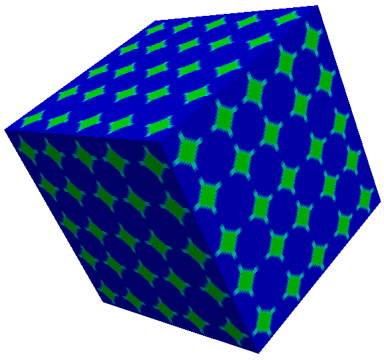


FIGURE 2.6 – **Empilement de 5^3 sphères :** milieu modèle pour le calcul de la caractéristique d'Euler-Poincaré en 3D. La phase solide est en bleu, la porosité en vert.

Avant de commenter les résultats obtenus par la méthode des dissecteurs, nous vérifions leur

cohérence en les comparant avec les valeurs données par l'approche des fonctions de Minkowski. Les courbes d'EPC obtenues par les deux approches pour l'empilement de sphères (SP) et des deux des dix milieux poreux représentés dans la figure 2.3 sont illustrées dans la figure 2.7. L'empilement de sphères obtient un écart moyen réduit (3,1%) comparé aux dix milieux poreux complexes (19,3% d'écart en moyenne). L'écart est plus fort sur la gauche de la courbe, correspondant aux premières étapes d'ouverture (figure 2.7), donc aux images les plus poreuses. Cet écart pourrait être dû à une légère différence de porosité constatée entre les deux méthodes (en moyenne de 3% pour tous les milieux poreux et toutes les étapes d'ouverture), provenant peut-être de manières différentes de lire les images par les logiciels utilisés. Ces différences de lecture pourraient se traduire par de petites disparités topologiques se répercutant sur les valeurs de porosité totale et d'EPC. Les écarts sont cependant jugés suffisamment restreints au vu des objectifs de cette étude pour valider notre méthode de calcul de la constante d'Euler-Poincaré selon l'approche des dissecteurs.

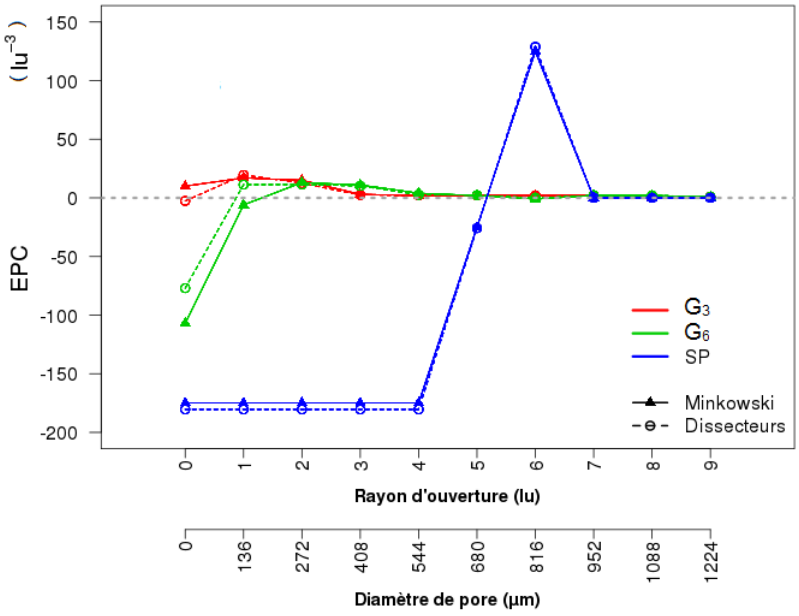


FIGURE 2.7 – **Comparaison de deux méthodes algorithmiques de calcul du nombre d'Euler :** l'approche des dissecteurs et l'approche des fonctions de Minkowski pour l'empilement de sphères *SP* (figure 2.6 et deux des dix milieux poreux présentés dans la figure 2.3, G_3 et G_6.

Nous avons déterminé le nombre d'Euler-Poincaré théorique de l'empilement de sphères d'après les images 2D. Les quatre illustrations en figure 2.8 donnent l'exemple de deux plans (en $Z = 10$ et $Z = 20$ lu) pour les étapes d'ouverture binaire de 1 et 6 voxels de rayon. Suite à l'ouverture binaire de 1 voxel, on peut compter sur certaines sections (ex : figure 2.8a), 25 trous (c'est-à-dire des volumes de solide indépendants) compris entre les limites de la section, ainsi que 10 ouvertures sur les deux bordures qui ne sont pas fermées par des murs. En balayant l'ensemble des sections, on s'aperçoit que la phase poreuse ne se déconnecte jamais (ex : figure 2.8b), sauf pour l'extrémité correspondant à un mur. Les trous et ouvertures sur les côtés indiquent donc des boucles non-redondantes dans l'espace en trois dimensions. Pour cet empilement composé, dans l'axe vertical, de quatre piles de sphères entières encadrées de deux rangées de demi-sphères, dont l'une fermée par un mur, on a donc $(4 + 1) \times (25 + 10) = 175$ boucles non-redondantes. On ne compte pas

d'élément déconnecté, d'où $\epsilon = \mathcal{N} + \mathcal{H} - \mathcal{C} = -175$. Après l'ouverture de 6 lu, en balayant la séquence de sections, on observe cinq successions de 25 trous (comme en figure 2.8c) séparées par des plans noirs, sans porosité (figure 2.8d). Les cinq séries de trous correspondent donc à des cavités isolées les unes des autres en 3D, d'où $\epsilon_3 = \mathcal{H} = +125$.

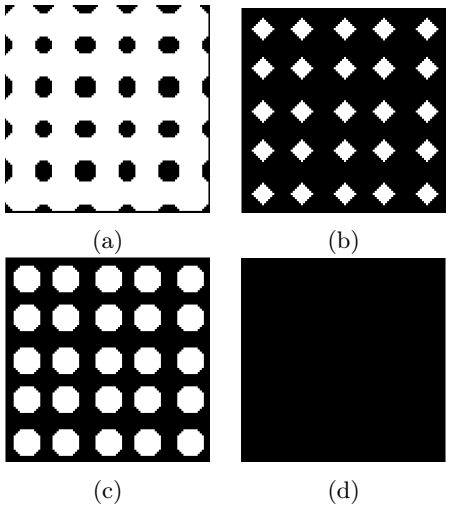


FIGURE 2.8 – **Sections de l'empilement de sphère transformées par ouverture binaire.** Les plans en $Z = 10$ lu et $Z = 20$ lu sont présentés respectivement en haut et en bas. Ces sections sont comparées après ouverture binaire de 1 lu (à gauche) et 6 lu (à droite). La phase poreuse est en blanc et la phase solide en noir.

L'analyse numérique de la morphologie de l'empilement de sphères montre que la porosité est constituée de pores de rayon inférieur à 7 lu (figure 2.9). La dernière classe de taille de pores (7-8 lu) représente presque la moitié de la porosité totale. Ce sont des pores légèrement plus fins (4-6 lu de rayon) qui ont un effet critique sur la connectivité du réseau poreux (figure 2.10). C'est en effet aux étapes d'ouverture de 4 à 6 lu que les connections entre les vides disparaissent (figure 2.8d). La caractéristique initialement négative devient alors positive, indiquant le passage d'un réseau constitué d'éléments bien connectés entre-eux à un ensemble fait d'éléments disjoints (figure 2.10). Les valeurs obtenues numériquement (-175 et +125) sont identiques aux valeurs théoriques.

Les dix milieux poreux complexes se différencient par l'amplitude de la gamme de taille de pores (de 0 à 4 lu de rayon, soit 0 à 554 μm de diamètre pour G_1 contre 0 à 26 lu soit 3536 μm de diamètre pour G_{10}). Certains cubes (G_4, G_{10}, G_5) ont une distribution de taille de pores asymétrique avec les classes de tailles les plus élevées les mieux représentées. La porosité de ces cubes est constituée d'un vaste pore (par exemple G_4 ou G_5 dans la figure 2.9) auquel sont éventuellement reliées quelques fines excroissances peu volumineuses. D'autres cubes (G_2, G_9, G_6, G_3) ont une distribution de taille de pores plus équilibrée entre les différentes classes. L'espace poral est plus morcelé et les nombreux pores fins comptent pour une part importante du volume total (comme on peut l'apprécier visuellement dans la figure 2.3 pour le cube G_9 par exemple). Les courbes d'EPC (figure 2.10) se démarquent nettement de celle de l'empilement de sphères et se rapprochent des résultats publiés pour des séries de lames minces de sol [Vogel, 1997]. La valeur initiale d'EPC (sans ouverture binaire) varie fortement entre les dix images, de -166 (G_9) à +10 (G_3).

Pour la majorité des cubes (ex : G_9, G_{10}, G_6, G_7, G_8), on trouve des valeurs négatives augmentant et se stabilisant autour de zéro dès les premières étapes d'ouverture, pour un rayon de 1 à 3 lu (figure 2.10). Ce type de courbes s'apparente à celle de l'horizon superficiel humifère (Ah) à structure agrégée dans l'article de Vogel [1997]. Les valeurs négatives en début de courbe montrent que

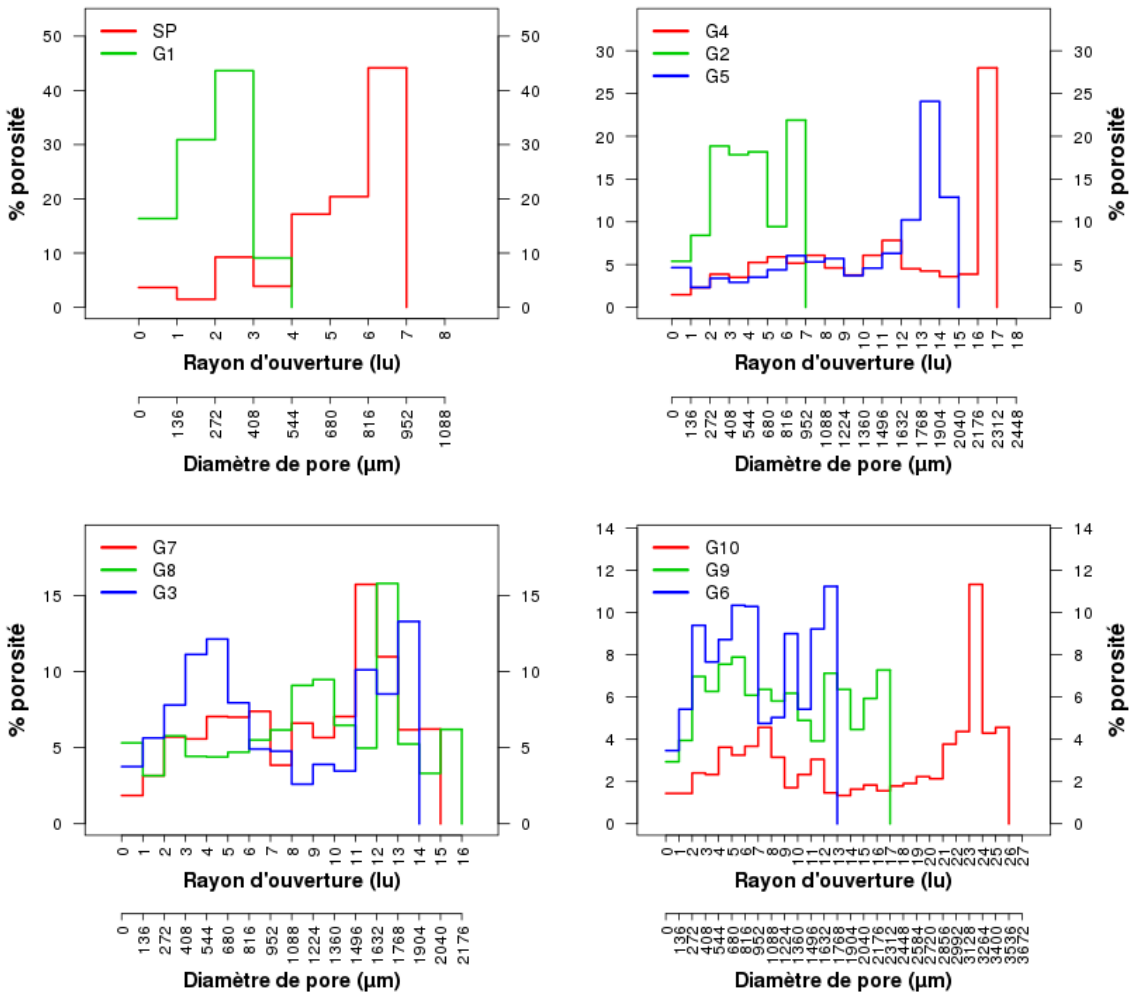


FIGURE 2.9 – **Distribution des tailles de pores pour l'empilement de sphère (*SP*) et les dix cubes** obtenue par opérations d'ouverture binaire selon la méthode de Vogel [1997].

les pores fins (136 - 408 μm de diamètre) sont responsables de la bonne connectivité de l'ensemble. La brusque augmentation de l'EPC est aussi indicatrice de gorges de cette taille. D'autres cubes se différencient par des valeurs toujours proches de zéro sans inflexion marquée (G_4, G_1). Ce type de courbe indique une porosité plutôt homogène : peu morcelée et sans rétrécissement important. Enfin, le cube G_3 se distingue par des valeurs d'abord positives puis nulles. Dans ce cas, les pores fins n'améliorent pas la connectivité du réseau mais forment un ensemble fragmenté avec peu de connections. Le même genre de courbe a été trouvé pour l'horizon AhBv dans les travaux de Vogel [1997].

Tortuosité géométrique

La tortuosité géométrique $\mathcal{T}$ est une grandeur adimensionnelle qui caractérise la sinuosité des chemins de diffusion dans l'espace poral. Elle est définie d'après la relation suivante :

$$\mathcal{T} = \frac{\mathcal{L}_g}{\mathcal{L}_e} \tag{2.5}$$

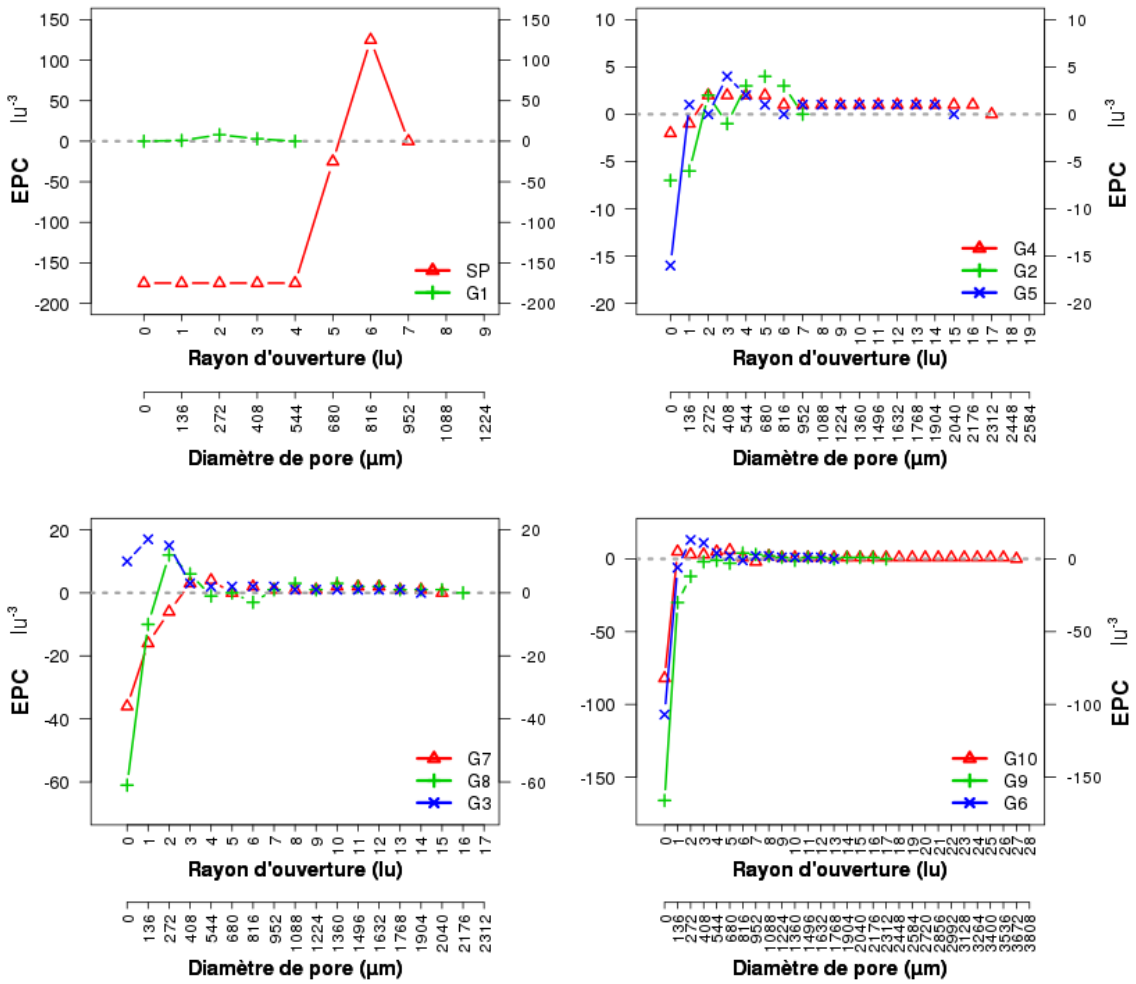


FIGURE 2.10 – **Caractéristique d'Euler-Poincaré** calculées pour les séries d'images après opérations successives d'ouverture binaire.

où $\mathcal{L}_g$ est la distance géodésique minimale (c'est-à-dire la longueur du plus court trajet des molécules de soluté entre deux points) et $\mathcal{L}_e$ la distance euclidienne [Clennell, 1997]. Les milieux pluriphasiques obtiennent des valeurs supérieures à 1, ce qui traduit l'allongement du parcours des molécules de soluté devant contourner les autres phases que celle dans laquelle elles diffusent. Cet allongement des chemins de diffusion est responsable d'une réduction du taux de diffusion effective du soluté D_e alors inférieur au coefficient de diffusion moléculaire dans l'eau D_m. Plusieurs relations entre tortuosité et coefficient de diffusion effective ont été définies, telle la relation de van Brakel et Heertjes [1974] :

$$D_e = \theta \frac{\delta}{\mathcal{T}} D_m \tag{2.6}$$

où θ est la teneur en eau volumique et δ la constrictivité géométrique. δ est un facteur inférieur ou égal à 1, qui intègre la variation de section de diffusion. δ est d'autant plus faible que l'aire de la plus petite section est étroite, et donc provoque le ralentissement du transfert des molécules au niveau des gorges par un phénomène de goulet d'étranglement [van Brakel et Heertjes, 1974; Genty et Pot, 2014].

Nous avons déterminé la tortuosité des dix milieux poreux dans la direction verticale, car c'est dans cette direction que nous avons étudié la diffusion dans les sections suivantes. Nous

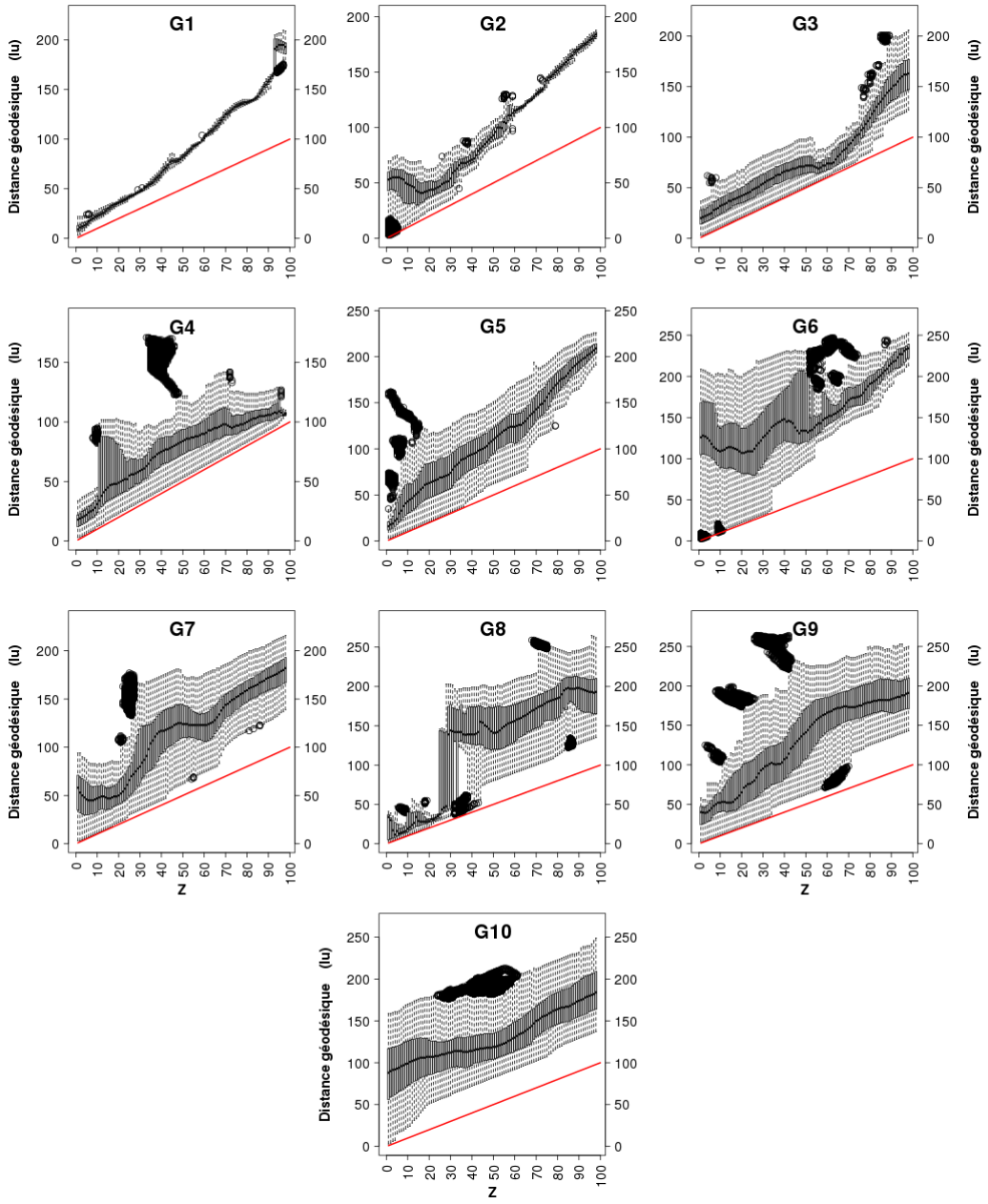


FIGURE 2.11 – **Dispersion des distances géodésiques en fonction de la profondeur du plan** pour les dix cubes.

avons calculé les distances géodésiques du premier plan ($Z = 1$) vers chacun des plans suivants ($Z = 2, 3, \cdots, 100$) selon la méthode de Gommes et al. [2009]. Nous avons utilisé pour cela un algorithme de connexité 6, qui parcourt la phase poreuse de voisin en voisin dans les trois directions orthogonales pour relier le premier plan au plan ($Z = i$ avec $1 < i \leq 100$).

La figure 2.12 présente une comparaison synthétique des dix milieux poreux, basée sur des distances géodésiques obtenues entre les plans $Z = 1$ et $Z = 100$ lu. En effet, d'après Gommes et al. [2009], les distances géométriques pour entre les deux extrémités d'un pore sont représentatives des conditions de transport dans toute la porosité de ce milieu.

Les distances géodésiques en fonction de la profondeur explorée sont représentées sous la forme de boîtes à moustaches, pour chaque milieu poreux dans la figure 2.11. La droite 1/1 en rouge correspond à une tortuosité géométrique de 1, c'est-à-dire un chemin de diffusion rectiligne et vertical entre les deux plans.

Le niveau de contrainte pour la diffusion qui s'exerce dans les milieux poreux et leur niveau d'hétérogénéité peut s'apprécier par l'amplitude de la dispersion des distances géodésiques (figure 2.11). Une faible amplitude indique des chemins de diffusion peu variés dans un canal étroit (exemple : G_1) alors qu'une forte amplitude (G_{10}, G_7, G_9, G_4) indique de multiples chemins de diffusion parcourant un pore large ou empruntant de nombreux petits pores bien connectés entre eux. Dans certains milieux, cette amplitude est relativement constante pour toutes les profondeurs (G_{10}, G_3) alors que d'autres montrent une variation de l'amplitude, avec une alternance de passages larges et resserrés (G_2, G_8), donc une hétérogénéité importante. Enfin, on peut étudier la proximité des valeurs minimales avec la droite 1/1. Les distances géodésiques minimales sont presque égales à la distance euclidienne sur toute la profondeur pour G_4 grâce à la présence de chemins de diffusion rectilignes le long d'un pore vertical droit. A l'opposé, dans certains milieux comme G_2 ou G_6, la distance géodésique peut représenter environ le double de la distance euclidienne sur certaines sections. On remarque aussi l'abondance des valeurs extrêmes dans les distances géodésiques élevées qui révèlent la présence de pores en cul-de-sac, imposant un détour pour la diffusion de la surface vers la profondeur (évidents pour G_4, G_5, G_6, G_9). Ces deux derniers points (présence de culs-de-sac et distances géodésiques minimales définissant la tortuosité géométrique) déterminent directement la vitesse de diffusion effective du soluté dans les milieux poreux.

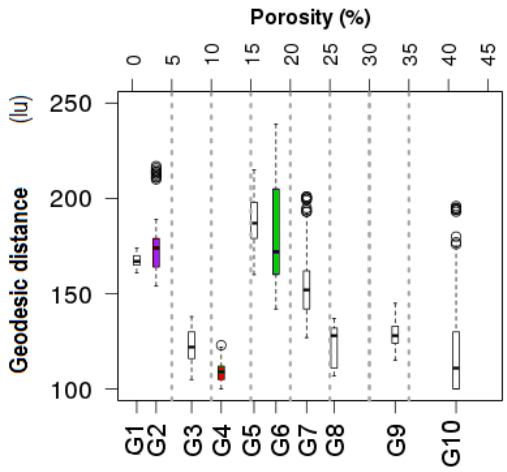


FIGURE 2.12 – **Dispersion des distances géodésiques entre les plans $Z = 1$ et $Z = 100$** pour les dix cubes.

Surface spécifique

La surface spécifique – le rapport entre la surface des contours d'un objet et de son volume – traduit le degré de complexité morphologique de cet objet. Dans le cas qui nous intéresse ici, la surface spécifique renseigne également sur les surfaces disponibles comme support pour les bactéries. L'objet 3D le plus régulier – la sphère – minimise la surface pour un volume donné. L'hétérogénéité d'un objet géométrique peut donc s'apprécier à l'écart entre sa surface spécifique et celle d'une sphère de même volume. Dans le cas de la porosité du sol, la rugosité et l'irrégularité de la surface des pores, ainsi que la prédominance de petits pores tendent à accroître la surface spécifique.

La surface spécifique d'un échantillon se réfère à la phase solide. La surface spécifique [L^{-1}] est estimée par le rapport entre la surface des pores, couverte par l'ensemble des "sites solides frontière" *NBS* et le volume de la phase solide, contenu dans l'ensemble des "sites solides" NS (équation 2.7).

$$SSA = \frac{NBS}{NS}\frac{\Delta S}{\Delta V} \tag{2.7}$$

où ΔS et ΔV sont la surface et le volume élémentaires représentés par un voxel. En unités réseau, on a $\Delta S = 1$ lu^2 et $\Delta V = 1$ lu^3.

Pour pouvoir être comparés malgré des différences de volume poreux, les résultats des différents milieux ont été rapportés à la surface spécifique d'une sphère de volume poreux équivalent, incluse dans un cube de 100^3 voxels. Le volume poreux V_p des milieux poreux est donné par le nombre de "sites fluides" NF multiplié par le volume d'un voxel. $V_p = NF \times \Delta V$.

On détermine le rayon de la sphère r_{eq} d'après ce volume poreux V_p (équation 2.8).

$$V_p = \frac{4}{3}\pi r_{eq}^3 \qquad \text{d'où} \qquad r_{eq} = \sqrt{\frac{3}{4}\frac{V_p}{\pi}}^3 \tag{2.8}$$

La surface de la sphère S_p (équation 2.9) est alors :

$$S_p = 4\pi r_{eq}^2 \tag{2.9}$$

Le volume de la phase solide V_s correspond au volume du cube moins le volume poreux, occupé par la sphère (équation 2.10).

$$V_s = 100^3 - V_p \tag{2.10}$$

Finalement, la surface spécifique de la sphère de volume équivalent SSA_{eq} est donnée dans la relation 2.11.

$$SSA_{eq} = \frac{S_p}{V_s} \qquad \text{soit} \qquad SSA_{eq} = \frac{\left(\frac{3}{4}\frac{V_p}{\pi}\right)^{\frac{2}{3}}}{100^3 - \frac{V_p}{\pi}} \tag{2.11}$$

Les résultats des 10 cubes sont exprimés comme une surface spécifique normalisée SSA_n [-] (équation 2.12).

$$SSA_n = \frac{SSA}{SSA_{eq}} \tag{2.12}$$

Les 10 milieux étudiés ont une surface spécifique environ 2 à 3 fois plus élevée que des sphères de volume équivalent (figure 2.13). Les plus faibles valeurs, légèrement inférieures à 2, pour les milieux G_4, G_5, G_{10} suggèrent une architecture poreuse relativement homogène. Une valeur de 3

ou plus (G_6, G_9) est indicatrice de motifs beaucoup plus irréguliers et d'une part importante de la porosité occupée par des petits pores.

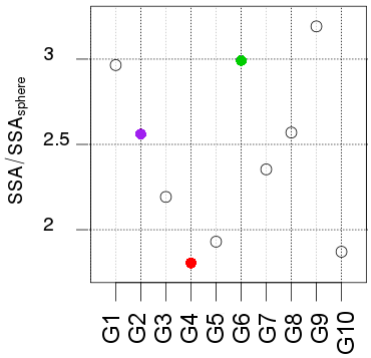


FIGURE 2.13 – **Surface spécifique** de la phase solide des cubes rapportée à la surface spécifique d'une sphère de volume poreux équivalent.

Sélection de trois milieux poreux

Les résultats des différents indicateurs (distribution des tailles de pores, caractéristique d'Euler-Poincaré, tortuosité, surface spécifique) ont été pris en compte pour choisir des milieux poreux de complexité morphologique contrastée. Ces indicateurs concordent pour discriminer le milieu G_4 comme le plus homogène. Il est caractérisé par un vaste volume poreux, sans variation notoire de diamètre de pores, suggéré par la valeur d'EPC toujours proche de 0, une tortuosité géométrique proche de 1 et une faible surface spécifique. Cela est confirmé par la visualisation de sa géométrie (figure 2.3) caractérisée par un large pore, droit à orientation verticale.

A l'opposé, le cube G_6 montre une courbe d'EPC passant d'une valeur initiale largement négative à zéro dès la première étape d'ouverture binaire, suggérant la présence de rétrécissements de section ou des pores étroits d'un diamètre de 2 lu (136 μm). La tortuosité de ce milieu est des plus élevées (figures 2.11-2.12) et l'amplitude de dispersion des distances géodésiques est importante mais variable selon la profondeur. L'illustration de la géométrie en figure 2.3 montre deux pores d'aspect irrégulier (l'un massif dans la moitié supérieure et un plus réduit dans la moitié inférieure) connectés par une unique jonction. La valeur élevée de surface spécifique est indicatrice d'une porosité éclatée en de nombreux petits pores. De nombreuses excroissances et pores fins peuvent en effet être discernés sur la figure 2.3.

Tous les indicateurs ne sont pas unanimes pour cube G_2. Ce milieu a une courbe d'EPC le classant dans les milieux plutôt homogènes. Cependant, la surface spécifique et la tortuosité sont plutôt élevées. Son choix se base sur une appréciation visuelle. Sa géométrie – en forme d'entonnoir avec un large pore en haut (diamètre maximal de 40 lu ou 2700 μm) se prolongeant par un pore étroit (diamètre minimal de 5 lu ou 340 μm) jusqu'au fond – suggère une anisotropie pour la diffusion dans la direction verticale (figure 2.11).

Les milieux G_4, G_6 et G_2 se différencient aussi par leurs valeurs de porosité totale : 11,25%, 18,82% et 3,02% respectivement.

Ces trois milieux constituent les trois modalités du facteur Géométrie (G).

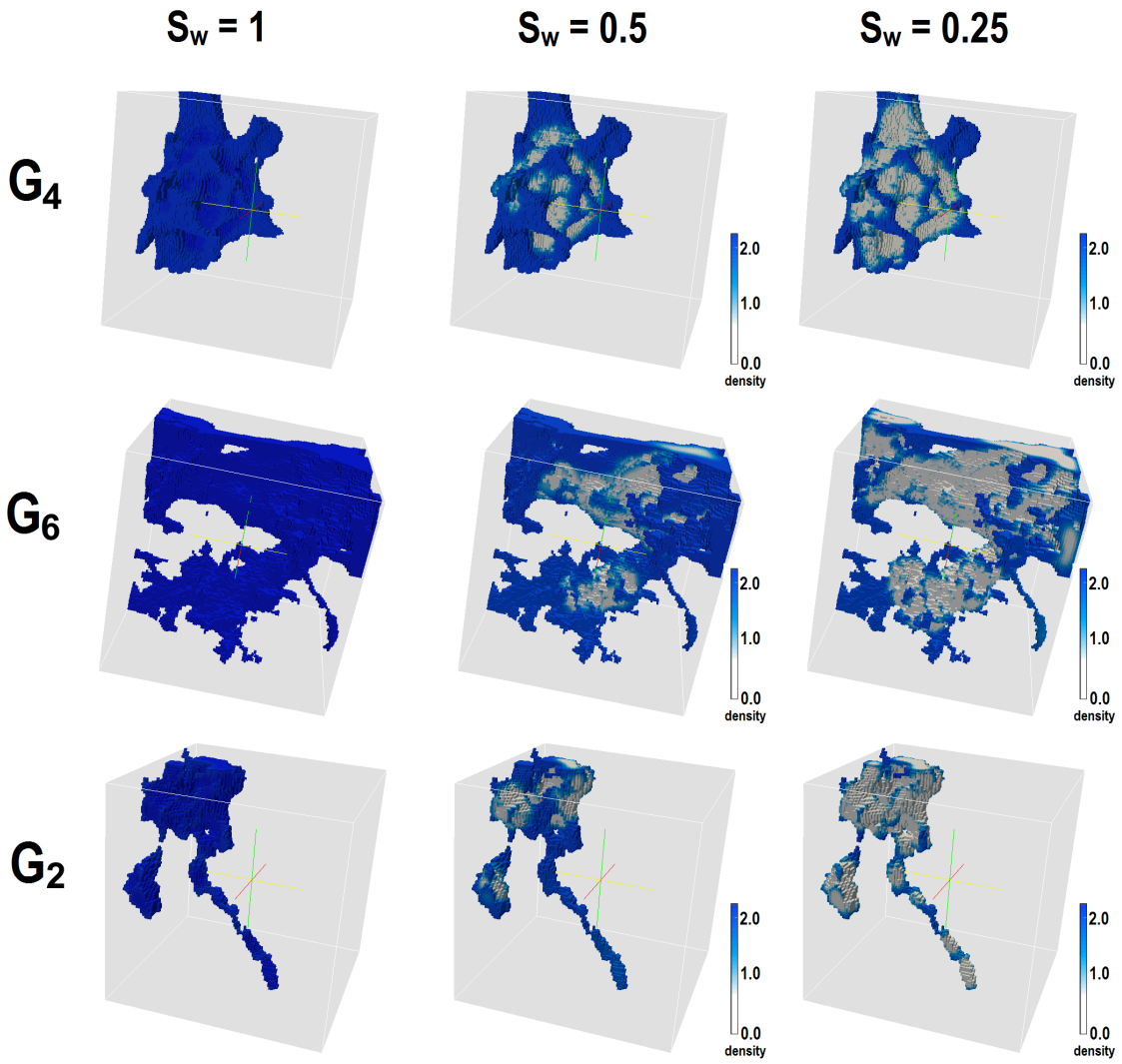


FIGURE 2.14 – **Géométrie de l'espace poral et distribution eau / air** dans les trois milieux sélectionnés (G_4, G_6, G_2) aux trois indices de saturation ($S_w = 1$, $S_w = 0,5$, $S_w = 0,25$). La phase liquide est en bleu et la phase gazeuse en beige. La phase solide n'est pas représentée.

2.1.3 Génération de trois niveaux de saturation en eau

Trois indices de saturation S_w ont été simulés dans chacun des trois milieux poreux, $S_w = 1$, $S_w = 0,5$ et $S_w = 0,25$, correspondant respectivement à 100, 50 et 25% du volume poreux occupé par la phase aqueuse.

Pour la saturation complète, tous les voxels de la porosité sont considérés comme "sites fluides" et seront concernés par le calcul de la collision. Les images originales ont donc été utilisées telles quelles pour la simulation de la biodégradation couplée au transport de solutés.

On peut représenter des conditions de saturation partielles en simulant au préalable la séparation de phase avec le modèle TRT diphasique comme décrit dans la section 1.1.6 du chapitre précédent. On impose un certain indice de saturation S_w en fixant la densité initiale de fluide (ρ_0) d'après la relation 2.13.

$$\rho_0 = S_w\ \rho_L \quad + \quad (1 - S_w)\ \rho_G \tag{2.13}$$

ρ_L et ρ_G sont les densités théoriques de liquide et de gaz pour la phase liquide et la phase gazeuse déduites du diagramme de phase de l'eau (voir section 1.1.6. Pour le paramètre $G = -0,16$, on trouve par construction de Maxwell les densités théoriques liquide et gazeuse $\rho_L = 2,42$ et $\rho_G = 0,03$. On impose donc des densités initiales $\rho_0 = 1,225$ et $\rho_0 = 0,6275$ pour obtenir les niveaux de saturation $S_w = 0,5$ et $S_w = 0,25$ respectivement.

Cependant, nous avons constaté en procédant ainsi que le modèle présentait des instabilités, en particulier lorsque la géométrie de l'espace poral est fortement complexe. Pour pallier ces instabilités, nous avons « forcé » la séparation de phase en initialisant une densité de fluide ρ_l élevée sur les sites à l'interface alors que la valeur ρ_g, plus faible, est affectée partout ailleurs.

ρ_l et ρ_g s'écartent des valeurs théoriques ρ_L et ρ_G respectivement en fonction de la proportion entre le volume à l'interface (représenté par de nombre de "sites fluides frontière" NBF) et le volume de la porosité sans contact direct avec la paroi ($NF - NBF$), tout en respectant la relation 2.14.

$$\rho_0 = \frac{NBF \times \rho_l \; + \; (NF - NBF) \times \rho_g}{NF} \tag{2.14}$$

Lorsque $NBF < (NF - NBF)$, on impose $\rho_l = \rho_L$. On déduit alors ρ_g de l'équation 2.14. Inversement, si $NBF > (NF - NBF)$, on impose $\rho_g = \rho_G$ et on déduit ρ_l d'après la relation 2.14. De cette manière on initialise les densités de fluide ρ_g et ρ_l toujours positives et comprises dans l'intervalle $[\rho_G; \rho L]$ correspondant au domaine d'instabilité défini par l'équation d'état de l'eau (section 1.1.6, équation 1.29, figure 1.2).

La viscosité cinématique de l'eau à 20°C, $\nu_P = 1,004$ mm^2.s^{-1}, correspond à la valeur $\nu_{LB} = \frac{1}{6}$ en unité réseau. Pour une résolution de 68 μm, on obtient un pas de temps de 0.765 ms d'après la relation 1.25. Les distributions à l'équilibre ont été obtenues après 5000 pas de temps, soit environ 3,825 s. Elles peuvent être visualisées dans la figure 2.14. Des bulles d'air apparaissent au centre des plus gros pores pour $S_w = 0,5$ et augmentent en taille à $S_w = 0,25$. L'eau ne reste alors que dans les anfractuosités, dans les pores les plus étroits et à l'interface avec les parois, conformément à la loi de Young-Laplace (figure 2.15).

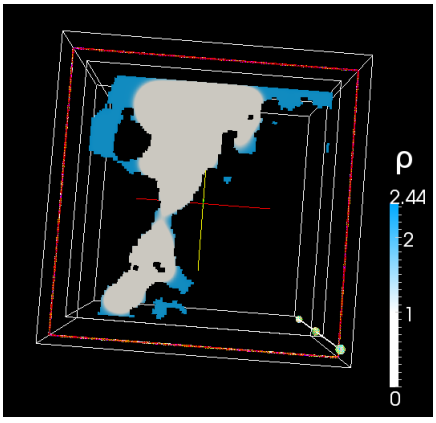


FIGURE 2.15 – **Répartition des phases aqueuse** (en bleu) **et gazeuse** (en beige) **simulée par le modèle TRT-LBM diphasique et montrée en 2D**. La section donnée en exemple est à $Z = 20$ lu du cube G_6 pour l'indice de saturation S_w=0,5.

Il est intéressant d'observer la distribution de la phase aqueuse selon l'axe vertical aux trois indices de saturation simulés (en figure 2.16) car elle détermine le transfert de soluté du haut vers le bas du cube. Le nombre de "sites fluides" (assimilé au volume d'eau) initialement plus élevé

dans les grands pores s'homogénéise le long du profil lorsque la saturation diminue. Au plus faible indice de saturation, l'eau résiduelle est à proximité des parois. Le milieu G_2 se distingue des autres car la quasi-totalité des "sites fluides" sont des "sites fluides frontière" à $S_w = 0,25$ alors que la proportion des "sites fluides frontière" est la plus faible pour G_4 à la même saturation.

Les voxels occupés par la phase gazeuse seront par la suite traités comme la phase solide et sont exclus du volume de diffusion, à la manière de Chau et al. [2005]. Nous supposons ici que le soluté ne change pas de phase. Cette hypothèse est acceptable pour le carbone organique dissous dans la solution du sol ou certains pesticides peu volatiles. La carte de répartition des densités des phases, sortie du modèle diphasique est prise comme fichier d'entrée de géométrie pour le modèle LBioS. La nouvelle image est seuillée à une valeur équidistante de ρ_l et ρ_g. Les conditions de rebond qui ont cours à l'interface solide / liquide sont appliquées aux sites de l'interface eau / air. Les sites à l'interface eau / air ne se voient cependant pas concernés par l'ensemble des processus aux frontières liquide / solide, tels que la sorption ou la croissance microbienne.

Les trois indices de saturation représentent les modalités du facteur Saturation (S).

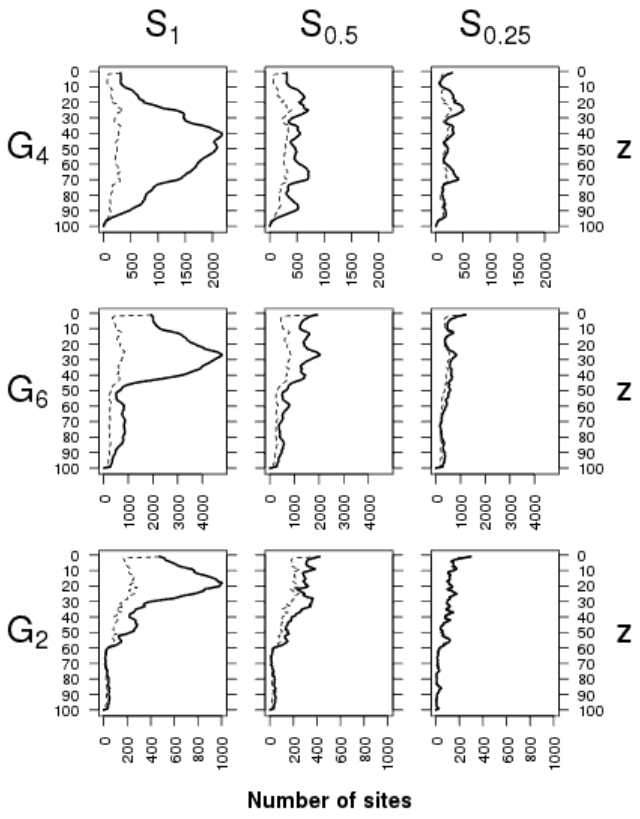


FIGURE 2.16 – **Distribution des "sites fluides"** (trait plein) **et des "sites fluides frontière"**(trait tireté) le long de l'axe vertical dans les trois milieux poreux aux trois indices de saturation calculés ($S_w = 1, S_w = 0,5$ et $S_w = 0,25$.

Diffusion effective dans les trois milieux poreux, aux trois niveaux de saturation Nous avons simulé la diffusion d'un traceur dans chaque milieu pour chaque indice de saturation, pour compléter la caractérisation morphologique basée sur l'étude de la tortuosité géométrique et pour estimer le niveau de contrainte pour la diffusion pour le cas de saturation partielle. Trois des six faces des cubes (plans $X = 100$, $Y = 100$ et $Z = 100$) ont été considérées comme des murs faisant

obstacle à la propagation du soluté pour éviter des conditions limites périodiques aux extrémités des cubes. L'apport du traceur se fait en un *pulse* d'une masse $M = M_0$ appliqué uniquement sur le plan $Z = 1$, en début de simulation ($t = 0$). Cet apport concentré sur le premier plan engendre un gradient dans la direction verticale. On obtient un profil de masses de soluté selon Z d'après les sorties 3D du modèle en sommant les densités de soluté sur tous les "sites fluides" en chaque plan : $M(z,t) = \sum_{r \in Z} \sum_q f_q$.

Nous avons comparé la répartition des masses selon Z simulée $M(z,t)$ à la solution analytique de la diffusion dans un milieu semi-infini en 1D ($M_{th}(z)$), pour des conditions de saturation partielle (équation 2.15), selon l'approche de Genty et Pot [2014].

$$M_{th}(z) = \frac{M_0}{\sqrt{\pi D_e t/\theta}} \times exp\left(-\frac{(z-z_0)^2}{4D_e t/\theta}\right) \tag{2.15}$$

où D_e est le coefficient de diffusion effective [$L^2.T^{-1}$], θ la teneur en eau volumique, z la coordonnée selon l'axe vertical et z_0 la coordonnée verticale où est fait l'apport ($z_0 = 1$). D_m, le coefficient de diffusion moléculaire est fixé à 0,5 $lu^2.tu^{-1}$. t est le pas de temps de sortie auquel les profils de masse analytique et simulée sont comparés. La période t doit être suffisamment longue pour que le soluté ait parcouru une part importante du milieu mais aussi suffisamment courte pour garder une concentration quasi-nulle au fond pour respecter les conditions semi-infinies de la solution analytique. La résolution spatiale de 68 μm donne une résolution en temps de 3,435 secondes d'après l'équation 1.37. Les simulations sont lancées pour une période totale d'environ 521 000 tu (10 jours) avec un pas de temps de sortie de 175 tu (10 minutes). Le temps t est défini pour chaque milieu et chaque niveau de saturation. Il s'agit du temps à partir duquel la concentration dans les "sites fluides" du plan $Z = 99$ atteint 1% de la masse M_0 rapportée au nombre total de "sites fluides" total (NF) dans le milieu.

Le coefficient de diffusion effective D_e a été optimisé en minimisant l'erreur en L2, notée E_L (équation 2.16).

$$E_L = \sqrt{\frac{\sum_r \left[M_{th}(z) - M(z)\right]^2}{\sum_r M_{th}(z)^2}} \tag{2.16}$$

Les valeurs de D_e et E_L donnent des informations complémentaires sur l'hétérogénéité des chemins de diffusion. Une valeur élevée pour D_e indique une topologie de pores plutôt homogène présentant peu d'obstacles à la diffusion. E_L quantifie l'écart des concentrations simulées au profil gaussien donné par la solution analytique (2.16). Une valeur élevée est donc indicatrice d'une topologie hétérogène imposant une forte contrainte pour la diffusion.

Les résultats sont présentés dans la figure 2.17. Les valeurs de E_L sont élevées dans tous les cas, du fait du degré d'hétérogénéité important des milieux poreux. Le coefficient de diffusion effective D_e, optimisé d'après ce critère E_L, est apprécié en termes relatifs et non pour leurs valeurs exactes, comme moyen d'apprécier de hiérarchiser les milieux poreux.

La diffusion effective est à la fois affectée par la géométrie des pores et le niveau de saturation (figure 2.17). A saturation complète, les milieux poreux ont pu être classés selon l'ordre décroissant du coefficient de diffusion effectif. On obtient ainsi $G_4 > G_6 > G_2$. Cet ordre est conservé quel que soit le niveau de saturation, le contraste entre les milieux ne faisant qu'augmenter avec la baisse de la saturation.

En conditions de saturation totale, pour G_4, le profil de masses simulé est relativement proche

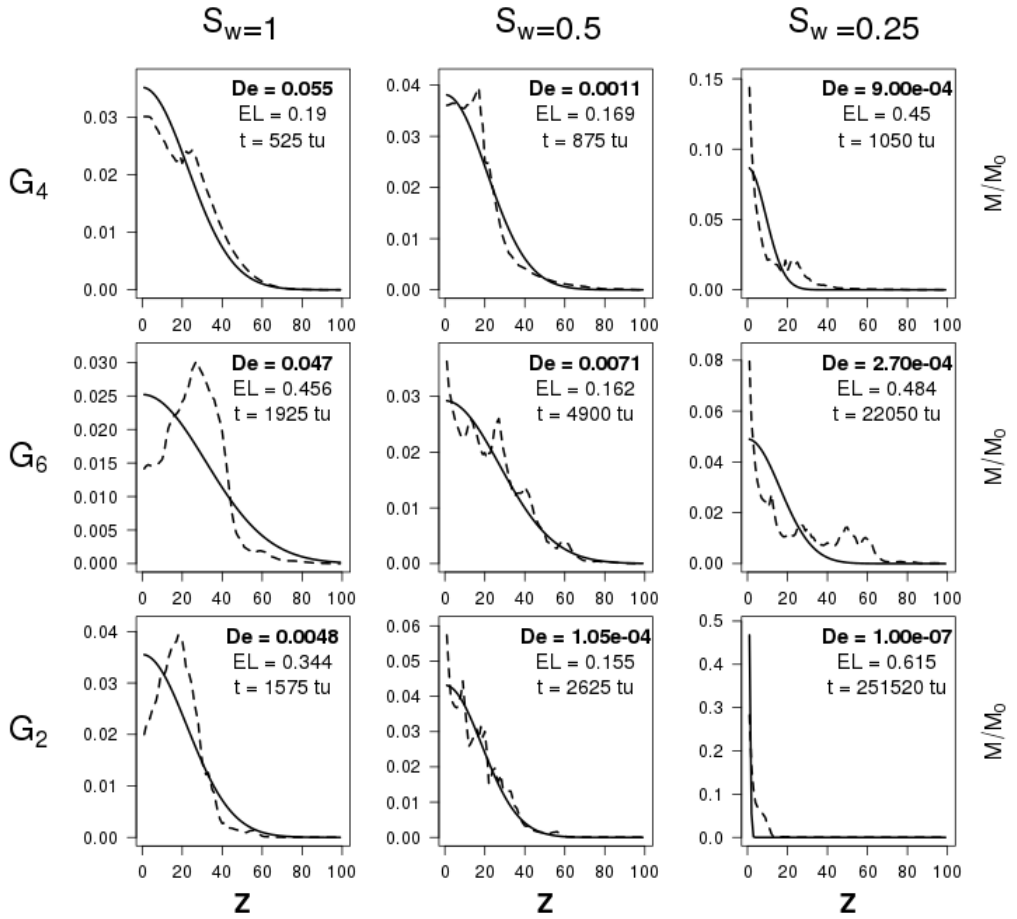


FIGURE 2.17 – **Profils selon Z de répartition de masses théoriques** (équation 2.15) en traits pleins **et simulés** (traits tiretés), dans les trois milieux (G_4, G_6, G_2), aux indices de saturation ($S_w = 1$, $S_w = 0.5$, $S_w = 0.25$). Les masses (en unités masses réseau, mu) sont normalisées par la masse initiale du *pulse* M_0.

du profil gaussien théorique. Ceci confirme les résultats de l'analyse morphologique (section 2.1.2), caractérisant ce milieu comme plutôt homogène. Dans les deux autres milieux, la distribution des masses relatives s'écarte d'un profil gaussien, avec une zone où le soluté est sur-représenté en haut et une région où il est sous-représenté en bas. Ces divergences par rapport à la solution analytique trahissent la présence de constrictions – ceci est observable dans la figure 2.14 et suggéré dans la figure 2.11 – qui ralentissent la propagation du soluté en profondeur. Les profils simulés deviennent de plus en plus irréguliers (en dents de scie) à mesure que l'indice de saturation en eau diminue. Un cas extrême est trouvé pour le milieu G_2 à $S_w = 0,25$ où le soluté ne se propage pas au-delà d'une profondeur de 20 lu (1360 μm), probablement car la phase aqueuse s'interrompt à cette profondeur. Ceci est dû à la discrétisation grossière de l'espace à la résolution de 68 μm qui ne permet pas de représenter les films mouillants assurant la continuité de la phase aqueuse.

2.1.4 Initialisation de la biodégradation du substrat

Paramétrisation du module de biodégradation

Pour une première application du modèle LBioS, un cas simple de dynamique avec un nombre limité de processus a été préféré. La cinétique de dégradation d'un seul substrat soluble et labile – le fructose – est simulée. Le fructose est un isomère du glucose et possède donc des propriétés physico-

chimiques similaires. Il a été observé que le glucose n'interagissait pas ou faiblement avec la phase solide du sol [Nguyen et Guckert, 2001]. Nous faisons l'hypothèse d'un coefficient d'adsorption nul pour le fructose. Les processus d'hydrolyse (équation 1.52) et d'adsorption - désorption (équations 1.53 et 1.54) n'auront donc pas à être traités ici. Les pools POC et SC sont initialisés et resteront à 0. De plus, nous avons fait l'hypothèse que le flux de mortalité est intégralement composé de carbone soluble, s'ajoutant au pool de DOC ($p_m = 0$) et ne s'adsorbant pas aux parois. Les pools impliqués dans la cinétique sont donc le DOC, la biomasse bactérienne B et le CO_2.

Le modèle de décomposition se résume alors aux équations 1.55, 1.56 et 1.59). Les paramètres du modèle de biodégradation ont été convertis à la manière expliquée dans la section 1.2.3. Ils sont reportés dans le tableau 2.1.

Symbole	**Définition**	**Valeurs physiques**	**Valeurs réseau**	**Références**
D_M	Coeff. diff. mol. du DOC	$6,73.10^{-6}$ $cm^2.s^{-1}$	0,5 $lu^2.tu^{-1}$	[GRC, 1986]
v_{DOC}	Taux max. prélèvement	$1,97.10^{-4}$ s^{-1}	$6,76.10^{-4}$ tu^{-1}	[Monga et al., 2014]
k_{DOC}	Constante de saturation	5.10^{-4} $mgC.cm^{-3}$ eau	$1,57.10^{-10}$ $mu.lu^{-3}$	[Monga et al., 2014]
k_r	Taux respiration	$2,31.10^{-6}$ s^{-1}	$7,95.10^{-6}$ tu^{-1}	[Monga et al., 2014]
k_m	Taux mortalité	$1.74.10^{-5}$ s^{-1}	$5,96.10^{-5}$ tu^{-1}	[Monga et al., 2014]
k_{i_k}	Cste d'inhibition physio.	$5,06.10^{-2}$ $mgC.g^{-1}$ sol	$1,91.10^{-8}$ $mu.lu^{-3}$	[Ingwersen et al., 2008]
R_0	État physio. initial	0.1 [-]	0.1 [-]	[Ingwersen et al., 2008]
DOC_0	Masse initiale DOC	$5,89.10^{-3}$ mgC	$5,89.10^{-3}$ mu	[Monga et al., 2014]
B_0	Biomasse initiale	$1,24.10^{-8}$ mgC	$1,24.10^{-8}$ mu	[Monga et al., 2014]

TABLE 2.1 – **Paramètres du module de décomposition de LBioS**

Les mêmes masses initiales de DOC (DOC_0) et de biomasse (B_0) ont été apportées dans tous les scénarios. Comme le volume d'eau change avec la porosité totale du milieu et l'indice de saturation, les concentrations initiales varient entre les scénarios. En conditions réelles, la concentration de la solution du sol varie avec le potentiel hydrique. Nous avons donc décidé de travailler avec des masses et non des concentrations initiales identiques entre les différents scénarios, pour observer l'impact du niveau global de concentration comme facteur abiotique à part entière.

Les conditions initiales et les conditions aux limites concernant la diffusion du substrat sont les mêmes que pour le cas du traceur (section 2.1.3) : une masse initiale DOC_0 est apportée en début de simulation sur les "sites fluides" du plan $Z = 1$; les murs solides sont disposés sur les plans $X = 100$, $Y = 100$ et $Z = 100$. La masse de bactéries a été répartie selon trois arrangements spatiaux selon l'axe vertical, c'est-à-dire dans l'axe du gradient de concentration causé par l'apport du substrat en *pulse*.

Pour tester l'influence d'une caractéristique intrinsèque des décomposeurs – en particulier celle de la dormance – sur la cinétique de dégradation, les sorties du modèle avec ou sans prise en compte de l'état physiologique seront confrontées. Dans la modalité P_0, l'état physiologique reste toujours égal à 1, représentant des conditions optimales. Dans la modalité P_1, R est fonction de la concentration locale de DOC (équation 1.51). La valeur de la constante d'inhibition entrant dans son calcul k_{i_r} est caractéristique des bactéries hétérotrophes du sol (stratèges r).

Ces deux alternatives constituent les deux modalités du facteur Physiologie (P).

Distribution spatiale des bactéries

Les bactéries du sol ont souvent été observées sous la forme de *hot-spots* [Nunan et al., 2002; Raynaud et Nunan, 2014; Vieublé-Gonod et al., 2006; Vieublé-Gonod et al., 2003] ou de biofilms [Pintelon et al., 2012]. Les biofilms, formations à haute densité cellulaire, sont surtout étudiés pour leur expansion rapide dans les milieux poreux et l'altération des conditions hydrodynamiques par le phénomène de *bioclogging* [Pintelon et al., 2012]. Les phénomènes de rétroaction du développement biologique sur les processus physiques ne font pas l'objet de cette étude. L'expansion spatiale des bactéries n'est d'ailleurs pas prise en compte (section 1.2.2).

Les microcolonies sont les plus fréquentes dans les zones riches en nutriments, (à proximité de résidus végétaux, fèces, *etc.*) ou dans les micropores offrant des conditions physico-chimiques relativement stables et un abri contre la prédation. Les micropores et les zones riches en nutriments (à proximité de résidus organiques) sont des habitats privilégiés des bactéries du sol [Foster, 1988; Ladd et al., 1996]. Ni les uns ni les autres n'ont été représentés ici, du fait de la limite de résolution d'une part, et de l'absence de composés organiques insolubles d'autre part. Plusieurs travaux appuient l'hypothèse d'une distribution bactérienne à la surface plutôt qu'à l'intérieur des agrégats en raison de conditions plus favorables pour l'apport de substrats et d'oxygène [Smucker et al., 2007]. Ainsi, Chenu et al. [2001] ont observé que l'apport d'un substrat soluble – le glucose – favorisait le développement des microorganismes à la surface des agrégats. C'est ce type de répartition bactérienne, agrégée et à la surface des macroaggrégats, que nous représentons ici, en attribuant à dix "sites fluides frontière" un dixième de la quantité de biomasse initiale (B_0) chacun.

Nous avons réparti la biomasse initiale de manière à respecter les conclusions d'études traitant de la spatialisation de de l'activité microbienne à une échelle proche de celle de notre étude. Grundmann et al. [2001] ont trouvé des distances relatives de quelques centaines de microns en modélisant la distribution de zones d'activité de bactéries nitrifiantes. Ils rapportent une valeur représentative de 375 μm. D'autres auteurs ont montré que les *hot-spots* de flore dégradante spécifique de pesticides peuvent s'influencer sur des distances de l'ordre du millimètre [Grundmann et Debouzie, 2000], voire du centimètre [Vieublé-Gonod et al., 2006; Vieublé-Gonod et al., 2003].

Nous avons créé trois types de répartition qui diffèrent par la distance moyenne à la source de substrat et par l'espacement des *hot-spots* entre eux. Dans la distribution "Dispersée" (L_D) les sites porteurs de bactéries sont régulièrement espacés tout le long de l'axe vertical (un *hot-spot* tous les 10 lu soit 680 μm). Nous avons aussi généré deux modalités de distribution extrêmes où les "sites bactériens" sont espacés tous les 3 lu (204 μm) soit à proximité, soit à l'opposé de la source de substrat. Pour la distribution "Colocalisée" (L_C), les dix *hot-spots* se concentrent sur le tiers supérieur du cube ($Z < 30$ lu soit 2040 μm) alors que pour la distribution "Non-colocalisée" (L_{NC}), les sites bactériens se trouvent uniquement sur le tiers inférieur $Z \geq 70$ lu soit 4760 μm). La distribution de l'apport de substrat et celle des "sites bactériens" est illustrée dans la figure 2.18.

Les trois types de distribution bactérienne sont les trois modalités du facteur Localisation (L).

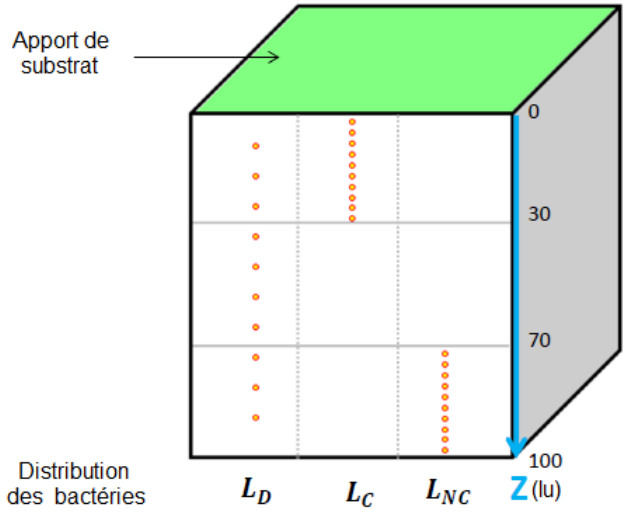


FIGURE 2.18 – **Répartition des dix "sites bactériens" selon la profondeur illustrée pour chacune des modalités de localisation.** Le substrat (représenté en vert au temps initial) est apporté en un *pulse* sur le plan $Z = 1$ lu. Les "sites bactériens" sont répartis sur toute la profondeur (localisation "Dispersée" L_D), sur le tiers supérieur (localisation "Colocalisée" L_C) ou tiers inférieur du cube (localisation "Non-colocalisée" L_{NC}).

2.2 Analyse de sensibilité globale

Une analyse de sensibilité globale [Lamboni et al., 2009; Wallach et al., 2013] prenant la forme d'une ANOVA a été menée pour quantifier l'influence de quatre facteurs d'entrée sur la valeur des trois variables de sortie du modèle à un temps donné. Les variables de sortie sont les quantités totales de DOC, de biomasse B et de CO_2. Les quatre facteurs ont été abondamment décrits dans les paragraphes précédents. Il s'agit de la géométrie (G), de l'indice de saturation (S), de la localisation des bactéries (L) et de leurs caractéristiques physiologiques (P). Les trois premiers facteurs comptent trois modalités ou niveaux, le dernier seulement deux. Le plan d'expérience est dit complet car toutes les modalités de tous les facteurs sont combinées en $3 \times 3 \times 3 \times 2 = 54$ scénarios.

La somme totale des carrés des écarts S_T exprime la variabilité totale pour chaque variable de sortie. Elle est formulée dans l'équation 2.17 où y_n est la valeur de la variable de sortie étudiée (y) pour le $n^{ème}$ des N scénarios avec $n = 1, \cdots N$, et $\bar{y}$ la moyenne de y sur tous les scénarios.

$$S_T = \sum_{n=1}^{N} (y_n - \bar{y})^2 \tag{2.17}$$

La variance totale peut être décomposée en une série de sommes des carrés des écarts associées aux quatre facteurs seuls et aux interactions entre les facteurs. La somme totale des carrés des écarts prend alors la forme présentée dans l'équation 2.18 où les lettres majuscules en indice désignent les facteurs et le signe " :" l'interaction.

$$\begin{aligned} S_T = S_G + S_S + S_L + S_P \\ + \quad S_{G:S} + S_{G:L} + S_{G:P} + S_{S:L} + S_{S:P} + S_{L:P} \\ + \quad S_{G:S:L} + S_{G:S:P} + S_{G:L:P} + S_{S:L:P} \\ + \quad S_{G:S:L:P} \end{aligned} \tag{2.18}$$

Chacun des quatre premiers termes à droite du signe égal traduit l'effet principal de chaque facteur, c'est-à-dire l'effet de chaque facteur seul. Les autres termes représentent les interactions de premier, second et troisième degré. La somme de tous les termes comprenant un facteur, seul ou en interaction, représente l'effet global de ce facteur.

La part de variance expliquée par chacun des facteurs et des interactions a été exprimée sous la forme d'indices de sensibilité SI_x (équation 2.19).

$$SI_x = \frac{S_x}{S_T} \times 100 \tag{2.19}$$

où S_x désigne l'un des quinze termes de l'équation 2.18. La somme de tous les indices SI_x est égale à 100%.

Nous avons calculé les termes de décomposition de l'équation 2.18 et les indices de sensibilité SI_x à l'aide de la fonction `aov` du logiciel libre `R` [R Core Team, 2014] dédiée à l'analyse de variance. Le classement des indices de sensibilité SI_x dépend du scénario que l'on choisit comme référence. Nous avons désigné le cas qui nous semblait le plus homogène comme référence. Il s'agit du scénario généré par l'association du milieu G_4, du niveau de saturation $S_w = 1$, de la distribution "Dispersée" et de la modalité de physiologie sans calcul de l'activité P_0. Les conditions les plus homogènes pour la diffusion sont atteintes pour le milieu G_4 à saturation complète (paragraphe 2.1.3). La modalité "Dispersée" présente la distribution bactérienne la plus régulière selon l'axe de propagation du substrat (section 2.1.4). Enfin, l'état physiologique, invariant pour la modalité de physiologie P_0, est par définition homogène dans l'espace.

2.3 Résultats

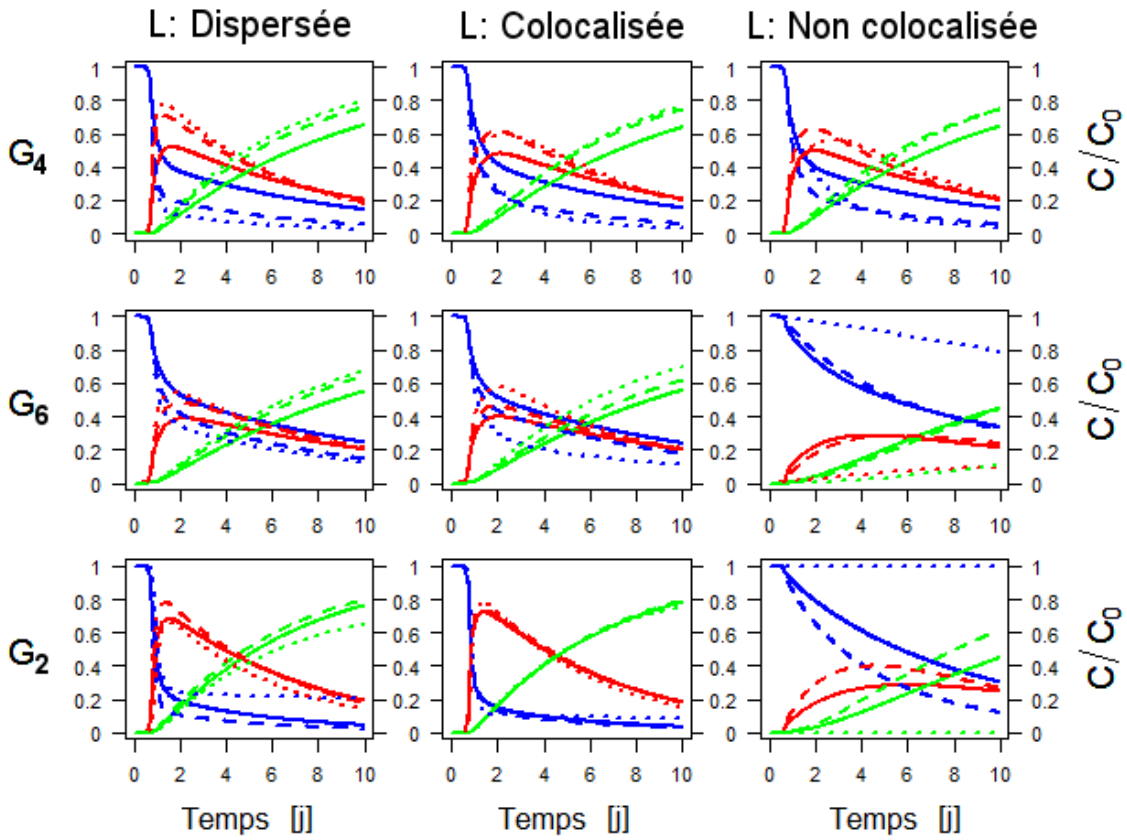
2.3.1 Cinétiques de biodégradation du substrat

Les cinétiques de l'intégralité des scénarios sont montrées dans les figures 2.19a-2.19b. Quelques exemples marquants sont également illustrés par les figures 2.20 - 2.24. Les pools de DOC, B et CO_2 y sont représentés respectivement en bleu, rouge et vert. Le tableau 2.2 donne la valeur moyenne, l'amplitude et le coefficient de variations des valeurs finales (à dix jours) de chaque pool pour les 54 scénarios.

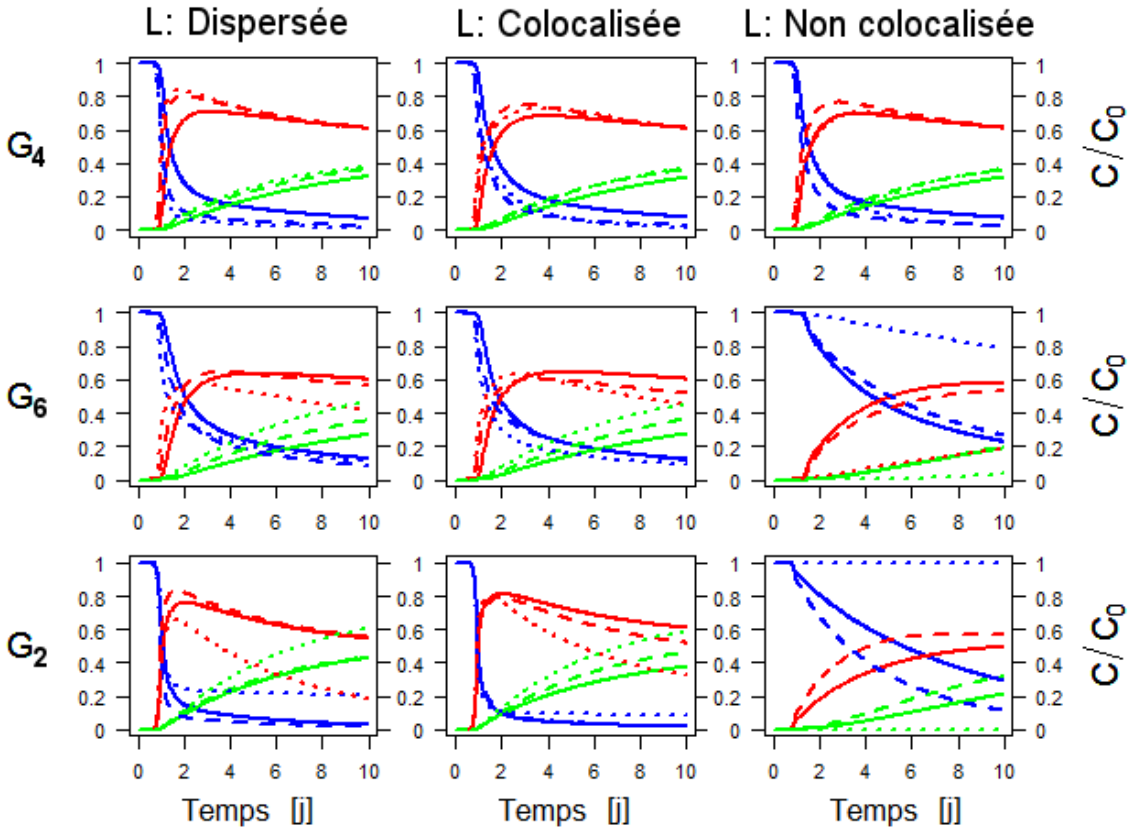
	DOC	***B***	***CO_2***
Moyenne	0,173	0,362	0,464
Min	0,015	$1,56.10^{-6}$	$8,50.10^{-8}$
Max	1,00	0,614	0,798
CV	1,313	0,527	0,444

TABLE 2.2 – **Résultats des 54 scénarios.** Les valeurs sont exprimées en masse de C par rapport à la masse totale initialisée.

Une grande variabilité peut être observée dans les cinétiques émanant du même apport de substrat, comme le soulignent les coefficients de variation élevés (table 2.2). Les différents scénarios aboutissent à des situations allant de l'épuisement complet (figure 2.24a, trait tireté bleu) à la conservation intégrale du substrat (figure 2.21b, trait tireté-pointillé bleu). Dans certains scénarios, la cinétique de croissance des bactéries est typique de conditions optimales en milieu homogène [Reischke et al., 2014] avec la séquence classique en trois phases – latence - croissance exponentielle



(a) 27 scénarios avec la modalité de physiologie P_0



(b) 27 scénarios avec la modalité de physiologie P_1

FIGURE 2.19 – **Cinétique de biodégradation du DOC dans les 54 scénarios**. Les scénarios correspondant à chacune des deux modalités de physiologie sont montrés sur deux pages séparées (P_0 en (a) et P_1 en (b)). Dans chaque page, les encarts correspondant aux différentes géométries sont ordonnés par lignes et les différentes modalités du facteur Localisation par colonnes. Les cinétiques des trois niveaux de saturation sont montrées ensemble dans chaque encart ($S_w = 1$ en trait plein, $S_w = 0,5$ en tireté $S_w = 0,25$ en pointillé). Les concentrations relatives des pools DOC, B et CO_2 sont représentées en bleu, rouge et vert respectivement.

- déclin de la biomasse – et une consommation de substrat et une émission de CO_2 intenses (ex : figure 2.20, traits pleins). D'autres scénarios s'éloignent de ce cas classique : on observe ainsi une limitation de la croissance malgré un substrat relativement abondant en quantité globale (ex : figure 2.21b, trait pointillé rouge) et une consommation incomplète jusqu'à la fin de la simulation. Dans certains cas, cette limitation est tellement forte que la croissance n'a toujours pas démarré pas après dix jours (figure 2.21b, traits tiretés-pointillés).

Afin de mieux dégager les effets de la structure du sol sur ces cinétiques, nous présentons par la suite une analyse des résultats en comparant les différents scénarios quant à l'effet de chacun des quatre facteurs.

Effet du facteur physiologie La fluctuation locale de l'état physiologique modifie les cinétiques plus ou moins fortement selon les scénarios. Par exemple, la figure 2.20 montre deux cas typiques des cinétiques observées en l'absence de fortes contraintes sur la diffusion. La dormance module la durée de la phase de latence : elle s'échelonne sur une plage de 16 à 54 heures pour les scénarios P_1 contre un intervalle plus réduit de 19 à 25 heures pour les scénarios P_0 (figure 2.19a).

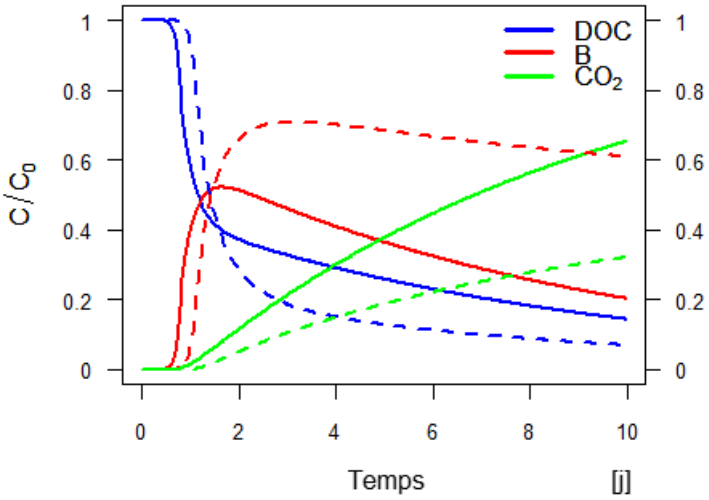


FIGURE 2.20 – **Effet du facteur physiologie** illustré dans les conditions les plus homogènes en termes de topologie (milieu G_4), de saturation en eau ($S_w = 1$) et d'arrangement spatial des décomposeurs (distribution "Dispersée") Les traits pleins représentent la modalité P_0 et les traits tiretés la modalité P_1.

Lorsque l'état physiologique est calculé (P_1) la croissance de la biomasse se termine fréquemment par un plateau. En effet, avec l'épuisement progressif du substrat, la proportion de biomasse dormante augmente, ce qui réduit les pertes globales de C par respiration et mortalité. Ce mécanisme de stockage de carbone dans la biomasse n'apparaît pas dans les scénarios P_0, pour lesquels on observe un déclin de la biomasse et une émission intense de CO_2 en fin de simulation. Ceci se traduit par une quantité de biomasse en fin de simulation systématiquement plus élevée pour les scénarios P_1 (51±16% du carbone injecté dans la biomasse après dix jours pour P_1 contre 19±5% en moyenne pour P_0). En moyenne sur l'ensemble des scénarios, l'ajustement local de l'état physiologique améliore l'efficacité de prélèvement du DOC (seulement 15±23% du DOC injecté au départ n'est pas consommé après dix jours pour les scénarios P_1 en moyenne contre 19±23% pour P_0). Cet effet est particulièrement visible pour les conditions les plus homogènes (par exemple, dans le milieu G_4 à saturation élevée, figure 2.20).

Effet de l'indice de saturation La dynamique de biodégradation est inégalement affectée par le changement de saturation en eau. Les différents scénarios ont des masses initiales identiques mais des concentrations différentes. La baisse du degré de saturation se traduit parfois par une stimulation de la cinétique expliqué par de fortes concentrations globales de substrat (figure 2.21a). Cependant, la cinétique n'est pas systématiquement stimulée à mesure que le degré de saturation diminue. Ainsi par exemple, lorsque les bactéries sont placées loin de la source de substrat dans le milieu G_2, le substrat diminue lentement selon une cinétique linéaire (figure 2.21b, trait pointillé bleu) laissant environ 80% du DOC préservé de la consommation après dix jours.

Les écarts par rapport à la cinétique exponentielle suggèrent donc que d'autres facteurs que le niveau global de concentration contrôlent la biodégradation. Nous avons vu qu'au plus faible indice de saturation, l'augmentation de la tortuosité dans la phase aqueuse résiduelle ralentit le transfert du substrat vers les bactéries (section 2.1.3). La régulation intervient au niveau local, selon les conditions rencontrées par les bactéries, et non plus sous l'effet de concentrations globales. Le milieu G_2 présente un cas de régulation absolue de la croissance du fait des conditions locales (figure 2.21b, traits tiretés-pointillés). Ce milieu présente une déconnexion de la phase aqueuse à $S_w = 0,25$ autour de la profondeur $Z = 20$ lu, qui, combinée à la déconnexion spatiale entre bactéries et source de substrat, le rend inaccessible pour elles (figures 2.17 et 2.23b).

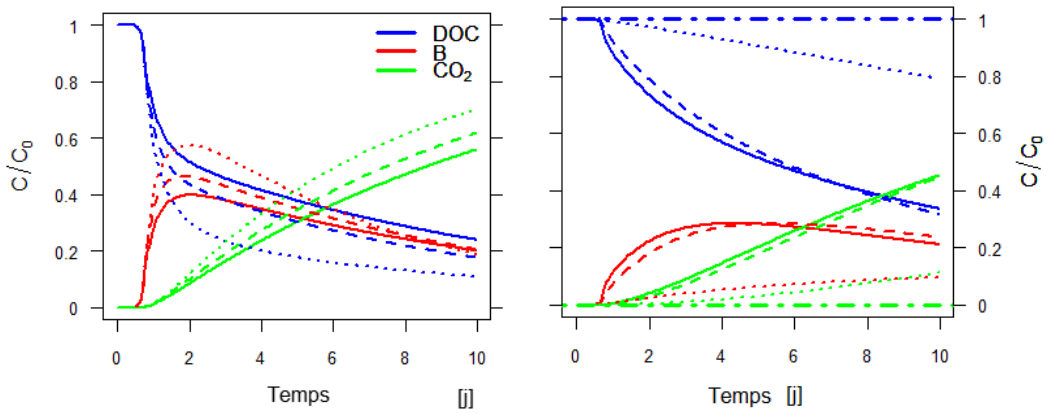


FIGURE 2.21 – **Effet du facteur saturation, en interaction avec le facteur de localisation.** L'effet de la saturation en eau peut être observé dans chacun des encarts montrant les scénarios pour les distributions bactériennes "Colocalisée" (a) et "Non-colocalisée" (b). La comparaison des deux encarts montrent une stimulation (a) ou un ralentissement (b) des cinétiques pour ces deux arrangements spatiaux opposés. Les cinétiques des niveaux de saturation $S_w = 1$, $S_w = 0,5$ et $S_w = 0,25$ sont montrées en traits plein, tireté et pointillé respectivement, toujours pour le milieu G_6, sauf dans le cas de limitation absolue de la cinétique pour G_2 à $S_w = 0,25$ montré en (b) en trait tireté-pointillé.

Effet de la géométrie des milieux poreux La consommation de DOC est la plus rapide et complète dans le milieu le plus homogène G_4, avec seulement 6±5% du DOC injecté retrouvé en fin de simulation. La variation des conditions hydriques et de la distribution des bactéries engendre une variabilité importante, mais moindre par rapport aux autres milieux (coefficient de variation de 79%).

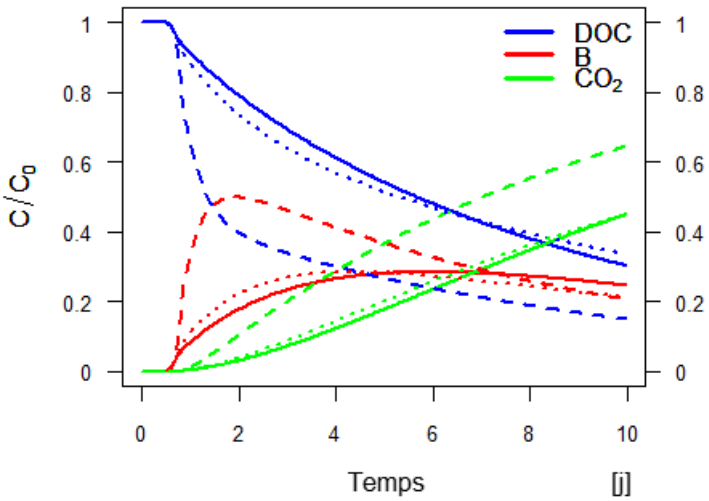
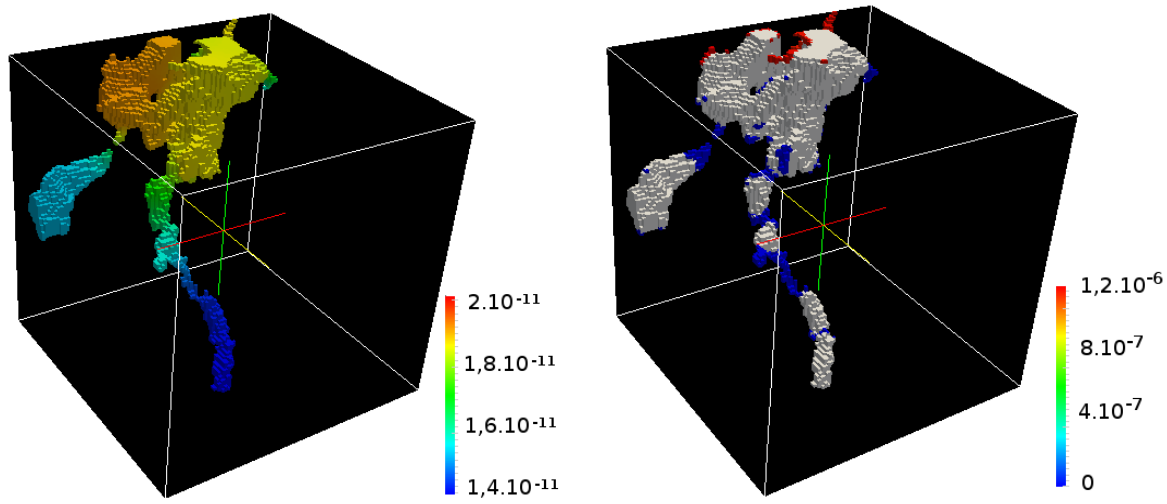


FIGURE 2.22 – **Effet du facteur géométrie.** L'impact de l'hétérogénéité de la morphologie est ici observé pour un arrangement spatial maximisant la distance entre source de substrat et décomposeurs (distribution "Non-colocalisée") et à saturation complète (S_1). La croissance bactérienne est exponentielle dans le milieu le plus homogène G_4 (trait tireté), alors qu'elle est limitée dans le milieu G_2 où la diffusion en profondeur est la plus ralentie. Le cumul de contraintes modérées pour la diffusion et de la concentration globale de substrat la plus faible limite de la même manière la croissance dans le milieu G_6 (trait pointillé).

La variabilité est exacerbée pour le milieu G_2 (22±30% de DOC à dix jours, CV = 151%). On y observe à la fois les cinétiques les plus rapides et le cas de limitation absolue. L'effet de la distribution des bactéries et de la saturation est particulièrement prononcé dans ce milieu. Ainsi, il est à noter que la croissance est limitée dès lors que les bactéries sont placées en profondeur (distribution "Non-colocalisée", L_{NC}), même à complète saturation (figure 2.22, traits pleins). La diffusion du substrat vers les bactéries situées au fond du pore étroit est ralentie en raison de la morphologie particulière de ce milieu en forme d'entonnoir (figure 2.23a). Le caractère discontinu de la phase aqueuse au plus faible niveau de saturation n'est donc pas la seule cause de limitation de la croissance. Dans ce cas, la tortuosité élevée uniquement associée à la morphologie et la déconnexion spatiale entre les bactéries et le substrat suffisent pour ralentir la cinétique.



(a) (b)

FIGURE 2.23 – **Carte de distribution du DOC à dix jours** pour le milieu G_2 avec les bactéries placées en fond du cube (L_{NC}) aux indices de saturation $S_w = 1$ (a.) et $S_w = 0,25$ (b.)
Un gradient de concentration persiste jusqu'en fin de simulation pour $S_w = 1$ due aux vitesses réduites de diffusion et de consommation du substrat à $S_w = 1$. A $S_w = 0,25$, la discontinuité de la phase aqueuse empêche le transport du substrat en profondeur, provoquant l'accumulation du substrat non consommé dans les quelques gouttes connectées à la surface et son absence partout ailleurs. (La phase gazeuse est représentée en gris).

Le milieu G_6 apparaît comme un intermédiaire entre G_4 et G_2 en terme de variabilité (24±21%, CV = 86%). Ce milieu présente à la fois les plus faibles concentrations globales et une tortuosité relativement élevée. On retrouve une cinétique ralentie pour la distribution "Non-colocalisée" (figure 2.22, traits tiretés), notamment au niveaux de saturation élevés ($S_w = 1$ ou 0,5), comme pour G_2. Dans ce cas, les effets locaux (tortuosité) et globaux (faible concentration) s'additionnent.

Effet de la localisation des bactéries par rapport au substrat La dynamique de biodégradation est sensiblement réduite pour la distribution Non-colocalisée" en raison de la déconnexion spatiale entre la source de substrat et les décomposeurs, quels que soient les autres facteurs. En moyenne, 35±33% du DOC injecté est retrouvé après dix jours pour cette modalité. Les deux autres modalités obtiennent des valeurs comparables (8±6% pour la distribution "Colocalisée" et 9±7% pour la distribution "Dispersée"). La figure 2.24a illustre un cas où la consommation de DOC est la plus rapide pour la distribution "Colocalisée". Les bactéries à proximité de la source sont stimulées par les fortes concentrations environnantes et captent la quasi-totalité du DOC avant que le gradient initial ne se dissipe. Dans d'autres scénarios cependant, le prélèvement est trop lent pour empêcher qu'une partie importante du substrat ne se propage en profondeur et devienne ainsi temporairement inaccessible pour la dégradation. Les bactéries doivent alors attendre le retour du substrat dont la concentration tend à s'homogénéiser. La consommation est alors plus rapide lorsque les bactéries sont le plus régulièrement réparties selon la profondeur (L_D, figure 2.24b). La proximité et la régularité de l'espacement régulent ici la vitesse de dégradation à égale mesure.

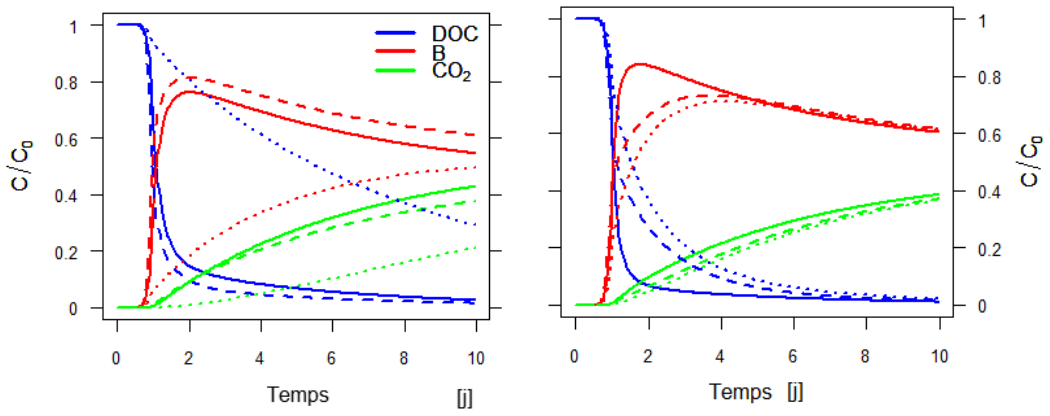


FIGURE 2.24 – **Effet du facteur localisation** illustré dans deux exemples marquants. Dans l'encart (a) sont montrés les scénarios dans le milieu G_6 à saturation complète ($S_w = 1$). La distribution "Dispersée" (trait plein) ou "Colocalisée" (trait tireté) apparaissent alternativement comme optimales, alors que la distribution "Non-colocalisée" (trait pointillé) montre toujours la plus lente cinétique de biodégradation.

Disparités locales de la croissance bactérienne La variation locale de disponibilité du substrat entraîne des conditions de développement contrastées au niveau local pour les bactéries. Cela peut induire une croissance inégale entre les dix sites pourtant initialisés à la même valeur de biomasse. Par exemple, dans le milieu G_2 avec les bactéries toutes situées en bas (L_{NC}), une disparité de biomasse s'installe entre les dix sites et se maintient jusqu'à la fin de la simulation (figure 2.25a). En effet, l'accès au substrat est inégal selon l'axe vertical du fait du chemin de diffusion unique dans le pore étroit où sont confinées les bactéries. Les bactéries situées en haut privent les suivantes de substrat. Le gradient de substrat le long du pore se répercute alors sur la répartition des masses de bactéries entre les sites, prenant elle-même la forme d'un gradient. Cela peut être interprété comme une forme de compétition entre décomposeurs, indépendante de leurs capacités intrinsèques et relevant uniquement de leur position vis-à-vis du substrat. Cette répartition en gradient est particulière au milieu G_2. Dans les deux autres milieux, la répartition plus uniforme entre les sites bactériens (figure 2.25b) suggère un accès plus équitable aux ressources grâce à des chemins de diffusion plus isotropes.

Un autre cas particulier s'observe dans le milieu G_2. Au plus faible indice de saturation ($S_w = 0,25$), lorsque les bactéries sont en distribution "Dispersée", seulement un site se trouve connecté au volume d'eau contenant le substrat. Seules les bactéries sur ce site bénéficient d'un accès prolongé au substrat et sont préservées de toute pression de compétition. Un seul site est alors presque aussi efficace pour prélever le DOC et émet plus de CO_2 que dix sites, lorsque ceux-ci sont tous hydrauliquement connectés aux indices de saturation plus élevés (figure 2.25c). L'état physiologique (pour les scénarios P_1) est toujours proche de 1, révélant des conditions optimales et expliquant la libération intense de CO_2 et le déclin de la biomasse (figure 2.25d).

En conclusion, la comparaison des cinétiques de l'ensemble des scénarios a permis de révéler qualitativement différents effets de la structure sur la biodégradation d'un substrat soluble. Deux mécanismes antagonistes sont ainsi apparus dans nos scénarios, l'un lié à la tortuosité de la phase aqueuse et l'autre à sa concentration globale en substrat. La régulation de la décomposition par limitation de la diffusion du substrat s'exprime lorsque la déconnexion – spatiale voire hydraulique – entre substrat et bactéries (distribution "Colocalisée") se combine avec une tortuosité élevée. La

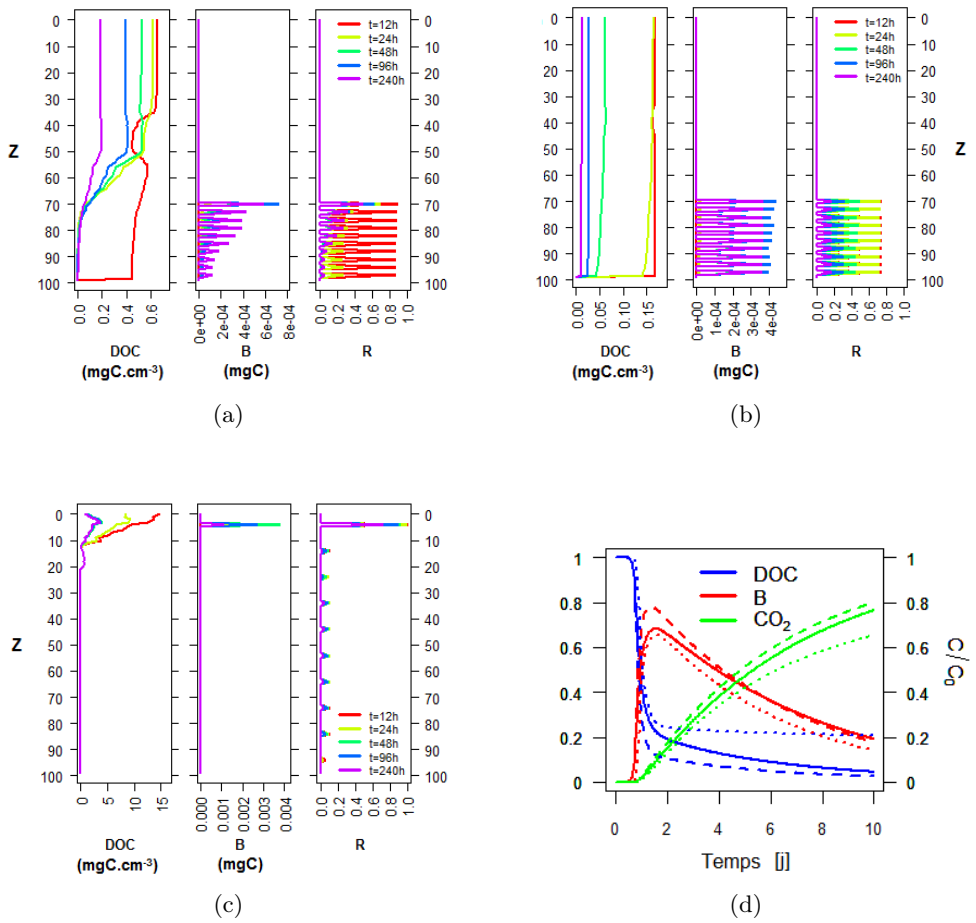


FIGURE 2.25 – **Profils de distribution de la concentration de DOC, de la biomasse et de l'activité bactérienne à différents pas de temps** pour différents scénarios (a, b, c) et cinétique (d) du scénario illustré en (c). Les variations locales de concentration du substrat influencent les répartitions de masse et d'activité bactériennes entre les *hot-spots* (a, b). L'activité optimale pour un seul *hot-spot* peut compenser l'activité nulle dans les sites isolés de la source de substrat, comme le montrent les cinétiques aux trois niveaux de saturation (d).

tortuosité élevée retardant la diffusion peut être due à une morphologie hétérogène seule (milieu G_2) ou combinée avec une faible teneur en eau (milieu G_2, $S_w = 0,25$). L'effet de l'augmentation de la tortuosité avec la baisse de la saturation est contrebalancé par la stimulation de l'activité bactérienne liée à l'augmentation générale de la concentration en substrat lorsque les bactéries ne sont pas trop distantes du substrat (localisations "Colocalisée" et "Dispersée") et la topologie peu hétérogène (milieu G_4). Enfin, lorsque l'hétérogénéité des conditions physiques n'occasionnent pas de contraintes importantes sur l'approvisionnement en substrat, l'ajustement de l'état physiologique (P_1) améliore l'acquisition de la ressource.

2.3.2 Analyse de sensibilité

La figure 2.26 montre les indices de sensibilité (SI_x) calculés pour chacune des trois variables de sortie (DOC, B, CO_2) après trois et dix jours de simulation.

Nous avons comparé les valeurs globales des pools à deux pas de temps correspondant à des phases différentes de la cinétique de biodégradation. Nous avons réalisé l'analyse de sensibilité en fin de cinétique (à dix jours) et à un temps antérieur (trois jours) proche de l'optimum de croissance des bactéries, idéalement en fin de croissance exponentielle. Cependant, nous pouvons constater

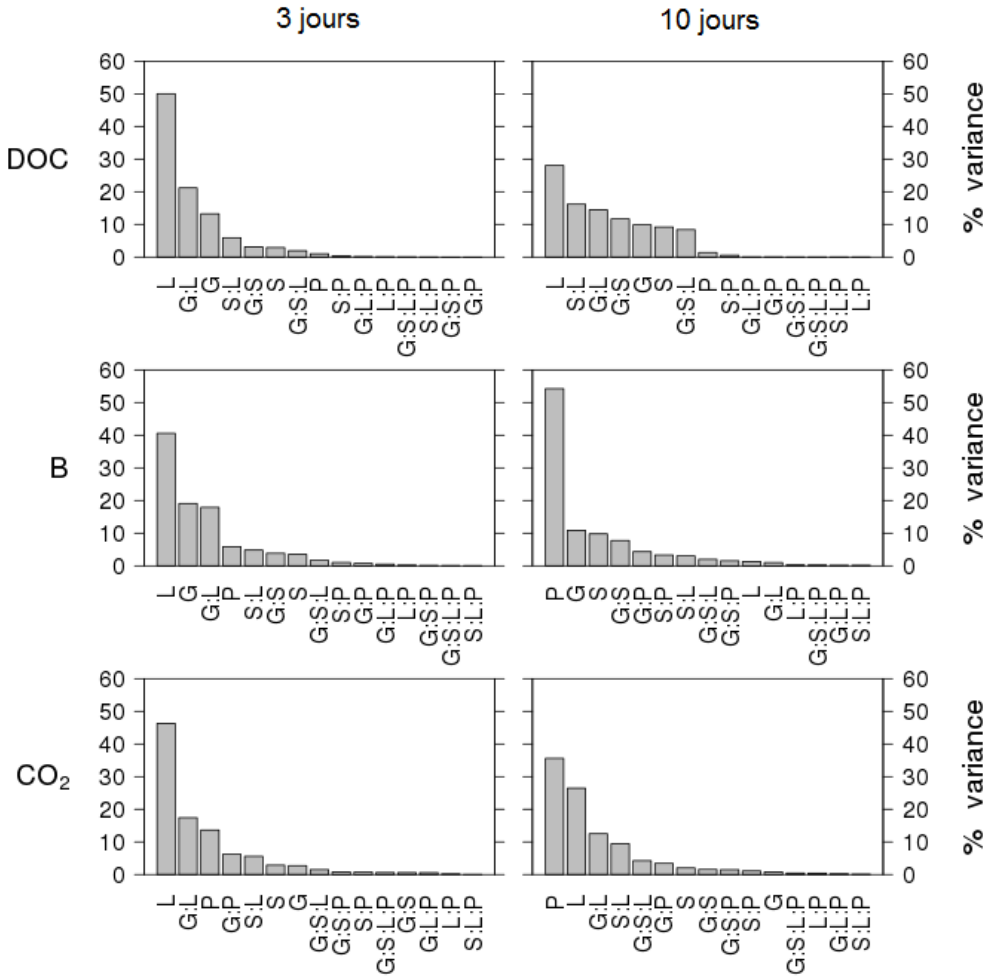


FIGURE 2.26 – **Indices de sensibilité** des quatre facteurs d'entrée (géométrie G, saturation en eau S, localisation des bactéries L, physiologie des bactéries P) et leurs interactions sur les trois variables de sortie du modèle (DOC, B et CO_2), à deux pas de temps de sortie (3 et 10 jours).

une forte variabilité à ce pas de temps car certains scénarios connaissent une phase exponentielle beaucoup plus précoce (terminée après environ 24 heures) alors que cette phase n'a pas encore commencé dans d'autres cas (figures 2.19a - 2.19b).

Après trois jours, la variance totale pour les trois variables est principalement expliquée par le facteur L de localisation (contributions de 41% à 50% à la variance totale en effet principal, c'est-à-dire sans interaction avec d'autres facteurs), par le facteur G de géométrie dans une moindre mesure (parts expliquées de la variance totale en effet principal de 13% pour DOC, 19% pour B, et seulement 3% pour CO_2) et par l'interaction entre les deux, G:L (expliquant 21, 18 et 17% de la variance totale pour DOC, B et CO_2 respectivement). Enfin, l'impact du facteur physiologie P est important pour le CO_2 (13% de la variance totale expliquée).

La distribution de la variance évolue nettement après 10 jours et diverge entre les trois variables de sortie. Elle est bouleversée pour la variable B, pour laquelle l'effet de la physiologie devient prédominant (54% de la variance totale expliquée par P en effet principal) alors que l'effet de la localisation devient négligeable (1% de la variance totale expliquée en effet principal). L'influence

de la localisation diminue mais reste importante pour DOC (1er rang, 28% de part de la variance totale en effet principal) et CO_2 (2ème rang, 26% de la variance totale expliquée, en effet principal). Pour DOC, la moitié de la variance totale (51%) est expliquée par la somme des interactions entre les facteurs physiques (par contribution décroissante à la variance : $S{:}L$, $G{:}L$, $G{:}S$ et $G{:}S{:}L$) alors que l'impact de la physiologie est mineur (1% en effet principal, 2% en effet global, incluant les interactions entre P et d'autres facteurs). La variable CO_2 est intégratrice : elle dépend de l'évolution des deux autres variables. Elle affiche donc des tendances intermédiaires entre à DOC et B. La physiologie (35% de part de la variance totale expliquée en effet principal) et la localisation (26% de part de la variance totale expliquée en effet principal) ont la plus forte influence. La somme des interactions entre les facteurs physiques (par ordre décroissant $G{:}S$, $G{:}L$, $S{:}L$ et $G{:}S{:}L$) explique 28% de la variance totale.

Les écarts de répartition de la variance entre trois et dix jours sont le fruit d'effets cumulés lors du processus de décomposition, c'est-à-dire des conséquences du développement de la biomasse sur la disponibilité du substrat. Les facteurs physiques, et en premier lieu la localisation des bactéries, sont déterminants lors du démarrage de la biomasse alors que la physiologie gagne en influence plus tardivement pour B et CO_2, lorsque le prélèvement de substrat devient significatif du fait de la quantité importante de biomasse.

Il aurait été difficile de hiérarchiser les facteurs uniquement en analysant les cinétiques de biodégradation, comme reporté dans la section précédente (2.3.1). L'analyse de variance permet non seulement de quantifier l'effet des facteurs seuls, mais aussi celui des interactions entre les facteurs. Les interactions entre les facteurs physiques sont apparues ici déterminantes pour la consommation de DOC et ont souvent contribué plus à la variance totale que les mêmes facteurs agissant seuls. Par exemple, $G{:}S$ ou $S{:}L$ ont une contribution plus élevée à la variance de DOC que le facteur S seul. Les interactions entre la saturation et ces deux facteurs physiques (localisation et géométrie) expliquent l'effet complexe du statut hydrique sur la biodégradation, comme cela a déjà pu être constaté dans le paragraphe dédié à l'effet de la saturation dans la section 2.3.1.

En revanche, les interactions entre la physiologie et les autres facteurs ont une influence limitée, notamment pour la variable DOC (moins de 1% de la variance totale expliquée pour DOC, 12% pour B et 9% pour CO_2) . Cela suggère que l'effet de la structure du sol est indépendant de celui de la physiologie. En effet, les mêmes tendances se retrouvent quand on compare les scénarios de chacune des modalités de physiologie pour les mêmes conditions physiques.

Notre étude a permis de mettre en évidence un contraste important entre la hiérarchie et l'importance des facteurs entre les trois variables de sortie. En effet, pour la variable DOC, l'effet des facteurs liés à la structure est prédominant alors que l'effet de la physiologie est mis en avant pour la variable B. La variable CO_2 montre quant à elle une importance partagée de ces différents facteurs. Le suivi d'une seule de ces variables (traditionnellement le CO_2) comme révélateur de la dynamique de biodégradation pourrait donc s'avérer insuffisant pour expliquer la dynamique du carbone dans les sols.

Variabilité associée au positionnement précis des bactéries L'influence des positions des sites bactériens tirés aléatoirement sur la variance totale a été estimée pour vérifier si les résultats sont dépendants de positions précises ou s'ils peuvent être généralisés à n'importe quelle sélection de sites pour les coordonnées Z imposées. En effet, les milieux poreux étudiés sont hétérogènes dans les trois dimensions et les contraintes sur la diffusion s'exercent aussi bien horizontalement

que verticalement.

Pour chaque milieu G et chaque arrangement spatial L, cinq nouvelles sélections ont été générées par tirage aléatoire comme décrit dans le paragraphe 2.1.4. Nous avons simulé la biodégradation avec ces différentes sélections, sur une période de 10 jours seulement dans les cas où la limitation de la biodégradation était la plus forte dans chaque milieu poreux, c'est-à-dire pour la saturation la plus faible ($S_w = 0,25$), et pour la modalité de physiologie P_1, qui s'est avérée maximiser le contraste entre les cinétiques (figures 2.19a et 2.19b).

La variabilité des cinétiques issues de ces nouvelles simulations n'a pas été prise en compte dans l'analyse de sensibilité globale. Nous avons calculé, dans une étape de vérification séparée, des coefficients de variation des cinq sélections aléatoires pour chaque combinaison $G \times L$. Nous avons déterminé les coefficients de variation à dix pas de temps. Les moyennes des dix valeurs par combinaison figurent dans le tableau 2.3.

	L_D	L_C	L_{NC}
G_4	0.261	0.102	0.070
G_6	0.168	0.130	0.056
G_2	0.742	0.462	5.10^{-6}

TABLE 2.3 – **Coefficients de variation des valeurs de DOC résultant du changement latéral de position des bactéries** à $Sw = 0,25$

L'écart de variabilité obtenu entre les trois modalités de localisation des sites bactériens est maximal pour le milieu G_2. Dans ce milieu, la variabilité induite par le tirage aléatoire des coordonnées X et Y des sites bactériens est très élevée pour les modalités L_D (CV=0.742) et L_C (CV=0,46) alors qu'elle est insignifiante pour la modalité L_{NC} (CV=5.10^{-6}). Pour les modalités L_D et L_C, la variabilité de la cinétique provient de la fluctuation du nombre de sites hydrauliquement connectés à la source de substrat, donc à celle du nombre de sites prenant part à sa biodégradation. A l'opposé, le changement des coordonnées X et Y des sites bactériens a une influence insignifiante pour la localisation L_{NC}, puisque cette fois-ci, aucun site bactérien n'a accès au substrat, étant donnée la déconnexion hydraulique observée dans la figure 2.17.

Dans les deux autres milieux poreux (G_4 et G_6) les coefficients de variation sont moins éloignés entre les trois modalités de localisation des bactéries. En effet, à la saturation $S_w = 0,25$, la tortuosité dans la phase aqueuse morcelée est suffisante pour retarder l'homogénéisation des concentrations de substrat, donc engendrer des différences de concentration entre les sites, sans toutefois empêcher de manière absolue la propagation vers tout ou partie des sites bactériens.

2.4 Discussion et conclusion

L'essence de ce travail était de tester notre modèle en tant qu'outil pour explorer le rôle de la structure sur la biodégradation de substrats carbonés, poursuivant l'hypothèse d'un contrôle de l'activité microbienne par l'accessibilité physique. L'approche discrète de notre modèle a permis de simuler simultanément la diffusion d'un substrat et sa consommation par des décomposeurs spatialisés dans des milieux poreux relativement complexes par rapport aux autres études traitant de cette question (voir par exemple [Folse III et Allison, 2012; Gharasoo et al., 2012; Knutson et al., 2005; Long et Or, 2009; Masse et al., 2007; Resat et al., 2012]).

Nous avons associé à cet outil un moyen de quantifier les effets de facteurs structuraux. Une analyse de sensibilité globale a été menée sur les résultats de cinétique dans 54 scénarios, construits

selon un plan factoriel complet. La variabilité totale a ainsi pu être décomposée en contributions de quatre facteurs – la géométrie de la porosité, son niveau de saturation en eau, la localisation des décomposeurs par rapport à une source de substrat et la physiologie bactérienne – et de leurs interactions. Les interactions entre les trois premiers facteurs expliquent la moitié de la variance totale dans nos scénarios pour la variable DOC, ce qui démontre le rôle important de la structure sur la consommation du substrat par les bactéries.

Dans nos scénarios, l'accessibilité du substrat est gouvernée par un seul mécanisme, la diffusion. Des effets antagonistes jouant à une échelle fine ont été identifiés dans les scénarios inventés ici. D'une part, un accès prolongé à une ressource abondante peut stimuler localement l'activité des bactéries dégradantes. D'autre autre part, la biodégradation a pu être ralentie voire empêchée lorsque la diffusion est limitée. Le premier effet de stimulation par la concentration a notamment été discuté dans [Don et al., 2013]. D'après les auteurs, la probabilité de rencontre entre le substrat et les décomposeurs (leurs enzymes) est d'autant plus élevée que la concentration en substrat est forte, d'où l'accroissement de l'efficacité du processus de biotransformation. Une régulation modérée des conditions de diffusion sur les processus microbiens a déjà été suggérée ou montrée expérimentalement [Dechesne et al., 2010; Kim et al., 2008] et est supposée fréquente dans les sols. En revanche, la limitation absolue en cas de discontinuité de la phase aqueuse relève d'un artéfact dû à la discrétisation de l'espace poral à une échelle trop grossière (section 2.1.3).

Le contrôle de la biodégradation par la diffusion ne s'exerce certainement pas dans la même mesure dans les échantillons de sol et telle qu'elle est modélisée dans leurs images discrètes. En effet, la discrétisation de l'espace altère considérablement l'architecture de la porosité en négligeant les pores les plus fins. Les chemins de diffusion dans les macropores simulés sont beaucoup moins tortueux qu'ils ne le seraient si l'intégralité de la distribution de tailles de pores pouvait être représentée. La répartition de la phase aqueuse modélisée selon une approche discrète souffre aussi d'imprécisions. La présence de micropores inondés et de films mouillants non résolus assurent un transport lent mais continu des solutés. Une représentation plus fidèle de la géométrie des phases solide et liquide pourrait impliquer des gradients de concentration plus prononcés et plus durables, amplifiant ainsi les disparités d'accès des bactéries au substrat en fonction de leur position. Notre modèle pourrait donc sous-estimer en certains égards, le rôle limitant de la diffusion tel qu'il peut intervenir dans le sol.

Deux stratégies pourraient être adoptées pour améliorer le réalisme de notre représentation : choisir une résolution plus fine ou intégrer une approche de « double-porosité » au modèle en calculant des processus effectifs dans les "sites solides".

Nous aurions pu travailler à l'échelle de la cellule bactérienne (autour de 1 μm) et ainsi privilégier une description fidèle de l'habitat bactérien dans un volume très restreint (environ 100^3 μm^3). Cependant, l'erreur sur la diffusion serait réduite sans être totalement éliminée. De plus, si cette solution était choisie, il faudrait changer de module de biodégradation pour une approche individu-centrée, car le formalisme de Monod est incompatible avec l'échelle de la cellule.

L'autre alternative permettrait de garder une échelle infra-millimétrique, donc de simuler un volume relativement important, tout en incluant de manière implicite des processus ayant lieu à une échelle inférieure à la résolution. Pour cela, les voxels actuellement classés comme "sites solides" seraient alors considérés comme des "sites fluides" associés à un taux de diffusion très faible correspondant aux taux de diffusion effective. Des bactéries pourraient être placées dans certains de ces sites comme s'ils étaient présents dans des micropores. De telles modifications sont susceptibles de changer considérablement les cinétiques observées ici. Le démarrage de la croissance

bactérienne serait fortement retardé, avec une désynchronisation importante des sites bactériens selon leur distance à un macropore. La diffusion ralentie entraînerait un prélèvement peu intense qui réduirait l'influence mutuelle de bactéries distantes – d'où une faible pression de compétition – et se traduirait par un épuisement progressif du substrat au niveau du milieu entier.

Par ailleurs, notre étude met l'accent sur la diffusion sans prendre en compte d'autres processus pertinents à une échelle infra-millimétrique ou de nature à compenser la limitation par la diffusion. Les conditions de diffusion pure sont rares dans le sol. Le transport de soluté par convection en régime hydrodynamique est sans doute plus important que la diffusion dans les macropores. De plus, nous avons exagéré la dépendance des bactéries à la diffusion du substrat en leur interdisant tout mouvement.

Cependant, si nos résultats ne peuvent pas être extrapolés au sol sans précautions, les tendances révélées ici peuvent être comparées à celles obtenues dans des dispositifs expérimentaux simplifiés. L'hétérogénéité représentée ici à l'échelle microscopique entraîne une variabilité dans la dynamique de biodégradation qui s'avère importante mais reste dans une gamme réaliste. Le coefficient de variation de 44% sur les émissions de CO_2 lors d'une incubation de dix jours est proche de données expérimentales de travaux étudiant l'effet de l'hétérogénéité spatiale sur la minéralisation de substrats solubles à une échelle millimétrique. Monard et al. [2012] ont obtenu un coefficient de variation légèrement plus faible pour du glucose (14-22%), alors que des CV allant de 25 jusqu'à 160% ont été trouvés pour un pesticide soluble, le 2,4-D [Monard et al., 2012; Vieublé-Gonod et al., 2006; Vieublé-Gonod et al., 2003].

Dans nos simulations, le facteur ayant le plus fort impact sur la variabilité des cinétiques simulées est l'arrangement spatial entre substrat et décomposeurs. Chenu et al. [2001] ont montré que l'accessibilité d'un substrat organique pour des décomposeurs peut être soit améliorée, soit réduite selon la distribution spatiale des communautés microbiennes dans la porosité du sol. La biodisponibilité du substrat a aussi été étudiée en modulant la spatialisation de substrats et décomposeurs à une échelle plus grossière (mm à cm) dans les travaux de Pinheiro et al. [2013] et Dechesne et al. [2010]. Ainsi, la dégradation du 2,4-D est réduite drastiquement de (50% à 0,3%) en passant d'une répartition uniforme des bactéries et du substrat à un cas où le substrat et la biomasse sont séparés de 2 cm [Pinheiro et al., 2013]. Dechesne et al. [2010] ont placé des *hot-spots* bactériens artificiels dans des microcosmes contenant du sable selon différentes distributions. Ils ont trouvé une efficacité de biodégradation accrue lorsque la biomasse est répartie en neuf points distants, par rapport à une seule position centrale. Les résultats de nos simulations montrent également qu'une distribution dispersée peut se révéler plus avantageuse pour les décomposeurs qu'une répartition regroupée, même avec une plus grande proximité de la source de substrat.

Dans d'autres études, l'influence de la déconnexion spatiale est investiguée indirectement en étudiant la cinétique de biodégradation en plaçant les bactéries et/ou leur substrat dans des pores de tailles différentes par manipulation du potentiel hydrique. En effet, selon la loi de Young-Laplace, $r_{eq} = \frac{2\sigma \cos \alpha}{\phi_m}$ (où σ est la tension superficielle et α l'angle de contact), on peut ajuster le rayon des pores inondés (r_{eq}) en contrôlant le potentiel matriciel (ϕ_m), en faisant l'hypothèse que les bactéries restent dans ces pores uniquement. Ainsi, dans les travaux de Ruamps et al. [2011], des cinétiques de minéralisation contrastées ont été observées pour du fructose entre les différentes classes de taille de pores. Cependant, des résultats différents ont été obtenus dans les études de Shaw et al. [2002] et de Ruamps et al. [2013], où le placement des bactéries ou du substrat affecte peu la minéralisation.

L'effet combiné de la localisation d'un substrat soluble et du potentiel hydrique a été illustré dans des travaux expérimentaux sur la minéralisation du glucose et du 2,4-D [Monard et al., 2012] et du benzoate [Dechesne et al., 2010]. Dechesne et al. [2010] ont trouvé un effet cumulatif du potentiel hydrique et de la distribution de la biomasse, pour des potentiels élevés et une distribution dispersée de la biomasse, stimulant tous deux la minéralisation du benzoate. Cependant, l'effet des facteurs est purement additif, contrairement à ce que nous avons observé dans notre étude où l'interaction $S : L$ peut donner des réponses très variées voire opposées. Dans les travaux de Dechesne et al. [2010], la répartition initiale du substrat est homogène, donc la diffusion du substrat vers les décomposeurs est moins limitante que dans notre étude, ce qui expliquerait l'effet plus important de l'interaction $S : L$ que chez Dechesne et al. [2010].

Les simulations de Monga et al. [2008] mettent en évidence une interaction entre l'état hydrique et la répartition des substrats organiques vis-à-vis des décomposeurs. Dans leur modèle individu-centré, la dégradation de la matière organique n'est possible que lorsque deux entités de décomposeurs et de substrat sont hydrauliquement connectées et si elles sont comprises dans une distance inférieure à leur « distance d'action ». Les auteurs ont crée deux modalités de distribution des microorganismes et des résidus organiques : une répartition uniforme et une répartition hétérogène où les masses des substrats et des décomposeurs sont proportionnelles au rayon des pores dans lesquels ils se situent. La baisse du potentiel hydrique a un effet spectaculaire (environ +60% de C organique non décomposé après 120 jours de h=0 cm à h=-135 cm) du fait de la déconnexion hydraulique entre résidus et microorganismes. La répartition a une influence plus modérée, croissant avec la succion (au maximum +5% de C organique conservé après 120 jours pour la distribution uniforme par rapport au cas hétérogène). En effet, la baisse du potentiel provoque la désaturation des pores les plus larges où est concentrée la majorité de la biomasse et du C organique dans le cas hétérogène. La variation de la teneur en eau se traduit alors par un changement des quantités initiales de biomasse et de substrats impliqués dans la biodégradation. Les effets du potentiel hydrique et de son interaction avec la distribution substrats / décomposeurs peuvent donc difficilement être comparés entre ce travail et ce qui a été présenté ici.

En testant notre modèle sur de multiples scénarios, nous avons démontré son aptitude à reproduire des effets régulateurs de la structure sur les processus de biodégradation dans des milieux poreux représentant les images discrétisées d'échantillons de sol non remanié. La résolution spatiale de 68 μm n'autorise cependant de prendre en compte que la macroporosité des échantillons. La représentativité des systèmes par rapport au sol pourra être améliorée en trouvant des moyens de compenser les biais liés à la discrétisation de l'espace et en intégrant de nouveaux processus physiques (convection) et biologiques (migration des bactéries).

Chapitre 3

Analyse des incertitudes et de la sensibilité du module de biodégradation aux paramètres décrivant le métabolisme bactérien

Le modèle LBioS a été conçu pour étudier l'influence des conditions abiotiques régnant dans les microhabitats sur l'activité des bactéries du sol responsables de la biodégradation des substrats organiques. Son architecture est issue du couplage entre un modèle de Boltzmann sur réseau et un modèle biogéochimique de carbone. Aux deux parties de ce modèle sont associées des biais propres à leur méthode et à la connaissance des processus représentés, qui réduisent la précision des prédictions du modèle. Il est nécessaire d'estimer les incertitudes associées à chacune de ces deux parties pour évaluer le niveau de confiance dans les résultats, donc la robustesse des conclusions sur l'influence réelle des paramètres physiques et biologiques sur lesquelles elles se basent.

La famille de modèles de l'approche de Boltzmann sur réseau fait l'objet d'un développement important depuis les années 1970. Ses fondements théoriques et le comportement mathématique de type de modèles sont documentés dans une littérature abondante. La précision de cette méthode est reconnue pour des domaines d'application variés et les biais qui lui sont propres sont eux aussi bien identifiés. Pour la modélisation des processus hydriques dans le sol, la principale source d'erreur est relative à la discrétisation de la porosité, comme cela a pu être discuté dans le chapitre précédent.

Les incertitudes associées au module de biodégradation sont de nature différente. Elles s'expliquent par plusieurs raisons. Ces incertitudes reposent tout d'abord sur la structure du modèle, étant donné le degré de compréhension réduite des processus impliqués. Il n'est pour l'instant pas possible de modéliser les processus biologiques d'une manière aussi mécaniste que les processus physiques. Les phénomènes quantifiés par les modèles de biodégradation (croissance bactérienne, respiration, consommation d'un substrat) résultent de nombreux mécanismes cellulaires difficiles à mesurer individuellement – et même simplement à identifier. Les nombreuses réactions interdépendantes sont confondues dans un petit nombre d'équations réglées par des paramètres peu nombreux. Il en découle une grande liberté pour le modélisateur quant aux processus à décrire et à la manière de les représenter, selon ses objectifs et ses connaissances fonction notamment des mesures expérimentales disponibles. Il existe ainsi une multitude de variantes de modèles biogéo-

chimiques, avec plus ou moins de processus simulés et des formalismes provenant de différentes sources. Or, l'effet de chaque équation est dépendant des résultats des autres équations d'un même modèle. Comme l'étude du comportement mathématique des modèles n'est pas systématiquement entreprise, la compatibilité entre les équations ainsi réunies n'est pas vérifiée, ni la pertinence des paramètres employés. On peut ainsi être frappé, en épluchant la littérature par la diversité des équations dans lesquelles sont impliqués des paramètres désignés par le même nom.

Les incertitudes de modèles de décomposition de la MOS tiennent aussi de difficultés spécifiques à la détermination de leurs paramètres. Ceux-ci sont estimés à partir de jeux de données mesurées à une échelle macroscopique, supérieure à celle des processus moteurs [Baveye et al., 2011]. A cette échelle, il n'est pas possible de s'affranchir de l'influence des conditions physiques spécifiques à l'incubation – qui font malheureusement trop rarement l'objet d'efforts de normalisation entre les expérimentateurs. Il est reconnu que la validité des paramètres est souvent dépendante des conditions de l'expérimentation de calibration, c'est pourquoi les modélisateurs se trouvent contraints de calibrer leur modèle pour chaque nouveau contexte d'application [Helton et Davis, 2000].

Nous sommes confrontés de plein fouet à ces difficultés du fait de notre question de recherche et de l'approche choisie pour y répondre :

- Notre modèle est conçu pour décrire explicitement l'influence des conditions abiotiques sur le fonctionnement microbien, à une échelle micrométrique à millimétrique. On ne sait pas :
  - dans quelle mesure les équations empruntées aux modèles macroscopiques sont transposables aux échelles inférieures
  - quelles valeurs donner aux paramètres de ces équations, faisant l'hypothèse de la validité de celles-ci en dépit du changement d'échelle

- Nous avons choisi de créer la structure qui nous paraissait la plus à même de représenter les processus importants à nos yeux. Pour cela, nous avons réuni dans un même modèle la très classique équation de Monod [1941] pour calculer la croissance bactérienne et des formalismes plus rares (le calcul de l'état physiologique d'après Blagodatsky et Richter [1998] et la respiration calculée selon une cinétique de premier ordre). Toutefois, en ne choisissant pas un modèle préexistant, nous nous sommes privés d'informations bibliographiques sur son fonctionnement, à travers des études mathématiques consacrées ou par des déductions de son application dans des situations variées.

- Pour finir, nous ne disposons pas de jeux de données adaptés et suffisamment complets pour calibrer le modèle ou tout du moins à comparer avec les valeurs d'origine bibliographique actuellement employées (voir chapitres précédents).

Les méthodes d'analyses des incertitudes et de la sensibilité peuvent nous aider à dissiper en partie ce flou. L'analyse d'incertitudes vise à quantifier les incertitudes sur les sorties d'un modèle provenant des incertitudes sur ses composantes (structure, équations) et sur les facteurs d'entrée (variables d'entrée, paramètres) [Wallach et al., 2013]. Elle consiste à relier la variabilité des sorties d'un modèle à la variation de ses entrées, volontairement maximisée par l'application du modèle dans un grand nombre de scénarios. Les stratégies basées sur des techniques d'échantillonnage Monte-Carlo permettent de révéler une tendance moyenne, ainsi que l'amplitude maximum de variation qui doit être attendue. L'analyse d'incertitudes est aussi un préalable à l'analyse de sen-

sibilité. Cette dernière étudie la relation entre ses informations entrantes et sortantes [Saltelli, 2000] en mesurant la contribution de chacun des facteurs à la quantité d'incertitudes totale des sorties d'un modèle. Cet outil donne accès à une compréhension globale du fonctionnement du modèle. Il peut aussi être utilisé pour répondre à des questions plus précises. Il peut notamment aider à prioriser les efforts d'estimation sur les paramètres les plus influents [Saltelli, 2000]. L'analyse de sensibilité peut être utilisée dans un but de simplification de modèle, en éliminant les paramètres ou équations montrant peu d'effet sur les résultats [Saltelli, 2000]. Certaines techniques permettent de détecter et de quantifier des liens de dépendance entre des paramètres qu'il faudra prendre en compte lors de la paramétrisation du modèle pour éviter des erreurs importantes dues à des combinaisons aberrantes de valeurs [Campolongo et al., 2000].

Plusieurs objectifs ont motivé la réalisation des analyses d'incertitudes et de sensibilité du module de biodégradation :

- Ce type d'analyse répondait tout d'abord au besoin de mieux connaitre le fonctionnement de notre modèle en observant ses réponses dans de très nombreuses situations et en élucidant les liens entre facteurs et variables de sortie.

- Nous étions ensuite particulièrement intéressés dans l'étude des incertitudes liées aux paramètres de la physiologie bactérienne. D'une part nous avons une connaissance limitée de la signification et de la validité des valeurs que nous utilisons, à cause de l'échelle particulière et du découplage des conditions biotiques et abiotiques dans notre modèle. D'autre part, poursuivant la démarche engagée dans le chapitre précédent, nous pourrions confronter la variabilité obtenue ici à celle qui émane des propriétés physiques, quantifiée au chapitre précédent, et ainsi hiérarchiser l'effet des facteurs physiques et des facteurs biologiques.

- Ces analyses doivent aussi servir à interroger la pertinence de la structure de notre modèle. Des approches spécifiques ont été développées pour étudier les incertitudes liées à la structure des modèles [Wallach et al., 2013] mais elles restent peu répandues. Par ailleurs, nous aurions pu utiliser des stratégies d'identification de modèle pour sélectionner parmi plusieurs la structure la plus performante. Nous ne mettrons pas en cause ici le bien fondé de la structure utilisée jusqu'à maintenant. Nous questionnerons cependant plus spécifiquement la pertinence de la représentation de deux processus dans notre modèle, l'état physiologique et l'humification, en réalisant les analyses sur des versions intégrant aucun, un ou deux de ces processus. Le calcul de la dormance est une originalité de notre modèle. Toutefois, son impact sur les prédictions se doit d'être vérifié. Le processus d'humification est quant-à-lui fondamentalement très important car supposé à l'origine de la formation de la matière organique du sol [Gleixner, 2013]. Or, nous ne l'avons jusqu'à présent pas fait intervenir dans les applications de notre modèle. Nous apprécierons ici les conséquences de sa représentation sur le fonctionnement de notre modèle.

- Pour finir, l'analyse de sensibilité doit fixer des règles, apporter des informations utiles pour la phase d'estimation des paramètres : sur les gammes de valeurs probables des paramètres, sur les paramètres sur lesquels doivent se concentrer les efforts, sur les liens de dépendance à prendre en compte lors de la paramétrisation.

3.1 Choix et principes des méthodes d'analyse d'incertitudes et de sensibilité

3.1.1 Analyse d'incertitudes

Une analyse d'incertitudes vise à mesurer le degré de confiance que l'on peut espérer des sorties d'un modèle en fonction des valeurs de facteurs d'entrée dits incertains. Les quatre sources d'incertitudes d'un modèle sont sa structure, le choix des équations utilisées, la précision de mesure des variables d'entrée et la précision d'estimation des paramètres du modèle. Nous analyserons ici les incertitudes liées à la paramétrisation uniquement. Le terme générique "facteur" et le mot "paramètre" seront donc indistinctement employés.

La première étape consiste à définir quels sont les paramètres incertains et dans quelle mesure ils sont amenés à varier, c'est-à-dire quelle est la distribution de probabilité des valeurs qu'ils peuvent prendre. On définit la distribution en s'appuyant sur des fondements théoriques (ex : tel paramètre est strictement positif, tel autre est inférieur/supérieur à tel seuil, *etc.*) et sur des estimations venant de données expérimentales quand elles sont accessibles. On peut estimer des paramètres d'après les données d'expérimentation de calibration ou recenser les valeurs trouvées par d'autres auteurs pour les mêmes processus et les mêmes équations. La sélection de valeurs pertinentes et la densité des observations sont primordiales pour garantir la robustesse de l'analyse. Lorsque la connaissance de la distribution d'un paramètres et le nombre d'observations expérimentales sont jugés insuffisants, une distribution uniforme est choisie. Seules les bornes du domaine de validité présumé doivent alors être renseignées. L'approximation sur la forme de la distribution est supposée plus petite que celle sur l'intervalle des valeurs possibles [Helton et Davis, 2000].

On s'intéresse ensuite à la distribution de probabilité de variable(s) de sortie d'intérêt, déterminée par celle des facteurs incertains. Les modèles sont le plus souvent trop complexes pour que celles-ci puissent être calculées analytiquement. Des stratégies probabilistes ont donc été développées pour approximer numériquement ces distributions.

Les techniques d'échantillonnage Monte-Carlo se prêtent bien à l'analyse d'incertitudes et peuvent aussi être utilisées pour étudier la sensibilité d'un modèle [Campolongo et al., 2000]. Ce sont des méthodes itératives qui consistent à exécuter des simulations en sélectionnant les valeurs des paramètres incertains par un tirage aléatoire selon leur distribution. Plusieurs variantes existent. Dans la plus simple d'entre elle – échantillonnage aléatoire –, le très grand nombre de tirage est censé assurer la bonne couverture de l'espace des paramètres et les facteurs sont considérés indépendants *a priori*. Si des corrélations existent entre certains facteurs, l'impact parfois considérable de combinaisons aberrantes peut maximiser les incertitudes, puis peut fausser l'analyse de sensibilité selon la méthode utilisée. Une variante reposant sur la transformation de rangs des valeurs de paramètres permet de spécifier les corrélations et d'en tenir compte lors de l'échantillonnage [Helton et Davis, 2000].

Nous avons choisi d'analyser les incertitudes par une approche Monte-Carlo avec échantillonnage aléatoire. Cette méthode est simple et robuste si le nombre de simulations est suffisamment grand [Wallach et al., 2013]. Le nombre de simulations ne constituait pas une véritable contrainte pour nous, en raison de la brièveté de chaque simulation (environ une seconde) et grâce aux capacités de calcul disponibles. Reste la question des corrélations entre paramètres.

Nous avions fait des premiers tests de régression pour mettre en évidence d'éventuelles corrélations. Ceux-ci n'ont pas permis d'identifier de couples de paramètres corrélés. Nous avons donc

choisi la méthode la plus simple à mettre en place, sans spécification d'interactions entre paramètres. Les résultats de l'analyse révèleront donc un degré d'incertitudes maximum, comprenant éventuellement des combinaisons non naturelles entre paramètres.

3.1.2 Analyse de sensibilité

L'analyse de sensibilité permet de hiérarchiser les facteurs selon leur influence sur les sorties, c'est-à-dire selon leur contribution à la quantité d'incertitudes des variables de sortie. De très nombreuses méthodes sont disponibles. Certaines ont été conçues pour détecter rapidement les facteurs influents (méthodes de *screening*), d'autres étudient le comportement du modèle en réponse à la perturbation locale d'un seul facteur (méthodes locales) [Saltelli, 2000]. Les méthodes globales fournissent l'information la plus complète sur le fonctionnement du modèle car elles permettent d'apprécier son comportement sur tout l'espace des paramètres, en faisant varier l'ensemble des facteurs incertains simultanément et selon leur loi de distribution. C'est donc une méthode globale que nous devions choisir pour espérer répondre à nos objectifs.

Il serait long de présenter ici toutes les méthodes globales ainsi que les atouts et limitations de chacune. Notre choix s'est plus précisément articulé entre deux alternatives, pour des raisons pratiques. Nous aurions pu analyser la sensibilité à partir des résultats des scénarios obtenus à la suite du tirage Monte-Carlo opéré pour l'analyse des incertitudes. On peut par exemple approximer les résultats des scénarios par un modèle de régression linéaire. Les coefficients de cette régression s'interprètent alors comme des indices de sensibilité, donnant le sens et l'amplitude de l'influence de chaque terme – facteur ou interaction de facteurs – causant la variabilité. Comme pour l'analyse d'incertitudes, l'échantillonnage par tirage Monte-Carlo permet d'explorer scrupuleusement l'espace des paramètres en faisant des combinaisons suivant la distribution de chacun. Cependant, ayant choisi au préalable un échantillonnage sans prise en compte d'éventuelles corrélations entre facteurs, nous nous exposions au risque que celles-ci faussent de manière significative les résultats de l'analyse de sensibilité [Helton et Davis, 2000].

Nous avions également pensé à la méthode utilisée dans le chapitre 2 pour quantifier l'influence de facteurs biotiques et abiotiques dans des conditions physiques hétérogènes. Il s'agissait d'une approche d'analyse de variance (ANOVA) sur un plan factoriel complet. L'ANOVA peut être appliquée à des facteurs qualitatifs (comme dans le chapitre 2) ou quantitatifs (comme par exemple ici, des paramètres). Cette méthode d'analyse de sensibilité est particulièrement avantageuse dans notre cas puisqu'elle car permet de détecter et de quantifier les interactions [Wallach et al., 2013] pas forcément connues *a priori*. En revanche, l'ANOVA traite les facteurs quantitatifs en un jeu restreint de niveaux discrets. La couverture de l'espace des paramètres est donc supposée partielle, par rapport aux méthodes basées sur un tirage Monte-Carlo [Campolongo et al., 2000]. De plus, les indices de sensibilité obtenus par ANOVA ne donnent pas d'indication sur le sens de la variation imprimée aux variables d'intérêt.

Il nous a cependant paru judicieux d'utiliser l'ANOVA comme méthode d'analyse de sensibilité du module de biodégradation pour sa simplicité vis-à-vis de la prise en compte des interactions, sans précautions nécessaires au préalable. Cette technique nous permettra de quantifier les interactions sans étape de travail supplémentaire. De plus, cette solution est la plus naturelle pour comparer les résultats de l'effet de facteurs physiques (chapitre 2) et des paramètres biologiques, puisque les deux auront été obtenus selon la même procédure.

3.2 Démarche conçue pour l'analyse des incertitudes et de la sensibilité du module de biodégradation de LBioS

3.2.1 Architecture du modèle

Nous avons décidé d'analyser la variabilité émanant des seules caractéristiques intrinsèques aux décomposeurs. Pour négliger toute influence de leur environnement physique, nous avons simulé la transformation d'un substrat soluble dans un milieu homogène, constitué d'un seul voxel. La résolution spatiale choisie est $L_P = 100$ μm, donnant la résolution temporelle $L_T = 7{,}429$ s.

3.2.2 Versions du modèle

Le calcul de l'état physiologique dans notre modèle est peut-être sa spécificité la plus marquante. Il convient de vérifier son impact, d'autant plus que le formalisme utilisé provient d'un modèle à la structure différente du nôtre. Pour cela, nous avons comparé les résultats de l'analyse d'incertitudes avec et sans activation de l'état physiologique. Nous avons identifié par P_1 et P_0 les versions avec et sans calcul de l'état physiologique, en référence à la dénomination utilisée pour les scénarios du chapitre 2, pour lesquels nous procédions déjà à l'activation facultative de l'état physiologique. k_i apparaît alors ou non dans la liste des paramètres incertains.

De la même façon, nous avons voulu tester l'influence du phénomène d'humification, matérialisé par le coefficient p_m divisant le flux de mortalité en une part $(1 - p_m)$, rejoignant le pool de DOC (recyclage) et le reste, (p_m), s'accumulant sous forme de carbone insoluble (POC) (voir section 1.2.1). Par défaut, ce coefficient de partage est nul : le carbone excrété est alors intégralement et directement recyclé. Nous avons comparé les résultats du modèle avec $p_m = 0$ et $p_m > 0$ (versions désignées par H_0 et H_1).

L'analyse portera donc sur quatre versions du modèle, définies par l'activation facultative du calcul de l'état physiologique et de l'humification : H_0P_0, H_1P_0, H_0P_1 et H_1P_1. La composition du jeu de paramètres diffère entre les versions. Les paramètres p_m et k_i se rajoutent éventuellement aux quatre paramètres communs : v_{DOC}, k_{DOC}, k_m et k_r. Ils sont donc au nombre de quatre (version H_0P_0), de cinq (versions H_1P_0 et H_0P_1) ou de six (version H_1P_1).

3.2.3 Origine des valeurs utilisées pour la détermination des distributions théoriques

La réalisation des tirages Monte-Carlo nécessite d'établir les distributions de probabilité des paramètres incertains. L'analyse de sensibilité par ANOVA demande simplement de connaitre la gamme de valeurs possibles. Nous nous servons de valeurs publiées dans différentes études expérimentales et de modélisation pour définir les intervalles de valeurs possibles et les distributions des paramètres. Ces valeurs sont représentatives de communautés microbiennes, de substrats organiques, de conditions au laboratoire, de structures de modèles différents. Les valeurs, origines et conditions d'obtention des paramètres sont détaillées dans la table 3.1.

Les paramètres se distinguent par leur nombre d'observations et leur origine. La littérature abonde de valeurs pour les paramètres de l'équation de Monod [1941] (appelés v_{DOC} et k_{DOC} dans notre modèle). Nous avons donc pu être plus sélectifs sur ces paramètres, en choisissant de préférence des incubations de souches pures avec un substrat unique, soluble et labile – souvent du glucose – comme c'est le cas dans les scénarios de notre modèle. Nous avons aussi intégré des

valeurs provenant d'études des cinétiques de croissance microbienne dans le sol.

Pour les autres paramètres (k_r, k_m, k_i et p_m), des valeurs sont plus rares et plus hétéroclites. Elles ont été ajustées pour des modèles de carbone du sol, où l'influence de conditions physiques hétérogènes est implicite et moyennée, et la biomasse microbienne et les substrats sont de nature diverse (bactéries et champignons se nourrissant de matières humifiées, résidus solides frais, exsudats racinaires, *etc.*). On notera le très petit nombre d'observations pour les paramètres k_i, k_r et p_m.

La spécification des gammes et des distributions des paramètres incertains est une étape déterminante pour la robustesse des résultats. Nous avons souhaité accorder le traitement le plus homogène possible entre les paramètres. Nous avons éliminé les valeurs correspondant aux incubations en milieu liquide car elles n'étaient pas disponibles pour tous les paramètres. Les valeurs seulement obtenues dans des études sur le sol ont donc été utilisées pour établir les gammes de référence des paramètres.

v_{DOC} j^{-1}	k_{DOC} $mg.cm^{-3}$	k_m j^{-1}	k_r j^{-1}	k_i $mg.cm^{-3}$	p_m -	Souche [1]	Substrat [2]	Humidité [3]	T °C	B_0 $mg.cm^{-3}$	DOC_0 $mg.cm^{-3}$	Références
17	$5.00.10^{-4}$	5.10^{-1}	0.2	-	0.3	*Arthrobacter sp.*	fructose	w=0.33	20	$6.20.10^{-1}$	$1.31.10^{-6}$	[Coucheney, 2009]
9.6	$1.00.10^{-3}$	1	0.13	-	0.45	*Arthrobacter sp.*	fructose	w=0.33	20	$6.20.10^{-1}$	$1.31.10^{-6}$	[Coucheney, 2009]
8	$1.40.10^{-4}$	$3.00.10^{-1}$	0.25	-	0.8	*Arthrobacter sp.*	fructose	w=0.33	20	$6.20.10^{-1}$	$1.31.10^{-6}$	[Coucheney, 2009]
7	$5.00.10^{-4}$	$2.40.10^{-1}$	0.5	-	0.8	*Arthrobacter sp.*	fructose	w=0.33	20	$6.20.10^{-1}$	$1.31.10^{-6}$	[Coucheney, 2009]
8.16	$7.00.10^{-4}$	$4.00.10^{-1}$	0.15	-	0.45	*Arthrobacter sp.*	fructose	w=0.33	20	$6.20.10^{-1}$	$1.31.10^{-6}$	[Coucheney, 2009]
6	$1.62.10^{-1}$	-	-	-	-	BM sol	glucose	Ψ =-45 hPa	12	$1.80.10^{-1}$	-	[Coody et al., 1986]
38.64	$1.75.10^{-1}$	-	-	-	-	BM sol	glucose	Ψ =-45 hPa	25	1.44	-	[Coody et al., 1986]
-	-	$7.50.10^{-1}$	-	-	-	BM sol	glucose	w=0.21	25	1.25	$1.65.10^{-1}$	[Van Veen et al., 1985]
-	-	$1.20.10^{-2}$	-	-	-	BM auto	glucose	$0.4 \times CR$	20	-	-	[Kersebaum et Richter, 1994]
-	-	$4.00.10^{-1}$	-	-	-	BM zymo	glucose	$0.4 \times CR$	20	-	-	[Kersebaum et Richter, 1994]
-	-	$1.20.10^{-2}$	-	-	-	BM auto		w=0.2	22	-	2.95	[Smith et al., 1986]
-	-	$4.00.10^{-1}$	-	-	-	BM zymo		w=0.2	22	-	2.3	[Smith et al., 1986]
-	-	1.309	-	1.034	-	BM sol	glucose	$0.5 \times CR$	20	-	-	[Blagodatsky et Richter, 1998]
-	-	1.309	-	$5.06.10^{-2}$	1	BM sol (r)	paille	Ψ =-63hPa	10	-	$5.43.10^{-1}$	[Ingwersen et al., 2008]
-	-	-	-	$3.11.10^{-2}$	-	BM sol (r)	paille	Ψ =-63hPa	10	-	$5.43.10^{-1}$	[Ingwersen et al., 2008]
-	-	-	-	$8.23.10^{-2}$	-	BM sol (r)	paille	Ψ =-63hPa	10	-	$6.09.10^{-1}$	[Ingwersen et al., 2008]
-	-	$1.44.10^{-1}$	-	-	-	BM sol	paille	w=0.2	15	-	-	[Knapp et al., 1983]
-	-	$2.04.10^{-1}$	-	-	-	BM sol	glucose	w=0.16	22	9.86	-	[Grant et al., 1993]
-	-	$6.00.10^{-3}$	-	-	-	BM sol	glucose	w=0.16	22	9.86	-	[Grant et al., 1993]
13.2	$4.40.10^{-3}$	$4.80.10^{-1}$	-	-	-	*P. fluorescens*	Exs. rac.	Ψ =-1000 hPa	15	-	-	[Scott et al., 1995]
13.2	$4.40.10^{-3}$	1.2	-	-	-	*P. fluorescens*	Exs. rac.	Ψ =-15000 hPa	15	-	-	[Scott et al., 1995]
-	-	$1.50.10^{-3}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$1.15.10^{-2}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$3.40.10^{-3}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$1.15.10^{-2}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$9.50.10^{-3}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$7.50.10^{-3}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$3.90.10^{-3}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$1.35.10^{-2}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]

suite ...

suite ...

v_{DOC} j^{-1}	k_{DOC} $mg.cm^{-3}$	k_m j^{-1}	k_r j^{-1}	k_i $mg.cm^{-3}$	p_m -	Souche [1]	Substrat [2]	Humidité [3]	T °C	B_0 $mg.cm^{-3}$	DOC_0 $mg.cm^{-3}$	Références
-	-	$9.80.10^{-3}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$9.20.10^{-3}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$1.02.10^{-2}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$1.08.10^{-2}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$7.50.10^{-3}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$1.16.10^{-2}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$7.00.10^{-3}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$1.17.10^{-2}$	-	-	-	BM sol	glucose	$0.75 \times CR$	20	-	-	[Van de Werf et Verstraete, 1987]
-	-	$8.00.10^{-2}$	$3.80.10^{-1}$	-	0.58	BM sol	paille	w=0.2	15	-	$6.25.10^{-1}$	[Garnier et al., 2008]
-	-	-	-	-	0.3	BM zymo	paille	w=0.187	25	-	$2.67.10^{-1}$	[Iqbal et al., 2014]
-	-	-	-	-	1	BM auto	paille	w=0.187	25	-	$9.36.10^{-1}$	[Iqbal et al., 2014]
-	-	$2.29.10^{-1}$	-	-	0.39	BM sol	paille + ..	w=0.28	28	-	2.41	[Aslam et al., 2013]
-	-	$2.29.10^{-1}$	-	-	0.39	BM sol	glyphosate	w=0.233	28	-	1.62	[Aslam et al., 2013]
3.96	$2.33.10^{-1}$	1.2	-	-	1	BM sol	Exs. rac.	w=0.3	-	-	$1.67.10^{-1}$	[Darrah, 1991]
4.80	$4.67.10^{-2}$	-	-	-	-	BM sol	Exs. rac.	w=0.3	-	-	$1.67.10^{-1}$	[Darrah, 1991]
-	-	$1.06.10^{-1}$	-	-	1	BM sol	Exs. rac.	-	-	-	-	[Toal et al., 2000]
-	-	$1.00.10^{-2}$	-	-	-	BM sol	-	-	-	-	-	[Jensen et al., 1997]
4.8	$1.33.10^{-2}$	-	-	-	-	BM sol	Exs. rac.	w=0.3	-	-	-	[Newman et Watson, 1977]
22.56	$1.60.10^{-3}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
22.08	$2.92.10^{-2}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
25.20	$3.96.10^{-2}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
25.68	$3.70.10^{-2}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
27.41	$4.49.10^{-2}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
15.60	$3.20.10^{-3}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
24.96	$5.04.10^{-2}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
12.86	$4.40.10^{-5}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
11.52	$1.60.10^{-4}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
7.32	$2.40.10^{-4}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
7.68	$1.40.10^{-3}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
18.48	$1.86.10^{-5}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
41.04	$6.00.10^{-1}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
19.20	$5.72.10^{-4}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]

suite ...

suite ...

v_{DOC} j^{-1}	k_{DOC} mg.cm^{-3}	k_m j^{-1}	k_r j^{-1}	k_i mg.cm^{-3}	p_m -	Souche [1]	Substrat [2]	Humidité [3]	T °C	B_0 mg.cm^{-3}	DOC_0 mg.cm^{-3}	Références
18.48	$4.92.10^{-4}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
22.08	$3.82.10^{-3}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
20.40	$1.00.10^{-3}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
21.36	$6.04.10^{-4}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
43.20	$1.60.10^{-3}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
14.40	$2.00.10^{-3}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
18.00	$7.00.10^{-4}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
20.88	$6.80.10^{-4}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	-	-	-	[Lobry, 1991]
20.4	$4.80.10^{-3}$	-	-	-	-	*Aerobacter cloacae*	glycerol	solution	37	-	-	[Newman et Watson, 1977]
2.4	$1.00.10^{-3}$	-	-	-	-	BM sol	sucres	solution	15-20	-	-	[Newman, 1978]
9.6	$4.00.10^{-3}$	-	-	-	-	BM sol	sucres	solution	15-20	-	-	[Newman, 1978]
22.08	$3.04.10^{-5}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	37	-	-	[Lendenmann et al., 2000]
22.08	$3.60.10^{-5}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	galactose	solution	37	-	-	[Lendenmann et al., 2000]
20.88	$4.20.10^{-5}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	maltose	solution	37	-	-	[Lendenmann et al., 2000]
13.68	$5.28.10^{-5}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	ribose	solution	37	-	-	[Lendenmann et al., 2000]
16.8	$5.00.10^{-5}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	fructose	solution	37	-	-	[Lendenmann et al., 2000]
22.56	$1.60.10^{-3}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	37	-	-	[Kovárová-Kovar et al., 2000]
24.96	$7.20.10^{-5}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	37	-	-	[Kovárová-Kovar et al., 2000]
18	$1.36.10^{-3}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	37	-	-	[Kovárová-Kovar et al., 2000]
18.24	$2.86.10^{-3}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	37	-	-	[Kovárová-Kovar et al., 2000]
29.52	$9.36.10^{-4}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	37	-	-	[Kovárová-Kovar et al., 2000]
18.72	$2.72.10^{-5}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	37	-	-	[Kovárová-Kovar et al., 2000]
13.2	$9.60.10^{-4}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	37	-	-	[Kovárová-Kovar et al., 2000]
13.2	$3.38.10^{-3}$	-	-	-	-	*Escherichia coli*	glucose	solution	37	-	-	[Kovárová-Kovar et al., 2000]
-	-	$5.50.10^{-2}$	-	-	-	BM sol	DOC sol	solution	20	20	$1.25.10^{-6}$	[Kuka et al., 2007]

TABLE 3.1 – **Valeurs, conditions expérimentales et origine des paramètres publiés** utilisés pour définir les gammes de paramètres incertains.

1. "auto / zymo" : microorganismes autochtones / zymogènes selon la classification de Winogradsky [Kemmitt et al., 2008], r : microorganismes à stratégie écologique r [Blagodatsky et Richter, 1998; Ingwersen et al., 2008]
2. "Exs.rac." : exsudats racinaires
3. Conditions hydriques données en teneur en eau massique (w), en potentiel (Ψ) ou en proportion de la capacité de rétention (CR).

3.2.4 Caractérisation des distributions des paramètres incertains

Nous avons donné les valeurs minimales et maximales recensées comme bornes des gammes, requises pour l'analyse de sensibilité par ANOVA. Il reste alors à définir les lois de distribution théorique approchée des paramètres pour les tirages Monte-Carlo. Il est très facile d'optimiser une fonction de distribution continue quelconque pour mimer la forme de nos distributions de valeurs bibliographiques à l'aide du logiciel `R`. Toutefois, il n'est pas possible de fixer des bornes avec ces lois de distribution. Des valeurs extrêmes hors gamme peuvent donc être générées. Nous préférons éviter d'inclure des valeurs potentiellement hors du domaine de validité du modèle dans nos scénarios, quitte à sous-estimer la variabilité des sorties en choisissant des distributions moins étendues qu'elles ne devraient.

Une loi uniforme décrit des valeurs équiprobables dans l'intervalle défini. La loi triangle permet de spécifier le mode de la distribution, c'est-à-dire la valeur la plus probable. Dans cette fonction, la probabilité, nulle aux bornes, croît linéairement jusqu'au mode. Les histogrammes des valeurs bibliographiques (figure 3.1) montrent des distributions asymétriques, sauf pour le paramètre p_m. Nous avons imposé des distributions triangle avec comme mode la médiane de la distribution pour tous les paramètres. Cela permet de restituer le caractère asymétrique des distributions observées pour $v_{DOC}, k_{DOC}, k_m, k_r$ et k_i. Quant au paramètre p_m, une loi uniforme conviendrait *a priori*. Cependant, la valeur maximale théorique de 1 (signifiant que l'intégralité du flux de mortalité forme du carbone insoluble) est fréquemment trouvée dans les données publiées. Cette valeur de 1 provient de travaux de modélisation et non de résultats expérimentaux. Nous pensons que cette valeur a été utilisée par commodité par les modélisateurs mais n'est pas réaliste. Nous avons donc souhaité l'exclure sans pour autant empêcher le tirage de valeurs élevées, proches de 1. Pour cette raison, nous avons préféré une distribution triangle à une distribution uniforme de 0 à 1 pour p_m. Les fonctions de densité des distributions approchées des six paramètres sont illustrées par les courbes vertes sur les histogrammes (figure 3.1). Ces distributions détermineront l'échantillonnage lors des simulations Monte-Carlo.

Deux distributions ont été établies pour les paramètres v_{DOC} et k_{DOC} : une distribution ne comprenant que les valeurs issues d'incubations dans du sol d'une part, et toutes les valeurs publiées présentées (issues de milieux liquides et sol) d'autre part. Les intervalles et la forme de la distribution, ainsi que la densité d'observations sont différents entre les deux types de distribution. L'effet du changement de distribution sur les résultats des analyses d'incertitudes et de sensibilité sera testé, pour les paramètres v_{DOC} et k_{DOC}. Pour les autres paramètres, il n'a pas été possible de procéder de la même façon car nous ne disposions pas de valeurs provenant d'incubations en milieu liquide.

3.2.5 Conditions initiales

Nous n'avons pas étudié l'effet de la variation des valeurs des pools de C au même titre que les paramètres cinétiques du modèle. Ces valeurs sont faciles à appréhender dans la pratique puisqu'elles se rattachent à des quantités inoculées au laboratoire. Le modèle peut néanmoins donner des réponses différentes en fonction de ses valeurs initiales. Les résultats de l'analyse d'incertitudes sont donc susceptibles de dépendre de ces valeurs.

Nous avons initialisé le substrat (du DOC) et la biomasse de manière à conserver les mêmes concentrations que dans l'expérimentation de Coucheney [2009], utilisées dans le chapitre 2 ($DOC_0 = 0,62$ mgC.cm^{-3}, $B_0 = 1,31.10^{-6}$ mgC.cm^{-3}). Nous avons ensuite réalisé les mêmes analyses avec une masse initiale de substrat (DOC_0) multipliée ou divisée par dix, tout en gardant la biomasse initiale (B_0) fixe. Le rapport substrat/bactéries est donc identique, multiplié ou divisé par 10 par rapport aux conditions dans le chapitre 2 ou dans l'expérimentation de Coucheney [2009].

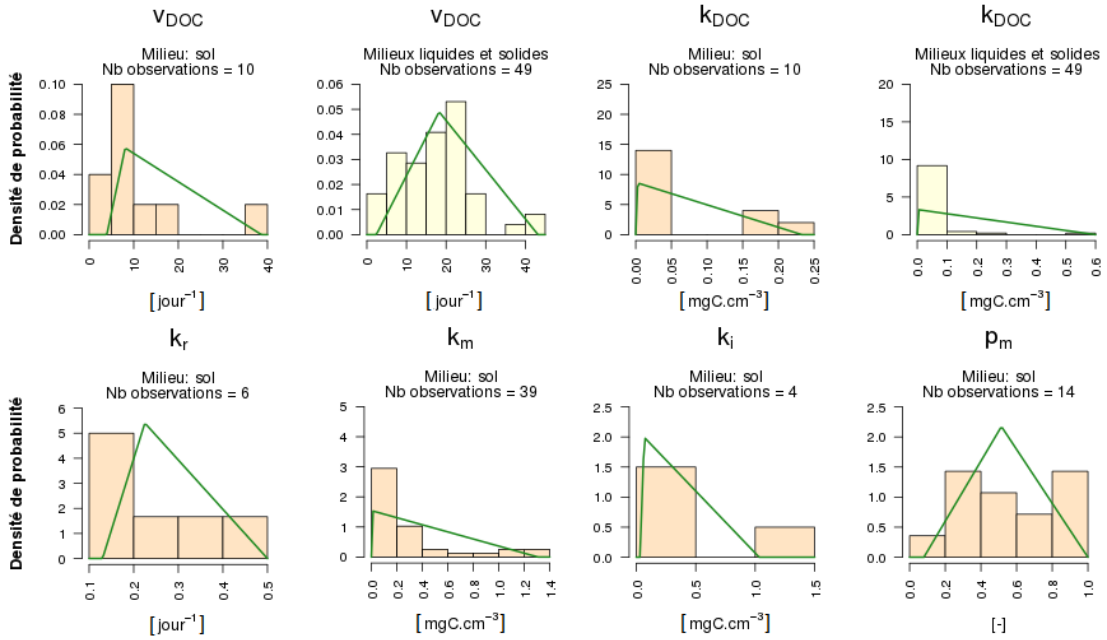


FIGURE 3.1 – **Histogrammes et fonctions de densité optimisées** (courbes vertes) **des paramètres pour les tirages Monte-Carlo**.
Les histogrammes en brun pâle représentent les valeurs issues d'études sur le sol, les histogrammes jaunes des valeurs en milieux liquides et sol.

3.2.6 Analyse d'incertitudes par simulations Monte-Carlo

L'échantillonnage des valeurs de paramètres, les itérations du modèle et le stockage des résultats ont été gérés par un seul programme en langage `R`. Nous avons construit pour chaque paramètre un vecteur de N valeurs sélectionnées par tirage aléatoire selon sa distribution avec la fonction `rtriangle` (disponible dans le paquet `Triangle` du logiciel `R` [R Core Team, 2014]). Chacune de ces N valeurs seront successivement prises en entrée par le modèle. Chaque itération simule une période de dix jours. On estime N suffisant lorsque des valeurs caractéristiques des sorties (par exemple la médiane et deux quantiles extrêmes) ne varient plus sensiblement à mesure que l'on incrémente les résultats de nouvelles itérations [Wallach et al., 2013]. La figure 3.2 montre l'évolution des quantiles 5, 50 et 95% de chaque variable d'intérêt regardées à dix jours pour l'une des situations analysées (version H_0P_1 du modèle, pour les distributions de paramètres provenant uniquement des études sur le sol et avec les conditions initiales identiques à celles de Coucheney [2009]). Un très petit nombre de simulations est suffisant pour que les trois quantiles de DOC se stabilisent (environ 50) comparé à B et CO_2 (les deux quantiles supérieurs oscillent faiblement jusqu'à $N \approx 3000$ pour B et $N \approx 10000$ pour CO_2). Nous considérons ici que 10000 est un nombre suffisamment grand pour le traitement statistique sur ces trois variables. Les tirages Monte-Carlo ont donc été réalisés sur 10000 itérations pour toutes les analyses d'incertitudes qui seront commentées par la suite.

La fonction `system` de `R` permet d'ordonner la réalisation d'une commande par un système d'exploitation de type `Unix`. Ici, nous l'avons utilisée pour réécrire les fichiers d'entrée avec les valeurs échantillonnées, puis pour compiler et exécuter le code du modèle (écrit en langage `C`) en boucle sur toutes les itérations. Les valeurs des variables de sortie aux pas de temps d'intérêt, trois et dix jours – comme dans l'analyse de sensibilité du chapitre 2 – sont extraits des fichiers de sortie du modèle et stockés avant que ceux-ci ne soient écrasés à la prochaine itération. Le code source de ce programme est donné en annexe A.

Nous interpréterons comme résultat final la distribution des trois variables de sorties illustrée au moyen d'histogrammes de fréquences. Comme les variables sont exprimées en concentrations

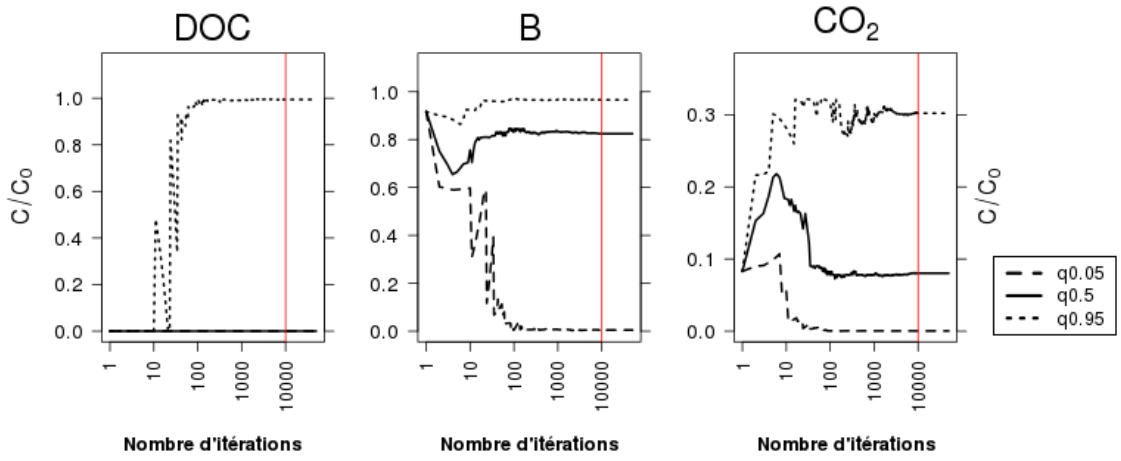


FIGURE 3.2 – **Évolution des quantiles 5, 50 et 95%** des trois variables de sortie à dix jours, à mesure de l'incrémentation des simulations Monte-Carlo.

relatives, le domaine de variation est compris entre 0 et 1.

3.2.7 Analyse de sensibilité par ANOVA sur plan d'expérience factoriel complet

L'analyse de sensibilité par ANOVA repose sur la décomposition de la variance totale des sorties issue de la combinaison de facteurs dans un plan factoriel complet [Wallach et al., 2013]. Nous avons attribué à chaque facteur d'entrée cinq niveaux. Il s'agit de valeurs jalonnant régulièrement la gamme de chaque paramètre : les bornes de la gamme, ainsi que des valeurs intermédiaires au quart, à la moitié et aux trois quarts de l'intervalle. Le plan factoriel complet compte $N = 5^{np}$ combinaisons où np est le nombre de paramètres incertains, soit 625 pour la version H_0P_0, 3125 pour les versions H_1P_0 et H_0P_1, ou 15625 itérations pour la versions H_1P_1.

Nous avons élaboré un programme `R` similaire à celui qui a servi à réaliser l'analyse d'incertitudes. Ce code peut être consulté dans l'annexe B. Les combinaisons des niveaux des différents paramètres sont générées, puis le code du modèle est compilé et exécuté en série à l'aide de la fonction `system`. Les variables de sortie d'intérêt (DOC, B, CO_2) sont stockées à chaque itération aux mêmes pas de temps que pour l'analyse d'incertitudes (trois et dix jours).

La somme des carrés des écarts (S_T) est calculée pour chaque variable (DOC, B, CO_2), nommée ici génériquement y, de moyenne $\bar{y}$, à chaque pas de temps (équation 2.17). Elle est décomposée en parts correspondant aux contributions des différents facteurs et interactions. L'équation 3.1 donne l'exemple d'une telle décomposition pour un plan d'expérience à quatre facteurs, nommés F_1 à F_4.

$$S_T = \sum_{1}^{4} (S_{F_1} \ \ldots \ S_{F_4}) + \sum_{1}^{6} (S_{F_{1:2}} \ \ldots \ S_{F_{3:4}}) + \sum_{1}^{5} (S_{F_{1:2:3}} \ \ldots \ S_{F_{2:3:4}}) \tag{3.1}$$

La part de S_T attribuée à chaque facteur seul (apparaissant dans la première somme à droite de l'égalité de l'équation 3.1) représente l'effet principal de ce facteur. L'effet global de chaque facteur correspond à la somme de son effet principal et des interactions dans lesquelles il est impliqué (interactions de 1^{er} au $(np-1)^{eme}$ ordre). Les deux premiers termes de somme à droite dans l'équation traduisent les six interactions de premier ordre (entre deux facteurs) et les cinq interactions de second ordre (entre trois facteurs).

Les indices de sensibilité représentent la proportion de chaque terme de l'équation 3.1 sur la somme des carrés de écarts totale (S_T), exprimée en pourcentages (équation 2.19). Nous étudierons comme résultats finaux la partition de la variance totale entre les différents termes de décomposi-

tion, c'est-à-dire l'ordre et la magnitude des différents indices de sensibilité.

3.3 Résultats

Les résultats des analyses d'incertitudes (distributions des trois variables de sortie issues des simulations Monte-Carlo) et des analyses de sensibilité (décomposition de la variance) seront d'abord commentés pour chacune des quatre versions du modèle, dans les conditions initiales de l'étude de Coucheney [2009]. L'effet du changement des distributions de deux paramètres (v_{DOC} et v_{DOC}) sera illustré dans ces conditions. Ensuite, nous nous intéresserons à l'effet du changement des concentrations initiales en substrat. Les valeurs moyennes et les variances des résultats des analyses d'incertitudes dans l'ensemble de ces situations sont répertoriées dans la table 3.2.

	Milieu	CI	Moyenne				Variance			
			H_0P_0	H_1P_0	H_0P_1	H_1P_1	H_0P_0	H_1P_0	H_0P_1	H_1P_1
DOC	S	.	$4.42.10^{-3}$	$2.02.10^{-3}$	$4.74.10^{-3}$	$2.45.10^{-3}$	$4.02.10^{-5}$	$9.97.10^{-6}$	$1.58.10^{-4}$	$2.19.10^{-4}$
		+	$4.33.10^{-4}$	$2.05.10^{-4}$	$4.56.10^{-4}$	$2.01.10^{-4}$	$3.56.10^{-7}$	$1.06.10^{-7}$	$4.19.10^{-7}$	$9.61.10^{-8}$
		-	$5.37.10^{-2}$	$3.24.10^{-2}$	$5.32.10^{-1}$	$5.37.10^{-1}$	$1.20.10^{-2}$	$1.05.10^{-2}$	$1.88.10^{-1}$	$1.90.10^{-1}$
	S+L	.	$9.15.10^{-3}$	$4.44.10^{-3}$	$1.38.10^{-2}$	$8.90.10^{-3}$	$6.71.10^{-4}$	$3.58.10^{-4}$	$4.37.10^{-3}$	$4.27.10^{-3}$
B	S	.	$9.98.10^{-2}$	$2.85.10^{-2}$	$7.35.10^{-1}$	$5.10.10^{-1}$	$3.96.10^{-3}$	$1.37.10^{-3}$	$2.92.10^{-2}$	$5.01.10^{-2}$
		+	$1.00.10^{-1}$	$2.93.10^{-2}$	$5.18.10^{-1}$	$1.93.10^{-1}$	$4.05.10^{-3}$	$1.43.10^{-3}$	$4.03.10^{-2}$	$1.73.10^{-2}$
		-	$1.27.10^{-1}$	$4.89.10^{-2}$	$4.33.10^{-1}$	$4.03.10^{-1}$	$7.91.10^{-3}$	$4.64.10^{-3}$	$1.61.10^{-1}$	$1.47.10^{-1}$
	S+L	.	$1.13.10^{-1}$	$3.22.10^{-2}$	$7.28.10^{-1}$	$5.10.10^{-1}$	$5.37.10^{-3}$	$1.88.10^{-3}$	$2.98.10^{-2}$	$4.98.10^{-2}$
CO_2	S	.	$8.96.10^{-1}$	$5.83.10^{-1}$	$2.60.10^{-1}$	$2.91.10^{-1}$	$4.14.10^{-3}$	$3.42.10^{-2}$	$2.95.10^{-2}$	$2.84.10^{-2}$
		+	$8.99.10^{-1}$	$5.85.10^{-1}$	$4.81.10^{-1}$	$4.89.10^{-1}$	$4.06.10^{-3}$	$3.43.10^{-2}$	$4.04.10^{-2}$	$3.42.10^{-2}$
		-	$8.19.10^{-1}$	$5.56.10^{-1}$	$3.57.10^{-2}$	$3.34.10^{-2}$	$2.35.10^{-2}$	$3.77.10^{-2}$	$2.89.10^{-3}$	$2.61.10^{-3}$
	S+L	.	$8.78.10^{-1}$	$5.58.10^{-1}$	$2.58.10^{-1}$	$2.80.10^{-1}$	$6.39.10^{-3}$	$3.49.10^{-2}$	$2.83.10^{-2}$	$2.75.10^{-2}$

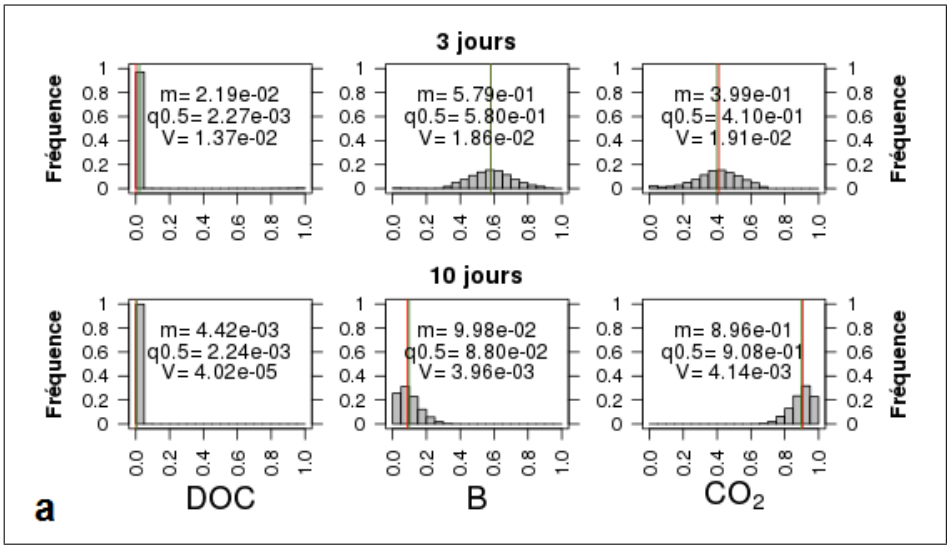
TABLE 3.2 – **Moyennes et variances des résultats des simulations Monte-Carlo à dix jours.** Le milieu d'incubation est désigné par les lettres S (sol) et L (liquide). Les conditions initiales (CI) de l'incubation de Coucheney [2009] sont indiquées par "." ; "+" et "-" représentent des concentrations initiales avec DOC_0 identique, multiplié ou divisé par 10 par rapport à l'expérimentation de Coucheney [2009].

3.3.1 Effet de la structure du modèle sur les incertitudes et la sensibilité du modèle

Version H_0P_0 (version « minimale » du modèle)

La structure du modèle dans la version H_0P_0 est caractérisée par une activité toujours optimale quelle que soit la concentration de DOC ($R = 1$) et par l'affectation de l'intégralité du flux de mortalité au pool DOC, signifiant un recyclage immédiat et intégral du carbone bactérien et flux d'humification nul ($p_m = 1$).

Analyse d'incertitudes La distribution de DOC se démarque nettement de celle de B et CO_2 (figure 3.3a). La quasi-totalité des valeurs de DOC appartient à la classe [0-0,05]. Les autres, moins de 3% des scénarios, peuvent atteindre la valeur maximale possible de 1. Les moyenne (0,02) et médiane (0,002) sont très proches de 0. L'écrasante majorité des scénarios aboutit donc à l'épuisement du substrat en moins de trois jours. De rares scénarios s'écartent de cette situation est aboutissent à une consommation du substrat incomplète voire nulle. Ces scénarios extrêmes tendent à augmenter la variance totale. De trois à dix jours, cette variance perd trois ordres de grandeur (de 10^{-2} à 10^{-5}). Presque tous les scénarios aboutissent à des quantités infimes de DOC (les moyenne et médiane sont inférieures à 5.10^{-3}). On observe encore quelques valeurs extrêmes, mais cette fois-ci beaucoup moins éloignées de la moyenne : la valeur maximale est de 0,15. A dix jours, la consommation de DOC est donc presque toujours complète, et toujours significative (au moins 85% du DOC apporté a disparu). Les incertitudes sont donc très faibles pour cette variable,



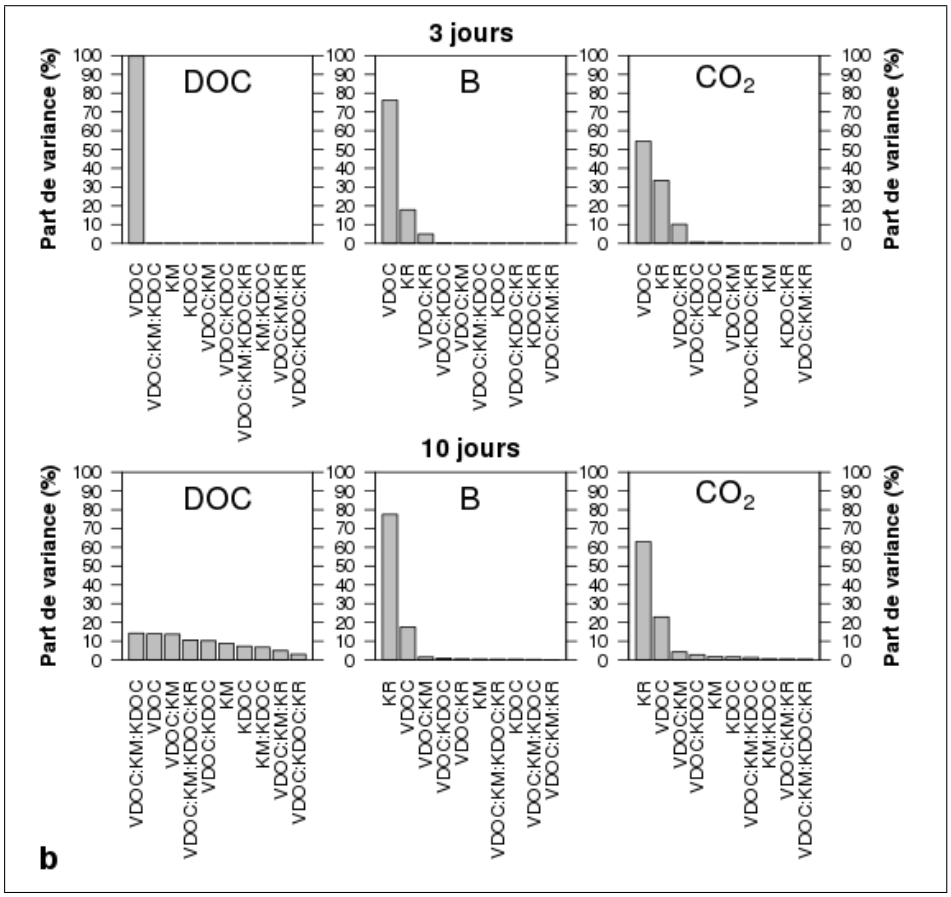


FIGURE 3.3 – **Résultats des analyses des incertitudes** (a) **et de la sensibilité** (b) de la version H_0P_0 du modèle.
Pour l'analyse d'incertitudes (a), les classes de valeurs des variables exprimées en concentrations relatives sont en abscisses, avec leur fréquence en ordonnées. Les valeurs de moyenne (m), médiane (q0.5) et de variance (V) sont écrites et matérialisées par les lignes verte et rouge pour les deux premières respectivement.
Pour l'analyse de sensibilité (b), les termes représentant les facteurs dans l'équation 3.1 sont exposés en abscisses, avec en ordonnées leur indice de sensibilité.
Les conditions initiales correspondent aux concentrations initiales de Coucheney [2009]. Les distributions de paramètres sont établies à partir d'études dans le milieu sol uniquement.

seulement engendrées par l'apparition de cas extrêmes très rares tendant à disparaître au fil du temps.

A trois jours, les variables B et CO_2 montrent des distributions proches d'une loi normale, avec des valeurs beaucoup plus dispersées que pour DOC au même pas de temps, malgré une variance comparable. Les valeurs moyennes indiquent une croissance bactérienne et une respiration importantes en général ($B = 0,58$ et $CO_2 = 0,4$) mais cachent des situations très variées entre les scénarios, selon leur degré d'avancement dans la cinétique. La combinaison ($DOC \to 0,\ B \to 1,\ CO_2 \to 0$) représente un état transitoire arrivant à la fin de la phase de croissance exponentielle, où tout le substrat a été consommé et une quantité minime de carbone a été respirée. Les scénarios s'écartent de cette situation à mesure que le carbone de la biomasse est converti en CO_2 pour tendre vers la situation d'équilibre ($DOC \to 0,\ B \to 0,\ CO_2 \to 1$), correspondant à l'arrêt de la cinétique du fait de la disparition de la biomasse. La situation ($DOC \to 1,\ B \to 0,\ CO_2 \to 0$) correspond aux cas de consommation de substrat nulle – donc de croissance nulle – constatés dans la distribution de DOC.

Les distributions de B et CO_2 se déportent vers les pôles opposés de la gamme à mesure du déclin du pool de biomasse et du transfert du carbone ainsi mobilisé vers le pool de CO_2. A dix jours, les cinétiques arrivent à un stade très avancé proche de l'arrêt par disparition de la biomasse d'après les valeurs moyennes de B et de CO_2 (B=0,1 et CO_2=0,9). On observe un resserrement des valeurs que traduit la baisse de la variance entre trois et dix jours (de 10^{-2} à 10^{-3}).

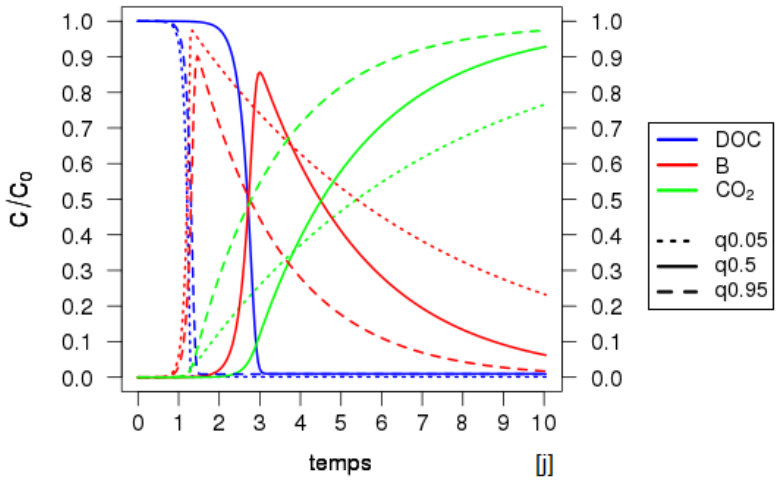


FIGURE 3.4 – **Cinétique de biodégradation de trois simulations issues du tirage de Monte-Carlo** pour l'analyse des incertitudes de la version H_0P_0 du modèle.
Les scénarios donnés en exemple sont les réalisations pour lesquelles on obtient la valeur des quantiles 5 (q0.05), 50 (q0.5) et 95% (q0.95) de la variable DOC à 10 jours.

L'étude de l'évolution des distributions révèle l'existence d'une tendance forte, un type de cinétique commun à la majorité des scénarios. Dans cette cinétique, l'évolution des trois variables intervient à des temps et à des cadences différents. DOC décline rapidement en début de cinétique jusqu'à son épuisement, qui concorde avec le début de l'augmentation de B et CO_2. Après le bref épisode de croissance exponentielle, le reste de la cinétique est marqué par le déclin monotone de la biomasse et l'augmentation symétrique du pool de CO_2 (figure 3.4), qui peut aller pour les cinétiques les plus rapides, jusqu'à la conversion complète du carbone de la biomasse en CO_2.

De très rares scénarios s'écartent qualitativement de ce cas général. Dans ces scénarios, la consommation est trop lente pour que la croissance bactérienne ait commencé avant trois jours et que le substrat ait totalement disparu à dix jours. L'occurrence de ces scénarios extrêmes tend à

augmenter la variabilité, donc le niveau d'incertitudes de la variable DOC. Cependant, ce niveau est très réduit à dix jours d'après la variance totale et la faible étendue de la gamme de valeurs prédites.

La consommation rapide et totale du substrat résulte en une partition variable entre les pools de biomasse et de CO_2 pour un temps donné, selon de fines différences de rythme entre les scénarios (voir les trois exemples de cinétique illustrés dans la figure 3.4). La gamme de valeurs prises à dix jours par B (0 - 0,43) et CO_2 (0,40 - 1) est plus étendue que pour DOC, ce qui traduit un plus grand niveau d'incertitudes pour ces deux variables.

Analyse de sensibilité A trois jours, la variabilité des valeurs de DOC est exclusivement expliquée par le paramètre v_{DOC} contrôlant la vitesse de prélèvement de la ressource par les bactéries (figure 3.3b). Les variables B et CO_2 sont également très sensibles à ce paramètre (il est responsable de plus de 75% et 50% de la variance totale de B et CO_2 respectivement). Toutefois, le taux de respiration k_r est aussi un paramètre important, en tant que facteur seul ou en interaction avec v_{DOC}. L'évolution de la distribution des variables de sortie avec le temps, constatée dans les résultats du tirage Monte-Carlo (figure 3.3a), s'accompagne d'une modification de la sensibilité des sorties aux différents facteurs. Pour B et CO_2, les paramètres v_{DOC} et k_r restent les deux seuls facteurs réellement influents, mais leur hiérarchie s'inverse entre les deux pas de temps (k_r compte pour 75 et 62% des variances de B et CO_2 respectivement, v_{DOC} pour 15 et 22%). La très faible variance de DOC se partage entre plusieurs termes de poids similaire. Les sorties de DOC à dix jours ont donc peu d'intérêt pour analyser la sensibilité de cette variable.

Le prélèvement de DOC apparaît donc seulement déterminé par un paramètre, v_{DOC} la vitesse maximale de croissance selon la loi de Monod [1941]. La constante de saturation (k_{DOC}) a un poids négligeable dans la variabilité des trois variables. Dans le modèle de Monod, v_{DOC} (plus classiquement appelé V_{max} ou μ_{max}) détermine l'initiation de la croissance et son rythme lorsque le substrat est abondant. k_{DOC} (ou k_s) gouverne quant à lui l'inflexion de la courbe de croissance à la fin de la phase exponentielle causée par la raréfaction du substrat. Dans notre modèle, la croissance de la biomasse résultant de la consommation de DOC est contrebalancée par des pertes de carbone via les flux de respiration et de mortalité. L'effet de ces pertes devient dominant à mesure que la concentration en DOC diminue sous l'effet du prélèvement prolongé par une biomasse de plus en plus abondante. En fin de cinétique, la biomasse est en phase de déclin comme on peut en juger par le déplacement des valeurs de B vers 0 tandis que le CO_2 s'accumule dans des proportions importantes (figure 3.3a). Le poids de la constante de saturation (k_{DOC}) s'avère négligeable devant celui de v_{DOC} et de k_r. En effet, la transition entre croissance (gouvernée par v_{DOC}) et déclin (gouverné notamment par k_r) est instantanée, sans passage par une phase de stagnation.

La respiration et la mortalité sont deux fonctions d'ordre 1 de la biomasse. Malgré un formalisme identique et une gamme de variation plus vaste, on note que le taux de mortalité (k_m) a une moindre influence par rapport au taux de respiration (k_r). Ceci s'explique par le fait que le flux de mortalité restitue le carbone sous forme de DOC directement assimilable par la biomasse, alors que la respiration représente une perte définitive.

L'évolution des trois pools du modèle dans la version H_0P0 est donc caractérisée par deux périodes bien distinctes et marquées par des processus différents : d'abord l'acquisition du substrat, très rapide et peu variable, gouvernée par la vitesse maximale de prélèvement (v_{DOC}), puis le déclin de la biomasse sous l'effet d'une respiration intense, influencé en premier lieu par le taux de respiration (k_r).

Version H_1P_0 : intégration du processus d'humification

Dans cette version du modèle, le flux de mortalité se partage entre recyclage (vers le pool de DOC) et humification (vers le pool de POC), sous le contrôle du coefficient p_m. Ce paramètre fait partie des facteurs incertains dans les analyses d'incertitudes et de sensibilité.

Analyse d'incertitudes La distribution de DOC aux deux pas de temps reste sensiblement la même dans la version H_1P_0 avec la prise en compte du processus d'humification (figure 3.5a), comparé à la version minimale H_0P_0 (figure 3.3a). On observe en revanche des différences pour B et CO_2 qui s'accentuent avec le temps. Les valeurs moyennes baissent et les distributions changent de forme. A trois jours, la moyenne de B est de 0,4 contre 0,58 dans la version H_0P_0. La distribution de type normal s'aplatit et couvre tout l'intervalle des valeurs possibles [0 - 1]. La plus grande dispersion des valeurs par rapport à la version H_0P_0 se traduit par l'augmentation modeste de la variance (d'environ un facteur deux, voir table 3.2). A dix jours, les valeurs de B se concentrent vers zéro (les moyenne et médiane sont de 0,03 et 0,01 et la variance diminue d'environ un facteur trois, comparé à la version H_0P_0). Le changement de distribution de CO_2 entre les versions H_0P_0 et H_1P_0 est minime à trois jours mais spectaculaire à dix jours. La distribution de CO_2 s'uniformise sur un intervalle couvrant presque toute la gamme des valeurs possibles [0,15 - 0,98]. Cette dispersion élevée s'accompagne d'une hausse de la variance (10^{-2} contre 10^{-3} pour la version H_0P_0). Comme pour B, on observe une baisse conséquente de la moyenne par rapport à la version H_0P_0 (0,58 au lieu de 0,9).

Le processus d'humification provoque l'affectation d'une partie du carbone dans un nouveau pool, POC. Il est concurrent du mécanisme de recyclage – par lequel la biomasse libère du carbone directement assimilable via le flux de mortalité – et représente une perte irréversible lorsque l'hydrolyse du carbone insoluble est négligée, comme c'est le cas ici. De manière générale, la prise en compte de l'humification précipite le déclin de la biomasse et réduit l'accumulation de CO_2. Les pertes définitives (par respiration et humification) sont parfois tellement intenses par rapport aux quantités recyclées qu'elles peuvent limiter la phase de croissance exponentielle de la biomasse, qui n'atteint alors pas son niveau maximum, habituellement proche de 1 (comparer les scénarios q0.05 et q0.5 de la figure 3.6). Les valeurs de POC sont de 0,24 en moyenne sur un intervalle [$\approx$ 0 - 0,8] à trois jours et de 0,39 en moyenne [$\approx$ 0 - 0,85] à dix jours (figure 3.5).

La réponse du modèle à dix jours est donc facilement prévisible en ce qui concerne les valeurs de DOC et de B, toujours proches de 0 en fin de simulation. Les incertitudes résident principalement dans la partition entre CO_2 et POC.

Analyse de sensibilité L'intégration du processus d'humification n'engendre pas de changement notable de la sensibilité de DOC aux différents paramètres (figure 3.5b), en comparaison avec les résultats de la version H_0P_0 (figure 3.3b). En revanche, l'influence de v_{DOC} et de k_r diminue nettement pour B et CO_2 au profit des paramètres qui déterminent le flux de mortalité k_m et son partage entre humification et recyclage, p_m. A dix jours, la variance du pool B est expliquée par la contribution des paramètres qui gouvernent ses pertes (k_m à hauteur de 25%, k_r : 20%, $k_m : k_r$: 18% p_m : 12%) devant v_{DOC} (11% de la variance expliquée). L'influence indirecte du partage entre humification et recyclage sur CO_2 est confirmée par la sensibilité importante de cette variable à k_m et p_m (43 et 20% de la variance totale expliquée à dix jours). La contribution de k_r recule spectaculairement : de 60% pour la version H_0P_0 à 27% pour la version H_1P_0.

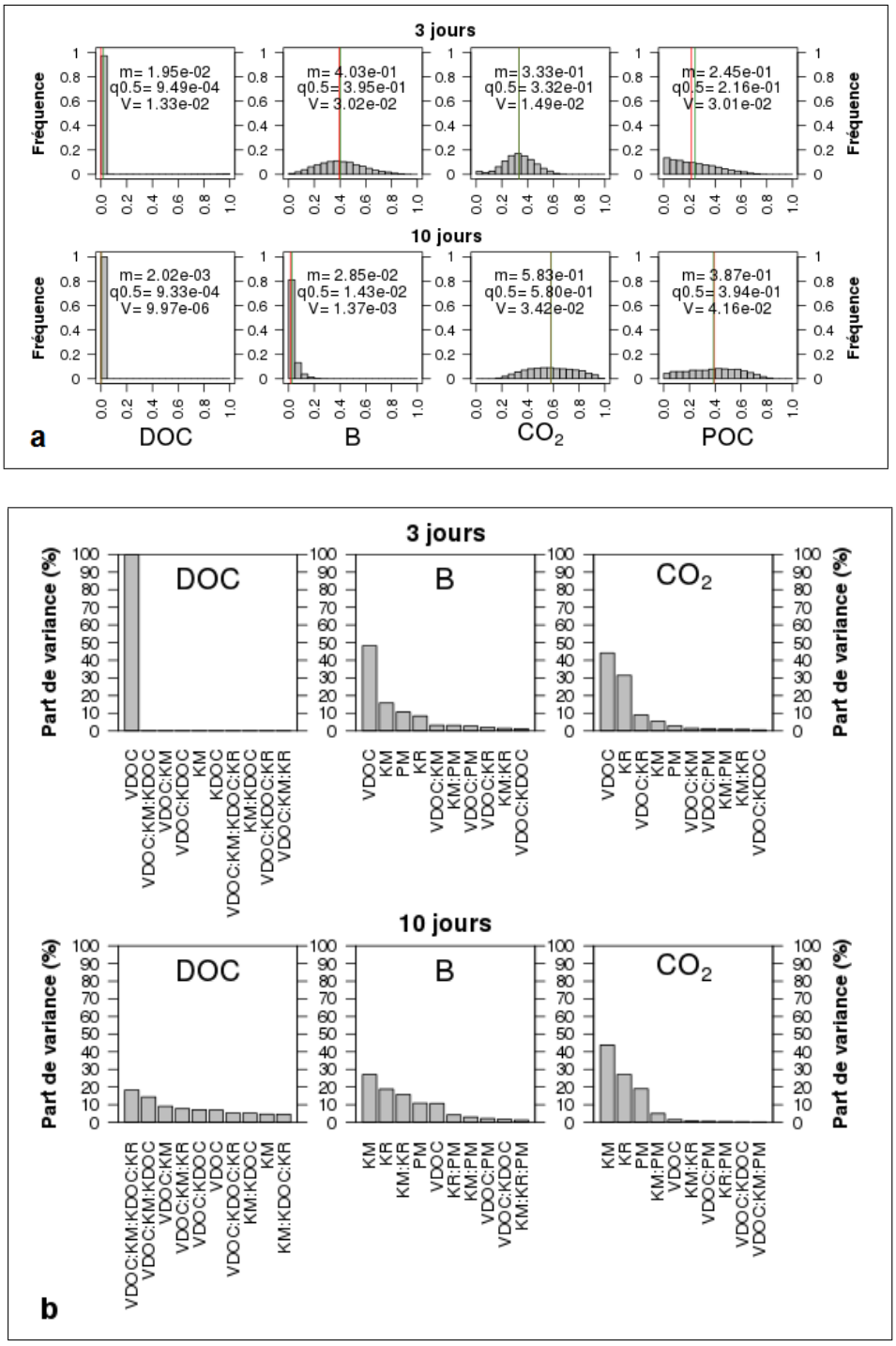


FIGURE 3.5 – **Résultats des analyses des incertitudes** (a) **et de la sensibilité** (b) de la version H_1P_0 du modèle.

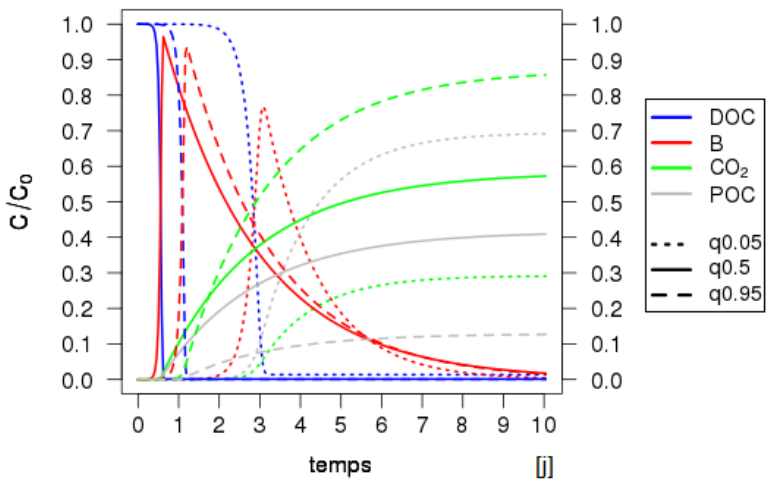


FIGURE 3.6 – **Cinétique de biodégradation de trois simulations issues du tirage Monte-Carlo** (version H_1P_0 du modèle)

Version H_0P_1 : intégration de l'état physiologique

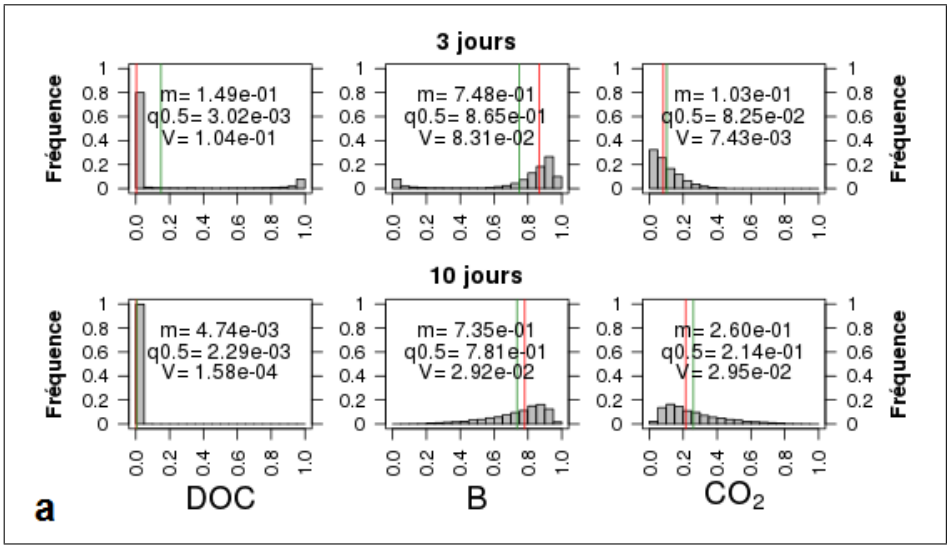
Dans la version H_0P_1, l'état physiologique varie en fonction de la concentration de DOC disponible pour les bactéries et est contrôlé par le paramètre k_i, défini comme facteur incertain. L'humification est considérée nulle et le recyclage du carbone bactérien total ($p_m = 0$).

Analyse d'incertitudes La figure 3.7a montre pour la version H_0P_1 une baisse de la fréquence de la classe $[0 - 0,05]$ de DOC à trois jours (environ 80% des scénarios) par rapport au modèle sans activation de l'état physiologique (version H_0P_0). L'augmentation de l'occurrence des cas extrêmes avec consommation incomplète du substrat par les bactéries provoque l'augmentation des variances de DOC et de B. Ces deux variables ont des distributions bimodales, localisées à proximité des bornes opposées de l'intervalle $[0 - 1]$. Les valeurs moyenne et médiane de B sont proches de 1 (0,75 et 0,87 respectivement) alors que celles de CO_2 sont proches de 0 (0,1 et 0,08 respectivement). La combinaison ($DOC \to 0,\ B \to 1,\ CO_2 \to 0$) déjà observée dans les sorties de version H_0P_0 correspondant à la fin de croissance exponentielle est à nouveau trouvée pour la version H_0P_1.

A dix jours, la distribution de DOC est très similaire à celle que l'on obtenait pour les versions précédentes (P_0). On retrouve une classe [0 - 0,05] écrasante avec quelques cas marginaux en dehors. Les valeurs moyenne et médiane sont inchangées. Cependant, l'étendue de la gamme incluant les cas marginaux de consommation partielle du substrat a augmenté par rapport aux versions P_0 [0 - 0,8]. En conséquence, la variance de DOC est plus élevée à dix jours pour la version H_0P_1 (10^{-4}) que pour les versions P_0 (10^{-5}, cf table 3.2) .

On n'assiste pas à l'inversion des valeurs de B et CO_2 entre trois et dix jours dans la version H_0P_1, comme c'était le cas pour les versions P_0. La valeur de B est inchangée entre trois et dix jours. L'accumulation moyenne de CO_2 a progressé (passant de 0,1 à 0,26 entre trois et dix jours) mais reste très réduite en comparaison des résultats de la version H_0P_0 (0,9). Les distributions de B et CO_2 s'étalent sur tout l'intervalle permis $[0 - 1]$. La variance de ces variables à dix jours (autour de 10^{-2}) est accrue en comparaison des résultats de la version H_0P_0 (autour de 10^{-3}, table 3.2).

L'intégration du calcul de l'état physiologique altère qualitativement la cinétique type observée dans les scénarios de la version H_0P_0, donc la distribution des variables de sortie. L'impact de



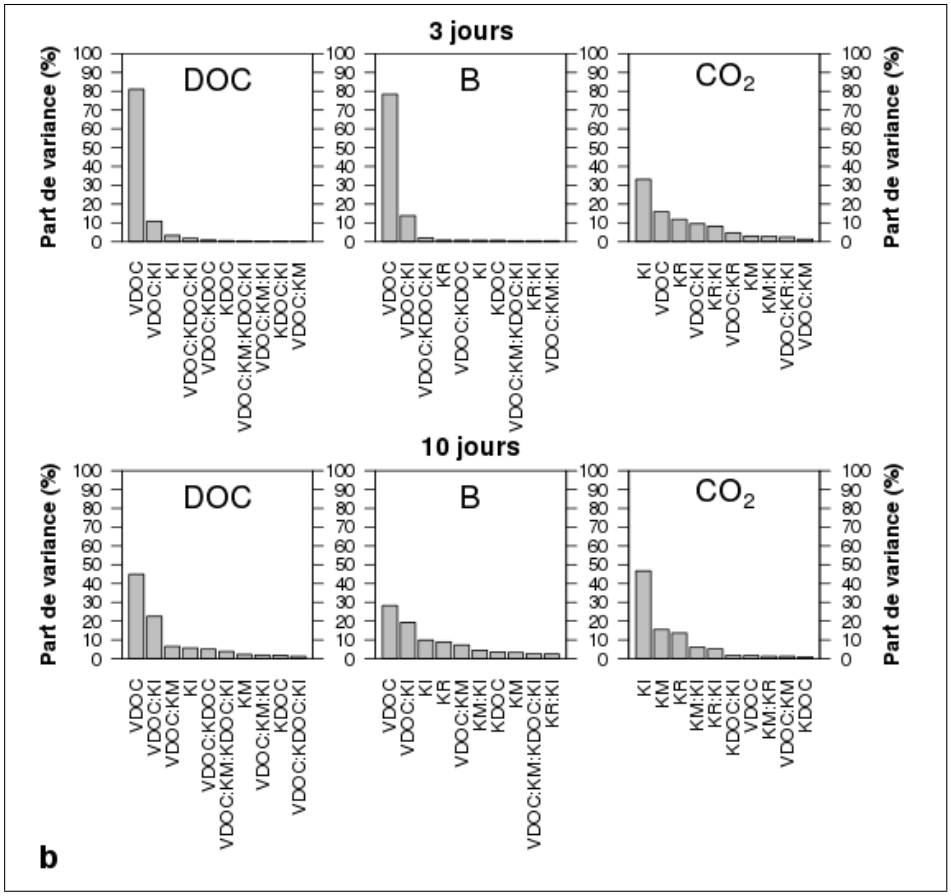


FIGURE 3.7 – **Résultats des analyses des incertitudes** (a) **et de la sensibilité** (b) de la version H_0P_1 du modèle.

la fluctuation de R sur les variables B et CO_2 est plus prononcé une fois la phase de croissance exponentielle terminée, lorsque la raréfaction du substrat provoque le déclin de l'activité des bactéries (figure 3.8). R chute et se stabilise à une valeur basse, stoppant ou limitant fortement tous les flux et provoquant donc la stagnation des différents pools. Les pertes de C par respiration et mortalité, normalement élevées du fait d'une biomasse abondante deviennent minimes, au même titre que le prélèvement de DOC, déjà négligeable du fait de la rareté du substrat à ce moment de la cinétique. Ce mécanisme est responsable du stockage du carbone sous la forme de biomasse dormante qui se manifeste ici par les fortes quantités de biomasse et l'accumulation modeste de CO_2 en moyenne en fin de simulation (figures 3.7a et 3.8). Toutefois, des scénarios caractérisés par les valeurs ($DOC \to 0,\ B \to 0,\ CO_2 \to 1$) sont observés, à faible fréquence et montrent que la disparition de la biomasse n'est pas inévitable quand R est activé (la cinétique q0.95 dans la figure 3.8 en donne un exemple).

L'évolution de l'état physiologique R diffère entre les scénarios en fonction de l'évolution de DOC (figure 3.8). Le contrôle de DOC variable sur R et la rétroaction de R sur les transformations bactériennes, d'une ampleur variable elle aussi, entraînent une multitude de réponses possibles du modèle pour des conditions initiales identiques, se traduisant par la forte dispersion des valeurs de B et CO_2 en fin de simulation (figure 3.7a). Le calcul de l'état physiologique augmente donc considérablement les incertitudes sur ces deux variables.

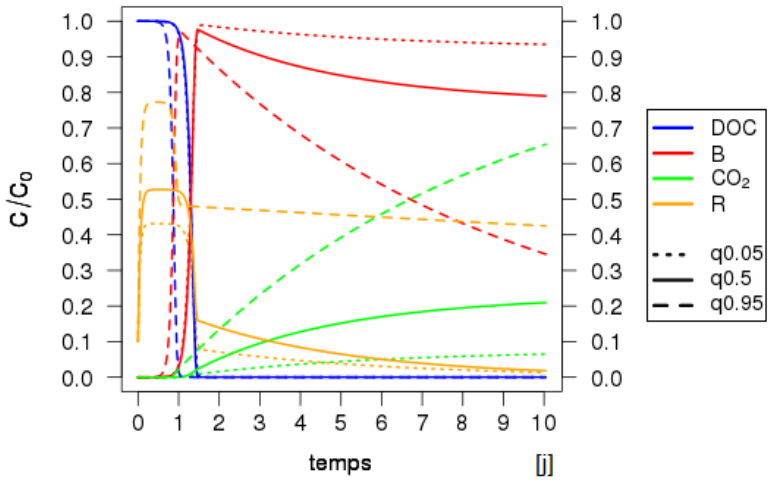


FIGURE 3.8 – **Cinétique de biodégradation de trois simulations issues du tirage Monte-Carlo** (version H_0P_1 du modèle)

Analyse de sensibilité Le paramètre v_{DOC} reste le plus influent pour DOC et B en début de cinétique (environ 80% de la variance totale expliquée, voir figure 3.7b). La constante d'inhibition de l'état physiologique k_i est le deuxième paramètre à intervenir, seul ou en interaction avec v_{DOC}. Pour CO_2, l'influence de k_i (30% de variance totale expliquée) et v_{DOC} (15%) est supérieure à celle du taux de respiration k_r (10%), bien que le contrôle des deux premiers paramètres soit moins exclusif que pour les variables DOC et CO_2. En fin de cinétique l'influence de v_{DOC} décroît pour DOC et B, comme dans la version H_0P_0 (figure 3.3b), mais cette fois-ci au dépens notamment de k_i et de l'interaction $v_{DOC} : k_i$ (figure 3.7b). Le poids de k_r est plus faible que pour la version H_0P_0, lorsque l'état physiologique n'était pas considéré, expliquant environ 10% de la variance totale en facteur seul. Le taux de mortalité k_m montre une contribution accrue, notamment pour la variable CO_2 même légèrement supérieure à la celle de k_r, le taux de respiration. Cette tendance contre-intuitive peut s'expliquer par le contrôle indirect de la respiration par la mortalité, mis en

lumière par la variation de R. En délivrant du carbone sous forme de DOC, le flux de mortalité tempère la baisse de l'état physiologique et donc le ralentissement de la respiration qui s'ensuit.

L'intégration de l'état physiologique affecte la sensibilité des sorties du modèle aux différents paramètres. L'effet important de R sur la cinétique se traduit par la sensibilité prépondérante de deux paramètres qui le règlent, v_{DOC} et k_i, en tant que facteurs seuls et interagissant l'un avec l'autre. Le paramètre v_{DOC} présentait déjà une forte sensibilité dans la version H_0P_0 du modèle, alors qu'il ne contrôlait que le flux de prélèvement de DOC. Dans la version H_0P_1, v_{DOC} exerce un contrôle direct sur ce flux et un contrôle indirect sur tous les autres flux, via la variable d'état physiologique. La sensibilité de k_{DOC}, qui lui aussi apparait à la fois dans les équations de Monod (équation 1.47) et du calcul de R (équation 1.51) reste négligeable comme dans la version H_0P_0. L'action globale de l'état physiologique, sur l'ensemble des flux peut expliquer le changement de la hiérarchie entre les autres paramètres, comme on a pu le constater pour k_m et k_r.

Version H_1P_1 : intégration de l'état physiologique et du processus d'humification

Dans cette version du modèle, l'état physiologique est variable et le processus d'humification est représenté. Les paramètres k_i et p_m font partie des paramètres incertains.

Analyse d'incertitudes A trois jours, les distributions des trois variables sont similaires entre les versions H_0P_1 et H_1P_1 (respectivement sans et avec calcul de l'état physiologique, figures 3.7a et 3.9a). A dix jours, la valeur moyenne de B diminue par rapport à la version H_0P_1 mais reste beaucoup plus élevée que pour la version H_0P_0 (0,51 pour la version H_1P_1, au lieu de 0,74 pour la version H_0P_1 et 0,1 pour la version H_0P_0). Le recentrage de la moyenne s'accompagne d'une uniformisation de la distribution de B sur tout l'intervalle $[0-1]$. La distribution de CO_2 est très peu modifiée. La moyenne augmente très légèrement (de 3%) comparé à la version H_0P_1 à dix jours. L'accumulation de POC est beaucoup plus lente que dans la version H_1P_0 du modèle (comparer les figures 3.6 et 3.10) : elle est divisée par trois à trois jours (0,08) et par deux à dix jours (0,2) par rapport à la version H_0P_1. Toutefois, des proportions très importantes de POC peuvent parfois être atteintes (jusque 0,83), comme dans la version H_1P_0. Le modèle avec l'intégration simultanée de l'état physiologique et du processus d'humification garde un comportement très similaire à celui de la version H_0P_1 (état physiologique uniquement). Dans cette version la plus complète du modèle, la partition du carbone à dix jours entre B, CO_2 et POC peut prendre toutes les combinaisons possibles, les trois variables présentant des distributions presque uniformes et balayant tout l'intervalle $[0-1]$.

Le processus d'humification lorsqu'il est simulé en même temps que la fluctuation de l'état physiologique, joue de manière subtile sur la distribution des sorties. Par exemple l'augmentation de CO_2 par rapport à la version H_0P_1, bien que très légère, révèle un comportement complexe résultant de la combinaison entre variation de l'état physiologique et amoindrissement du recyclage de la biomasse par l'affectation d'une partie du flux au pool de POC. Ce phénomène de recyclage est supposé être le plus influent en fin de croissance exponentielle, lorsque les quantités de DOC deviennent limitantes pour la biomasse. En réduisant les quantités de DOC restituées par le flux de mortalité, la prise en compte du processus d'humification impose des conditions plus limitantes pour la biomasse à ce moment précis de la cinétique. Ceci causerait une diminution plus progressive de l'activité bactérienne, ce qui réduirait l'intensité du prélèvement par la biomasse, alors massive. Les concentrations de DOC maintiendraient un niveau d'activité plus élevé, cumulé dans le temps, que pour la version H_0P_1 du modèle. La biomasse perdrait alors plus de carbone, à la fois sous la forme de CO_2 et de POC. Le niveau d'incertitudes sur B, CO_2 et POC est maximale pour cette version la plus complète du modèle.

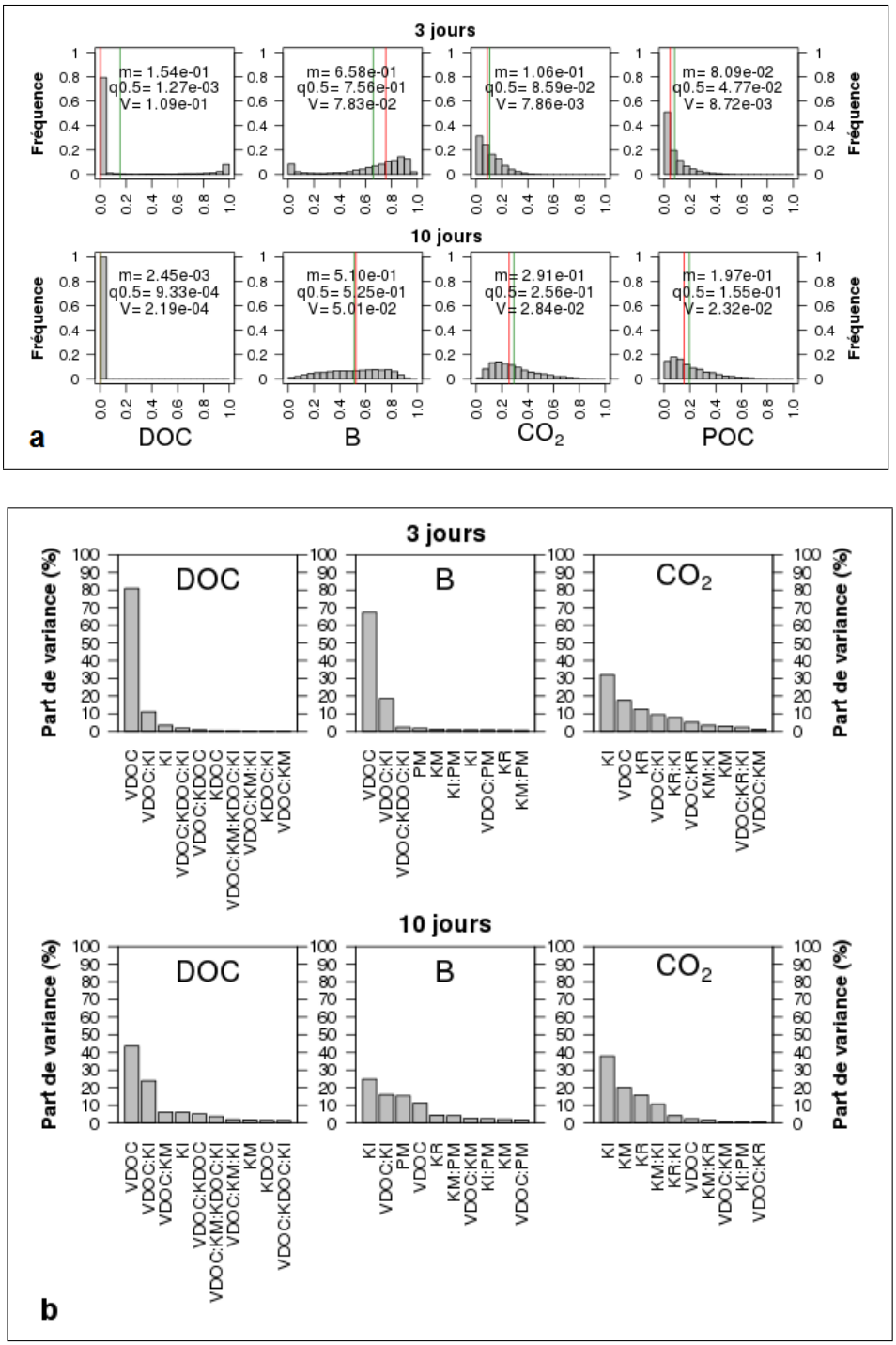


FIGURE 3.9 – **Résultats des analyses des incertitudes** (a) **et de la sensibilité** (b) de la version H_1P_1 du modèle.

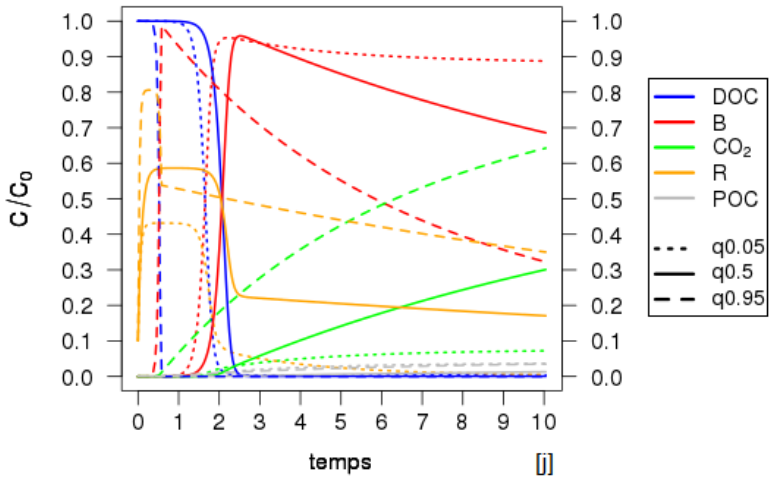


FIGURE 3.10 – **Cinétique de biodégradation de trois simulations issues du tirage Monte-Carlo** (version H_1P_1 du modèle)

Analyse de sensibilité Les différences de sensibilité aux facteurs sont modérées, à l'image des différences dans les distributions, si l'on compare les résultats des version H_0P_1 (figure 3.7b) et H_1P_1 (figure 3.9b). L'effet de l'intégration du processus d'humification est le plus évident dans la sensibilité de B. Il se manifeste notamment par la progression de l'influence de k_i (premier facteur en effet principal à dix jours, avec une contribution à la variance de 23% contre 12% pour la version H_0P_1) et par le recul du paramètre v_{DOC} (12% à dix jours contre 27% pour la version H_0P_1). p_m, le coefficient de partage entre humification et recyclage apparaît en troisième position avec une contribution de 15%. L'effet de k_i sur la variance de CO_2 diminue légèrement au profit des autres paramètres à dix jours. La contribution de p_m à la variabilité de CO_2 est minime.

La hiérarchie des différents paramètres montre donc bien l'effet prépondérant de l'état physiologique sur celui du processus d'humification. La variance de B et CO_2 est plus équitablement répartie entre les différents paramètres par rapport aux autres versions du modèle, ce qui explique le caractère plus nuancé des réponses du modèle par rapport aux autres versions mais aussi la très grande variabilité observée.

3.3.2 Effet du changement de distribution des paramètres

Le changement de distribution (en termes de forme et d'intervalle) ne concerne ici que deux paramètres v_{DOC} et k_{DOC}. Imposer des distributions différentes pour ces paramètres a très peu d'effet sur les résultats des analyses d'incertitudes présentées précédemment (annexe C), comme en témoignent les faibles écarts dans les valeurs de moyenne et variance données dans la table 3.2. Aucun changement notable n'est remarqué dans les distributions de B et CO_2. Les distributions de la variable DOC gardent le même profil caractérisé par la concentration des valeurs dans la première classe d'effectifs. Toutefois, les scénarios aboutissant à une consommation incomplète voire nulle du substrat sont plus fréquents à dix jours. Cette occurrence accrue entraîne la progression de la variance. Elle est multipliée par 17 à 35 selon les versions du modèle, alors que les variances sont équivalentes entre les deux types distributions pour B et CO_2 (table 3.2). Les scénarios responsables de l'accroissement de la variance de DOC restent des cas extrêmes ne changeant pas fondamentalement la distribution. En conséquence, le changement de distributions n'a que peu d'effet sur la sensibilité des sorties aux différents facteurs. On assiste simplement à une légère progression de l'influence de v_{DOC}.

3.3.3 Effet du changement des conditions initiales

Avec l'augmentation de la concentration initiale de substrat, la classe $[0 - 0,05]$ de DOC à trois jours devient plus fréquente (>95%) et les autres classes marginales (figure 3.11a). A dix jours, DOC avoisine systématiquement zéro. Aucune valeur extrême n'apparaît. Aucun changement notoire dans les distributions des autres variables (B et CO_2) n'est constaté.

Nous avons réalisé les mêmes analyses en changeant la valeur de DOC_0 (multipliée ou divisée par dix) pour les quatre versions du modèle. Par souci de concision, nous ne présenterons que les résultats de deux versions : H_1P_0 et H_1P_1, sans ou avec activation de l'état physiologique, respectivement. L'effet du changement des conditions initiales s'est avéré similaire avec ou sans prise en compte de l'humification. Les principales tendances décrites ici pour les versions H_1P_0 et H_1P_1 seront généralisées aux versions sans activation de l'humification.

Augmentation de la concentration initiale de DOC

Modèle sans intégration de l'état physiologique (P_0) L'augmentation de la concentration de DOC accélère sa consommation par les bactéries en écourtant le temps de latence. L'épuisement de la ressource est en général atteint avant trois jours et la probabilité d'obtenir des scénarios où la consommation est incomplète à dix jours tend vers zéro. L'initiation anticipée de la croissance quand DOC_0 est élevé s'explique par la place de DOC dans l'équation de Monod (équation 1.47). Plus DOC est grand devant k_{DOC}, plus $\frac{DOC}{DOC+k_{DOC}}$ est proche de 1 et plus l'effet multiplicateur de v_{DOC} domine. Les autres transformations bactériennes sont avancées dans le temps, mais pas stimulées à la manière du flux de prélèvement (figure 3.12).

La sensibilité du modèle aux différents facteurs n'est pas altérée par l'augmentation de la concentration initiale de substrat (figure 3.11b). Le paramètre k_{DOC} notamment reste très peu sensible malgré le changement du niveau de concentration du substrat.

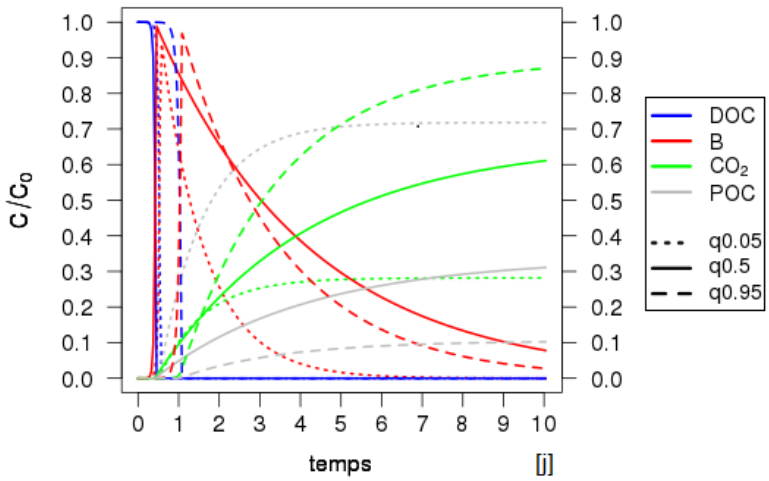


FIGURE 3.12 – **Effet de l'augmentation de la concentration initiale de substrat sur la cinétique de biodégradation** pour la version H_1P_0 du modèle.

Modèle avec intégration de l'état physiologique (P_1) Comme pour les versions P_0, l'augmentation de DOC_0 réduit la probabilité d'occurrence des scénarios caractérisés par une concentration de DOC non nulle, à trois et dix jours.

Les distributions des variables B et CO_2 à trois et dix jours sont modifiées lorsque la concentration initiale de substrat est accrue. Les distributions se rapprochent d'une loi normale à trois jours, comme pour les versions où l'état physiologique (R) n'est pas impliqué (figure 3.11a). Contrai-

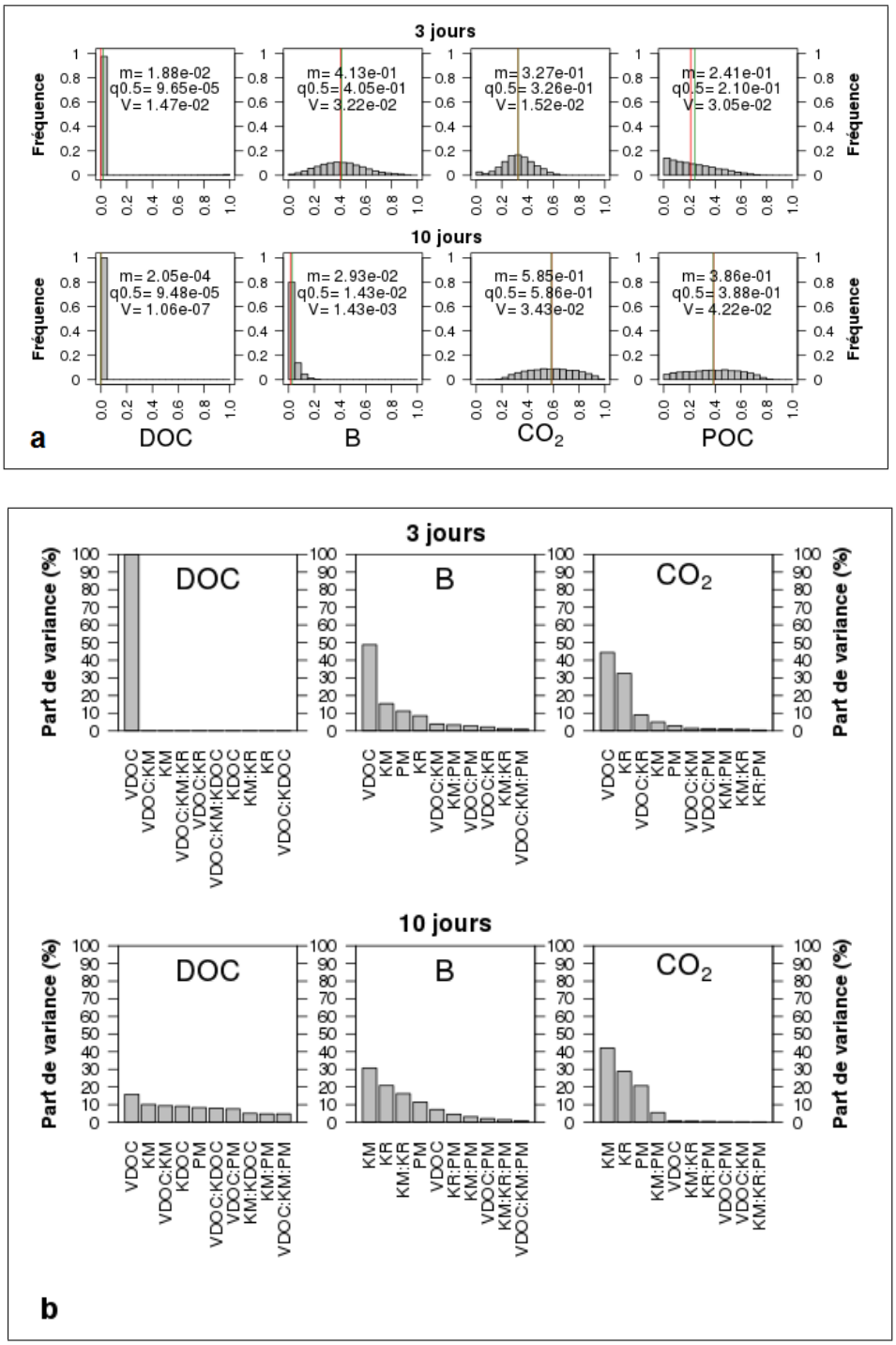
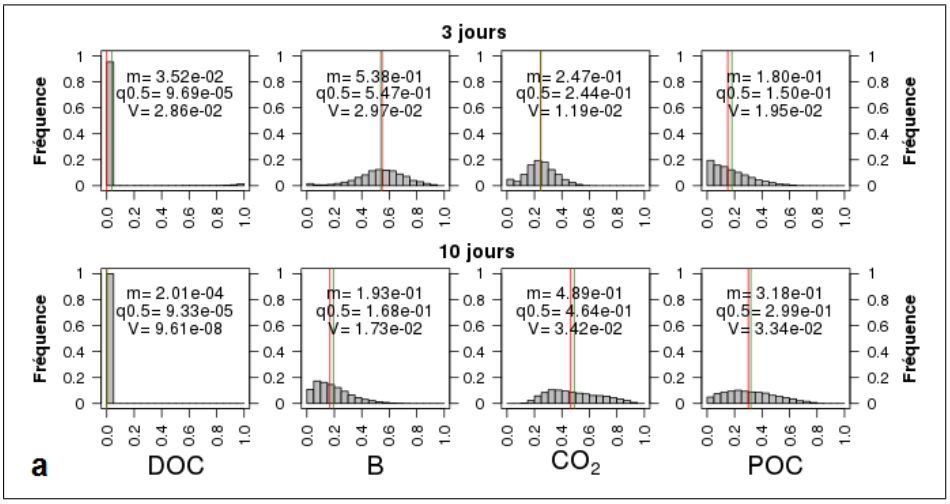


FIGURE 3.11 – **Effet de l'augmentation de la concentration initiale de substrat sur les distributions des variables de sortie** (a) **et sur la sensibilité** (b) du modèle pour la version H_1P_0 du modèle.



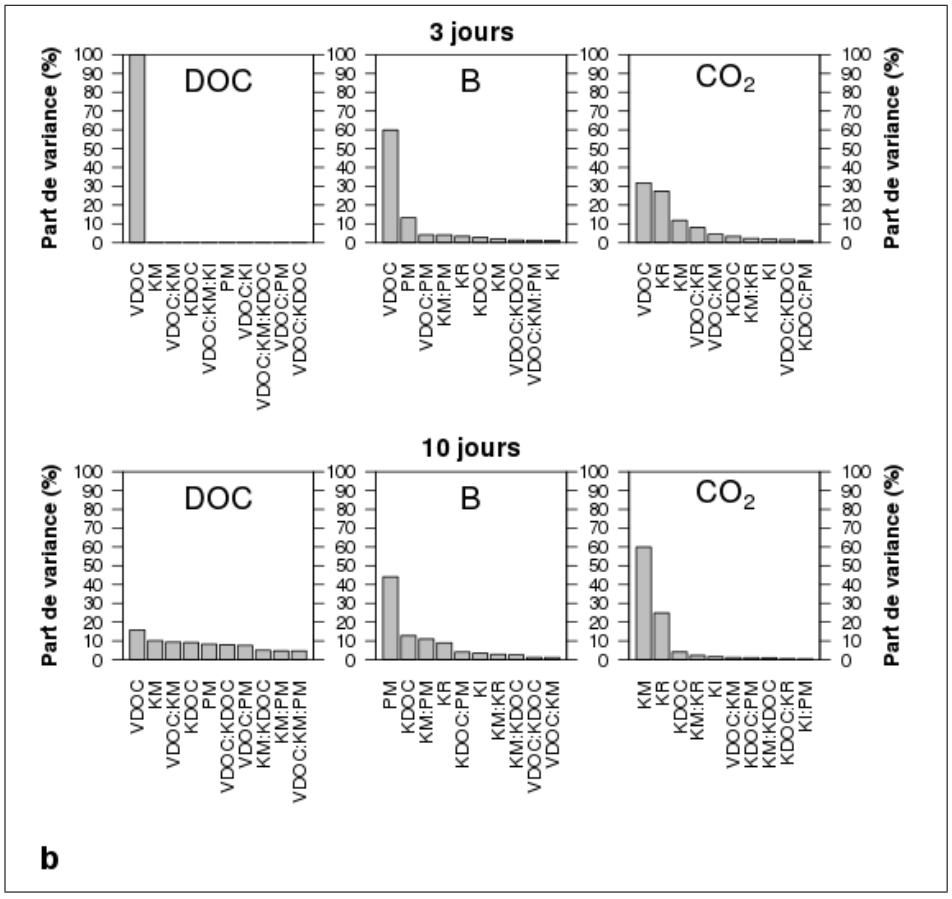


FIGURE 3.13 – **Effet de l'augmentation de la concentration initiale de substrat sur les distributions des variables de sortie** (a) **et sur la sensibilité** (b) du modèle pour la version H_1P_1

.

rement à ce qui avait été observé pour les conditions initiales d'origine (figure 3.5a), les valeurs moyennes de B et CO_2 évoluent nettement au cours du temps : B diminue de 0,54 à 0,19 et CO_2 augmente de 0,25 à 0,49 entre trois et dix jours, en moyenne. La production moyenne de POC est de 0,32 au bout de dix jours.

La concentration de DOC détermine l'état physiologique tout au long de la simulation et affecte directement le calcul de tous les flux. R opère une régulation asymétrique selon DOC : la régulation est nulle si DOC est suffisamment grand devant les constantes de saturation et d'inhibition (k_{DOC} et k_i). Quand ce n'est pas le cas, la limitation des flux par R s'amplifie à mesure que DOC diminue. Le niveau moyen de R est considérablement augmenté lorsque DOC_0 est élevé (figure 3.14). La prise en compte de l'état physiologique affecte donc moins le comportement du modèle lorsque l'apport initial de substrat est abondant.

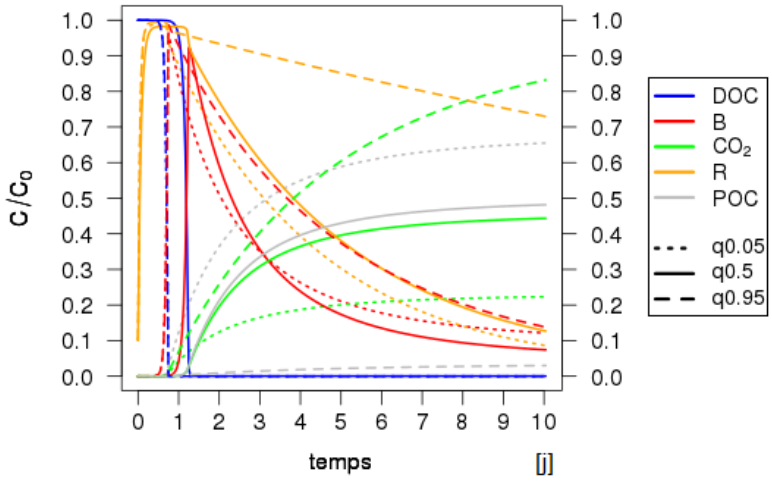


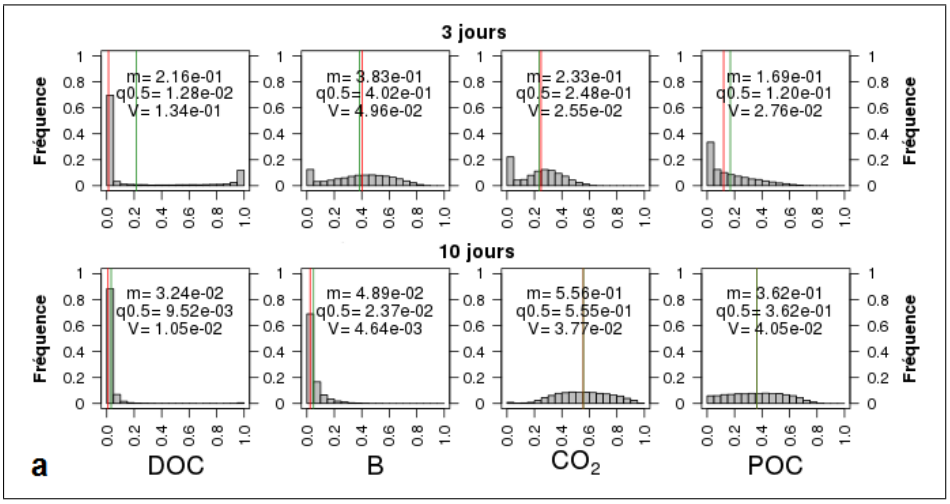
FIGURE 3.14 – **Effet de l'augmentation de la concentration initiale de substrat sur la cinétique de biodégradation** pour la version H_1P_1 du modèle.

On notera que le niveau de la ressource en fin de simulation, bien qu'apparemment très faible exprimé en concentration relative, reste suffisant pour que la biomasse conserve un niveau d'activité élevé (figure 3.14). La biomasse décline donc jusqu'à la fin, sous l'effet de flux sortant intenses, comme dans les versions P_0 du modèle.

Pour les versions prenant en compte l'état physiologique, l'influence de k_i, qui s'était montrée déterminante pour une concentration initiale plus faible, devient anecdotique (figure 3.13b). La partition de la variance de B s'avère étonnante. Le coefficient de partage p_m est important dès trois jours et devient le facteur dominant (contribution à la variance de 43%), suivi de k_{DOC} qui jusqu'à maintenant ne s'exprimait pas (contribution de 10%). Pour CO_2, k_m devient dominant, expliquant plus de la moitié de la variance (60%) et surpassant largement la contribution de k_r (25%). La faible influence des paramètres réglant R confirme l'atténuation déjà commentée de l'effet de l'état physiologique en cas de concentrations élevées. Cette neutralisation de l'état physiologique favorise l'expression d'autres processus. Le partage entre recyclage et humification apparaît ici essentiel, à en juger par la sensibilité du modèle aux paramètres p_m et k_m.

Diminution de la concentration initiale de DOC

Modèle sans intégration de l'état physiologique (P_0) La distribution de DOC à trois jours est caractérisée par un regroupement des valeurs dans les deux classes extrêmes (figure 3.15a) : la classe [0 - 0,05] et [0,95 - 1] comptent respectivement 70% et 10% des effectifs. Les distributions de B et CO_2 sont marquées par la fréquence élevée de la classe [0 - 0,05]. Les scénarios caractérisés par



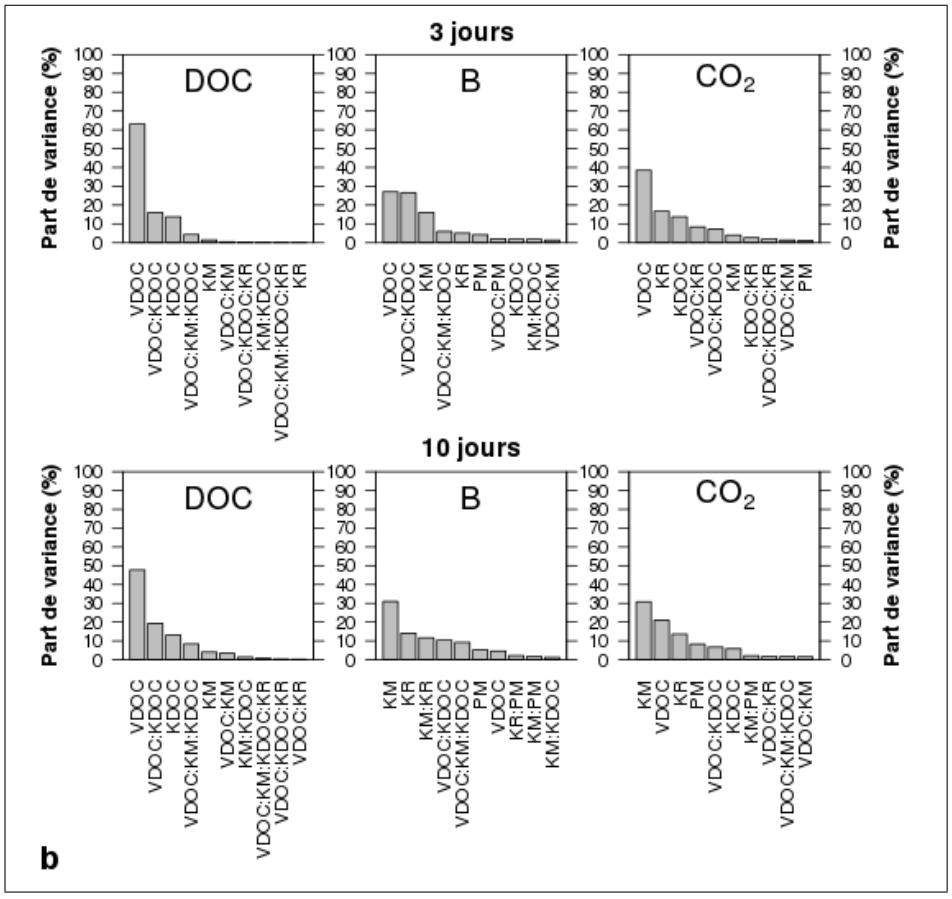


FIGURE 3.15 – **Effet de la diminution de la concentration initiale de substrat sur les distributions des variables de sortie** (a) **et sur la sensibilité** (b) du modèle pour la version H_1P_0

.

les valeurs ($DOC \to 1,\ B \to 0,\ CO_2 \to 0$) représentent des cas où le démarrage de la croissance n'a pas eu lieu ou pour lesquels la croissance n'est pas finie. A dix jours, les valeurs se concentrent dans la première classe $[0-0,05]$ mais aussi dans les classes voisines [0,05 - 0,2]. Les distributions de B et CO_2 à dix jours sont proches de celles qui étaient obtenues avec des concentrations initiales de substrat supérieures. Les valeurs de CO_2 sont équitablement réparties entre les différentes classes de 0,2 à 1 avec une moyenne est de 0,56. La valeur moyenne de POC est de 0,36. Les valeurs de B restent majoritairement localisées dans l'intervalle [0 - 0,2].

La diminution de DOC_0, comme son augmentation, affecte la cinétique en jouant sur le calcul du prélèvement dans les versions P_0. Lorsque la concentration de DOC est petite devant k_{DOC}, le terme de l'équation de Monod ($\frac{v_{DOC}DOC}{k_{DOC}+DOC}B$), la vitesse de prélèvement est réduite. Alors que l'acquisition de carbone par les bactéries est limitée par la concentration de substrat, les pertes de C ne sont fonction que de B et ne sont donc pas directement régulées par DOC. Lorsque jusqu'alors DOC_0 était suffisamment élevé, la vitesse de prélèvement était très rapide comparée aux vitesses de mortalité et de respiration, ce qui causait un épisode de croissance très intense et très bref, succédé par un épisode de déclin (voir par exemple les figures 3.6 et 3.17). Dans le cas présent où la concentration DOC_0 est plus faible, la différence de vitesse entre le gain et les pertes de C tend à s'estomper. Les flux sortant ne sont alors plus négligeables devant le flux de prélèvement, et ce dès l'initiation de la croissance. L'augmentation de la biomasse est donc plus lente et plus restreinte (la valeur maximum de B s'éloigne de 1). La respiration et l'accumulation de POC deviennent conséquentes simultanément à l'augmentation de B.

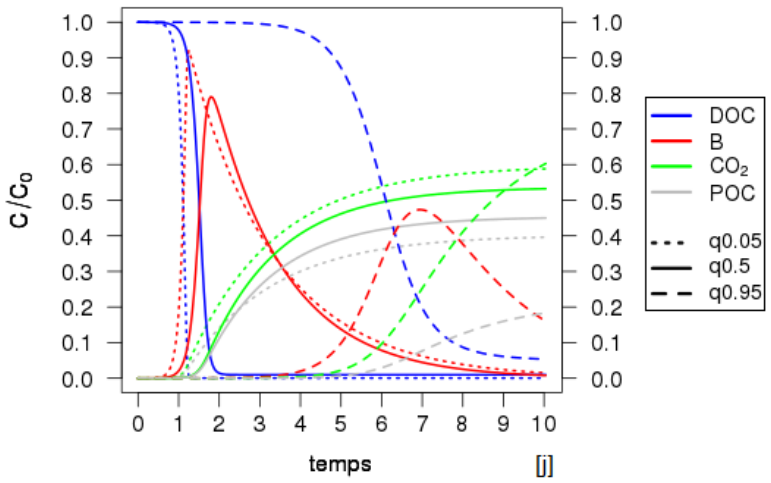


FIGURE 3.17 – **Effet de la diminution de la concentration initiale de substrat sur la cinétique de biodégradation** pour la version H_0P_1 du modèle.

Le contrôle considérable de DOC par v_{DOC} observé pour des concentrations initiales non limitantes diminue alors que k_{DOC} gagne en influence (figure 3.15b). v_{DOC} reste le premier facteur explicatif de la variance de DOC (63% et 47% à trois et dix jours). k_{DOC} a une contribution non négligeable en effet principal (15% à trois et dix jours) et en interaction avec v_{DOC} (16 et 15% à trois et dix jours).

La variance de B et CO_2 ne connait pas de changement conséquent avec la diminution de DOC_0, hormis l'apparition de k_{DOC} dans les facteurs explicatifs. La variance est répartie entre la contribution de plusieurs facteurs, déterminant à la fois le prélèvement (v_{DOC}, k_{DOC}) et les autres flux (k_m, k_r notamment).

Il apparaît donc ici que l'influence de k_{DOC} est liée à la concentration initiale de substrat. Le fait que plusieurs facteurs interviennent (v_{DOC}, k_{DOC}, $v_{DOC} : k_{DOC}$) explique la variabilité accrue

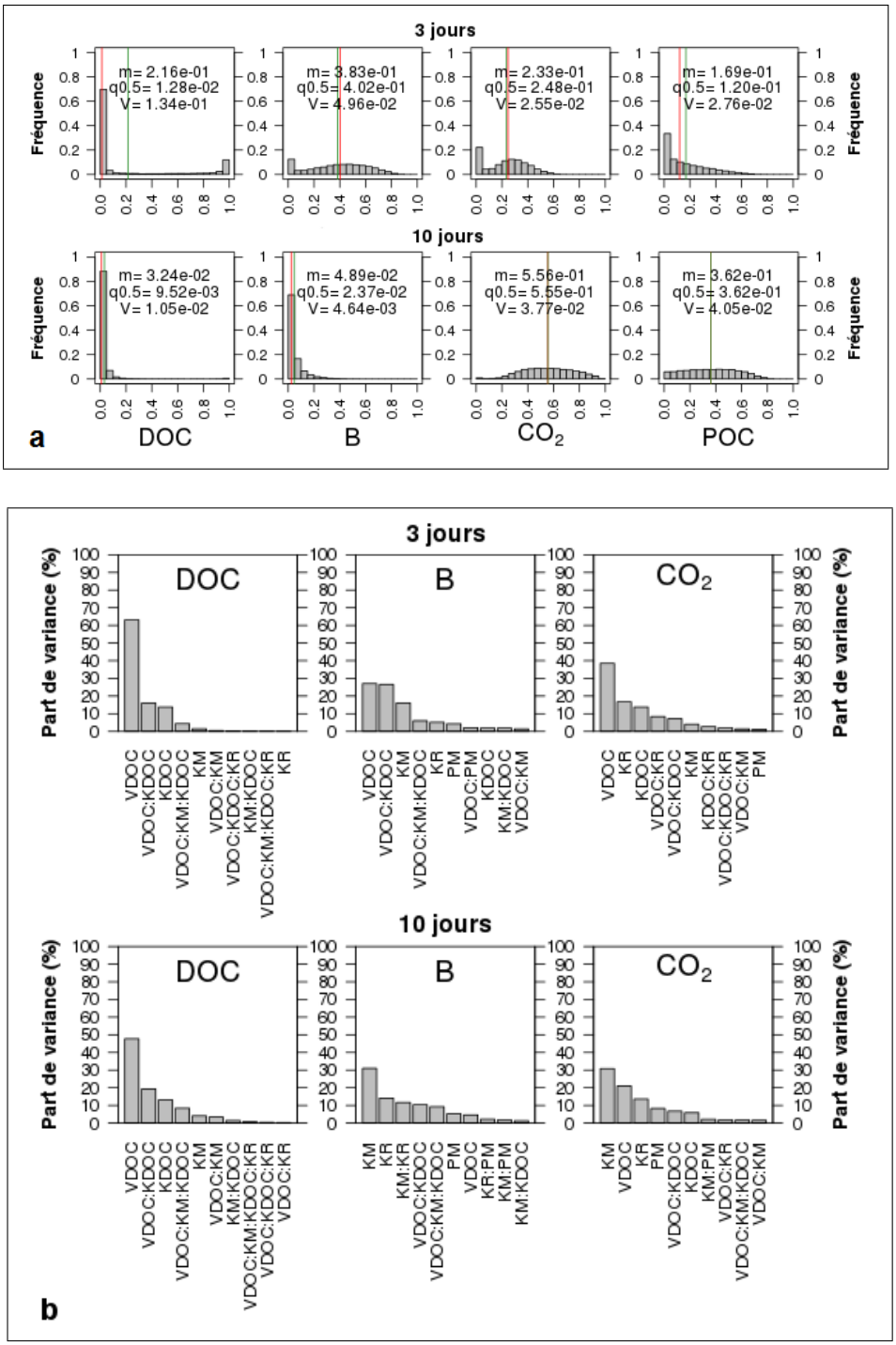
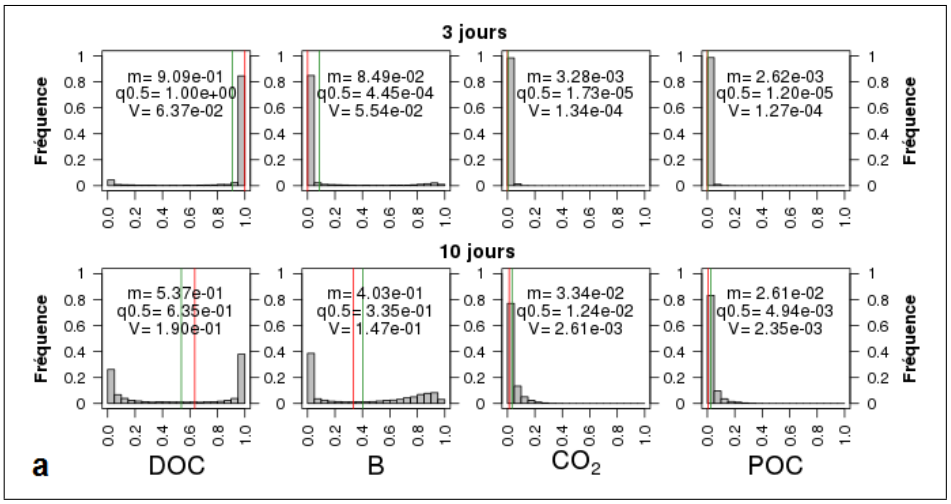


FIGURE 3.16 – **Effet de la diminution de la concentration initiale de substrat sur les distributions des variables de sortie** (a) **et sur la sensibilité** (b) du modèle pour la version H_0P_1.



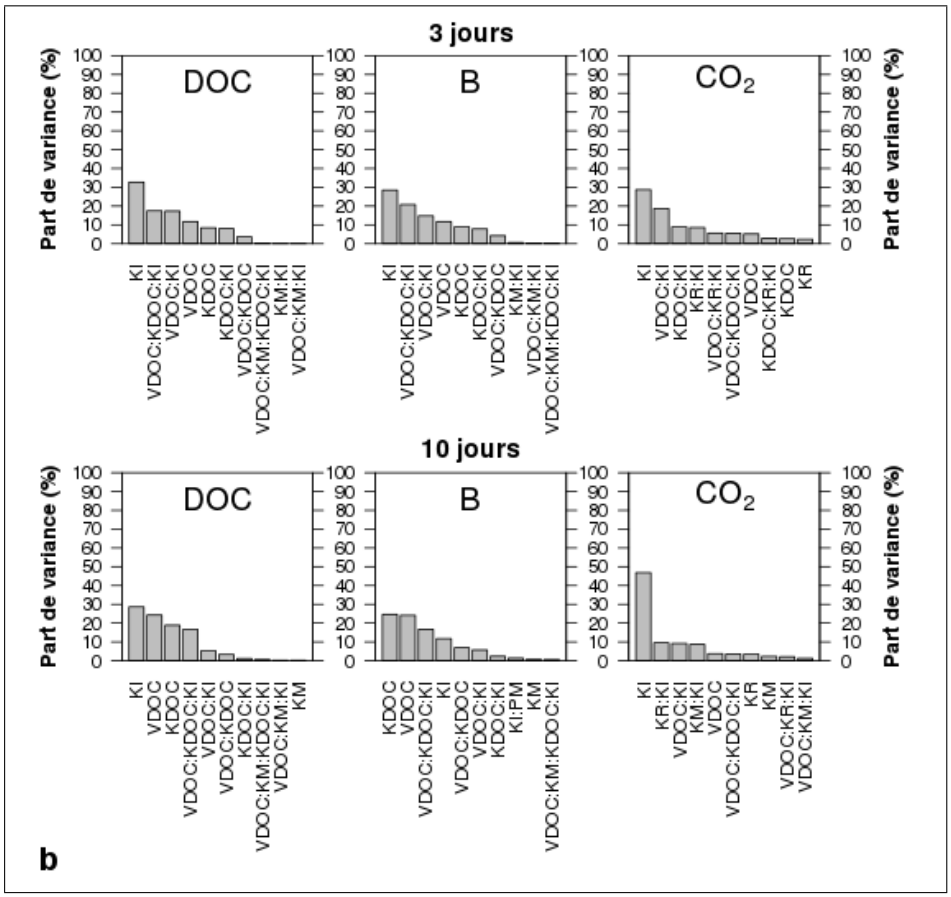


FIGURE 3.18 – **Effet de la diminution de la concentration initiale de substrat sur les distributions des variables de sortie** (a) **et sur la sensibilité** (b) du modèle pour la version H_1P_1.

sur DOC par rapport à une situation de contrôle absolu par le seul paramètre v_{DOC}.

Modèle avec intégration de l'état physiologique (P_1) La réponse du modèle lorsque l'état physiologique est activé est drastiquement altérée par la diminution de la concentration initiale de substrat (comparer les figures 3.9a et 3.18a). A trois jours, les classes $[0,95-1]$ de DOC et $[0-0,05]$ de B comptent 85% des effectifs (figure 3.18a). Les scénarios caractérisés par la combinaison ($DOC \to 1,\ B \to 0,\ CO_2 \to 0$) indiquant l'absence de démarrage de la croissance sont donc majoritaires. A dix jours, les classes $[0,95-1]$ de DOC et $[0-0,05]$ de B comptent encore 38% des effectifs. Une proportion considérable de scénarios montrent donc une cinétique nulle. La classe extrême opposée est la deuxième plus fréquente (26% des effectifs). Les classes intermédiaires sont peu représentées. Cette distribution bimodale maximise la variance de DOC (de l'ordre de 10^{-2}). B obtient une variance similaire ainsi qu'une distribution bimodale comme DOC. La production de CO_2 est toujours faible, comprise entre 0 et 20% du carbone initial, 3% en moyenne. La valeur moyenne de POC est aussi de 0,03 à dix jours.

Comme dans les versions P_0, la période de latence et la vitesse de la croissance sont altérées (augmentation de la durée moyenne et de la variabilité). La vitesse de prélèvement est même parfois tellement faible qu'elle empêche toute croissance (par exemple, le scénario q0.05 de la figure 3.19). Lorsque la croissance est permise, elle peut s'échelonner sur plusieurs jours. Les autres flux bactériens (mortalité, respiration) deviennent quantitativement importants quand B est elle-même importante, c'est-à-dire après avoir fait considérablement baisser la concentration de DOC. L'activité est alors au plus bas, résultant toujours en un déclin très lent et limité de la biomasse et une production de CO_2 et de POC négligeable.

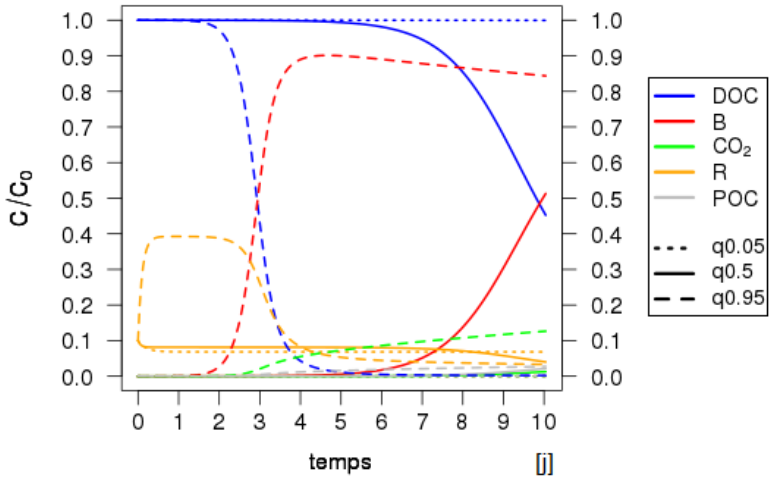


FIGURE 3.19 – **Effet de la diminution de la concentration initiale de substrat sur la cinétique de biodégradation** pour la version H_1P_1 du modèle.

L'état physiologique (R) est faible dès le début de la cinétique (figure 3.19). La répression des flux est donc forte tout au long de la cinétique. Le flux de prélèvement, jusqu'alors peu affecté par la régulation de R est ici doublement limité, par le biais de l'équation de Monod (1.47) et par le calcul de l'état physiologique (1.51). Les flux sortant de la biomasse, sont comme dans les autres situations régulés par une faible activité.

Une faible concentration initiale de substrat ne change pas le comportement du modèle en nature, mais en rythme. Ainsi, toutes les tendances précédemment décrites sont retrouvées mais se déroulent sur une période plus longue. La grande variabilité observée dans les distributions des sorties provient de l'étalement dans le temps plus ou moins long de chaque étape de la cinétique

(latence, croissance, dormance ou déclin limité de la biomasse).

L'emprise importante de l'état physiologique s'exprime au travers de la sensibilité importante des trois variables aux paramètres k_i, v_{DOC} et k_{DOC} (figure 3.18b). k_i est souvent le premier facteur explicatif de la variance des sorties à trois et dix jours, alors son influence était devenue négligeable lors l'augmentation de DOC_0 (figure 3.13b). Sa contribution avoisine 30% des variances de chacune des trois variables à trois jours et de celle de DOC à dix jours. Son effet devient dominant pour CO_2 à dix jours (45% de part de variance). k_i affecte aussi la variabilité des sorties à travers de nombreuses interactions, notamment avec v_{DOC} et k_{DOC} à trois jours. v_{DOC} et k_{DOC} ont aussi une importance conséquente en tant que facteurs seuls : chacun compte pour environ 20% de la variance pour DOC et B. Les autres paramètres (k_m, k_r, p_m) sont très peu représentés, et seulement en interaction avec k_i.

3.4 Discussion

Le travail présenté dans ce chapitre a permis d'acquérir une vision d'ensemble des réponses possibles du module de biodégradation en conditions homogènes, reflétant la variabilité imputée à la physiologie bactérienne et aux sources d'incertitudes associées (méconnaissance des mécanismes, difficultés d'investigation par des moyens expérimentaux, différence d'échelle entre l'application du modèle et les données ayant servi à la détermination des paramètres utilisés, *etc.*). Les doutes concernant la structure du modèle et la gamme de validité des paramètres nécessitaient l'emploi de méthodes globales, capables d'explorer le plus exhaustivement possible l'espace des paramètres supposé.

Nous avons particulièrement mis l'accent sur l'étude de la structure du modèle, en testant différentes options. Notre modèle se caractérise par : le flux de prélèvement du substrat soluble par la biomasse calculé selon une cinétique de Monod (équation 1.47), des flux de mortalité (équation 1.49) et de respiration (équation 1.48) tous deux fonction de premier ordre de la biomasse. Deux processus supplémentaires peuvent être simulés facultativement dans le but de rendre le modèle plus mécaniste : le contrôle du rythme des transformations par l'état physiologique des bactéries fonction de l'abondance du substrat (équation 1.51) et le partage du flux de mortalité en une partie soluble recyclée et une partie insoluble humifiée 1.50. L'analyse des incertitudes a permis d'évaluer le niveau d'incertitudes des sorties du modèle, selon quatre versions différentes (avec aucun, l'un ou l'autre, ou les deux processus optionnels impliqués) et dans des conditions initiales contrastées. L'analyse de sensibilité a permis quant à elle d'identifier le poids des différents paramètres dans ces incertitudes, pour mieux comprendre le fonctionnement du modèle et apporter des indications utiles en vue d'une étape d'estimation de ces paramètres.

Niveau d'incertitudes des variables de sortie Les trois variables de sortie (DOC, B et CO_2) présentent des niveaux d'incertitudes différents aux deux dates de sortie étudiées (trois et dix jours). A part en cas de concentrations initiales de substrat limitantes, les incertitudes sur DOC sont plus faibles que sur B et CO_2 aux dates étudiées. La plupart de scénarios aboutissent en effet à la consommation de tout le substrat en moins de trois jours. Le module de biodégradation faisant ici à lui seul l'objet d'une étude détaillée a été créé pour fonctionner au sein d'un modèle spatialisé. Le travail présenté dans le chapitre 2 a révélé un impact important des conditions environnementales sur les valeurs de DOC.

La figure 3.20 illustre la distribution des sorties pour 27 scénarios obtenus avec un même paramétrage du module biologique mais des conditions physiques différentes. La structure du module est celle de la version H_0P_1 (avec activation de l'état physiologique et sans humification). La distribution de DOC se démarque nettement des résultats des simulations Monte-Carlo obtenues dans le présent chapitre, par la représentation importante des valeurs intermédiaires et l'étendue des

valeurs, couvrant tout l'intervalle [0 - 1] (figure 3.20). Les incertitudes liées à la physiologie se manifestent surtout par l'occurrence de scénarios très rares où la cinétique est trop lente pour que le substrat soit entièrement consommé. La variabilité des valeurs de DOC est donc considérablement réduite par rapport à la variabilité provenant de l'hétérogénéité spatiale. Le niveau d'incertitudes du module de biodégradation est donc acceptable par rapport aux objectifs de cette thèse, concernant la variable DOC. Tel n'est pas le cas pour les deux autres variables d'intérêt qui ont montré une dispersion importante dans presque toutes les situations analysées. Ces résultats renforcent l'une des conclusions du chapitre 2 : ils nous offrent l'occasion de réaffirmer l'intérêt de suivre DOC plutôt que CO_2 comme variable indicatrice de l'effet de l'hétérogénéité spatiale sur la cinétique de biodégradation.

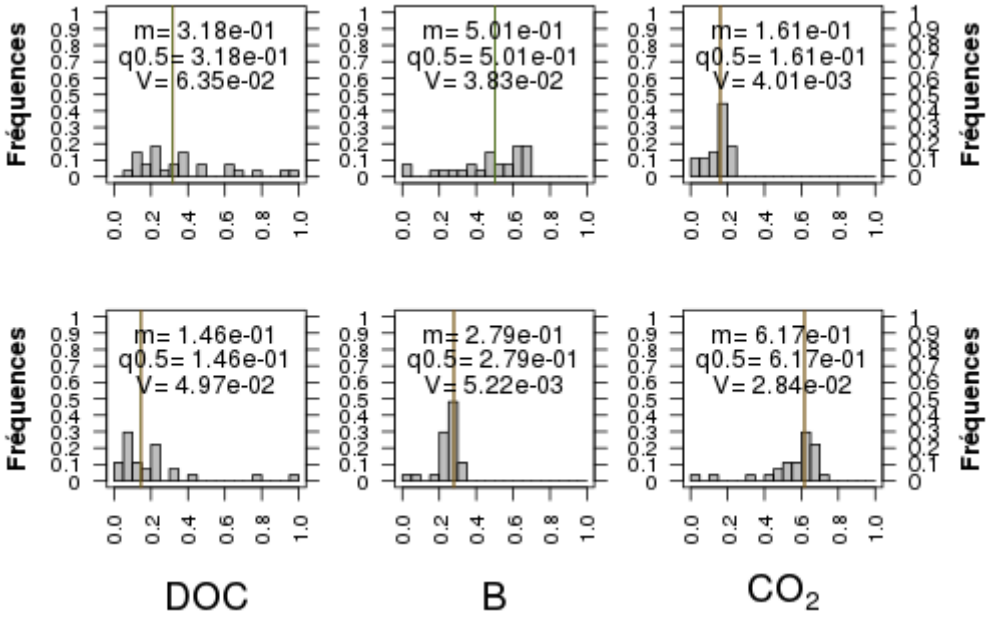


FIGURE 3.20 – **Distribution des sorties pour les scénarios faisant varier les facteurs physiques en milieu hétérogène**, dans le cadre du travail du chapitre 2 sur l'étude de l'impact de la structure sur la dynamique de biodégradation.
Les sorties à trois et dix jours sont présentées en haut et en bas, respectivement.

Impact de l'intégration de l'état physiologique et du processus d'humification sur les incertitudes Les quatre versions du modèle se distinguent quant aux distributions et au niveau d'incertitudes de B et CO_2. La version dite minimale du modèle, sans prise en compte de l'état physiologique ni de l'humification obtient la plus faible variabilité des réponses. Les scénarios montrent tous la même tendance (déclin de la biomasse et accumulation importante de CO_2) et montrent à dix jours une faible dispersion des valeurs. Cette variabilité réduite (par rapport aux autres versions) s'explique par le petit nombre de degrés de liberté (4 paramètres incertains, contre 5 ou 6 dans les autres versions) et la dominance de la sensibilité par deux paramètres seulement v_{DOC} (la vitesse maximale de prélèvement de Monod) et k_r (le taux de respiration).

Le comportement du modèle est radicalement changé lorsque le contrôle de la dynamique par une nouvelle variable, l'état physiologique R est simulé. Des tendances opposées se dessinent par rapport au simple contrôle par l'équation de Monod avec une partition finale du carbone caractérisée en général par une biomasse élevée et un cumul de CO_2 faible. La variabilité est amplifiée, les valeurs s'étalant cette fois sur tout l'intervalle [0 - 1]. L'état physiologique réprime l'ensemble des flux avec une ampleur croissante à mesure que la teneur en substrat diminue. Comme, en

conditions homogènes, rien n'entrave la consommation du substrat, les scénarios aboutissent immanquablement à son épuisement, induisant une réduction extrême de l'état physiologique des bactéries lorsqu'il est calculé. Les conditions homogènes pour lesquelles le comportement du modèle est observé, pourraient donc biaiser l'interprétation faite de l'impact de l'état physiologique sur la cinétique de biodégradation du substrat. La répression intense en fin de cinétique se manifeste par la dominance de deux des trois paramètres réglant l'état physiologique : k_i la constante d'inhibition de l'état physiologique et v_{DOC} la vitesse maximale de prélèvement selon Monod (k_{DOC}, la constante de saturation de Monod n'a d'influence qu'en cas de conditions initiales limitantes).

Intégrer le processus d'humification ajoute une nouvelle variable, mais cette variable n'a pas un rôle central dans la dynamique comme l'état physiologique R. La variable en question est un nouveau pool (POC pour carbone organique particulaire). Le carbone insoluble résulte du partage (selon le coefficient p_m) du flux de mortalité en une partie soluble (DOC) ré-assimilable par les bactéries, et une partie insoluble mise à l'écart de la biodégradation (POC). L'humification affecte l'évolution de la biomasse en déterminant les quantités de carbone « recyclé ». La distribution de POC et l'effet de l'humification sur les autres variables (DOC, B et CO_2) changent radicalement selon l'activation ou non de l'état physiologique. Sans R, l'intégration de l'humification tend à accélérer le déclin de la biomasse en concurrençant le recyclage. Le carbone se partage principalement entre POC et CO_2, selon l'ajustement de k_m, le taux de mortalité, p_m et k_r qui sont d'ailleurs les trois paramètres les plus influents en fin de simulation pour B et CO_2. La variabilité est très grande et des valeurs de CO_2 et POC anormalement élevées peuvent être observées ($POC \to 1, CO_2 \to 0$ ou $POC \to 0, CO_2 \to 1$). Une production bien plus limitée de l'une est l'autre de ces pools a lieu lorsque l'état physiologique réprime les flux de mortalité et de respiration lorsque le substrat est rare. Enfin, une légère altération de l'évolution de R par la modulation de l'apport de carbone recyclé semble avoir lieu lorsque les concentrations de substrat deviennent limitantes.

Effet des conditions initiales sur la réponse du modèle Les conditions initiales des simulations se sont révélées avoir un impact considérable sur le comportement du modèle, lorsque les teneurs en substrat apportées sont limitantes. A nouveau, la nature de cet effet dépend de l'activation ou non de l'état physiologique. Sans R, le contrôle par la faible concentration de substrat de la cinétique de Monod tend à rallonger la latence, et à réduire la croissance. Cet effet est attribué à la diminution de l'écart entre les vitesses des flux de C entrant et sortant de la biomasse, du fait de la limitation du prélèvement de DOC du fait de sa rareté. Le rôle de k_{DOC}, négligeable en d'autres circonstances, devient essentiel pour gérer les cas de conditions initiales défavorables. Lorsque l'état physiologique est impliqué, son puissant contrôle s'exerce de manière homogène sur tous les flux, dès le début de la simulation. En conséquence, l'évolution observée dans des conditions plus favorables se déroule au ralenti mais n'est pas foncièrement altérée, conduisant à un temps d'évolution et à un partage souvent irréaliste du carbone entre les différents pools (B proche de 1, CO_2 et POC cumulés négligeables). Le contrôle excessif et inadapté de l'état physiologique résulte de l'inadéquation entre les valeurs initiales et les distributions des paramètres, notamment les constantes de saturation k_{DOC} et k_i. Il pourrait suggérer un domaine de validité limité concernant les concentrations initiales. Le modèle, lorsqu'il intègre l'état physiologique, serait donc peu adapté pour représenter la grande variabilité des teneurs en nutriments rencontrées dans le sol. Cependant, il se peut que cette incohérence entre paramètres et concentrations initiales soit le fruit d'erreurs d'estimation des distributions de paramètres.

Perspectives concernant la paramétrisation du modèle Plusieurs conséquences pratiques peuvent être tirées de nos résultats : L'estimation précise des paramètres n'est pas strictement requise si le module de biodégradation est employé selon sa vocation première — étudier l'effet de l'hétérogénéité spatiale sur la dynamique de biodégradation – et que seule la variable DOC est

suivie en tant qu'indicateur. Si l'on est intéressé par un suivi temporel précis de la biodégradation d'un composé (par exemple un polluant organique), il sera nécessaire de raffiner la paramétrisation du modèle. L'effort pourra se concentrer sur le paramètre v_{DOC} dont la sensibilité est dominante pour la variable DOC. Enfin, si l'on est intéressé par le suivi du fonctionnement biologique dans son ensemble, il faudra aussi estimer les autres paramètres influents en dehors de v_{DOC}.

L'emploi du modèle sans prise en compte de l'état physiologique, plus simple dans son fonctionnement, peut s'avérer avantageux. Le contrôle central de la cinétique par le niveau d'activité complexifie considérablement la réponse du modèle et laisse beaucoup d'inconnues suite à ce premier travail, reposant sur une connaissance restreinte concernant la cohérence des différents formalismes entre-eux et le domaine de validité du modèle.

Réflexion sur les fondements et les améliorations possibles de la structure du modèle biologique En plus d'évaluer la variabilité des réponses du modèle et de fournir des renseignements pour préparer l'étape d'estimation des paramètres, étudier le comportement du modèle de manière approfondie a permis de questionner la pertinence des processus décrits et celle de notre manière de les représenter dans le modèle.

Avec les quatre versions du modèle testées, la séquence classique de latence – croissance exponentielle – déclin de la biomasse est presque toujours respectée. Sauf cas extrêmes et conditions initiales particulières, la phase de croissance est courte (de l'ordre de quelques heures) et conduit à l'assimilation de tout le substrat disponible par la biomasse. Les bactéries connaissent donc un changement radical en termes de disponibilité de la ressource, alors que la diffusion réduite dans le cas de milieux poreux hétérogènes tendait à ralentir la disparition du substrat (voir chapitre 2). Le déclin de la biomasse qui suit est plus ou moins prononcé selon la version du modèle et la combinaison des valeurs de paramètres. Le comportement du modèle diffère particulièrement à cet égard selon l'activation ou non de l'état physiologique.

Si l'état physiologique est négligé, les flux sortants de la biomasse (respiration et mortalité) excédant le flux de prélèvement causent une décroissance illimitée de la biomasse. Les quantités de biomasse sont faibles en moyenne au bout de dix jours, parfois nulles. La majorité du carbone a été converti en CO_2 , et éventuellement en carbone organique insoluble (POC) quand l'humification est modélisée. Ce processus tend d'ailleurs à accélérer le déclin de la biomasse. En effet, il concurrence le phénomène de recyclage microbien, en limitant les quantités de carbone assimilable restituées via le flux de mortalité. Moyennant un ajustement approprié des paramètres induisant la décroissance de la biomasse à un rythme modéré, le modèle sans prise en compte de l'état physiologique peut constituer une approximation satisfaisante pour une incubation en milieu contrôlé, où le substrat est apporté en une seule fois, en début d'incubation. En revanche, dès lors que la biomasse vient à s'annuler, il devient incapable à reproduire un épisode de croissance ultérieur. Il est donc peu adapté pour décrire un système caractérisé par la fluctuation du niveau de ressource tel que le sol.

Lorsque l'état physiologique est considéré, l'épuisement du substrat en fin de croissance exponentielle cause la diminution plus ou moins aiguë du niveau d'activité. Les flux sortants (respiration, mortalité) sont alors réduits, entraînant un déclin ralenti de la biomasse, voire la stagnation de ce pool à une valeur proche de la totalité du carbone dans le milieu. La chute de l'état physiologique laisse très souvent apparaître une situation paradoxale où la biomasse est à la fois très abondante et dormante, alors qu'une biomasse abondante est généralement associée à une activité métabolique intense et que la dormance correspond à un état physiologique de subsistance pour des populations microbiennes amoindries du fait de conditions défavorables [Konopka, 1999; Wang et al., 2014]. Il résulte de cela une très faible production de CO_2 (et éventuellement de POC). L'accumulation de CO_2 et de POC, très basse durant la phase de croissance ne progresse pas ou très peu pendant le reste de la simulation. La transition brutale du statut d'activité, ainsi que les valeurs très élevées de B et très faibles des valeurs cumulées de CO_2 (et éventuellement de POC) s'expliquent par

deux raisons. D'une part les flux sortant de la biomasse mobilisent peu de carbone pendant la période de croissance, d'autre part le contrôle puissant et non sélectif par l'état physiologique ne permet pas à un flux important de mortalité de prendre place lorsque le substrat devient rare. A l'opposé, le contrôle de l'état physiologique peut s'avérer insuffisant pour empêcher le déclin illimité de la biomasse, lorsque la valeur de k_i est faible au regard du niveau de concentration. L'état physiologique reste alors relativement élevé tout au long de la simulation. Dans les versions du modèle présentées, il n'existe en effet aucun mécanisme pour empêcher ou tempérer l'une ou l'autre de ces tendances extrêmes : stockage ou déstockage massif du carbone de la biomasse.

Pendant la période d'activité intense aboutissant à la croissance, la respiration semble sous-estimée : le cumul est souvent insignifiant au moment où la biomasse termine sa phase de croissance exponentielle. La multiplication de la biomasse telle qu'elle est observée expérimentalement mobilise toute l'énergie disponible pour soutenir la synthèse de nouvelles cellules à un rythme élevé. Cette activité métabolique intense se traduit nécessairement par un dégagement de CO_2 intense. Cette évidence peut être formalisée dans les modèles par la distinction entre une respiration de croissance et une respiration de maintenance [Wang et Post, 2012]. La respiration de croissance peut être modélisée sous la forme d'un rendement d'assimilation (Y) proportionnel au flux de prélèvement du substrat. La respiration de maintenance consiste en un flux proportionnel à la biomasse à un taux réduit. L'émission de CO_2 est d'ailleurs calculée ainsi dans les modèles de Blagodatsky et Richter [1998] et de Ingwersen et al. [2008] desquels nous avons repris l'expression de l'état physiologique. L'application d'un rendement d'assimilation permettrait peut-être d'une part de simuler une vitesse de respiration en rapport avec l'augmentation de la biomasse. D'autre part, la dépense en carbone accrue pendant la phase d'acquisition de la ressource, en ralentissant l'accroissement de la biomasse, ralentirait peut-être le flux de prélèvement (fonction de B) donc l'épuisement du substrat, évitant ainsi la chute brutale du niveau d'activité à la fin de la croissance.

L'importance respective des phénomènes de mortalité et de la mise en dormance en réaction à un stress est mal connue. Il est possible que les carences nutritives ou la survenue d'un stress modifient le métabolisme (engendrant l'excrétion de métabolites) et causent la mort d'une partie des cellules, c'est-à-dire accroissent la vitesse de mortalité. Certains auteurs ont d'ailleurs adopté une fonction inverse à la quantité de DOC pour exprimer une augmentation de la mortalité en conditions limitantes [Zelenev et al., 2000]. L'application du calcul de l'état physiologique néglige l'effet éventuel de la mortalité, en inhibant tous les flux de manière identique, y compris la mortalité. Une régulation plus sélective des flux par l'état physiologique, plus forte sur la respiration que sur la mortalité par exemple, pourrait être justifiée. Cette solution rejoint la première alternative (formaliser la respiration de croissance) sous certains aspects, car elle module l'intensité de la respiration selon le statut de la biomasse (croissante ou simplement en maintenance). Appliquer une telle mesure permettrait peut-être de ralentir la croissance et surtout d'éviter le blocage apparent de la cinétique causée par la rétention excessive de carbone dans la biomasse. En revanche, le cumul de CO_2 risque d'être sous-estimé, la réévaluation du taux de respiration ne suffisant peut-être pas à engendrer un flux respiratoire massif pendant la seule période de croissance. Enfin, ni l'une ni l'autre de ces alternatives n'empêchent la disparition de la biomasse en fin de cinétique.

Dans une étude sur le rôle de la variation de l'état physiologique, Konopka [1999] distingue deux formes de résistance possibles en réponse à un niveau croissant de privation de substrat. Les microorganismes à l'état « quiescent »connaissent un ralentissement modéré de leur métabolisme lorsque la teneur en ressource est suffisante pour assurer les besoins de maintenance de la biomasse mais trop faible pour soutenir sa croissance. Le passage de l'état de pleine croissance à ce mode de vie ralenti est facilement réversible, car il n'engage pas de dépense énergétique particulière. L'état de dormance est une forme de résistance plus extrême que l'état de quiescence permettant aux cellules d'arrêter leur métabolisme, lorsque le niveau de ressource est trop faible pour satisfaire les besoins cellulaires élémentaires. L'arrêt puis la reprise de l'activité métaboliques impliquent

des transformations importantes. Nous pourrions nous inspirer de cette classification des états d'activité microbienne pour éviter l'extinction de la biomasse en fin de cinétique. Le passage à l'état dormant – caractérisé par l'arrêt de tous les flux — pourrait être traité grâce à un seuil de biomasse atteint lors de son déclin. Il faudrait également réfléchir aux modalités de reprise de l'activité métabolique après la dormance : différée pour prendre en compte le redéploiement de tous les mécanismes cellulaires normaux ? selon une concentration seuil de substrat ? On peut considérer en revanche les transitions entre métabolisme de croissance et métabolisme quiescent soient traitées implicitement via la variable d'état physiologique.

Les possibilités de modification du modèle sont nombreuses. Si l'objectif est de simplifier le modèle et de réduire sa variabilité, nous pourrions envisager d'abandonner le calcul de l'état physiologique et de traiter la dormance uniquement par l'ajout d'un seuil de biomasse. La cinétique uniquement régulée par la loi de Monod ne présente pas un comportement aberrant — même en cas de conditions initiales défavorables – à condition d'imposer une combinaison de paramètres adaptée et d'ajouter un moyen de prévenir l'extinction de la biomasse.

3.5 Conclusion

Le comportement du module de biodégradation de LBioS a été exploré indépendamment des conditions physiques et pour une large variété de valeurs de paramètres mimant la diversité des propriétés physiologiques des bactéries. L'étude a notamment porté sur l'influence de deux processus : l'humification et le calcul de l'état physiologique des bactéries.

L'humification, processus de formation de la matière organique du sol, a montré un effet modeste sur la distribution des sorties. La prise en compte de hydrolyse du carbone insoluble synthétisé, processus négligé dans ce travail mais qui permettrait de rendre remobiliser le carbone, pourrait cependant altérer les tendances observées ici et peut-être donner plus de poids au processus d'humification dans la cinétique.

L'état physiologique a au contraire montré un rôle majeur dans la cinétique de dégradation et dans le niveau d'incertitudes sur les sorties du modèle. Ce processus de régulation a été implémenté pour représenter la dormance, comme moyen pour les bactéries de s'accommoder de la privation temporaire de substrat. Notre manière d'appréhender la dormance permet en effet d'éviter la disparition de la biomasse dans la majorité des cas. Cependant, on assiste très souvent à un blocage presque complet de la cinétique aboutissant à une partition du carbone peu réaliste (biomasse surdéveloppée et respiration cumulée négligeable). Ce phénomène est par ailleurs accentué en cas de concentrations initiales limitantes, ce qui rend alors les sorties du modèle moins pertinentes que lorsque la régulation par l'état physiologique est ignorée.

En dépit des réserves qui peuvent être émises sur la pertinence de notre représentation du fonctionnement bactérien, les incertitudes attribuées au module de biodégradation seul ne peuvent pas masquer la variabilité résultant de l'hétérogénéité des conditions environnementales. La formalisation de l'état physiologique tendrait même plutôt à amplifier la variabilité provenant de l'hétérogénéité spatiale, en renforçant la limitation de la biodégradation en cas d'apport restreint de substrat plutôt qu'en la compensant. Les conclusions sur le fonctionnement du module de biodégradation ne remettent donc pas en cause la pertinence des résultats décrits dans le chapitre 2 sur l'impact de la structure du sol sur la cinétique de biodégradation d'un composé soluble. Elles confirment par ailleurs le choix du pool de DOC comme variable de prédilection pour évaluer la variabilité résultant de conditions abiotiques hétérogènes.

Chapitre 4

Étude expérimentale de la biodégradation en milieux homogènes et structurés

Les modèles peuvent être vus comme des outils pour aider à comprendre et interroger le fonctionnement des systèmes représentés. Toutefois, la pertinence des interprétations des sorties du modèle dépend de celle des informations données en entrée (validité des équations, précision des valeurs de paramètres, *etc.*). Il semblait nécessaire de compléter notre démarche de modélisation par une partie expérimentale. Les expérimentations qui vont être présentées ci-dessous ont pour objectifs de vérifier les hypothèses à la base de notre modèle et de le calibrer. Comme les études traitant des processus mis en jeu à l'échelle d'intérêt dans notre modèle sont relativement rares, une part importante du travail a consisté à mettre au point des protocoles spécialement adaptées à nos questions et contraintes. Les résultats présentés dans ce chapitre peuvent donc être considérés comme provisoires. Ils serviront à discuter de la pertinence des modes opératoires. Nous nous y appuierons pour proposer des améliorations qui permettront plus tard, avec les moyens adéquats, de répondre concrètement aux objectifs de chaque manipulation : paramétrisation ou confrontation entre mesures et simulations.

La définition des paramètres du module de biodégradation demandait tout d'abord d'apporter des éléments de réponse concernant la dépendance des paramètres biologiques à certaines conditions abiotiques. Nous devions plus particulièrement savoir si l'adhésion des bactéries sur un support modifie ou non leur physiologie, nous imposant alors de choisir des paramètres adaptés à un mode de vie sessile ou planctonique. Pour répondre à cette question, nous avons mis en place des incubations en milieu liquide ou en suspension (milieu homogène offrant des surfaces d'attachement pour les bactéries).

Concernant l'objectif de validation, nous avons mis au point une série de manipulations nous inspirant des scénarios simulés dans le chapitre 2. Ces expériences ont été conçues pour pouvoir contrôler les facteurs abiotiques (caractéristiques morphologiques de l'espace poral, régime hydrique, spatialisation du substrat et des décomposeurs) de manière suffisamment précise pour inférer le rôle des différents processus à l'œuvre (diffusion du substrat, consommation par les bactéries) et à une échelle relativement fine (millimétrique). Les facteurs structuraux précédemment énoncés (morphologie des pores, teneur en eau, distribution du substrat et des décomposeurs) ne sont malheureusement pas aussi faciles à contrôler matériellement que virtuellement. Nous avons donc décidé de ne faire varier qu'un seul des facteurs (la saturation en eau) et de maintenir les autres constants. Nous avons réalisé nos incubations en appliquant différentes valeurs de potentiel

hydrique, à l'aide de microcosmes particuliers permettant d'ajuster une dépression tout en formant une enceinte protectrice limitant les échanges avec l'extérieur. Pour limiter la variabilité des caractéristiques morphologiques des milieux poreux, nous avons confectionné des structures constituées d'agrégats de taille calibrée, compactés à une masse volumique donnée. Enfin, pour jouer sur la localisation d'un substrat soluble et de décomposeurs et en maximiser l'effet, nous avons imposé des distributions initiales de déconnexion spatiale. Nous avons pour cela procédé à des apports localisés dans des échantillons où la biomasse microbienne et le carbone organique dissous natifs avaient au préalable été éliminés par stérilisation et rinçage. Pour apprécier l'évolution temporelle et spatiale des différents pools impliqués, nous avons réalisé un suivi spatialisé en procédant aux mesures après découpe des échantillons en couches successives. Pour faciliter le traçage, nous avons choisi de travailler avec du glucose marqué au carbone 14.

4.1 Matériel et méthodes

4.1.1 Origine et caractéristiques physico-chimiques du sol

Le sol principalement utilisé est un luvisol provenant de l'essai agronomique La Cage de la station expérimentale de l'INRA de Versailles. Le sol a été prélevé dans l'horizon labouré (profondeur 0-30 cm), à une teneur en eau massique de 0,18 $g.g^{-1}$, en mars 2011 et stocké à 4°C depuis. Dans les expérimentations décrites dans les sections 4.1.2 et 4.1.6, du sol de l'essai agronomique QualiAgro, déjà décrit précédemment (section 2.1.1) a été employé en plus du sol de La Cage. Les principales caractéristiques physico-chimiques de ces deux sols sont récapitulées dans le tableau 4.1. Il est à noter que le sol de QualiAgro comprend une part importante de résidus organiques dans la fraction grossière non quantifié dans la teneur en carbone organique total (TOC) de la fraction fine donnée dans la table 4.1.

Provenance	**Argile**	**Limon**	**Sable**	**TOC**	**C/N**	**CEC**	**pH**
	%			$mg.g^{-1}$	[-]	Meq $100g^{-1}$	[-]
La Cage	17	56	27	10	9,9	10	7,4
QualiAgro	19	75	6	11	9,5	9,4	6,9

TABLE 4.1 – **Caractéristiques physico-chimiques des sols utilisés dans les expérimentations.**

4.1.2 Prétraitement du sol

Le sol a été tamisé sans forçage entre 2 et 3,15 mm à la teneur en eau de stockage (0,18 $g.g^{-1}$). Les agrégats obtenus ont été conditionnés en sachets hermétiques avant d'être stérilisés aux rayons γ à une dose de 45 à 75 kGy par une entreprise spécialisée (Ionisos, Dagneux). La stérilisation permet d'éliminer la biomasse autochtone, pour maîtriser la distribution initiale des bactéries en procédant à un apport localisé. Cependant, cette étape provoque une libération conséquente de carbone organique dissous labile provenant du cytoplasme des microorganismes tués ainsi que des altérations physico-chimiques des matières organiques du sol [Berns et al., 2008]. Une méthode de rinçage a donc été conçue dans le but d'éliminer le carbone dissous libéré et de permettre la maîtrise de la localisation de la source de carbone lors des incubations. L'étape de rinçage a été pratiquée en conditions stériles à la suite d'une première étape de stérilisation, puis les agrégats ont été à nouveau stérilisés afin d'éliminer une éventuelle contamination microbienne.

La description détaillée du matériel utilisé et de la procédure de rinçage est donnée dans l'annexe D. Le matériel utilisé comprend d'une part un simulateur de pluie alimenté par une pompe péristaltique, et d'autre part d'une embase supportant le sol à rincer et permettant l'évacuation

du lixiviat. La section importante de l'embase (Φ_{int} = 14 cm) permet le traitement de masses conséquentes de sol (autour de 700 g équivalent sec) apporté sous forme d'agrégats non compactés. Des essais préliminaires avaient également été réalisés avec des agrégats sous formes de galettes (Φ = 5 cm, H = 2 cm, ρ_b = 1,2 g.cm^{-3}) dans des microcosmes munis de petits simulateurs de pluie. Ils en différaient toutefois par la manière dont le potentiel hydrique est imposé (à l'aide d'une pompe à air plutôt que par différence de hauteur d'eau avec un réservoir). Un potentiel de - 31 kPa (soit h=-316 cm) était alors imposé.

Pour éviter l'altération de la structure des agrégats, nous avons pris plusieurs précautions. Nous avons cherché à :

- limiter la force d'impact des gouttes. Le simulateur de pluie muni de 45 aiguilles (Φ_{ext} = 330 μm) dispense la solution de rinçage en de nombreuses gouttelettes à faible débit (1,5 cm^3.min^{-1} soit 6 mm.h^{-1}).
- éviter l'ennoiement des agrégats. Dans l'embase se fixe une toile en inox de porosité 20 μm. Une faible dépression (h=-10 cm) peut être imposée de manière à permettre l'écoulement du lixiviat.
- éviter la déstructuration chimique par la lixiviation des éléments minéraux du sol. Nous reconstituer une solution de sol synthétique (CaN_2O_6, $CaSO_4$, NaCl) d'après Chabauty et al. [2015].

Le rinçage suivant la première stérilisation devait éliminer le carbone organique dissous tout en limitant autant que possible la recolonisation par d'autres microorganismes. Plusieurs points ont été réfléchis pour réduire le risque de contamination :

- Stérilisation à l'autoclave de la solution de rinçage et de tous les équipements composés de matières thermorésistantes (verre, certains tuyaux en silicone et PVC).
- Stérilisation par trempage ou essuyage à l'éthanol (pur ou dilué) des autres matériaux.
- Utilisation d'aiguilles stériles jetables.
- Toutes les manipulations ont été réalisées sous flux laminaire (poste de sécurité microbiologique ou PSM) et un flux minimum a été laissé en continu en dehors des manipulations.

Le rinçage a duré environ 60 heures et a impliqué un volume d'élution de 5,4 L estimé à environ 10 fois le volume de pores (pour une masse volumique apparente des agrégats estimée à $\approx$ 0.9 g.cm^{-3}). Le traitement des agrégats s'est achevé par le drainage (par augmentation graduelle de la charge hydraulique) suivi d'une période de séchage par évaporation dans des contenants stérilisés limitant les échanges avec l'air ambiant, jusqu'à obtenir une teneur en eau pondérale comprise entre 16 et 17%. Les agrégats ont ensuite été conditionnés dans poches plastifiées scellées hermétiquement.

4.1.3 Construction des milieux pour les incubations en conditions hétérogènes

Des galettes de sol ont été préparées à partir d'agrégats de taille calibrée (2 - 3,15 mm de diamètre) dont la teneur en eau avait préalablement été ajustée à une 0,205 g.g^{-1}. Les agrégats ont été compactés à l'aide d'une presse mécanique de manière à obtenir une masse volumique finale de 1,2 g.cm^{-3} [Pinheiro et al., 2015]. Les galettes réalisées dans ce travail avaient un diamètre de 5 cm et une hauteur de 2,1 cm donnant une masse de 49,5 g équivalent sol sec.

4.1.4 Caractérisation de la rétention hydrique des milieux structurés

La teneur en eau en fonction du potentiel hydrique a été mesurée selon deux méthodes pour travailler à des potentiels proches de la saturation d'une part, et pour explorer des domaines plus secs d'autre part (jusqu'à pF=4,2). La courbe de rétention a été mesurée en profil de désaturation.

Mesure de la rétention dans un domaine proche de la saturation Pour mesurer la teneur en eau à proximité de la saturation, nous avons suivi la perte de masse des échantillons induite en imposant une dépression croissante à des galettes d'agrégats dans les microcosmes inspirés des dispositifs utilisés par Poll et al. [2010] et confectionnés par l'atelier de l'*Institute of Soil Science and Land Evaluation* de l'Université de Hohenheim (figure 4.1).

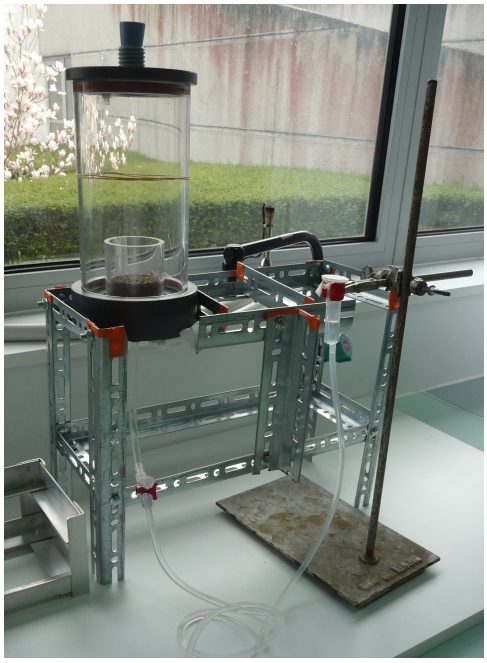


FIGURE 4.1 – **Microcosme** permettant de réaliser des incubations à un potentiel hydrique fixé.

Les microcosmes ont été conçus pour réaliser des incubations de sol à une dépression maintenue constante tout en isolant l'échantillon des conditions extérieures. L'ajustement du potentiel de l'échantillon est assuré grâce à un extracteur à plaque poreuse [Musy et Soutter, 1991]. L'échantillon repose directement sur une plaque céramique poreuse reliée à un réservoir servant à ajuster la charge hydraulique. La dépression induite par une différence de hauteur entre l'eau dans le réservoir et l'échantillon est transmise par les pores fins saturés de la plaque poreuse (pression d'entrée d'air de 1 bar, correspondant à un diamètre de pores de 3 μm).

Le microcosme forme une enceinte protectrice isolant l'échantillon des conditions extérieures et permettant l'échantillonnage de l'atmosphère à l'intérieur. Un orifice refermable dans le couvercle donne accès à un piège à soude pour le captage du CO_2. Lors des manipulations (en conditions stériles pour les incubations), le cylindre peut être retiré de sa base et la charge hydraulique dans la plaque poreuse peut être bloquée grâce à la fermeture d'une vanne trois voies adaptée au tuyau raccordant réservoir et plaque poreuse.

L'ajustement du potentiel hydrique a été obtenu par saturation de l'échantillon puis drainage, en baissant graduellement le niveau du réservoir par rapport à la surface de la plaque poreuse (par paliers de 2 cm environ) depuis le niveau 0. Pour le suivi de la caractéristique de rétention, les mesures ont été réalisées après un temps d'équilibration de 48 heures. La contrainte spatiale dans le laboratoire limite la hauteur d'eau qui peut être imposée dans le système, à 130 cm dans nos conditions.

Mesure de la rétention pour les potentiels éloignés de la saturation Des pressions élevées – équivalentes à une dépression de même valeur absolue – peuvent être imposées grâce à l'emploi de presse de Richards (ou marmites à pression) [Musy et Soutter, 1991]. Le suivi de l'évolution

massique de galettes d'agrégats a ainsi pu être poursuivi jusqu'à pF=4,2 ($\psi \approx 16$ bar ou 1600 kPa soit $h \approx$ -160 m). Un temps d'équilibration de 48 heures est laissé entre le réglage de la dépression et la pesée.

La caractéristique de rétention a été estimée à partir de deux séries mesurée par une des deux méthodes présentées, en trois répétitions.

4.1.5 Incubations en milieu liquide

Pour toutes les incubations décrites dans ce chapitre, la croissance de la souche *Cupriavidus necator* JMP 134 a été observée à sa température optimale (28°C) en présence de glucose en concentrations variables. L'apport des de nutriments autres que cette source principale de carbone est assuré par la solution nutritive Cardiff (composition en annexe E).

L'incubation en milieu liquide permet de caractériser le comportement d'une souche et sa cinétique de croissance, en faisant intervenir un minimum de paramètres environnementaux et en plaçant les bactéries dans des conditions optimales pour leur croissance. L'accès à l'oxygène et au substrat est facilité par l'agitation constante. L'incubation en solution constitue à une étape préparatoire pour les autres expérimentations microbiologiques décrites dans les sections suivantes. Son protocole est présenté dans l'annexe F.

Modalité	**Concentration Substrat**		**Concentration Bactéries**		**Substrat/ Bactéries**[a]
	$mg.mL^{-1}$	$mgC.mL^{-1}$	$CFU.mL^{-1}$ [b]	$mgC.mL^{-1}$ [c]	[.]
$Gl_{0,2}B_{-5}$	0,5	0,2	$1,40.10^6$	7.10^{-5}	$2{,}86.10^3$
$Gl_{0,4}B_{-5}$	1	0,4			$5{,}72.10^3$
Gl_1B_{-5}	2,5	1			$1{,}43.10^4$
Gl_2B_{-5}	5	2			$2{,}86.10^4$
$Gl_{0,2}B_{-7}$	0,5	0,2	$1,40.10^4$	7.10^{-7}	$2{,}86.10^5$
$Gl_{0,4}B_{-7}$	1	0,4			$5{,}72.10^5$
Gl_1B_{-7}	2,5	1			$1{,}43.10^6$
Gl_2B_{-7}	5	2			$2{,}86.10^6$
$Gl_{0,5}B_{-6}$	1,25	0,5	$6,80.10^4$	$3{,}40.10^{-6}$	$1{,}47.10^5$
[Coucheney, 2009][d]	1,54	0,62	$2{,}60.10^4$	$1{,}30.10^{-6}$	$4{,}74.10^5$
[Coucheney, 2009]	3,82	1,53	$6{,}40.10^4$	$3{,}20.10^{-6}$	$4{,}74.10^5$

TABLE 4.2 – **Concentrations initiales de glucose et de bactéries testées pour les incubations en solution** comparées aux concentrations dans les expérimentations de Coucheney [2009] (deux dernières lignes).
[a] D'après les concentrations de substrat et bactéries exprimées en masse de C par unité de volume
[b] CFU : unité formant colonie (≈ nombre de cellules bactériennes)
[c] Conversion d'après les mesures en $CFU.mL^{-1}$ pour 1 CFU = 5.10^{-11} mg C [Monga et al., 2014]
[d] Valeurs initiales choisies pour le modèle dans le chapitre 2 provenant de l'incubation de Coucheney [2009].

Les concentrations initiales en substrat et en bactéries – et le rapport des deux – affectent la cinétique de croissance bactérienne dans notre modèle (cf chapitre 3). Comme dans les autres parties de cette thèse, nous avons pris les conditions expérimentales de Coucheney [2009] comme référence (souche pure en présence d'un composé soluble labile). Les concentrations initiales des différentes incubations en solution sont données dans la table 4.2. Les valeurs répertoriées ici sont approximatives. Il s'agit des apports théoriques, les concentrations initiales exactes n'ayant pas été mesurées et étant difficiles à déduire du fait des incertitudes sur le volume de solution liées à la méthode (la stérilisation de la solution dans les erlenmeyers d'incubation provoque une diminution variable du volume initial).

La mesure de la biomasse par densité optique est calibrée par numération cellulaire (voir section I.1.2 en annexe). Elle donne donc une estimation en nombre de cellules ou CFU (unité formant colonie) par unité de volume. Pour convertir les concentrations de cellules en concentrations de

carbone, nous avons pris le facteur d'équivalence 1 CFU = 5.10^{-11} mg C utilisé par Monga et al. [2014]. Le rapport substrat/bactéries est calculé d'après les concentrations de glucose exprimées en masse de carbone par unité de volume.

Dans une première série d'incubations (8 premières lignes de la table 4.2) nous avons modulé les apports de substrat et de bactéries autour des valeurs initiales de Coucheney [2009], induisant une variation du rapport substrat/bactéries de trois ordres de grandeurs. Nous n'avons pas réalisé de répétitions pour ces modalités. Nous avons ensuite cherché à imposer les concentrations initiales les plus proches possibles de celles de Coucheney [2009] (modalité $Gl_{0,5}B_{-6}$, table 4.2), obtenant un rapport substrat/bactéries du même ordre de grandeur (10^5 en g.g^{-1} de carbone). Cette modalité a été réalisée en triplicats.

Les deux variables suivies – la concentration en glucose et la concentration en cellules bactériennes – ont été mesurées sur après prélèvement d'un petit volume (3 mL) en conditions stériles. Les mesures sont les plus fréquentes autour de l'initiation supposée de la croissance (18 - 28 h) et s'espacent en dehors de cette période. La concentration cellulaire a été estimée par densité optique (section I.1.2 en annexe) et le glucose par dosage colorimétrique (section I.2.1).

4.1.6 Incubations en suspension de sol

Nous avons comparé les cinétiques de croissance en solution et en suspension pour déterminer si la seule présence de particules solides influence ou non les capacités métaboliques des bactéries et donc savoir quel type de données choisir (provenant d'incubations en solution ou en suspension) pour la paramétrisation du modèle.

Le protocole (annexe G) est inspiré du protocole d'incubation en solution (F) mais a dû être adapté aux spécificités du milieu suspension et du suivi d'un pool gazeux. La présence d'une phase solide complique le suivi de la biomasse et du substrat. Elle demande notamment de passer par une étape d'extraction. D'autre part, l'addition de sol stérilisé est source de carbone organique dissous et de matière organique particulaire. Pour suivre spécifiquement la biodégradation du substrat apporté, du glucose marqué au ^{14}C a été utilisé. La mesure de la radioactivité par comptage à scintillation liquide permet de doser facilement et spécifiquement les produits de la transformation du glucose. La radioactivité mesurée dans chaque pool rapportée à la radioactivité injectée permet de déterminer la concentration relative de ce pool.

Nous avons dosé le $^{14}CO_2$ et le carbone organique dans la phase liquide (DO^{14}C), pouvant représenter le glucose et/ou un composé transformé. Le dosage du glucose permet de déduire les parts respectives du substrat d'origine et de produits de transformation. Le suivi du ^{14}C bactérien et du ^{14}C non extractible (c'est-à-dire présent dans la phase solide) permettrait de compléter le bilan de masse mais n'a pas été réalisé ici. En effet, la mesure de biomasse microbienne par extraction fumigation-extraction n'est pas adaptée aux milieux à forte humidité. Nous avons suivi l'évolution des concentrations bactériennes par dénombrement cellulaire, comptabilisant indistinctement les bactéries ayant ingéré le ^{14}C du substrat ou non. Nous avons par ailleurs supposé le ^{14}C non extractible négligeable, étant donnée la nature du substrat employé (peu enclin à s'adsorber [Nguyen et Guckert, 2001] et minéralisé sans métabolites secondaires). Le $^{14}CO_2$ a été mesuré en cinétique alors que les mesures de glucose, de DO^{14}C et de concentration cellulaire ont été réalisées en fin d'incubation.

Deux questions ont suscité la réalisation de plusieurs modalités :

– Nous souhaitions imposer des conditions d'accessibilité optimale pour bien mettre en évidence une éventuelle stimulation du métabolisme par la seule adhésion des cellules aux particules solides. Le brassage constant des erlenmeyers pendant l'incubation favorise l'homogénéisation les concentrations de substrats, microorganismes et oxygène dissous. Nous avons testé trois proportions massiques entre sol et solution (1, 2/3 et 1/2) pour obtenir une modalité qui

garantirait des conditions d'accessibilité proches de l'optimum. Les modalités présentent un masse de sol identique (10 g équivalent sol sec) et des volumes de solution différents. Les masses initiales ont été choisies de manière à se rapprocher du rapport substrat/bactéries de la modalité $Gl_{0,5}B_{-6}$ des expérimentations en solution, donc de celui de l'étude de Coucheney [2009]. Les concentrations en solution sont en revanche beaucoup plus élevées (de 10 à 30 fois). La raison du choix de concentrations si différentes, malgré le souci de comparabilité entre les deux expérimentations, tient au protocole d'extraction (imposant une dilution du sol au dixième) et à la gamme restreinte de sensibilité de la méthode du dosage de glucose.

– Dans l'éventualité d'une altération de la cinétique de biodégradation par la présence d'une phase solide, nous avons voulu vérifier si cet effet serait affecté par le type de sol. Nous avons utilisé du sol de deux provenances : du sol de l'essai La Cage, destiné aux incubations en milieu hétérogène (section 4.1.7), et du sol de l'essai agronomique QualiAgro de Feucherolles, présenté dans la section 2.1.1

Nous avons comparé les cinétiques en suspension avec un témoin en milieu liquide. L'ensemble des modalités a été réalisé en triplicats. Le sol utilisé avait subi un prétraitement comprenant une phase de stérilisation suivie d'un rinçage (voir section 4.1.2).

Sol	**M sol frais**	**V solution nutritive**[a]	**V liquide total**	**C glucose**		**C bactéries**		**Substrat/ Bactéries**[b]
	g	mL	mL	$mg.mL^{-1}$	$mgC.mL^{-1}$	$CFU.mL^{-1}$ [c]	$mgC.mL^{-1}$ [d]	[.]
QualiAgro	12,59	5,41	10	46,18	18,49	$1,24.10^{6}$	$6,22.10^{-5}$	$2,97.10^{5}$
	12,59	10,41	15	24,01	9,62	$8,29.10^{5}$	$4,15.10^{-5}$	$2,32.10^{5}$
	12,59	15,41	20	16,22	6,50	$6,22.10^{5}$	$3,11.10^{-5}$	$2,09.10^{5}$
La Cage	12,23	5,78	10	43,29	17,34	$1,24.10^{6}$	$6,22.10^{-5}$	$2,79.10^{5}$
	12,23	10,78	15	23,20	9,29	$8,29.10^{5}$	$4,15.10^{-5}$	$2,24.10^{5}$
	12,23	15,78	20	15,85	6,35	$6,22.10^{5}$	$3,11.10^{-5}$	$2,04.10^{5}$
Témoin	0	13,00	15	19,23	7,70	$8,29.10^{5}$	$4,15.10^{-5}$	$1,86.10^{5}$
$Gl_{0,5}B_{-6}$[e]	0		250,00	1,25	0,5	$6,80.10^{4}$	$3,40.10^{-6}$	$1,47.10^{5}$

TABLE 4.3 – **Conditions initiales des différentes modalités de suspension de sol**. La masse de sol est de 10 g MS. Les volumes d'apport de glucose et de bactéries sont de 1 mL chacun.
[a] Solution Cardiff (voir annexe E)
[b] D'après les concentrations de substrat et bactéries exprimées en masse de C par unité de volume
[c] CFU : unité formant colonie ($\approx$ nombre de cellules bactériennes)
[d] Conversion d'après les mesures en $CFU.mL^{-1}$ pour 1 CFU = 5.10^{-11} mg C [Monga et al., 2014]
[e] Les valeurs pour la modalité $Gl_{0,5}B_{-6}$ de l'incubation de la section 4.1.5 sont données pour comparaison

4.1.7 Incubations en milieu structuré

Cette dernière incubation a été réalisée en vue d'une validation du modèle LBioS, simulant la régulation de la biodégradation par les conditions de diffusion hétérogènes dans des milieux poreux. Cette expérimentation a été conçue en référence au plan d'expérience virtuel du chapitre 2, mettant en jeu trois facteurs structuraux : l'architecture de la porosité, la saturation en eau et la localisation des bactéries vis-à-vis du substrat. Dans l'incubation ici présentée, un facteur a été modulé – la saturation en eau – et les deux autres maintenus constants. Des galettes d'agrégats décrites dans la section 4.1.3 ont été utilisées comme milieu hétérogène. Le protocole complet de l'expérimentation peut être consulté dans l'annexe H.

Pour se rapprocher de l'échelle d'application du modèle (micro- à millimétrique) tout en facilitant le suivi spatialisé, nous avons choisi de travailler avec des galettes d'agrégats de 21 mm (induisant une masse sèche de 49,5 g de sol par galette), à découper en trois tranches. La direction verticale a été privilégiée pour étudier le rôle de la diffusion dans la régulation de la biodégradation, toujours en référence aux scénarios du chapitre 2. Comme le positionnement du substrat et des bactéries ne peut pas être manié aussi finement au laboratoire que dans notre modèle, nous avons choisi une seule disposition maximisant la déconnexion spatiale : les apports en faible volume de substrat (150 μL) et de bactéries (100 μL) sous la forme de gouttelettes ont été répartis sur la

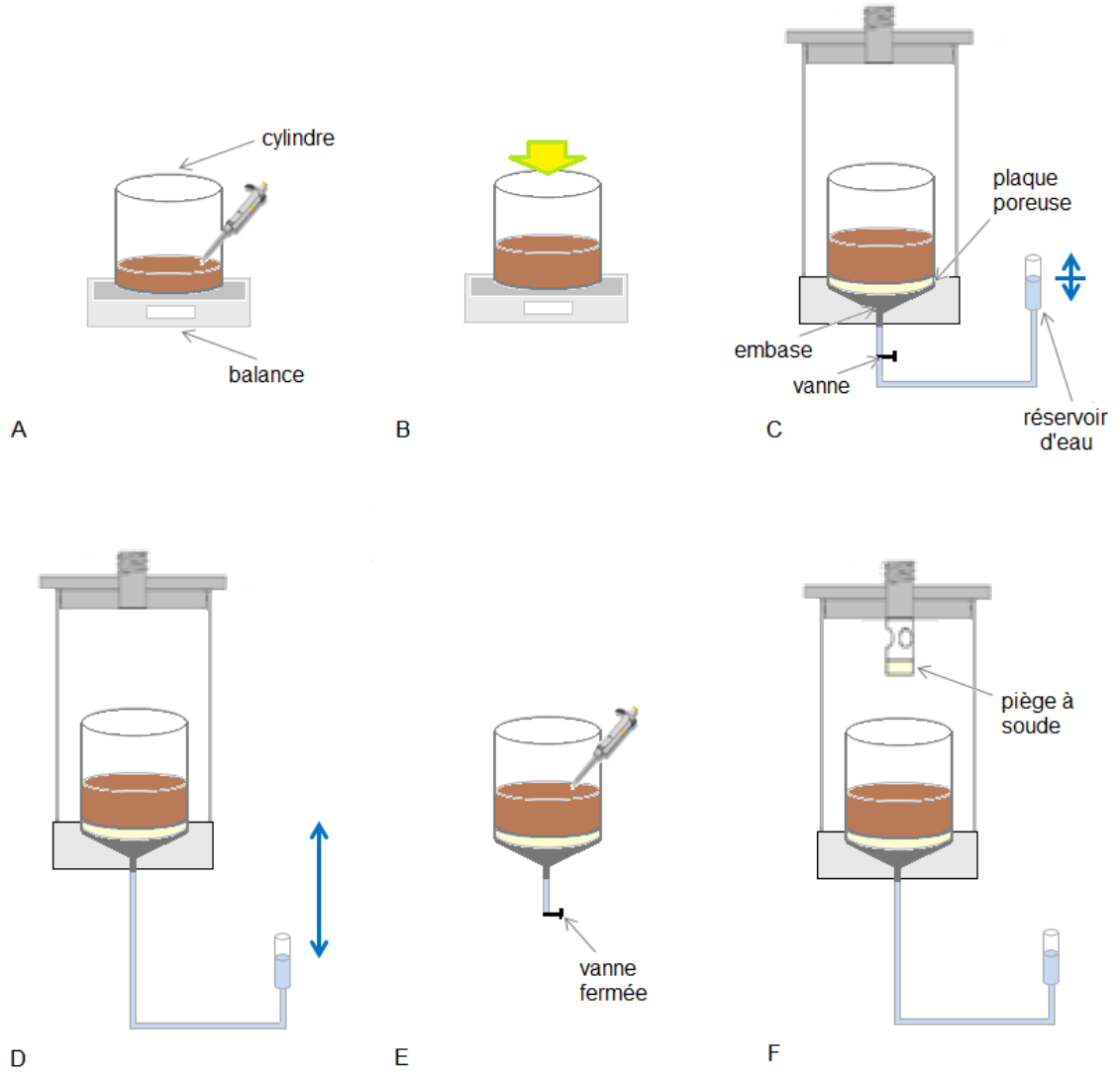


FIGURE 4.2 – **Protocole de lancement de l'incubation en milieu structuré** illustré dans ses principales étapes.
A : En conditions stériles, un quart de la masse finale est versé et compacté dans le cylindre. L'inoculum préalablement dosé est apporté à la surface sous la forme de gouttelettes.
B : Le reste de la masse d'agrégats est ajouté et compacté dans le cylindre.
C : La galette d'agrégats est mise à saturer dans le microcosme, préalablement assemblé et réglé à h=0 cm.
D : La succion est ajustée en descendant progressivement le niveau du réservoir d'eau.
E : Le substrat est apporté sous la forme de gouttelettes à la surface de la galette en conditions stériles.
F : Début de l'incubation.

face supérieure de la galette pour le glucose et dans le tiers inférieurs pour l'inoculum (voir annexe H). Nous avons varier la saturation en eau entre les modalités grâce à l'emploi des microcosmes décrits dans la section 4.1.4. Trois dépressions (h=-5, -20 et -100 cm) ont été choisies proches de la saturation, de manière à maximiser le contraste entre les modalités dans la limite du domaine d'exploration permis par la méthode expérimentale (section 4.1.4) et par le modèle. La figure 4.2 retrace les étapes du protocole de lancement de l'incubation. Ce protocole inclue une phase de saturation de l'échantillon suivie de la désaturation jusqu'à la dépression finale, d'une durée limitée (environ une heure chacune), encadrée par les apports de l'inoculum – pendant la construction de la galette – et du glucose – clôturant le lancement de l'incubation (annexe H).

Cette expérimentation, conçue pour répondre aux questions centrales de cette thèse, a fait l'objet du suivi le plus complet possible en terme de variété de pools. Doser en parallèle les pools marqués (^{14}C) et totaux (^{14}C + ^{12}C) permet de distinguer les composés selon leur origine. Nous avons donc mesuré à la fois le $^{14}CO_2$ (issu de la minéralisation spécifique du glucose) et le CO_2 total (minéralisation non spécifique de toute source de C dans l'échantillon). Pour la phase aqueuse, nous avons dosé le glucose et le DO^{14}C. Nous avons estimé la biomasse totale par dénombrement cellulaire. Le ^{14}C non extractible a été mesuré pour évaluer le bilan de masse. L'évolution dans le temps et dans l'espace des pools a été étudiée en effectuant les mesures destructives par tranches de galettes et à trois dates (2, 18 et 175 h). Les dates extrêmes sont supposées représenter les conditions initiales et finales de la cinétique. La date intermédiaire a été choisie pour renseigner sur les conditions au début de la croissance bactérienne. Ce raffinement du suivi a été décidé au détriment de la vérification de la variabilité par des répétitions. Les trois modalités ont été réalisées à partir de trois échantillons, chacun d'eux étant sacrifié à l'une des trois dates de mesures.

Les mêmes masses de substrat (20 mg C) et d'inoculum ($\approx 1.10^{-4}$ mg C) ont été apportées dans les différentes modalités, impliquant des différences de concentration selon la teneur en eau des échantillons. Un rapport substrat/bactéries de l'ordre de 1.10^5, en référence aux conditions initiales de [Coucheney, 2009] a été imposé.

Une modalité témoin, avec apport de glucose mais sans apport d'inoculum a été réalisée, au potentiel h=-20 cm. La première date de mesure n'a pas été réalisée pour le témoin, car les transformations microbiologiques étaient supposées négligeables en deux heures.

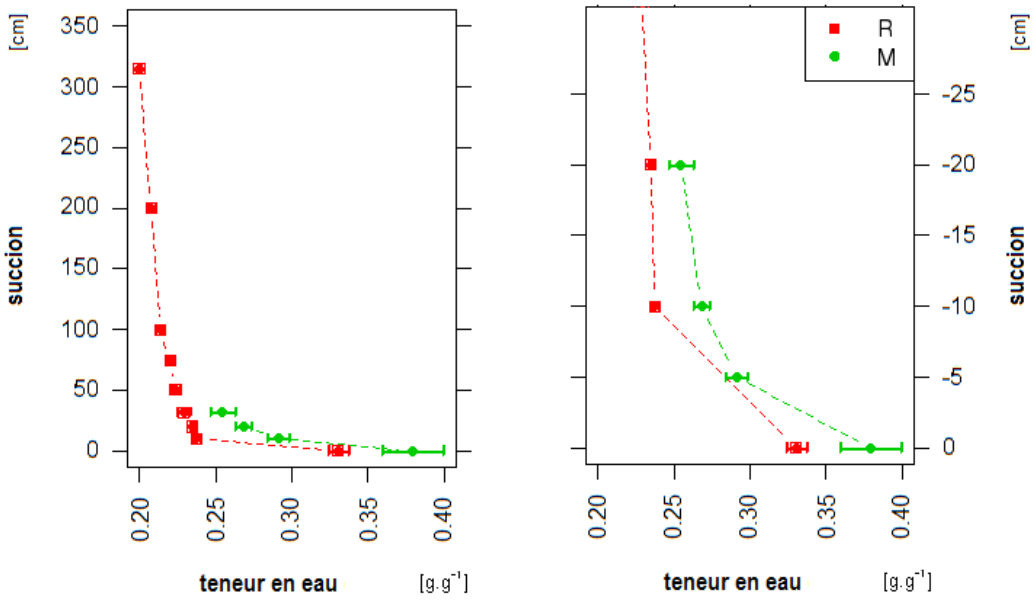
4.2 Résultats

4.2.1 Évaluation de la rétention hydrique des milieux structurés

Les deux méthodes de mesure de la rétention hydrique montrent une diminution importante de la teneur en eau pondérale dès le premier palier de désaturation : de 0,38 à 0,30 g.g^{-1} entre h=0 à -5 cm d'après les mesures en microcosmes (figure 4.3b). La loi de Jurin prédit un rayon maximal de pores inondés de 300 μm, inférieur aux dimensions de la plupart des vides laissés entre les agrégats millimétriques sélectionnés. La baisse de la teneur en eau observée correspond donc manifestement à la vidange de la porosité inter-agrégats. Des pertes d'eau de plus en plus modérées sont observées entre h=-5 et h=-10 cm puis h=-10 et h=-20 cm. Les valeurs diffèrent entre les deux méthodes de mesure pour cette gamme de potentiels. Elles sont de 3,3 et 2,5% plus faibles avec la méthode des marmites à pression (figure 4.3a). Une telle sous-estimation de la teneur en eau aux faibles succions avec la méthode des marmites à pression a déjà été constatée par Richard et al. [2001].

Le niveau de variabilité change aussi entre les deux méthodes : elle est plus élevée pour les mesures en microcosmes. Le montage des plaques poreuses dans les embases des microcosmes s'est révélé être une tâche délicate, avec de fortes répercussions sur la transmission du potentiel.

La diminution de la teneur en eau se poursuit à un rythme très lent et régulier, entre h=-20 à h=-315 cm (rayon maximal de pores inondés de 75 à 4,8 μm), de 0,24 à 0,20 g.g^{-1} d'après les



(a) (b)

FIGURE 4.3 – **Évaluation de la caractéristique de rétention** pour le domaine de succion 0 - 315 cm par presse de Richards (R) et 0 - 20 cm dans les microcosmes (M).
Les résultats sont moyennés dans chaque série de trois répétitions.

résultats de la méthode des marmites à pression. Cette variation correspond à la vidange progressive de la porosité intra-aggrégats, qui est influencée par la texture du sol – limoneuse dans le cas du sol de La Cage.

Les résultats obtenus par les deux méthodes aux faibles succions sont cohérents en termes de tendance de variation, même si leurs valeurs diffèrent. La comparaison des deux méthodes a ainsi permis de vérifier en partie la performance de la méthode d'ajustement du potentiel dans nos microcosmes.

L'évolution de la teneur en eau entre h=-5 et h=-100 cm laisse supposer des situations différentes en terme de distribution de la phase aqueuse malgré des valeurs relativement proches. La baisse de la teneur en eau est la plus importante autour de h=-5cm. A cette valeur de potentiel, la phase aqueuse semble donc encore bien représentée dans la porosité inter-agrégats. La perte d'eau entre h=-5 et h=-20 cm pourrait être due à la diminution de l'eau résiduelle dans la macroporosité. La très lente diminution autour de h=-100 cm semble trahir la vidange de pores de la porosité intra-agrégats. L'eau dans la macroporosité ne serait alors présente que sous la forme de films mouillants.

L'utilisation des microcosmes pour l'évaluation de la caractéristique a fait apparaître des difficultés liées au montage des microcosmes, source d'incertitudes sur la valeur de potentiel effectivement imposée.

4.2.2 Rinçage du carbone organique dissous natif des agrégats

La cinétique d'élution du DOC natif de sol lors de l'expérimentation de rinçage est illustrée dans la figure 4.4. Les différentes modalités sont représentées par un seul échantillon, sans répétition. Les échantillons ont subi différents traitements (pas de stérilisation, stérilisation unique, ou séquence stérilisation - rinçage - stérilisation) et ont été rincés à l'aide de deux dispositifs distincts (microcosme ou système macroscopique décrit dans l'annexe D impliquant des différences de vo-

lume et de structure (agrégats en galettes ou en vrac) entre les échantillons. Pour comparer des mesures provenant de dispositifs différents (caractérisés par des surfaces arrosées et des volumes de sol différents), la quantité d'eau écoulée est exprimée en lame (Volume / Surface) [L].

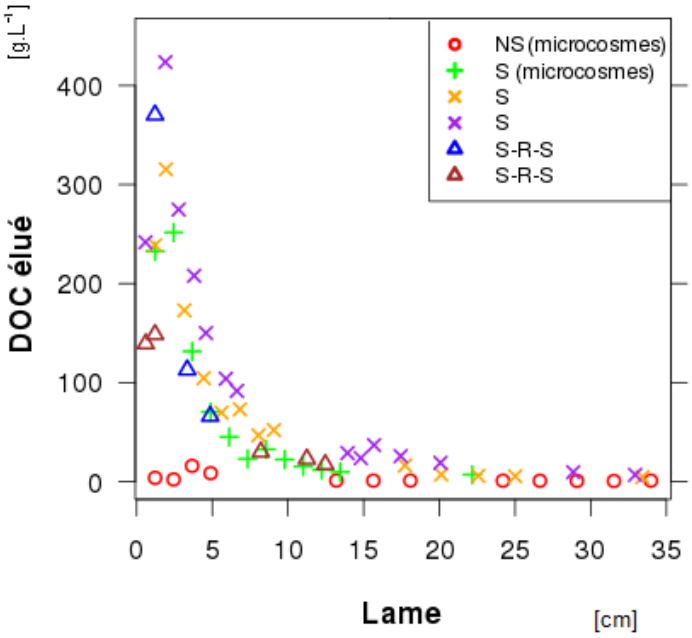


FIGURE 4.4 – **Concentration de DOC élué au cours du rinçage** d'échantillons de sol ayant subi différents traitements (NS : sol non stérile, S : une stérilisation, SRS : stérilisation - rinçage - stérilisation) dans différents dispositifs (microcosmes ou systèmes macroscopiques).
Les modalités sont représentées sans répétition.

La cinétique d'élution du DOC est très différente entre les agrégats stérilisés et non stérilisés. Le DOC des agrégats non stériles est libéré en faibles quantités à un rythme constant. Tous les autres échantillons montrent un pic de concentration en début de rinçage puis une décroissance exponentielle et enfin un niveau asymptotique équivalent à la concentration pour le sol non stérilisé.

Les mesures obtenues sur des agrégats stérilisés une seule fois (sans rinçage préalable) montrent la même allure, quel que soit le dispositif utilisé. La concentration maximale et la vitesse de décroissance varie (de 150 à 420 $g.L^{-1}$ suivant les échantillons), probablement selon le rapport entre la masse de sol et la surface arrosée. Ceci permet d'affirmer que la différence de cinétique observée entre sols traités et non traités provient bien du traitement et non d'un éventuel effet système. La teneur élevée en DOC dans les échantillons après stérilisation est attribuée à la lyse des cellules microbiennes et à la libération de leur cytoplasme. L'élution plus lente et constante en fin de rinçage pourrait qaunt à elle résulter d'altérations physico-chimiques impliquant le clivage ou la désorption de molécules humiques.

Les valeurs des échantillons ayant subi la séquence stérilisation - rinçage - stérilisation sont nettement supérieures aux concentrations d'un sol non stérilisé. La concentration maximale varie d'un facteur 2 entre les deux échantillons testés et peut atteindre un niveau comparable aux échantillons n'ayant pas subi le traitement complet. Le rinçage n'a donc pas ou peu d'effet sur la teneur finale en DOC après stérilisation. La contamination et la recolonisation de microorganismes pendant les phases de rinçage et/ou de séchage semble l'hypothèse la plus probable pour expliquer la similarité des cinétiques d'élution entre des échantillons rincés puis stérilisés ou simplement stérilisés. Les conditions de l'expérimentation de rinçage pourraient favoriser la croissance de microorganismes en cas de contamination en dépit des précautions prises pour préserver la stérilité du sol : abon-

dance de substrat labile en début de rinçage, conditions hydriques optimales (humides mais non anoxiques), température douce et constante, durée totale du cycle assez longue (3 à 4 jours).

Des essais préliminaires à l'expérimentation présentée en section 4.1.4 ont apporté d'autres indices confirmant l'hypothèse de contamination des sols rincés. La figure 4.5 illustre la cinétique de minéralisation d'une même quantité de glucose ^{14}C dans des échantillons soumis à des prétraitements différents. Deux témoins sans apport d'inoculum ont été réalisés. Le premier (T_{SR}) a été soumis à un prétraitement en deux étapes (stérilisation - rinçage), le second (T_{SRS}) en trois étapes (stérilisation - rinçage - stérilisation). La modalité inoculée en bactéries et incubée dans les mêmes conditions hydriques est donnée pour comparaison (B_{20}). Le sol pour cette modalité avait par ailleurs subi un prétraitement en trois étapes.

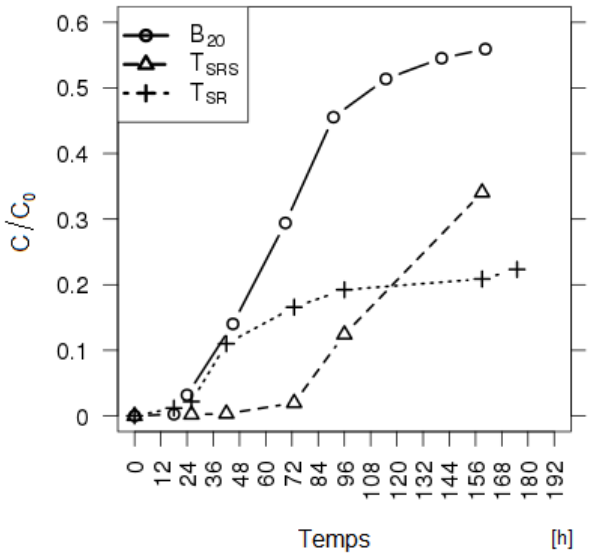


FIGURE 4.5 – **Minéralisation du carbone organique natif dans du sol sans apport de bactéries**, après stérilisation, rinçage et stérilisation (S-R-S), ou stérilisation et rinçage (S-R).

La cinétique de minéralisation est équivalente entre les échantillons B_{20} et T_{SR} pendant les 42 premières heures : le temps de démarrage (entre 18 et 26 heures) et la vitesse initiale sont similaires. Après la mesure de 42 heures, les deux courbes se séparent : la croissance continue au même rythme pour l'échantillon inoculé alors qu'elle s'infléchit pour T_{SR}. L'autre témoin (T_{SRS}) connait un démarrage plus tardif (entre 42 et 72 heures). La vitesse de minéralisation est ensuite comparable à l'échantillon inoculé. Le démarrage rapide pour le témoin T_{SR} indique qu'une biomasse microbienne abondante et active est présente malgré l'absence d'inoculation. Cette biomasse provient donc d'une contamination antérieure à l'incubation, vraisemblablement pendant le rinçage ou le séchage du sol après rinçage. Pour le témoin T_{SRS}, la période de latence rallongée suggère un développement lent, suite à une contamination récente, ayant eu lieu pendant l'incubation, par exemple lors de l'ouverture des microcosmes pour le renouvellement des pièges à soude).

Les résultats montrés dans les figures 4.4 et 4.5 suggèrent que l'étape de rinçage favorise la colonisation des agrégats stérilisés par une biomasse contaminante. Cette biomasse pourrait utiliser le DOC abondant en début du rinçage pour croître. Ainsi le rinçage fait diminuer la charge en DOC des agrégats (par lixiviation et surement dans une certaine mesure par consommation microbienne) mais permet la recolonisation du sol stérilisé par une nouvelle biomasse microbienne. La présence de cette biomasse non contrôlée change les conditions initiales et la cinétique de croissance, annulant un effet de la spatialisation recherché par l'apport limité et localisé de la biomasse. Lorsque le sol

rincé est stérilisé une nouvelle fois, la biomasse contaminante est éliminée et provoque la libération d'une quantité de DOC variable (figure 4.4), possiblement équivalente à la charge présente dans des échantillons stérilisés sans rinçage préalable.

L'échec du maintien de la stérilité des agrégats au moment du rinçage peut être dû à un équipement mal adapté car difficile à stériliser avant utilisation (matériaux thermosensibles interdisant la stérilisation par autoclavage, sensibles à l'éthanol ou présentant des surfaces rugueuses ou aspérités difficiles à nettoyer, *etc.*) et délicats à manipuler dans l'espace d'une hotte à flux laminaire (PSM), favorisant le risque d'erreurs par l'opérateur. D'autre part, la phase de séchage apparaît critique en termes de risques de contamination : les agrégats sont entreposés dans une enceinte entre-ouverte, sous flux laminaire minimum pendant une période de 24 à 36 heures (voir annexe D).

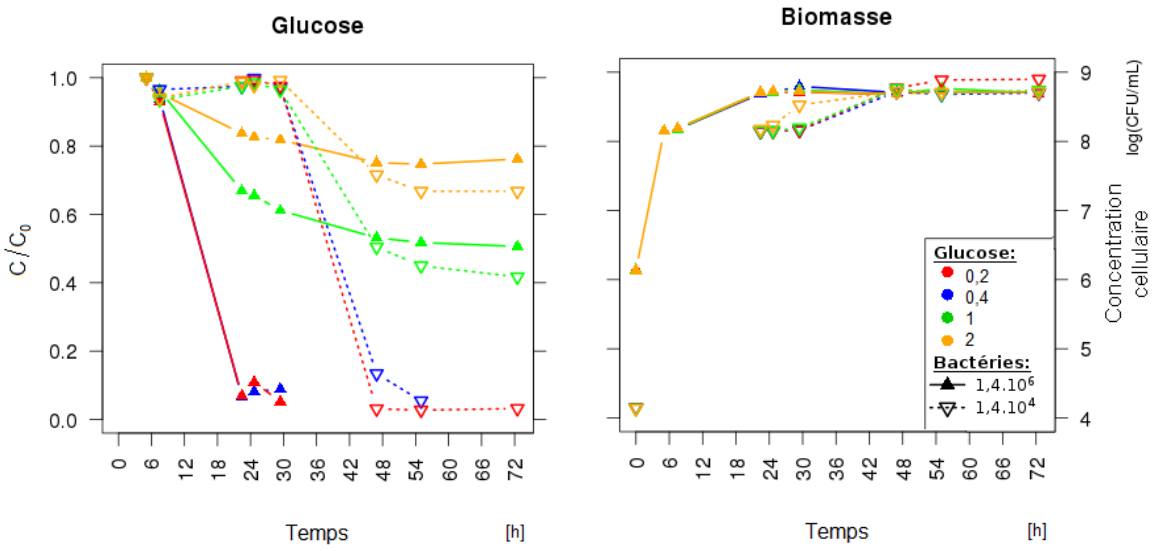
Une évolution importante du protocole et du matériel est à envisager pour que l'expérimentation puisse répondre à ses objectifs. La phase de séchage doit être supprimée au profit d'un drainage plus prononcé. Obtenir un état suffisamment sec pour garantir une bonne stabilité structurale des agrégats demande d'imposer une succion bien supérieure à celle qui peut être atteinte avec le système actuel. Notre dispositif de succion pourrait par exemple être remplacé par un système d'aspiration muni d'une pompe à vide. Les matériaux du système de rinçage devront être choisis de manière à faciliter leur stérilisation.

L'utilisation de sol rincé sans stérilisation ultérieure a donc été proscrite pour les incubations. Toutefois, les résultats de vérification ayant été obtenus tardivement, des échantillons stérilisés puis rincés ont été utilisés pour l'une des expérimentations (incubations en suspension présentées dans la section 4.1.6). Les incubations en milieu hétérogène (section 4.1.4) ont quant-à-elles été réalisées dans du sol stérilisé après rinçage. L'emploi d'agrégats stérilisés (préalablement stérilisés et rincés ou non) implique la présence d'une charge non quantifiée et non spatialisée d'un substrat labile et soluble. Toutefois, le marquage isotopique du glucose permet de suivre spécifiquement sa cinétique de minéralisation.

4.2.3 Cinétique de biodégradation du glucose en milieu liquide

Impact des concentrations initiales

Les résultats présentés dans les figures 4.6a et 4.6b illustrent l'effet de la variation des concentrations initiales en substrat et en inoculum (huit premières modalités de la table 4.2). Le glucose est quantifié en masse relative de carbone. En revanche, la biomasse est exprimée en concentration cellulaire ($\log_{10}$CFU.mL^{-1}). Les estimations après conversion du nombre de cellules en masse de carbone (basée sur le facteur de conversion de Monga et al. [2014] : 1 CFU = 5.10^{-11} mg C) donnent une proportion maximale de 5% du carbone sous la forme de biomasse. La masse relative de bactéries est donc manifestement sous-estimée. Des imprécisions liées à la méthode de dosage de la biomasse et/ou à un facteur de conversion inapproprié pourraient expliquer un tel écart avec l'ordre de grandeur attendu. Pour éviter les incertitudes liées à la conversion, les prochains résultats seront également exprimés en concentration cellulaire et non en masse relative. La cinétique est évaluée sur 72 heures, période pendant laquelle les principaux changements apparents ont lieu.



(a) (b)

FIGURE 4.6 – **Cinétique de consommation du glucose** (a.) **et de croissance bactérienne** (b.) **en solution pour différentes concentrations initiales** de glucose et de bactéries.
Les huit modalités (table 4.2) sont désignées dans la légende par leur concentrations initiales théoriques en glucose (en $mgC.mL^{-1}$) et en bactéries (en $CFU.mL^{-1}$).

L'évolution de la biomasse est marquée par un épisode de croissance, faisant augmenter la concentration cellulaire de 3 à 5 ordres de grandeur. La croissance est suivie d'une phase de stagnation, à une concentration similaire entre les différentes modalités, quelles que soient les conditions initiales et la quantité de substrat encore présente dans le milieu. La durée de la latence est affectée par la quantité initiale de biomasse : elle est comprise entre 0 et 5 heures pour la plus forte concentration initiale de biomasse (7.10^{-5} $mgC.mL^{-1}$ ou $1{,}4.10^{6}$ $CFU.mL^{-1}$), contre 20 à 26 heures autrement. La cinétique de consommation du glucose est à la fois sensible aux concentrations initiales de glucose et de biomasse. La vitesse de décroissance est identique pour les deux plus faibles doses de glucose (0,2 et 0,4 $mgC.mL^{-1}$) aboutissant à un niveau résiduel de environ 5% du substrat apporté dans les deux cas. La consommation devient plus lente et plus incomplète à mesure que la concentration initiale en glucose augmente : elle atteint seulement 45% et 18% de l'apport en fin de cinétique pour des concentrations initiales en substrat de 1 et 2 $mgC.mL^{-1}$. La consommation du glucose est légèrement plus poussée pour la plus faible valeur initiale de biomasse.

Les cinétiques observées ici présentent des points communs avec les cinétiques simulées par notre modèle en conditions homogènes. La croissance bactérienne est marquée une phase exponentielle suivie d'un plateau. Une phase de latence peut également être observée selon la valeur initiale de la biomasse. En revanche, les cinétiques mesurées pour les deux concentrations initiales les plus élevées en glucose (1 et 2 $mgC.mL^{-1}$) s'écartent radicalement du comportement du modèle, prédisant systématiquement l'épuisement du substrat en conditions homogènes. Dans l'incubation, la croissance s'arrête toujours au même niveau de biomasse, quelle que soit la concentration de glucose restant. L'arrêt de la croissance semble déterminé par la concentration bactérienne et non par celle du substrat. L'inhibition constatée pourrait être densité - dépendante ou elle pourrait être causée par un effet toxique du glucose à forte concentration. Un effet inhibiteur du glucose a été reporté dans l'étude de Barja et Núñez [1999], mais pour des concentrations au delà de 20 $g.L^{-1}$, quatre fois supérieures à la plus forte dose testée ici. Une carence d'un nutriment autre que le glucose pourrait peut-être expliquer l'inhibition observée. Pour tester cette hypothèse les concentrations en nutriments dans le milieu nutritif pourraient être augmentées (voir en annexe E la composition de la solution Cardiff utilisée). Par ailleurs, les cinétiques observées s'écartent du

comportement du modèle par l'absence de phase de déclin suivant la croissance.

Cinétique de biodégradation pour le rapport substrat/bactéries « de référence »

Les concentrations initiales de la dernière modalité ($Gl_{0,5}B_{-6}$ dans la table 4.2) correspondent aux valeurs prises comme référence dans les scénarios de modélisation et ont pour cela été choisies pour définir le rapport substrat/bactéries de référence pour les autres incubations. La figure 4.7 montre la cinétique de la modalité $Gl_{0,5}B_{-6}$, réalisée en triplicats.

La croissance bactérienne et la consommation du glucose deviennent perceptibles à partir de 20 heures d'incubation. Elles connaissent ensuite une phase exponentielle (jusqu'à environ 36 h), un ralentissement. La décroissance du substrat se poursuit jusqu'en fin d'incubation, aboutissant à une concentration relative finale d'environ 10%. La biomasse se stabilise de 36 à 60 heures puis sa valeur chute de plus d'un ordre de grandeur entre l'avant-dernier et le dernier point de mesure, en l'espace de seulement deux heures. Ce déclin brutal de la biomasse trouve probablement son origine dans le changement de la méthode d'estimation (par dénombrement cellulaire pour la dernière date de mesure, par spectrométrie pour les autres).

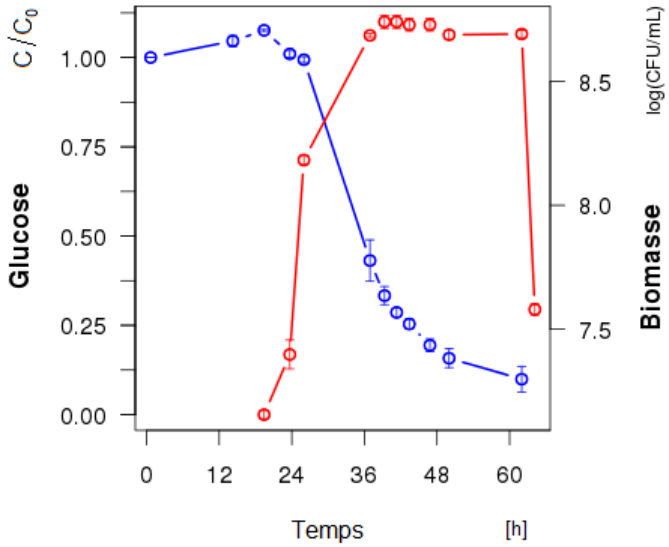


FIGURE 4.7 – **Cinétique de croissance en milieu liquide pour le rapport susbtrat/bactéries de référence** (modalité $Gl_{0,5}B_{-6}$ de la table 4.2.)
La concentration de glucose (bleu) est donnée en masse relative. La concentration cellulaire (rouge), exprimée en CFU.mL^{-1}, a été estimée par dosage spectrométrique à l'exception du dernier point, mesuré par dénombrement.

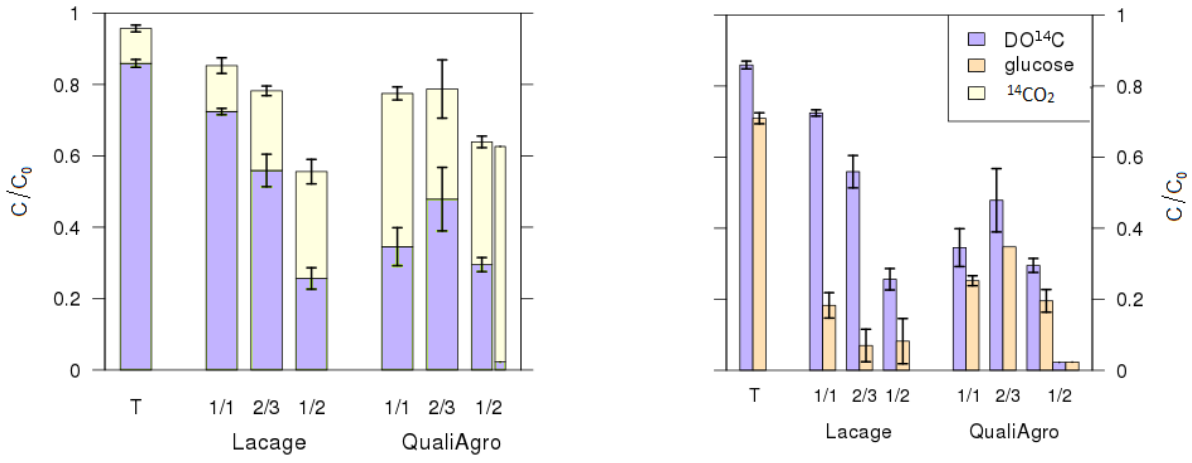
Cette incubation, conçue pour représenter des conditions initiales similaires aux scénarios modélisés dans cette thèse, montre des tendances comparables aux cinétiques simulées : même durée de la période de latence, croissance et consommation de l'essentiel du substrat en une période relativement courte. La comparaison des valeurs de biomasse estimées par numération cellulaire et méthode spectrométrique permet d'estimer indirectement la matière particulaire résiduelle provenant du flux de mortalité dans notre modèle. Cette forme de carbone correspondrait au pool de POC produit les bactéries via le flux d'humification (équation 1.50).

L'apparente cohérence avec le comportement du modèle et la faible variabilité observée (figure 4.7) rendent ce jeu de données exploitable dans une démarche de paramétrisation du modèle, si aucun effet adhésion ne venait à être montré par l'expérimentation en suspension de sol (section 4.1.6). Il manque cependant dans ces données l'information sur l'évolution de la variable CO_2

pour compléter la comparaison entre cinétiques mesurées et simulées et éventuellement utiliser les données expérimentales pour une calibration.

4.2.4 Cinétique de biodégradation du glucose en suspension de sol

Les figures 4.8 et 4.9 retracent l'évolution du glucose dans les différentes modalités d'incubation en suspension de sol. La figure 4.8 montre les concentrations mesurées en fin d'incubation à 6 jours. La figure 4.8a représente les concentrations de $DO^{14}C$ et $^{14}CO_2$ cumulé. L'écart entre le ^{14}C apporté et la somme de ces deux pools permet de déduire la part du carbone non-extractible, représentant à la fois le ^{14}C des cellules microbiennes et du ^{14}C sous forme insoluble (POC dans notre modèle). La figure 4.8b renseigne sur la partition du $DO^{14}C$ entre substrat d'origine et composés solubles issus de sa transformation. Toutefois, des incertitudes élevées liées à la méthode de dosage du glucose (impliquant une dilution importante des extraits, pour le domaine de concentrations mesurées) confère à cette donnée une valeur essentiellement indicative. La figure 4.9 montre la cinétique d'émission du $^{14}CO_2$ au cours de l'incubation.



(a) (b)

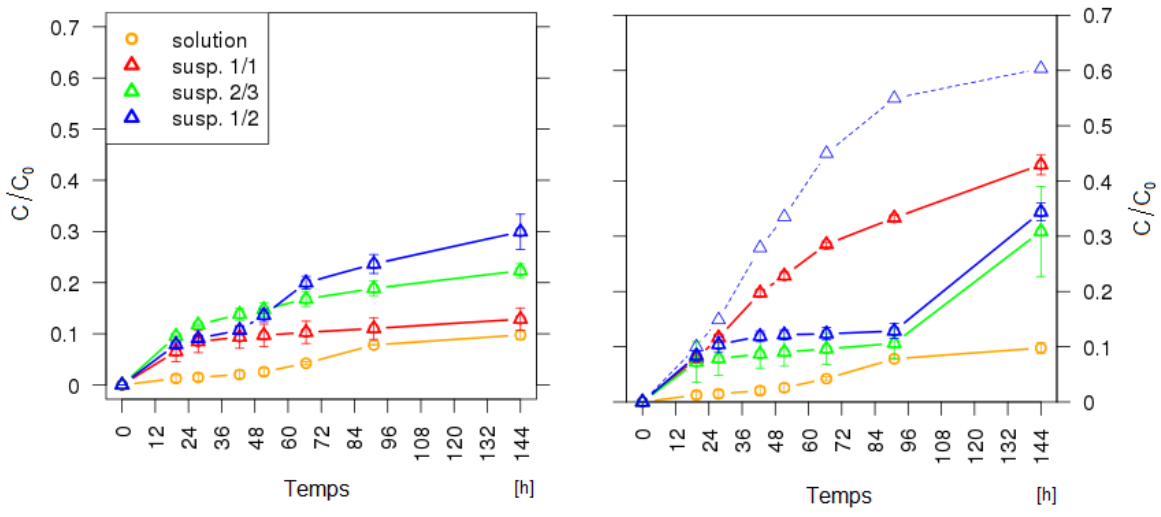
FIGURE 4.8 – **Bilan de masse partiel en fin d'incubation** (a.) **et comparaison entre teneurs en ^{14}C extrait et en glucose** (b.) dans le témoin en solution (T) et les sols de La Cage et QualiAgro pour différents rapports massiques sol/liquide (1, 2/3, 1/2).
Une répétition de la modalité (QualiAgro, 1/2) est montrée séparément car trop différente des deux autres.

Les concentrations finales élevées de $DO^{14}C$ et de glucose (85% et 72% de l'apport, respectivement) indiquent qu'une faible proportion de substrat a été consommée par les bactéries en 6 jours dans la modalité témoin (figure 4.8b). La respiration montre un démarrage tardif (environ 48h) et ne connait pas de phase d'accélération marquée (figure 4.9). Elle aboutit à une valeur de 10% en fin d'incubation. Une part minime du substrat est converti en POC (figure 4.8a).

Les résultats d'incubation en suspension montrent une grande variabilité. La dynamique est de manière générale plus intense que dans le témoin, puisque le $DO^{14}C$ restant en fin d'incubation est moins abondant (3 à 72% de l'apport initial, (figure 4.8a). Une part importante du carbone consommé est minéralisé : le $^{14}CO_2$ cumulé compte pour 11 à 60% de l'apport. Une production conséquente de carbone non-extractible est observée dans toutes les modalités de suspensions [15-43%] et les écarts importants estimés entre les concentrations de $DO^{14}C$ et de glucose dans certaines modalités (celles du sol de La Cage) dénotent aussi la production de composés solubles issus de la transformation du substrat.

Les modalités en suspension se distinguent également du témoin par la cinétique de respiration. Celle-ci montre un démarrage précoce avec un cumul de $^{14}CO_2$ conséquent ($\approx 10\%$) dès la première

date de mesure (18h). La courbe de respiration peut prendre deux allures différentes : logarithmique ou « en escalier » avec deux phases distinctes d'accélération.



(a) (b)

FIGURE 4.9 – **Cinétique du minéralisation du glucose ^{14}C dans le témoin en solution et pour les modalités en suspension de sol**, pour les sols de l'essai La Cage (a.) et de l'essai QualiAgro (b.) et pour différents rapport massique sol/liquide (1, 2/3, 1/2).
Une répétition au comportement radicalement différent des autres pour la modalité QualiAgro, rapport solide/liquide 1/2 est montrée séparément (traits pointillés bleus).

Les concentrations initiales ont été choisies de manière à garder un rapport substrat/bactéries constant (similaire à la modalité $Gl_{0,5}B_{-6}$ des incubations en solution) malgré un volume liquide différent entre les modalités. Les concentrations varient entre les modalités et sont d'un à deux ordres de grandeur supérieures aux valeurs de l'incubation en milieu liquide (voir tables 4.3 et 4.2).

Une faible croissance bactérienne est suggérée pour le témoin de l'expérimentation présentée ici, pour lequel la plupart du glucose injecté est retrouvé après six jours d'incubation. On assiste à une inhibition de la biodégradation comme dans l'incubation en milieu liquide, pour les concentrations de glucose les plus élevées (voir section précédente). L'inhibition est ici plus forte en proportion, car la concentration initiale en glucose est plus élevée que dans les incubations de la table 4.2.

Les modalités en suspension présentent des différences importantes dans la cinétique de minéralisation – caractérisée notamment par l'absence de phase de latence – et dans la partition finale du ^{14}C (production de composés solubles et insolubles négligeable pour le témoin en solution). Elles montrent également une grande variabilité.

L'origine de ces comportements atypiques et de cette grande variabilité est vraisemblablement liée au mode de prétraitement du sol utilisé dans les suspensions. Le sol avait été stérilisé puis rincé quelques jours avant les incubations, sans être stérilisé à nouveau. Les résultats de vérification de l'expérimentation de rinçage (section 4.2.2, figure 4.5) ont montré *a posteriori* que le rinçage était source de contamination microbienne. Le sol comportait donc une biomasse préétablie, ni quantifiée ni caractérisée, capable de prélever massivement et sans délai le substrat apporté.

Les résultats décrits ici ne permettent pas de conclure quant à l'impact des particules de sol sur l'activité des bactéries. Les cinétiques observées entre suspensions et solutions sont notoirement différentes, mais cette divergence peut être attribuée à plusieurs facteurs non contrôlés liés à une contamination microbienne.

Pour mettre en évidence un éventuel effet de l'adhésion des bactéries sur des particules, les conditions de stérilité devraient être strictement contrôlées. Le prétraitement du sol par rinçage tel qu'il a été réalisé, est à proscrire. L'usage de sol stérilisé mais non rincé est préférable, bien qu'il apporte une source de carbone soluble labile pouvant concurrencer la consommation du glucose marqué, donc altérer indirectement sa cinétique de minéralisation. Le risque de contamination microbienne et les sources de substrats non désirées pourraient être plus facilement contrôlées en utilisant un mélange synthétique (phyllosilicates et sables purifiés) plutôt que du sol. Ainsi, l'influence des particules n'interviendrait qu'en tant que support pour l'attachement des bactéries. De plus, pour faciliter la comparaison entre cinétique en milieu liquide et en suspension, les mêmes concentrations initiales dans la phase liquide devront être utilisées. La biomasse et le ^{14}C non extractible devront être mesurés pour vérifier l'évolution de tous les pools impliqués.

4.2.5 Cinétique de biodégradation du glucose en milieu structuré

L'expérimentation visait à tester l'influence du potentiel hydrique, évaluée pour trois valeurs (h=-5, -20 et -100 cm) sur la biodégradation de glucose ^{14}C par des bactéries, tous deux apportés aux extrémités opposées d'un milieu hétérogène composé d'agrégats compactés. Les agrégats utilisés avaient subi un prétraitement consistant en une succession de d'étapes de stérilisation - rinçage - stérilisation. L'incubation comprenait onze échantillons : trois modalités mesurées à trois dates de sacrifice et une modalité témoin mesurée aux deux dernières dates seulement. Ces échantillons seront désignés par la lettre T pour le témoin ou B pour les modalités inoculées en bactéries, suivie d'un indice lettrique *i, m* ou *f* indiquant le temps de mesure (initial, intermédiaire ou final) et d'un indice numérique 5, 20 ou 100 (pour les potentiels h=-5, -20 et -100 cm).

Sources d'incertitudes sur les conditions expérimentales et les valeurs mesurées Plusieurs points critiques ou lacunes sont susceptibles de biaiser les résultats décrits ultérieurement :

– Difficulté d'établir et de maintenir le potentiel hydrique désiré

La table 4.4 donne les valeurs des masses humides et les teneurs en eau des échantillons de chaque modalité, à chaque date de sacrifice. Il faut tout d'abord noter que les teneurs en eau sont calculées d'après la même valeur de masse sèche (49,5 g) qui représente la masse théorique mais peut varier légèrement entre les échantillons. Les valeurs maximales et minimales de teneur en eau sont toutes deux trouvées pour des échantillons au potentiel hydrique h=-100 cm ($B_{i,100}$ et $B_{f,100}$). L'ajustement du potentiel pour l'échantillon $B_{i,100}$ avait échoué : une rupture de la dépression imposée avait eu lieu pendant l'ajustement du potentiel, manifestement trop rapide. La très faible teneur en eau pour l'échantillon $B_{f,100}$ à la date finale traduit cette fois-ci la difficulté à maintenir le potentiel initial pendant tout le temps de l'incubation (des bulles d'air occupant toute la section du tuyau sont apparues après quelques jours, rompant la connexion hydraulique entre l'échantillon de sol et le réservoir d'eau).

Les teneurs en eau enregistrées ici sont toutes en deçà des valeurs obtenues lors de l'évaluation de la caractéristique de rétention (section 4.2.1) et elles ne discriminent pas les modalités.

	Masse fraîche g				**Teneur en eau pondérale** $g.g^{-1}$			
Date de mesure	B_5	B_{20}	B_{100}	T_{20}	h_5	h_{20}	h_{100}	T_{20}
initiale	60,34	60,12	65,70	*NM*	0,22	0,21	0,33	*NM*
intermédiaire	60,11	58,44	58,08	58,79	0,21	0,18	0,17	0,19
finale	63,78	60,35	56,97	59,82	0,29	0,22	0,15	0,21

TABLE 4.4 – **Masses fraiches et teneur en eau massique des échantillons entiers.**
Les pesées ont été faites avant découpe. La teneur en eau est calculée d'après la masse sèche théorique (49,5 g). L'annotation *NM* désigne les points non mesurés.

– Absence d'évaluation de la variabilité expérimentale

Les modalités ont été réalisées sans répétition. Il n'est donc pas possible d'attribuer les différences de teneur en eau et de concentrations mesurées à l'effet du traitement ou à la seule variabilité expérimentale.

– Imprécisions liées aux pertes massiques pendant les mesures destructives

Des pertes de matière ont eu lieu lors de la découpe des tranches et lors de leur transfert dans les flacons d'extraction. La radioactivité comptée dans les extraits et les teneurs échantillons sont donc minorées de ce fait. Pour tenter de limiter ce biais, les résultats bruts ont été réévalués grâce à l'emploi d'un facteur correctif égal au rapport entre masse du culot de centrifugation après séchage et masse sèche initiale théorique (49,5 g).

– Découpe irrégulière des échantillons

La découpe des échantillons s'est avérée très délicate du fait de l'état collant ou friable de la galette selon son humidité. La distribution de la masse entre les trois tranches apparaît donc systématiquement inégale (figure 4.10), avec la tranche basse systématiquement sur-représentée au détriment des tranches médiane et haute. La répartition spatiale des différents compartiments décrite plus loin sera donc légèrement faussée de ce fait.

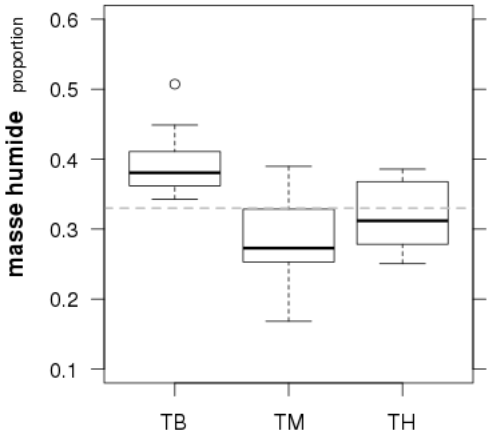


FIGURE 4.10 – **Répartition des masses humides dans les tranches** basse (TB), médiane (TM) et haute (TH) après découpe.

– Lancement décalé des incubations

Le protocole de préparation des incubations s'est avéré long, contraignant et minutieux (cf annexe H). Le lancement des incubations a donc été programmé à des dates différentes, pour un ou deux échantillons à chaque fois. Un nouvel inoculum a été préparé à chaque date de lancement, impliquant de légères différences de concentration de bactéries, dues à la méthode de dosage spectrométrique peu précise (section I.1.2 en annexe).

– Défaut de bilan de masse systématique

Les bilans de masse ^{14}C obtenus sont systématiquement déficitaires, de 6 à 47%, en moyenne 22% (voir figure 4.11). Par ailleurs, les résultats bruts de l'estimation du ^{14}C non extractible, dans la phase solide comportaient souvent des valeurs négatives. L'estimation de ce compartiment dépendant de celui de la phase extraite : la teneur en $DO^{14}C$ du volume résiduel liquide laissé au moment de la séparation des deux phases est déduite des teneurs du culot de centrifugation obtenue par oxydation catalytique après séchage (section I.4.1 en annexe). La déshydratation totale des échantillons était atteinte après plusieurs jours de séchage en étuve à 30°C. Il est possible qu'une partie des composés dans les culots (composés non extractibles ou présents dans le liquide

résiduel) ait été minéralisée pendant le séchage réalisé à une température favorable à la croissance de nombreux microorganismes. Cette minéralisation non comptabilisée pourrait expliquer les faibles teneurs obtenues après combustion. Les concentrations dans la phase solide seraient alors sous-estimées. Ce risque pourra facilement être évité à l'avenir en augmentant la température de séchage.

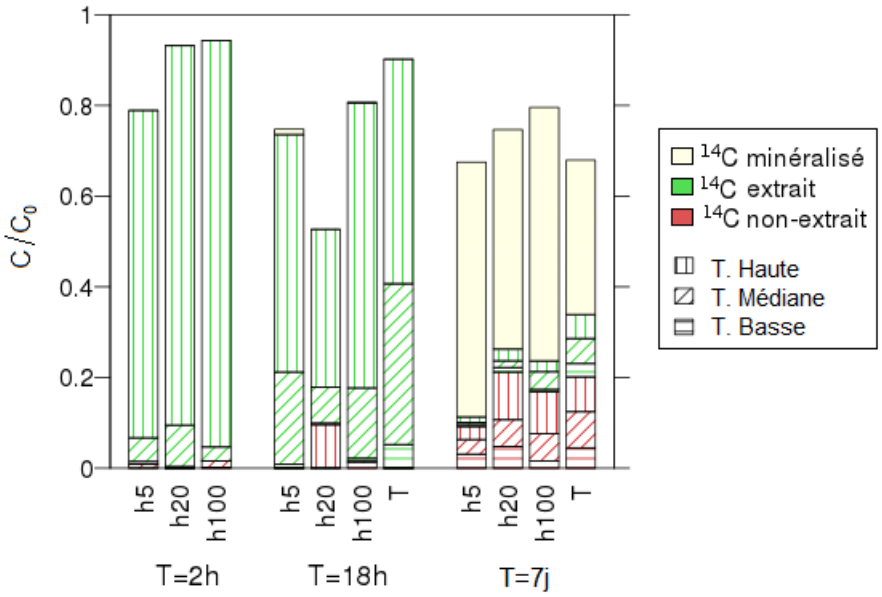


FIGURE 4.11 – **Bilans de masse** pour les trois modalités de potentiel (h=-5, h=-20, h=-100 cm) à 2, 18 et 175 heures, estimé d'après la radioactivité relative de chaque compartiment, dans chaque tranche.

Conditions initiales La première date de mesure (deux heures après le lancement) a été décidée pour tenter de rendre compte des conditions initiales de l'expérimentation, essentielles pour interpréter ensuite les résultats cinétiques.

La quasi-totalité du ^{14}C détecté appartient à la phase extraite (figure 4.11) : le ^{14}C est présent dans la phase solide à l'état de trace et l'émission de $^{14}CO_2$ n'est pas détectable aussitôt après le début de l'incubation. Les quantités totales (par échantillon et non par tranche) en DO^{14}C et en glucose sont similaires et proches de la quantité de substrat théoriquement apportée (figure 4.12), sauf pour l'échantillon $B_{i,5}$ qui obtient un écart de 17% entre mesures de DO^{14}C et de glucose et un défaut de bilan de 22%. Les écarts observés entre DO^{14}C et glucose sont supposés provenir des sensibilités très différentes des deux méthodes de mesure (mesure de la radioactivité du DO^{14}C par comptage des scintillations liquides et dosage colorimétrique du glucose). Le DO^{14}C et le glucose se répartissent selon un gradient décroissant de haut en bas (figures 4.12 et 4.13).

La distribution de la biomasse est mise en regard avec celle du substrat dans la figure 4.13. L'un des échantillons (h_{100}) montre un niveau de biomasse plus élevé que les deux autres. La distribution de la biomasse suit dans les trois échantillons un gradient décroissant de bas en haut. La biomasse n'est donc pas absente de la tranche haute mais plus faible de deux ordres de grandeur par rapport à la tranche basse dans laquelle est a été inoculée.

Les conditions initiales n'impliquent donc pas une déconnexion spatiale véritable entre substrat et décomposeurs mais des gradients de concentration opposés. Le transfert du substrat de la face supérieure de la galette à la tranche médiane s'explique par l'infiltration des gouttelettes au moment de l'apport, suivie par de la diffusion pendant les deux heures qui suivent l'apport. La biomasse peu abondante mais tout de même présente dans la partie supérieure de la galette peut quant à elle

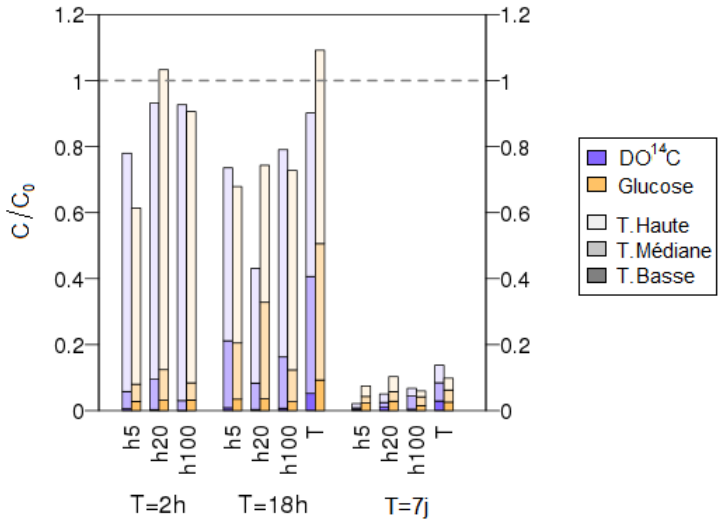


FIGURE 4.12 – **Comparaison des teneurs et distributions spatiales du ^{14}C extrait et du glucose**.

avoir été entraînée par le flux hydrique ascendant induit par l'humectation de l'échantillon suivant l'inoculation (voir annexe H).

Évolution de la répartition du carbone entre pools et dans l'espace A 18 heures, les concentrations dans la phase extraite (glucose et DO^{14}C) sont proches des concentrations initiales pour le témoin ($T_{m,20}$) mais inférieures pour les échantillons inoculés (figure 4.12). La masse de glucose n'atteint que 68 à 72% de l'apport théorique pour $B_{m,5}$, $B_{m,20}$, $B_{m,100}$. Les masses relatives de glucose et de DO^{14}C sont semblables sauf pour l'échantillon $B_{m,20}$, qui présente un défaut de bilan de masse élevé (47%) suggérant une erreur dans la mesure du DO^{14}C pour cet échantillon. Le gradient de concentration est atténué par rapport aux conditions initiales, avec une redistribution du carbone soluble entre tranches supérieure et médiane (figure 4.13). Pour toutes les modalités, les teneurs extraites chutent pour le dernier point de mesure après sept jours d'incubation (figure 4.12). Les concentrations de DO^{14}C atteintes sont très faibles (de 2% pour $B_{f,5}$ à 13% pour $T_{f,20}$) et sont équivalentes entre les tranches. La disparition de la majeure partie du substrat dans la modalité témoin signale une contamination par des microorganismes allochtone.

Une élévation du niveau global de biomasse apparaît dans tous les échantillons inoculés après 18 heures d'incubation (figure 4.13). La concentration cellulaire augmente d'environ trois ordres de grandeur par rapport aux conditions initiales. Cet accroissement moyen s'accompagne d'une atténuation plus ou moins franche du gradient initial de concentration. La croissance et la modification de la distribution initiale sont les plus soutenues dans l'échantillon $B_{m,5}$ et les plus modérées pour $B_{m,20}$.

La biomasse continue d'augmenter entre 18 heures et sept jours d'incubation mais dans une proportion moindre qu'entre les deux premières dates de mesures. La hiérarchie constatée entre les modalités au pas de temps précédent est conservée après sept jours. L'écart de concentrations entre les tranches inférieure et supérieure est rattrapé et s'inverse même pour l'un des échantillons ($B_{f,100}$).

Les teneurs en ^{14}C dans la phase solide sont montrées dans la figure 4.11. Ces teneurs deviennent conséquentes seulement au dernier pas de temps pour toutes les modalités. L'activité dans la phase solide représente 9, 21 et 17% de l'apport initial pour les modalités $B_{f,5}$, $B_{f,20}$ et $B_{f,100}$ respectivement, 10% pour le témoin. La répartition semble environ égale entre les tranches.

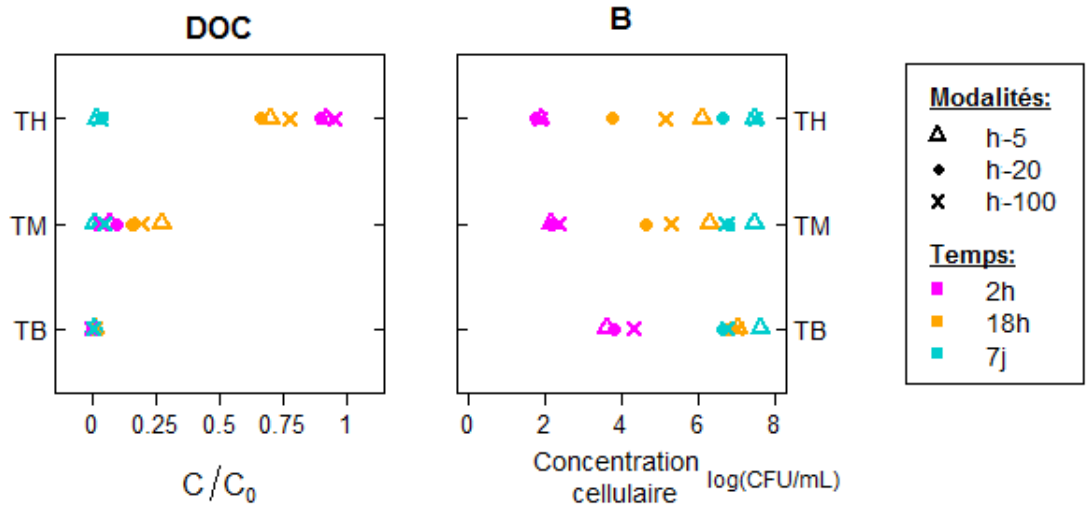


FIGURE 4.13 – **Répartitions comparées du substrat (gauche) et de la biomasse (droite)** par tranche à 2, 18 heures et 7 jours
TB : tranche basse, TM : tranche médiane, TH : tranche haute

L'échantillon $B_{m,20}$ sacrifié à 18h se distingue également par une quantité importante de ^{14}C non extractible (10%). Ce résultat provient très probablement de la sous-estimation du DO^{14}C relatée plus haut.

Comme le ^{14}C pour la phase solide, le ^{14}C de la phase gazeuse constitue une part importante du bilan de masse, pour la dernière date de mesure uniquement (figure 4.11). En fin d'incubation, 48% ($B_{f,20}$) à 56% ($B_{f,5}$ et $B_{f,100}$) du substrat a été minéralisé dans les échantillons inoculés, et 34% dans le témoin. La modalité qui montre la valeur finale la plus élevée, $B_{f,5}$, est aussi la seule pour qui la minéralisation cumulée est perceptible le plus tôt (dès 18 heures).

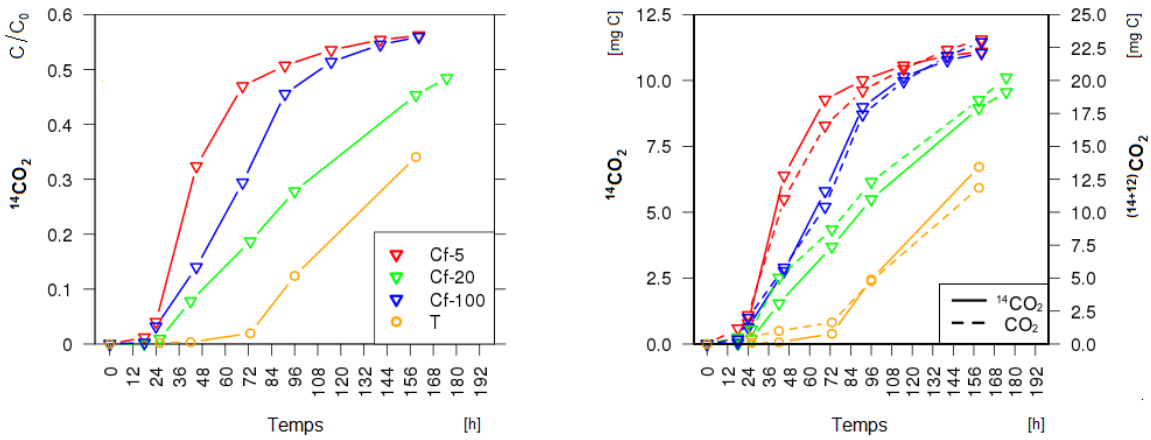
Le cumul de tous les pools de ^{14}C montre un défaut de bilan allant de 6% à 47% (ou 33% si l'on écarte l'échantillon $B_{m,20}$ pour lequel des erreurs expérimentales importantes sont soupçonnées).

Cinétique de minéralisation du glucose ^{14}C et du carbone organique total La cinétique de minéralisation du glucose radiomarqué et du carbone organique total sont illustrées dans les figures 4.14a et 4.14b, en traits pleins et pointillés respectivement.

La minéralisation du glucose ^{14}C exprimée en masse de carbone est calculée d'après l'activité relative et la masse initiale de glucose. La minéralisation du carbone total (^{14}C et ^{12}C) est directement mesurée par analyseur de CO_2 (voir section I.3.2 en annexe). Pour chaque modalité, les courbes de minéralisation ^{14}C et C total ont quasiment la même allure et ne diffèrent que par leurs valeurs, d'un facteur 2. Ceci suggère que la biomasse utilise pour sa croissance une autre source de carbone possédant des propriétés similaires par rapport au glucose puisqu'elle est minéralisée à la même vitesse, et présente dans les mêmes proportions.

Le témoin – contaminé d'après la figure 4.12 – se démarque des trois autres échantillons par un démarrage beaucoup plus tardif de la minéralisation du substrat ^{14}C. La production est négligeable jusqu'au point de mesure à 72 heures.

Deux types de cinétique se distinguent : les échantillons $B_{f,5}$ et $B_{f,100}$ montrent une accumulation exponentielle du $^{14}CO_2$ suivie d'un ralentissement en fin de cinétique. Ces deux échantillons atteignent un cumul équivalent malgré un démarrage plus précoce (18 heures) et une vitesse initiale plus soutenue pour l'échantillon $B_{f,5}$. L'échantillon $B_{f,20}$ montre lui une minéralisation plus lente et non limitée en fin d'incubation. Cette cinétique ressemble à celle du témoin et ne diffère que par la période de latence plus courte (26 heures).



(a) (b)

FIGURE 4.14 – **Cinétique de minéralisation du glucose marqué** (a. et b.) **et du carbone organique total** (b.) pour chaque échantillon représentant une modalité de potentiel
Les valeurs de $^{14}CO_2$ sont exprimées en radioactivité relative (a.), converties en concentration de carbone et comparées aux mesures de CO_2 total (b.)

L'apport non colocalisé du substrat et de l'inocolum ont permis d'obtenir des conditions initiales contrastées observées deux heures après le lancement de l'incubation. A 2 heures, les bactéries et le substrat apparaissent distribués selon des gradients de concentration opposés, sans véritable déconnexion spatiale. Cette distribution en gradient pour le glucose en début d'incubation est uniquement due à la propagation du substrat, supposée principalement par diffusion. Celle de la biomasse témoigne de mouvements non attendus. L'inoculation intervient avant l'ajustement du potentiel qui comporte une phase de saturation puis de désaturation de la galette. Ces flux ascendants puis descendants sont manifestement la cause du déplacement des bactéries pendant les 2 premières heures (l'influence de la migration active des bactéries est supposée négligeable pour un délai aussi court).

La deuxième date de mesure destructive (18 heures) montre un déclin du substrat et une augmentation de la biomasse suggérant l'influence de la consommation par les bactéries et le début de la croissance. La biomasse est alors toujours plus importante en bas de l'échantillon, proche de son emplacement initial. Elle altère la distribution du glucose en formant un puits de carbone principalement localisé en bas de la colonne. Une homogénéisation du gradient de biomasse, plus ou moins avancée selon les modalités, semble être en cours dès 18 heures. L'évolution de la distribution spatiale pourrait être due à une plus forte stimulation de la croissance en haut de la galette où le substrat est plus concentré, ou au déplacement des cellules par migration. La dernière date de mesure fait état de la disparition de la plupart du substrat et d'une répartition uniforme de la biomasse. La courte durée de la latence et la respiration importante tout au long de l'incubation suggèrent des conditions peu contraignantes en termes d'accessibilité. Les échantillons montrent des différences dans la cinétique de minéralisation et dans la concentration finale de la biomasse. L'absence de répétition et les incertitudes sur les conditions hydriques dans les échantillons ne permettent pas de conclure quant à l'effet du traitement, le potentiel hydrique.

Cette expérimentation a montré son potentiel pour imposer et suivre des processus de biodégradation spatialisés dans un milieu structuré. Nous avons pu imposer des conditions initiales contrastées, bien que moins extrêmes que celles que nous visions. Nous avons pu suivre l'évolution spatiale et temporelle du substrat et des bactéries, comme il est possible de le faire avec notre modèle.

Cependant les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un effet des conditions physiques

sur la cinétiques de biodégradation. Une meilleure maîtrise des conditions hydriques imposées dans les microcosmes et la réalisation de répétitions sont indispensables. Par ailleurs, le protocole d'inoculation de la biomasse doit impérativement être changé pour éviter l'influence de flux convectifs parasites avant même l'initiation de l'incubation. Les bactéries devront être apportées après et non avant l'ajustement du potentiel hydrique, au même moment que l'apport du substrat marquant le début de l'incubation.

4.3 Discussion

Des expérimentations ont été conçues pour vérifier nos hypothèses de travail et pour appuyer le développement de notre modèle par la production de données pour sa paramétrisation et sa validation. Les protocoles ont été imaginés pour prendre en compte un grand nombre de contraintes et ont mis en jeu des équipements et méthodes peu usuels (microcosmes avec ajustement du potentiel hydrique, systèmes de rinçage). Vérifier la faisabilité et constater les limites scientifiques et pratiques de ces méthodes constituait déjà un premier pas important.

Différentes sources d'erreurs limitent les possibilités d'interprétation en termes de fonctionnement biophysique des systèmes étudiés. Certaines tendances esquissées méritent tout de même d'être rapportées :

- Les cinétiques mesurées en milieu liquide semblent trahir un comportement vis-à-vis de la concentration en substrat en désaccord avec les hypothèses du modèle. La croissance est apparue limitée malgré un substrat abondant alors que le modèle aurait au contraire prévu une stimulation de la croissance aboutissant à l'épuisement de la ressource.
- Le fonctionnement microbien en suspension – l'autre milieu testé considéré comme optimal en termes d'accessibilité physique – semble différent de ce qu'il a été observé en solution. En particulier, la limitation de la croissance en présence de substrat abondant n'a pas été constatée.

Pour renforcer la portée des résultats obtenus dans les différents expérimentations, certains points de méthode pourront facilement être corrigés. Par exemple, l'expérimentation de paramétrisation pourrait tout simplement être recommencée avec des agrégats stérilisés (c'est-à-dire en supprimant le prétraitement de rinçage du carbone organique dissous). Toutefois, la performance d'une méthode dans son ensemble dépend aussi beaucoup de la facilité de sa mise en œuvre. Les nombreuses exigences que nous avons voulu respecter dans l'expérimentation de validation en particulier, ont rendu sa réalisation très lourde et ainsi réduit ses chances de succès. Ces exigences doivent être hiérarchisées selon nos objectifs et nos principaux choix doivent être réévalués :

Choix de l'échelle Nous avons tenté d'imposer et de suivre des processus spatialisés sur une distance de 21 mm. L'échelle millimétrique est assez souvent employée dans les travaux étudiant la distribution hétérogène de l'activité microbienne et son contrôle physique [Dechesne et al., 2010; Monard et al., 2012; Pinheiro et al., 2015; Poll et al., 2010]. Cette distance peut tout de même être jugée courte étant donnée la faible précision de notre mode d'apport des substrat et inoculum, et celle de notre mode de suivi spatialisé (découpe irrégulière des tranches). Un milieu plus grand nous permettrait d'imposer et de suivre plus facilement des conditions contrastées entre les trois tranches.

La contrainte sur la taille du milieu est imposée par notre approche de modélisation. La distance de 21 mm était vue comme maximale pour permettre de décrire l'espace poral avec une résolution relativement importante. Nous envisagions ainsi d'utiliser des images tomographiques de nos milieux hétérogènes avec une résolution de 4,6 μm à cet effet (voir chapitre 5).

Choix de la méthode d'ajustement du potentiel hydrique La simulation de la répartition hétérogène de l'eau dans les pores à saturation partielle est un point fort de notre modèle.

Souvent, le potentiel hydrique dans les incubations est imposé en ajustant la teneur en eau de manière à se placer sur un point donné de la caractéristique de rétention (voir par exemple Ruamps et al. [2013]). Cette méthode ne permet pas de prédire la pression à l'échelle des pores. Elle ne serait donc pas cohérente avec notre approche de modélisation.

L'emploi des microcosme à plaque poreuse s'avère donc une solution pertinente. Cependant notre méthode d'ajustement du potentiel par l'équilibration de la charge hydraulique pose deux problèmes majeurs. D'une part les étapes de saturation puis de désaturation ont impliqué des flux convectifs qui ont altéré la distribution initiale des bactéries. D'autre part, la délicatesse requise lors du montage du dispositif de succion est difficilement compatible avec les autres contraintes du protocole (notamment la rapidité d'exécution demandée pour suivre une cinétique courte, les contraintes spatiales pour l'opérateur liées au travail en conditions stériles). Les microcosmes utilisés dans ce travail sont inspirés des dispositifs de Poll et al. [2010] adaptés à un système de dépression par aspiration. Ce système est plus facile à manipuler mais ne permet pas d'obtenir avec précision des potentiels proches de la saturation, correspondant au domaine exploré dans le cadre de cette thèse. Trouver une méthode alternative performante aux bas potentiels améliorerait considérablement la qualité et la robustesse des résultats.

Choix des microorganismes et du substrat Nous avons choisi le glucose comme substrat et une souche bactérienne pure, nous plaçant dans des conditions similaires aux scénarios simulés au cours de cette thèse. Ce choix est lourd de conséquences sur les conditions de la manipulation. Le glucose est universellement consommé par les microorganismes et possède une cinétique de minéralisation très rapide. La première caractéristique favorise les contaminations et oblige donc à prendre toutes les précautions nécessaires pour travailler en conditions stériles. La seconde complique le suivi temporel par la brièveté de la cinétique. Choisir un substrat soluble avec une dégradation plus lente et spécifique limiterait le risque de consommation et permettrait un échantillonnage plus complet plus espacé dans le temps. La cinétique de biodégradation du pesticide soluble 2,4-D par une flore indigène compétente a ainsi été suivie pendant 14 jours par Pinheiro et al. [2015].

Choix du milieu Nous avons choisi des agrégats compactés stérilisés, milieu proche des conditions du sol mais laissant la possibilité de contrôler certaines propriétés de structure. Les sources de substrat et les risques de contamination sont difficiles à maîtriser dans ce milieu du fait de l'abondance de carbone soluble d'origine microbienne, libéré lors de la stérilisation. L'apport abondant et spatialement homogène de cette ressource labile peut fausser la cinétique de biodégradation du substrat suivi et peut favoriser les contaminations. Les études imposant des processus microbiologiques spatialisés emploient souvent des systèmes plus simples permettant d'agir spécifiquement sur la structure sans impliquer d'autres facteurs pouvant influencer l'activité microbienne. Ces milieux – microcosmes de sable [Dechesne et al., 2010; Treves et al., 2003] ou systèmes complètement artificiels [Dechesne et al., 2008; Kim et al., 2008] – limitent en revanche les possibilités d'étudier des caractéristiques morphologiques complexes provenant de tailles et formes de pores variées. Une bonne alternative à nos galettes d'agrégats naturels pourrait consister en l'emploi de galettes équivalentes construites avec des agrégats artificiels, produits à partir de mélanges de fractions minérales pures selon le protocole de Guenet et al. [2011].

Chapitre 5

Confrontation entre modèle et expérimentation : incubations en milieu structuré

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté une expérimentation imaginée pour tester l'hypothèse d'accessibilité physique et valider notre modèle (section 4.1.7). Les résultats de cette expérimentation ne se sont pas révélés suffisamment robustes pour être employés à cette fin (section 4.2.5). En dépit de cela, nous avons souhaité parachever notre démarche en tentant de reproduire virtuellement l'expérience réalisée au laboratoire.

La confrontation entre modèle et expérimentation nous semble constructive à plusieurs égards. Elle participe à une démarche d'amélioration continue de la méthode, aussi bien expérimentale que numérique. Le fait de convertir l'expérience réelle en une expérience virtuelle permet d'« incarner » les scénarios de modélisation. Cette démarche oblige à se poser des questions au cours de la construction des scénarios qui n'auraient pas forcément émergé dans une réflexion sans référence à une expérimentation concrète. La modélisation de systèmes expérimentaux peut donc aider le modélisateur à rendre sa description plus précise, moins détachée des conditions matérielles. La mise en regard des systèmes expérimentaux et virtuels peut aussi apporter des éléments de perfectionnement de la méthode expérimentale. Elle peut notamment révéler des points du protocole à modifier pour obtenir une meilleure adéquation entre expérimentation et simulation, ou souligner des aspects importants nécessitant un suivi intensifié.

De manière plus générale, même sans atteindre l'objectif de validation par une comparaison quantitative, la comparaison des tendances simulées et observées permet d'apprécier la pertinence du modèle. Des comportements profondément différents peuvent révéler des processus mal pris en compte ou omis dans le modèle et aider à formuler de nouvelles hypothèses à tester après sa modification. La confrontation entre modèle et expérimentation devrait être la dernière étape d'un processus itératif – la construction d'un modèle – permettant de progresser dans la compréhension d'un système par la remise en cause et l'amélioration perpétuelles du modèle, vu comme outil d'exploration.

Ce chapitre présente la méthode employée pour retracer les conditions de l'expérimentation décrite dans la section 4.2.5 du chapitre précédent. Brièvement, il s'agit de l'incubation d'un substrat soluble et d'une souche bactérienne apportés aux extrémités verticalement opposées de milieux structurés, composés d'agrégats de sol compactés. L'évolution de la distribution spatiale des bactéries et du substrat a été suivie grâce à des mesures destructives après découpe de l'échantillon en trois tranches, réalisées à trois dates (2h, 18h et 7j). Trois modalités se distinguent par leur valeur

de potentiel hydrique (h=-5, -20 et -100 cm). Elles ont été réalisées pour mettre en évidence un éventuel effet de la structure sur la cinétique, par le biais notamment de l'altération du temps de diffusion du substrat dans la phase aqueuse.

L'organisation spatiale des milieux poreux a pu être visualisée par microtomographie aux rayons X, dans le cadre d'un travail spécifiquement consacré à la détection des interfaces entre l'eau et l'air [Pot et al., 2015]. Les échantillons ont été conditionnés selon les mêmes protocoles (construction de la structure et ajustement du potentiel) et ont été soumis à deux des potentiels hydriques imposés dans l'incubation précédemment décrite : h=-5 cm et h=-20 cm. L'acquisition des images n'a pas été menée sur la dernière modalité de l'incubation, caractérisée par les conditions les plus sèches. En effet, les interfaces eau-air sont supposés majoritairement trop fins à ce potentiel pour être visualisés à la résolution de travail de cette étude (4,6 μm).

Nous nous sommes donc appliqués à reproduire grâce à notre modèle l'expérimentation dans deux modalités : h=-5 cm et h=-20 cm, notées h_{-5} et h_{-20} respectivement. Les milieux poreux implémentés dans le modèle ont été construits à partir d'images tomographiques, desquelles la topologie des phases poreuse et aqueuse ont été extraites. Ce chapitre décrit les étapes d'acquisition des images par microtomographie aux rayons X (après une courte introduction aux principes de cette technologie) et de remodelage de ces images en vue de leur implémentation puis de la simulation de la biodégradation selon les conditions de l'incubation. Il se termine par la comparaison des résultats modélisés aux données expérimentales.

5.1 Production des images discrètes approximant la structure des milieux d'incubation

5.1.1 Généralités sur la microtomographie aux rayons X

La tomographie aux rayons X à transmission est une approche optique non-destructive, permettant de visualiser la structure interne d'un objet opaque. Elle repose sur la mesure de l'atténuation d'un rayonnement traversant cet objet, qui résulte des interactions entre les photons incidents et le matériau irradié. L'atténuation (écart entre I, l'intensité du rayonnement sortant de l'objet et I_0, l'intensité incidente) suit la loi de Beer-Lambert (équation 5.1).

$$I = I_0 \exp(-\mu x) \tag{5.1}$$

où x est une distance (l'épaisseur de l'objet), et μ est le coefficient d'atténuation linéaire. Le coefficient d'atténuation linéaire est fonction de la composition du matériau et du niveau d'énergie du rayonnement. Les applications en tomographie utilisent un rayonnement suffisamment énergétique pour traverser des objets opaques sur toute leur épaisseur et être partiellement transmis aux détecteurs. La tomographie vise à extraire le coefficient d'atténuation en chaque point de mesure d'intensité pour déduire la nature du matériau en ce point.

Le coefficient d'atténuation linéaire est fonction du numéro atomique moyen (Z) et de la densité moyenne (ρ) des matériaux présents dans la surface projetée représentée par un point [Taina et al., 2008; Wildenschild et al., 2002]. Pour le domaine du spectre électromagnétique utilisé en tomographie (de l'ordre de 10^3 à 10^6 électron-Volt) deux processus optiques déterminent l'atténuation : l'absorption photo-électrique et la diffusion de Compton [Ketcham et Carlson, 2001; Wildenschild et al., 2002]. L'absorption photo-électrique désigne le transfert total de l'énergie d'un photon vers un électron de couche interne d'un matériau scanné [Ketcham et Carlson, 2001]. Dans la diffusion de Compton, l'énergie du photon n'est que partiellement transmise à un électron de couche externe. Cette perte d'énergie s'accompagne d'un changement de la trajectoire du photon [Ketcham et Carlson, 2001]. Les deux processus ont une sensibilité différente au numéro atomique et à la

densité : l'absorption photo-électrique est plus sensible aux variations de Z alors que la diffusion de Compton souligne plus fortement les variations de ρ [Taina et al., 2008; Wildenschild et al., 2002]. La contribution relative de ces phénomènes varie selon le niveau d'énergie (E). L'absorption photo-électrique domine pour $E < 100$ keV alors que la diffusion de Compton prévaut pour les rayonnements de plus haute énergie (jusqu'à 10 MeV) [Ketcham et Carlson, 2001; Wildenschild et al., 2002]. Le niveau d'énergie peut donc être choisi de manière à maximiser le contraste entre plusieurs phases, fonction de la composition élémentaire et de la densité de chacune d'elle.

La capacité à discerner les contrastes dépend en partie de la qualité de l'image, c'est-à-dire de son rapport signal/bruit, de l'ampleur des artefacts de mesure et de la résolution spatiale. La résolution spatiale dépend des caractéristiques de l'équipement utilisé (taille du point focal, nombre, taille et sensibilité des détecteurs) et de la configuration (les distances entre source, détecteurs et objets scanné définissent le grossissement de l'image) [Ketcham et Carlson, 2001; Wildenschild et al., 2002]. La taille de l'objet scanné lui-même détermine donc le grossissement. Il existe un facteur de 1000 à 1500 entre le volume d'un voxel et le volume total échantillonné. On ne peut donc pas maximiser simultanément la résolution spatiale et le volume prospecté. L'emploi d'un rayonnement monochromatique augmente le rapport signal/bruit et évite la survenue d'un des artefacts les plus courants et les plus difficiles à corriger appelé *beam hardening* [Ketcham et Carlson, 2001; Wildenschild et al., 2002]. Ce terme désigne l'atténuation préférentielle des rayonnements les moins énergétiques d'un spectre, causant l'élévation du niveau moyen d'énergie à mesure que le faisceau traverse l'objet. Le rayonnement plus énergétique est donc moins atténué au centre de l'objet qu'à sa périphérie à un degré qui dépend de la composition du matériau [Ketcham et Carlson, 2001; Wildenschild et al., 2002].

On distingue deux grandes familles de tomographes qui se distinguent par la source de rayonnement : les instrumentations adaptées au rayonnement synchrotron et les tomographes industriels, dérivés des scanners médicaux. Les tomographes industriels sont équipés de tubes à rayons X contenant à chacune des extrémités des électrodes de charge opposée (la cathode et l'anode, formant une diode). L'application d'un courant de haute tension précipite des électrons en excès dans la cathode vers l'anode, chargée positivement. Deux processus sont à l'origine de radiations de haute énergie : le ralentissement des électrons à proximité de l'anode (*Bremsstrahlung*) et la transition des électrons de l'anode à un niveau d'énergie moindre lorsqu'ils sont excités par des électrons provenant de la cathode. Les radiations émanant de ces deux processus sont comprises dans un spectre continu de 0,2 à 100 keV. Le faisceau est donc polychromatique et a une forme conique ou en éventail [Wildenschild et Sheppard, 2013].

Le rayonnement synchrotron est différent par nature. Les électrons sont mis en mouvement à grande vitesse et forcés à suivre une orbite circulaire dans un anneau de stockage sous l'effet d'un champ magnétique. La décélération des électrons provoque l'émission de radiations comprises dans un large spectre. Cependant, les synchrotrons produisent un rayonnement suffisamment intense pour être décomposé en rayons de longueurs d'onde spécifiques à l'aide d'un monochromatiseur [Wildenschild et Sheppard, 2013]. Un monochromatiseur est constitué de deux cristaux le rayonnement incident et sélectionne un angle, donc une longueur d'onde spécifique que l'on définit par l'orientation des cristaux.

Une meilleure qualité d'image et les résolutions les plus fines sont obtenues par rayonnement synchrotron. L'intensité du rayonnement, bien que réduite une fois le faisceau monochromatisé, est environ 10^9 fois supérieure à celle des rayonnements des tubes à rayons X [Wildenschild et Sheppard, 2013]. Elle peut être encore amplifiée au moyen de condensateurs dans certaines instrumentations en synchrotrons. L'intensité conditionne le rapport signal/bruit. En effet, plus le flux d'électrons incident est élevé et plus le comptage des électrons sortant est statistiquement fiable, même pour une très petite surface échantillonnée [Wildenschild et Sheppard, 2013]. L'intensité limite donc par ce biais la résolution spatiale [Wildenschild et Sheppard, 2013]. Un rayonnement

parfaitement parallèle, comme le faisceau monochromatisé en synchrotron, est par ailleurs nécessaire pour la détection aux plus hautes résolutions [Wildenschild et Sheppard, 2013]. La tomographie en synchrotron permet enfin de s'affranchir de la correction de l'artefact de *beam hardening* puisque le rayonnement est rendu monochromatique [Wildenschild et al., 2002].

Lors de l'acquisition, le faisceau est projeté en de multiples orientations grâce à la rotation relative d'un ensemble source – détecteurs et de l'objet scanné. L'étape de reconstruction consiste à convertir ces multiples projections en une seule image 3D où la variation du coefficient linéaire est représentée par celle de la valeur en niveaux de gris de chaque voxel. La reconstruction est opérée par un algorithme adapté à la géométrie du faisceau (algorithme de *back-projection* pour un faisceau parallèle ou de algorithme de Feldkamp pour un faisceau conique). L'image reconstruite peut ensuite être améliorée par l'application de filtres pour supprimer le bruit. Le filtres gaussiens et les filtres médians sont les plus simples et les plus couramment employés. Ils consistent à recalculer la valeur de chaque voxel selon la valeur de ses voisins compris dans un masque. D'autres filtres nécessitant une implémentation plus lourde ont été développés pour préserver les contours des composantes très bruitées [Kaestner et al., 2008]. Des algorithmes destinés à corriger d'éventuels artefacts de mesure peuvent aussi être appliqués à ce stade. Enfin, la dernière étape consiste à distribuer les voxels en classes discrètes, correspondant aux différentes phases de l'objet. Il s'agit de la segmentation.

La segmentation peut être réalisée par seuillage (méthode globale) ou par méthode locale. Les méthodes globales consistent à classer les voxels d'après leur valeur, en référence à un ou plusieurs seuil(s). La valeur du ou des seuils fréquemment estimée après simple vérification visuelle. Elle peut aussi être calculée d'après l'histogramme de l'image. L'une des plus connues, mais aussi des plus performantes des méthodes globales est la méthode d'Ostu [1993] [Iassonov et al., 2009]. Deux classes différentes sont identifiées d'après l'histogramme, puis le seuil est défini de manière à augmenter la variance inter-classe tout en diminuant les variances à l'intérieur de chaque classe. Les méthodes globales, classant les voxels d'après leur seule valeur, sont moins exactes que les méthodes locales pour un milieu hétérogène et multiphasique tel le sol [Iassonov et al., 2009]. En effet des voxels peuvent être mal classés du fait du chevauchement de certaines classes et par l'effet de volume partiel. Cette expression désigne l'occurrence de voxels dont la valeur représente un signal moyen de différentes phases non résolues [Iassonov et al., 2009; Ketcham et Carlson, 2001]. Les méthodes locales consistent à adapter le seuil selon la distribution des valeurs des voxels voisins. De nombreuses méthodes existent. Une des méthodes les plus répandues en géosciences est la méthode de krigeage de Oh et Lindquist [1999]. Elle est basée sur le classement des voxels d'après le calcul d'indicateurs d'autocorrélation spatiale [Iassonov et al., 2009].

5.1.2 Tomographie de milieux poreux comparables aux milieux d'incubation

Des galettes d'agrégats ont été préparées selon la méthode décrite dans la section 4.1.2. Elles possédaient donc les mêmes caractéristiques macroscopiques que les échantillons de l'incubation présentée dans la section 4.2.5 (masse volumique apparente de 1,2 $g.cm^{-3}$, teneur en eau pondérale de 0,205 $g.g^{-1}$). Les galettes ont ensuite été découpées en parties plus petites, dans le but de maximiser la résolutions. Les échantillons à scanner prennent la forme de cubes de $(6 \times 6 \times 8)$ mm^3. Des systèmes de succion miniaturisés ont été employés pour ajuster le potentiel hydrique des échantillons avant le scannage (figure 5.1). Ces systèmes sont composés d'une seringue de 1 cm de diamètre remplies à la moitié de billes de verre (de 90-125 μm de diamètre) reliée par le bas à un tuyau muni d'une vanne à trois voies. Une fois fabriqués, les échantillons ont été stockés individuellement dans leurs seringues. Les échantillons ont été déposés à la surface des billes de verre, surmontés d'une boule de parafilm (destinée à éviter leur mouvement et à limiter le volume

d'air donc l'évaporation pendant le scannage) et le haut de la seringue recouvert de parafilm.

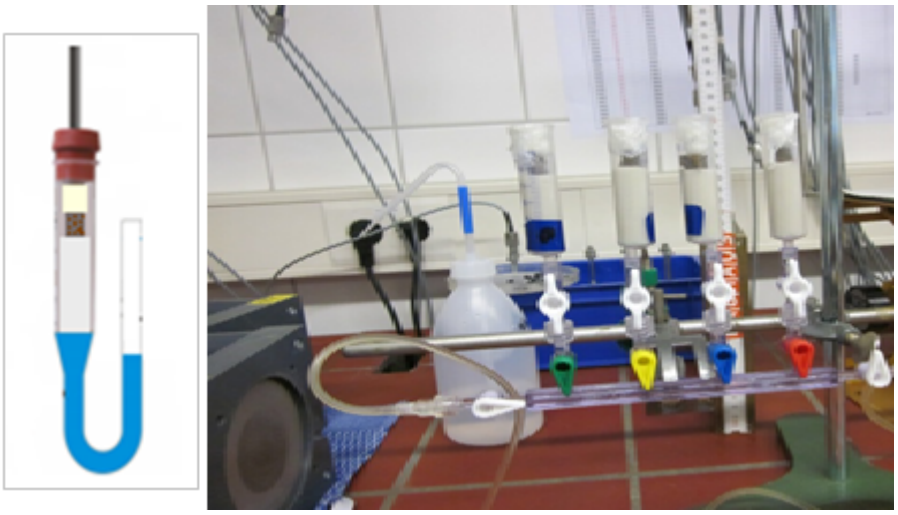


FIGURE 5.1 – **Systèmes de succion miniaturisés** utilisés l'ajustement du potentiel hydrique et le scannage des échantillons (cubes d'agrégats compactés).

L'étape suivante de préparation (l'ajustement du potentiel hydrique) a été réalisée au synchrotron HASYLAB (*Hamburger Synchrotron Strahlungslabor*) à Hambourg, dans les locaux laissés à disposition avec chaque ligne de faisceau. Les échantillons ont été portés à saturation complète pendant 24 heures puis installés au potentiel désiré pour la prise d'image pendant 24 heures supplémentaires. Le potentiel a été modulé en faisant varier la charge gravitaire, en ajustant la hauteur du réservoir d'eau libre. L'eau utilisée avait été dégazée par ébullition 24 heures auparavant. Les échantillons ont été installés aux potentiels de -0,5 kPa et -2 kPa correspondant à des charges hydrauliques de h=-5 et h=-20 cm respectivement. Trois répétitions par échantillons ont été réalisées par potentiel hydrique. La fermeture de la vanne à trois voies permet de maintenir le potentiel hydraulique temporairement, lors du déplacement et du scannage (d'une durée de deux heures environ).

Pour la prise d'image, l'échantillon dans sa seringue est fixé dans le support du tomographe à une distance déterminant le grossissement de l'image. La prospection des échantillons a été divisée en plusieurs étapes de scannage couvrant une zone de hauteur restreinte. De cette manière, une résolution fine, requise pour la visualisation des interfaces eau-air, a pu être atteinte : 4,6 μm.

Le faisceau, rendu parallèle et monochromatique par un monochromatiseur à doubles cristaux, a été réglé à une énergie de 30 keV. Pendant la phase d'acquisition, le rayonnement traversant l'échantillon a été enregistré alors que l'échantillon subissait une rotation de 180° par pas de 0,2°.

5.1.3 Traitement des images

La reconstruction et les étapes de prétraitement des images ont été réalisées hors du cadre de cette thèse. Les étapes suivantes, décrites plus loin, ont été réalisées à l'aide du logiciel `ImageJ`. Pour chaque modalité (h_{-5} et h_{-20}), une seule image correspondant à une portion d'échantillon de 1,188 mm a été sélectionnée. Elle se présente sous la forme d'une séquences de 257 images 2D en niveau de gris, numérisées au format `.tif`.

Le traitement des images en vue de la simulation de la biodégradation a nécessité plusieurs opérations. D'une part, les images ont dû être segmentées pour extraire la géométrie de la phase aqueuse. D'autre part, les images ont dû être redimensionnées pour obtenir une hauteur comparable à celle des galettes d'agrégats utilisées lors de l'incubation (21 mm). Nous avons pensé à

dupliquer les images en miroir autant de fois que nécessaire. Ces duplications successives multiplieraient la taille des fichiers et donc celle du temps de calcul. Nous avons envisagé des moyens de réduire le niveau d'information des images : tronquer les images horizontalement et diminuer la résolution spatiale. La première opération amoindrit la représentativité des images, la seconde limite la précision de la reproduction de la topologie et augmente donc les erreurs liées à la discrétisation. Nous avons employé les deux stratégies de manière à trouver un compromis satisfaisant entre représentativité, précision des images et rapidité de calcul.

- La résolution spatiale a été diminuée deux fois (de 4,6 à 18,4 μm), divisant la taille de l'image par 2×2^3).
- L'image redimensionnée a été dupliquée quatre fois, pour atteindre une épaisseur de 17,44 mm.
- La séquence d'image a été tronquée latéralement. Une sélection équivalant à environ la moitié de l'aire initiale a été retenue.

Des tests préliminaires, nous ont montré que le changement de résolution spatiale altérait la distribution des niveaux de gris des images. Nous avons établi un ordre entre les différentes opérations de traitement, tel que la topologie des milieux poreux soit le plus fidèlement restituée :

1. Redimensionnement
2. Segmentation
3. Troncature
4. Duplications en miroir

Redimensionnement des images

Les images de la périphérie ont présenté plus de bruit que les images du centre des séquences. Nous avons donc supprimé les dix premières et dix dernières images des séquences. Celles-ci ne comptent alors plus que 237 images (soit une hauteur réelle de 1,09 mm).

Pour changer la résolution la fonction `Scale` a été appliquées sur les séquences d'images, en spécifiant un facteur de redimensionnement de 0,25 dans chaque dimension et un mode d'interpolation bilinéaire. Les séquences redimensionnées se composent alors de 59 images.

Segmentation

Nous avons segmenté nos images en déterminant un seuil global par appréciation visuelle. Nous avons choisi cette méthode, bien que certainement moins performante et plus subjective que des approches locales automatisées, pour sa simplicité et sa rapidité. Son niveau de précision nous paraissait satisfaisant pour cet exercice.

La fonction `Threshold` a été employée sur les séquences d'images. Elle permet à l'utilisateur de spécifier les deux bornes d'une classe de niveaux de gris selon l'aspect de l'histogramme et par la visualisation par surbrillance dans l'image des objets sélectionnés.

Nous avons réalisé la segmentation sur les images dans leur résolution d'origine – plus nettes – pour visualiser plus facilement les contours des phases dans les images redimensionnées. La segmentation des deux types d'images est illustrée dans les figures 5.2 et 5.3.

La distribution des niveaux de gris est continue pour les images originales. Trois pics inégaux peuvent être aperçus, révélateurs des trois phases, apparaissant dans l'image de la modalité la moins saturée, h_{-20} (figure 5.3). Le plus gros pic dans les valeurs les plus élevées correspond à la phase solide, le pic à l'opposé suggère la phase gazeuse. La phase aqueuse ne se distingue que sur un petits nombre de pixels situés aux interfaces des pores. Ces pixels marquent un très petit pic dans l'histogramme à des valeurs intermédiaires. Les pixels situés entre les pics des phases liquide et solide sont relativement fréquents. Ils correspondent probablement à des pixels où les

deux phases sont présentes en mélange et dont les interfaces ne sont pas résolus par effet de volume partiel (section 5.1.1). L'histogramme pour la modalité la plus saturée (h_{-5}) montre des propriétés similaires mais se démarque par l'absence de pic dans les valeurs peu denses (figure 5.2). La phase gazeuse est effet très minoritaire, uniquement représentée par quelques petites bulles.

Les valeurs de seuil varient entre les images d'origine et les images redimensionnées (table 5.1), comme le laissait deviner les différences dans leurs histogrammes (figures 5.2 et 5.3). Les seuils distinguent aussi les deux milieux, probablement à cause de légères différences d'exposition et peut-être aussi dans les opérations de reconstruction.

	Image originale	**Image redimensionnée**
h=-5 cm	24 ; 48	25 ; 60
h=-20 cm	24 ; 55	28 ; 60

TABLE 5.1 – **Valeurs des seuils estimées pour les images milieux poreux dans leur résolution d'origine et modifiée**.
La première valeur marque la limite entre les phases gazeuse et liquide, la seconde entre l'eau et la phase solide.

Pour chaque séquence en niveaux de gris, deux séquences d'images binaires représentant la phase aqueuse et la porosité (eau + air) ont été extraites. Pour la phase aqueuse, les pixels compris entre les deux bornes données dans la table 5.1 sont spécifiées. Pour la porosité, la borne haute est conservée alors que la limite basse est mise à zéro. L'image de la phase aqueuse sera utilisée dans les simulations de biodégradation. L'image de la porosité permet de caractériser les milieux selon des grandeurs macroscopiques (porosité totale et indice de saturation).

	Image initiale	Image redimensionnée	Résultats de Pot et al. [2015]
	Porosité (P)		
h=-5 cm	0,053	0,077	0,06
h=-20 cm	0,078	0,11	0,08
	Indice de saturation (S_w)		
h=-5 cm	0,98	0,98	0,99
h=-20 cm	0,40	0,47	0,38

TABLE 5.2 – **Caractéristiques macroscopiques des images discrètes des milieux poreux.**
Les valeurs de porosité totale et de saturation obtenue avec ou sans redimensionnement sont comparées aux résultats obtenus par Pot et al. [2015] par la méthode de segmentation de Otsu [1979].

Les paramètres macroscopiques de nos images segmentées manuellement sont proches des valeurs de Pot et al. [2015] obtenues par la méthode de Otsu [1979], lorsque la résolution spatiale n'a pas été modifiée (table 5.2). Les volumes de la porosité et de la phase aqueuse apparaissent systématiquement accrus par l'opération de redimensionnement. Lors de la détermination des seuils, nous avons sciemment surestimé les volumes des interfaces qui apparaîtraient sinon très discontinus. Nous avons jugé une approximation sur la porosité et la saturation moins préjudiciable qu'une dépréciation de la connectivité pour le calcul du transport réactif.

Les images segmentées sont enregistrées dans des séquences de fichiers `.tif` avec seulement deux valeurs : 255 pour les pixels de la phase d'intérêt et 0 pour le reste.

Troncature

Les séquences redimensionnées et segmentées ont été tronquées en sélections de 60^2 pixels représentant environ la moitié de la surface initiale, à l'aide de l'outil de sélection `Crop` de `ImageJ`. Les sélections ont été réalisées de manière à comprendre une phase aqueuse continue dans la direction verticale.

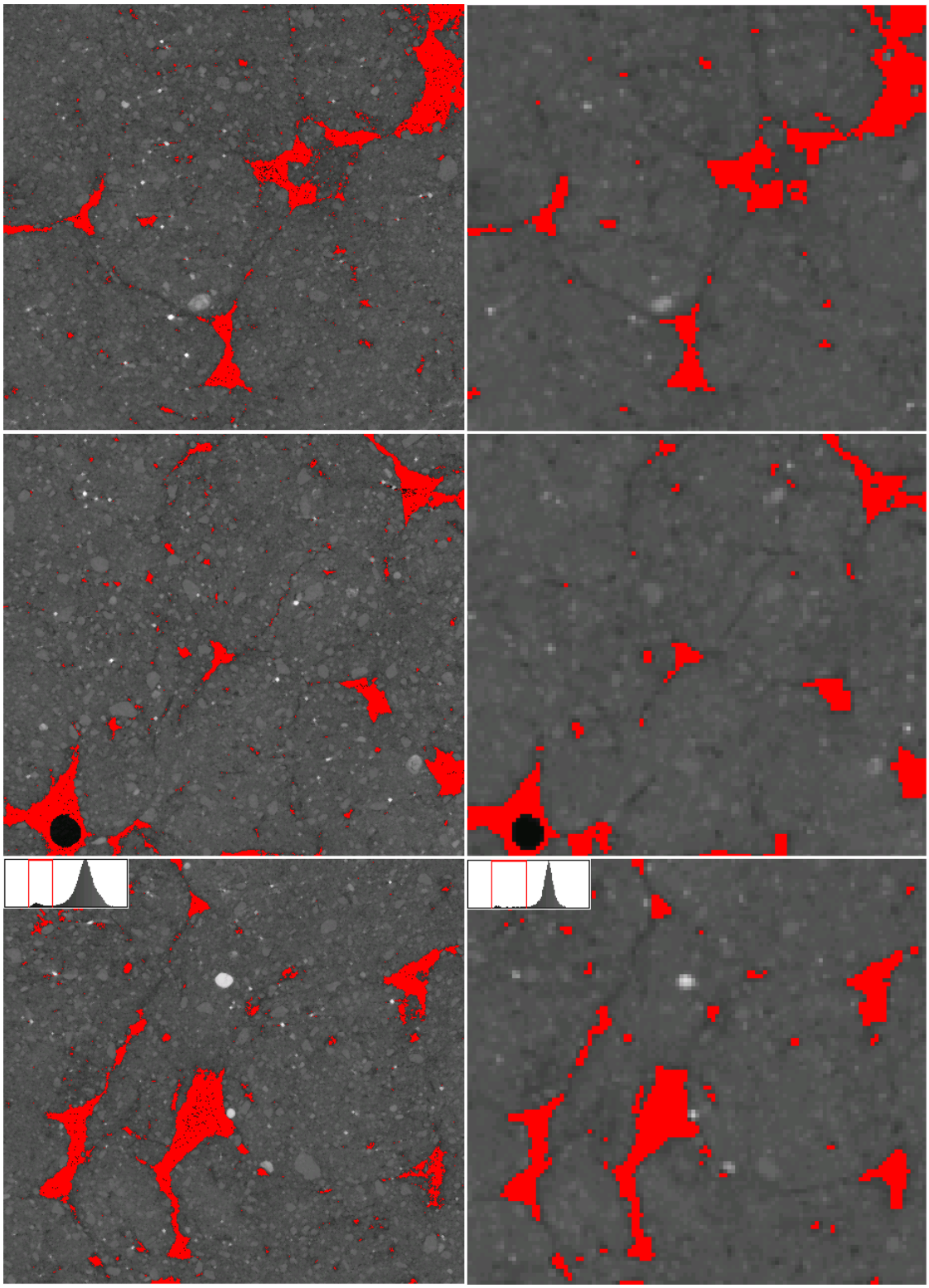


FIGURE 5.2 – **Captures d'écran lors de l'opération de segmentation manuelle** pour la modalité h_{-5}.
Les phases désignées comme l'eau et l'air apparaissent en rouge et en noir respectivement. De haut en bas sont montrées les sections première, médiane et dernière. Les images originales (à gauche) sont comparées aux images redimensionnées (à droite). L'impact du redimensionnement sur l'histogramme est illustré pour la dernière section.

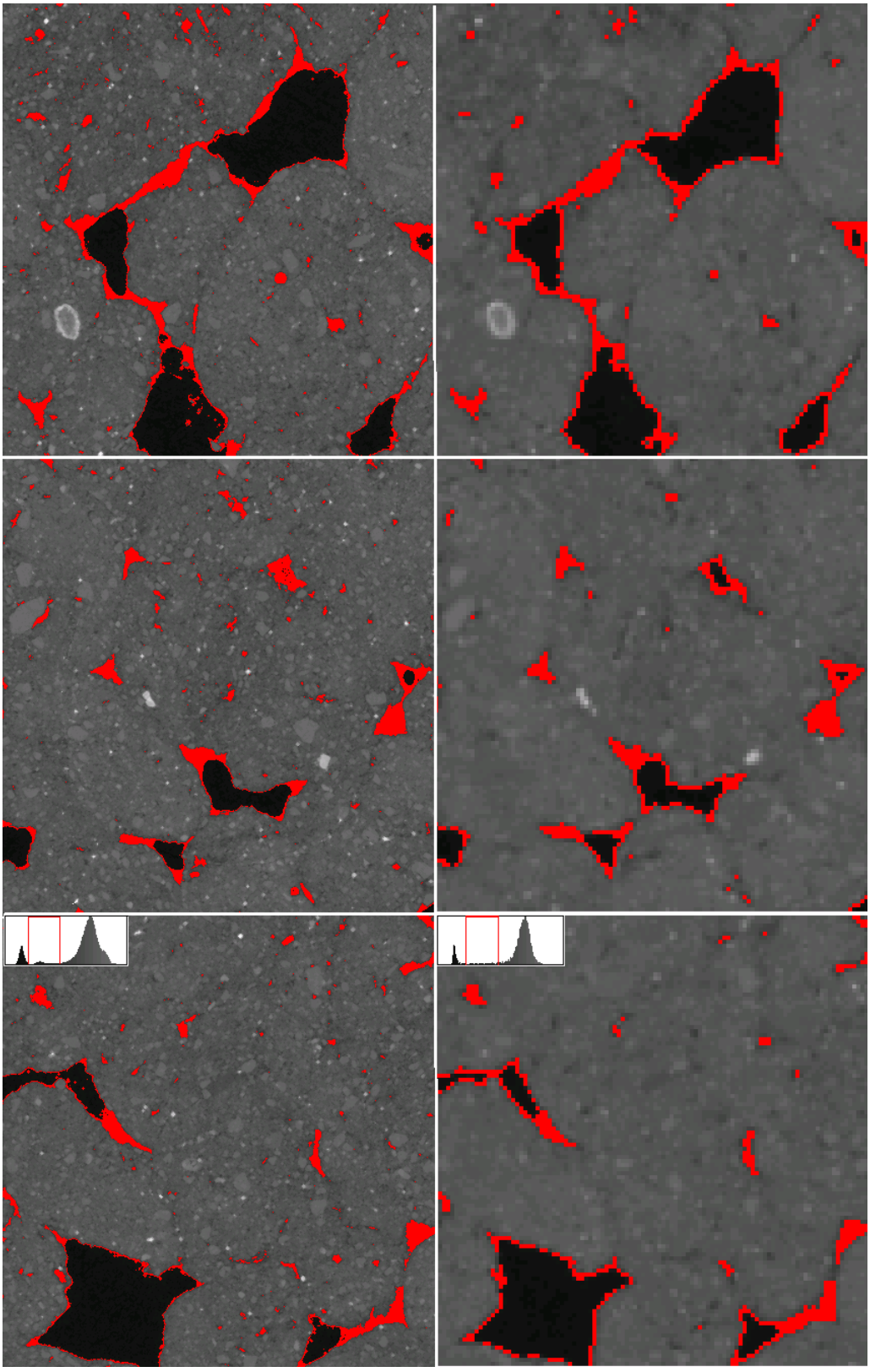


FIGURE 5.3 – **Captures d'écran lors de l'opération de segmentation manuelle** pour la modalité h_{-20}.
Les phases désignées comme l'eau et l'air apparaissent en rouge et en noir respectivement. De haut en bas sont montrées les sections première, médiane et dernière. Les images originales (à gauche) sont comparées aux images redimensionnées (à droite). L'impact du redimensionnement sur l'histogramme est illustré pour la dernière section.

Duplications en miroir

Nous avons appliqué un algorithme copiant et numérotant les images 2D de manière à dupliquer la séquence en miroir. Nous avons réalisé huit duplications successives pour atteindre une séquence de 928 images représentant une hauteur réelle de 17,44 mm.

Les séquences d'images doivent enfin être converties dans un format lisible par notre modèle. Les séquences d'images `.tif` de valeurs 0 et 255 ont été réécrites en séquences `.txt` de valeurs 0 et 1. Les séquences ont ensuite été concaténées (commande `cat`) en un seul fichier 3D compatible avec le code du modèle LBioS, d'une dimension de 60 x 60 x 928 voxels. Pour le calcul du transport réactif, seule la porosité connectée au premier plan est conservée, comme dans les applications décrites dans le chapitre 2 (voir section 2.1.1). Cette dernière opération modifie à nouveau les valeurs de porosité et de saturation (table 5.3). Les deux images représentent les régimes de saturation totale (modalité h_{-5}) et partielle (modalité h_{-20}). La teneur en eau volumique (calculée comme le produit de la porosité et de l'indice de saturation) est d'un tiers plus élevée dans la modalité la plus saturée (h_{-5}) par rapport à l'autre.

	P	S_w	θ
$h = -5$ cm	0,045	1	0,045
$h = -20$ cm	0,088	0,335	0,029

TABLE 5.3 – **Caractéristiques macroscopiques des milieux poreux :** porosité P, indice de saturation S_w et teneur en eau volumique θ.

La structure répétitive des images due aux répétitions successives apparaît dans la figure 5.4. La distribution des sites fluides diffère entre les deux images finales. L'eau dans le milieu poreux le moins saturé (modalité h_{-20}) se trouve majoritairement aux interfaces avec les parois et la phase gazeuse, puisque les "sites fluides" sont presque exclusivement de "sites fluides frontière". Le milieu le plus saturé se caractérise par une plus grande amplitude de variation de la porosité selon la profondeur. De vastes volumes poreux (intégralement occupés par l'eau) sont entrecoupés par des sections de rétrécissement.

5.2 Initialisation du modèle dans les conditions de l'expérimentation de validation

Paramétrisation

Les incubations en milieu liquide et en suspension de sol (sections 4.1.5 et 4.1.6) ont été conçues pour paramétriser le modèle. Les résultats de l'incubation en suspension relatés dans la section 4.2.4 se sont avérés trop variables pour pouvoir être utilisés à cette fin. Nous n'avons pas non plus mené une procédure d'estimation numérique à partir des résultats d'incubation liquide (section 4.1.5), moins variables mais plus incomplets (les mesures de CO_2 sont manquantes), pour éviter des erreurs engendrées par la sous-détermination du modèle. Nous avons fait varier les paramètres autour des valeurs de Coucheney [2009], largement utilisées au cours de cette thèse, de manière à déterminer une combinaison de paramètres permettant de reproduire les principaux traits caractéristiques observés dans les cinétiques mesurées. Ces paramètres sont présentés dans la table 5.4. Les valeurs ont été converties en "unités réseau" sachant la résolution spatiale de 18,4 μm et le coefficient de diffusion moléculaire du substrat inchangé par rapport aux applications du modèle dans les chapitres précédents. La résolution en temps T_P est de 0,25153 s. La simulation couvre une durée de sept jours.

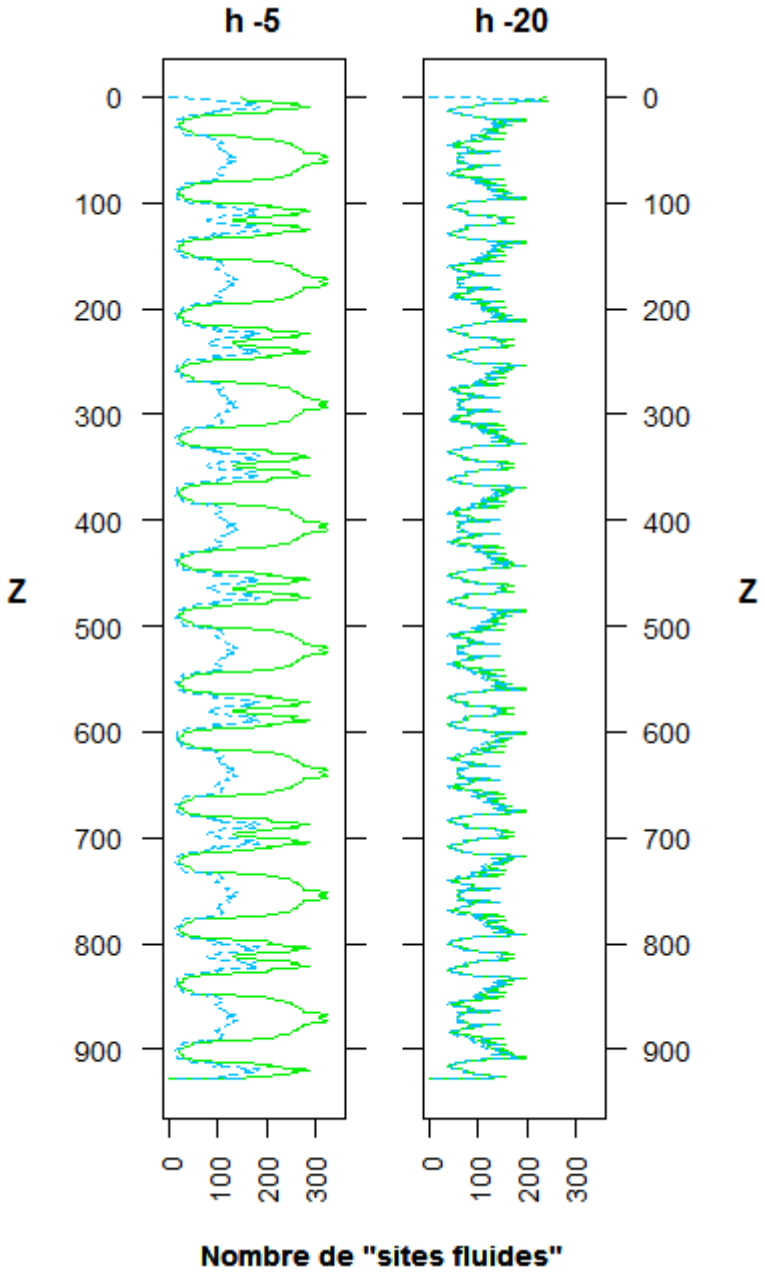


FIGURE 5.4 – **Profils verticaux de répartition de la phase aqueuse.**
Les nombres par plan de "sites fluides" (voxels occupés par l'eau) et de "sites fluides frontière" (voxels inondés à l'interface avec la paroi) sont montrés en traits pleins verts et pointillés bleus, respectivement.

L'état physiologique n'a pas été considéré, car sa simulation entraîne une accumulation de carbone dans la biomasse non observée dans nos résultats expérimentaux. Nous avons en revanche activé le processus d'humification pour simuler la production du carbone non-extractible mesuré dans notre expérimentation (figure 4.11). $p_m = 0,8$ est une valeur classique pour le coefficient de partage de la mortalité (voir table 3.1).

Symbole	**Définition**	**Valeurs physiques**	**Valeurs réseau**
D_M	Coeff. diff. moléculaire du *DOC*	$6,73.10^{-6}$ cm^2.s^{-1}	0,5 lu^2.tu^{-1}
v_{DOC}	Taux maximal de prélèvement	$1,74.10^{-4}$ s^{-1}	$4,37.10^{-5}$ tu^{-1}
k_{DOC}	Constante de saturation	5.10^{-4} mgC.cm^{-3}	$3,11.10^{-12}$ mu.lu^{-3}
k_r	Taux de respiration	$2,31.10^{-6}$ s^{-1}	$5,82.10^{-7}$ tu^{-1}
k_m	Taux de mortalité	$1,56.10^{-6}$ s^{-1}	$2,91.10^{-7}$ tu^{-1}
p_m	Coefficient d'humification	0,8 [-]	0,8 [-]
T_{max}	Temps de simulation	604 800 s	2 404 480 tu

TABLE 5.4 – **Paramètres cinétiques du module de biodégradation.**

Conditions initiales : apport du substrat et distribution bactérienne

Les conditions initiales appliquées au modèle ont été réfléchies de manière à refléter les conditions expérimentales (section 4.1.7). Les masses ont été initialisées avec la contrainte de garder des concentrations comparables entre expérimentation et simulation. Les concentrations se réfèrent ici au volume total de l'échantillon et non au volume de la phase aqueuse, par faute de mesure précise de la teneur en eau dans les systèmes expérimentaux (cf section 4.2.5). Les volumes des galettes d'agrégats des incubations ($V = 41,23$ cm^3) et des images utilisées pour les simulations ($2{,}081.10^{-2}$ cm^3) sont séparées d'un facteur $1,981.10^3$. Les masses initiales simulées sont calculées en divisant les masses initiales mesurées par ce facteur.

La masse initiale de glucose correspond à la masse théorique injectée lors de l'expérimentation. Le dosage spectrométrique de la biomasse lors de l'inoculation est approximatif et ne permet pas de connaître la quantité injectée avec précision. Nous nous sommes donc servis des valeurs de biomasse de la première date de mesure (2 heures), considérant une éventuelle variation négligeable par rapport au temps de l'apport (voir figure 4.13). Nous nous sommes servis du facteur de conversion utilisé dans le chapitre précédent (1 CFU = 5.10^{-11} mg C). Les biomasses initiales diffèrent entre les deux modalités expérimentales. Les masses initiales sont données dans la table 5.5.

	Modalité $h = -5$ cm		Modalité $h = -20$ cm	
	Expérience	Simulation	Expérience	Simulation
	Distribution du substrat			
α_H	0,926		0,898	
α_M	0,067		0,098	
α_B	0,007		0,004	
DOC_0	19,73 mgC	$9{,}96.10^{-3}$ mu	19,73 mgC	$9{,}96.10^{-3}$
	Distribution de la biomasse			
α_H	0,011		0,009	
α_M	0,015		0,023	
α_B	0,974		0,968	
B_0	$6{,}087.10^{-6}$ mgC	$3{,}072.10^{-9}$ mu	$3{,}773.10^{-6}$ mgC	$1{,}904.10^{-9}$ mu

TABLE 5.5 – **Masses et distributions initiales du substrat et des bactéries.**
Les symboles α_H, α_M et α_B désignent les proportions de matière (substrat ou bactéries) mesurées dans les tranches haute, médiane et basse respectivement.

Une des propriétés recherchées dans la conception de nos systèmes expérimentaux était l'apport

non-colocalisé du substrat et des microorganismes. Le protocole expérimental n'a pas permis d'obtenir une distribution initiale contrastée entre le glucose et la biomasse, mais sans atteindre une déconnexion spatiale absolue. Substrat et décomposeurs sont apparus répartis selon des gradients de concentration opposés (figures 4.12 et 4.13). Nous avons répercuté la zonation par tranches dans notre modèle spécifiant trois régions d'égale épaisseur (309 ou 310 sites soit 5,686 mm) que nous appellerons désormais "tranches virtuelles". Les masses à apporter par "tranche virtuelle" ont été déterminées d'après les proportions déduites des mesures, données dans la table 5.5. Elles ont finalement été initialisées en tant que densité, à l'échelle du site. Les densités ont été calculées selon le rapport entre la masse à apporter par "tranche virtuelle" et le nombre de sites pouvant recevoir du substrat ("sites fluides") ou de la biomasse ("sites fluides frontière") dans cette "tranche virtuelle".

La répartition des concentrations initiales de substrat et de bactéries est illustrée dans la figure 5.5. Les écarts de concentration du glucose entre les deux milieux s'expliquent par leur différence de volume aqueux total (table 5.3). En revanche, la concentration de biomasse plus élevée dans la modalité h_{-5} est présumée résulter d'imprécisions liées à la méthode de dosage du glucose (sections 4.2.5 et I.2.1 en annexe).

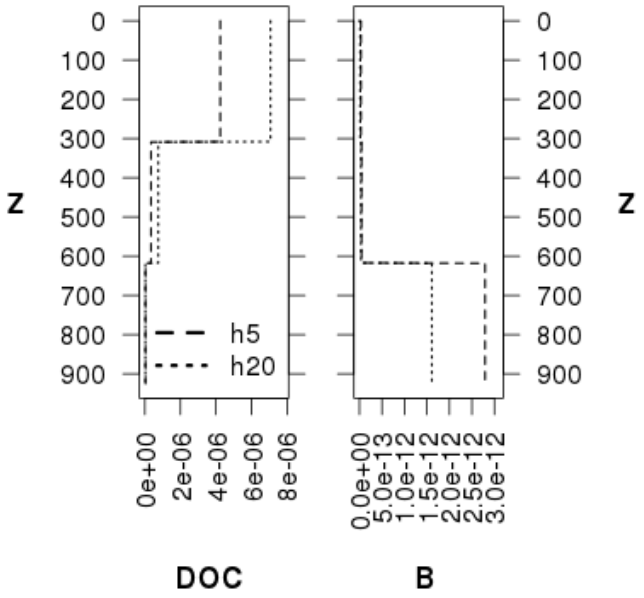


FIGURE 5.5 – **Distribution verticale des concentrations initiales de glucose et de bactéries** dans les deux milieux poreux.
Les masses sont rapportées au nombre de "sites fluides" par section

Le DOC a été initialisé sur tous les sites appartenant à la phase aqueuse. La biomasse a été répartie sur les parois humides des pores, c'est-à-dire dans les "sites fluides frontière". L'image de la phase aqueuse implémentée dans le modèle pour les simulations ne présente pas de distinction entre les interfaces solide-liquide et liquide-gaz. La topologie des interfaces solide-liquide peut cependant être déduite par la comparaison des images de la porosité et de la phase aqueuse pour un même milieu. Seuls les "sites fluides frontière" répertoriés pendant la lecture de la topologie de la porosité sont désignés comme susceptibles de recevoir de la biomasse. N'ayant aucune information sur la taille d'éventuelles colonies bactériennes se formant juste après inoculation, nous avons supposé une répartition uniforme sur les parois des pores.

5.3 Résultats

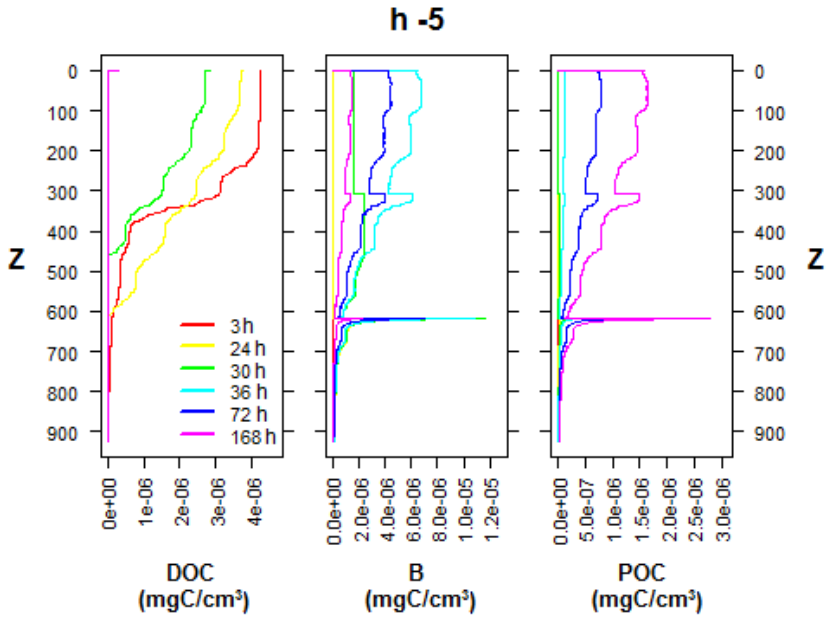
5.3.1 Tendances simulées

L'évolution des concentrations à différents pas de temps est illustrée dans les figures 5.6a et 5.6b. La distribution du DOC s'écarte peu de son gradient initial dans les trente premières heures (figure 5.5). Ce pas de temps (30 h) est aussi marqué par le début de la croissance de la biomasse. Cette croissance n'est pas restreinte à la "tranche virtuelle" basse, dans laquelle elle était initialement plus abondante (d'un facteur 100 par rapport à la tranche haute). La biomasse se développe au contraire de manière privilégiée dans le tiers supérieur, où le substrat était plus abondant pendant l'initiation de la croissance. Le développement bactérien apparaît ponctuellement plus prononcé, au niveau des transitions entre deux "tranches virtuelles", caractérisées par une variation abrupte des concentrations initiales de substrat et de biomasse. La biomasse présente en haut de cette tranche consomme le DOC de manière préférentielle par rapport aux bactéries situées sur le reste de la tranche. La répartition du carbone organique particulaire (POC) suit fidèlement celle de la biomasse dont elle est issue. Les distributions de ces deux variables ne diffèrent que dans leur évolution temporelle. La biomasse connaît une phase de croissance jusqu'à 36h suivie d'un déclin jusqu'en fin de simulation, alors que l'évolution du POC est toujours croissante à partir de son initiation, légèrement retardée par rapport à celle de la biomasse.

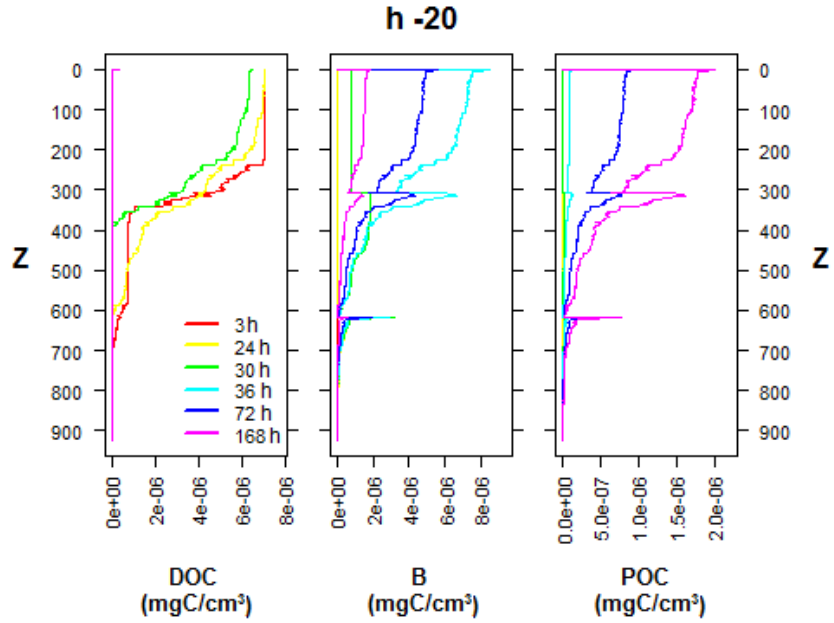
L'évolution des distributions est similaire dans les deux milieux, mais présente toutefois de légères différences. Le gradient initial de DOC semble s'estomper moins rapidement en début de simulation dans la modalité h_{-20} par rapport à la modalité h_{-5} (figure 5.6). En conséquences, le contraste de distribution de la biomasse (avec un développement privilégié sur la tranche haute) est plus prononcé pour la modalité h_{-20}. Ces faibles disparités dans les distributions témoignent de conditions de diffusion et de concentrations initiales différentes entre les milieux (figure 5.5). Le milieu h_{-20} conjugue une concentration initiale de substrat et une tortuosité vraisemblablement plus importantes du fait de sa plus faible teneur en eau. Une plus grande proportion du glucose est consommée localement et n'atteint pas les bactéries en profondeur, à cause d'un retard de diffusion plus important et d'une consommation stimulée par une concentration initiale plus élevée que dans l'autre modalité.

La cinétique de biodégradation dans les deux milieux hétérogènes a été comparée avec un milieu homogène avec des concentrations initiales et des paramètres cinétiques équivalents (figure 5.7). Nous avons pris un milieu composé d'un "site fluide" avec une résolution de 100 μm et converti les paramètres cinétiques et les masses initiales comme dans le chapitre 3 (section 3.2.5). Les tendances simulées diffèrent entre le milieu homogène d'une part et les milieux hétérogènes d'autre part. En revanche, les différences observées entre les distributions spatiales des variables des deux milieux poreux n'ont pas d'influence sur leur cinétique.

Les faibles différences dans la cinétique de disparition du substrat entre conditions homogènes et hétérogènes aboutit à une évolution différente de la biomasse, du POC et du CO_2. En conditions homogènes, la biomasse connaît une décroissance exponentielle jusqu'à disparaître au bout d'environ quatre jours. Le carbone se partage entre le pool de POC (85%) et le CO_2 (15%). Dans les milieux hétérogènes, le déclin de la biomasse et l'augmentation du POC et du CO_2 sont plus lents et linéaires et continuent tout au long de la simulation. La partition à sept jours est dominée par le pool de CO_2 (57%). La biomasse et le POC produits en fin de simulation représentent respectivement 19 et 23% du carbone injecté.



(a)



(b)

FIGURE 5.6 – **Évolution de la distribution des concentrations de DOC, de biomasse et de POC selon la profondeur**, dans les milieux poreux h_{-5} (a.) et h_{-20} (b.)

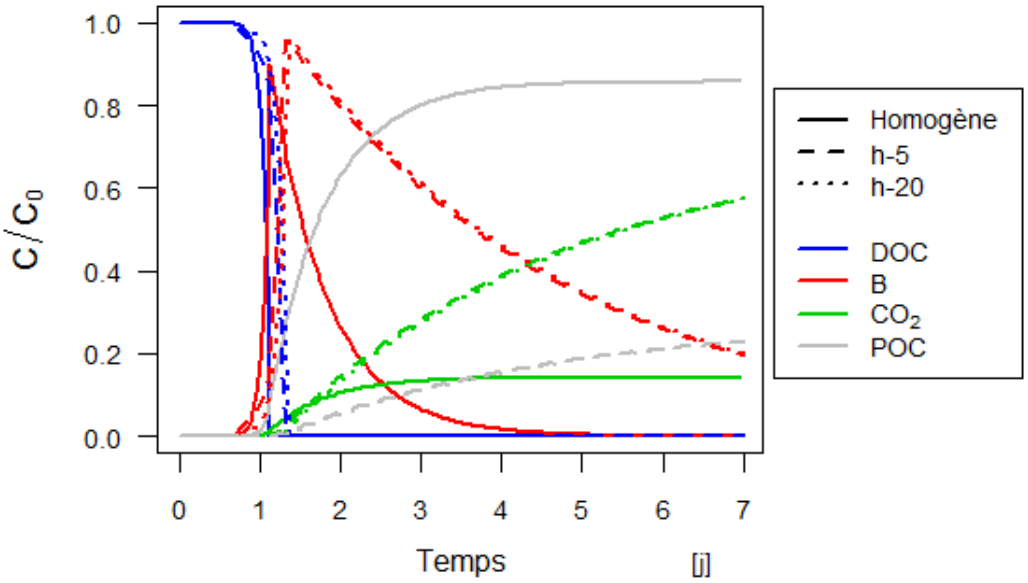


FIGURE 5.7 – **Cinétiques de biodégradation simulées dans les deux milieux poreux** (h_{-5} et h_{-20}) **comparées à une cinétique en milieu homogène** pour les mêmes paramètres microbiens.

5.3.2 Confrontation des résultats simulés avec les résultats expérimentaux

Les distributions des variables simulées et mesurées sont représentées dans les figures 5.8 et 5.9. Les variables *DOC*, *B* et *POC* sont comparées aux dates des mesures destructives (2h, 18h et 7j) ainsi qu'à une date intermédiaire (36h) pour les résultats simulés pour mieux rendre compte du comportement du modèle (figure 5.8). Les masses par tranche simulées sont calculées en sommant les masses sur tous les sites d'une "tranche virtuelle". Pour faciliter la comparaison en s'affranchissant des erreurs de bilan de masse sur les résultats expérimentaux, les variables expérimentales ont été ajustées de manière à obtenir un bilan de 100%, en rapportant les masses à la somme de tous les pools mesurés au temps donné et non à la masse initiale.

Les résultats de biomasse n'ont pas été exprimés en masse relative, comme dans le chapitre précédent, pour éviter les incertitudes liées à la conversion. Des calculs de conversion réalisés en guise de vérification donnent des valeurs de biomasse supérieures aux quantités de carbone non-extractible (représentant la somme des pools de biomasse et de POC). Mises à part les erreurs liées à la conversion, ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'une part de la biomasse mesurée est alimentée par du carbone du sol non marqué. Par conséquent, nous avons uniquement pu comparer les proportions par tranches, en rapportant la biomasse par tranche à la biomasse totale pour la simulation, et le nombre de CFU par tranche au nombre de CFU total pour les mesures. Nous montrons ainsi la répartition spatiale de la biomasse en perdant l'information sur le statut de la biomasse dans le bilan de masse.

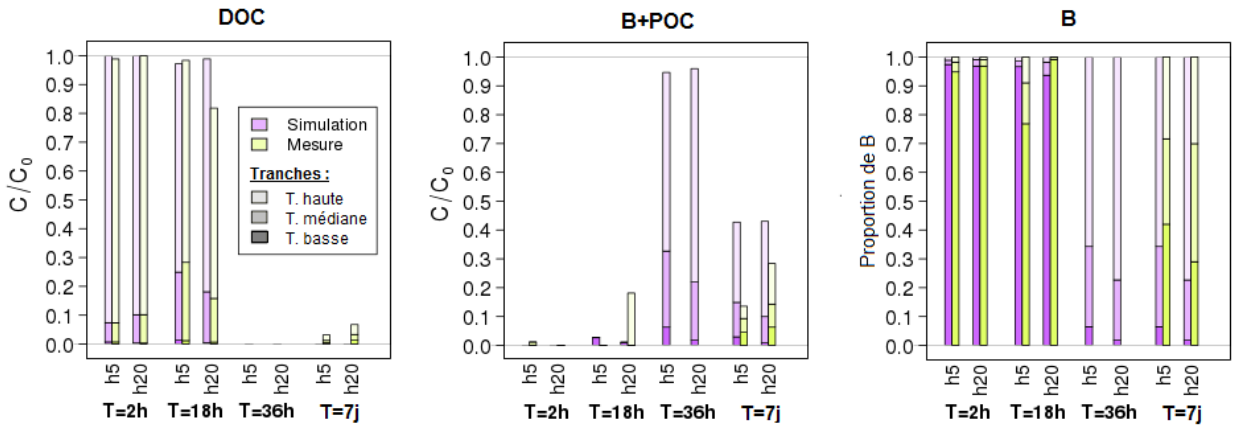


FIGURE 5.8 – **Distributions spatiales simulées et mesurées du DOC** (gauche)**, de la biomasse** (milieu) **et du carbone non-extrait** (droite) représentées sous la forme d'histogramme.
Dans les deux premiers encarts, les quantités mesurées sont exprimées en masses relatives pour un bilan de ^{14}C ajusté. Dans l'encart de droite, les valeurs de biomasse simulées (en masse de carbone) et mesurées (en concentration cellulaire) sont comparées en tant que proportions de biomasse par tranche par rapport à la biomasse totale au temps donné.

Le modèle reproduit bien l'évolution mesurée de la variable DOC. Dans l'expérimentation comme dans les simulations, le début de la cinétique (2 et 18h) marqué par la quasi-totalité du carbone sous la forme de DOC est suivi par une phase de déclin de cette variable. La disparition est totale et antérieure à 36h pour le modèle (figure 5.8) alors que du DOC est détecté à l'état résiduel en fin d'expérimentation (environ 2 et 5% du carbone injecté pour h_{-5} et h_{-20} respectivement).

En revanche, l'évolution des valeurs de biomasse et de POC est mal capturée par le modèle. Dans les résultats expérimentaux, l'accroissement de la somme de ces deux pools est accompagné d'une homogénéisation des concentrations. Les simulations prévoient une augmentation préférentielle de B+POC à proximité de la zone d'apport du substrat qui entraîne l'inversion du gradient de concentration, d'abord croissant puis décroissant de haut en bas. La distribution finale de B+POC calque la répartition initiale de DOC (figure 5.9). Les résultats mesurés et simulés pour ces deux variables se différencient en termes de distribution spatiale mais aussi de quantités totales : celles-ci peuvent varier de plus du simple au double entre les résultats mesurés et simulés à la date finale (figure 5.8).

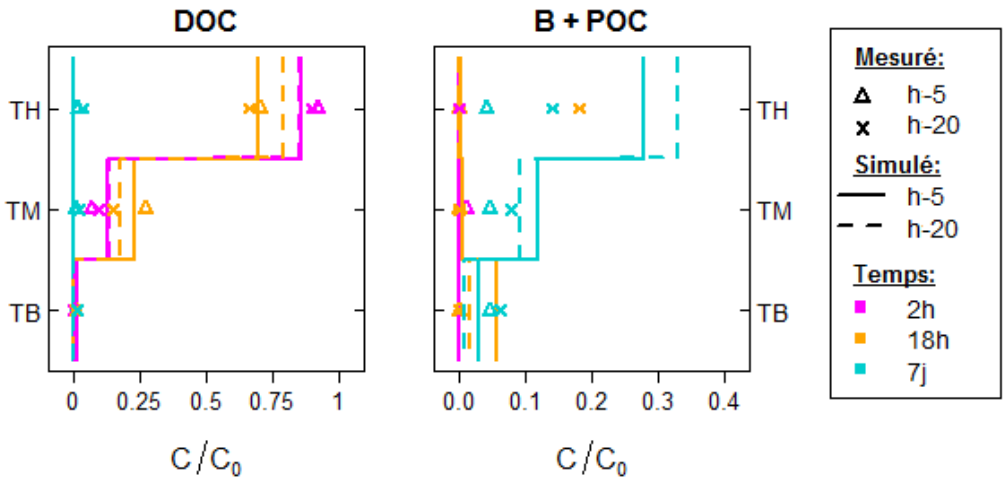


FIGURE 5.9 – **Distribution spatiale des valeurs simulées et mesurées du DOC** (gauche) **et du carbone non-extractible** (droite) par tranche.
Le carbone non-extractible mesuré expérimentalement correspond dans la simulation à la somme des pools B et POC. Les quantités mesurées sont exprimées en masses relatives pour un bilan de ^{14}C ajusté.

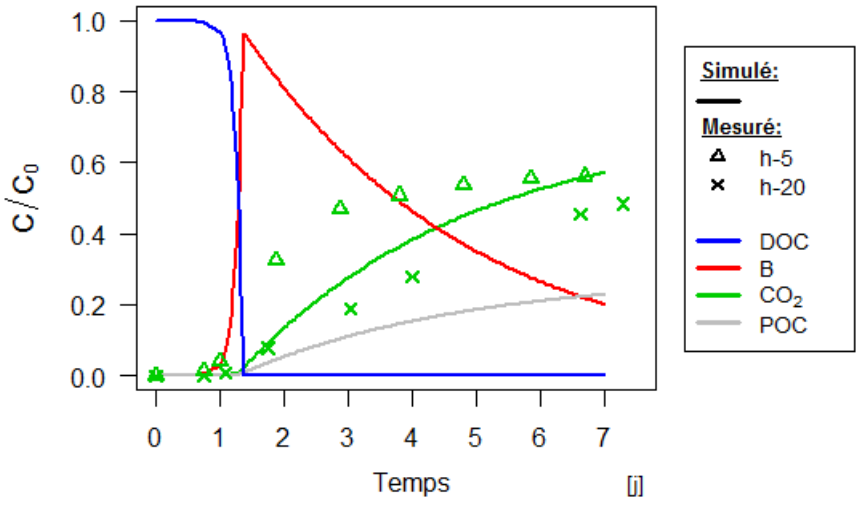


FIGURE 5.10 – **Cinétiques de minéralisations simulées et mesurées**.
Les quantités mesurées sont exprimées en masses relatives pour un bilan de ^{14}C ajusté.
Les variables simulées sont montrées pour une seule modalité (h_{-5}), les deux modalités montrant une cinétique identique (figure 5.7).

Les mesures et les simulations montrent une même tendance d'évolution pour la variable CO_2 (figure 5.10) : la respiration cumulée démarre autour de 24h et augmente jusqu'à la fin de la période suivie. Les résultats observés se distinguent des résultats simulés par le comportement différencié des deux modalités, déjà constaté dans la distribution du carbone non-extractible. Les deux modalités simulées montrent une cinétique semblable, intermédiaire entre les évolutions mesurées (augmentation sigmoïde rapide pour la modalité h_{-5} et lente accumulation pour h_{-20}). Les résultats simulés sont proches des résultats mesurés pour la modalité h_{-20} en début de cinétique : le démarrage est synchrone et l'augmentation initiale se fait au même rythme jusqu'à 48h. Ensuite, la respiration simulée s'accélère pour rejoindre les valeurs mesurées pour la modalité h_{-5}.

5.4 Discussion

Ce travail était destiné à tester les capacités de notre modèle à reproduire les tendances observées dans une expérimentation faisant varier un facteur physique – la saturation – dans des conditions spatialement hétérogènes. Certaines limitations relatives aux résultats expérimentaux (absence de répétitions, données aberrantes, faible précision des mesures, difficultés de conversion des grandeurs, *etc.*) empêchent une comparaison quantitative des données simulées et observées. Cependant, ce nouveau cas d'application du modèle est source de réflexion sur son fonctionnement et ses conditions d'application.

Nous nous sommes attelés dans ce travail à générer deux milieux poreux morphologiquement différents, à partir d'images d'échantillons réels soumis à des conditions hydriques distinctes. Les simulations n'ont pas fait apparaître de différences dans les cinétiques calculées dans ces milieux, suggérant une absence d'effet à l'échelle macroscopique de l'hétérogénéité des conditions abiotiques à l'échelle microscopique. La consommation du substrat s'est montrée aussi rapide et efficace qu'en milieu homogène. Cela signifie que nos scénarios faisaient intervenir des conditions optimales d'accessibilité physique. En effet, l'accès du substrat y était favorisé par l'omniprésence de la biomasse. Sa distribution initiale était uniforme en termes de localisation des "sites bactériens", bien que la répartition inégale des masses entre ces sites soit source d'hétérogénéité. Dans de telles conditions, notre modèle a prédit une adaptation instantanée de la demande à l'offre au niveau local. La consommation n'était sensiblement pas retardée par la diffusion : ces deux processus étaient simultanés.

Ces résultats mettent en évidence l'importance cruciale de la distribution de la biomasse. La localisation hétérogène des "sites bactériens" apparaît comme condition nécessaire pour qu'une régulation par la diffusion puisse s'exprimer dans notre modèle. Le choix d'une distribution ponctuelle, comme dans les scénarios du chapitre 2, aurait peut-être fait émergé des conclusions tout autres. La distribution bactérienne est apparue comme une question problématique récurrente au cours de cette thèse. Elle a été traitée selon des choix arbitraires, souvent motivés par des considérations pratiques plus que scientifiques, du fait de la rareté des connaissances fondamentales en la matière. Ces conclusions soulignent la nécessité de se pencher spécifiquement sur cette question. Nous pourrions tester différentes configurations de distributions ponctuelles (avec différentes tailles, distances de séparation, répartitions de *hot-spots*) et voir dans quelle mesure elles altèrent le contrôle par l'accessibilité physique. Par ailleurs, comme le contrôle par l'accessibilité physique dans notre modèle tient de la « compétition » entre vitesses de diffusion et de croissance, il pourrait être intéressant de modifier les paramètres de l'équation de Monod et de chercher une éventuelle interaction entre motifs de distribution et capacités physiologiques des bactéries.

Une tendance dans nos résultats expérimentaux semble trahir une divergence importante entre le modèle et les processus réels. La répartition hétérogène de la biomasse en fin de simulation contraste avec la situation homogène trouvée expérimentalement. L'influence d'un processus de migration des bactéries est soupçonnée (section 4.2.5). Dans notre modèle, l'évolution de la biomasse est calculée à l'échelle du site uniquement. Aucun mécanisme de transport ne cause la redistribution de la biomasse entre les sites. Une fois le substrat intégralement consommé, la biomasse diminue globalement sans que ne s'estompent les variations locales de masse. Le caractère hétérogène de la distribution bactérienne est donc obligatoirement conservé. L'absence de représentation de la dispersion des microorganismes apparaît comme une limitation importante dans notre approche. En effet, un tel phénomène aurait pour effet d'atténuer la limitation par diffusion et devrait donc être pris en compte dans l'étude du contrôle par l'accessibilité physique.

L'échelle de la cellule semble la plus appropriée pour décrire les processus de migration, comme dans les modèles multi-agents ou IBM (comme par exemple dans les modèles de Gras et al. [2011]; Long et Or [2009]; Resat et al. [2012]). Notre échelle d'étude – celle de la population – nous

demande d'inventer un moyen original de représenter la migration. Il nous faudra réfléchir à des règles d'essaimage de petites quantités de biomasse et aux modalités de calcul du transport dans la phase fluide. L'approche de Boltzmann paraît avantageuse pour traiter un nouveau mécanisme de transport. Elle a d'ailleurs déjà été employée pour simuler des processus de migration bactérienne dans les milieux poreux [Long et Or, 2009; von der Schulenburg et al., 2009].

Cet exercice nous prépare pour une véritable procédure de validation. Il a fait ressortir plusieurs points à améliorer dans le travail expérimental. Les préconisations essentielles qui émergent sont la nécessité de réaliser des répétitions et de renforcer le suivi temporel. L'évolution pendant la longue période depuis la fin supposée de la latence jusqu'à la fin de l'incubation n'est pas renseignée dans les données expérimentales actuelles. Une date de mesure intermédiaire, visant la fin de la croissance exponentielle (30-45h) nous permettrait notamment de juger de la pertinence de nos équations, prédisant un évènement de croissance très rapide et intense. Un autre point important à faire évoluer dans le protocole expérimental concerne la méthode d'inoculation du substrat et de la biomasse. Des apports plus ciblés doivent pouvoir être garantis pour imposer une véritable déconnexion spatiale entre le substrat et les décomposeurs.

D'autre part, la manière de simuler ces apports dans notre modèle, indépendamment des questions déjà abordées sur la distribution ponctuelle ou uniforme de la biomasse, pourrait être affinée. En effet, la représentation du milieu en trois zones homogènes, en référence aux mesures par tranche, ont généré des discontinuités avec des conséquences palpables sur les processus bactériens. La représentation par paliers de concentration pourrait être remplacée par la description explicite de gradients.

Un autre point critique ayant sans doute contribué à minimiser une éventuelle limitation de la cinétique par les conditions de diffusion dans nos simulations est notre méthode de traitement des images des milieux poreux. La pratique du redimensionnement est particulièrement discutable car elle entraîne des biais importants sur la description des conditions hydriques. En effet, elle modifie la taille et la forme des interfaces entre l'eau et l'air et par conséquent altéré certaines caractéristiques clé dans la régulation par l'accessibilité physique (connectivité et tortuosité de la phase aqueuse). Elle sera à prohiber dans les futurs essais de confrontation entre simulation et expérimentation. La pertinence des images utilisées en termes de propriétés structurales n'a pas été vérifiée dans ce travail. Quel que soit le degré de sophistication de la méthode de génération des milieux virtuels, une étape de caractérisation morphologique scrupuleuse devra être utilisée à la manière de la démarche mise en place dans le chapitre 2 (section 2.1.2).

Conclusion

Atouts de la méthode

Cette thèse avait pour objectif de construire un modèle spatialisé, adapté à l'étude du concept d'accessibilité physique. Nous avons pour cela couplé un modèle de Boltzmann sur réseau (TRT-LBM, [Ginzburg et al., 2008b]) calculant des processus hydriques dans les milieux poreux, et un modèle biogéochimique de carbone. Des processus physiques et biologiques y sont simulés à l'échelle des pores du sol, jugée pertinente pour décrire les conditions abiotiques dans les microhabitats et leurs conséquences sur l'activité biologique. En décrivant explicitement des conditions et processus hétérogènes à l'échelle des microhabitats et en y reliant la cinétique globale de biodégradation d'un substrat soluble, notre modèle s'est montré capable de simuler des effets de régulation de l'activité de microorganismes par la structure de leur milieu.

Notre approche s'est avérée attractive car elle offre la possibilité d'intégrer de multiples processus et facteurs décrivant les conditions abiotiques dans les microenvironnements. Les processus de transport conditionnent l'accès des microorganismes aux composés qui leur sont essentiels dans des milieux à forte hétérogénéité spatiale et font à ce titre l'objet d'une attention particulière dans le concept d'accessibilité physique [Or et al., 2007]. L'eau occupe un rôle majeur dans la description des habitats microbiens [Bouckaert et al., 2013; Thomsen et al., 1999] : sa localisation et son mouvement dans les pores déterminent les flux de matière, l'occupation et le déplacement des organismes. Les approches spatialisées qui décrivent des conditions de saturation partielle restent pourtant rares (voir par exemple les travaux de Falconer et al. [2012] ou de Monga et al. [2014] comme exceptions). Nous avons choisi d'explorer l'influence de la distribution hétérogène de l'eau à saturation partielle en régime hydrostatique, c'est-à-dire à la manière dont elle est étudiée expérimentalement, pour permettre une utilisation complémentaire des approches expérimentales et virtuelle. Dans de telles conditions, le mécanisme de transport à l'œuvre est la diffusion. Ainsi, dans tous les scénarios réalisés au cours de cette thèse, la cinétique globale de biodégradation était gouvernée par les vitesses de deux processus : la diffusion et la consommation d'un substrat soluble. La relative plasticité de notre modèle permet d'envisager l'intégration de processus variés (sorption, hydrolyse de composés insolubles, diffusion d'autres composés tels que l'oxygène dissous, *etc.*) dont les effets sur l'activité microbienne pourraient être examinés à leur tour.

L'effet régulateur de la structure s'est manifesté par le biais de trois facteurs, qui, en générant de l'hétérogénéité spatiale, ont altéré les vitesses de diffusion et de consommation du substrat. Il s'agit de l'architecture de l'espace poral, de la distribution de la phase aqueuse et de l'arrangement spatial du substrat et des décomposeurs dans la porosité. La simplicité d'implémentation d'images discrètes dans les modèles de Boltzmann sur réseau permet de recourir à des technologies d'imagerie 3D – ici la microtomographie aux rayons X – pour décrire la structure de milieux poreux réels. L'une des applications présentée dans le chapitre 5 donne aussi un exemple d'implémentation d'images de la phase aqueuse dérivée de mesures tomographiques. Autrement, la distribution de la phase aqueuse à saturation partielle est simulée par le modèle TRT-LBM, conçu pour calculer de divers processus dans différents régimes hydriques. Enfin, l'approche discrète de notre modèle laisse toute

latitude pour définir le positionnement des substrats et des décomposeurs. L'influence de ces trois facteurs définissant l'effet de la structure – architecture de la porosité, distribution de la phase aqueuse, distribution des substrat et décomposeurs – peut par ailleurs être comparée à celle de propriétés intrinsèques des microorganismes, en jouant simplement sur les paramètres du module de biodégradation. Dans une première application du modèle (chapitre 2), nous avons ainsi tenté une hiérarchisation entre les facteurs de structure et un facteur propre aux microorganismes. Ce travail a montré, pour les conditions définies dans nos scénarios, une dominance des facteurs physiques sur le facteur biologique, ainsi que l'importance des interactions entre les facteurs physiques.

Nous avons pris le parti d'une description relativement simple des processus microbiens. Le module de biodégradation calcule la consommation du substrat et la croissance selon un formalisme couramment utilisé dans les modèle de décomposition de la MOS, la loi de Monod [1941]. Des hypothèses fortes – négligence du rôle des champignons, immobilité des bactéries, non-considération des comportements à l'échelle cellulaire – ont été consenties pour faciliter l'interprétation des tendances simulées et mieux discerner l'influence des conditions abiotiques. Les conséquences de ces choix dans la conception du module de biodégradation ont par ailleurs été étudiées et font l'objet d'un chapitre entier de ce manuscrit (chapitre 3).

L'échelle de notre modèle – celle des pores du sol – constitue un de ses atouts. Cette échelle est jugée déterminante pour de nombreux processus. Cependant elle reste encore insuffisamment étudiée – notamment sur les questions impliquant des processus biologiques – car elle est difficile à explorer. Le développement de méthodes expérimentales et calculatoires variées est donc souhaitable pour faire progresser la connaissance des phénomènes à cette échelle. Avec notre modèle, la mise en scène de processus divers dans des conditions hétérogènes à l'échelle des pores a permis de dévoiler des mécanismes de régulation insoupçonnés, pouvant aider à interpréter des tendances à une échelle macroscopique. Ainsi des propriétés de structure – longueur à la diffusion, tortuosité de la phase aqueuse, concentration en substrat – se sont exprimées en des effets variés, antagonistes selon les conditions locales de diffusion (chapitre 2). De tels mécanismes pourraient avoir leur importance dans la variabilité de la réponse des microorganismes aux conditions hydriques dans le sol observée à l'échelle macroscopique.

Les différentes applications de notre modèle l'ont révélé comme un outil attractif dans une démarche exploratoire, adapté pour tester des hypothèses et en formuler de nouvelles, à tester ultérieurement. Il a permis d'identifier des mécanismes possibles de régulation jouant à une échelle microscopique et a mis en lumière des points à l'importance critique (par exemple, dans le chapitre 5 notamment, les motifs de distribution bactérienne). Par ailleurs, la possibilité de générer de nombreux scénarios et la conception de plans d'expériences virtuelles adaptés à une analyse statistique des résultats permet une estimation quantitative sur des effets provenant de propriétés microscopiques difficiles à caractériser (voir section 2.3.2).

Limites

Limitations du module de biodégradation

Des incertitudes de plusieurs origines réduisent le niveau de confiance dans les sorties du modèle et cantonnent pour l'instant son usage à des fins exploratoires et non prédictives. La structure du modèle et les modalités de représentation des conditions physiques sont deux sources potentielles d'erreurs. Les analyses d'incertitudes menées sur le module de biodégradation ont pointé le degré élevé d'incertitudes attribuable aux seules valeurs de paramètres cinétiques et de concentrations initiales (chapitre 3). En effet, la variation en combinaison des valeurs trouvées dans la littérature a fréquemment généré une variabilité maximale dans la réponse du modèle. La paramétrisation du module de biodégradation s'avère donc décisive. Or, cette opération s'appuie sur des données

expérimentales difficiles à obtenir. Ainsi les données que nous avons produites aux cours d'expériences spécialement réalisées dans cet objectif n'ont pas montré une qualité suffisante pour pouvoir entreprendre une procédure de calibration.

Les analyses d'incertitudes et de sensibilité ont été l'occasion d'identifier des traits simulés qui décrivent mal le métabolisme bactérien. Nous avons par exemple observé une transition abrupte de la biomasse lors de la phase de croissance, un changement radical d'état physiologique lors de la mise en dormance et un couplage insuffisant entre cinétiques de respiration et de croissance. Ces caractéristiques sont de nature à altérer les conclusions sur l'effet des conditions physiques simulé par le modèle spatialisé. Dans celui-ci, le réglage entre vitesses de diffusion et de consommation du substrat gouverne la cinétique de biodégradation. La surestimation de la vitesse de croissance ou la réduction excessive de l'état physiologique peuvent respectivement atténuer ou accentuer l'effet limitant lié à la diffusion du substrat. Toutefois, lorsque l'influence simultanée de facteurs physiques et biologiques a été étudiée, la physiologie bactérienne a montré un faible impact sur la cinétique de biodégradation comparé à la régulation exercée par les facteurs de structure, pour nos scénarios (chapitre 2). Quelques pistes ont été évoquées pour modifier le module de biodégradation (calcul de la respiration de croissance par la considération d'un rendement d'assimilation, révision de la représentation de la dormance, *etc.*, voir section 3.4).

Limitations relatives à la spatialisation

Aux incertitudes associées au module de biodégradation s'ajoutent celles qui relèvent de la représentation des conditions abiotiques et des processus de transport dans le modèle spatialisé. Ces approximations proviennent de gaps fondamentaux, de simplifications décidées pour alléger la description de systèmes naturellement très complexes, ou de biais méthodologiques.

Certains aspects dans notre modèle ont parfois été décrits avec arbitraire, à défaut de connaissances fondamentales précises sur le sujet. Il en est ainsi de la distribution initiale des bactéries. Elle a parfois été représentée uniforme ou agrégée en amas dont les caractéristiques spatiales (taille, distance et densité) ont été choisies *a priori*, selon les circonstances (sections 2.1.4 et 5.3). Or, ces choix semblent conditionner l'expression des phénomènes de régulation par la structure (section 5.4).

Certains processus ont été ignorés dans le but de simplifier la description d'un milieu complexe. Nos scénarios décrivent un système statique dans lequel l'eau et les décomposeurs sont strictement immobiles et l'accessibilité physique déterminée uniquement par la diffusion du substrat. Les conclusions obtenues dans cette thèse ne s'appliquent que pour le régime hydrostatique alors que le sol, système ouvert en échange avec son environnement, est caractérisé par de fréquents flux d'eau dans ses pores. Le transport de soluté par convection est bien plus rapide que par diffusion. L'emprise de la diffusion illustrée dans nos scénarios de modélisation serait donc nettement minorée hors de conditions purement hydrostatiques. En outre, dans les conditions naturelles la distribution du substrat n'est pas seule a être amenée à évoluer. Le déplacement des microorganismes – par des processus passifs ou actifs – est susceptible de peser dans le contrôle par l'accessibilité physique. En particulier, des phénomènes de migration active par attraction des bactéries vers le substrat (chimiotactisme) contrebalanceraient la répression de l'activité microbienne causée par une diffusion limitante du substrat.

Notre approche a été conçue pour représenter le rôle central de l'eau dans le concept d'accessibilité physique. Ainsi, la distribution hétérogène de la phase aqueuse dans la porosité à saturation partielle s'est révélée déterminante dans l'accès des bactéries à leur substrat dans certains de nos scénarios (section 2.3). Dans les conditions naturelles toutefois, l'accès au substrat n'est pas l'unique facteur limitant de l'activité microbienne qui soit affecté par la distribution de la phase aqueuse. La respiration hétérotrophe du sol est co-limitée par les sources de carbone et l'oxygène. Tous

deux ont un rôle antagoniste quant à l'influence de la saturation en eau sur l'activité microbienne (modèle conceptuel de Skopp et al. [1990], figure 1). La diffusion limitante de l'oxygène dans la phase aqueuse est supposée réprimer la biodégradation pour les indices de saturation élevés. Ce déclin potentiel de l'activité microbienne est pour l'instant ignoré par notre modèle.

Enfin et surtout, nos hypothèses simplificatrices mettent en exergue le rôle de la diffusion alors qu'un biais méthodologique important limite l'exactitude du calcul de ce processus. La discrétisation de l'espace tronque la distribution de taille de pores en causant l'omission de la porosité non-résolue. Les voxels appartenant à la phase solide sont définis comme imperméables au transfert de soluté alors qu'ils comprennent en réalité pour des échantillons de sol des micropores non-résolus dans lesquels le substrat diffuse, quoique lentement. La discrétisation de la porosité fausse le calcul de la diffusion en sous-estimant le volume poreux disponible pour la propagation du substrat, et en sur-estimant la vitesse de diffusion par le « lissage » de la topologie réelle du milieu. La discrétisation de l'espace affecte également la simulation de la distribution de l'eau. Elle empêche notamment la représentation de films d'eau plus fins que la résolution et peut ainsi entraîner une sous-estimation de la connectivité de la phase aqueuse. Le calcul de la diffusion est donc doublement altéré par l'approximation de la géométrie de milieux poreux à saturation partielle, par l'omission des flux dans la microporosité et par la réduction excessive de la connectivité hydraulique. La fragmentation artificielle de la phase aqueuse a montré avoir de lourdes répercutions sur les conditions d'accessibilité du substrat simulées par notre modèle, avec notamment l'apparition d'une déconnexion hydraulique totale entre source de substrat et décomposeurs causant une répression absolue de l'activité microbienne (section 2.3.1).

Pertinence du modèle à différentes échelles

Les méso- et macropores (pores dont le diamètre est supérieur à 10 μm [Luxmoore, 1981]) sont caractérisés par une morphologie complexe et une grande hétérogénéité spatiale dans les conditions abiotiques [Jarvis et al., 2007]. L'échelle de la macroporosité est donc déterminante dans la problématique d'accessibilité physique. Les applications du modèle présentées dans ce manuscrit ont toutes pris place à l'échelle des macropores. Cependant, plusieurs des hypothèses simplificatrices limitent la pertinence du modèle à cette échelle. Les macropores sont caractérisés par une fluctuation importante des conditions hydriques. Le cas hydrostatique limite donc particulièrement la représentativité de nos scénarios. Par ailleurs, les seuls décomposeurs représentés dans notre modèle sont des bactéries. Ce choix limite lui aussi la généricité des résultats simulés puisque que les macropores seraient le plus souvent dominés par les champignons [Foster, 1988]. Ces deux limitations (omission du transport convectif et des champignons) rendent nos scénarios pertinents pour décrire des systèmes expérimentaux, mais leurs conclusions ne peuvent pas s'étendre aux conditions courantes dans la macroporosité du sol. Enfin, le rôle important des micropores dans les flux diffusifs et en tant qu'habitat bactérien est négligé.

Les micropores (pores de diamètre inférieur à 10 μm [Luxmoore, 1981]) sont souvent considérés comme un habitat privilégié des bactéries [Ranjard et Richaume, 2001]. Par ailleurs, un effet régulateur important de la structure est attendu dans les micropores, du fait de leur forte tortuosité. Ces espaces semblent donc intéressants à étudier dans le cadre de l'étude des microhabitats et des liens entre les conditions abiotiques qui y règnent et l'activité des bactéries. Les spécificités de notre modèle rendent son utilisation pertinente à l'échelle des micropores. Dans les micropores, le transport des solutés est principalement diffusif du fait de la faible mobilité de la phase aqueuse. La simulation de conditions hydrostatiques est donc plus représentative à cette échelle qu'à celle des macropores. De plus, à l'échelle des micropores, l'omission des champignons comme acteurs de la biodégradation serait plus recevable. Enfin, représenter les micropores permettrait de décrire plus finement les microhabitats en réduisant les erreurs sur la diffusion et sur la distribution de la phase

aqueuse provenant de la discrétisation de l'espace. Cependant, l'échelle des micropores est aussi celle de la cellule bactérienne et notre module de biodégradation est conçu pour représenter les bactéries sous la forme de colonies ou populations. Un modèle individu-centré serait donc certainement plus indiqué. L'approche IBM a aussi l'avantage de représenter plus naturellement les phénomènes de migration, dont le poids dans la problématique d'accessibilité physique mériterait d'être vérifié. Le couplage de notre modèle de Boltzmann sur réseau avec un modèle individu-centré permettrait d'atteindre un degré de complexité plus proche des conditions du sol. En effet, non seulement les conditions abiotiques mais aussi le comportement des bactéries seraient spatialement hétérogènes. Une telle approche n'a pas été envisagée dans le cadre de cette thèse qui visait à fournir un outil permettant la mise en évidence d'effets de la structure sur l'activité microbienne. En effet, la représentation de la variabilité spatiale du comportement risquerait de compliquer l'interprétation des résultats et pourrait nuire à l'identification des effets de la structure.

Perspectives

Cette thèse a donné naissance à un nouveau modèle dédié à l'étude du contrôle de la biodégradation par la structure du sol. Différentes carences citées plus haut limitent la robustesse des résultats et pourraient faire l'objet d'améliorations. Parmi les questions les plus urgentes figure le besoin de prendre en compte la porosité non-résolue.

Toutefois, quels que soient les amendements à la structure du modèle, des étapes de calibration et de validation sont incontournables pour augmenter la confiance dans les sorties du modèle. De nouvelles expérimentations devront donc être menées.

Les différentes applications relatées dans ce manuscrit ont d'ores-et-déjà montré la capacité du modèle à explorer l'influence des conditions environnementales dans le microhabitats. De nombreuses pistes de réflexion sont ouvertes et peuvent être investiguées. Une des questions qui a émergé suite à nos travaux concerne l'influence de la distribution bactérienne. Cet aspect pourra être étudié à l'aide de notre modèle allié à des méthodes statistiques telles que celles qui ont été employées au cours de ce travail (sections 2.2, 3.2.1, 3.2.2).

Enfin, bien que la compréhension des processus à l'échelle des microhabitats soit nécessaire pour elle-même, des stratégies de changement d'échelle doivent être imaginées pour que les connaissances acquises à l'échelle microscopique – celle des mécanismes – puissent être prises en compte par les modèles prédictifs fonctionnant à l'échelle macroscopique – celle des enjeux.

Prise en compte de la porosité non-résolue

La porosité non-résolue doit être prise en compte dans les calculs pour réduire les erreurs provoquées par la discrétisation de l'espace. Une méthode relativement simple pour le faire consisterait à décrire la phase solide comme perméable aux flux diffusifs. La diffusion dans la porosité non résolue serait décrite implicitement, en abolissant les conditions limites de rebond aux frontières entre la phase solide et la phase fluide et en affectant à la phase solide un coefficient de diffusion faible, correspondant à un coefficient de diffusion effective. Reste alors à estimer un tel coefficient. L'évaluation de vitesses de diffusion effective pourrait être réalisée par des moyens expérimentaux. Elle pourrait aussi faire l'objet d'une étude à l'aide de notre modèle, en simulant la diffusion dans des micropores explicitement décrits par l'implémentation d'images tomographiques à haute résolution (nanométrique à submicrométrique). Cette méthode devrait cependant être validée par des mesures de diffusion. La consommation pourrait, tout comme la diffusion, être calculée dans la porosité non-résolue. Des sites dans la phase solide pourraient être désignés comme "sites bactériens". Des règles concernant la densité maximale dans ces sites pourraient être dictées pour prendre en compte la contrainte spatiale du développement bactérien due au confinement dans les

micropores. La simulation de la diffusion dans la porosité non-résolue aurait cependant pour inconvénient d'augmenter considérablement le nombre d'unités de calcul donc la durée des simulations, puisque la diffusion serait simulée dans tous les sites du milieu.

Calibration et validation du modèle

Les résultats non concluants obtenus dans de premières expérimentations prévues pour la calibration et la validation du modèle ont soulevé des points critiques à respecter ou à changer (chapitre 4). Les incubations de calibration en milieu non structuré – solution ou suspension de sol – devront être recommencées avec une meilleure maîtrise de la stérilité (abandon de la phase de rinçage du carbone organique dissous natif) et un suivi cinétique de toutes les variables en jeu. L'expérimentation en milieu structuré – agrégats compactés avec ajustement du potentiel et apports localisés – destinée à la validation est plus difficile à mettre en œuvre et nécessite une révision sur plusieurs points de sa méthode. Le protocole d'inoculation du substrat et des bactéries doit permettre des apports localisés et une meilleure maîtrise des conditions hydriques pour garantir des conditions initiales contrastées à l'intérieur des échantillons (déconnexion spatiale initiale entre substrat et décomposeurs) et entre les modalités.

Exploration des effets de la distribution bactérienne

La distribution bactérienne devra faire l'objet d'une étude approfondie, justifiée à la fois par la grande sensibilité de notre modèle à cet égard et par le besoin de mieux connaitre et comprendre l'influence de cet aspect en général. L'influence de différents paramètres de distribution pourrait être quantifiée selon la méthode décrite dans la section 2.2, par la variation de facteurs selon un plan factoriel complet suivi d'une analyse de sensibilité globale. Les résultats des applications déjà réalisées soulignent l'importance d'une distribution ponctuelle (section 5.5). L'étude des caractéristiques des *spots* bactériens – étendue, densité, espacement moyen – comme facteurs permettrait peut-être de faire émerger des motifs favorables ou défavorables vis-à-vis de l'accès au substrat, à mettre en lien avec les conclusions d'autres approches traitant de ce sujet [Dechesne et al., 2003; Grundmann et al., 2001; Raynaud et Nunan, 2014]. L'impact de ces caractéristiques des *hot-spots* pourra aussi être comparé à d'autres facteurs décrivant l'arrangement spatial – répartition du substrat, des masses bactériennes par *spot*, *etc.* – pour mieux comprendre leurs influences respectives et combinées, et ainsi identifier les critères importants à prendre en considération lors de l'initialisation pour des applications futures du modèle.

Transferts vers l'échelle macroscopique

Une des principales réserves émises sur la méthode de Boltzmann sur réseau est sa lourdeur à haute résolution limitant son usage à des volumes restreints. Nous avons opéré nos simulations dans des volumes d'environ 300 mm^3 (chapitre 2) et 20 mm^3 (chapitre 5). Cette limitation proscrit l'emploi de modèles de Boltzmann sur réseau pour un usage prédictif à une échelle macroscopique. C'est pourquoi des stratégies de changement d'échelle doivent être trouvées.

On peut chercher à étendre le volume de prospection pour se rapprocher de l'échelle d'échantillons utilisés à des fins expérimentales. Un moyen pourrait être de diviser l'image entière de l'échantillon en sous-parties et de calculer les processus de manière séquentielle dans ces différentes sous-parties. Imaginons un apport de substrat soluble sous la forme d'un *pulse* localisé en haut de l'échantillon, décrit par une succession de strates indépendantes. Le transport et la consommation du substrat seraient d'abord calculés dans la première strate, recevant directement l'apport du substrat. Des conditions aux limites de puits infini seraient appliquées sur la bordure inférieure de la strate et la cinétique d'élution du substrat traversant cette bordure serait enregistrée par le modèle.

Puis, dans une étape suivante, le transport et la consommation du substrat seraient calculés dans la strate juste en dessous avec l'apport de substrat imposé selon la cinétique d'élution enregistrée précédemment, et ainsi de suite. L'évolution temporelle des variables pour l'ensemble du milieu serait reconstituée à partir de la cinétique dans chacune des strates. Le traitement séquentiel des différentes sous-parties de l'image permettrait de traiter de volumes plus larges qu'initialement avec une précision élevée, en contournant la limitation de capacité de calcul. Cette méthode pourrait être employée pour simuler la cinétique de biodégradation dans des échantillons relativement grands, donc faciles à manipuler. Elle pourrait être plus exacte que celle que nous avions utilisée dans le chapitre 5 qui impliquait une altération importante de l'image discrète du milieu. Cette approche, très gourmande en temps de calcul, est en revanche peu indiquée pour le traitement de scénarios en grand nombre.

L'ambition plus commune d'un changement d'échelle est la transmission de l'information sur l'hétérogénéité spatiale microscopique dans les modèles prédictifs macroscopiques. Ce transfert peut être opéré à l'aide de fonctions de régulation, comparables à celles qui traitent de la température ou de la teneur en eau dans de nombreux modèles de décomposition de la MOS. Notre modèle spatialisé peut servir à estimer des relations statistiques entre déterminants microscopiques et variables cinétiques comme l'ont fait Nkongolo et al. [2010] à partir de résultats expérimentaux : ils ont défini des relations statistiques entre différents déterminants du transport gazeux à l'échelle des pores (notamment, le coefficient de diffusion des gaz, la tortuosité) et les émissions de gaz à effet de serre mesurées dans des échantillons à structure intacte. Une démarche similaire peut facilement être envisagée avec notre modèle. Elle s'appuierait d'ailleurs sur la méthode illustrée dans le chapitre 2, basée sur un plan d'expériences virtuelles suivi d'une analyse statistique. Des scénarios combinant plusieurs facteurs source d'hétérogénéité à l'échelle microscopique seraient construits. Pour maximiser le nombre et la variété des configurations, une attention particulière serait portée à la confection de milieux hétérogènes simples mais contrastés. Des indicateurs quantifiant des propriétés physiques pertinentes à l'échelle des pores seraient calculés. Enfin, des relations statistiques entre résultats des cinétiques de biodégradation et déterminants microscopiques pourraient être établies et servir de base pour l'édification de fonctions de régulation à intégrer aux modèles macroscopiques.

Un outil novateur a été construit pour explorer environnement mal connu – l'espace poral du sol – et l'impact de sa structure sur l'activité des êtres vivants qu'il abrite – les microorganismes. Cette thèse a déjà fourni des exemples d'applications intéressantes de cet outil. Le modèle LBioS peut servir à étudier l'influence du potentiel hydrique sur l'activité microbienne. Il a déjà prouvé son intérêt dans l'étude de cette question : la description des conditions hétérogènes dans les pores dans de multiples scénarios a permis de faire émerger des mécanismes microscopiques pouvant contribuer à la variabilité de la réponse microbienne à l'altération de la saturation en eau. Le modèle peut être utilisé conjointement à des incubations testant l'influence des conditions hydriques sur l'activité microbienne pour un potentiel fixe. La confrontation du modèle à une expérimentation de ce type pendant cette thèse n'a pas fait apparaître d'effet de la saturation sur l'activité microbienne mais a en revanche donné l'occasion d'identifier un déterminant microscopique potentiellement important dans la régulation de la biodégradation par la structure : les motifs de distribution bactérienne. L'étude spécifique de cet aspect est un exemple de perspectives entrevues pour poursuivre l'exploration des processus à l'échelle microscopique et de leurs conséquences sur le fonctionnement global d'un système. La conception de plans d'expériences virtuelles alliés à des méthodes d'analyse statistique, déjà illustrée dans ce travail semble prometteuse pour différentes problématiques, et notamment celle du changement d'échelle.

Bibliographie

Aidun, C. K. et J. R. Clausen. 2010, «Lattice-boltzmann method for complex flows», *Annual review of fluid mechanics*, vol. 42, p. 439–472.

Allison, S. D., M. D. Wallenstein et M. A. Bradford. 2010, «Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology», *Nature Geoscience*, vol. 3, n° 5, p. 336–340.

Aslam, S., P. Garnier, C. Rumpel, S. E. Parent et P. Benoit. 2013, «Adsorption and desorption behavior of selected pesticides as influenced by decomposition of maize mulch», *Chemosphere*, vol. 91, n° 11, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.005, p. 1447–1455.

Balesdent, J., D. Arrouays, C. Chenu et C. Feller. 2011, «Stockage et recyclage du carbone», dans *Sols et environnement*, édité par M. Girard, C. Walter, J. Rémy, J. Berthelin et J. Morel, 2e éd., Dunod, Paris, p. 108–132.

Barja, I. et L. Núñez. 1999, «Microcalorimetric measurements of the influence of glucose concentration on microbial activity in soils», *Soil biology and biochemistry*, vol. 31, n° 3, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00149-7, p. 441–447.

Barré, P., O. Fernandez-Ugalde, I. Virto, B. Velde et C. Chenu. 2014, «Impact of phyllosilicate mineralogy on organic carbon stabilization in soils : incomplete knowledge and exciting prospects», *Geoderma*, vol. 235, doi : http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.07.029, p. 382–395.

Barrett, L. K. et C. Yust. 1970, «Some fundamental ideas in topology and their application to problems in metallography», *Metallography*, vol. 3, n° 1, p. 1–33.

Baveye, P. C., M. Laba, W. Otten, L. Bouckaert, P. Dello Sterpaio, R. R. Goswami, D. Grinev, A. Houston, Y. Hu, J. Liu et al.. 2010, «Observer-dependent variability of the thresholding step in the quantitative analysis of soil images and x-ray microtomography data», *Geoderma*, vol. 157, n° 1, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.03.015, p. 51–63.

Baveye, P. C., D. Rangel, A. R. Jacobson, M. Laba, C. Darnault, W. Otten, R. Radulovich et F. A. Camargo. 2011, «From dust bowl to dust bowl : soils are still very much a frontier of science», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 75, n° 6, doi :http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2011.0145, p. 2037–2048.

Berns, A., H. Philipp, H.-D. Narres, P. Burauel, H. Vereecken et W. Tappe. 2008, «Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state nmr, uv and fluorescence spectroscopy», *European Journal of Soil Science*, vol. 59, n° 3, p. 540–550.

Berthelin, J., F. Andreux et C. Munier-Lamy. 2011, «Constituants originaux du sol : réactivité et interactions», dans *Sols et environnement*, édité par M. Girard, C. Walter, J. Rémy, J. Berthelin et J. Morel, 2e éd., Dunod, Paris, p. 39–65.

Blagodatsky, S., E. Blagodatskaya, T. Yuyukina et Y. Kuzyakov. 2010, «Model of apparent and real priming effects : linking microbial activity with soil organic matter decomposition», *Soil biology and biochemistry*, vol. 42, n° 8, p. 1275–1283.

Blagodatsky, S. et O. Richter. 1998, «Microbial growth in soil and nitrogen turnover : a theoretical model considering the activity state of microorganisms», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 30, n° 13, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00028-5, p. 1743–1755.

Boswell, G. P. 2008, «Modelling mycelial networks in structured environments», *Mycological research*, vol. 112, n° 9, p. 1015–1025.

Bouckaert, L., D. Van Loo, N. Ameloot, D. Buchan, L. Van Hoorebeke et S. Sleutel. 2013, «Compatibility of x-ray micro-computed tomography with soil biological experiments», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 56, p. 10–12.

Bousquet, F. et C. Le Page. 2004, «Multi-agent simulations and ecosystem management : a review», *Ecological modelling*, vol. 176, n° 3, p. 313–332.

van Brakel, J. et P. Heertjes. 1974, «Analysis of diffusion in macroporous media in terms of a porosity, a tortuosity and a constrictivity factor», *International Journal of Heat and Mass Transfer*, vol. 17, doi :http://dx.doi.org/10.1016/0017-9310(74)90190-2, p. 1093–1103.

Cambier, C., M. Bousso, D. Masse et E. Perrier. 2007, «A new, offer versus demand, modelling approach to assess the impact of micro-organisms spatio-temporal population dynamics on soil organic matter decomposition rates», *ecological modelling*, vol. 209, n° 2, p. 301–313.

Campolongo, F., A. Saltelli, T. Sø rensen et S. Tarantola. 2000, «Chapter 2 : Hitchhiker's guide to sensitivity analysis», dans *Sensitivity analysis*, édité par A. Saltelli, K. Chan, E. M. Scott et al., Wiley, New York, p. 15–47.

Carson, J. K., V. Gonzalez-Quiñones, D. V. Murphy, C. Hinz, J. A. Shaw et D. B. Gleeson. 2010, «Low pore connectivity increases bacterial diversity in soil», *Applied and environmental microbiology*, vol. 76, n° 12, p. 3936–3942.

Cazelles, K., W. Otten, P. C. Baveye et R. E. Falconer. 2013, «Soil fungal dynamics : Parameterisation and sensitivity analysis of modelled physiological processes, soil architecture and carbon distribution», *Ecological Modelling*, vol. 248, p. 165–173.

Chabauty, C., V. Pot, M. Bourdat-Deschamps, N. Bernet, C. Labat et P. Benoit. 2015, «Transport of organic contaminants in subsoil horizons and effects of dissolved organic matter related to organic waste recycling practices», .

Chau, J., D. Or et M. Sukop. 2005, «Simulation of gaseous diffusion in partially saturated porous media under variable gravity with lattice boltzmann methods», *Water Resources Research*, vol. 41, n° 8, doi :http://dx.doi.org/10.1029/2004WR003821.

Chenu, C., J. Hassink et J. Bloem. 2001, «Short-term changes in the spatial distribution of microorganisms in soil aggregates as affected by glucose addition», *Biology and Fertility of Soils*, vol. 34, n° 5, doi :{http://dx.doi.org/10.1007/s003740100419}, p. 349–356, ISSN 0178-2762.

Chenu, C. et A. Plante. 2006, «Clay-sized organo-mineral complexes in a cultivation chronosequence : revisiting the concept of the 'primary organo-mineral complex'», *European Journal of Soil Science*, vol. 57, n° 4, p. 596–607.

Chopard, B. et M. Droz. 1998, *Cellular automata*, Springer.

Chowdhury, N., P. Marschner et R. Burns. 2011, «Response of microbial activity and community structure to decreasing soil osmotic and matric potential», *Plant and Soil*, vol. 344, n° 1-2, p. 241–254.

Clennell, M. B. 1997, «Tortuosity : a guide through the maze», *Geological Society, London, Special Publications*, vol. 122, n° 1, doi :http://dx.doi.org/10.1144/gsl.sp.1997.122.01.18, p. 299–344.

Coody, P. N., L. E. Sommers et D. W. Nelson. 1986, «Kinetics of glucose uptake by soil microorganisms», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 18, n° 3, doi :http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(86)90062-3, p. 283–289.

Coucheney, E. 2009, *Effets combinés de facteurs climatiques et de la diversité sur le fonctionnement de communautés bactériennes : respiration et métabolomique.*, thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie.

Craine, J., C. Morrow et N. Fierer. 2007, «Microbial nitrogen limitation increases decomposition», *Ecology*, vol. 88, p. 2105—-2113.

Darrah, P. 1991, «Models of the rhizosphere», *Plant and Soil*, vol. 133, n° 2, doi :http://dx.doi.org/10.1007/BF00009191, p. 187–199.

Dechesne, A., D. Or et B. F. Smets. 2008, «Limited diffusive fluxes of substrate facilitate coexistence of two competing bacterial strains», *FEMS microbiology ecology*, vol. 64, n° 1, p. 1–8.

Dechesne, A., C. Pallud, D. Debouzie, J. Flandrois, T. Vogel, J. Gaudet et G. Grundmann. 2003, «A novel method for characterizing the microscale 3d spatial distribution of bacteria in soil», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 35, n° 12, p. 1537–1546.

Dechesne, A., G. Wang, G. Gülez, D. Or et B. F. Smets. 2010, «Hydration-controlled bacterial motility and dispersal on surfaces», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, n° 32, doi :http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1008392107, p. 14 369–14 372.

d'Humières, D. 2002, «Multiple–relaxation–time lattice boltzmann models in three dimensions», *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 360, n° 1792, doi :http://dx.doi.org/10.1098/rsta.2001.0955, p. 437–451.

d'Humières, D. et I. Ginzburg. 2009, «Viscosity independent numerical errors for lattice boltzmann models : from recurrence equations to "magic" collision numbers», *Computers & Mathematics with Applications*, vol. 58, n° 5, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.camwa.2009.02.008, p. 823–840.

Don, A., C. Rödenbeck et G. Gleixner. 2013, «Unexpected control of soil carbon turnover by soil carbon concentration», *Environmental Chemistry Letters*, vol. 11, n° 4, doi :http://dx.doi.org/10.1007/s10311-013-0433-3, p. 407–413.

Downie, H., N. Holden, W. Otten, A. J. Spiers, T. A. Valentine et L. X. Dupuy. 2012, «Transparent soil for imaging the rhizosphere», .

Dubois, F. 2007, «Une introduction au schéma de boltzmann sur réseau», dans *ESAIM : Proceedings*, vol. 18, EDP Sciences, p. 181–215.

Dullien, F. 1992, «Pore structure», dans *Porous Media*, Elsevier BV, p. 5–115, doi :http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-223651-8.50007-9.

Dungait, J. A., D. W. Hopkins, A. S. Gregory et A. P. Whitmore. 2012, «Soil organic matter turnover is governed by accessibility not recalcitrance», *Global Change Biology*, vol. 18, n° 6, doi :http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02665.x, p. 1781–1796.

Dupin, H. J., P. K. Kitanidis et P. L. McCarty. 2001, «Simulations of two-dimensional modeling of biomass aggregate growth in network models», *Water resources research*, vol. 37, n° 12, p. 2981–2994.

Ehrhardt, C., R. Haymon, S. M. Sievert et P. Holden. 2009, «An improved method for nanogold in situ hybridization visualized with environmental scanning electron microscopy», *Journal of microscopy*, vol. 236, n° 1, p. 5–10.

Elyeznasni, N., F. Sellami, V. Pot, P. Benoit, L. Vieuble-Gonod, I. Young et S. Peth. 2012, «Exploration of soil micromorphology to identify coarse-sized om assemblages in x-ray ct images of undisturbed cultivated soil cores», *Geoderma*, vol. 179, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.02.023, p. 38–45.

Falconer, R. E., A. N. Houston, W. Otten et P. C. Baveye. 2012, «Emergent behavior of soil fungal dynamics : Influence of soil architecture and water distribution», *Soil Science*, vol. 177, n° 2, doi :http://dx.doi.org/10.1097/SS.0b013e318241133a, p. 111–119.

Falloon, P., C. D. Jones, M. Ades et K. Paul. 2011, «Direct soil moisture controls of future global soil carbon changes : An important source of uncertainty», *Global Biogeochemical Cycles*, vol. 25, n° 3, doi :http://dx.doi.org/10.1029/2010GB003938.

Fang, C. et J. B. Moncrieff. 1999, «A model for soil co_2 production and transport 1 : : Model development», *Agricultural and Forest Meteorology*, vol. 95, n° 4, p. 225–236.

Fang, C. et J. B. Moncrieff. 2005, «The variation of soil microbial respiration with depth in relation to soil carbon composition», *Plant and Soil*, vol. 268, n° 1, p. 243–253.

Folse III, H. J. et S. D. Allison. 2012, «Cooperation, competition, and coalitions in enzyme-producing microbes : social evolution and nutrient depolymerization rates», *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, doi :http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00338.

Fontaine, S. et S. Barot. 2005, «Size and functional diversity of microbe populations control plant persistence and long-term soil carbon accumulation», *Ecology Letters*, vol. 8, n° 10, p. 1075–1087.

Fontaine, S., S. Barot, P. Barré, N. Bdioui, B. Mary et C. Rumpel. 2007, «Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply», *Nature*, vol. 450, n° 7167, p. 277–280.

Foster, R. 1988, «Microenvironments of soil microorganisms», *Biology and Fertility of Soils*, vol. 6, n° 3, doi : http://dx.doi.org/10.1007/BF00260816, p. 189–203.

Franzluebbers, A. 1999, «Microbial activity in response to water-filled pore space of variably eroded southern piedmont soils», *Applied Soil Ecology*, vol. 11, n° 1, p. 91–101.

Friedlingstein, P., P. Cox, R. Betts, L. Bopp, W. Von Bloh, V. Brovkin, P. Cadule, S. Doney, M. Eby, I. Fung et al.. 2006, «Climate-carbon cycle feedback analysis : Results from the c4mip model intercomparison», *Journal of Climate*, vol. 19, n° 14, p. 3337–3353.

Gardner, M. 1970, «Mathematical games : The fantastic combinations of john conway's new solitaire game "life"», *Scientific American*, vol. 223, n° 4, p. 120–123.

Garnier, P., C. Cambier, M. Bousso, D. Masse, C. Chenu et S. Recous. 2008, «Modeling the influence of soil-plant residue contact on carbon mineralization : Comparison of a compartmental approach and a 3d spatial approach», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 40, n° 11, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.032, p. 2754–2761.

Garnier, P., C. Neel, C. Aita, S. Recous, F. Lafolie et B. Mary. 2003, «Modelling carbon and nitrogen dynamics in a bare soil with and without straw incorporation», *European Journal of Soil Science*, vol. 54, n° 3, doi : http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2389.2003.00499.x, p. 555–568.

Genty, A. et V. Pot. 2013, «Numerical simulation of 3d liquid-gas distribution in porous media by a two-phase trt lattice boltzmann method», *Transport in Porous Media*, vol. 96, n° 2, p. 271–294.

Genty, A. et V. Pot. 2014, «Numerical calculation of effective diffusion in unsaturated porous media by the TRT lattice Boltzmann method», *Transport in Porous Media*, vol. 105, doi :http://dx.doi.org/10.1007/s11242-014-0374-8, p. 391–410.

Gharasoo, M., F. Centler, P. Regnier, H. Harms et M. Thullner. 2012, «A reactive transport modeling approach to simulate biogeochemical processes in pore structures with pore-scale heterogeneities», *Environmental Modelling & Software*, vol. 30, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.envsoft.2011.10.010, p. 102–114.

Gignoux, J., J. House, D. Hall, D. Masse, H. B. Nacro et L. Abbadie. 2001, «Design and test of a generic cohort model of soil organic matter decomposition : the somko model», *Global Ecology and Biogeography*, vol. 10, n° 6, p. 639–660.

Ginzburg, I. 2005, «Equilibrium-type and link-type lattice boltzmann models for generic advection and anisotropic-dispersion equation», *Advances in Water resources*, vol. 28, n° 11, p. 1171–1195.

Ginzburg, I., F. Verhaeghe et D. d'Humières. 2008a, «Study of simple hydrodynamic solutions with the two-relaxation-times lattice boltzmann scheme», *Communications in computational physics*, vol. 3, n° 3, p. 519–581.

Ginzburg, I., F. Verhaeghe et D. d'Humières. 2008b, «Two-relaxation-time lattice boltzmann scheme : About parametrization, velocity, pressure and mixed boundary conditions», *Communications in computational physics*, vol. 3, n° 2, p. 427–478.

Gleixner, G. 2013, «Soil organic matter dynamics : a biological perspective derived from the use of compound-specific isotopes studies», *Ecological research*, vol. 28, n° 5, p. 683–695.

Gommes, C. J., A.-J. Bons, S. Blacher, J. H. Dunsmuir et A. H. Tsou. 2009, «Practical methods for measuring the tortuosity of porous materials from binary or gray-tone tomographic reconstructions», *AIChE J.*, vol. 55, n° 8, doi :http://dx.doi.org/10.1002/aic.11812, p. 2000–2012.

Grant, R., N. Juma et W. McGill. 1993, «Simulation of carbon and nitrogen transformations in soil : mineralization», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 25, n° 10, doi :http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(93)90046-E, p. 1317–1329.

Gras, A., M. Ginovart, J. Valls et P. C. Baveye. 2011, «Individual-based modelling of carbon and nitrogen dynamics in soils : Parameterization and sensitivity analysis of microbial components», *Ecological modelling*, vol. 222, n° 12, p. 1998–2010.

GRC. 1986, *Handbook of Chemistry and Physics*, 66e éd., GRC Press, Boca Raton, FL.

Greaves, J. et E. Carter. 1920, «Influence of moisture on the bacterial activities of the soil», *Soil Science*, vol. 10, n° 5, doi :http://dx.doi.org/10.2307/2255435, p. 361–388.

Grundmann, G. et D. Debouzie. 2000, «Geostatistical analysis of the distribution of nh4+ and no2–oxidizing bacteria and serotypes at the millimeter scale along a soil transect», *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 34, n° 1, doi : http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00754.x, p. 57–62.

Grundmann, G., A. Dechesne, F. Bartoli, J. Flandrois, J. Chasse et R. Kizungu. 2001, «Spatial modeling of nitrifier microhabitats in soil», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 65, n° 6, doi :http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00754.x, p. 1709–1716.

Guenet, B., J. Leloup, C. Hartmann, S. Barot et L. Abbadie. 2011, «A new protocol for an artificial soil to analyse soil microbiological processes», *Applied soil ecology*, vol. 48, n° 2, p. 243–246.

Guenet, B., C. Neill, G. Bardoux et L. Abbadie. 2010, «Is there a linear relationship between priming effect intensity and the amount of organic matter input ?», *Applied Soil Ecology*, vol. 46, n° 3, p. 436–442.

Hansen, S., H. Jensen, N. Nielsen et H. Svendsen. 1991, «Simulation of nitrogen dynamics and biomass production in winter wheat using the danish simulation model daisy», *Fertilizer research*, vol. 27, n° 2-3, p. 245–259.

Hanson, C. A., J. A. Fuhrman, M. C. Horner-Devine et J. B. Martiny. 2012, «Beyond biogeographic patterns : processes shaping the microbial landscape», *Nature Reviews Microbiology*, vol. 10, n° 7, p. 497–506.

He, X., Q. Zou, L.-S. Luo et M. Dembo. 1997, «Analytic solutions of simple flows and analysis of nonslip boundary conditions for the lattice boltzmann bgk model», *Journal of Statistical Physics*, vol. 87, n° 1-2, p. 115–136.

Helton, J. et F. Davis. 2000, «Chapter 6 : Sampling-based methods», dans *Sensitivity analysis*, édité par A. Saltelli, K. Chan, E. M. Scott et al., Wiley, New York, p. 101–153.

Hénin, S. et M. Dupuis. 1945, «Essai de bilan de la matière organique du sol», *Annales agronomiques*, vol. 3, p. 17–29.

Hilpert, M. et C. T. Miller. 2001, «Pore-morphology-based simulation of drainage in totally wetting porous media», *Advances in Water Resources*, vol. 24, n° 3, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1708(00)00056-7, p. 243–255.

Howard, D. et P. Howard. 1993, «Relationships between co˜ 2 evolution, moisture content and temperature for a range of soil types», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 25, p. 1537–1537.

Iassonov, P., T. Gebrenegus et M. Tuller. 2009, «Segmentation of x-ray computed tomography images of porous materials : A crucial step for characterization and quantitative analysis of pore structures», *Water Resources Research*, vol. 45, n° 9, doi :http://dx.doi.org/10.1029/2009WR008087.

Ingwersen, J., C. Poll, T. Streck et E. Kandeler. 2008, «Micro-scale modelling of carbon turnover driven by microbial succession at a biogeochemical interface», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 40, n° 4, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.10.018, p. 864–878.

Iqbal, A., P. Garnier, G. Lashermes et S. Recous. 2014, «A new equation to simulate the contact between soil and maize residues of different sizes during their decomposition», *Biology and fertility of soils*, vol. 50, n° 4, doi :http://dx.doi.org/10.1007/s00374-013-0876-5, p. 645–655.

Jarvis, N., M. Larsbo, S. Roulier, A. Lindahl et L. Persson. 2007, «The role of soil properties in regulating non-equilibrium macropore flow and solute transport in agricultural topsoils», *European journal of soil science*, vol. 58, n° 1, p. 282–292.

Jenkinson, D., S. Andrew, J. Lynch, M. Goss et P. Tinker. 1990, «The turnover of organic carbon and nitrogen in soil [and discussion]», *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, vol. 329, n° 1255, doi :http://dx.doi.org/10.1098/rstb.1990.0177, p. 361–368.

Jensen, L., T. Mueller, N. Nielsen, S. Hansen, G. Crocker, P. Grace, J. Klir, M. Körschens et P. Poulton. 1997, «Simulating trends in soil organic carbon in long-term experiments using the soil-plant-atmosphere model daisy», *Geoderma*, vol. 81, n° 1, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S0016-7061(97)88181-5, p. 5–28.

Joekar-Niasar, V., M. Prodanović, D. Wildenschild et S. Hassanizadeh. 2010, «Network model investigation of interfacial area, capillary pressure and saturation relationships in granular porous media», *Water Resources Research*, vol. 46, n° 6.

Kaestner, A., E. Lehmann et M. Stampanoni. 2008, «Imaging and image processing in porous media research», *Advances in Water Resources*, vol. 31, n° 9, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2008.01.022, p. 1174–1187.

Kemmitt, S., C. V. Lanyon, I. Waite, Q. Wen, T. Addiscott, N. Bird, A. O'donnell et P. Brookes. 2008, «Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass—a new perspective», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 40, n° 1, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.021, p. 61–73.

Kersebaum, K. et O. Richter. 1994, «A model approach to simulate c and n transformations through microbial biomass», *European Journal of Agronomy*, vol. 3, n° 4, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S1161-0301(14)80166-4, p. 355–360.

Ketcham, R. A. et W. D. Carlson. 2001, «Acquisition, optimization and interpretation of x-ray computed tomographic imagery : applications to the geosciences», *Computers & Geosciences*, vol. 27, n° 4, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S0098-3004(00)00116-3, p. 381–400.

Kim, H. J., J. Q. Boedicker, J. W. Choi et R. F. Ismagilov. 2008, «Defined spatial structure stabilizes a synthetic multispecies bacterial community», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, n° 47, doi : http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0807935105, p. 18 188–18 193.

Knapp, E., L. Elliott et G. Campbell. 1983, «Carbon, nitrogen and microbial biomass interrelationships during the decomposition of wheat straw : a mechanistic simulation model», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 15, n° 4, doi :http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(83)90011-1, p. 455–461.

Knudsen, G., J. Stack, S. Schuhmann, K. Orr et C. LaPaglia. 2006, «Individual-based approach to modeling hyphal growth of a biocontrol fungus in soil», *Phytopathology*, vol. 96, n° 10, p. 1108–1115.

Knutson, C., C. Werth et A. Valocchi. 2005, «Pore-scale simulation of biomass growth along the transverse mixing zone of a model two-dimensional porous medium», *Water Resources Research*, vol. 41, n° 7, doi :http://dx.doi.org/10.1029/2004WR003459, p. W07 007.

Kohlmeier, S., T. H. Smits, R. M. Ford, C. Keel, H. Harms et L. Y. Wick. 2005, «Taking the fungal highway : mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi», *Environmental Science & Technology*, vol. 39, n° 12, doi :http://dx.doi.org/10.1021/es047979z, p. 4640–4646.

Konopka, A. 1999, «Theoretical analysis of the starvation response under substrate pulses», *Microbial Ecology*, vol. 38, n° 4, doi :http://dx.doi.org/10.1007/s002489900178, p. 321–329.

Kovárová-Kovar, K., S. Gehlen, A. Kunze, T. Keller, R. von Däniken, M. Kolb et A. P. van Loon. 2000, «Application of model-predictive control based on artificial neural networks to optimize the fed-batch process for riboflavin production», *Journal of biotechnology*, vol. 79, n° 1, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00211-X, p. 39–52.

Kuka, K., U. Franko et J. Rühlmann. 2007, «Modelling the impact of pore space distribution on carbon turnover», *Ecological Modelling*, vol. 208, n° 2, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2007.06.002, p. 295–306.

Kuzyakov, Y., J. Friedel et K. Stahr. 2000, «Review of mechanisms and quantification of priming effects», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 32, n° 11, p. 1485–1498.

Ladd, J. N., R. C. Foster, P. Nannipieri et J. Oades. 1996, «Soil structure and biological activity», *Soil biochemistry*, vol. 9, doi :http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-81490-6.50034-0, p. 23–78.

Lamboni, M., D. Makowski, S. Lehuger, B. Gabrielle et H. Monod. 2009, «Multivariate global sensitivity analysis for dynamic crop models», *Field Crops Research*, vol. 113, n° 3, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2009.06.007, p. 312–320.

Lawrence, C. R., J. C. Neff et J. P. Schimel. 2009, «Does adding microbial mechanisms of decomposition improve soil organic matter models ? a comparison of four models using data from a pulsed rewetting experiment», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 41, n° 9, p. 1923–1934.

Leis, A. P., S. Schlicher, H. Franke et M. Strathmann. 2005, «Optically transparent porous medium for nondestructive studies of microbial biofilm architecture and transport dynamics», *Applied and environmental microbiology*, vol. 71, n° 8, p. 4801–4808.

Lendenmann, U., H. Senn, M. Snozzi et T. Egli. 2000, «Dynamics of mixed substrate growth of escherichia coli in batch culture : the transition between simultaneous and sequential utilisation of carbon substrates», *Acta Univ. Carol. Environ*, vol. 14, p. 21–31.

Lennon, J. T. et S. E. Jones. 2011, «Microbial seed banks : the ecological and evolutionary implications of dormancy», *Nature Reviews Microbiology*, vol. 9, n° 2, doi :http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2504, p. 119–130.

Li, C., S. Frolking et R. Harriss. 1994, «Modeling carbon biogeochemistry in agricultural soils», *Global biogeochemical cycles*, vol. 8, n° 3, p. 237–254.

Linn, D. et J. Doran. 1984, «Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soils», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 48, n° 6, p. 1267–1272.

Lobry, J. 1991, *Ré-évaluation du modele de croissance de Monod. Effet des antibiotiques sur l'energie de maintenance*, thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon I.

Long, T. et D. Or. 2009, «Dynamics of microbial growth and coexistence on variably saturated rough surfaces», *Microbial Ecology*, vol. 58, n° 2, doi :http://dx.doi.org/10.1007/s00248-009-9510-3, p. 262–275.

Long, W. et M. Hilpert. 2008, «Lattice-boltzmann modeling of contaminant degradation by chemotactic bacteria : Exploring the formation and movement of bacterial bands», *Water Resources Research*, vol. 44, n° 9, doi : http://dx.doi.org/10.1029/2007WR006129.

Luxmoore, R. 1981, «Micro-, meso-, and macroporosity of soil», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 45, n° 3, p. 671–672.

MacDonald, I., P. Kaufmann et F. Dullien. 1986, «Quantitative image analysis of finite porous media», *Journal of Microscopy*, vol. 144, n° 3, doi :http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.1986.tb02808.x, p. 277–296.

Manichon, H. et J. Roger-Estrade. 1990, «Caractérisation de l'état structural et étude de son évolution à court et moyen terme sous l'action des systèmes de culture», dans *Les systèmes de culture*, édité par L. Combe et D. Picard, INRA, Paris, p. 27–55.

Manzoni, S. et A. Porporato. 2007, «A theoretical analysis of nonlinearities and feedbacks in soil carbon and nitrogen cycles», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 39, n° 7, p. 1542–1556.

Manzoni, S. et A. Porporato. 2009, «Soil carbon and nitrogen mineralization : theory and models across scales», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 41, n° 7, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.02.031, p. 1355–1379.

Masse, D., C. Cambier, A. Brauman, S. Sall, K. Assigbetse et J.-L. Chotte. 2007, «Mior : an individual-based model for simulating the spatial patterns of soil organic matter microbial decomposition», *European Journal of Soil Science*, vol. 58, n° 5, doi :http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2389.2007.00900.x, p. 1127–1135.

Michaelis, L. et M. L. Menten. 1913, «Die kinetik der invertinwirkung», *Biochem. z*, vol. 49, n° 333-369, p. 352.

Molina, J., C. Clapp, M. Shaffer, F. Chichester et W. Larson. 1983, «Ncsoil, a model of nitrogen and carbon transformations in soil : description, calibration, and behavior», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 47, n° 1, p. 85–91.

Monard, C., C. Mchergui, N. Nunan, F. Martin-Laurent et L. Vieublé-Gonod. 2012, «Impact of soil matric potential on the fine-scale spatial distribution and activity of specific microbial degrader communities», *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 81, n° 3, doi :http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01398.x, p. 673–683.

Monga, O., M. Bousso, P. Garnier et V. Pot. 2008, «3D geometric structures and biological activity : Application to microbial soil organic matter decomposition in pore space», *Ecological Modelling*, vol. 216, n° 3-4, doi : {http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2008.04.015}, p. 291–302.

Monga, O., P. Garnier, V. Pot, E. Coucheney, N. Nunan, W. Otten et C. Chenu. 2014, «Simulating microbial degradation of organic matter in a simple porous system using the 3-d diffusion-based model mosaic», *Biogeosciences*, vol. 11, n° 8, doi :http://dx.doi.org/10.5194/bg-11-2201-2014, p. 2201–2209.

Monod, J. 1941, «Sur un phénomène nouveau de croissance complexe dans les cultures bactériennes», *CR Acad. Sci.(Paris)*, vol. 212, p. 934–936.

Moorhead, D. L., G. Lashermes et R. L. Sinsabaugh. 2012, «A theoretical model of c-and n-acquiring exoenzyme activities, which balances microbial demands during decomposition», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 53, p. 133–141.

Moorhead, D. L. et R. L. Sinsabaugh. 2006, «A theoretical model of litter decay and microbial interaction», *Ecological Monographs*, vol. 76, n° 2, p. 151–174.

Moyano, F. E., S. Manzoni et C. Chenu. 2013, «Responses of soil heterotrophic respiration to moisture availability : An exploration of processes and models», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 59, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.002, p. 72–85.

Musy, A. et M. Soutter. 1991, *Physique du sol*, vol. 6, PPUR presses polytechniques.

Myers, R., K. Weier et C. Campbell. 1982, «Quantitative relationship between net nitrogen mineralization and moisture content of soils», *Canadian Journal of Soil Science*, vol. 62, n° 1, p. 111–124.

Neill, C. et J. Gignoux. 2006, «Soil organic matter decomposition driven by microbial growth : a simple model for a complex network of interactions», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 38, n° 4, p. 803–811.

Newman, E. 1978, «Root microorganisms : their significance in the ecosystem», *Biological Reviews*, vol. 53, n° 4, doi :http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185X.1978.tb00863.x, p. 511–554.

Newman, E. et A. Watson. 1977, «Microbial abundance in the rhizosphere : a computer model», *Plant and Soil*, vol. 48, n° 1, doi :http://dx.doi.org/10.1007/BF00015157, p. 17–56.

Nguyen, C. et A. Guckert. 2001, «Short-term utilisation of 14c-[u]glucose by soil microorganisms in relation to carbon availability», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 33, n° 1, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00114-0, p. 53 – 60.

Nkongolo, N., R. Hatano et V. Kakembo. 2010, «Diffusivity models and greenhouse gases fluxes from a forest, pasture, grassland and corn field in northern hokkaido, japan», *Pedosphere*, vol. 20, n° 6, p. 747–760.

Nunan, N., K. Ritz, D. Crabb, K. Harris, K. Wu, J. W. Crawford et I. M. Young. 2001, «Quantification of the in situ distribution of soil bacteria by large-scale imaging of thin sections of undisturbed soil», *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 37, n° 1, p. 67–77.

Nunan, N., K. Wu, I. Young, J. Crawford et K. Ritz. 2002, «In situ spatial patterns of soil bacterial populations, mapped at multiple scales, in an arable soil», *Microbial Ecology*, vol. 44, n° 4, doi :{http://dx.doi.org/10.1007/s00248-002-2021-0}, p. 296–305, ISSN 0095-3628.

Nunan, N., K. Wu, I. Young, J. Crawford et K. Ritz. 2003, «Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil», *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 44, n° 2, doi :{http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00027-8}, p. 203–215, ISSN 0168-6496.

Oh, W. et W. B. Lindquist. 1999, «Image thresholding by indicator kriging», *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, vol. 21, n° 7, p. 590–602.

Or, D., B. Smets, J. Wraith, A. Dechesne et S. Friedman. 2007, «Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media – a review», *Advances in Water Resources*, vol. 30, n° 6–7, doi : http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2006.05.025, p. 1505 – 1527.

Otsu, N. 1979, «Aa threshold selection method from grey scale histogram», *IEEE Transactions on Systems Man and Cybernetics*.

Pallud, C., A. Dechesne, J. Gaudet, D. Debouzie et G. Grundmann. 2004, «Modification of spatial distribution of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid degrader microhabitats during growth in soil columns», *Applied and environmental microbiology*, vol. 70, n° 5, p. 2709–2716.

Pan, C., L.-S. Luo et C. T. Miller. 2006, «An evaluation of lattice boltzmann schemes for porous medium flow simulation», *Computers & fluids*, vol. 35, n° 8, p. 898–909.

Parton, W. J., D. S. Schimel, C. Cole et D. Ojima. 1987, «Analysis of factors controlling soil organic matter levels in great plains grasslands», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 51, n° 5, doi :http://dx.doi.org/10.2136/sssaj1987.03615995005100050015x, p. 1173–1179.

Paul, E. A. 2015, «An exciting present and great future built on basic knowledge and unifying concepts», dans *Soil microbiology, ecology and biochemistry*, édité par E. A. Paul, 4e éd., Academic press.

Paul, K., P. Polglase, A. O'Connell, J. Carlyle, P. Smethurst et P. Khanna. 2003, «Defining the relation between soil water content and net nitrogen mineralization», *European Journal of Soil Science*, vol. 54, n° 1, p. 39–48.

Perret, J., S. Prasher, A. Kantzas et C. Langford. 1999, «Three-dimensional quantification of macropore networks in undisturbed soil cores», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 63, n° 6, doi :http://dx.doi.org/10.2136/sssaj1999.6361530x, p. 1530–1543.

Peth, S., C. Chenu, N. Leblond, A. Mordhorst, P. Garnier, N. Nunan, V. Pot, M. Ogurreck et F. Beckmann. 2014, «Localization of soil organic matter in soil aggregates using synchrotron-based x-ray microtomography», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 78, p. 189–194.

Picioreanu, C., M. C. van Loosdrecht, J. J. Heijnen et al.. 1998, «A new combined differential-discrete cellular automaton approach for biofilm modeling : application for growth in gel beads», *Biotechnology and bioengineering*, vol. 57, n° 6, p. 718–731.

Pinheiro, M., P. Garnier, J. Beguet, F. M. Laurent et L. V. Gonod. 2015, «The millimetre-scale distribution of 2, 4-d and its degraders drives the fate of 2, 4-d at the soil core scale», *Soil Biology and Biochemistry*, doi : http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.05.008.

Pinheiro, M., P. Garnier, L. Fabrice Martin, A. Rapaport, J. Beguet et L. Vieublé-Gonod. 2013, «Impact of distribution heterogeneity of microorganisms and 2,4-d on biodegradation processes in soil : experiment and modelling», dans *Conference on Pesticide Behaviour in Soils, Water and Air*, University of York, p. 2.

Pintelon, T., C. Picioreanu, M. van Loosdrecht et M. Johns. 2012, «The effet of biofilm permeability on bio-clogging of porous media», *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 109, doi :http://dx.doi.org/10.1002/bit.24381, p. 1031–1042.

Poll, C., H. Pagel, M. Devers-Lamrani, F. Martin-Laurent, J. Ingwersen, T. Streck et E. Kandeler. 2010, «Regulation of bacterial and fungal mcpa degradation at the soil–litter interface», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 42, n° 10, p. 1879–1887.

Pot, V. 2011, «Modélisation spatialisée du transport de pesticides á l'échelle du pore par un modèle de boltzmann sur réseau», cahier de recherche, UMR INRA - AgroParisTech, Environnement et Grandes Cultures.

Pot, V., S. Peth, O. Monga, L. Vogel, A. Genty, P. Garnier, L. Vieublé-Gonod, M. Ogurreck, F. Beckmann et P. Baveye. 2015, «Three-dimensional distribution of water and air in soil pores : Comparison of two-phase two-relaxation-times lattice-boltzmann and morphological model outputs with synchrotron x-ray computed tomography data», *Advances in Water Resources*, vol. 84, p. 87–102.

R Core Team. 2014, *R : A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL `http://www.R-project.org/`.

Ranjard, L. et A. Richaume. 2001, «Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil», *Research in Microbiology*, vol. 152, n° 8, p. 707–716.

Raynaud, X., J.-C. Lata et P. W. Leadley. 2006, «Soil microbial loop and nutrient uptake by plants : a test using a coupled c : N model of plant–microbial interactions», *Plant and Soil*, vol. 287, n° 1-2, p. 95–116.

Raynaud, X. et N. Nunan. 2014, «Spatial Ecology of Bacteria at the Microscale in Soil», *PLoS ONE*, vol. 9, n° 1, doi :http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087217, p. e87 217, ISSN 1932-6203.

Reischke, S., J. Rousk et E. Bååth. 2014, «The effects of glucose loading rates on bacterial and fungal growth in soil», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 70, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.011, p. 88–95.

Resat, H., V. Bailey, L. A. McCue et A. Konopka. 2012, «Modeling microbial dynamics in heterogeneous environments : growth on soil carbon sources», *Microbial Ecology*, vol. 63, n° 4, doi :http://dx.doi.org/10.1007/s00248-011-9965-x, p. 883–897.

Richard, G., J. Sillon et O. Marloie. 2001, «Comparison of inverse and direct evaporation methods for estimating soil hydraulic properties under different tillage practices», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 65, n° 1, p. 215–224.

Riebeek, H. 2011, «The carbon cycle», *Earth Observatory, NASA*.

Riis, V., H. Lorbeer et W. Babel. 1998, «Extraction of microorganisms from soil : evaluation of the efficiency by counting methods and activity measurements», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 30, n° 12, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00232-0, p. 1573–1581.

Rodrigo, A., S. Recous, C. Neel et B. Mary. 1997, «Modelling temperature and moisture effects on c–n transformations in soils : comparison of nine models», *Ecological Modelling*, vol. 102, n° 2, p. 325–339.

Ruamps, L. S., N. Nunan et C. Chenu. 2011, «Microbial biogeography at the soil pore scale», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 43, n° 2, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.010, p. 280–286.

Ruamps, L. S., N. Nunan, V. Pouteau, J. Leloup, X. Raynaud, V. Roy et C. Chenu. 2013, «Regulation of soil organic C mineralisation at the pore scale», *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 86, n° 1, SI, doi :{http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12078}, p. 26–35.

Rustad, L. E., T. G. Huntington et R. D. Boone. 2000, «Controls on soil respiration : implications for climate change», *Biogeochemistry*, vol. 48, n° 1, p. 1–6.

Saffih-Hdadi, K. et B. Mary. 2008, «Modeling consequences of straw residues export on soil organic carbon», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 40, n° 3, p. 594–607.

Saltelli, A. 2000, «Chapter 1 : What is sensitivity analysis», dans *Sensitivity analysis*, édité par A. Saltelli, K. Chan, E. M. Scott et al., Wiley, New York, p. 3–13.

Schimel, J. P. et M. N. Weintraub. 2003, «The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil : a theoretical model», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 35, n° 4, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00015-4, p. 549–563.

von der Schulenburg, D., T. Pintelon, C. Picioreanu, M. Van Loosdrecht et M. Johns. 2009, «Three-dimensional simulations of biofilm growth in porous media», *AIChE Journal*, vol. 55, n° 2, p. 494–504.

Scott, E. M., E. A. Rattray, J. Prosser, K. Killham, L. Glover, J. Lynch et M. Bazin. 1995, «A mathematical model for dispersal of bacterial inoculants colonizing the wheat rhizosphere», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 27, n° 10, doi :http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(95)00050-O, p. 1307–1318.

Shaffer, M., L. Ma et S. Hansen. 2001, *Modeling Carbon and Nitrogen Dynamics for Soil Management*, CRC Press, doi :http://dx.doi.org/10.1201/9781420032635.

Shan, X. et H. Chen. 1993, «Lattice boltzmann model for simulating flows with multiple phases and components», *Physical Review E*, vol. 47, n° 3, p. 1815.

Shaw, L., Y. Beaton, S. Sousa, L. Glover, K. Killham et A. Meharg. 2002, «Mineralisation of 2, 4-dichlorophenol and glucose placed into the same or different hydrological domains as a bacterial inoculant», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 34, n° 4, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00212-7, p. 531–539.

Simunek, J. et D. Suarez. 1993, «Modeling of carbon dioxide transport and production in soil. 1. model development.», *Water resources research*.

Sinsabaugh, R. et D. Moorhead. 1994, «Resource allocation to extracellular enzyme production : a model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 26, n° 10, p. 1305–1311.

Skopp, J., M. Jawson et J. Doran. 1990, «Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 54, n° 6, doi :http://dx.doi.org/10.2136/sssaj1990.03615995005400060018x, p. 1619–1625.

Smith, G. A., J. S. Nickels, B. D. Kerger, J. D. Davis, S. P. Collins, J. T. Wilson, J. F. McNabb et D. C. White. 1986, «Quantitative characterization of microbial biomass and community structure in subsurface material : a prokaryotic consortium responsive to organic contamination», *Canadian journal of microbiology*, vol. 32, n° 2, doi :http://dx.doi.org/10.1139/m86-022, p. 104–111.

Smucker, A. J., E.-J. Park, J. Dorner et R. Horn. 2007, «Soil micropore development and contributions to soluble carbon transport within macroaggregates», *Vadose Zone Journal*, vol. 6, n° 2, doi :http://dx.doi.org/10.2136/vzj2007.0031, p. 282–290.

Stenström, J., K. Svensson et M. Johansson. 2001, «Reversible transition between active and dormant microbial states in soil», *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 36, n° 2-3, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00122-2, p. 93–104.

Strong, D., H. d. Wever, R. Merckx et S. Recous. 2004, «Spatial location of carbon decomposition in the soil pore system», *European Journal of Soil Science*, vol. 55, n° 4, p. 739–750.

Suchomel, B. J., B. M. Chen et M. B. Allen. 1998, «Macroscale properties of porous media from a network model of biofilm processes», *Transport in porous media*, vol. 31, n° 1, p. 39–66.

Taina, I., R. Heck et T. Elliot. 2008, «Application of x-ray computed tomography to soil science : A literature review», *Canadian Journal of Soil Science*, vol. 88, n° 1, doi :http://dx.doi.org/10.4141/CJSS06027, p. 1–19.

Thomsen, I. K., P. Schjønning, B. Jensen, K. Kristensen et B. T. Christensen. 1999, «Turnover of organic matter in differently textured soils : Ii. microbial activity as influenced by soil water regimes», *Geoderma*, vol. 89, n° 3, p. 199–218.

Thullner, M. et P. Baveye. 2008, «Computational pore network modeling of the influence of biofilm permeability on bioclogging in porous media», *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 99, n° 6, p. 1337–1351.

Thullner, M., L. Mauclaire, M. H. Schroth, W. Kinzelbach et J. Zeyer. 2002, «Interaction between water flow and spatial distribution of microbial growth in a two-dimensional flow field in saturated porous media», *Journal of Contaminant Hydrology*, vol. 58, n° 3, p. 169–189.

Tisdall, J. et J. Oades. 1982, «Organic matter and water-stable aggregates in soils», *Journal of soil science*, vol. 33, n° 2, p. 141–163.

Toal, M., C. Yeomans, K. Killham et A. Meharg. 2000, «A review of rhizosphere carbon flow modelling», *Plant and Soil*, vol. 222, n° 1-2, doi :http://dx.doi.org/10.1023/A:1004736021965, p. 263–281.

Todd-Brown, K. E., F. M. Hopkins, S. N. Kivlin, J. M. Talbot et S. D. Allison. 2012, «A framework for representing microbial decomposition in coupled climate models», *Biogeochemistry*, vol. 109, n° 1-3, doi :http://dx.doi.org/10.1007/s10533-011-9635-6, p. 19–33.

Treves, D., B. Xia, J. Zhou et J. Tiedje. 2003, «A two-species test of the hypothesis that spatial isolation influences microbial diversity in soil», *Microbial Ecology*, vol. 45, n° 1, p. 20–28.

Van Loo, D., L. Bouckaert, O. Leroux, E. Pauwels, M. Dierick, L. Van Hoorebeke, V. Cnudde, S. De Neve et S. Sleutel. 2014, «Contrast agents for soil investigation with x-ray computed tomography», *Geoderma*, vol. 213, p. 485–491.

Van Loosdrecht, M., J. Lyklema, W. Norde et A. Zehnder. 1990, «Influence of interfaces on microbial activity.», *Microbiological Reviews*, vol. 54, n° 1, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.07.029, p. 75–87.

Van Veen, J., J. Ladd et M. Amato. 1985, «Turnover of carbon and nitrogen through the microbial biomass in a sandy loam and a clay soil incubated with [14 c (u)] glucose and [15 n](nh 4) 2 so 4 under different moisture regimes», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 17, n° 6, doi :http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(85)90128-2, p. 747–756.

Vandevivere, P. et P. Baveye. 1992, «Effect of bacterial extracellular polymers on the saturated hydraulic conductivity of sand columns.», *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 58, n° 5, p. 1690–1698.

Vieublé-Gonod, L., J. Chadoeuf et C. Chenu. 2006, «Spatial distribution of microbial 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid mineralization from field to microhabitat scales», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 70, n° 1, doi :http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2004.0034, p. 64–71.

Vieublé-Gonod, L., C. Chenu et G. Soulas. 2003, «Spatial variability of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-d) mineralisation potential at a millimetre scale in soil», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 35, n° 3, doi : http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00287-0, p. 373–382.

Vogel, H. 1997, «Morphological determination of pore connectivity as a function of pore size using serial sections», *European Journal of Soil Science*, vol. 48, n° 3, doi :http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2389.1997.tb00203.x, p. 365–377.

Vogel, H.-J. et W. Schlüter. 2010, «Quantification of soil structure based on minkowski functions», *Computers and Geosciences*, vol. 36, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.cageo.2010.03.007, p. 1236–1245.

Vos, M., A. B. Wolf, S. J. Jennings et G. A. Kowalchuk. 2013, «Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil», *FEMS Microbiology Reviews*, doi :http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12023.

Wallach, D., D. Makowski, J. W. Jones et F. Brun. 2013, «Chapter 5 : Uncertainty and sensitivity analysis», dans *Working with Dynamic Crop Models : Methods, Tools and Examples for Agriculture and Environment*, Academic Press, p. 161–204.

Wang, G., M. A. Mayes, L. Gu et C. W. Schadt. 2014, «Representation of dormant and active microbial dynamics for ecosystem modeling», *PloS one*, vol. 9, n° 2, doi :http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089252, p. e89 252.

Wang, G. et W. M. Post. 2012, «A theoretical reassessment of microbial maintenance and implications for microbial ecology modeling», *FEMS microbiology ecology*, vol. 81, n° 3, p. 610–617.

Weihermüller, L., J. Huisman, A. Graf, M. Herbst et J.-M. Sequaris. 2009, «Multistep outflow experiments to determine soil physical and carbon dioxide production parameters», *Vadose Zone Journal*, vol. 8, n° 3, p. 772–782.

Van de Werf, H. et W. Verstraete. 1987, «Estimation of active soil microbial biomass by mathematical analysis of respiration curves : relation to conventional estimation of total biomass», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 19, n° 3, doi :http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(87)90008-3, p. 267–271.

Wildenschild, D. et A. P. Sheppard. 2013, «X-ray imaging and analysis techniques for quantifying pore-scale structure and processes in subsurface porous medium systems», *Advances in Water Resources*, vol. 51, doi :http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2012.07.018, p. 217–246.

Wildenschild, D., C. Vaz, M. Rivers, D. Rikard et B. Christensen. 2002, «Using x-ray computed tomography in hydrology : systems, resolutions, and limitations», *Journal of Hydrology*, vol. 267, n° 3, doi :http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1694(02)00157-9, p. 285–297.

Wutzler, T. et M. Reichstein. 2008, «Colimitation of decomposition by substrate and decomposers ? a comparison of model formulations», *Biogeosciences*, vol. 5, n° 3, p. 749–759.

Yang, Y., Q. Liao, X. Zhu, H. Wang, R. Wu et D.-J. Lee. 2011, «Lattice boltzmann simulation of substrate flow past a cylinder with psb biofilm for bio-hydrogen production», *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 36, n° 21, p. 14 031–14 040.

Young, I. M. et J. W. Crawford. 2004, «Interactions and self-organization in the soil-microbe complex», *Science*, vol. 304, n° 5677, p. 1634–1637.

Zelenev, V., A. Van Bruggen et A. Semenov. 2000, «"bacwave," a spatial–temporal model for traveling waves of bacterial populations in response to a moving carbon source in soil», *Microbial ecology*, vol. 40, n° 3, doi : http://dx.doi.org/10.1007/s002480000029, p. 260–272.

Zhang, Y., G. Lashermes, S. Houot, Y. Zhu, E. Barriuso et P. Garnier. 2014, «Cop-compost : a software to study the degradation of organic pollutants in composts», *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 21, n° 4, p. 2761–2776.

Advances in Water Resources 83 (2015) 123–136

Contents lists available at ScienceDirect

Advances in Water Resources

journal homepage: www.elsevier.com/locate/advwatres

Modeling the effect of soil meso- and macropores topology on the biodegradation of a soluble carbon substrate

Laure E. Vogel[a,*], David Makowski[b], Patricia Garnier[a], Laure Vieublé-Gonod[a], Yves Coquet[c,d,e], Xavier Raynaud[f], Naoise Nunan[g], Claire Chenu[h,1], Ruth Falconer[i], Valérie Pot[a,**]

[a] INRA, AgroParisTech, UMR 1402 ECOSYS, F-78850 Thiverval-Grignon, France
[b] INRA, AgroParisTech, UMR 211 Agronomie, F-78850 Thiverval-Grignon, France
[c] Université Orléans, ISTO, UMR 7327, 45071 Orléans, France
[d] CNRS/INSU, ISTO, UMR 7327, 45071 Orléans, France
[e] BRGM, ISTO, UMR 7327, BP 36009, 45060 Orléans, France
[f] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institute of Ecology and Environmental Sciences – Paris, Paris, France
[g] CNRS, Institute of Ecology and Environmental Sciences – Paris, Campus AgroParisTech, Thiverval-Grignon, France
[h] AgroParisTech, Institute of Ecology and Environmental Sciences – Paris, Campus AgroParisTech, Thiverval-Grignon, France
[i] SIMBIOS Centre, Bell Street, Dundee, University of Abertay, Dundee, Scotland DD1 1HG, UK

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 July 2014
Revised 2 April 2015
Accepted 24 May 2015
Available online 30 May 2015

Keywords:
Biodegradation
Lattice-Boltzmann method
Pore-scale heterogeneity
Spatial distribution
Substrate diffusion
Microbial habitats

ABSTRACT

Soil structure and interactions between biotic and abiotic processes are increasingly recognized as important for explaining the large uncertainties in the outputs of macroscopic SOM decomposition models. We present a numerical analysis to assess the role of meso- and macropore topology on the biodegradation of a soluble carbon substrate in variably water saturated and pure diffusion conditions . Our analysis was built as a complete factorial design and used a new 3D pore-scale model, LBioS, that couples a diffusion lattice-Boltzmann model and a compartmental biodegradation model. The scenarios combined contrasted modalities of four factors: meso- and macropore space geometry, water saturation, bacterial distribution and physiology. A global sensitivity analysis of these factors highlighted the role of physical factors in the biodegradation kinetics of our scenarios. Bacteria location explained 28% of the total variance in substrate concentration in all scenarios, while the interactions among location, saturation and geometry explained up to 51% of it.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Soil is the most complex and heterogeneous material on earth due to its complicated architecture and the high diversity of organisms that it hosts. It is also one of the biggest carbon storage pools containing more than twice the amount of carbon present in the atmosphere. Soil Organic Matter (SOM) decomposition, even if it is evaluated to a relative loss of carbon of less than a percent [1], is thus a key process regarding CO_2 emissions.

Experimental observations at the millimeter scale have shown that the distribution of bacteria is characterized by the presence of hot-spots [2–5]. The heterogeneity of the arrangement of soil particles (inter-aggregate vs intra-aggregate porosity) and the variation of water saturation conditions contribute to maintain gradients in abiotic conditions (nutrients, pH and redox conditions) and therefore locally promote or not the growth of micro-organisms [6]. The patchy distribution patterns of bacteria in soils can result in spatial disconnection between organic residues and decomposers and thereby influence the kinetics of decomposition of organic compounds, as has been shown experimentally by [7,8]. The sinuous water diffusion pathways in the soil pore space through which nutrients can be transported can thus play a major role in these situations [9,10] although this can be mitigated by cells migration mechanisms allowing the microorganisms to reach distant resources [11–14].

The complex interactions between the biotic and abiotic components of soil that occur at the scale of the microhabitats of soil decomposers has been identified as being a major regulator of the C and N cycles [15–17].

Despite these considerations, SOM decomposition models are dominated by macroscopic models in which soil structure is not explicitely represented and the role of physical environmental conditions – especially hydration statuses – is described by non-robust empirical macroscopic functions [18,19]. Indeed, since microscale

* Corresponding author. Tel.: +331 3081 5922; fax: +33130815396.
** Corresponding author. Tel.: +331 3081 5402.
E-mail addresses: laure.vogel@outlook.fr (L.E. Vogel), valerie.pot@grignon.inra.fr (V. Pot).
[1] Present address: INRA, AgroParisTech, UMR 1402 ECOSYS, F-78850 Thiverval-Grignon, France

http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2015.05.020
0309-1708/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

heterogeneities are hidden within these macroscale functions, they may appear to cause large uncertainties in model outputs [20,21].

The combination of non invasive X-ray tomographic tools to describe the 3D structure of soil [22,23] and the development of pore-scale models [24] can now be used to test hypotheses on the role of soil structure. An increasing number of modeling studies have begun to account for pore-scale spatial heterogeneity when simulating biodegradation kinetics (e.g. [25–30]) but they have been restricted to relatively simple artificial media. Few attempts to model biological activity using 3D tomographic images of soil have pointed out that the combination of different soil pore space geometries and hydration status can affect organic matter decomposition [31] and/or the growth and colonization of soil by fungi [32]. However, a global sensitivity analysis to assess the influence of pore space topology, hydration status, spatial arrangement of organic substrates and decomposers, and the intrinsic physiology of the microorganisms on the decomposition of SOM has yet to be tackled.

The aim of this paper was to quantify the relative influence of physical and biological drivers both as separate and interacting factors on the biodegradation kinetics of a soluble substrate. We performed a modeling exercise describing a simplified picture of the 3D soil pore space retaining only the meso- and macroporal space but combining different diffusion pathways in variably saturated conditions and with patchy distributions of bacteria.

We simulated bacterial dynamics in 3D meso- and macropore topologies obtained from X-Ray computed tomography images of undisturbed soil samples at a resolution of 68 μm. Following the approach found in Chau et al. [33], we first numerically computed explicit air-water interfaces in the pore space using the two-phase two-relaxation-time lattice Boltzmann model (TRT-LBM) [34]. We then simulated the diffusion and biodegradation of a non-sorbing soluble substrate at different water saturation levels under pure diffusive conditions (no water flow due to precipitation). To do so, the advection-diffusion TRT-LBM [35] was coupled to a compartmental model dedicated to bacteria-driven biodegradation, forming the new LBioS model (Lattice-Boltzmann model for biodegradation affected by soil structure). We built a complete factorial design, in which physical factors (the geometry of the meso- and macropores, water saturation, bacteria spatialization) and a physiological factor were varied in combination. A global sensitivity analysis was applied to the outputs of 54 generated scenarios. For this exploratory work, our objectives were twofold: (i) to assess our modeling approach as a tool for investigating the effect of spatial heterogeneity on biodegradation processes and, (ii) to quantify the effect of physical and biological factors on biodegradation kinetics. The simplifications made in this work are presented in details throughout the paper and discussed through their consequences on the obtained results.

2. LBioS model description

2.1. Water physics modeling

We used a lattice Boltzmann approach for simulating water physics processes. In the lattice Boltzmann method, the physical behavior of a fluid emerges from the microscopic movements of small entities of the fluid – named the populations (f_q) – that are distributed at the nodes or sites (r) of a regular grid – the lattice. Sites belong either to the solid matrix (solid sites) or to the pore space (fluid sites) and are arranged in order to recreate the discrete structure of a porous medium. At every site, populations accounting for microscopic masses and momentum are ascribed to velocity vectors ($\vec{c_q}$) defining their direction (q) on the grid ($q = 0$ for resting populations and $1 \leq q \leq Q-1$ for moving populations, with Q the number of directions on the grid). We used the two-relaxation-time scheme [35] that takes advantage of the symmetry of the lattice, so that populations f_q are decomposed into symmetric and antisymmetric components along their opposite velocities $\vec{c_q} = -\vec{c_{\bar{q}}}$ (Eq. (1)):

$$f_q = f_q^+ + f_q^- \text{ and } f_q^\pm = \frac{1}{2}(f_q^\pm \pm f_{\bar{q}}) \qquad q = 1,\ldots,Q-1 \tag{1}$$

$$f_0 = f_0^+ \qquad f_0^- = 0$$

The distribution evolution at the node from time t to $t+1$ is summed up in the equation of evolution (2).

$$f_q(r+\vec{c_q}, t+1) - f_q(r,t) = \lambda_e\left[f_q^+(r,t) - e_q^+(r,t)\right] + \lambda_o\left[f_q^-(r,t) - e_q^-(r,t)\right] + S_q \tag{2}$$

The evolution equation includes the collision operator (two first terms of right hand side of Eq. (2)), a source term (S_q) and the propagation step (left hand side of Eq. (2)). During the collision step, the relaxation of moments resulting from the populations' distribution at time t towards an equilibrium state ($e_q = e_q^+ + e_q^-$) governs the reorganization of these populations.

During the propagation step, moving populations are translated to their neighboring nodes in the q direction, defining a new distribution at $t+1$. S_q is an external source term adding or removing a fraction of the population at a given site. It can represent an external force such as gravity, fluid-fluid interactions (cohesion) or biodegradation. Boundary conditions of bounce back type are applied at the pore walls: populations leaving a fluid site and hitting a solid site are sent back in the opposite direction.

Macroscopic variables such as fluid density (ρ) or momentum (J) are calculated at each site of the lattice from the populations' distribution (Eqs. (3) and (4)).

$$\rho = \sum_q f_q \tag{3}$$

$$J = \rho\vec{u} = \sum_q f_q\vec{c_q} \tag{4}$$

where $\vec{u}$ is the macroscopic velocity. They are expressed in lattice units, that can be easily converted into physical units.

The equilibrium populations e_0 and $e_q^\pm$ in Eq. (2) are defined in Eqs. (5)–(7) from [36].

$$e_0 = \rho - \sum_{q=1}^{Q-1} e_q^+ \tag{5}$$

$$e_q^+ = t_q^* c_s^2 \rho + g_s . E_q^+(\vec{j},\rho) \qquad E_q^+(\vec{j},\rho) = \frac{3j_q^2 - ||\vec{j}||^2}{2\rho}$$

$$\vec{j} = \vec{J} + \frac{\vec{F}}{2} \qquad j_q = \vec{j}.\vec{c_q} \qquad q = 1,\ldots Q-1 \tag{6}$$

$$e_q^- = t_q^*\,\vec{u}\,\vec{c_q} \qquad q = 1,\ldots Q-1 \tag{7}$$

where $\vec{F}$ is a body force, c_s is a free parameter of the model set to $\frac{1}{3}$ and g_s is a parameter equal to 0 or 1. The values of the weights t_q^*, parameters λ_e and λ_o and non linear term $E_q^+(\vec{j},\rho)$ are specific of the model version (see below).

2.1.1. Two-phase TRT-LBM

We used the two-phase TRT-LBM for the resolution of Stokes flow, as described in detail in [34], to simulate air-water distribution in porous media. For modeling the Stokes equation $g_s = 0$ [36]. The Shan–Chen implementation of multiphase flow was used [37] and the LBM was solved on a D3Q19 lattice (three dimensions, 19 directions). t_q^* in Eqs. (6) and (7) was set to $\frac{1}{6}$ for orthogonal velocities ($||\vec{c_q}|| = 1$) and $\frac{1}{12}$ for diagonal velocities ($||\vec{c_q}|| = \sqrt{2}$).

The parameterization of λ_e and λ_o is of critical importance for model performance and stability. λ_e and λ_o must be comprised between -2 and 0, their stability range. In the two-phase model, λ_e is related to the kinematic viscosity ν along $\nu = -\frac{1}{3}(\frac{1}{2} + \frac{1}{\lambda_e})$ while λ_o is set free. We used $\nu = \frac{1}{6}$ and $\lambda_o = \frac{3}{16}$ [34].

Rescaling to real physical units can be easily performed taking advantage of the fact that space and time resolutions are linked via ν. Let L_{LB} and T_{LB} be the space and time in lattice units (respectively [lu] and [tu]) and their corresponding value in real units, L_P and T_P (respectively [L] and [T]). They are linked through Eq. (8) with ν_{LB} and ν_P the kinematic viscosity respectively expressed in lattice [$lu^2.tu^{-1}$] and physical units [$L^2.T^{-1}$].

$$T_P = \frac{\nu_{LB}}{\nu_P}\frac{L_P^2}{L_{LB}^2}\frac{T_{LB}}{} \tag{8}$$

2.1.2. TRT-LBM for diffusion

To simulate the diffusion of a carbonaceous solute in porous media, we used the advection-dispersion TRT-LBM of [35]. The LBM was solved on a D3Q7 lattice. As only diffusion (and not advection) was considered, the macroscopic velocity ($\vec{u}$) was set to zero, so did $E_q^+(j,\rho)$ and e_q^-.

λ_e is set free and λ_o is related to the molecular diffusion coefficient D_M of the solute along $D_M = -c_s^2(\frac{1}{2}+\frac{1}{\lambda_o})$. We used $D_M = \frac{1}{2}$ and $\lambda_e = -\frac{64}{33}$ [38].

As previously, the time resolution of the diffusion LBM was deduced from $D_{M_{LB}}$ in lattice units [$lu^2.tu^{-1}$], D_{M_P} in physical units [$L^2.T^{-1}$] and L_P in Eq. (9).

$$T_P = \frac{D_{M_{LB}}}{D_{M_P}}\frac{L_P^2}{L_{LB}^2}\frac{T_{LB}}{} \tag{9}$$

2.2. Biodegradation processes modeling

The diffusion model was coupled to a biodegradation model describing soluble carbon consumption by bacteria. The mathematical formalism of the module was inspired by classical carbon turnover models [39] and relied on the dynamical partition of carbon masses into different pools, i.e. classes of compounds of uniform decomposability with no other specification than their masses. We did not differentiate organic carbon based on biochemical quality, particle size or stoechiometry as commonly found in decomposition models [39].

We simulated the consumption of a labile, non-sorbing soluble substrate, such as glucose or fructose. We did not address here the hydrolysis of solid organic matter into soluble substrate by exoenzymes.

Bacteria were represented as full actors of the decomposition as they drive all carbon fluxes in our model (uptake, respiration and mortality). Bacteria were taken hereafter as the only microbial decomposers. We chose to exclude fungi, because they have a different and more complex growth pattern [40].

All of the carbon mass was shared between three pools: the dissolved organic carbon (DOC) which constitutes the pool of available carbon to bacteria, the bacteria B, and the carbon dioxide CO_2. All of them are expressed in mass of C per volume [$M.L^{-3}$] (Fig. 1).

The uptake of carbon substrate by bacteria was based on Monod formalism (Eq. (10)).

$$uptake(t) = \frac{\nu_{DOC}\ DOC(t)}{DOC(t)+k_{DOC}}\ B(t) \tag{10}$$

where ν_{DOC} is the maximal uptake rate [T^{-1}] and k_{DOC} the half saturation constant [$M.L^{-3}$].

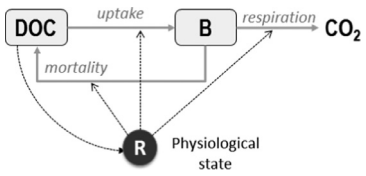


Fig. 1. Conceptual scheme of the biodegradation module of the LBioS model.

Monod equation was designed for bacterial growth in homogeneous media [41]. Although the environments of the bacterial colonies in the scenarios presented here were not homogeneous, it was felt that this simplification was necessary for a number of reasons: (i) no information is available on how bacterial growth and physiology is affected by differences in microenvironments and, (ii) as a first exploratory step, the aim of the study was not to analyze the interactive effects of abiotic factors and bacterial physiology effect on biodegradation. Therefore, the differences in physiology induced by differences in microenvironment were neglected.

Bacterial mortality was calculated following Eq. (11), where k_m is the mortality rate [T^{-1}].

$$mortality(t) = k_m\ B(t) \tag{11}$$

Bacteria emit CO_2 by respiration. In many carbon turnover models, a portion of the substrate, determined by a constant assimilation yield Y, is directly converted into carbon dioxide. Although the latter formulation is more widespread, we simulated respiration as a first-order flux (Eq. (12)), following [26,42], as it accounts for the direct influence of bacteria on substrate mineralization.

$$respiration(t) = k_r\ B(t) \tag{12}$$

where k_r is the respiration rate [T^{-1}].

A reversible transition from active to dormant state in response to fluctuating nutrient availability – "the famine-to-feast strategy" is likely to be crucial in soil systems and therefore in the modeling of microbial dynamics [43]. We integrated a way to account for bacterial activity and dormancy as a function of resource concentration. Bacteria were assumed to fall into a transient resting stage during starvation conditions [44]. This strategy enables bacteria to respond to wide nutrient fluctuations as are often found in soils [10,44,45] and not to die off when metabolic requirements cannot be met by the available resources. The physiological state concept and computation (Eq. (13)) were taken from [46] and can also be found in [47].

$$\frac{dR}{dt} = \frac{\nu_{DOC}\ DOC}{k_{DOC}+DOC}\left(\frac{DOC}{k_i+DOC} - R\right) \tag{13}$$

where R [-] is the physiological state index or the instantaneous proportion of active biomass and k_i is another half saturation constant, the inhibition constant [$M.L^{-3}$].

R varies between 0 and 1 as a function of DOC. R=1 describes non-limiting DOC concentrations. In this case, 100% of the biomass is active and every bacteria driven flux (uptake, mortality and respiration) reaches its maximum potential value. Lower DOC concentrations result in the reduction of the bacterial fluxes by a factor R. The optional activation of R is useful for assessing the role of dormancy in DOC transformation kinetics.

The ordinary differential equations of the pools of the biodegradation module are given below:

$$\frac{dDOC}{dt} = -\frac{\nu_{DOC}\ DOC}{k_{DOC}+DOC}\ R\ B \quad + \quad k_m\ R\ B \tag{14}$$

$$\frac{dB}{dt} = \left(\frac{\nu_{DOC}\ DOC}{k_{DOC}+DOC} \quad - \quad k_r - k_m\right) R\ B \tag{15}$$

$$\frac{dCO_2}{dt} = k_r\ R\ B \tag{16}$$

2.3. Coupling of the diffusion TRT-LBM and the biodegradation module

In the LBM, the lattice sites are assigned as fluid or solid sites to reproduce the geometry of the soil pore space. The site's class specifies the physical and biochemical processes that can take place in.

DOC moves within the medium by diffusing in the liquid phase (i.e. the fluid sites). The diffusion of DOC is managed by TRT-LBM by

redistributing the DOC mass of each fluid site according to the microscopic populations using the weights t_q^* (Eq. (17)).

$$f_q(r,t) = t_q^* \; DOC(r,t) \qquad q = 0, \; \ldots \; Q-1 \tag{17}$$

Bacteria were immobile and placed in the fluid sites (more details are provided in Section 3.4.1). The local fluxes of DOC emanating from the bacterial metabolism constitute the source term S_q in the TRT equation of evolution (2). They are proportionally redistributed to the microscopic populations (f_q) along:

$$S_q(r,q,t) = t_q^* \; (-uptake(r,t) \; + \; mortality(r,t)) \tag{18}$$

Bacterial growth therefore relies on the supply of substrate, itself dependent on diffusion processes within the pore network.

3. Factorial design of soluble carbon substrate biodegradation

3.1. Generation of 3D soil sample images

3.1.1. Soil column sampling and scanning

The soil is a silty loamy (19% clay, 75% silt, 6% sand) Albeluvisol [48] from a field experiment in Feucherolles (50km West of Paris, France). It is cultivated (wheat-maize succession), tilled, fertilized and manured with urban compost [49]. A soil column (5 cm height, 5 cm diameter) was collected from the tillage inter-furrows [50]. The soil samples were scanned with a benchtop X-ray micro-computed tomography system (Nikon Metrology X-Tek HMX CT scanner, Nikon Metrology X-Tek Systems Ltd, Tring, UK) at 90keV and 112mA. The 3D image made of $600 \times 600 \times 600$ voxels was reconstructed using the CT Pro reconstruction software and a voxel-resolution of 68 μm was achieved corresponding to a volume size of about 68 cm^3. A global threshold according to [50] was used to discriminate solid matrix from pore space.

To maintain computational and memory cost at reasonable levels, we divided the initial image into 216 cubes of $100 \times 100 \times 100$ voxels (of volume size of about 314 mm^3). While the total macroporosity of the large image (i.e. the proportion of void voxels above 68 μm resolution) was 0.11 [50], there was a large variation of the macroporosity across the 216 cubes (with a coefficient of variation of 106%) as well as a large variation of the pore topologies. Three cubes with different pore topologies were selected for the study. The choice of cubes was based on the morphological characteristics of their pore space.

3.1.2. Representativeness of the soil images

Our objective was to reproduce millimeter scale variability identified by several authors [3,7]. As resolution and sample size are not independent with computed tomography scanning, we chose to use a relatively coarse resolution (68 μm) in order to image relatively large samples and therefore account for environmental variations at the millimeter scale.

Since the soil consists to 94% out of silt and clay, i.e., particles of size < 50 μm the resolved porosity of the CT images corresponds to a volumetric water content measured on the whole soil column of only 0.14 $cm^3.cm^{-3}$ while for the unresolved porosity it amounts to about 0.40 $cm^3.cm^{-3}$ [50]. At the resolution of the scans, the CT images are not accounting for pores or any geometrical feature smaller than 68 μm. They only depict the topology of meso- or macropores according to Luxmoore classification [51]. Nevertheless, as will be evidenced in next section, straightforward visual inspection and quantification of morphological indicators demonstrate that they captured more realistically the 3D geometry and topology of soil meso- and macropores than would generic porous media models, like those based on sphere packings. Indeed, the investigated pores are the result of tillage since the soil was sampled in the former soil surface that was plowed in by the mouldboard. The maize residues that were incorporated also participated to the formation of such pores. A micro-morphological study of the soil sample was previously performed on the soil sample [50], which found very good agreement between the shape of meso- and macropores detected by the scans (at least on the 2D sections) and that identified on thin-sections.

3.1.3. Selection of three 100^3 voxels cubes

We used three indicators to assess the physical heterogeneity of the pore space topology: the Euler–Poincaré characteristic (EPC), the geometrical tortuosity (τ) and the specific surface area (SSA).

A preliminary treatment of the cubes was performed to remove all disconnected pores (small pores can be isolated because of artificial edge cutting or because some connections may not be detected at the given resolution) using a home-made algorithm for searching connected components. Prior to carrying out the morphological analyses on which the cube selection was based, all cubes that did not have connected porosity from the top ($Z = 1$) to the bottom ($Z = 100$) planes were removed. Of the remaining 61 cubes, we randomly selected ten cubes (named after G_1 to G_{10}) that spanned the whole range of porosity, and performed on them the morphological analyses. We further calculated the three morphological indicators on a periodic synthetic porous medium: a cubic packing of spheres of 100^3 voxels, named after *SP*. It was made of $4 \times 4 \times 4$ entire spheres (10 lu radius) and $2 \times 4 \times 4$ half spheres placed at the edges. The porosity of *SP* was 39.78%.

The Euler–Poincaré characteristic. The Euler–Poincaré characteristic (EPC) is used to quantify the connectivity of the pore space, i.e. the number of non-redundant closed-loop paths in the pore space geometry [52]. We used the method described in [53] for calculating the EPC on the segmented 3D images. The first step was a morphological opening of the pore space (i.e. successive erosion and dilation) using ImageJ software (minimum 3D and maximum 3D filters) performed on the full 3D stack of images of each cube. The procedure was repeated with the pixelized 3D structuring element (sphere) of increasing radius (from one to eight pixels). We thus obtained eight 3D images of each medium, where pores from small to large diameter were successively removed. For each image, we calculated the remaining porosity. Fig. 2a shows the resulting pore-size distribution (PSD). The PSD curves of the ten cubes showed that the equivalent pore diameters were comprised between 68 and 3536 μm ranging the pores as meso- and macropores according to Luxmoore classification [51]. Only one cube (G_1) exhibited pores of diameter smaller than 544 μm while the maximum size of *SP* pores was 952 μm.

We calculated the third Minkowski functional measure from which the Euler–Poincaré number can be derived, using algorithms based on Ohser and Mücklich [32,54,55]. Results are shown in Fig. 2b. The EPC curve of *SP* was characterized by high negative and positive values together with an abrupt variation between both values. The latter was the result of simultaneous closing of all connections – in only two opening steps from 544 to 816 μm diameter – changing from a pore phase well connected by multiple paths to a set of isolated cavities. By contrast, the cubes exhibited a lower connectivity but a continuous variability in the EPC curve as observed for non-aggregated soils [53]. The EPC curves of several cubes showed negative values at small radii and reached 0 at larger radii, suggesting a continuous well-connected pore space. In some cases, (cubes G_{10}, G_6, G_8, Fig. 2b), the EPC curve reached positive values suggesting that the openings generated a number of isolated cavities that exceeded the number of loops. It has been suggested that this form of EPC curve is indicative of larger pores connected only by smaller pores or throats [53], as is the case for the sphere packing. Finally, other cubes presented flat EPC curves always close to zero (G_1, G_4) or slightly positive (G_3) suggesting a poorly connected pore network and a low variation in the geometry of the pore space for the whole range of pore size [53].

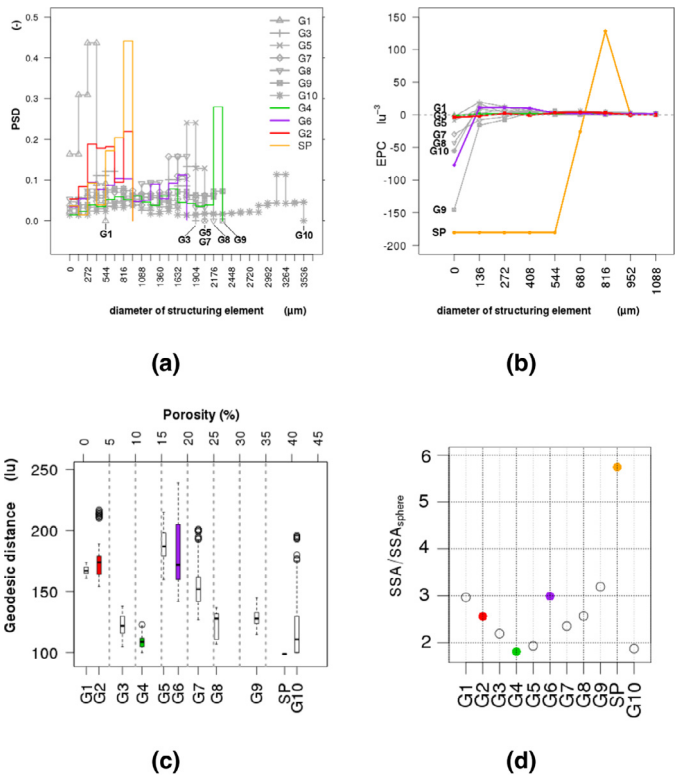


Fig. 2. Morphological indicators of the ten 100^3 voxels images and the sphere packing (*SP*): the pore-size distribution (a), Euler–Poincaré characteristic (b), geodesic distance (c) and the ratio of SSA of the cubes and SSA of sphere of equivalent pore volume (d). *SP* and the three cubes (G_4, G_6, G_2) chosen among the initial selection of 10 are shown in color. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

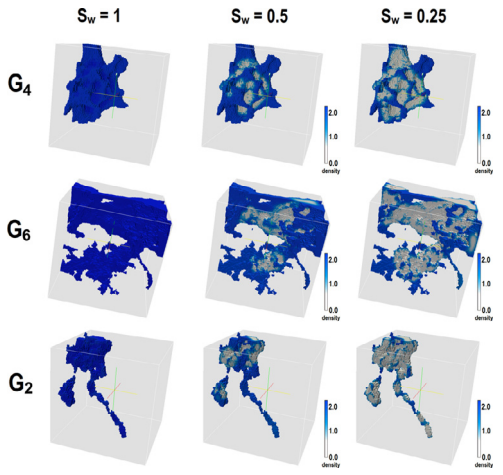


Fig. 3. Pore space geometry and water and air distribution in the three selected media (G_4, G_6, G_2) at the three simulated saturation levels ($S_w = 1, S_w = 0.5, S_w = 0.25$). The liquid phase is in dark, and the gas phase is in light. Solid phase is not represented. Note that all pore space connected from first ($Z = 1$) to last ($Z = 99$) plane in the vertical direction for all cubes.

The geometrical tortuosity. We calculated the geometrical tortuosity, τ_g, which is defined as the ratio of the geodesic distance, L_g, over the Euclidean distance, L_e [56]. It describes the larger diffusional pathways occurring in the sinuous shape of the pore network as compared to free water. Following Gommes et al. [57], we calculated the geodesic distances from the topmost plane ($Z = 1$) to any point of the pore space of the cube using a 6-connectivity algorithm. Fig. 2c shows only the results of the geodesic distances of the points of the plane $Z = 100$ for the ten cubes, since geodesic distances between closer points may not be relevant to the effective diffusion transport properties of the whole cube [57].

The mean geodesic distance and the dispersion of the data differed considerably among the ten cubes 2c). Some cubes were also characterized by low values close to 100 (i.e. geometrical tortuosity close to 1), which suggests potentially short diffusion pathways (G_4, G_3). Other cubes were characterized by larger geometrical tortuosity values of about 1.5 (G_1, G_2, G_5, G_6), large dispersion of the geodesic distances (G_6, G_{10}), with frequent extreme values (G_2, G_7, G_{10}). This is probably related to a well-connected pore space with a lot of non-redundant loops, suggesting a more complex shape of the pore space geometry and potentially tortuous diffusion pathways. By contrast, for the sphere packing all the calculated geodesic distances L_g were found equal to 100 lu, the Euclidean distance L_e (Fig. 2c).

The specific surface area. Finally, the specific surface area (SSA) describes the available liquid/solid interface where bacteria can attach and live. It is defined as the liquid/solid interface area per unit mass [52] and was straightforwardly calculated as the ratio between boundary solid sites and total solid sites of the cube images. In order to easily compare the ten cubes and *SP*, we normalized the SSA by the SSA of a sphere of equivalent porosity (Fig. 2d).

All cubes had twice to three times larger specific surface area than spheres of equivalent volumes, while for *SP* it was almost six times, because of the spherical shape of the solid grains that maximized the surface area between the liquid and solid phases by contrast to the CT images that displayed more concave surfaces. The cubes with the lowest SSA ratios were expected to have large uniform pores (G_4, G_5, G_{10}), while high SSA ratios probably denoted abundant small pores and/or irregular patterns of the liquid/solid interface (G_1, G_6, G_9).

The comparison with *SP* showed significant differences in the morphological indicators as compared to the ten cubes. In particular, the irregular pore shapes observed in the CT images caused anisotropic and tortuous diffusion pathways that could not be found in *SP*. The CT images appeared thus as good candidates to test how LBioS can describe in a deterministic way the biodegradation kinetics at the millimeter scale, when taking into account realistic spatial disconnection between DOC and hot-spots of bacterial colonies [7,58] at different levels of water saturation.

We selected three cubes for which the three morphological indicators suggested that the heterogeneity of the pore network was either high, intermediate or low. The most homogeneous medium was the cube G_4 as indicated by the low and constant EPC values, the lowest geometrical tortuosity and surface specific area ratio. From visual observation, it is characterized by a unique large pore, straight in the vertical direction and connected with small lateral pores (Fig. 3). Cube G_6 was selected because it obtained values of geometrical tortuosity and SSA ratio among the highest found. It is made of two main irregular pores (a massive one in the top half and a smallest one in the bottom half) connected by a unique junction. The presence of a fine elongated pore, from $Z \approx 35$ to $Z \approx 80$ length units ($Z \approx 2380$–5440 µm), connected by a narrow throat probably participated to the sign shift of the EPC curve.

Compared to G_6, G_2 presented a lower SSA ratio, a similarly high geometrical tortuosity and a rather flat EPC curve with low negative values showing thus contrasted values of the three morphological indicators. The visual observation of G_2 revealed an anisotropy for diffusion in the vertical direction. Indeed, it is characterized by a funnel-shaped pore topology, with a wide pore at the top (maximum width $\approx$ 40 lattice length units or 2700 µm) ending with a narrow extension (length $\approx$ 40 lu or 2700 µm, minimal throat size: 5 lu or 340 µm) (Fig. 3). Total macroporosity values for G_4, G_6 and G_2 were 11.25%, 18.82% and 3.02%, respectively.

3.2. Generation of water-air distributions for three saturation levels

For each cube, we calculated the distributions of water and air corresponding to different saturation indexes (i.e. the proportion of liquid voxels on porous voxels): $S_w = 1$, $S_w = 0.5$ and $S_w = 0.25$. The original images of pore space were used for the complete saturation ($Sw = 1$). The lower saturation levels were produced by simulating phase separation in pore space with the two-phase TRT-LBM. Phase separation was induced by initially setting a homogeneous macroscopic fluid density (ρ_0) to the porous sites of the lattice according to [34]. The initial density (ρ_0) was calculated using Eq. (19).

$$\rho_0 = S_w\ \rho_L\ +\ (1 - S_w)\ \rho_G \tag{19}$$

where ρ_L and ρ_G are respectively the theoretical density values of liquid and gas phases given in [34]. Simulations were run until equilibrium was reached ($T_f = 5000$ time units ≈ 3.825 s). Note that the space resolution of the images gave a time resolution of $T_P = 0.765$ ms according to Eq. (8).

The simulated static distributions of water and air phases are displayed in Fig. 3. As water saturation decreased, bubbles of increasing size were found in the center of the biggest pores.

3.3. Effective diffusion in the 3D porous media

For each saturation level, we simulated the diffusion of a tracer in the three selected cubes in order to better characterize the diffusion transport properties than can be deduced from the geometrical tortuosity alone. To prevent periodic conditions, three faces of the cubes (planes $X = 100$, $Y = 100$ and $Z = 100$) were set as solid. At $t = 0$ the tracer mass was set to $M = M_0$ at $Z = 1$, and $M = 0$ everywhere else. The initial conditions constrained the diffusion in the vertical axis and, following [59], we compared the simulated tracer mass $M(z, t)$ to the analytical solution of the diffusion equation (20) written for a semi-infinite medium and previous initial conditions according to [60] and for a variably saturated porous medium:

$$M_{\text{th}}(z) = \frac{M_0}{\sqrt{\pi D_e t/\theta}} \times exp\left(-\frac{(z - z_0)^2}{4D_e t/\theta}\right) \tag{20}$$

where D_e is the effective diffusion coefficient [$L^2 .T^{-1}$], θ is the volumetric water content [$M^3.M^{-3}$], z is the vertical coordinate, $Z_0 = 1$ and t is the computation time large enough for the tracer plume to diffuse through a large part of the porous medium but small enough to keep a zero mass on the $Z = 99$ plane to keep close to the semi-infinite conditions of the analytical solution. From the 3D maps of tracer mass at each time step, we calculated the total mass by plane Z, $M(z, t) = \sum_{r \in Z} \sum_q f_q$.

The optimization of the effective diffusion coefficient D_e was done by minimizing the L2 norm error E_L (Eq. (21)).

$$E_L = \sqrt{\frac{\sum_r [M_{th}(z) - M(z)]^2}{\sum_r M_{th}(z)^2}} \tag{21}$$

Results are presented in Fig. 4. A large uncertainty was associated to the optimization with large values of E_L found in all cases. The effective diffusion coefficient and E_L values gave complementary information about the heterogeneity of the diffusion pathways. A large D_e value indicated a rather homogeneous topology presenting few constraints on solute diffusion. The larger the E_L value, the more the tracer profile diverged from the Gaussian shape (Eq. (20)), because of heterogeneous diffusion pathways.

The effective diffusion was affected by both the geometry of the pore network and the saturation level. Under complete saturation, the cubes could be ranked by decreasing effective diffusion rates, with $G_4 > G_6 > G_2$. This order was kept whatever the saturation level, and the difference among cubes increased as a function of decreasing saturation level.

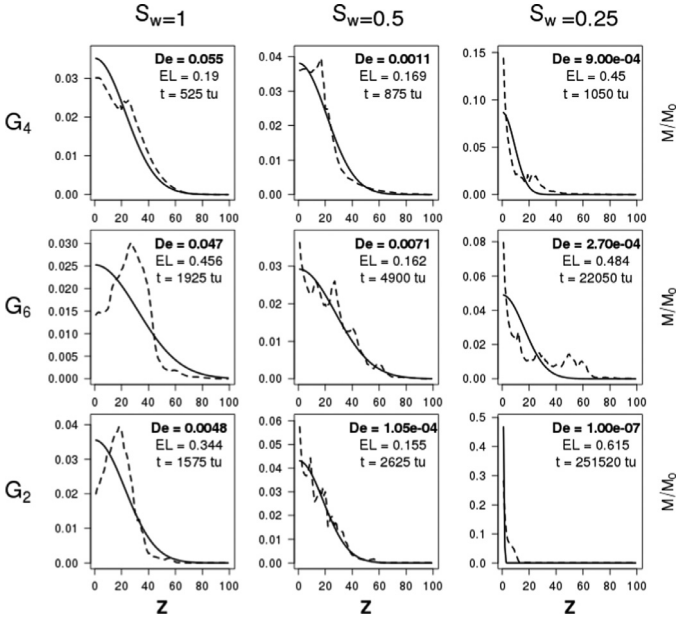


Fig. 4. Comparison between the relative analytical mass calculated from Eq. (20) (plain lines) and the relative simulated mass profile along Z (dashed lines) in the three media at saturation levels of $S_w = 1$, $S_w = 0.5$, $S_w = 0.25$. Masses (in lattice mass units) are normalized by the initial mass of the tracer pulse, M_0.

In G_4, the tracer profile was in rather good agreement with the theoretical Gaussian shape, confirming the values found for the morphological indicators. By contrast, in G_2 and G_6, even under complete saturation, the tracer profiles diverged from the Gaussian shape, suggesting many more variations in pore section and heterogeneous diffusion pathways than in G_4 (Fig. 3). In G_2, the solute did not diffuse beyond $Z = 20$ because of discontinuities in the water phase at this depth. This discontinuity resulted from the coarse discretization of the grid that did not allow for thin water films, as was also observed by Vogel et al. [24].

3.4. Biodegradation kinetics in the 3D porous media

3.4.1. Design of the numerical simulations

We computed the biodegradation of a mass DOC_0 of DOC during ten days (about 250,000 lattice time units). Substrate input was performed as in the previous section (3.3), by replacing the tracer solute by DOC.

In this work, we intended to reproduce patchy distributions of bacteria or hot-spots. Because of the coarse resolution and the biodegradation module written in terms of carbon pools, we did not simulate the spatial expansion of bacterial biomass: the growth was only calculated as an increase of carbon mass in the initialized voxels. Note that we checked in our simulations that we did not reach unrealistic biomass density in these voxels. We did not simulate biofilms that can alter fluid transport properties of the host porous medium through bio-clogging processes [61] because there is little evidence that biofilms develop extensively in natural soils (e.g. [62]). Therefore we neglected the potential feedback that bacterial activity can have on the physical heterogeneity of the pore networks.

We thus split the initial total mass of the bacteria pool, B_0, into several spots that were always water-filled whatever the saturation level. The sites at the boundary with solid mostly contained the remaining water at low saturation level. We thus selected these sites to hold the bacteria spots because we did not want to modify their position when we modified the water saturation level. However, due to the coarse discretization of the grid, some of the sites neighboring the solid phase may be empty of water, so that we initially retained the

Table 1
Parameters of the biodegradation module. lu is lattice length unit, tu is time unit and mu is mass unit.

Symbol	Definition	LB parameter	Physical parameter	Ref.
D_M	DOC mol. diff. coeff.	0.5 $lu^2.tu^{-1}$	6.73×10^{-6} $cm^2.s^{-1}$	[69]
ν_{DOC}	Maximal uptake rate	6.76×10^{-4} tu^{-1}	17 d^{-1}	[42]
k_{DOC}	Half saturation constant	1.57×10^{-10} mu · lu^{-3}	5×10^{-4} mgC.cm^{-3} water	[42]
k_r	Respiration rate	7.95×10^{-6} tu^{-1}	0.2 d^{-1}	[42]
k_m	Mortality rate	5.96×10^{-5} tu^{-1}	1.5 d^{-1}	[42]
k_i	Inhibition constant	1.91×10^{-8} mu · lu^{-3}	6.07×10^{-2} mgC.cm^{-3} soil	[47]
R_0	Initial physical state	0.1 [–]	0.1 [–]	[47]
DOC_0	Initial DOC mass	5.89×10^{-3} mu	5.89×10^{-3} mgC	[42]
B_0	Initial bacterial mass	1.24×10^{-8} mu	1.24×10^{-8} mgC	[42]

boundary sites that remained full of water at the lowest saturation level.

The modeled distributions of bacteria were based on results from studies which suggest that spots of bacterial activity can be separated by few hundreds of microns [63] to millimetric [64] or even centimetric distances [3,4]. We generated three spatial arrangements with different inter-spots spacing and mean distances to the substrate source, at a submillimeter scale. The initial biomass (B_0) was split into ten spots of equal carbon mass. A homogeneous distribution throughout the vertical axis of the cube was compared to two spatial arrangements with bacterial spots concentrated either close to the DOC source or far from it. In the *Dispersed* location (L_D), spots were regularly spaced along the Z direction (one spot every 10 $\Delta Z = 10$ lu = 680 μm). In the *Top* (L_T) and *Bottom* locations (L_B), bacterial sites were placed every $\Delta Z = 3$ lu = 204 μm, on $Z < 30$ lu = 2,040 μm and $Z > 70$ lu = 4,760 μm, respectively.

3.4.2. Biodegradation module parameterization

Values of the parameters of the biodegradation module (Table 1) were obtained from two papers: [42,47]. Monga et al. incubated single *Arthrobacter sp.* strains in unsaturated sand ($\theta = 0.33$) amended with fructose [42]. As glucose has been found not to interact with the soil matrix in [65], we assumed that fructose does not either, as it is an isomer of glucose. We used the same biodegradation model as [42] (without dormancy) and applied the rate constants (ν_{DOC}, k_{DOC}, k_r, k_m) they fitted to experimental CO_2 emission curves.

The initial masses of substrate DOC_0 and bacteria B_0 were identical to those of [42] for all cubes and water saturation levels so that concentrations changed between the scenarios because of the differences in water volume.

The parameters (k_i and R_0) used for computing the physiological state were found in [47]. Two inhibition constants values (k_{i_r} and k_{i_K}) characterize respectively rapid litter decomposers or *r-strategists* and slow decomposers (*K-strategists*). Ingwersen et al. assimilated soil bacteria to rapid decomposers [47] . We thus applied k_{i_r}. Soil is characterized by low microbial activity, due to fluctuating and fragmented resource input [43]. The estimated proportion of active biomass under natural conditions in soils ranges between 5 and 20% (18.8% +/− 8.8 was found in [66], 5–20% in [67] or 18% +/− 15 in [68]). An initial value of $R = 10\%$ was chosen [47] in agreement with the above-mentioned references.

The impact of bacterial physiology on biodegradation kinetics was assessed by calculating the dynamical physiological state R (Eq. (13)) in one case (P_1). In another case, P_0, the physiological state was set to a constant value of 1, standing for optimal resource abundance conditions.

4. Global sensitivity analysis

A global sensitivity analysis [70–72] was carried out to study the sensitivity of three model outputs to four input factors. The model outputs were DOC, B and CO_2 at two time steps (three days and ten days), and the four input factors were those presented above: Geometry (G), Saturation (S), Location (L) and Physiology (P). Three levels were considered for the first three input factors and two levels for the last one. These levels correspond to discrete values of the factors. A complete factorial design was built by combining all the levels across all the factors leading to $3 \times 3 \times 3 \times 2 = 54$ scenarios.

Table 2
Summarized final values of the three carbon pools (expressed as C/C_0).

	DOC	B	CO_2
Mean	0.173	0.362	0.464
min	0.015	1.56×10^{-6}	8.50×10^{-8}
max	1.00	0.614	0.798
CV	1.313	0.527	0.444

An analysis of variance was performed with the `aov` function of the R software [73]. The total variability found in the values of the output variables was thus decomposed into contribution parts of the four factors and of all of the combinations between those factors.

The variance distribution was related to a reference case to which the other scenarios were compared. The scenario with the most homogeneous conditions was designated as the reference scenario. G_4 at Saturation $S_w = 1$ displayed the most homogeneous conditions for diffusion (Section 3.3). The *Dispersed* location is characterized by the most even bacteria repartition and the P_0 physiology modality by a constant and optimal bacterial activity. We thus chose as the reference scenario, the combination between modalities G_4 for geometry, $S_w = 1$ for saturation, *Dispersed* for location and P_0 for physiology.

Finally, in order to determine whether the relationship between the model outputs and the distribution of bacterial hotspots was general or dependent on the specific location of the hotspots within the pore network, we performed five additional random selections of X and Y coordinates for the fixed Z. Bacterial kinetics were simulated for all of these selections at $S_w = 0.25$ and physiology P_1, for which the largest contrast in outputs was expected. The coefficients of variation of the DOC outputs from the five random selections were calculated at ten regular time steps during the whole simulation period (251,520 time units or ten days) and then averaged over all time steps.

5. Results

5.1. General features of bacterial growth kinetics

The same DOC input resulted in a large variety of outputs in the 54 scenarios, as reflected by high coefficients of variation (Table 2 and Figs. 5–8; comprehensive kinetic results can be found in Appendix A.11). The final situations ranged from zero biodegradation (e.g. Fig. 6b, dashed-dotted lines) to nearly complete substrate depletion (e.g. Fig. 8a, dashed lines). Some of the scenarios were close to the "classical" growth pattern found for labile soluble substrates in optimal growth conditions [74]. After a lag phase, biomass grew exponentially until substrate depletion then declined due to reduced uptake

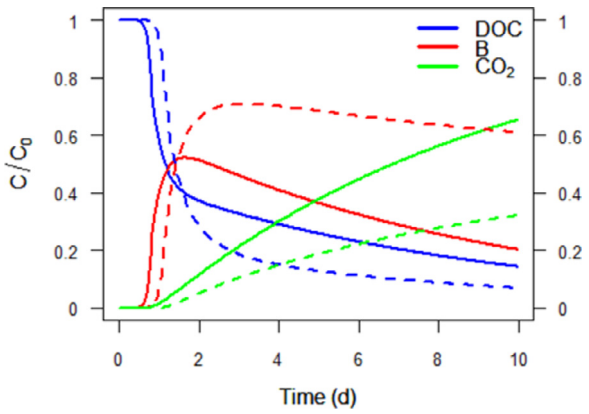


Fig. 5. Effect of the factor physiology shown in the most homogeneous physical conditions, in terms of pore topology (G_4), water saturation ($S_w = 1$) and bacterial distribution (*Dispersed* location). Plain and dashed lines are for the P_0 and P_1 physiology modalities, respectively.

and C losses by mortality and respiration, as reflected by the high CO_2 emissions (e.g. Fig. 5, plain lines). Other scenarios diverged from this behavior. In some case biomass growth was rapidly limited despite the fact that the overall DOC concentrations were still sufficient to sustain growth (Fig. 6b, dotted lines). In these cases, a large portion of the DOC remained unconsumed until the end. No growth was observed in an extreme case of limitation (Fig. 6, dashed-dotted lines).

5.2. Influence of biological and physical factors

Physiology. The activation of physiological state modulated kinetics (Fig. 5). Dormancy increased the range of durations of the lag phase (16–54 hours for scenarios with P_1 versus 19–25 h for P_0). Growth often resulted in a biomass plateau and reduced CO_2 emission when the physiological state (R) variation was considered (scenarios P_1) because C stayed in the increasingly inactive biomass pool as R decreased. By contrast, biomass was more prone to decline when respiration and mortality were not reduced by R (scenarios P_0). It resulted in a systematically lower final biomass value after ten days in these scenarios (25% in average for P_0 compared to 52% for P_1). The physiological state activation also enhanced DOC uptake efficiency (16% of initial DOC was left over after ten days in average for scenarios P_1 versus 21% for P_0). This effect was especially apparent for the most homogeneous conditions (e.g. for cube G_4 and for high saturation levels, see Fig. 5).

Water saturation. We observed differential responses to water saturation. As the initial B_0 and DOC_0 values remained the same whatever the water content, the overall DOC concentration varied as a function of the water volume. Water content decrease enhanced the rate of C mineralization in certain circumstances (Fig. 6a). However, saturation decrease did not always induce a gradual kinetics enhancement. When bacteria were distant from the substrate source (*Bottom* location), a slow linear DOC decrease could happen, indicating a severe consumption limitation, as for instance in the medium G_6 where 80% of the substrate was kept from degradation (Fig. 6b, dotted lines).

The divergence from an exponential behavior suggests that the global concentration of substrate did not control biodegradation kinetics alone. At the lowest water content, an increase in the tortuosity of the residual water phase possibly reduced the diffusion of substrate towards bacteria.

We observed in G_2 at $S_w = 0.25$, an extreme case of such regulation mechanism, i.e. no bacterial growth (Fig. 6b, dashed-dotted lines). This cube presented a hydraulic discontinuity between the DOC source and the bottom of the narrow pore where bacteria were located (Section 3.3, Fig. 4) at the lowest saturation index.

Geometry. Each of the three sets of 18 scenarios in G_4, G_6 and G_2 displayed a high variability. DOC values after ten days reached mean and coefficient of variation of 6% and 79% for G_4, 25% and 86% for G_6 and 22% and 141% for G_2. The DOC consumption was always quick and intense in the most homogeneous cube G_4 (Fig. 7), regardless of the bacteria location or the water content, resulting in a low mean DOC value after ten days. By contrast, the highest CV value in G_2 (141%) reflected extremes in kinetics found for that cube, from severely restricted growth because of limited diffusion to quick and intense DOC uptake. Note that in G_2, where the highest overall concentration was found, the consumption of DOC was slow under complete saturation when the bacteria where located in the bottom of the cube (Fig. 7). The particular morphology of G_2 with a funnel-shaped pore ending with a long pore constriction generated a delay in diffusion of DOC towards the bacteria. The discontinuous water phase under low water content was therefore not the only constraint on biodegradation. In this case, high tortuosity due to pore morphology and the spatial disconnection between bacteria and DOC source were sufficient to

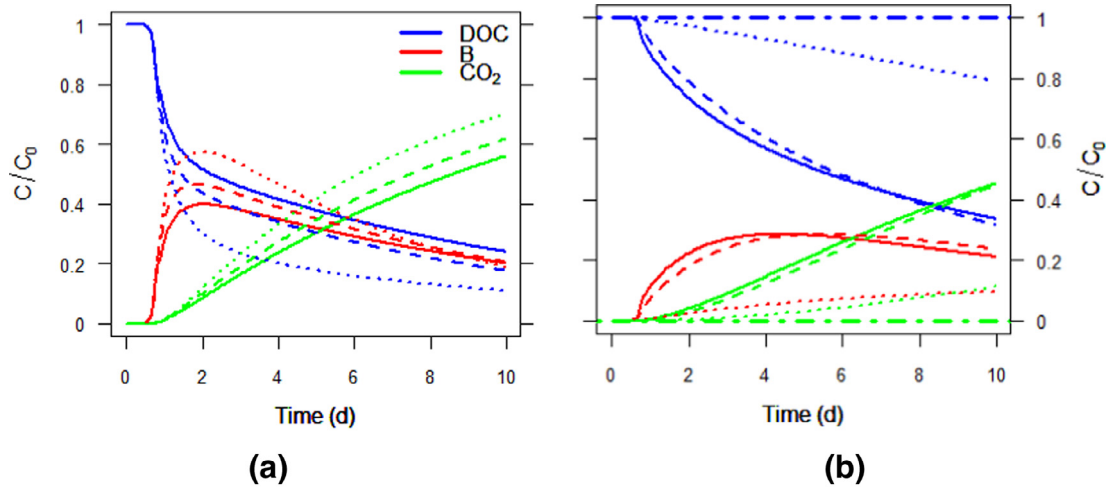


Fig. 6. Effect of saturation factor crossed with location factor. The effect of saturation can be observed in each plot showing scenarios in *Top* (a) and *Bottom* location (b). Comparison of the two plots illustrates stimulation (a) or limitation (b) of kinetics that can be found for opposite bacterial distributions. Plain lines are for saturation $S_w = 1$, dashed lines for $S_w = 0.5$ and dotted lines for $S_w = 0.25$. All kinetic curves are for medium G_6, except the dashed-dotted lines in (b) showing an extreme limitation of biodegradation in medium G_2 at $S_w = 0.25$.

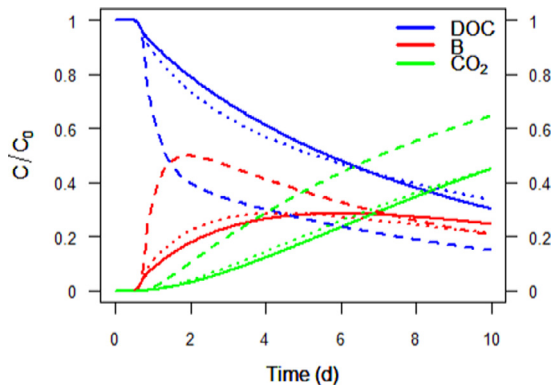


Fig. 7. Effect of the geometry factor. The impact of morphological heterogeneity is shown for *Bottom* location under complete saturation ($S_w = 1$). Bacterial growth was exponential in the most homogeneous medium G_4 (dashed lines), while it was reduced in G_2 (plain lines) due to high diffusion constraint. The combination of moderate diffusion constraint and low overall substrate concentration resulted in similar growth reduction in G_6 (dotted lines).

reduce DOC uptake. Cumulated low overall concentration and high tortuosity effects were also responsible of the slow DOC decrease in cube G_6 under similar conditions (Fig. 7).

Location. The degradation of DOC was noticeably lowered when bacteria were placed in the bottom of the cubes, as expected, because of the spatial disconnection between substrate input and bacteria (35% of the initial DOC mass was left over after ten days, for *Bottom* location scenarios). The DOC uptake efficiency was similar in *Dispersed* and *Top* location modalities (10 and 9% remaining DOC respectively). Fig. 8a illustrates a case where DOC consumption was the quickest for the L_D scenario. Bacteria located at the top were stimulated by the high surrounding substrate concentrations during early simulation times and therefore consumed all the DOC before the initial DOC gradient dissipated (Fig. 8a). However, in L_T scenarios, when DOC diffused beyond the last bacterial spot (30 lu) it was no longer available to bacteria, until it began to diffuse in the opposite direction. The resulting biodegradation kinetics for *Top* location were slower than for the *Dispersed* location (Fig. 8b). It was found here that proximity to substrate and evenness of bacterial spots distribution affected the mineralization rates equally.

Local distribution of bacterial growth. Local variations of substrate availability induced contrasted bacterial development conditions depending on location modality. It could sometimes result in non-uniform distributions of biomass between the ten initialized sites. For instance, in G_2 and with bacteria distributed in bottom and under complete saturation, a disparity in the bacterial development appeared and settled through the ten days (Fig. 9a). Indeed, in the narrow long pore of cube G_2, there was only one diffusion pathway meaning that access to substrate differed depending on spots depth. Bacterial biomass was therefore distributed as a gradient along the diffusion pathway, so that the uppermost bacterial sites deprived the deeper ones of DOC. This can be viewed as a kind of competition, independent of the organisms' capacities and only based on their spatial arrangement. This gradient did not appear for similar scenarios in the other two cubes (Fig. 9b), suggesting that diffusion pathways were more isotropic, resulting in a more equal access to DOC.

Once again in cube G_2 at the lowest water content, the isolation of bacterial spots from the substrate induced by hydraulic disconnection revealed a peculiarity of the system. In the *Dispersed* location scenario, only one bacterial spot was hydraulically connected to the substrate source. This bacterial spot was therefore not subjected to any competitive pressure for the resource (Fig. 9c) and was almost as efficient in taking up DOC as all bacterial spots in similar scenarios at higher water contents ($S_w = 1$, $S_w = 0.5$) and released similar amounts of CO_2. The physiological state R – when it was allowed to vary (scenarios P_1) – quickly increased to 1 and stayed close to that value throughout the ten days (Fig. 9c) so that activity of the bacterial spot was optimal. It resulted thus in an intense respiration and consequent biomass decline (Fig. 9d).

Summary. These results showed two antagonistic effects caused by the meso and macropores shape on the biodegradation of DOC. The limitation of biodegradation by diffusion became dominant when a high tortuosity was combined with a large spatial – or even hydraulic – disconnection between substrate and decomposers (*Bottom* location). The increase of tortuosity induced a delay in the diffusion of DOC in the case of a complex pore topology (cube G_2) and/or low saturation ($S_w = 0.25$). The limitation by diffusion was counterbalanced by a stimulation of the bacterial activity through local increases in the concentration of DOC by both decrease of saturation and decrease of porosity in case the pore topology was not too heterogeneous (G_4) and substrate source and bacteria were

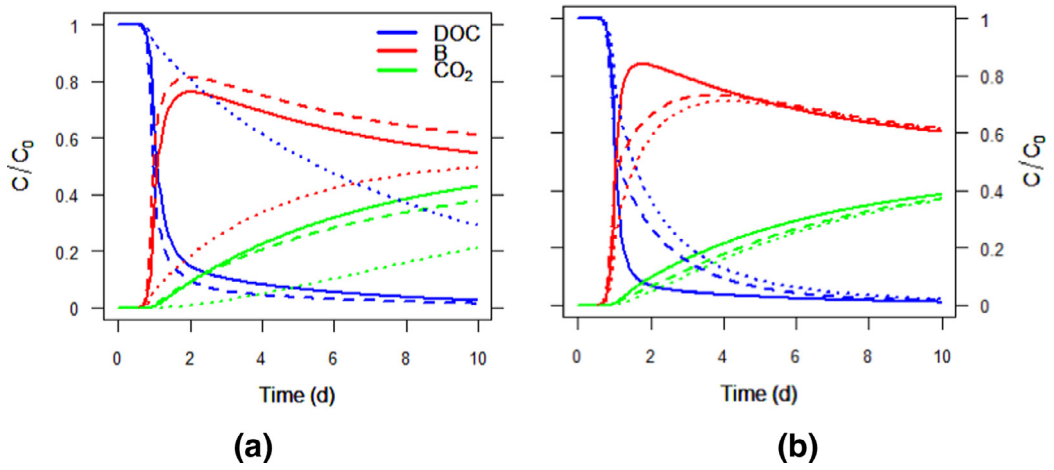


Fig. 8. Effect of the location factor illustrated in two remarkable examples. Scenarios in medium G_6 at saturation $S_w = 1$ are shown in (a), while scenarios in G_4 at $S_w = 0.25$ are shown in (b). Either *Dispersed* (plain line) or *Top* (dashed line) distribution was found optimal for substrate consumption, while slowest kinetics always occurred for *Bottom* distribution (dotted line).

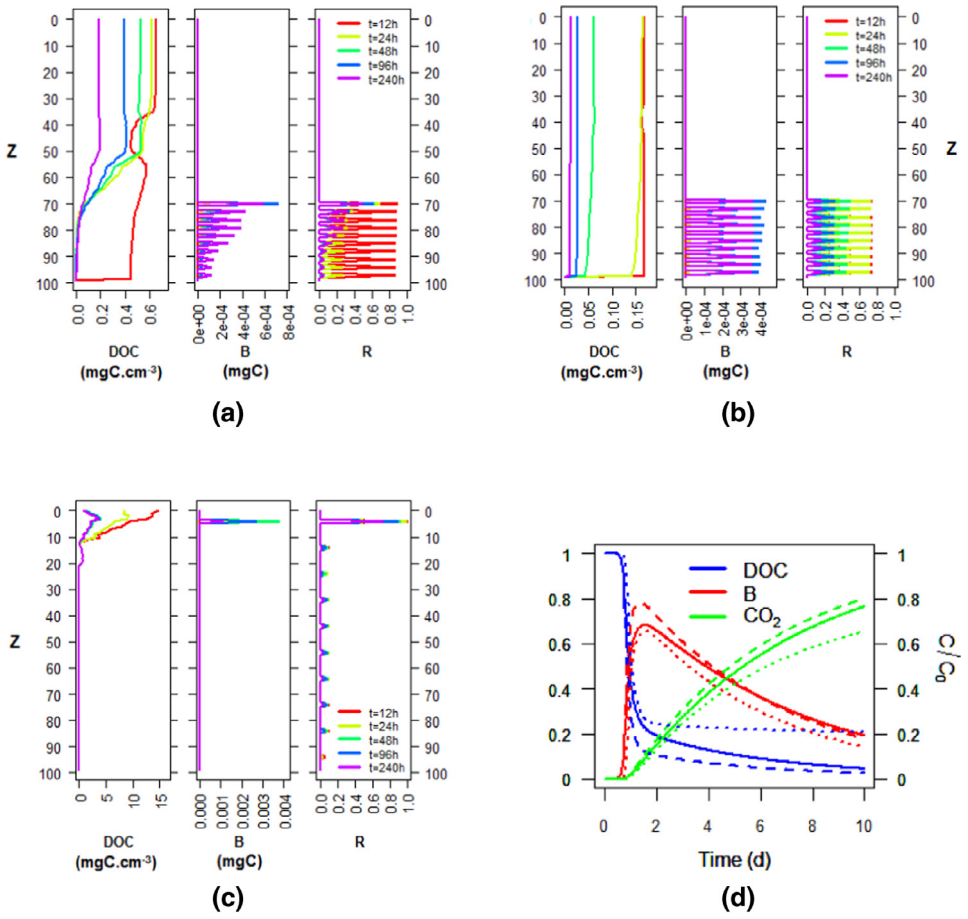


Fig. 9. 1D profiles of DOC concentration, biomass and activity of bacteria at different time steps in three different scenarios: G_2, L_B, $Sw = 1$ and P_1 in (a), G_4, L_B, $Sw = 1$, P_1 in (b), and G_2, L_D, $S_w = 0.25$, P_1 in (c). The global kinetics of DOC biodegradation of the latter scenario in (c) was compared in (d) to similar cases at higher saturation levels (plain lines are for $S_w = 1$, dashed lines for $S_w = 0.5$ and dotted lines for $S_w = 0.25$). Variations in substrate concentrations influenced the distribution of mass and activity between bacterial spots (a, b). The optimal activity in only one spot supplied with substrate (c) partly offset the inactivation of isolated ones, as can be seen on global kinetics (d).

not too distant (*Top* and *Dispersed* locations). Finally, in some cases, the activation of the physiological state R (P_1) enhanced the overall substrate uptake efficiency in the most homogeneous conditions. Local variations of bacterial activity were also sometimes shown to offset the impact of diffusion limitation .

5.3. Global sensitivity analysis results

Fig. 10 shows the results of the variance analysis for each global variable (DOC, B and CO_2) after three and ten days of simulation. After three days, the total variance of the values of every variable was mainly explained by the location (41 to 50% of the total variance) and to a lesser extent by the geometry of the pore network (explaining 13% of the total variance for DOC and 19% for B) and the interaction between the two (*G:L* explaining 21, 18 and 17% of the total variance for DOC, B and CO_2 respectively). The impact of bacterial physiology was also significant for CO_2 (explaining 13% of the total variance).

After ten days, variance partitioning shifted differently for the three output variables. Drastic changes appeared for B, for which physiology dominated, explaining 54% of total variance on its own, while the location effect was negligible (1% of the total variance). However, location remained a major factor for DOC (1st rank, explaining 28% of the total variance) and CO_2 (2nd rank, explaining 26% of the total variance), though its contribution to the total variability was lower than after three days. Half of the total variance (51%) was explained by interactions between physical factors (*S:L, G:L, G:S* and *G:S:L*). Physiology had a minor impact on DOC, either alone (1%) or in

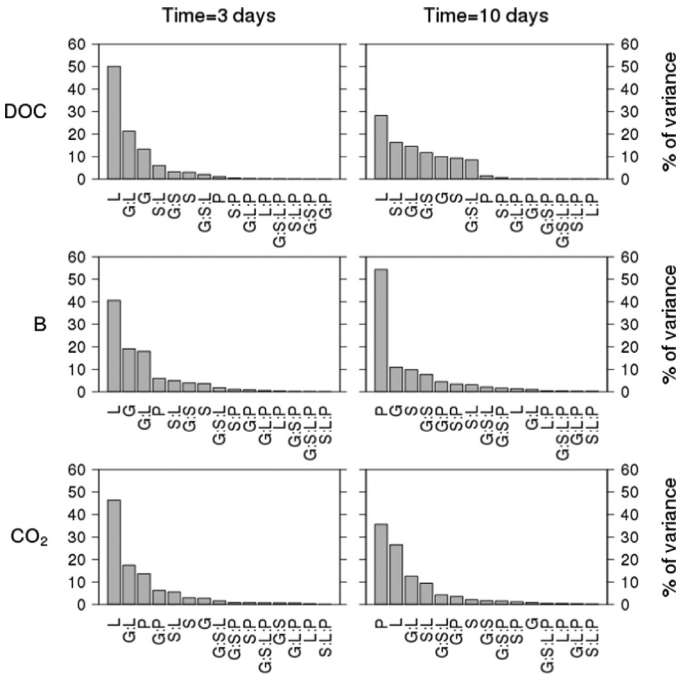


Fig. 10. Contribution parts of the total variance in the values of DOC, B and CO_2 attributed to the factors *G, S, L, P* and their interactions, expressed as percentage. ":" denotes the interaction.

interaction (less than 1%). CO_2, as an integrative variable, displayed intermediate results between DOC and B with physiology (35%) and location (26%) having the strongest influence. The total contribution of the interacting physical factors (*G:S, G:L, S:L* and *G:S:L*) explained 28% of the total variance of CO_2.

The differences observed between three days and ten days of incubation resulted from cumulative effects during the biodegradation process. For instance, after three days, the physical factors, and in particular the location of bacteria relative to substrate, were predominant in initiating bacterial growth while after ten days, the partition of C in either CO_2 or B pools was mainly the results of the physiology.

The complexity of the bacterial responses to the same resource input made it difficult to establish a hierarchy of the contribution of the different factors to biodegradation (Section 5.2). The analysis of variance indicated a significant contribution of the interactions between the physical factors. In particular, it confirmed that the interactions between the different physical factors better explained the variability of biodegradation than some of these factors alone, as was observed in Section 5.2. For instance, *G:S* or *S:L* contributed more to DOC values variability than *S* alone. Interactions between saturation and the other physical factors explained the antagonistic effects of hydration status on biodegradation, as it has been already raised above.

By contrast, the interactions between *P* and other factors had a rather weak effect, whatever the variable, but especially for DOC. It suggests that the effect of physical factors on DOC biodegradation was independent to physiology in these scenarios. Indeed, the same trends could be found when comparing scenarios with similar physical conditions but different physiology modalities.

Finally, it was pointed out that DOC, B and CO_2 obtained contrasted results. It suggests that following the CO_2 global value as an indicator for the fate of organic substrate in soils, as it is frequently done, could actually be insufficient.

Variability associated to local bacterial positions. Highest CV were obtained in G_2 for *Top* (46%) and *Dispersed* (74%) location modalities, while no variability appeared for *Bottom* location ($CV = 5 \times 10^{-6}$). A lowest variation range was found in media G_4 and G_6: from 4% (G_4, L_B) to 26% (G_6, L_D).

At $S_w = 0.25$, the diffusion pathways were very heterogeneous. Thus, changes in *X* and *Y* coordinates modified the local substrate availability for each bacterial spot and thus its development. In G_2 for *Dispersed* and *Top* location modalities, a few bacterial sites were always hydraulically connected to the DOC input and could therefore take part to the degradation. The highest variability in that cases results from the number of connected bacterial sites that varied between random selections (figure not shown) and thus occasioned marked differences in global kinetics.

The variability found here suggested that the quantification of factors impact presented before depends on our arbitrary selections of bacterial sites positions, but confirmed the weight of the interaction *G:L* on DOC degradation highlighted by the global sensitivity analysis.

6. Discussion and conclusion

The use of a pore-scale model, coupling lattice-Boltzmann and compartmental biological models, to simulate biodegradation by taking into account pore topology appeared here as a promising tool for challenging hypotheses about the role of heterogeneous soil microenvironments on biodegradation processes. The transport of a non-sorbing soluble substrate and its utilization by bacteria could be simulated simultaneously in relatively sophisticated representations of meso- and macropore space, as compared to the simplistic media found in other microbial dynamics models integrating spatial heterogeneity like [25–30].

For the first time, we quantified the effect of heterogeneous distribution of some meaningful abiotic parameters in meso- and macropores, on the regulation of biodegradation using a complete factorial design. A global sensitivity analysis was applied on the results of the 54 generated scenarios. The total variance could be decomposed into contribution parts of four tested factors – pore space geometry, water content, substrate-decomposers spatial arrangement, bacterial physiology – and their interactions. The results of the global sensitivity analysis emphasized the role of the physical heterogeneity in our scenarios. It revealed the influence of the interactions between the three physical factors, as they explained a significant part of the variability of the substrate concentration.

In our scenarios, the prevailing abiotic control played through diffusion, as it was the only physical process that determined substrate accessibility to bacteria. Antagonistic effects could be identified due to the contrasted water saturation conditions combined with decomposers spatialization, highlighting once again the role of interactions between physical factors. On the one hand, we found that prolonged access to plentiful substrate could locally enhance bacterial degrading activity. On the other hand, reduced diffusion rates were sometimes found to slow down or even prevent biodegradation when discontinuities in the water phase blocked substrate propagation. Don et al., disregarding microscale heterogeneity and transport processes, interpreted such stimulation as a consequence of the increased probability of encounter between substrates and microorganisms [75]. Moderate diffusion limitation has already been suggested [9,45,76] or shown experimentally [7,77] and is likely to be frequent in natural conditions, whereas the extreme limitation case we found has to be regarded with caution. Indeed, the disconnection of water phase resulted from the coarse discretization of the grid and was thus a consequence of experimental and modeling setting (see Section 3.3).

However, if some submillimeter scale effects simulated here are relevant for soils, diffusion control probably does not exert in the same extent in soils. First it is expected that the diffusion conditions will strongly differ between the real samples and their discretized images, because a significant part of the porosity remained unresolved at the submillimeter scale. A finer reproduction of soil pore space would (i) considerably increase the porosity of the images as we represented only 14% of the total soil porosity, (ii) include tortuous diffusion pathways in micropores and (iii) provide more realistic representation of the water phase through a better resolution of thin water films ensuring a reduced but continuous solute transport. This would tend to induce increased and persisting concentration gradients and may thus amplify the contrasts between bacteria, depending on their local position. Second, introducing mechanisms allowing for bacteria motion would probably counterbalance partly our conclusions that diffusion played a major control on the biodegradation kinetics.

Despite our scenarios imperfectly depicted the complex processes found in real soils, the effects attributed to physical heterogeneity at the meso and macropore scale that were revealed here can be compared to results obtained with simplified experimental systems. Our scenarios generated a high but still realistic variability in biodegradation response. The coefficient of variation of 44% found here for 10 days CO_2 emissions was close to values obtained in experimental studies exploring the effect of spatial heterogeneity on the mineralization of soluble substrates at the millimeter scale: Monard et al. obtained slightly lower CV for glucose (14–22%) [8], while CV values ranging from 25 to 160% have been found for the soluble pesticide 2,4-D [3,4,8].

The spatial arrangement of substrate and decomposers was found to have the greatest impact of substrate bioavailability, inducing in our case high variation in DOC consumption. This was in agreement with Chenu et al. who showed that the accessibility of soluble organic carbon to the soil decomposers can be either limited or enhanced by the existence of heterogeneous spatial distributions of microbial communities in the soil porosity [78].

Bioavailability of substrate was also investigated by modulating substrate-decomposers spatialization in [7,58], but at a larger scale

(mm to cm). The degradation of 2,4-D drastically decreased from 50% in the case of a homogeneous substrate and biomass repartition to 0.3% when separating substrate and biomass by 2 cm [58]. Dechesne et al. placed artificial bacterial hot-spots (i.e. alginate beads) separated by few millimeters in sand microcosms [7]. They found an increased biodegradation efficiency when they inoculated bacteria on nine positions as compared to a single central spot of the same initial mass. We also found that a dispersed distribution of bacteria could sometimes be a better strategy than gathering the spots even near the substrate source. In other studies, the importance of spatial disconnection was investigated indirectly by studying biodegradation in different pore size classes. Substrates and/or bacteria were experimentally placed in different pore size classes by manipulating the water potential and consequently the equivalent radius of water-filled pores according to Young–Laplace law. In [79] substrate mineralization was contrasted among pore size classes while in [80,81], bacteria or substrate placement had little effect.

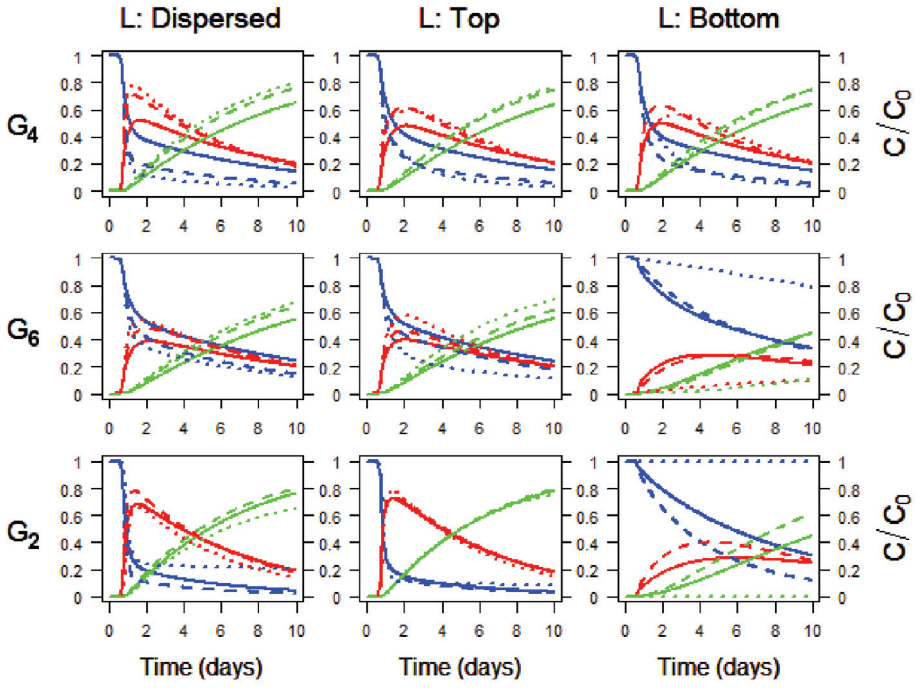
The combined effect of substrate location and water potential was illustrated by experimental works based on the incubation of soluble substrates, such as glucose and 2,4-D [8], and benzoate [7]. Dechesne et al. found cumulative effects of the water potential and the biomass distribution, with high water potential and dispersed distribution both stimulating the mineralization of benzoate [7]. No clear interaction between the two factors appeared, maybe because of the homogeneous initial distribution of the substrate. By contrast, the distribution of bacteria and substrate was found to affect mineralization differently depending on the water content in [31]. In the model used by the authors, organic matter and bacteria could be in air-filled pores and have no influence on the intensity or rate of mineralization, meaning that there were changes in the effective biomass and organic matter as the water content changed. In our model, this was not the case as the bacteria and DOC always remained in the water phase. The different location effects observed in our results and in their work are therefore not strictly comparable.

Although biology was simplified and a coarse resolution was chosen in the present work, the diversity of the biological responses in these simulation scenarios where physical heterogeneity was explicitly described at the meso- and macropore scale, mirrored some variability found in experimental data. Removing these simplifying assumptions can be progressively done in the modeling tool provided here. The approach appears thus promising to further investigate the role of soil structure in SOM decomposition in more realistic pictures of soils.

Acknowledgments

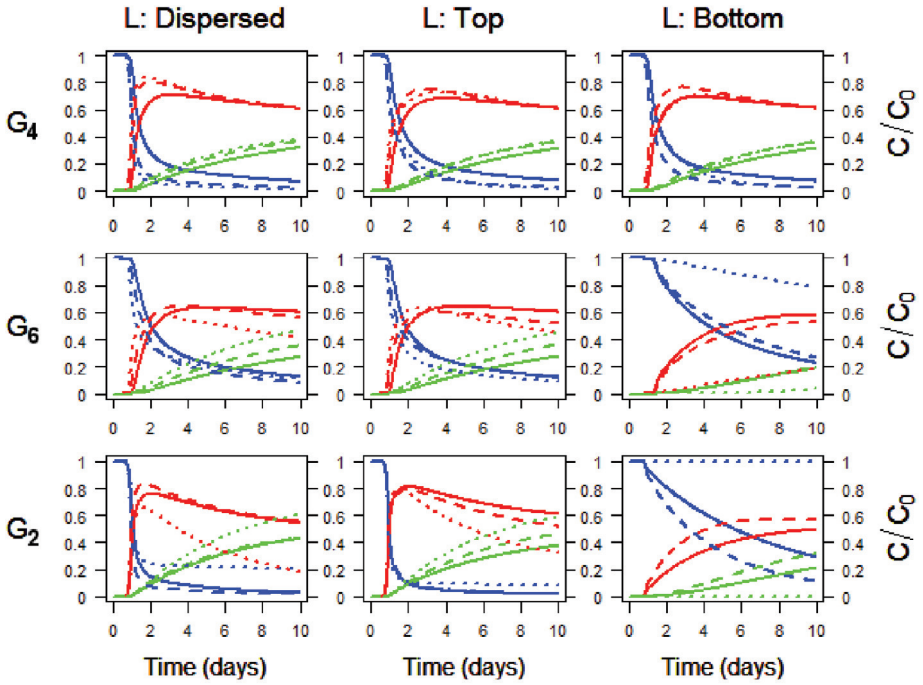
This work benefited from the French ANR project ANR-09-SYSCOMM MEPSOM. We acknowledge Veolia Environment group for financial support of the QUALIAGRO field site where soil were sampled. The soil samples were scanned in SIMBIOS Centre (University of Abertay, Dundee, Scotland). We would like to thank Gérald Debenest and Isabelle Cousin for fruitful discussions.

Appendix A. DOC biodegradation kinetics of the 54 scenarios



(a) Physiology P_0

Fig. A11. DOC biodegradation kinetics of all scenarios displayed on separate pages for different physiology modalities (P_0 in (a) and P_1 in (b)). In each plot, inserts are ordered by row for geometry and by column for location factor. Inside of each insert, the three saturation levels are represented by different line styles ($S_w = 1$ in plain, $S_{0.5}$ in dashed and $S_w = 0.25$ in dotted lines). DOC, B and CO_2 are shown in blue, red and green, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



(b) Physiology P_1

Fig. A11. DOC biodegradation kinetics of the 54 scenarios. Scenarios of different physiology are displayed on separate pages (P_0 in (a) and P_1 in (b)). In each plot, inserts are ordered by row for geometry and by column for location factor. Inside of each insert, the three saturation levels are represented by different line styles ($S_w = 1$ in plain, $S_w = 0.5$ in dashed and $S_w = 0.25$ in dotted lines). DOC, B and CO_2 are shown in blue, red and green, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

References

[1] Bellamy P, Loveland P, Bradley R, Lark R, Kirk GJD. Carbon losses from all soils across England and wales 1978–2003. Nature 2005;437:245–8.

[2] Nunan N, Wu K, Young I, Crawford J, Ritz K. In situ spatial patterns of soil bacterial populations, mapped at multiple scales, in an arable soil. Microb Ecol 2002;44(4):296–305. http://dx.doi.org/10.1007/s00248-002-2021-0.

[3] Vieublé-Gonod L, Chenu C, Soulas G. Spatial variability of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) mineralisation potential at a millimetre scale in soil. Soil Biol Biochem 2003;35(3):373–82. http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00287-0.

[4] Vieublé Gonod L, Chadoeuf J, Chenu C. Spatial distribution of microbial 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid mineralization from field to microhabitat scales. Soil Sci Soc Am J 2006;70(1):64–71. http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2004.0034.

[5] Raynaud X, Nunan N. Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. PLoS ONE 2014;9(1):e87217. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087217.

[6] Smucker AJ, Park E-J, Dorner J, Horn R. Soil micropore development and contributions to soluble carbon transport within macroaggregates. Vadose Zone J 2007;6(2):282–90. http://dx.doi.org/10.2136/vzj2007.0031.

[7] Dechesne A, Wang G, Gülez G, Or D, Smets BF. Hydration-controlled bacterial motility and dispersal on surfaces. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107(32):14369–72. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1008392107.

[8] Monard C, Mchergui C, Nunan N, Martin-Laurent F, Vieublé-Gonod L. Impact of soil matric potential on the fine-scale spatial distribution and activity of specific microbial degrader communities. FEMS Microbiol Ecol 2012;81(3):673–83. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01398.x.

[9] Or D, Smets B, Wraith J, Dechesne A, Friedman S. Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media – a review. Adv in Water Resour 2007;30(6–7):1505–27. http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2006.05.025.

[10] Vos M, Wolf AB, Jennings SJ, Kowalchuk GA. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. FEMS Microbiol Rev 2013. http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12023.

[11] Barton JW, Ford RM. Determination of effective transport coefficients for bacterial migration in sand columns. Appl Environ Microbiol 1995;61(9):3329–35. http://dx.doi.org/10.1016/0009-2509(96)00302-8.

[12] Van Loosdrecht M, Lyklema J, Norde W, Zehnder A. Influence of interfaces on microbial activity. Microbiol Rev 1990;54(1):75–87. http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.07.029.

[13] Pandey G, Jain RK. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. Appl Environ Microbiol 2002;68(12):5789–95. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.12.5789-5795.2002.

[14] Kohlmeier S, Smits TH, Ford RM, Keel C, Harms H, Wick LY. Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. Environ Sci Technol 2005;39(12):4640–6. http://dx.doi.org/10.1021/es047979z.

[15] O'Donnell A, Young I, Rushton S, Shirley M, Crawford J. Visualization, modelling and prediction in soil microbiology. Nat Rev - Microbiol 2007;5:689–99. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1714.

[16] Young IM, Crawford JW. Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. Science 2004;304(5677):1634–7. http://dx.doi.org/10.1126/science.1097394.

[17] Ball B. Soil structure and greenhouse gas emissions: a synthesis of 20 years of experimentation. Eur J Soil Sci 2013;64:357–73. http://dx.doi.org/10.1111/ejss.12013.

[18] Davidson EA, Samanta S, Caramori SS, Savage K. The Dual Arrhenius and Michaelis–Menten kinetics model for decomposition of soil organic matter at hourly to seasonal time scales. Global Change Biol 2012;18(1):371–84. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02546.x.

[19] Moyano FE, Manzoni S, Chenu C. Responses of soil heterotrophic respiration to moisture availability: an exploration of processes and models. Soil Biol Biochem 2013;59:72–85. http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.002.

[20] Baveye PC, Rangel D, Jacobson AR, Laba M, Darnault C, Otten W, et al. From dust bowl to dust bowl: soils are still very much a frontier of science. Soil Sci Soc Am J 2011;75(6):2037–48. http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2011.0145.

[21] Falloon P, Jones CD, Ades M, Paul K. Direct soil moisture controls of future global soil carbon changes: an important source of uncertainty. Global Biogeochem Cycles 2011;25(3). http://dx.doi.org/10.1029/2010GB003938.

[22] Sleutel S, Cnudde V, Masschaele B, Vlassenbroek J, Dierick M, Van Hoorebeke L, et al. Comparison of different nano- and micro-focus x-ray computed tomography set-ups for the visualization of the soil microstructure and soil organic matter. Comput Geosci 2008;34(8):931–8. http://dx.doi.org/10.1016/j.cageo.2007.10.006.

[23] Cnudde V, Masschaele B, Dierick M, Vlassenbroeck J, Hoorebeke LV, Jacobs P. Recent progress in X-ray CT as a geosciences tool. Appl Geochem 2006;21(5):826–32. http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.02.010.

[24] Vogel H-J, Tölke J, Schulz V, Krafczyk M, Roth K. Comparison of a lattice-Boltzmann model, a full-morphology model, and a pore network model for determining capillary pressure–saturation relationships. Vadose Zone J 2005;4(2):380–8. http://dx.doi.org/10.2136/vzj2004.0114.

[25] Knutson C, Werth C, Valocchi A. Pore-scale simulation of biomass growth along the transverse mixing zone of a model two-dimensional porous medium. Water Resources Res 2005;41(7):W07007. http://dx.doi.org/10.1029/2004WR003459.

[26] Masse D, Cambier C, Brauman A, Sall S, Assigbetse K, Chotte J-L. Mior: an individual-based model for simulating the spatial patterns of soil organic matter microbial decomposition. Eur J Soil Sci 2007;58(5):1127–35. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2389.2007.00900.x.

[27] Long T, Or D. Dynamics of microbial growth and coexistence on variably saturated rough surfaces. Microb Ecol 2009;58(2):262–75. http://dx.doi.org/10.1007/s00248-009-9510-3.
[28] Resat H, Bailey V, McCue LA, Konopka A. Modeling microbial dynamics in heterogeneous environments: growth on soil carbon sources. Microb Ecol 2012;63(4):883–97. http://dx.doi.org/10.1007/s00248-011-9965-x.
[29] Folse III HJ, Allison SD. Cooperation, competition, and coalitions in enzyme-producing microbes: social evolution and nutrient depolymerization rates. Front Microbiol 2012;3. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00338.
[30] Gharasoo M, Centler F, Regnier P, Harms H, Thullner M. A reactive transport modeling approach to simulate biogeochemical processes in pore structures with pore-scale heterogeneities. Environ Model Softw 2012;30:102–14. http://dx.doi.org/10.1016/j.envsoft.2011.10.010.
[31] Monga O, Bousso M, Garnier P, Pot V. 3D geometric structures and biological activity: application to microbial soil organic matter decomposition in pore space. Ecol Model 2008;216(3–4):291–302. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2008.04.015.
[32] Falconer RE, Houston AN, Otten W, Baveye PC. Emergent behavior of soil fungal dynamics: Influence of soil architecture and water distribution. Soil Sci 2012;177(2):111–19. http://dx.doi.org/10.1097/SS.0b013e318241133a.
[33] Chau J, Or D, Sukop M. Simulation of gaseous diffusion in partially saturated porous media under variable gravity with lattice Boltzmann methods. Water Resour Res 2005;41(8). http://dx.doi.org/10.1029/2004WR003821.
[34] Genty A, Pot V. Numerical simulation of 3D liquid-gas distribution in porous media by a two-phase TRT lattice Boltzmann method. Transp Porous Media 2013;96(2):271–94. http://dx.doi.org/10.1007/s11242-012-0087-9.
[35] Ginzburg I. Equilibrium-type and link-type lattice Boltzmann models for generic advection and anisotropic-dispersion equation. Adv Water Resour 2005;28(11):1171–95. http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2005.03.004.
[36] Ginzburg I, Verhaeghe F, d'Humières D. Two-relaxation-time lattice Boltzmann scheme: about parametrization, velocity, pressure and mixed boundary conditions. Commun Comput Phys 2008;3(2):427–78.
[37] Shan X, Chen H. Lattice Boltzmann model for simulating flows with multiple phases and components. Phys Rev E 1993;47(3):1815. http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.47.1815.
[38] Pot V, Hammou H, Elyeznasni N, Ginzburg I. Role of soil heterogeneities onto pesticide fate: a pore-scale study with lattice Boltzmann. In: 1st international conference and exploratory workshop on soil architecture and physico-chemical functions. "CESAR" proceedings. Aarhus University, Research Centre Foulum (DNK); 2010. p. 4.
[39] Hansen S, Shaffer M, Ma L, editors. Modeling carbon and nitrogen dynamics for soil management. CRC Press; 2001 http://dx.doi.org/10.1201/9781420032635.
[40] Jennings DH, Lysek G. Fungal biology: understanding the fungal lifestyle. Bios Sci Publishers Ltd; 1996.
[41] Lobry J, Flandrois J, Carret G, Pave A. Monod's bacterial growth model revisited. Bull Math Biol 1992;54(1):117–22. http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8240(05)80179-X.
[42] Monga O, Garnier P, Pot V, Coucheney E, Nunan N, Otten W, et al. Simulating microbial degradation of organic matter in a simple porous system using the 3-d diffusion-based model mosaic. Biogeosciences 2014;11(8):2201–9. http://dx.doi.org/10.5194/bg-11-2201-2014.
[43] Wang G, Mayes MA, Gu L, Schadt CW. Representation of dormant and active microbial dynamics for ecosystem modeling. PLoS One 2014;9(2):e89252. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089252.
[44] Konopka A. Theoretical analysis of the starvation response under substrate pulses. Microb Ecol 1999;38(4):321–9. http://dx.doi.org/10.1007/s002489900178.
[45] Kemmitt S, Lanyon CV, Waite I, Wen Q, Addiscott T, Bird N, et al. Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass — a new perspective. Soil Biol and Biochem 2008;40(1):61–73. http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.021.
[46] Blagodatsky S, Richter O. Microbial growth in soil and nitrogen turnover: a theoretical model considering the activity state of microorganisms. Soil Bio Biochem 1998;30(13):1743–55. http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00028-5.
[47] Ingwersen J, Poll C, Streck T, Kandeler E. Micro-scale modelling of carbon turnover driven by microbial succession at a biogeochemical interface. Soil Biol Biochem 2008;40(4):864–78. http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.10.018.
[48] FAO. World reference base for soil resources: 2006: a framework for international classification, correlation and communication. FAO; 2006.
[49] Houot S, Clergeot D, Michelin J, Francou C, Bourgeois S, Caria G, et al. Agronomic value and environmental impacts of urban composts used in agriculture. Microbiol Compost 2002:457–72.
[50] Elyeznasni N, Sellami F, Pot V, Benoit P, Vieublé-Gonod L, Young I, et al. Exploration of soil micromorphology to identify coarse-sized OM assemblages in X-ray CT images of undisturbed cultivated soil cores. Geoderma 2012;179:38–45. http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.02.023.
[51] Luxmoore R. Micro-, meso- and macroporosity of soil. Soil Sci Soc Am J 1981;45:671–2.
[52] Dullien FAL. Pore structure. In: Porous media. Elsevier; 1992. p. 5–115.
[53] Vogel H-J. Morphological determination of pore connectivity as a function of pore size using serial sections. Eur J Soil Sci 1997;48(3):365–77. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2389.1997.tb00203.x.
[54] Ohser J, Mücklich F. Statistical analysis of microstructures in material science. New York: Wiley; 2000.
[55] Vogel H-J, Schlüter W. Quantification of soil structure based on minkowski functions. Comput Geosci 2010;36:1236–45. http://dx.doi.org/10.1016/j.cageo.2010.03.007.
[56] Clennell MB. Tortuosity: a guide through the maze. Geol Soc London Spec Publ 1997;122(1):299–344. http://dx.doi.org/10.1144/gsl.sp.1997.122.01.18.
[57] Gommes CJ, Bons A-J, Blacher S, Dunsmuir JH, Tsou AH. Practical methods for measuring the tortuosity of porous materials from binary or gray-tone tomographic reconstructions. AIChE J 2009;55(8):2000–12. http://dx.doi.org/10.1002/aic.11812.
[58] Pinheiro M, Garnier P, Fabrice Martin L, Rapaport A, Beguet J, Vieublé-Gonod L. Impact of distribution heterogeneity of microorganisms and 2,4-D on biodegradation processes in soil: experiment and modelling. In: Conference on pesticide behaviour in soils, water and air. University of York; 2013. p. 2.
[59] Genty A, Pot V. Numerical calculation of effective diffusion in unsaturated porous media by the TRT lattice Boltzmann method. Transp Porous Media 2014;105:391–410. http://dx.doi.org/10.1007/s11242-014-0374-8.
[60] Guyon E, Hulin J-P, L P. Hydrodynamique physique. Savoirs Actuels Inter Editions et Editions du CNRS; 1991.
[61] Pintelon T, Picioreanu C, van Loosdrecht M, Johns M. The effet of biofilm permeability on bio-clogging of porous media. Biotechnol Bioeng 2012;109:1031–42. http://dx.doi.org/10.1002/bit.24381.
[62] Nunan N, Wu K, Young I, Crawford J, Ritz K. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. FEMS Microbiol Ecol 2003;44(2):203–15. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00027-8.
[63] Grundmann G, Dechesne A, Bartoli F, Flandrois J, Chasse J, Kizungu R. Spatial modeling of nitrifier microhabitats in soil. Soil Sci Soc Am J 2001;65(6):1709–16. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00754.x.
[64] Grundmann G, Debouzie D. Geostatistical analysis of the distribution of NH4+ and NO2–oxidizing bacteria and serotypes at the millimeter scale along a soil transect. FEMS Microbiol Ecol 2000;34(1):57–62. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00754.x.
[65] Nguyen C, Guckert A. Short-term utilisation of 14C-[U]glucose by soil microorganisms in relation to carbon availability. Soil Biol Biochem 2001;33(1):53–60. http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00114-0.
[66] Van de Werf H, Verstraete W. Estimation of active soil microbial biomass by mathematical analysis of respiration curves: relation to conventional estimation of total biomass. Soil Biol Biochem 1987;19(3):267–71. http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(87)90008-3.
[67] Stenström J, Svensson K, Johansson M. Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. FEMS Microbiol Ecol 2001;36(2–3):93–104. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00122-2.
[68] Lennon JT, Jones SE. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. Nat Rev Microbiol 2011;9(2):119–30. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2504.
[69] GRC. Handbook of chemistry and physics. 66th ed. Boca Raton, FL: GRC Press; 1986.
[70] Saltelli A, Chan K, Scott EM. Sensitivity analysis, vol. 134. New York: Wiley; 2000.
[71] Lamboni M, Makowski D, Lehuger S, Gabrielle B, Monod H. Multivariate global sensitivity analysis for dynamic crop models. Field Crops Res 2009;113(3):312–20. http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2009.06.007.
[72] Wallach D, Makowski D, Jones JW, Brun F. Working with dynamic crop models: methods, tools and examples for agriculture and environment. Uncertainty and sensitivity analysis. Academic Press; 2013. p. 161–204. [Chapter 5]. http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-397008-4.00005-8.
[73] R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria; 2014. URL http://www.R-project.org/.
[74] Reischke S, Rousk J, Bååth E. The effects of glucose loading rates on bacterial and fungal growth in soil. Soil Biol Biochem 2014;70:88–95. http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.011.
[75] Don A, Rödenbeck C, Gleixner G. Unexpected control of soil carbon turnover by soil carbon concentration. Environ Chem Lett 2013;11(4):407–13. http://dx.doi.org/10.1007/s10311-013-0433-3.
[76] Schjonning P, Thomsen IK, Petersen Sr O, Kristensen K, Christensen BT. Relating soil microbial activity to water content and tillage-induced differences in soil structure. Geoderma 2011;163(3–4):256–64. http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.04.022.
[77] Kim HJ, Boedicker JQ, Choi JW, Ismagilov RF. Defined spatial structure stabilizes a synthetic multispecies bacterial community. Proc the National Acad Sci 2008;105(47):18188–93. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0807935105.
[78] Chenu C, Hassink J, Bloem J. Short-term changes in the spatial distribution of microorganisms in soil aggregates as affected by glucose addition. Biol Fertil Soils 2001;34(5):349–56. http://dx.doi.org/10.1007/s003740100419.
[79] Ruamps LS, Nunan N, Chenu C. Microbial biogeography at the soil pore scale. Soil Biol Biochem 2011;43(2):280–6. http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.010.
[80] Shaw L, Beaton Y, Sousa S, Glover L, Killham K, Meharg A. Mineralisation of 2,4-dichlorophenol and glucose placed into the same or different hydrological domains as a bacterial inoculant. Soil Biol Biochem 2002;34(4):531–9. http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00212-7.
[81] Ruamps LS, Nunan N, Pouteau V, Leloup J, Raynaud X, Roy V, et al. Regulation of soil organic C mineralisation at the pore scale. FEMS Microbiol Ecol 2013;86(1, SI):26–35. http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12078.

Advances in Water Resources 84 (2015) 87–102

Contents lists available at ScienceDirect

Advances in Water Resources

journal homepage: www.elsevier.com/locate/advwatres

Three-dimensional distribution of water and air in soil pores: Comparison of two-phase two-relaxation-times lattice-Boltzmann and morphological model outputs with synchrotron X-ray computed tomography data

V. Pot[a,*], S. Peth[b], O. Monga[c], L.E. Vogel[a], A. Genty[d], P. Garnier[a], L. Vieublé-Gonod[a], M. Ogurreck[e], F. Beckmann[e], P.C. Baveye[a,f]

[a] INRA, AgroParisTech, UMR 1402 ECOSYS, Thiverval-Grignon F-78850, France
[b] Department of Soil Science, University of Kassel, Nordbahnhofstr. 1a, Witzenhausen D-37231, Germany
[c] UMMISCO-Cameroun, UMI 209 UMMISCO, University of Yaoundé, IRD, University of Paris 6, Bondy Cedex F-93143, France
[d] CEA Saclay, DEN/DANS/DM2S/STMF/LATF, Gif-sur-Yvette F-91191, France
[e] Institute of Materials Research, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Max-Planck-Str. 1, D-21502 Geesthacht, Germany
[f] Laboratory of Soil and Water Engineering, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, New York 12180, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 April 2015
Revised 6 August 2015
Accepted 11 August 2015
Available online 18 August 2015

Keywords:
Pore-scale
Synchrotron X-ray micro CT
Soil air-water interfaces
Lattice Boltzmann model
Morphological model

ABSTRACT

Recent progress in the understanding of soil microbial processes at micrometric scales has created a need for models that accurately predict the microscale distribution of water, and the location of air–water interfaces in pores. Various models have been developed and used for these purposes, but how well they fare against real data has yet largely to be determined. In this context, for the first time, this article compares the prediction of two of these models to experimental data obtained on soil material. The distribution of water and air in soil samples constituted of repacked aggregates, equilibrated at three matric potentials (−0.5 kPa, −1 kPa and −2 kPa), was measured via synchrotron X-ray computed tomography at a resolution of 4.6 μm. Water distribution was simulated by a two-phase lattice Boltzmann model (LBM) and a morphological model (MOSAIC). Results indicate that, when one lifts the assumption, motivated by capillary theory, that a pore can drain only if a connecting pore is already full of air, MOSAIC gives an acceptable approximation of the observed air–water interfaces. However, discretization of pores as geometrical primitives causes interfaces predicted by MOSAIC to have nonphysical shapes. By contrast, LBM is able to predict remarkably well the location of air–water interfaces. Nevertheless, given the huge difference in computing time (minutes versus tens of hours) required to run these two models, it is recommended that further research be carried out on the development of both, in parallel.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Over the last decade, a significant body of work has been devoted to the response of soils, and especially of the vast stock of organic matter they contain, to changing climatic boundary conditions or to different agricultural practices. In that context, it has become increasingly clear that detailed knowledge is required of the different physical, (bio)chemical, and biological parameters that determine the activity of microorganisms at the microscopic scale. The demand for this information is not new. Several soil microbiologists have pointed it out already for more than half a century [1]. However, not much could be done by way of a response until roughly 15 years ago, when significant technological breakthroughs allowed the geometry of the pore space in soils to be visualized, and the spatial heterogeneity of a number of chemical and mineralogical constituents of soils to be quantified at micrometric scales commensurate with fungal hyphae and even the most minute of bacteria or archaea [6–9,40,48].

The availability of such microscopic-scale data, combined with the anticipation of further advances in the very near future in terms of both laser and X-ray technologies opening up even brighter prospects, has prompted researchers to develop an array of sophisticated models at the pore scale. Among them, lattice-Boltzmann models (LBM) [20,29] are able to describe water, solute, and particulate transport in the interstitial space of soils, as well as the shape of

* Corresponding author. Tel.: +33 1 30815402; fax: +33 1 30 815396.
E-mail address: vpot@grignon.inra.fr (V. Pot).

http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2015.08.006
0309-1708/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

air-water interfaces [13,53], without having to invoke the kind of simplifying assumptions about the geometry or topology of soil pores that were typical of earlier generations of models, based on traditional partial differential equations or capillary network idealizations. Similarly, agent- or individual-based models describe quantitatively the growth and metabolism of microorganisms much more realistically than traditional models, based on descriptions of population dynamics, and are able to account in great detail for the effects of the relative spatial distributions of fungi [13], bacteria [15,18,27,30], and the organic matter on which they feed. At the moment, the development of each of these different models is moving forward, in parallel with interdisciplinary efforts to combine them in order to describe various types of micro-scale scenarios and assess the nature of emergent properties of soil systems [13].

As with any type of modeling, part of the work of developing microscopic-scale models of soil processes consists of ensuring that model outputs are adequately approximating the reality they purport to represent. This is particularly important in the case of the spatial distribution of the aqueous phase in the pore space, because this distribution directly impacts the connectivity of liquid-filled pores as well as the rate and extent of air flow, all of which in turn influence directly the distribution and activity of microorganisms. A possible first step to assess the adequacy of a particular model to simulate water distribution in the soil pore space is to compare the results with other models, to make sure that there is general consistency among various alternative descriptions. Vogel et al. [51], for example, compare the outputs of pore network and morphology models with the predictions of a lattice-Boltzmann code, based on structural data relative to a homogeneous sintered borosilicate glass sample. Ideally, however, a further step in the evaluation of a given model should involve the comparison of model outputs to experimental data. Sukop et al. [46] measured the distribution of non-miscible phases in columns of quartz sand at a resolution of 20 μ m, and tried to simulate the results with a multicomponent, multiphase LBM. The outcome is generally satisfying, in terms of bulk concentrations of the different phases, even though detailed analysis of individual pores reveals numerous discrepancies between simulations and observations. A similar exercise has yet to be carried out with an actual soil sample, however.

The fact that attenuation of X-rays by water is quantitatively not very different from that by organic matter makes it very difficult experimentally to distinguish water from soil constituents under many circumstances. To palliate this difficulty, some authors have used other liquids, like decane, instead of water [43], or doped Soltrol, a NAPL, with a marked contrast with water [3], or they have added various contrast agents to the water, to modify its X-ray attenuation [46,49]. Another option is to work with porous media that do not contain any organic matter. For example, Brusseau et al. [10] and Culligan et al. [12] show air-water interfaces in 3D computed tomography (CT) images of repacked sand and glass beads, respectively, at a resolution of about 12 μm using synchrotron X-ray CT. More recently, Andrew et al. [4] show detailed air-water interfaces and are able to successfully measure contact angle of CO_2-brine interfaces onto the solid surface of limestone at a small resolution of 2 μm.

Working with a real soil material, Carminati et al. [11] adopt yet another approach, in that they focus on the water that occupies part of the volume in larger pores, located between aggregates. They are able under these conditions to clearly observe pendular rings of water between two clay-loam soil aggregates at a resolution close to 6 μm. Tippkötter et al. [47] adopt a similar focus, in undisturbed soil samples, and are able with a table-top X-ray CT scanner to visualize the presence of water films coating the inner surfaces of meso- and macropores. These data obtained by Carminati et al. [11] and Tippkötter et al. [47], or equivalent CT data obtained in other soils, could in principle be used to assess whether existing pore-scale models of water distribution in soils are adequate.

In this general context, a first objective of the research reported in the present article was to obtain a new set of 3D images of air-water interfaces at a few μm resolution at defined matric potentials in a material constituted of repacked soil aggregates. A second objective was to simulate air-water distribution in this material using two mathematical models to find out which approach is the most promising in order to describe quantitatively the retention of water in soils. The two models, namely a two-relaxation-times (TRT) lattice-Boltzmann model, and the pore morphology model of Monga et al. [35], were chosen because of their contrasting features. The former model is capable of describing very realistically the physics of phase separations, as well as the hydrophobic or hydrophilic properties of the soil solid phase [20] but it presents the relative disadvantage of being very demanding in terms of computational resources. By contrast, the far simpler morphology-based model provides a compact description of pore space and has lower computational costs, but it presents the possible drawback of relying on a simplified description of soil physical laws.

2. Material and method

2.1. Soil preparation

Soil samples were obtained in the La Cage field site (Versailles, France) from the surface horizon of a silt loamy Albeluvisol [14] with 17% clay, 56% silt and 27% sand. The soil was passed through a 2 mm sieve, and soil aggregates between 2 and 3.15 mm in size were collected from the coarse fraction. The gravimetric moisture content of the aggregates was adjusted at 0.205 $kg\,kg^{-1}$, which was hypothesized to amount to 80% of 'field capacity' (defined by a matric potential of −32 kPa or pF=2.5). The aggregates were then packed uniformly at a bulk density of 1200 $kg\,m^{-3}$ into cylinders, 50 mm in diameter and 40 mm high. The resulting soil columns were subsequently sawed to about 8 mm thick slices. Nine $6 \times 6 \times 8$ mm^3 soil cubes were sampled out of each slice with the help of a razor blade in order to minimize disturbance during cutting. The samples were stored in a cold chamber at 4°C before further processing.

2.2. Miniaturized suction device

We developed a miniaturized experimental suction device to equilibrate the small soil cubes at fixed matric potentials close to water saturation. The design was specifically conceived to enable measurements at the Synchrotron radiation microtomography (SR-μCT) facility. Nine syringes, 1 cm in diameter, were half-filled with 90−125 μm-diameter glass beads, and subsequently connected at the bottom end to a hanging water column. Each soil cube was placed on top of the glass beads in a syringe and after matric potential was equilibrated, the sample was secured in place with a parafilm pellet to prevent any movement during scanning. After that, the syringes were sealed at the top with parafilm. The volume of the air phase above the soil cubes was thus kept as small as possible to prevent evaporation during the tomography scans.

The soil cubes were first equilibrated at a matric potential of -2 kPa for two days using de-aired water. Then, all soil cubes were slowly saturated and were kept equilibrated at 0 kPa for 1 h in order to remove residual entrapped air. The time duration of this process was initially longer but several cubes collapsed and the whole procedure was repeated with new cubes for a shorter time. Then the syringes, in series of three, were directly equilibrated at specific matric potentials of −0.5 kPa, −1 kPa, and −2 kPa, respectively, for 24 h. For scanning, the syringe was detached from the hanging water column after closing a valve at its bottom tip. Thus, each soil cube was imaged at only one matric potential, with three replicates for each matric potential.

2.3. SR-μCT scans

Microtomography measurements were carried out at the SR-μCT facility operated by the GKSS Research Centre at HASYLAB (Hamburger Synchrotron Strahlungslabor) belonging to the DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron) in Hamburg, Germany. The injected beam is monochromatized by a double crystal monochromator producing a parallel beam with a specific X-ray energy (in this case 30 keV). Aggregate projections (cubes) were recorded by a CCD camera in 0.2° steps with rotations from 0 to 180°. The achieved voxel resolution after reconstructing the image projections was 4.6 μm.

2.4. Image pre-processing and analysis

Prior to image analysis and modeling, the reconstructed image datasets were preprocessed using the software package ToolIP with MAVIkit [16,17]. First, inscribed cubic subvolumes were extracted to avoid boundary effects at the edges of the sample. The size of the resulting images of about 900 × 900 × 500 voxels was unfortunately too large to carry out LBM computations using the computers at our disposal. Given the fine resolution of the raw data and the fact that our focus was primarily on interaggregate porosity, we opted to decrease the resolution of the images by a factor of two. All image analyses and modeling were thus performed on images with a voxel resolution of 9.2 μm. To reduce image noise, a rank order median filter was applied. The filter sorts the values of voxels covered by a filter mask (in our case a 3 × 3 × 3 voxel size mask was used) and assigns the median to the considered (central) voxel. To segment the matrix from the detectable pore space a global threshold value was automatically calculated according to Otsu [39] from the gray value histogram by maximizing the intra-class variance of the matrix and pore classes while minimizing the gray value variances within the two classes. The threshold to segment the water- and gas-filled pore regions was selected at the minimum between the two distinct peaks.

The relative fractions of the three phases (gas, water, matrix) were subsequently calculated based on the number of voxels corresponding to each phase. Porosity was calculated as the sum of the relative fractions of gas and water and the water saturation index, S_w, was equal to the ratio of the relative fraction of water over porosity. Following a procedure suggested by Vogel et al. [52], the pore size distribution (PSD) of the cubes was calculated by a morphological opening of the pore space (i.e., successive erosion and dilation) using 3D spherical structuring elements of increasing radius (from 5 to 45 voxels corresponding to 23 to 207 μm). We used the Minimum 3D and Maximum 3D filters of ImageJ software [37] to perform erosion and dilation. Air–water triangulated isosurfaces were generated by the Isocontour tool of ParaView [2] from the extracted 3D data containing the segmented air phase of the images. The surface area was then simply calculated by integration and translated into physical units of mm^2 via multiplication with the squared voxel resolution.

2.5. Two-phase TRT lattice-Boltzmann model

We used the two-phase single-component two-relaxation-times (TRT) lattice-Boltzmann model because it has intrinsically higher stability, and therefore is better able than single-relaxation-time schemes to simulate spontaneous phase separation in pore spaces with complex 3D geometries [20]. Such a single-component LBM would not be able to describe two-phase flow displacements with viscous forces representative of an air–water system, but it is nevertheless adequate to describe static conditions of systems at equilibrium, like those in our experiments. Phase separation is simulated by incorporating attractive fluid–fluid short-range interactions to simulate surface tension forces [44,45] and attractive or repulsive fluid–solid interactions [29,42] to simulate hydrophilic or hydrophobic surfaces.

A lattice-Boltzmann model describes a fluid as a collection of fictitious particles that, alternatively, propagate from node to node on a regularly spaced grid, then collide with the particles that end up on the same nodes. The probability of finding a particle at position $\vec{r}$, in one of the microscopic directions envisaged within the lattice, and time t is denoted by $f_q(\vec{r},t)$, where the subscript q is an index associated with the set of microscopic directions. A typical discretization of space is $D3Q19$, in 3 dimensions and with 18 nearest neighbors considered around each node, described by the unit microscopic velocity vectors, $\vec{c}_q$. In this case, the subscript q takes on 19 different values (including rest particles).

The mathematical formulation of the model is based on the TRT Boltzmann evolution equation, which describes the relaxation of the probability density function f_q to prescribed equilibrium functions $e_q^{\pm}$ [20,22] and is given by:

$$
\begin{aligned}
&f_q(\vec{r}+\vec{c}_q,t+1) = f_q(\vec{r},t) + \lambda_e n_q^+ + \lambda_o n_q^- + S_q^-,\ \ q=0,\ldots,Q-1\\
&n_q^{\pm} = f_q^{\pm} - e_q^{\pm},\ \ f_q = f_q^+ + f_q^-,\ \ f_q^{\pm} = \tfrac{1}{2}(f_q \pm f_{\bar{q}}),\\
&\vec{c}_{\bar{q}} = -\vec{c}_q,\ \ \vec{c}_0 = \vec{0},\ \ f_0 = f_0^+,\ \ f_0^- = 0,
\end{aligned}
\tag{1}
$$

The equilibrium functions are given by:

$$
\begin{aligned}
&e_0^+ = e_0 = \rho - \sum_{q=1}^{Q-1} e_q^+,\ \ e_q^+ = t_q^* c_s^2 \rho,\ \ q=1,\ldots,Q-1,\\
&e_q^- = t_q^* \vec{J}\cdot\vec{c}_q,\ \ q=0,\ldots,Q-1,
\end{aligned}
\tag{2}
$$

where ρ and $\vec{J}$ are the macroscopic mass density and momentum flux defined from the local probability density functions f_q along:

$$
\rho = \sum_{q=0}^{Q-1} f_q,\ \ \vec{J} = \sum_{q=0}^{Q-1} f_q \vec{c}_q \tag{3}
$$

Finally, $\vec{F}_G$, $\vec{F}_W$ and $\vec{F}_g$ are body forces designed to simulate fluid–fluid, solid–fluid forces and gravity, respectively. They are computed in the source term of the TRT Boltzmann evolution equation, S_q^-.

$$
\begin{aligned}
&S_q^- = t_q^*\left((\vec{c}_q\cdot\vec{F}_G) + (\vec{c}_q\cdot\vec{F}_W) + (\vec{c}_q\cdot\vec{F}_G)\right)\\
&\vec{F}_G = -\psi(\vec{r},t)\textstyle\sum_q t_{Gq}^* G\psi(\vec{r}+\vec{c}_q,t)\vec{c}_q,\ \ \psi(\vec{r},t) = 1-\exp(-\rho(\vec{r},t))\\
&\vec{F}_W = -\psi(\vec{r},t)\textstyle\sum_q t_{Wq}^* Ws(\vec{r}+\vec{c}_q,t)\vec{c}_q,\ \ s=\{0,1\}\ \text{if}\ \vec{r}=\{\text{fluid, solid}\}\\
&\vec{F}_g = -\rho F_z\vec{z},\ \ g = F_z
\end{aligned}
\tag{4}
$$

The parameters $G<0$, W and F_z control the attractive interaction strength, the hydrophobicity of the solid surface and the gravity strength, respectively, whereas g is the gravitational acceleration of the lattice Boltzmann.

Assuming that c_s^2 is an independent parameter (set to 1/3), the isotropic weights, t_q^*, for the 3D nineteen-velocities model (D3Q19) used in this study are as follows: $t_I^* = 1/6$, $t_{II}^* = 1/12$, where the Roman numbers are equal to $||\vec{c}_q||^2$, so that the t_I^* apply to orthonormal directions and t_{II}^* to diagonal directions. The weights, t_{Wq}^* and t_{Gq}^* are chosen as: $t_{W,0}^* = t_{G,0}^* = 0$, $t_{W,I}^* = t_{G,I}^* = 2$, $t_{W,II}^* = t_{G,II}^* = 1$ [42].

Stability conditions of the model impose that the functions Λ_e and Λ_o of the two eigenvalues, λ_e and λ_o, of the TRT collision operator be positive [22]:

$$
\begin{aligned}
&\Lambda_e = -(\tfrac{1}{2}+\tfrac{1}{\lambda_e}),\ \Lambda_o = -(\tfrac{1}{2}+\tfrac{1}{\lambda_o})\\
&\Lambda_{eo} = \Lambda_e\Lambda_o,\ -2<\lambda_e,\lambda_o<0
\end{aligned}
\tag{5}
$$

The parameterization of the model was done according to Genty and Pot [20]. The eigenvalue, λ_e was fixed by an arbitrarily value of

the kinematic viscosity, $\nu = 1/6$ along $\nu = (1/3)\Lambda_{eo}$, for the case of incompressible Stokes flow. The eigenvalue, λ_o was calculated from a fixed value of $\Lambda_{eo} = 3/16$.

We used a value of $G = -0.16$ that provides an interface thickness of three nodes of the lattice [20] and selected a value of $W = 0.15$ in order to match the fully-wetting fluid conditions (zero contact angle between liquid and solid phases).

The grid of the lattice-Boltzmann model was directly superimposed to the segmented voxels of the 3D SR-μCT images. However, to save computational and memory costs, the calculations were performed only on the nodes of the lattice that were associated with an interstice in the soil.

The liquid–gas distribution was simulated by fixing an initial homogeneous density, ρ_i on all the fluid nodes, as spontaneous phase separation is expected to be initiated from interactions with the solid walls. The initial density, ρ_i, was calculated for each different matric potential from the mass balance equation:

$$\rho_i = (\rho_l - \rho_g)S_w + \rho_g \tag{6}$$

where ρ_g and ρ_l are the density of the gas and liquid phases, ($\rho_g = 0.03\ mu\,lu^{-3}$ and $\rho_l = 2.42\ mu\,lu^{-3}$ [20]), respectively, and S_w is the water saturation index of each segmented SR-μCT images.

Bounce-back conditions were applied at solid boundaries. Since some pores were cut by the edges of our images, we applied hydrophobic conditions ($W = 0$) at the boundary voxels that contained air in the SR-μCT data in order to simulate realistic liquid–gas distributions. Hydrophilic conditions ($W = 0.15$) were applied elsewhere.

As discussed in [20], we hypothesized that spontaneous phase separation can yield realistic air-water distribution in complex 3D porous medium if the pore space is fully connected. Genty and Pot [20] demonstrated that for the same fixed water saturation, the two-phase LBM can fill two pores of different sizes with water and air differently, depending on whether or not they are connected. If they are not connected, both pores contain air, whereas if they are connected, air is preferentially found in the largest pore as one would expect from capillary theory. The Shan–Chen LB model thus provides static liquid–gas distribution that can be compared directly with the air-water distribution observed in the 3D SR-μCT images.

2.6. MOSAIC model

In this approach, we approximate the pore space in the soil by a network of so-called volume primitives [33,36], i.e., simple geometric shapes that can be transformed at will and combined to represent more complex geometries. To do so, we use a geometrical algorithm based on Delaunay triangulation to determine the maximal balls of the pore space segmented from the 3D CT images. Maximal balls are defined as the balls included in the pore space but not included in any other ball included in pore space. Then, we extract a minimal set of the maximal balls in order to obtain a compact representation of the pore space [34].

A mathematical graph is associated with the minimal set of maximal balls. Each node of the graph or ball B_i is assigned as many features, $f_{k,i}$, as desired to describe the physical, biological and chemical states of the ball [34], where the subscript k indexes the various features. In this study, we defined one parameter that quantifies the hydration status of each ball. Any given ball B_i can be either full of water ($f_{1,i} = 1$) or empty (full of air, $f_{1,i} = 0$).

Initially, all nodes are filled by water ($f_{1,i} = 1$ for all balls B_i). The final water content distribution is simulated by an iterative drainage procedure, following [50]. In this procedure, the Young–Laplace equation defines the equivalent maximum radius, r_{eq} [m], of the pores that are filled with water at a fixed matric potential, Ψ [kPa]:

$$\Psi = \frac{2\sigma cos(\theta)}{r_{eq}} \tag{7}$$

where σ is the surface tension of water in contact with air [$N\,m^{-1}$], θ is the contact angle of water on the solid surface, considered in this study to be zero for a fully wetting fluid.

The original version of the MOSAIC program assumes that balls can empty only if their radius is larger than a threshold value r_{eq} and if they are connected to the air phase, through wider balls that have already emptied. At each step in the computation, an iterative search is carried out for balls of radius larger than r_{eq} and in contact with a ball full of air. Balls that meet these requirements are then emptied. The iterative procedure is stopped when equilibrium is reached [34]. In a slightly altered version of the program, this condition on the emptying of balls is lifted. As long as the minimum radius requirement is satisfied, balls are allowed to empty even if they are not connected to a neighboring empty pore.

In fine, like the TRT LBM model, the MOSAIC model also yields spatial static liquid–gas distributions in the soil, which can be directly compared to the air-water distributions observed in the 3D SR-μCT images.

2.7. Pore-scale modeling of air–water interfaces

Since the main objective of this work was to assess, through comparison with CT data, the ability of two different modeling approaches to simulate the distribution of air and water in soils at the pore scale, we chose to focus on single pores to carry out a detailed analysis of model predictions. We selected one cube each out of the series at -2 kPa and -1 kPa (cubes bkk03a and bkk04a respectively) on which we performed the simulation of the air-water distribution with the two models. The segmented images were used directly as input data of the pore space for the LBM model whereas a Delaunay triangulation was performed on them by MOSAIC. We observed that the interaggregate porosity consisted of several unconnected pores. The disconnection was due to unresolved microporosity in the SR-μCT tomography datasets. We thus performed the numerical calculations on connected pores by selecting sub-images containing connected porosity only.

To account for the spatial agreement of the position of the menisci between simulations and measurements, the mean absolute error, MAE, was calculated as follows:

$$\mathrm{MAE} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}|s_i - m_i| \tag{8}$$

where the summation is taken over all pore voxels n, and s_i and m_i are the thresholded densities of the voxels for the simulated and measured images respectively.

3. Results and discussion

3.1. SR-μCT scans

As was also found by Tippkötter et al. [47] and generally unlike in the case of images obtained with table-top, polychromatic X-ray computed tomography scanners [5,23–25], the histograms of the 3D SR-μCT images of the soil samples display three distinct peaks (Fig. 1). The height of the peaks in different images cannot be compared to each other, since the sizes of the SR-μCT images differ among samples, but the relative frequencies of each gray level are directly comparable. The attribution of two of the peaks, respectively the leftmost and the rightmost ones, to air and to the mineral components of the matrix (including unresolved pores in the latter case) is straightforward. The middle peak could in principle correspond to either water or organic matter, and caution is therefore warranted to reach a correct interpretation. In some cases, the use of a contrasting agent may be able to tease apart water-filled voxels from those that contain organic matter. However, a preliminary test with one such contrasting

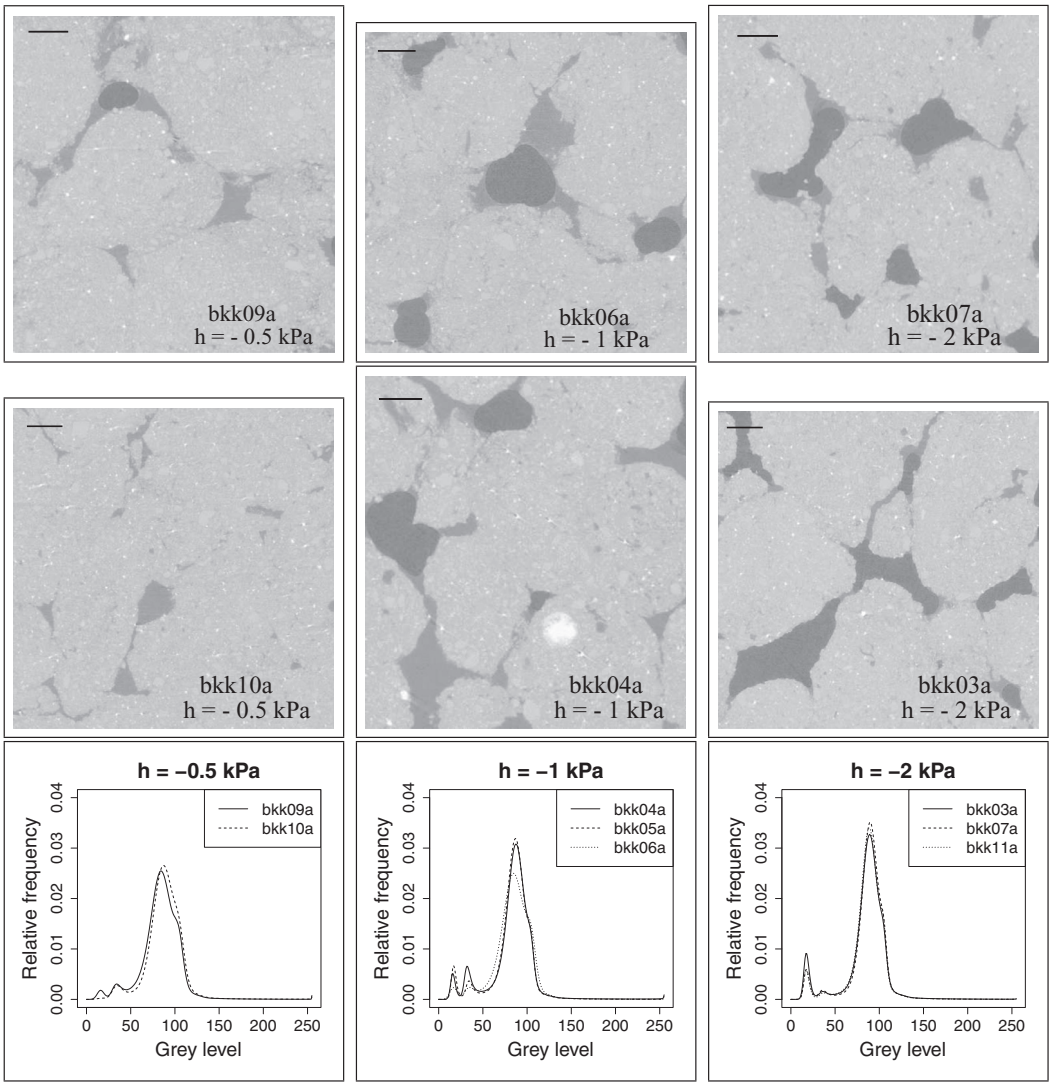


Fig. 1. 2D sections of SR-μCT images of the cubes at the three different matric potentials: −0.5 kPa (left), −1 kPa (middle) and −2 kPa (right) and histograms of the 3D SR-μCT images of each cube (bottom figures). In the tomographic sections, black is the air phase, dark gray is the water phase and light gray to white is the matrix phase. The scale bars represent 500 μm.

agent (KI) indicated that soil structure was significantly modified by it, and that approach was not adopted subsequently. Instead, we assumed as a working hypothesis that all voxels having gray values in the range of the middle peak are indicative of the presence of water, as long as morphological characteristics suggest otherwise.

In all samples, water menisci were clearly visible in the macropores of the soil samples as depicted in Fig. 1, and visual comparison of the original and segmented images, respectively, suggests that the separation of the phases appears reasonable (Fig. 2). Nevertheless, in one sample (bkk09a, data not shown), the segmentation algorithm classified as liquid phase what appears morphologically to be a large piece of organic matter. This pore region was not part of the selected regions of interest used subsequently for the comparison of the modeling results and the SR-μCT data.

The porosity values calculated in the SR-μCT images are 0.08 ± 0.02, 0.11 ± 0.02 and 0.09 ± 0.02 at matric potentials of −0.5 kPa, −1 kPa, and −2 kPa, respectively (Table 1). These porosity values correspond to the porosity that can be seen at the resolution of the SR-μCT images, and therefore includes only part of the porosity of the soil samples, which hereafter will be referred to as mesoporosity according to Luxmoore's classification [28]. The mesoporosity seems to increase slightly as the matric potential decreases, although there is some scatter in the data since one of the cubes (bkk09a) at $h = -0.5$ kPa has a higher porosity. In the latter sample, we observed a piece of organic matter, which was ill-identified as liquid phase by the segmentation algorithm, as mentioned previously. With the particulate organic matter considered as solid phase, the mesoporosity drops by 2%. The trend of mesoporosity being inversely related to the matric potential is confirmed by visual inspection of the original grayscale images, which suggest that the largest macropores are located in the cubes equilibrated at −1 and −2 kPa, compared to the samples equilibrated at −0.5 kPa (Fig. 3).

Table 1
Matric potential, h, porosity, ϵ, and water saturation index, S_w, of the eight SR-μCT images.

Sample	h (kPa)	ϵ (−)	S_w (−)
bkk03a	−2	0.10	0.28
bkk07a	−2	0.08	0.38
bkk11a	−2	0.07	0.35
bkk04a	−1	0.13	0.72
bkk05a	−1	0.10	0.53
bkk06a	−1	0.09	0.71
bkk09a	−0.5	0.09	0.81
bkk10a	−0.5	0.06	0.99

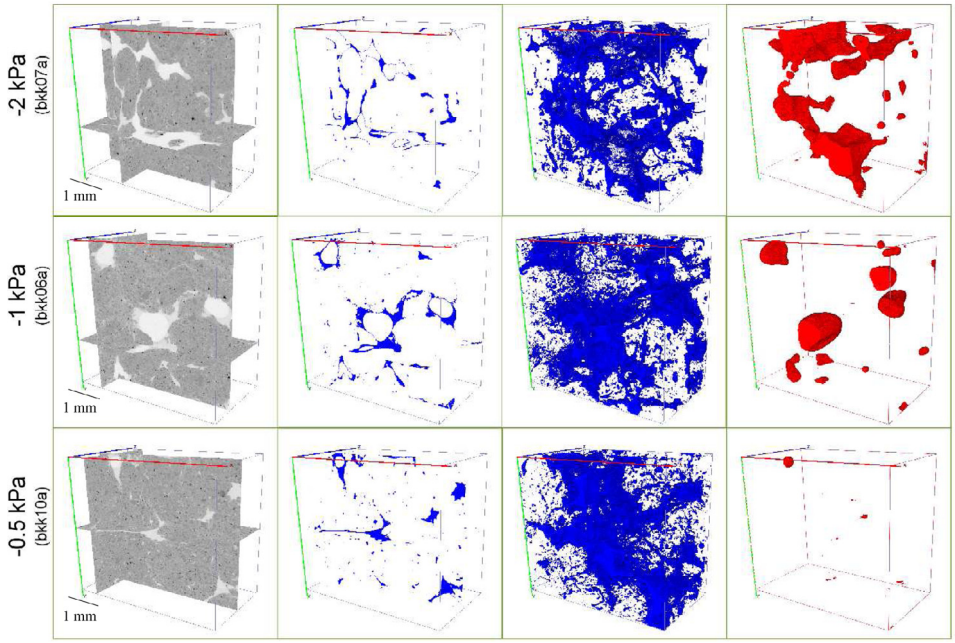


Fig. 2. Images of the soil matrix and segmented water and gas phases for selected samples at different matric potentials. From left to right: cross-sectional views of original density maps (shown as gray values with white for the lowest and black for the highest density, respectively); cross-sectional views of water configuration for the same sections; 3D distribution of all water filled pore spaces; 3D distribution of the gas phase. The voxel dimensions of the three reconstructed images, from top to bottom, are 428 × 451 × 258, 462 × 458 × 256 and 489 × 474 × 257.

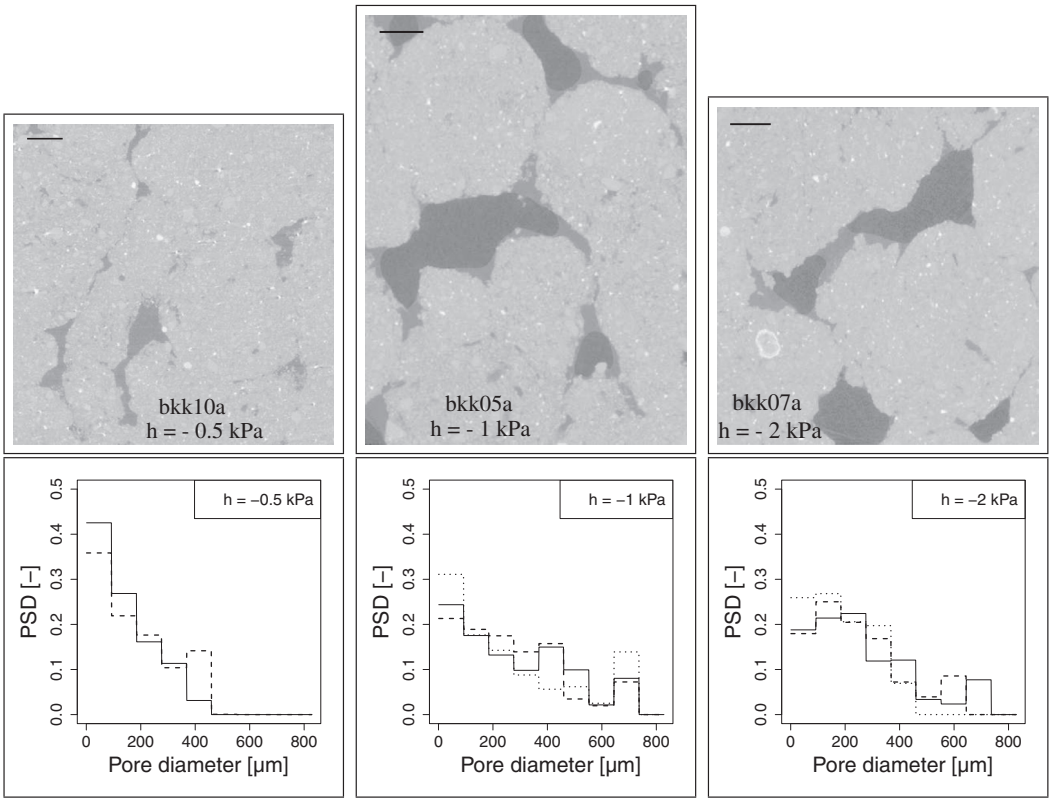


Fig. 3. Top: 2D sections of SR-μCT images chosen among three cubes showing the largest interaggregate macropores observed (cubes bkk10a: −0.5 kPa, bkk05a: −1 kPa and bkk07a: −2 kPa from left to right, respectively). The scale bars represent 500 μm. Bottom: PSD curves of all cubes calculated after each morphological opening. Pore diameter is the diameter of the 3D structuring element. The dashed, dotted, and solid lines in the graphs are associated with the different replicate samples.

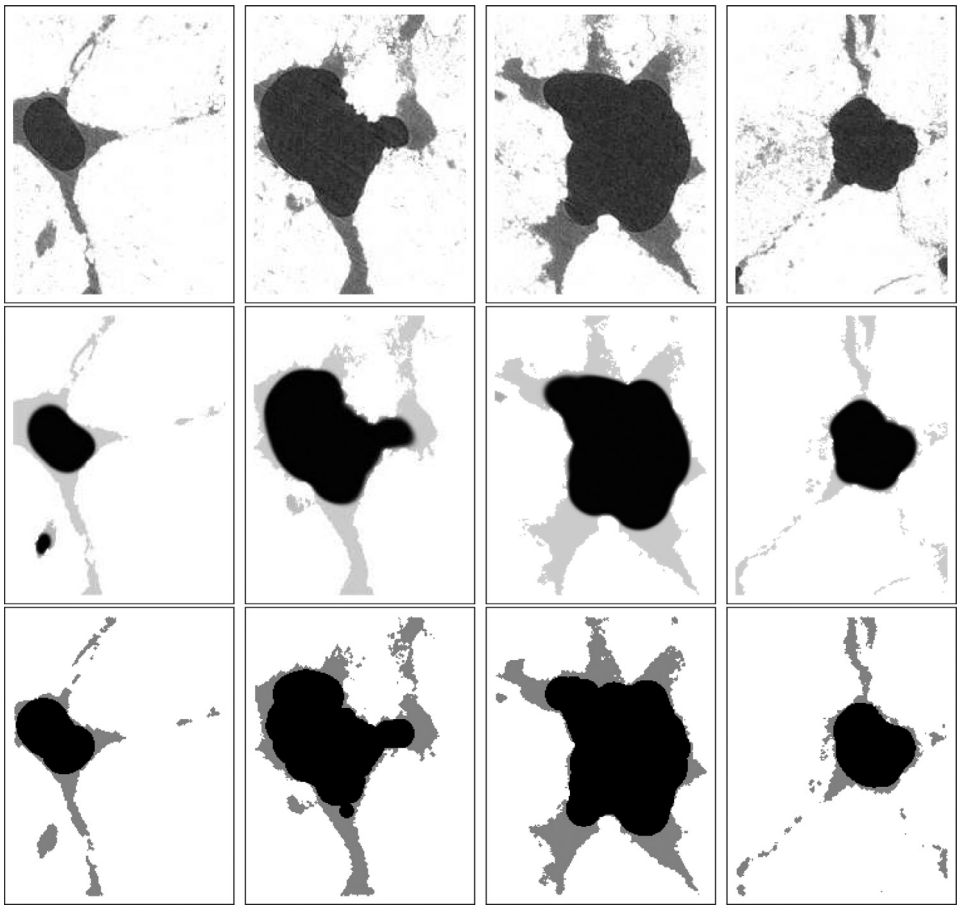


Fig. 4. Comparison between SR-μCT (first row), LBM (second row) and MOSAIC (fourth row) of the air-water distribution in the connected pore space of ROI p1bkk04a at different vertical sections $z = 22$, 64, 106 and 148 (from left to right). The water saturation index of the pore is 0.45. Solid phase is in white, water is in light gray and air is in black.

These visual observations are confirmed by a pore size distribution analysis, where, following Vogel et al. [52], small- to large-diameter pores are successively removed (Fig. 3). The pore space of cubes equilibrated at a matric potential of −0.5 kPa consisted predominantly of pores with diameters smaller than 460 μm, with about 39% of the pore space corresponding to pores with diameters between 0 and 92 μm. In contrast, a more homogeneous pore size distribution was observed for the lower matric potentials, with a lower percentage, (22 ± 5%) of pores smaller than 92 μm in diameter. Except for one cube (bkk11a, $h = -2$ kPa), where no pores with diameters larger than 460 μm were found, the relative volume fraction of larger pores was 16 ± 5 %.

There may be various reasons for these observations. The most obvious one may be that the two samples for the −0.5 kPa matric potential (bkk09a and bkk010a) collapsed slightly during the initial saturation while this was not the case for the other six samples used for lower matric potentials, which would be a coincidence. On the other hand given the low bulk density ($\rho_b = 1200\,\mathrm{kg\,m^{-3}}$) at which aggregates were packed initially, it is also possible that capillary forces between aggregates caused a rearrangement of their geometrical configuration, possibly leading to a local opening of larger pores. This could have led to changes in connectivity of the pore space during desaturation. It is hard to imagine that this mechanism would play a significant role as one would expect instead that capillary forces would pull aggregates together.

Another potential explanation for the observed structural changes may be that aggregates were shrinking to some extent as samples were drained, thus resulting in an increased pore size of the inter-aggregate pore volume. But pore diameters that would drain at −1 and −2 kPa should be in the order of 300 to 150 μm so that probably only a small fraction of intraaggregate pores were drained at all. Regardless of the exact mechanisms that may have resulted in the observed structural changes, these have no bearing on the comparison of models, since both models take the pore space geometry as it was measured, at each individual matric potential, handled separately.

In the SR-μCT images, almost all macropores were full of water at the highest matric potential (−0.5 kPa), and only a small proportion of the pore voxels were filled with air. In one of the samples, some air bubbles were found (bkk09a, Figs. 1 and 2), suggesting that the samples probably contained small amounts of entrapped air, which was not completely removed during saturation. In all samples, macropores progressively filled with air when the matric potential was lowered to −2 kPa, as confirmed by the increase of the relative frequency of air voxels (Fig. 1). At a matric potential of −1 kPa, macropores were approximately equally filled with water and air while at a matric potential of −2 kPa the air-filled pore space exceeded the water-filled pore space. These observations are in line with the calculations of the average water saturation, S_w, which decreases from 0.90 ± 0.13 for h=−0.5 kPa, to 0.65 ± 0.11 for h=−1 kPa, and finally to 0.34 ± 0.05 for h=−2 kPa (Table 1) in agreement with the image histograms (Fig. 1).

The mechanism by which the large pores partially emptied of water as the matric potential was decreased is relevant in the context of the comparison of the two different modeling approaches. Mass flow of the air phase, invading the large pores, would be consistent with the observation of a change in the geometry of the aggregates,

and of an opening up of the interstices between them when matric potential was decreased. Although we cannot fully explain the responsible mechanism, the PSD curves suggest the creation of macropores with decreasing matric potential (Fig. 3). Aggregates may have moved relative to each other by capillary forces, and thus they may conceivably have enabled air to squeeze in on its way to finding a new stable arrangement. However, if passages large enough existed, they must have closed back down, because when one looks at the full sequence of 2D cross-sections constituting the 3D image, large pores seem surrounded on all sides by small pores, which remained filled with water even at the lowest matric potential, and therefore should not have allowed mass flow of air in the state when the sample was in equilibrium with the applied matric potential. Again, the PSD curves depicted a reduction by half of the pore volume occupied by pores of an equivalent diameter inferior to 92 μm when matric potential was decreased supporting thus the idea of a closure of such passages. In loose homogeneous loess soils, Peth et al. [41] also observed similar modification of soil structure with an increase of large pores and a concomitant closure of small pores during drying. In loose packing where soil is easily compressible, the opening of new macropores could more easily induce a closure of smaller pores as a response to hydraulic stress.

Perhaps a more plausible explanation for the presence of pockets of air in the large pores is that nucleation occurred and bubbles formed that increased in size until they eventually filled the pores. Little has been written about nucleation in soils [19,32,38]. It is well-known that this process is very hard to eliminate in tensiometers tubes, where the slightest impurity, a piece of dust or a spot of grease on the inside surfaces of the tubes, is enough to cause nucleation and lead the tensiometers to fail [31]. In soils, one would expect nucleation points to be extremely numerous, from clay particles or particulate organic matter to bacterial cells or fungal hyphae, located in the lumen of pores or on solid surfaces. For nucleation to occur, air needs to be dissolved in the liquid phase. Even though, in our experiments, the water with which the soil samples were filled was initially deaired, it is likely that some air managed to dissolve again in the liquid phase by the time the samples were scanned, a few days later.

Since nucleation does not seem to have limited the appearance of bubbles or air pockets in the soil samples, all that is needed to account for their presence in the pores as shown in Figs. 1 and 3 is that the size of pores be sufficient to accommodate air pockets that are stable at the matric potentials applied. Miller [32] considers that air bubbles with a diameter smaller than the critical diameter predicted by the Young–Laplace equation at a given matric potential would be unstable, and eventually collapse. Therefore, based on classical capillary theory as a rule of thumb, pores need to be of about the size of this critical diameter, i.e., 280 and 150 μm, respectively, at matric potentials of −1 kPa and −2 kPa, for air bubbles to persist. These dimensions are consistent with the sizes of most pores in which bubbles are located (Figs. 1 and 3).

3.2. Pore-scale modeling of air–water interfaces

For the cube bkk04a, in the soil sample equilibrated at -1kPa, ROI p1bkk04a of size 169 × 223 × 210 voxels has a volume of 6.2 mm^3 and contains a pore of approximately ovoidal shape in its inner part with elongated extensions in several directions. For the cube bkk03a, equilibrated at -2 kPa, two regions of interest (ROI), p1bkk03a and p4bkk03a, were selected. Their sizes are, respectively, 132 × 157 × 90 voxels and 112 × 208 × 90 voxels, corresponding to volumes of 1.4 mm^3 and 1.6 mm^3. ROI p1bkk03a involves a single, roughly rhombohedrical pore, whereas ROI p4bkk03a comprises two elongated pores connected by a narrow constriction (throat). The two pores p1bkk04a and p1bkk03a share a relatively simple morphology (close to a rounded shape). By contrast, pore p4bkk03a has a more complex geometry, with throats connecting larger pores. These contrasting morphologies allowed us to test the models under different conditions.

3.2.1. Modeling at −1 kPa

The water saturation index of the pore space in ROI p1bkk04a is estimated from the thresholded 3D image to be around 0.45. At the matric potential of −1 kPa, the central part of the main pore, with a maximal diameter evaluated by MOSAIC to be 700 μm, is occupied by air (Figs. 4 and 5), in spite of the fact that the narrow, water-filled extensions of the central pore should have prevented any mass movement of air.

To simulate the air-water distribution with the LBM model, an initial average density was adopted, corresponding to the saturation level measured on the SR images, according to a procedure described by Genty and Pot [20,21]. Then the model initiated a phase separation and the position of water menisci was determined by equilibrium between cohesive forces in the liquid phase, as well as wetting- and gravity forces.

Simulation results suggest that for this ROI p1bkk04a, the distribution of water and air predicted by the LB method agrees remarkably well with experimental observations. Discrepancies are very minor, like an air pocket predicted in a small pore in section $z = 22$ (left column in Fig. 4), which is not in the SR image.

A 3D perspective view of the pore, as in Fig. 5, allows a better visual inspection of the correspondence between SR-μCT observations and LBM predictions. In smaller cylindrical-shaped pores, LBM predicts the presence of two separate small air pockets that are not seen in the SR-μCT images, whereas in another small pore, close to plane ($x = 169$), LBM does not predict the presence of air, which SR-μCT detected. Nevertheless, these discrepancies are limited in scope, and overall the shape and location of the air–water interface in this ROI are close to the reality as revealed by SR-μCT images. This goodness-of-fit translates into a very low mean absolute error, equalbrk to 0.08.

In the case of MOSAIC, the Young–Laplace equation determines if the geometric primitives (balls) representing the pore space can in principle empty at the matric potential that is applied on the soil sample. Whether or not a pore that could in principle empty indeed does so depend in practice on the connectivity of the air phase [26]. In this particular instance, no drainage of the large pore could take place because it is not accessible to air, i.e., the throats full of water surrounding this pore cannot empty since the matric potential applied is not low enough for that. The 3D perspective views of the scanned image (Fig. 5) show clearly that, in ROI p1bkk04a, the central pore containing air is enclosed by throats full of water in all spatial directions. As a matter of fact, since a crucial condition for bulk air penetration is not met, MOSAIC fails to predict the presence of air in this case (data not shown).

When the constraint relative to the connectivity of the air-filled pore space is lifted, i.e., when the balls envisaged by MOSAIC are allowed to empty independently of each other, MOSAIC predicts filling of the large pore in ROI p1bkk04a with air (third row in Fig. 4) with an equal amount of air ($S_w = 0.45$). The air–water interfaces agree well with the observed ones in the SR-μCT images, although the MAE is higher, at 0.16, than that obtained with LBM. In the small pore in section $z = 22$, MOSAIC does not predict the presence of air, in contrast to LBM. However, the air–water interface has an unphysical, globulous appearance, compared to the smooth shape predicted by LBM and observed in the SR-μCT data. In one instance, at the bottom of the air pocket in section $z = 64$, MOSAIC emptied one ball resulting in a manifestly unphysical-looking shape for the predicted air–water interface. The latter features are undoubtedly due to the discretization of the pore space as a collection of geometric primitives (balls), as nicely evinced by the surface rendering of the air–water interfaces in Fig. 6. By contrast, LBM calculates the balance between the different forces acting on water particles and simulates minimum

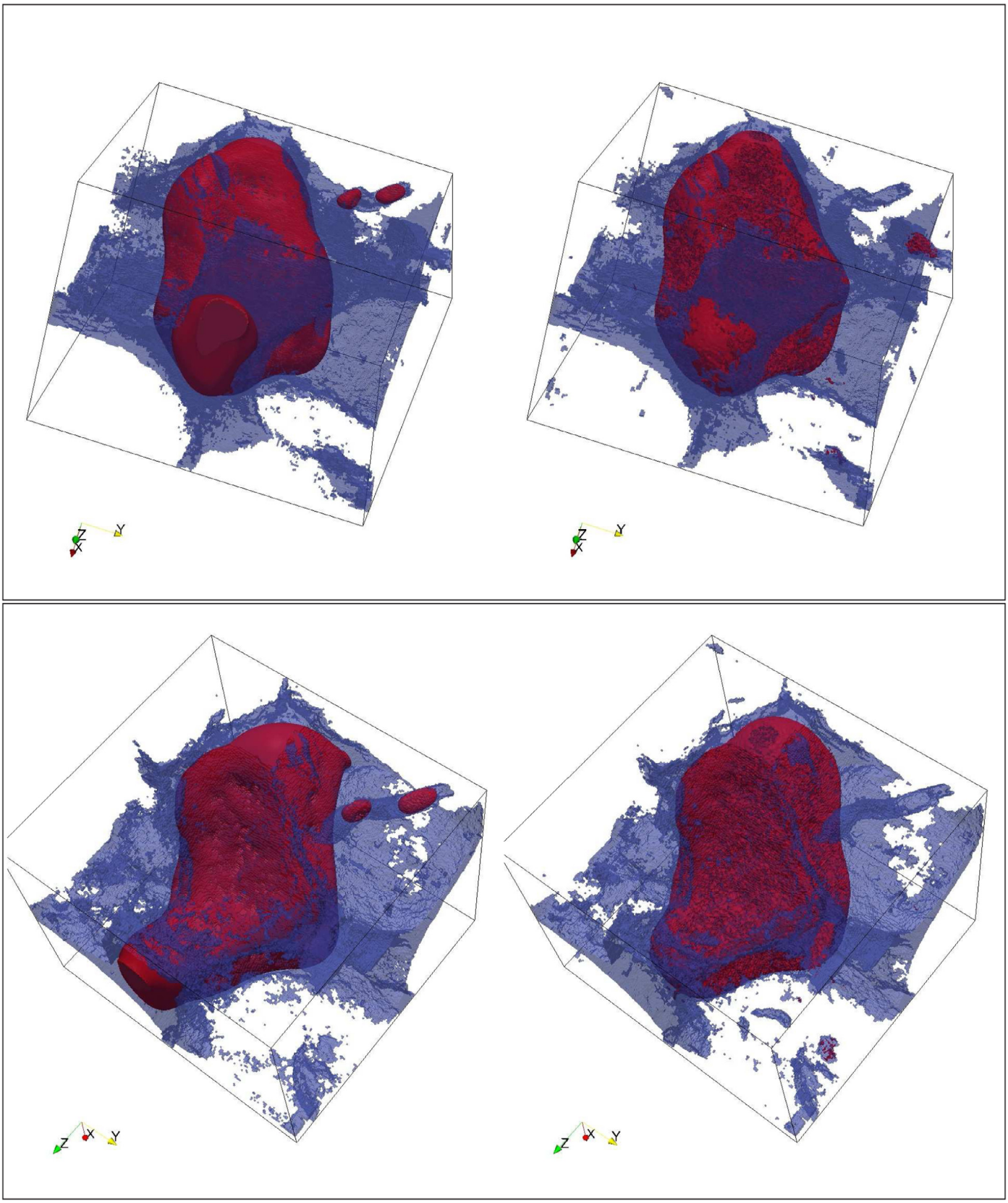


Fig. 5. Region of Interest p1bkk04a viewed from two different perspectives, respectively along the *z*-axis (top) and the *x* axis (bottom). LBM predictions are on the left, and synchrotron X-ray CT images on the right. The solid phase is not represented, whereas water is in blue and air is in red. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

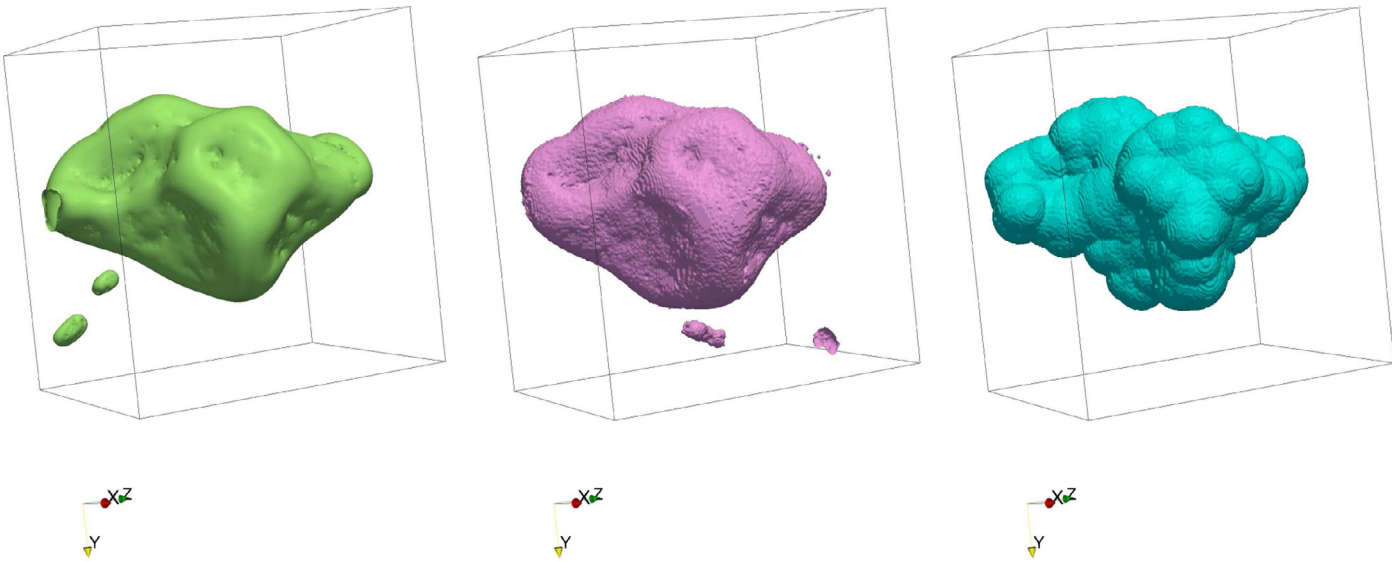


Fig. 6. Air–water interfacial surfaces of Region of Interest p1bkk04a for LBM (left), synchrotron X-ray CT images (middle) and MOSAIC (right)..

interfacial areas. The air–water interfacial area that MOSAIC predicts for the pore depicted in Fig. 6 is 6.4 mm^2, slightly higher than the value of 5.9 mm^2 found with LBM, confirming to some extent the unphysical shape of the interfaces predicted by MOSAIC. The interfacial area calculated in the segmented SR-μCT image is intermediate, with a value of 6.1 mm^2.

3.2.2. Modeling at −2 kPa

Visual inspection of the pore space in Figs. 7–10 suggests that the inner diameter of the central pore of p1bkk03a is larger than that of the pores in p4bkk03a. Indeed, MOSAIC provides an estimate of the largest pore diameter in each ROI: 382 μm for p1bkk03a, and 204 μm for p4bkk03a. As expected, this translates into very different degrees of water saturation, of 0.20 and 0.49, respectively, at the matric potential of −2 kPa.

Simulation results suggest that for the more regular shape of the pore of p1bkk03a, the distribution of air and water, as well as the location of the air–water interfaces, predicted by the LB method agrees remarkably well with the measured one (Fig. 7 and 9). For p4bkk03a ROI, again a generally good agreement is observed between LBM predictions and SR-μCT measurement, although more water is found in the top center part of the pore (see sections 30 and 39 of Fig. 8) and an air pocket is predicted to be present in the bottom left part of the pore (see section 39 of Fig. 8), when in fact none is found in the corresponding SR-μCT image. These minor discrepancies are perhaps clearer in the 3D graphs (Fig. 10), where one can see the simulated air pocket connected to the boundary ($z = 0$ plane) of the cube (top figures of Fig. 10), and where the air pocket close to plane ($y = 0$) is larger than in the measured image.

For p1bkk03a, an MAE of 0.05 confirms the excellent agreement between the LBM-predicted and SR-μCT images (Fig. 7), whereas a larger value of 0.13 for p4bkk03a (Fig. 8) indicates a higher degree of mismatch.

By contrast, the MOSAIC model did not manage to reach the measured levels of saturation: water saturations of 0.32 and 0.70 were obtained for p1bkk03a and p4bkk03a (third row in Figs. 7 and 8). The calculated MAE values are 0.23 and 0.37, respectively.

In order for the location of the air–water interfaces predicted by MOSAIC to be closer to SR-μCT observations, a different approach needs to be adopted, namely simply emptying balls starting from the largest radii down to the lower ones until a satisfactory water saturation level is obtained. For ROI p1bkk03a, this point is reached when the threshold diameter of the balls is equal to 73.6 μm, at which point the level of water saturation in the ROI is 0.19 (fourth row in Fig. 7). For ROI p4bkk03a, a water saturation of 0.50 is reached when the threshold diameter of the balls is equal to 112 μm (fourth row in Fig. 8). The predictions made with the MOSAIC model are significantly better under these conditions. In p4bkk04a, in some places, MOSAIC simulates the distribution of air and water better than LBM, with an amount of water in the top center part of the pore that compares more favorably with that in the SR-μCT images (sections 30 and 39 of Fig. 8). In addition, unlike LBM, MOSAIC does predict the presence of an air bubble in the bottom left part of the pore (section 39). In other places, MOSAIC is in disagreement with SR-μCT images, for example when it predicts the presence of air pockets in the middle of the central part of the pore (section 39), and a discontinuity of the liquid phase in the bottom part of the pore (section 54). Finally, by contrast to LBM, an unphysical shape of the air–water interface is clearly noticeable due to the ball discretization. The calculated MAE is 0.18 and 0.30 for p1bkk03a and p4bkk03a, respectively, higher than the error calculated for the LBM results. The air–water interfacial areas are 2.5 and 1.8 mm^2 for p1bkk03a and p4bkk03a, respectively, slightly higher than the corresponding values of 2.2 and 1.7 mm^2 obtained with LBM, which in turn are very near the values of 2.1 and 1.7 mm^2, respectively, found for the measured SR-μCT data.

3.2.3. Discussion of modeling results

In order for the MOSAIC model to predict the location of air–water interfaces even approximately, the restriction imposed by capillary theory that only pores connected physically to air-filled pores can drain has to be lifted. This observation seems to lend credence to the idea that the presence of gas pockets in the SR-μCT images is due to some kind of nucleation, followed by the growth of air bubbles out of gases dissolved in the aqueous phase. Actually, the remarkable fit of LBM predictions with observations to some extent and very indirectly, also supports the same scenario. Clearly, since the LBM scheme that was adopted in the research involves only one component, there is no way it could describe explicitly the processes causing the coalescence of dissolved gases into bubbles. Indeed, only (virtual) particles associated with water are considered explicitly by the LBM scheme. When calculations lead these particles to separate into a dense phase and a light phase in specific portions of the pore space, this phase

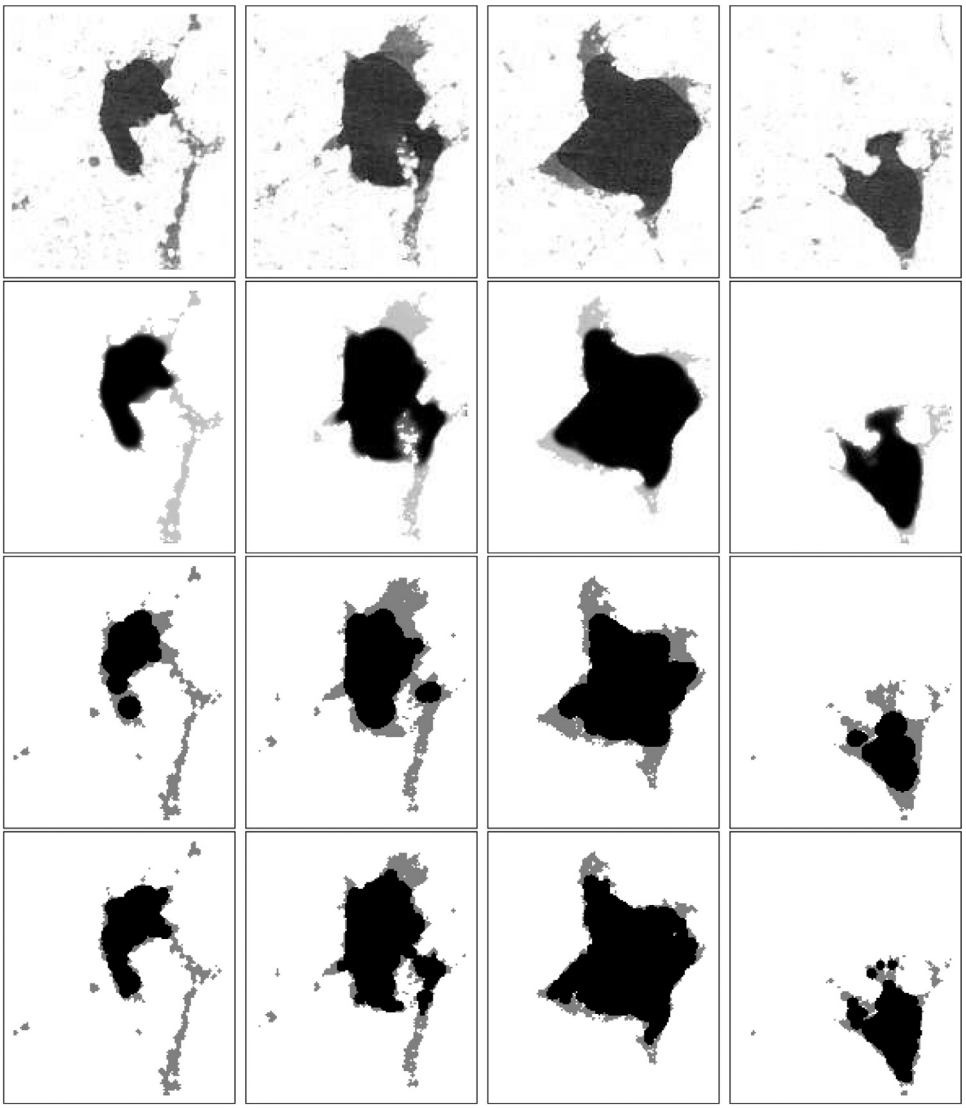


Fig. 7. Comparison between SR-μCT (first row), LBM (second row) and MOSAIC (third and fourth rows) of the air-water distribution in the connected pore space of ROI p1bkk03a at different vertical sections $z = 18$, 24, 34 and 65 (from left to right). The water saturation index of the pore is 0.20. Solid phase is in white, water is in light gray and air is in black. The third row corresponds to a threshold diameter value of 150 μm corresponding to $h = -2$ kPa (resulting in $S_w = 0.32$) while the fourth row corresponds to a lower threshold value of 73.6 μm (resulting in $S_w = 0.19$).

separation is the manifestation only of a balance of the different forces acting on water particles, in particular forces of adsorption of these particles on pore walls. However, for all practical purposes, the equilibrium state associated with this phase separation is phenomenologically indistinguishable from a situation in which a bubble would have formed in a pore, and the volume of this bubble would no longer change through degassing of the liquid phase.

If one considers that this scenario of the spontaneous growth of air pockets in the pore space is valid, then the fact that MOSAIC is able to predict the presence of air, and in one instance the same amount of air, suggests that the representation of the pore space via simple geometric primitives is an acceptable approximation. The computation carried out by the LBM and MOSAIC both require knowledge of the degree of saturation of the pores, a condition that poses practical problems. Indeed, it is clear from comparison of the results for the two ROIs at a matric potential of −2 kPa that even within a single soil sample, different pores have different degrees of saturation. However, Genty and Pot [20] have shown that, as long as pores are connected in a soil sample, the only piece of information about the degree of saturation that LBM needs as input relates to its value for the network of pores as a whole, not that of each individual pore separately, as with MOSAIC. This is a definite advantage of LBM over MOSAIC, in that knowledge of the actual degree of saturation of a soil is generally available in practice whenever one might want to simulate the distribution of water in the pore space, at least under static conditions.

Nevertheless, it may be possible to rethink somehow the discretization of the pore space in MOSAIC to make the model better able to simulate the distribution of water and air in soils. One major incentive to continue working along that path is that, compared to the more accurate LBM model, MOSAIC is blazingly fast. On a similar type of computer (typical desktop computer with two 2.6 GHz processors), running the LBM program on one of the ROIs considered earlier takes between 2 and 19 h, while exactly the same cases take about 5 min when run with MOSAIC. The considerable time savings that ensue may be extremely useful when one tries to work with larger soil samples, as is very likely to be increasingly the case in years to come, in order to resolve the question of how to upscale microscopic simulations to larger scales (e.g., [8]).

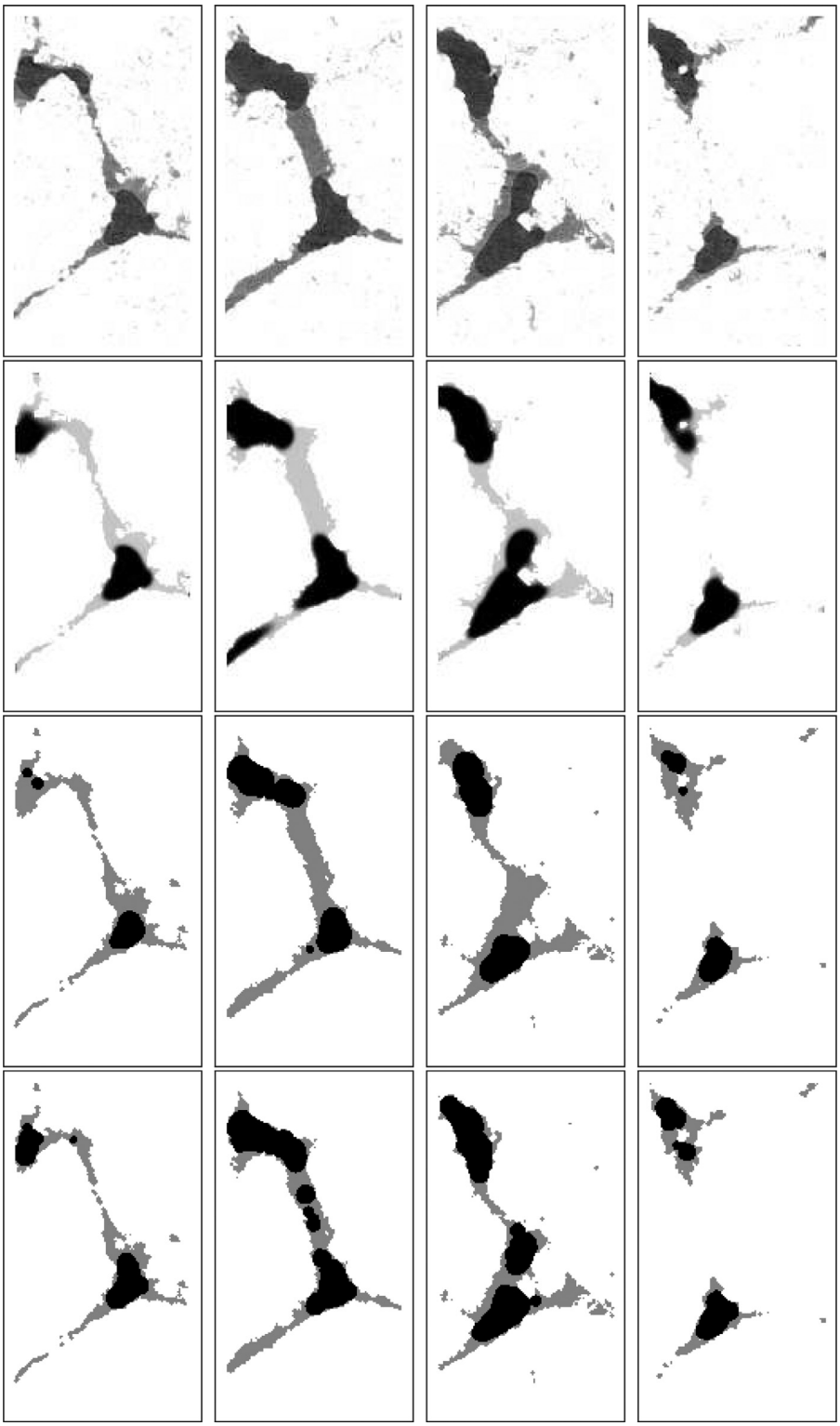


Fig. 8. Comparison between SR-μCT (first row), LBM (second row) and MOSAIC (third and fourth rows) of the air-water distribution in the connected pore space of ROI p4bkk03a at different vertical sections $z = 30$, 39, 54 and 63 (from left to right). The water saturation index of the pores is 0.49. Solid phase is in white, water is in light gray and air is in black. The third row corresponds to a threshold diameter value of 150 μm corresponding to $h = -2$ kPa (resulting in $S_w = 0.70$) while the fourth row corresponds to a lower threshold value of 112 μm (resulting in $S_w = 0.50$).

4. Conclusion

A first result of the research described in this article is a new experimental data set of 3D images of air-water interfaces obtained in a soil via synchrotron X-ray computed tomography at different matric potentials (-0.5, -1 and -2 kPa). The high quality of the images allows a clear visualization of the water menisci without using a dopant for water. These images clearly show that soil pores can desaturate even in situations where capillary theory predicts that they should not. Indeed, pores partially filled with air in some of the

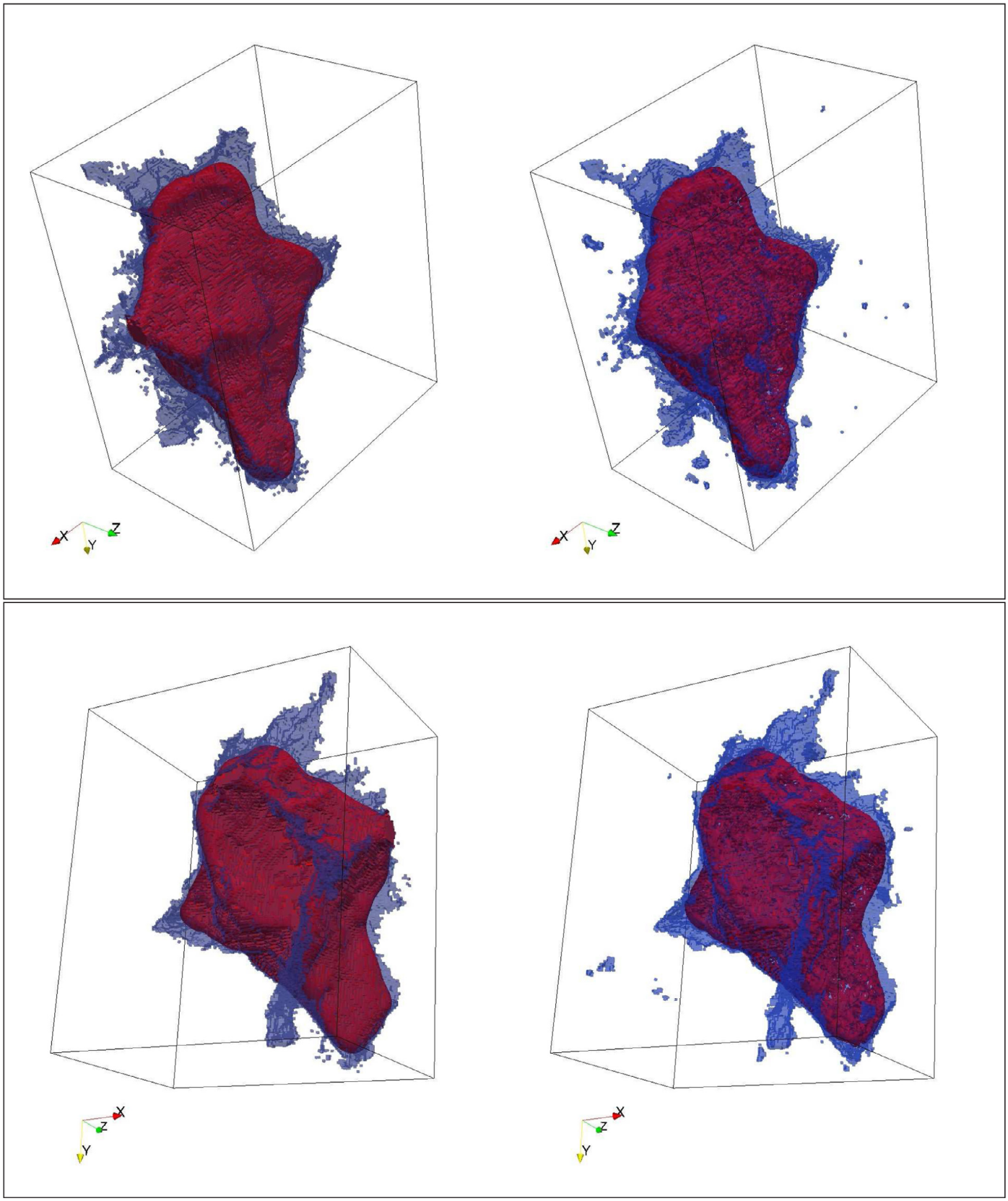


Fig. 9. Region of Interest p1bkk03a viewed from two different perspectives, respectively diagonally in the *x*-*y* plane (top) and along the *z* axis (bottom). LBM predictions are on the left, and synchrotron X-ray CT images on the right. The solid phase is not represented, whereas water is in blue and air is in red. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

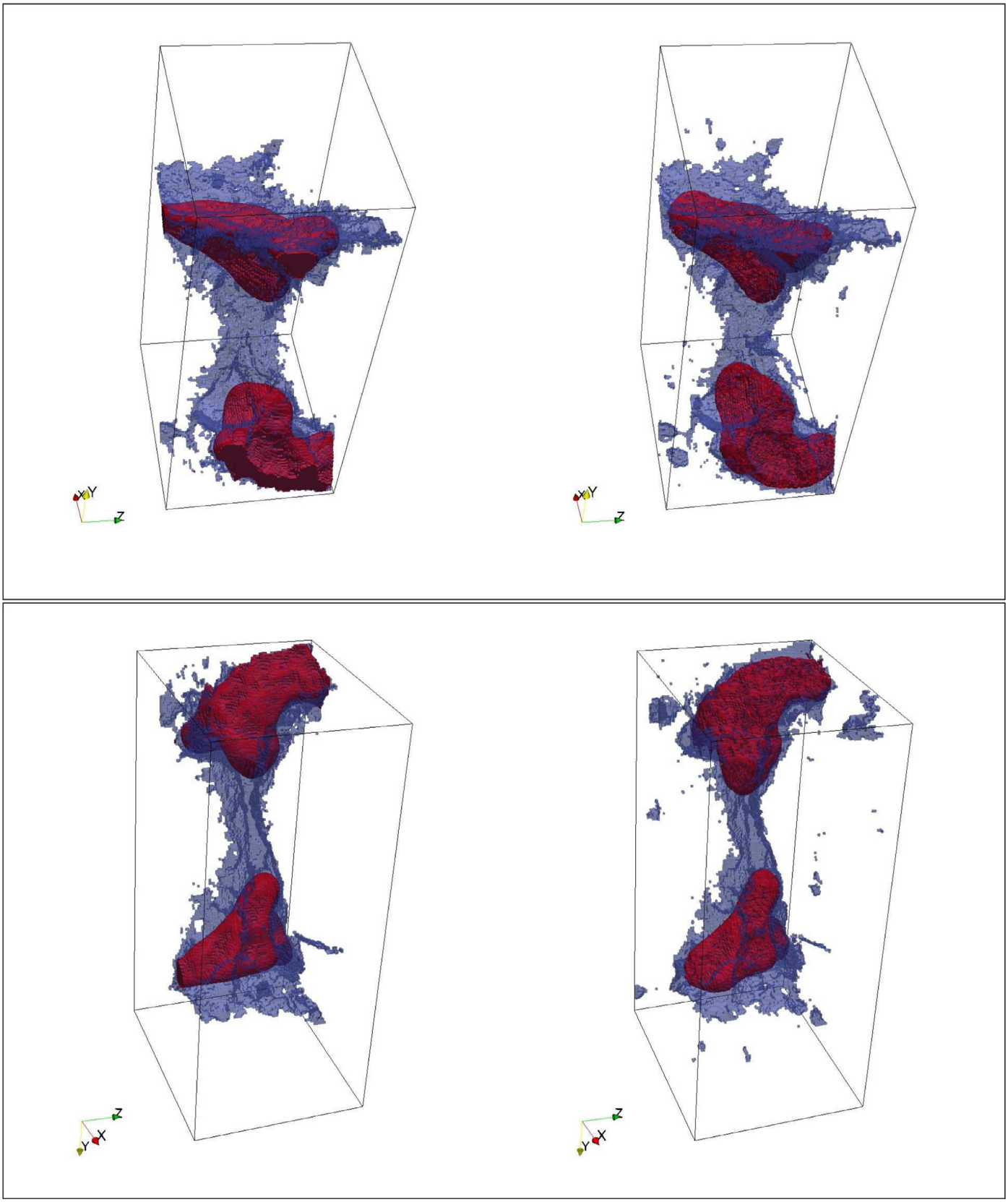


Fig. 10. Region of Interest p4bkk03a viewed from two different perspectives, respectively looking downward along the *y* axis (top) and upward along the same axis (bottom). LBM predictions are on the left, and synchrotron X-ray CT images on the right. The solid phase is not represented, whereas water is in blue and air is in red. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

images are surrounded by smaller pores that remain consistently water-saturated, in contradiction with capillary theory. A likely explanation for this observation is the process of nucleation and the subsequent growth of bubbles as dissolved gases are released from solution. These observations of non-capillary desaturation of pores have significant practical consequences in that any prediction of water saturation of a soil using capillary theory, without any allowance for nucleation and bubble growth, is likely to overestimate the amount of water that is actually present in the system.

A second result is illustrated in Figs. 4–9. For the first time, predictions made with two computer models of the distribution of water in soil samples equilibrated at different matric potentials are compared with experimental data, obtained via synchrotron X-ray computed tomography. Results of this comparison indicate that the two models do not fare equally. MOSAIC, a model based on the representation of pore space through a collection of geometrical primitives and application of capillary theory, fails to account for experimental observations as long as pores are restricted to drain only when some contiguous interstice is already full of air. This is a significant observation, in the sense that this same restriction underlies most capillary network models used routinely to describe the retention or movement of water in variably-saturated porous media. When this assumption is lifted, i.e., pores are allowed to drain regardless of the status of their neighbors, the performance of MOSAIC improves noticeably. On a case by case basis, it is possible to obtain a reasonable agreement between measured and predicted locations of air–water interfaces with MOSAIC if the critical diameter at which pores empty is lowered to reproduce the experimentally measured degree of water saturation. However, this procedure is clearly arbitrary, and renders the model unsuitable for practical use in its current version. In addition, predicted air–water interfaces are oddly shaped, likely as a consequence of the discretization of the pore space with geometrical primitives, which then determine the configuration of the interfaces between air and aqueous phases. Even though this does not translate into very different air–water interfacial area values, compared with LBM predictions, processes dependent on the geometry of air–water interfaces would be affected.

From a modeling standpoint, the most substantial result of the research described in this article undoubtedly relates to the remarkably accurate prediction of air–water interfaces by the lattice-Boltzmann model. In very few cases, LBM predicts the presence of air in pores where none is observed experimentally, whereas in other cases, the opposite occurs. Nevertheless, these discrepancies are very minor. Overall, the results of the comparison are remarkably good, with a high level of agreement between measured and predicted locations of air–water interfaces. These observations suggest that LBM-based models can be used reliably to determine where water is located in the pore space of soils, information that is crucial to describe properly the activity of soil bacteria, archaea, and fungi. One drawback of the LBM is the very long time that computations take, of the order of 20 h for the longest simulations carried out in this research. With techniques like domain decomposition, the use of multiple processors, and computations using graphic processors (GPUs) instead of CPUs, it will probably be possible to speed the computations up drastically in years to come, but it is likely that LBM will always take far longer to run than blazingly-fast MOSAIC, whose computing times are of the order of a few minutes on a desktop computer. Therefore, for the time being, it seems wise to pursue further development and testing of both LBM and MOSAIC approaches in parallel.

Acknowledgments

This work was supported in part by a bilateral French-German PROCOPE Project and the French ANR project ANR-09-SYSCOMM MEPSOM. The authors also thank HASYLAB (Hamburger Synchrotron Strahlungslabor) at DESY (Deutsche Elektronen-Synchrotron) for access and the Helmholtz-Association for supporting the use of the radiation source under contract no. I-2011-0228. M. Ogurreck gratefully acknowledges financial support from the German Research Foundation (DFG) via SFB 986 M^3, project Z2.

References

[1] Alexander M. Biochemical ecology of soil microorganisms. Annu Rev Microbiol 1964;18:217–50.
[2] Ahrens J, Geveci B, Law C. ParaView: an end-user tool for large data visualization. Visualization handbook. Elsevier; 2005. ISBN-13:978-0123875822.
[3] Al-Raoush R. Experimental investigation of the influence of grain geometry on residual NAPL using synchrotron microtomography. J Contam Hydrol 2014;159:1–10. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconhyd.2014.01.008.
[4] Andrew M, Bijeljic B, Blunt MJ. Pore-scale contact angle measurements at reservoir conditions using X-ray microtomography. Adv Water Resour 2014;68:24–31. http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2014.02.014.
[5] Baveye PC, Laba M, Otten W, Bouckaert L, Dello Sterpaio P, Goswami RR, et al. Observer-dependent variability of the thresholding step in the quantitative analysis of soil images and X-ray microtomography data. Geoderma 2010;157:51–63. http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.03.015.
[6] Baveye PC, Rangel D, Jacobson AR, Laba M, Darnault C, Otten W, et al. From dust bowl to dust bowl: soils are still very much a frontier of science. Soil Sci Soc Am J 2011;75:20372048. http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2011.0145.
[7] Baveye PC, Laba M. Moving away from the geostatistical lamppost: why, where, and how does the spatial heterogeneity of soils matter? Ecol Modell 2015;298:2438. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2014.03.018.
[8] Baveye PC. Grand challenges in the research on soil processes. Front Environ Sci 2015;3:10. http://dx.doi.org/10.3389/fenvs.2015.00010.
[9] Blunt MJ, Bijeljic B, Dong H, Gharbi O, Iglauer S, Mostaghimi P, et al. Pore-scale imaging and modelling. Adv Water Resour 2013;51:197–216. http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2012.03.003.
[10] Brusseau ML, Peng S, Snaar G, Murao A. Measuring air-water interfacial areas with x-ray microtomography and interfacial partitioning tracer tests. Environ Sci Technol 2007;41:1956–61. http://dx.doi.org/10.1021/es061474m.
[11] Carminati A, Kaestner A, Lehmann P, Flühler H. Unsaturated water flow across soil aggregate contacts. Adv Water Resour 2008;31:1221–32. http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2008.01.008.
[12] Culligan KA, Wildenschild D, Christensen BSB, Gary WG, Rivers ML. Pore-scale characteristics of multiphase flow in porous media: a comparison of air-water and oil-water experiments. Adv Water Resour 2006;29:227–38. http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2005.03.021.
[13] Falconer RE, Houston AN, Otten W, Baveye PC. Emergent behavior of soil fungal dynamics: influence of soil architecture and water distribution. Soil Sci 2012;177:111–19. http://dx.doi.org/10.1097/SS.0b013e318241133a.
[14] FA0. World reference base for soil resources 2006. A framework for international classification, correlation and communication. In: World soil resources reports 103. Rome: Food and Agriculture organization of the United Nations; 2006. p. 145.
[15] Folse HJ, Allison SD III. Cooperation, competition, and coalitions in enzyme-producing microbes: social evolution and nutrient depolymerization rates. Front Microbiol 2012;3:338. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00338.
[16] Fraunhofer ITWM. Department of Image Processing. ToolIP – tool for image processing 2009, http://www.itwm.fraunhofer.de/toolip.
[17] Fraunhofer ITWM. Department of Image Processing. MAVIkit MAVI toolbox for ToolIP 2013, http://www.itwm.fraunhofer.de/toolip.
[18] Garnier P, Cambier C, Bousso M, Masse D, Chenu C, Recous S. Modeling the influence of soil-plant residue contact on carbon mineralization: comparison of a compartmental approach and a 3D spatial approach. Soil Biol Biochem 2008;40:2754–61. http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.032.
[19] Gawin D, Sanavia L. Simulation of cavitation in water saturated porous media considering effects of dissolved air. Transp Porous Media 2010;81:141–60. http://dx.doi.org/10.1007/s11242-009-9391-4.
[20] Genty A, Pot V. Numerical simulation of 3D liquid-gas distribution in porous media by a two-phase TRT lattice Boltzmann method. Transp Porous Media 2013;96:271–94. http://dx.doi.org/10.1007/s11242-012-0087-9.
[21] Genty A, Pot V. Numerical calculation of effective diffusion in unsaturated porous media by the TRT lattice Boltzmann method. Transp Porous Media 2014;105:391–410. http://dx.doi.org/10.1007/s11242-014-0374-8.
[22] Ginzburg I, Verhaeghe F, d'Humières D. Study of simple hydrodynamics solutions with the two-relaxation-times lattice Boltzmann scheme. Commun Comput Phys 2008;3:519–81.
[23] Hapca SM, Houston A, Otten W, Baveye PC. New local thresholding method for soil images by minimizing grayscale intra-class variance. Vadose Zone J 2013;12(3). http://dx.doi.org/10.2136/vzj2012.0172.
[24] Houston AN, Otten W, Baveye PC, Hapca SM. Thresholding of computed tomography images of heterogeneous porous media by adaptive-window indicator kriging. Comput Geosci 2013a;54:239248. http://dx.doi.org/10.1016/j.cageo.2012.11.016.
[25] Houston AN, Schmidt S, Tarquis AM, Otten W, Baveye PC, Hapca SM. Effect of scanning and image reconstruction settings in X-ray computed microtomography on quality and segmentation of 3D soil images. Geoderma 2013b;207–208(1):154–65. http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.05.017.

[26] Hunt AG, Ewing RP, Horton R. What's wrong with soil physics? Soil Sci Soc Am J 2013;77:1877–87. http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2013.01.0020.
[27] Knutson CE, Werth CJ, Valocchi AJ. Pore-scale simulation of biomass growth along the transverse mixing zone of a model two-dimensional porous medium. Water Resour Res 2005;41:W07007. http://dx.doi.org/10.1029/2004WR003459.
[28] Luxmoore R. Micro-, meso- and macroporosity of soil. Soil Sci Soc Am J 1981;45:671–2.
[29] Martys NS, Chen H. Simulation of multicomponent fluids in complex three-dimensional geometries by the lattice Boltzmann method. Phys Rev E 1996;53(1):743–50.
[30] Masse D, Cambier C, Brauman A, Sall S, Assigbetse K, Chotte J-L. MIOR: an individual-based model for simulating the spatial patterns of soil organic matter microbial decomposition. Eur J Soil Sci 2007;58:1127–35. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2389.2007.00900.x.
[31] Miller EE, Salehzadeh A. Stripper for bubble-free tensiometry. Soil Sci Soc Am J 1993;57:1470–3.
[32] Miller RD. Comment on "Paradoxes and realities in unsaturated flow theory" by W.G. Gray and S.M. Hassanizadeh. Water Resour Res 1994;30:1623–4.
[33] Monga O, Ngom NF, Delerue JF. Representing geometric structures in 3D tomography soil images: application to pore space modelling. Comput Geosci 2007;33:1140–61. http://dx.doi.org/10.1016/j.cageo.2006.11.015.
[34] Monga O, Bousso M, Garnier P, Pot V. 3D geometric structures and biological activity: application to microbial soil organic matter decomposition in pore space. Ecol Modell 2008;216:291–302. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2008.04.015.
[35] Monga O, Garnier P, Pot V, Coucheney E, Nunan N, Otten W, et al. Simulating microbial degradation of organic matter in a simple porous system using the 3-D diffusion-based model MOSAIC. Biogeosciences 2014;11:2201–9. http://dx.doi.org/10.5194/bg-11-2201-2014.
[36] Ngom NF, Monga O, Mohamed MMO, Garnier P. 3D shape extraction segmentation and representation of soil microstructures using generalized cylinders. Comput Geosci 2012;39:50–63. http://dx.doi.org/10.1016/j.cageo.2011.06.010.
[37] Ollion J, Cochennec J, Loll F, Escudé C, Boudier T. TANGO: A generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. Bioinformatics 2013;29:1840–1. http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt276.
[38] Or D, Tuller M. Cavitation during desaturation of porous media under tension. Water Resour Res 2002;38:1061. http://dx.doi.org/10.1029/2001WR000282.
[39] Otsu N. A threshold selection method from gray level histograms. EEE Trans Syst Man Cybern 1979;9:6266.
[40] Peth S, Horn R, Beckmann F, Donath T, Fisher J, Smucker AJM. Three-dimensional quantification of intra-aggregate pore-space features using synchrotron-radiation-based microtomography. Soil Sci Soc Am J 2008;72:897–907. http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2007.0130.
[41] Peth S, Nellesen J, Fischer G, Horn R. Non-invasive 3D analysis of local soil deformation under mechanical and hydraulic stresses by μCT and digital image correlation. Soil Tillage Res 2010;111:3–18. http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2010.02.007.
[42] Raiskinmäki P, Koponen A, Merikoski J, Timonen J. Spreading dynamics of three-dimensional droplets by the lattice Boltzmann method. Comput Mater Sci 2000;18:7–12.
[43] Schaap MG, Porter ML, Christensen BSB, Wildenschild D. Comparison of pressure-saturation characteristics derived from computed tomography and lattice Boltzmann simulations. Water Resour Res 2007;43:W12506. http://dx.doi.org/10.1029/2006WR005730.
[44] Shan X, Chen H. Lattice Boltzmann model for simulating flows with multiple phases and components. Phys Rev E 1993;47(3):1815–20.
[45] Shan X, Chen H. Simulation of nonideal gases and liquid-gas phase transitions by the lattice Boltzmann equation. Phys Rev E 1994;49(4):2941–8.
[46] Sukop MC, Huang H, Lin CL, Deo MD, Oh K, Miller JD. Distribution of multiphase fluids in porous media: comparison between lattice Boltzmann modeling and micro-x-ray tomography. Phys Rev E 2008;77:026710.
[47] Tippkötter R, Eickhorst T, Taubner H, Gredner B, Rademaker G. Detection of soil water in macropores of undisturbed soil using microfocus X-ray tube computerized tomography (μCT). Soil Tillage Res 2009;105:12–20. http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2009.05.001.
[48] Taina IA, Heck RJ, Elliot TR. Application of X-ray computed tomography to soil science: A literature review. Can J Soil Sci 2008;88:1–20. http://dx.doi.org/10.4141/cjss2012-044.
[49] Van Loo D, Bouckaert L, Leroux O, Pauwels E, Dierick M, Van Hoorebeke L, et al. Contrast agents for soil investigation with X-ray computed tomography. Geoderma 2014;213:485–91. http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.08.036.
[50] Vogel H-J, Roth KI. Quantitative morphology and network representation of soil pore structure. Adv Water Res 2001;24:233–42. http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1708(00)00055-5.
[51] Vogel H-J, Tölke J, Schulz VP, Krafczyk M, Roth K. Comparison of a lattice-Boltzmann model, a full-morphology model, and a pore network model for determining capillary pressure-saturation relationships. Vadose Zone J 2005;4:380–8. http://dx.doi.org/10.2136/vzj2004.0114.
[52] Vogel H-J, Weller U, Schlüter S. Quantification of soil structure based on Minkowski functions. Comput Geosci 2010;36:1236–45. http://dx.doi.org/10.1016/j.cageo.2010.03.007.
[53] Vogel L, Makowski D, Garnier P, Vieublé-Gonod L, Raynaud X, Nunan N, et al. Modelling the effect of soil meso- and macropores topology on the biodegration of a soluble carbon substrate. Adv Water Resour 2015;83:123–36. http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2015.05.020.

Annexe A

Code source du programme réalisé pour l'analyse d'incertitudes

```
np=4 # nombre de facteurs incertains
CI=2 # modalite de conditions initiales

nt=10000            # nombre de tirages
tu=7.429            # resolution temporelle (secondes)
th=round(3600/tu)   # pas de temps du modee (1h)
tmax=242*th         # pas de temps du modee (1h)
Tu=tu/(3600*24)     # facteur de conversion pour les constantes de vitesse
d1=73; d2=242       # pas de temps d'analyse des resultats


lu=0.01             # resolution spatiale (cm)
Lu=lu^3             # facteur de conversion pour les constantes de saturation


doc0=6.1994e-7      # concentration initiale de DOC de reference
ci=c(1,10,0.1)
doc00=doc0*ci[CI]   # concentration initiale de DOC (fonction de la modalite CI)

bact00=1.3099e-12   # biomasse initiale
C0=doc00+bact00     # concentration initiale de C

library(triangle)



# 1) Ecriture des commandes de modification du fichier d'entree du modee aux nt simulations

    # Conditions initiales et limites du modee
commande1=paste('sed s/tmaxx/',tmax,'/ par_mod.h > par1.h',sep="")
commande2=paste('sed s/thx/',th,'/ par1.h > par2.h',sep="")
commande3=paste('sed s/doc00x/',doc00,'/ par2.h > par3.h',sep="")
commande4=paste('sed s/bact00x/',bact00,'/ par3.h > par4.h',sep="")

    # Commandes de compilation et d'execution du modee
commande11='make clean'
commande12='make dxqy_v8'
commande13='./dxqy_v8'



# 2) Definition des distributions des facteurs incertains
par_name=c('vdoc','km','kdoc','kr','ki','pm')   # vecteur de noms de facteurs
conv=c(Tu,Tu,Lu,Tu,Lu,1)                        # vecteur des facteurs de conversion


#paramètres des lois de distribution
    Min=c(3.96000, 0.00150, 0.00014, 0.13000, 0.03110, 0.08000)
    Max=c(38.640, 1.309, 0.233, 0.500, 1.034, 1.000)
    Mod=c(8.08000, 0.01350, 0.00270, 0.22500, 0.06645, 0.51500)


par_name=par_name[1:np];  conv=conv[1:np]; Min=Min[1:np];  Max=Max[1:np];  Mod=Mod[1:np]

vdoc<-is.vector(np)
km<-is.vector(np)
kdoc<-is.vector(np)
kr<-is.vector(np)
```

```
# 3) Tirage aleatoire des nt combinaisons de facteurs incertains
param<-matrix(0,nrow=nt,ncol=np)
for (p in 1:np)
{
    param[,p]=rtriangle(nt,a=Min[p],b=Max[p],c=Ctr[p])*conv[p]
}


    # BOUCLE DE nt SIMULATIONS
    for (i in 1:nt)
    {
      vdoc=formatC(param[i,1],format='e',digits=5)
      km=formatC(param[i,2],format='e',digits=5)
      kdoc=formatC(param[i,3],format='e',digits=5)
      kr=formatC(param[i,4],format='e',digits=5)

      # 4) Commande de reecriture des valeurs des facteurs incertains
      commande5=paste('sed s/vdocx/',vdoc,'/ par4.h > par5.h',sep="")
      commande6=paste('sed s/kmx/',km,'/ par5.h > par6.h',sep="")
      commande7=paste('sed s/kdocx/',kdoc,'/ par6.h > par7.h',sep="")
      commande8=paste('sed s/krx/',kr,'/ par7.h > par8.h',sep="")}


      # 5) Execution des commandes d'initialisation et de lancement des simulations
          # Conditions initiales et aux limites
          system(commande1)
          system(commande2)
          system(commande3)
          system(commande4)

          # Ecriture des facteurs incertains
          system(commande5)
          system(commande6)
          system(commande7)
          system(commande8)

          # compilation et execution du modee
          system(commande11)
          system(commande12)
          system(commande13)



      # 6) Lecture et stockage des resultats
      tab=read.table('table_bacteria.dat')
      doc_1=tab[d1,3]; doc_2=tab[d2,3];
      bact_1=tab[d1,4]; bact_2=tab[d2,4];
      co2_1=tab[d1,6]; co2_2=tab[d2,6];

      res<-matrix(0,nrow=nt,ncol=np+nd*3)
      res[i,]=c(formatC(param[i,],format='e',digits=5),doc_1,bact_1,co2_1,doc_2,bact_2,co2_2)


    } # FIN DE LA BOUCLE DE SIMULATIONS


    # 7) Ecriture du fichier de resultats
    write.table("results_AI.txt",col.names=c(par_name,'doc_1','bact_1','co2_1','doc_2',
                                             'bact_2','co2_2',sep='\t')
```

Annexe B

Code source du programme réalisé pour l'analyse de sensibilité

```
np=4      # nombre de parametres
CI=1      # modalite de conditions initiales

nl=5      # nombre de niveaux
nd=2      # nombre de dates

N=ni^np   # nombre de combinaisons

tu=7.429            # resolution temporelle (secondes)
th=round(3600/tu)   # pas de temps du modele (1h)
tmax=242*th         # pas de temps du modele (1h)
Tu=tu/(3600*24)     # facteur de conversion pour les constantes de vitesse
d1=73; d2=242       # pas de temps d'analyse des resultats

lu=0.01             # resolution spatiale (cm)
Lu=lu^3             # facteur de conversion pour les constantes de saturation

doc0=6.1994e-7      # concentration initiale de DOC de reference
ci=c(1,10,0.1)
doc00=doc0*ci[CI]   # concentration initiale de DOC (fonction de la modalite CI)

bact00=1.3099e-12   # biomasse initiale
C0=doc00+bact00     # concentration initiale de C



# 1) Ecriture des commandes de modification du fichier d'entree du modele aux nt simulations

    # Conditions initiales et limites du modele
    commande1=paste('sed s/tmaxx/',tmax,'/ par_mod.h > par1.h',sep="")
    commande2=paste('sed s/thx/',th,'/ par1.h > par2.h',sep="")
    commande3=paste('sed s/doc00x/',doc00,'/ par2.h > par3.h',sep="")
    commande4=paste('sed s/bact00x/',bact00,'/ par3.h > par4.h',sep="")

    # Commandes de compilation et d'execution du modele
    commande11='make clean'
    commande12='make dxqy_v8'
    commande13='./dxqy_v8'



# 2) Definition des gammes de distribution
    par_name=c('vdoc','km','kdoc','kr','ki','pm')   # vecteur de noms de facteurs
    conv=c(Tu,Tu,Lu,Tu,Lu,1)                        # vecteur des facteurs de conversion
    Min=c(3.96000, 0.00150, 0.00014, 0.13000, 0.03110, 0.08000)
    Max=c(38.640, 1.309, 0.233, 0.500, 1.034, 1.000)
    par_name=par_name[1:np]; Min=Min[1:np]; Max=Max[1:np]; conv=conv[1:np];


# 3) Definition des niveaux discrets de chaque facteur incertain
    level<-array(0, c(ni,np))

    for (p in 1:np)
    {
    level[1,p]=Min[p]*conv[p];
    level[5,p]=Max[p]*conv[p];
```

```
    level[2,p]=(level[5,p]-level[1,p])/4
    level[3,p]=(level[5,p]-level[1,p])/5
    level[4,p]=(level[5,p]-level[1,p])*3/4

    }


  n=0
# DEBUT DES BOUCLES IMBRIQUEES pour la simulation des N combinaisons
  for (l in 1:nl){
    vdoc=formatC(level[l,1],format='e',digits=5);
    for (l in 1:nl){
      km=formatC(level[l,2],format='e',digits=5);
      for (l in 1:nl){
        kdoc=formatC(level[l,3],format='e',digits=5);
        for (l in 1:nl){
          kr=formatC(level[l,4],format='e',digits=5);
              n=n+1


       # 4) Commande de reecriture des valeurs des facteurs incertains
        commande5=paste('sed s/vdocx/',vdoc,'/ par4.h > par5.h',sep="")
        commande6=paste('sed s/kmx/',km,'/ par5.h > par6.h',sep="")
        commande7=paste('sed s/kdocx/',kdoc,'/ par6.h > par7.h',sep="")
        commande8=paste('sed s/krx/',kr,'/ par7.h > par8.h',sep="")}


      # 5) Execution des commandes d'initialisation et de lancement des simulations
        # Conditions initiales et aux limites
        system(commande1)
        system(commande2)
        system(commande3)
        system(commande4)

        # Ecriture des facteurs incertains
        system(commande5)
        system(commande6)
        system(commande7)
        system(commande8)

        # compilation et execution du modele
        system(commande11)
        system(commande12)
        system(commande13)


      # 6) Lecture et stockage des resultats
            tab=read.table('table_bacteria.dat')
            doc_1=tab[d1,3]; doc_2=tab[d2,3]
            bact_1=tab[d1,4]; bact_2=tab[d2,4]
            co2_1=tab[d1,6]; co2_2=tab[d2,6]
            res<-matrix(0,nrow=N,ncol=np+nd*3) # 3 variables de sortie
            res[n,]=c(par_name,doc_1,bact_1,co2_1,doc_2,bact_2,co2_2)

        }
      }
    }
  } # FIN DES BOUCLES DE SIMULATION


# 7) Ecriture du fichier de resultats
  write.table(res,'results_AS.txt',col.names=c(par_name,'doc_1','bact_1','co2_1',
                                               'doc_2','bact_2','co2_2'),sep='\t')
```

Annexe C

Résultats complémentaires des analyses d'incertitudes

Voir section 3.3.2.

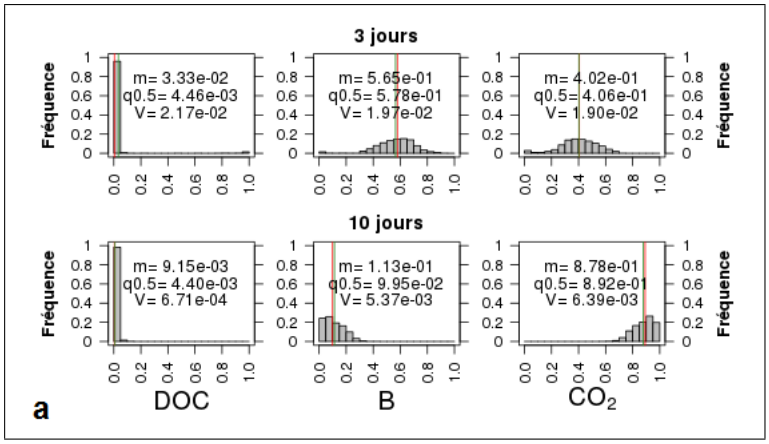


FIGURE C.1 – **Effet du changement de distribution des paramètres** v_{DOC} et k_{DOC} pour la version H_0R_0 du modèle (version minimale du modèle sans calcul de l'humification ni de l'état physiologique)

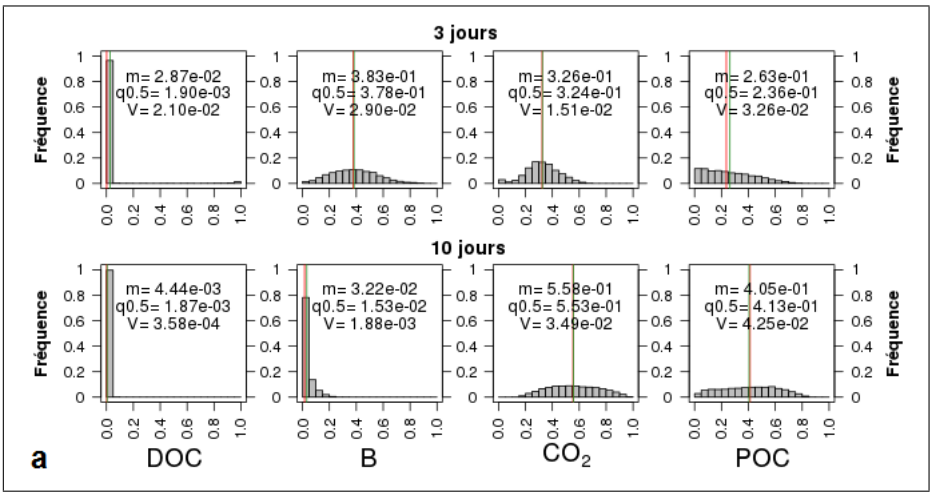


FIGURE C.2 – **Effet du changement de distribution des paramètres** v_{DOC} et k_{DOC} pour la version H_1R_0 du modèle (avec calcul de l'humification)

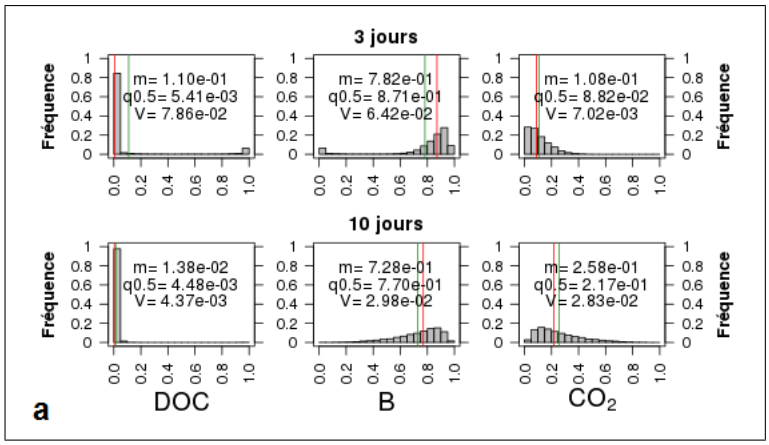


FIGURE C.3 – **Effet du changement de distribution des paramètres** v_{DOC} et k_{DOC} pour la version H_0R_1 du modèle (avec calcul de l'état physiologique)

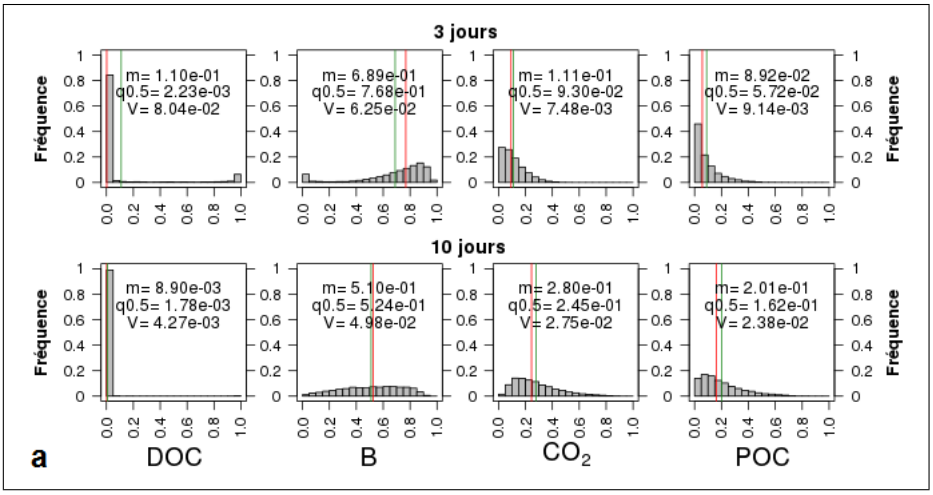


FIGURE C.4 – **Effet du changement de distribution des paramètres** v_{DOC} et k_{DOC} pour la version H_1R_1 du modèle (avec calcul de l'état physiologique et de l'humification)

Annexe D

Protocole de rinçage du carbone organique dissous d'agrégats de sol

Principe

Le sol préalablement tamisé et stérilisé est rincé afin d'éliminer le carbone microbien libéré lors de la stérilisation. Un simulateur de pluie réglé sur un bas débit est utilisé pour rincer de manière homogène et non agressive. Une succion est imposée sur l'échantillon afin de permettre l'évacuation de l'eau de rinçage. Des précautions sont prises afin d'éviter la recolonisation du sol par des microorganismes (notamment dispositif fermé grâce à un cylindre entre simulateur et embase).

Se reporter au schéma D.1 pour les codes des tuyaux (t1 – t5) :

Matériel

- pompe péristaltique , tuyaux pour auto-analyse Tygon jaune-bleu (Φ_{int} 1,52 mm) [t2], tuyau élastique et autoclavable (Versilic 6X4) [t1 et t3], raccords ou sections de tuyau de diamètre intermédiaire
- simulateur de pluie en PVC translucide Φ_{ext} 180 mm avec entrée raccord rapide 6 mm à connecter avec section tuyau rigide (6X4) et à l'opposé embouts pour 45 aiguilles hypodermiques 29G X 1/2" (Φ_{ext} 0,33 mm)
- dispositif de succion : embase Φ_{ext} 200 mm ; toile inox (20 μm) ; tour métallique ; 2 joints toriques ; cylindre (Φ_{int} 140 mm, Φ_{ext} 150) avec alésage à la base sur 32 mm ; seringue 5 mL pour ajustement de la charge hydraulique et évacuation du lixiviat ; tuyau Versilic (6X4 mm) [t4 et t5] ; tuyau Hexacanal (10X6) tuyau rigide jonctions large ; 3 purges (tuyau Φ_{ext} 3 mm) avec pinces de mort
- 2 bouteilles de 2L (alimentation et lixiviats) avec ouverture Φ 45 mm, bouchons en silicone percés de 2 trous, tuyaux rigides (6X4 mm)
- portoir en cornières métalliques (H= 40cm ; L=60cm ; l=40cm) pour le montage, socle indépendant pour poser temporairement.
- Statifs

Durée

84 h environ (montage : 6 h ; rinçage système : 6 h ; rinçage échantillon : 60 - 72 h ; démontage/drainage : 6 h) pour 670 - 750 g MS de sol stérilisé (soit environ 800-900 g frais). Des quantités importantes de sol peuvent être gérées en dupliquant le système et en optimisant les rotations : une nouvelle série de deux peut être lancée pendant l'étape de séchage de la précédente.

Préparatifs

Préparation de la solution de rinçage Préparer les solutions mères en conditions non stériles (CaN_2O_6 à 153 g.L^{-1}, NaCl à 8,78 g.L^{-1}, $CaSO_4$ à 1,139 g.L^{-1})

Sel	CaN_2O_6, 4 H_2O	NaCl	$CaSO_4$, 2 H_2O
Masse pour 1L de solution	220,189	8,78	1,44

Sous PSM : Filtrer les solutions avec une seringue et un filtre stérile (en acétate de cellulose 0,2 μm) les solutions. Les transférer dans des flacons stériles et les stocker à 4°C.

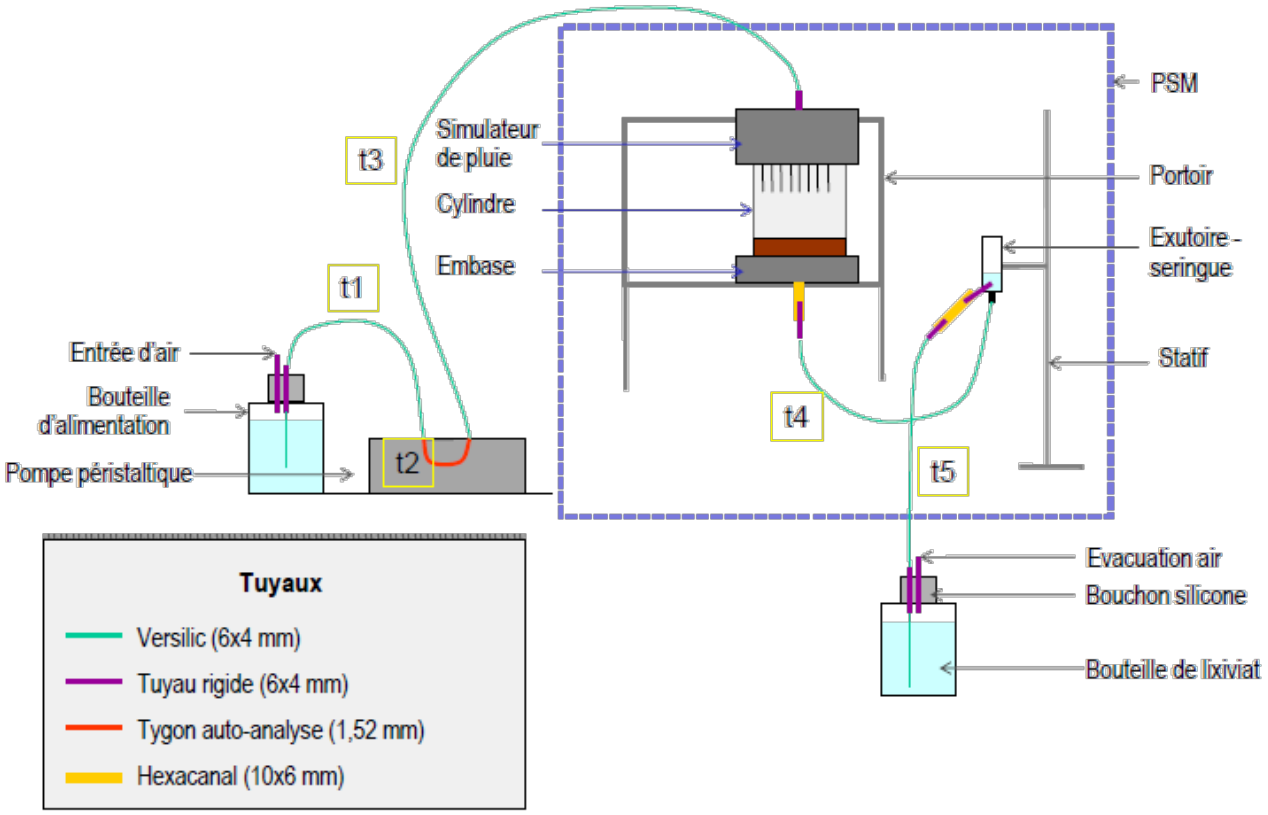


FIGURE D.1 – Schéma du montage

Préparation de la solution saline mixte Sous PSM, dans la zone stérile du bec bunsen, filtrer une quantité suffisante de chacune des solutions mères. Prélever les volumes indiquées ci-dessous avec des pipettes stériles de microbiologie de 2mL (CaN_2O_6 et NaCl) et 10 mL ($CaSO_4$).

Sel	CaN_2O_6, 4 H_2O	NaCl	$CaSO_4$, 2 H_2O
Volume (mL) de solution mère pour 1L	2	2	2
Concentration dans la solution de rinçage ($g.L^{-1}$)	0,3060	0,01756	0,02278

Refermer le flacon et homogénéiser.

Stérilisation par autoclave

- solution de rinçage
- eau stérile pour préparation solution de rinçage (prévoir 10 L par rinçage)
- bouteilles d'alimentation et de lixiviats
- parties du circuit préalablement assemblées, dans des sacs à autoclave séparés : [t1] + bouchon silicone ; [t3] ; [t4] + exutoire + [t5]
- contenants pour le séchage

Mode opératoire

Mise en route

Montage du dispositif de succion (sous PSM) Nettoyer l'embase avec un chiffon imbibé d'éthanol, et le cylindre en plexiglas (sensible à l'éthanol) avec de l'éthanol dilué à 50 Placer la toile inox sèche dans l'embase et la coincer avec un joint torique à l'aide d'une spatule. Placer le tour métallique autour du cylindre puis, en dessous, le deuxième joint torique. Placer les boulons dans les trous du tour métallique et serrer l'ensemble. Placer les trois petites purges. Poser l'embase sur le portoir.

Installer l'exutoire-seringue sur le statif. Connecter le tuyau vers la bouteille de lixiviats [t5]. Scotcher l'extrémité du tuyau [t4] sur le portoir, à hauteur de la toile inox. Remplir ce tuyau par l'autre extrémité à l'aide d'une seringue et une bouteille d'eau autoclavée de 250 mL. Connecter le tuyau [t4] à la sortie de l'embase. Régler le niveau d'eau à + 1 cm

(1 cm au dessus du niveau de la toile inox). Maintenir un niveau d'eau constant dans l 'exutoire en remplissant goutte à goutte à la seringue jusqu'à inonder toute la surface de la toile. Baisser le niveau de la seringue progressivement sur le statif en attendant à chaque étape que l'eau ait le temps de s'évacuer jusqu'à -10 cm. Laisser environ 30 minutes, puis vérifier que la dépression soit correctement maintenue (ni fuite, ni bulle dans les tuyaux).

Montage et remplissage du simulateur de pluie (sous PSM) Nettoyer avec un chiffon d'éthanol l'intérieur du simulateur de pluie Connecter le tuyau d'auto-analyse [t2] au tuyau d'alimentation [t1] d'une part et au tuyau d'entrée du simulateur d'autre part [t3]. Plonger l'extension du tuyau [t1] dans la bouteille d'alimentation en fixant le bouchon silicone préalablement assemblé. Amorcer le flux dans le circuit [t1 + t2 + t3] en aspirant avec une seringue de 50 mL à l'extrémité du tuyau [t3].

Remplissage du simulateur : Défaire 2 aiguilles diamétralement opposées. Placer le simulateur face aiguilles vers le haut. Remplir rapidement en plaçant la bouteille d'alimentation en hauteur. Vérifier la résorption de la bulle d'air. Lorsqu'elle est petite, replacer la bouteille au niveau du simulateur. Placer le tuyau d'auto-analyse [t2] sur un bras de la pompe péristaltique. Actionner la pompe au débit maximal. A la fin, chasser la bulle résiduelle : replacer une des aiguilles et incliner le simulateur du côté opposé. Une fois la bulle éliminée, baisser le débit, replacer la dernière aiguille et attendre l'apparition de gouttelettes. Arrêter la pompe. Placer le simulateur sur le cylindre.

Rinçage du système vide Lancer une pluie continue sur le système à vide pendant 30 minutes à débit maximum afin d'en éliminer le carbone résiduel. Faire un premier prélèvement à la fin de cette période pour avoir la valeur du C propre au système.

Rinçage du sol Poser le simulateur sur le support indépendant. Déverser le sol (agrégats conditionnés en sachets scellés) directement sur la toile inox. Entre chaque sachet versé, aplanir délicatement la surface à l'aide d'une spatule stérile. Reposer le simulateur sur le cylindre. Lancer une pluie continue de 8 $mm.h^{-1}$ soit 2 $mL.min^{-1}$ (correspondant à 21 $tr.min^{-1}$) pendant 60 heures. Faire un prélèvement à la fin (éventuellement des prélèvements intermédiaires pour suivre une cinétique). Renouveler régulièrement la solution de la bouteille d'alimentation en transvasant sous hotte. Vider par la même occasion la bouteille de lixiviat pour éviter un débordement.

Mesures

Mesurer le Carbone Organique Dissous à la fin du rinçage du sytème, après 1h de rinçage du sol et en fin de rinçage.

Prélèvement Prévoir une coupelle propre. Ouvrir la bouteille de lixiviat. Poser dans la coupelle le bouchon et ses tuyaux. Vider le lixiviat. Remonter le bouchon sur la bouteille. Laisser pleuvoir pendant quelques minutes, le temps d'obtenir un peu plus de 20 mL. Ouvrir la bouteille comme précédemment et verser le contenu dans un flacon. Conserver le prélèvement à 4°C.

Dosage du carbone organique en solution voir annexe I

Protocole d'arrêt

Drainage Arrêter la pompe péristaltique. Augmenter la dépression en baissant le niveau de l'exutoire par rapport à celui de la toile inox. Cette augmentation doit être progressive (par pas de 0,5 cm puis 1 à 2 cm) de manière à laisser l'échantillon s'équilibrer à chaque nouveau potentiel intermédiaire. On ne peut donc passer au pas suivant que lorsque l'échantillon s'arrête de goutter (ou que le débit est parait très faible). La dépression finale atteinte dépend du bon état de la toile, de son bon ajustement lorsqu'on la découpe et de son placement soigné dans l'embase lors du montage. On peut espérer atteindre une dépression de -60cm dans de bonnes conditions (max : -75 cm). Bien réussir cette étape permet de réduire le temps de séchage et de limiter les dommages sur la structure (plus fragile avec l'humidité et en limitant la manipulation d'homogénéisation).

Séchage Le sol est transféré dans un contenant intermédiaire, toujours sous PSM. Les contenants sont des plats à fond creux (type plat à gratin) fermés (recouvrir le plat contenant le sol par un couvercle ou un autre plat) pour sécher par équilibration avec l'air. Pour rendre le séchage plus efficace on doit homogénéiser délicatement à plusieurs reprises à l'aide d'une spatule. Le séchage peut durer 12 à 72h selon l'état de l'échantillon à la suite du drainage et la température ambiante.

Conservation des échantillons Prévoir des modalités de conservation permettant de maintenir des conditions stériles. Par exemple : conditionner le sol en plusieurs poches de 75 à 100g fermées hermétiquement en chassant l'air autant que possible (utilisation d'une soudeuse à plastique). Le conditionnement doit se faire sous hotte.

Nettoyage du système de rinçage

Sortir le matériel de sous la PSM dès qu'il n'est plus utilisé, au fur et à mesure des étapes après l'arrêt du rinçage.

– Vider le simulateur de pluie. Jeter les aiguilles dans une poubelle spéciale.

– Rincer grossièrement à l'eau les composantes de l'embase et du simulateur. Essuyer et passer un sopalin imbibé d'alcool sur les pièces en PVC, les joints, le tour métallique.
– Rincer à l'éthanol puis à l'eau distillée tous les tuyaux, les bouchons en silicone, l'exutoire-seringue, la toile inox. Laisser à l'air libre.
– Rincer à l'eau distillée la toile inox. La laisser tremper dans un bain d'éthanol. La rincer à nouveau à l'eau distillée.
– Laver les bouteilles au détergent (ex : TFD4).

Annexe E

Composition du milieu d'incubation : Solution Cardiff

Composé	**Concentration** ($mg.L^{-1}$)
$(NH_4)2SO_4$	1000
($MgSO_4$, 7 H_2O)	207
K_2HPO_4	1500
KH_2PO_4	500
$CaCl_2$	33,3
$ZnSO_4$,7 H_2O	0,02
($MgCl_2$, 4H2O)	0,001
H_3BO_3	0,0005
$CoCl_2$,6 H_2O	0,0025
$CuSO_4$	0,01
($NiCl_2$, $6H_2O$)	0,0005
($FeSO_4$, $7H_2O$)	0,025
EDTA	0,0125
Extrait de levure	5

Annexe F

Protocole d'incubation en milieu liquide

Principe

L'incubation en milieu liquide est une expérimentation basique pour étudier la cinétique de biodégradation d'un substrat par une souche bactérienne. Elle ne fait intervenir que les propriétés physiologiques des bactéries et leur capacité à croître en utilisant un substrat comme unique source d'énergie. Cette expérimentation donne une première idée de la durée de la cinétique et permet de tester l'influence de la variation des concentrations initiales de bactéries et de substrats. Variables mesurées : glucose, biomasse

Consignes de sécurité

Respect des règles de manipulation de souches biologiques Manipulations microbiologiques sous flux laminaire. Stérilisation de 15 mn au rayonnement UV et nettoyage des surfaces et du matériel à l'éthanol avant chaque manipulation. Travailler dans la zone de stérilité du bec bunsen pour de courtes durées, quand c'est possible. Gestion des déchets microbiologiques (voir paragraphe dédié)

Gestion des déchets Jeter les consommables souillés en poubelle de déchets microbiologique, à autoclaver.

Durée

4 jours

Modalités, répétitions

Pour étudier l'influence des concentrations de glucose et de bactéries, quatre concentrations de glucose (A :0,5 ; B :1 ; C :2,5, D :5 $mg.mL^{-1}$) et deux densités de bactéries (1 :1, 40.106 et 2 :1, 40.104 $CFU.mL^{-1}$) ont été croisées dans une première incubation, sans répétitions.

Les concentrations de 1,25 $mg.L^{-1}$ (E) en glucose et 6,8.104 $CFU.mL^{-1}$ (3) ont été imposées dans une autre incubation, cette fois en trois répétitions.

Matériel

Souche bactérienne : Cupriavidus necator JMP134 Milieux de pré-culture : milieu gélosé TY supplémenté en glucose

Substrat : glucose

Réactifs :
- Solution pour dosage de glucose (3,5-DNS)
- Eau stérile
- Solution Cardiff sans glucose (milieu nutritif pour l'incubation), voir annexe E.
- Solution Cardiff à 0,25 $g.L^{-1}$ de glucose (milieu pour la préparation de l'inoculum, les dénombrements)
- Gélose TY à 0,25 $g.L^{-1}$ de glucose (dénombrements)

Equipements Hotte à flux laminaire (Poste Sécurité Microbiologique), spectromètre, table d'agitation, chambre d'incubation

Préparatifs

- préparation de la solution de glucose (200 g.L-1)
- repiquage de la souche 2 à 4 jours avant l'incubation (en tubes de gélose TY à 0,25 g.L-1 de 2,4-D)
- préparation des milieux de croissance
- préparation des tubes de dilution et boîtes de Pétri pour dénombrement

Mode opératoire

Lancement de l'incubation

Préparation des milieux d'incubation Matériel : erlenmeyers 250 mL, coton, aluminium, éprouvette, autoclave, solution nutritive Cardiff sans glucose.

Mesurer 200 mL de solution Cardiff à l'éprouvette. Remplir les erlenmeyers. Boucher l'orifice avec du coton et couvrir avec une feuille d'aluminium. Autoclaver l'ensemble des erlenmeyers.

Préparation de l'inoculum (sous PSM) Matériel : souche repiquée, tubes stériles de 50 mL, pipettes jetables stériles, oses, spectromètre et cuves pour rayonnement visible, flacon de 100 mL de milieu Cardiff à 0,25 $g.L^{-1}$ de glucose, vortex, poubelle déchets microbiologiques.

Dans tube stérile de 50 mL, introduire 20 mL de milieu Cardiff et ensemencer avec la souche à l'aide d'une ose, vortexer. Prélever stérilement 2 mL d'inoculum à transférer dans une cuve spectrométrique. Mesurer la densité optique. Diluer dans des tubes stériles de manière à obtenir la valeur désirée, précédemment calculée d'après l'équation d'étalonnage pour approcher la concentration désirée pour l'inoculum. La relation d'étalonage suivante entre la concentration exprimée en $\log_{10}(CFU.mL^{-1})$ et la DO_{600} a été utilisée : C = DO_{600} x 1,062 + 8,137 (cf annexe J.) Conserver à 4°C en attendant l'inoculation.

Ajout de l'inoculum et de la solution de glucose (sous PSM) Matériel : pipetman, pipettes jetables stériles (2 et 5 mL), filtres stériles (0,2 μm), seringues 50 mL, flacon stérile, poubelle pour déchets microbiologiques, filtres (0,2 μm), flacon stérile, vortex, solution de glucose à 200 g.L-1, inoculum, erlenmeyers remplis de milieu stérile, table d'agitation, chambre d'incubation

Dans la zone de stérilité du bec bunsen, prélever la solution de glucose à la seringue et filtrer dans un flacon stérile. Homogénéiser l'inoculum au vortex. Retirer le bouchon d'un erlenmeyer. Prélever 1 mL d'inoculum à la pipette stérile et verser dans l'erlenmeyer. Reboucher. Homogénéiser en remuant légèrement. Faire l'apport pour tous les erlenmeyers. Procéder de la même manière pour apporter le glucose filtré. Le volume de l'apport dépend de la concentration finale souhaitée (0,5 à 5 mL pour des concentrations finales de 0,5 à 5 $mg.L^{-1}$). Installer sur table d'agitation en chambre d'incubation à 28°C.

Mesures non destructives Pas de temps entre deux mesures : de 2 à 10h.

Prélever 3 mL d'échantillon à la pipette stérile après avoir remuer délicatement l'erlenmeyer. Transférer dans une cuve spectrométrique pour le dosage de la biomasse. Verser le contenu de la cuve dans un pilulier et réaliser le dosage du glucose à partir de ce même échantillon

- Estimation de la concentration cellulaire par densité optique (voir annexe I)
- Estimation de la concentration cellulaire par dénombrement (voir annexe I) En fin de cinétique uniquement

Nettoyage Détruire la souche en autoclavant les erlenmeyers pleins, ainsi que les consommables souillés par la souche et les tubes de dilution et boîtes de géloses ensemencés lors du dénombrement

Annexe G

Protocole d'incubation de sol en suspension

Principe

On souhaite comparer les cinétiques de biodégradation d'un substrat soluble par une souche bactérienne dans deux milieux homogènes : une solution et une suspension pour vérifier si la présence d'une phase solide modifie les capacités métaboliques de la souche. Pour assurer des concentrations initiales similaires en bactéries et en substrat, les deux milieux sont stérilisés au préalable. Le sol est rincé avec un protocole spécifique pour éliminer le carbone organique dissous provenant du sol. Pour assurer un suivi spécifique de la biodégradation du substrat inoculé et pour faciliter ce suivi, un substrat radiomarqué est utilisé.

Variables mesurées : $^{14}CO_2$, CO_2 total, DO^{14}C, glucose, (biomasse, résidus non-extractibles).

Consignes de sécurité

Respect des règles de manipulation de radio-isotopes Manipulations avec gants nitriles, sur un plateau et avec une poubelle de paillasse dédiée. Nettoyage régulier avec sopalin imbibé d'éthanol Manipulation de la solution source dans aire contrôlée ^{14}C uniquement, dans réservoir pour contenir un renversement éventuel. Nettoyage des surfaces à l'éthanol après chaque manipulation, vérification de la radioactivité par frottis à l'éthanol et comptage des frottis. Incubations en chambre en aire contrôlée ^{14}C. Centrifugation en aire contrôlée ^{14}C. Démontage et nettoyage aire contrôlée ^{14}C. Gestion des déchets radioactifs (voir paragraphe dédié).

Respect des règles de manipulation de souches biologiques Manipulations microbiologiques sous flux laminaire. Stérilisation de 15 mn au rayonnement UV et nettoyage des surfaces et du matériel à l'éthanol avant chaque manipulation. Travailler dans la zone de stérilité du bec bunsen pour de courtes durées, quand c'est possible. Gestion des déchets microbiologiques (voir paragraphe dédié)

Gestion des déchets Trier les consommables souillés, réactifs et milieux de culture usagés :

- en contact avec la souche seulement : poubelle microbio, à autoclaver
- en contact avec des composés radioactifs : poubelle ^{14}C
- tri selon la radioactivité mesurées et la nature chimique des déchets liquides (soude et réactifs de dosage du glucose)

Durée

1 jour pour la mise le lancement, 7 jours pour l'incubation.

Modalités, répétitions : 7 modalités : 2 types de sol x 3 rapports massiques sol/liquide (1/1, 2/3 et 1/2) + 1 témoin correspondant à une incubation en solution. Toutes les modalités sont réalisées en triplicats (21 microcosmes). Les mesures destructives sont réalisées en fin d'incubation.

Matériel

Sol Deux types de sol ont été testés : luvisol de l'essai agronomique La Cage et un albeluvisol de l'essai QualiAgro de Feucherolles. Les deux sols ont au préalable été tamisés, stérilisés et rincés selon un protocole spécifique.

Souche bactérienne : *Cupriavidus necator* JMP134 Milieux de pré-culture : milieu gélosé TY supplémenté en glucose Masse initiale par échantillon : $1{,}24.10^7$ CFU apporté dans 1 mL (C=$1{,}24.10^8$ CFU.mL^{-1})

Substrat : glucose ^{14}C source : fournisseur : Amersham, solvant : eau +3% éthanol, année d'achat : 2002, pureté : 98%, stockage : 4°C, activité volumique : 444 000 DPM.μL préparation de la solution : préparation de solution de solution froide (sans marquage) à 259 g.L^{-1}. Prélévement de 10 mL et ajout de la molécule marquée. Homogénéisation manuelle et filtration (0,2 μm) en conditions stériles. Stockage à 4°C. Activité volumique mesurée : 35 000 DPM.mL^{-1}, concentration mesurée : 272 g.L^{-1} dont 0,1 g.L^{-1} de glucose ^{14}C. Masse initiale par échantillon : 272 mg apporté dans 1 mL Activité initiale par échantillon : 35 000 DPM

Réactifs Solution NaOH 10N, liquide scintillant Extractant : $Na_4P_2O_7$ (1 g.L^{-1}) Solution pour dosage de glucose (3,5-DNS) Eau stérile Solution Cardiff sans glucose (milieu nutritif pour l'incubation), voir annexe E. Solution Cardiff à 0,25 g.L^{-1} de glucose (milieu pour la préparation de l'inoculum, les dénombrements) Gélose TY à 0,25 g.L^{-1} de glucose (dénombrements)

Equipements Microcosmes : bocaux de 1 L (Le Parfait), erlenmeyers de 100 mL avec deux piluliers polypolylène 40 mL fixés avec de l'adhésif, anneaux en carton recouverts de papier aluminium pour le maintien de l'erlenmeyer balance de précision, pipetman, compteur à scintillation liquide, spectrophotomètre de paillasse, analyseur Skalaar, dessiccateur, taille d'agitation, chambre d'incubation.

Préparatifs

- préparation de la solution marquée
- repiquage de la souche 2 à 4 jours avant l'incubation (en tubes de gélose TY à 0,25 g.L^{-1} de 2,4-D)
- préparation des milieux de croissance
- préparation des tubes de dilution et boîtes de Pétri pour dénombrement
- autoclave pour stérilisation du matériel (notamment les microcosmes entiers et prêts à l'emploi)
- détermination de la teneur en eau massique du sol en sacrifiant un sachet stérile.

Mode opératoire

Mise en route

Apport du sol et les microcosmes (sous PSM) Matériel : sachets de sol rincé, balance de précision, spatules stériles, bocaux d'incubation

Porter des gants stériles. Sortir l'erlenmeyer du bocal, apporter une masse de sol humide correspondant à 10g de sol sec. Replacer l'erlenmyer dans le bocal et fermer.

Préparation de l'inoculum (sous PSM) Matériel : souche repiquée, tubes stériles de 50 mL (Falcon) , pipettes jetables stériles, oses, spectromètre et cuves pour rayonnement visible, flacon de 100 mL de milieu Cardiff à 0,25 g.L^{-1} de glucose, vortex, poubelle déchets biologiques, spectromètre visible réglé sur 600 nm.

Dans tube stérile de 50 mL, introduire 20 mL de milieu Cardiff et ensemencer avec la souche à l'aide d'une ose, vortexer. Prélever stérilement 2 mL d'inoculum à transférer dans une cuve spectrométrique. Mesurer la densité optique. Diluer dans des tubes stériles de manière à obtenir la valeur désirée, précédemment calculée d'après l'équation d'étalonnage pour approcher la concentration désirée pour l'inoculum (environ 2.10^8 CFU.mL^{-1}). La relation d'étalonage suivante entre la concentration exprimée en $\log_{10}$(CFU.mL^{-1}) et la DO_{600} a été utilisée : C = DO_{600} x 1,062 + 8,137 (cf annexe J).

Préparation de la soude à 1N (sous PSM) Matériel : un flacon stérile de 1L, 1L d'eau distillée stérile, éprouvette de 100 et de 50 mL stériles, une dispensette réglée sur 10 mL, une bouteille de NaOH commerciale à 32%.

Sous PSM, dans le flacon stérile, verser 92 mL de soude à 32% et 908 mL d'eau distillée stérile à l'aide des éprouvettes stériles, homogénéiser, positionner la dispensette et amorcer.

Ajout de milieu liquide, de l'inoculum et de la solution de glucose (sous PSM) Matériel : un plateau ^{14}C avec poubelle ^{14}C, solution de glucose 200 g.L^{-1}, filtres 0,2 μm, seringue 50 mL, flacon stérile, flacon de 250 mL d'eau distillée stérile, flacon d'inoculum, deux flacons de 500 mL de milieu Cardiff stérile, flacon de soude + dispensette préparés, cônes stériles, pipettes 5 et 10 mL, piluliers en verre 20 mL stériles, grande pince stérile, poubelle déchets microbiologiques.

Dans la zone de stérilité du bec bunsen, filtrer la solution avec la séringue dans le flacon stérile. Dans chaque bocal d'incubation : Ajouter du milieu Cardiff (10, 15 ou 20 mL selon les modalités), 1 mL d'inoculum et 1 mL de glucose dans l'erlenmeyer contenant le sol. Remuer délicatement. Ajouter 5 mL d'eau distillée dans un des piluliers fixés sur l'erlenmeyer Ajouter 10 mL de soude un pilulier en verre stérile et le placer dans l'autre pilulier fixé sur l'erlenmeyer. Fermer le bocal. Transférer en chambre d'incubation. Positionner l'ensemble des bocaux sur la table d'agitation. Régler l'agitation à vitesse 3.

Mesures non destructives

Fréquence : journalière

Mesures : $^{14}CO_2$ (comptage à scintillation liquide, voir annexe I)

CO_2 total (analyseur par titrage colorimétrique, voir annexe I) *Pas réalisé pour les résultats présentés ici.*

Prélèvement de 1 mL d'échantillon de soude pour le dosage du $^{14}CO_2$ puis conservation des piluliers de soude en dessiccateur avant le dosage du CO_2 total.

Mesures destructives

Dans les travaux présentés ici : en fin d'incubation.

Extraction (sous PSM) Matériel : flacons de centrifugation de 250 mL stériles, balance de précision, ciseaux, solution d'extraction ($Na_4P_2O_7$ à 1 $g.L^{-1}$), filtre 0,2 μm, flacon stérile plateau ^{14}C avec poubelle ^{14}C, pipette 5 mL, cônes stériles, bouchons pour piluliers de soude, pince stérile, éprouvette 100 mL stérilisée, vortex, table

Porter des gants nitrile. Filtrer dans un flacon stérile l'extractant. Prélever le pilulier de soude à l'aide de la pince stérile. Le boucher et le mettre de côté. Sur plateau ^{14}C, sortir l'erlenmeyer du bocal sur le plateau. Couper l'adhésif pour libérer les deux piluliers. Mesurer le volume nécessaire d'extractant avec l'éprouvette (80, 75 et 70 mL pour les modalités avec rapport sol/eau 1/2, 2/3 et 1/1 pour obtenir une dilution 10^{-1}.) Tarer avec un tube de centrifugation. Sur plateau, transvaser le contenu de l'erlenmeyer. Rincer avec un peu d'extractant. Verser l'extractant dans le tube de centrifugation. Homogénéiser longuement au vortex. Mettre à agiter sur agitateur rotatif pendant 10 minutes.

Estimation de la concentration bactérienne par dénombrement voir annexe I *Pas réalisé pour les résultats présentés ici.*

Centrifugation Matériel : centrifugeuse, balance de précision, piluliers en plastique refermables (50 mL) pour conservation éventuelle à -20°C, plateau et poubelle ^{14}C.

Porter des gants nitrile pour le risque radioisotopique. Centrifugation à 15000 RCF pendant 10 minutes. Sur balance tarée, transférer le surnageant dans un pilulier. Peser le surnageant et le tube de centrifugation contenant le culot humide. Mettre les tubes de centrifugation ouverts à l'étuve pour déshydratation (30°C).

Estimation de la concentration en DO^{14}C voir annexe I Dosage sur 1 mL d'échantillon.

Dosage du glucose en solution voir annexe I

Mesures des résidus non-extractibles voir annexe I *Pas réalisé pour les résultats présentés ici.*

Nettoyage

Nettoyage des instruments ayant servi lors de l'extraction ou des mesures avec un chiffon imbibé d'éthanol. Contrôle du nettoyage par frottis ^{14}C. Trempage de la verrerie souillée en bain détergent. Vérification de la radioactivité de tout le matériel et de la zone de travail (notamment PSM). Gestion des déchets comme indiqué plus haut.

Annexe H

Protocole d'incubation en milieu structuré

Principe

L'incubation avec ajustement du potentiel dans des microcosmes adaptés est destinée à l'étude des effets de la structure d'un échantillon liée à la diffusion entre des microorganismes et une source de substrat soluble non-colocalisés. La variation du potentiel hydrique est supposée affecter le temps de diffusion du substrat. Le sol est remanié pour obtenir une structure hétérogène répétable (agrégats de taille calibrée, assemblés en une galettes : Φ = 50 mm, H = 21 mm, M = 49,5g MS, ρ = 1,2 g.cm-3). Les agrégats ont été stérilisés au préalable pour inoculer des bactéries en une position spécifique. Une souche pure est utilisée pour garantir l'homogénéité des paramètres physiologique. Le substrat est une molécule soluble pure et radiomarquée, pour tracer ses transformations par les bactéries. Le suivi en cinétique comprend la mesure de la minéralisation mais aussi des mesures destructives. Les trois dates choisies (2h, 18h, 170h) représentent les conditions initiales (2 h) et finales (170 h) de l'incubation, ainsi que la période précédent la phase de croissance (18h).

Variables mesurées : $^{14}CO_2$, CO_2 total, concentration bactérienne, DO^{14}C, glucose, résidus non-extractibles.

Consignes de sécurité

Respect des règles de manipulation de radio-isotopes Manipulations avec gants nitriles, sur un plateau et avec une poubelle de paillasse dédiée. Nettoyage régulier avec sopalin imbibé d'éthanol Manipulation de la solution source dans aire contrôlée ^{14}C uniquement, dans réservoir pour contenir un renversement éventuel. Nettoyage des surfaces à l'éthanol après chaque manipulation, vérification de la radioactivité par frottis à l'éthanol et comptage des frottis. Incubations en chambre en aire contrôlée ^{14}C. Centrifugation en aire contrôlée ^{14}C. Démontage et nettoyage aire contrôlée ^{14}C. Gestion des déchets radioactifs (voir paragraphe dédié).

Respect des règles de manipulation de souches biologiques Manipulations microbiologiques sous flux laminaire. Stérilisation de 15 mn au rayonnement UV et nettoyage des surfaces et du matériel à l'éthanol avant chaque manipulation. Travailler dans la zone de stérilité du bec bunsen pour de courtes durées, quand c'est possible. Gestion des déchets microbiologiques (voir paragraphe dédié)

Gestion des déchets Trier les consommables souillés, réactifs et milieux de culture usagés :

- en contact avec la souche seulement : poubelle de déchets microbiologiques, à autoclaver,
- en contact avec des composés radioactifs : poubelle ^{14}C
- les milieux dans lesquels la souche a été cultivée après consommation du substrat marqué (boîtes de Pétri et tubes de dilution pour les dénombrements) : autoclave puis élimination en déchets ^{14}C
- tri selon la radioactivité mesurées et la nature chimique des déchets liquides (extraits, soude et réactifs de dosage du glucose)

Durée

1 jour pour la mise le lancement, 7 à 10 jours pour l'incubation. La procédure de lancement et les mesures après 2 h ne permettent pas de gérer un grand nombre d'échantillons (1 ou 2 à la fois).

Matériel

Sol Sol au préalable tamisé (2 – 3,15 mm de maille) à ≈18%, conditionné en sachets hermétiques (65 g MS par sachet) et stérilisé aux rayons γ. Du luvisol de l'essai agronomique La Cage a été utilisé. 49,5 g MS par échantillon.

Souche bactérienne : *Cupriavidus necator* JMP134 Milieux de pré-culture : milieu gélosé TY supplémenté en glucose Masse initiale par échantillon : ≈ 2.10^7 CFU apporté dans 100 μL (C = 2.10^8 CFU.mL^{-1})

Substrat : glucose ^{14}C

- source : fournisseur : Amersham, solvant : eau +3% éthanol, année d'achat : 2002, pureté : 98%, stockage : 4°C, activité volumique : 444 000 DPM.μL
- préparation de la solution : préparation de solution de solution froide (sans marquage) à 328g.L^{-1}. Prélèvement de 10 mL et ajout de la molécule marquée. Homogénéisation manuelle et filtration (0,2 μm) en conditions stériles. Stockage à 4°C.
- Activité volumique mesurée : 458 DPM.μL, concentration mesurée : 329 g.L^{-1} dont 0,1 g.L^{-1} de glucose ^{14}C.
- Masse initiale par échantillon : 50 mg apporté dans 150 μL
- Activité initiale par échantillon : 52 300 DPM

Réactifs Solution NaOH 10N, liquide scintillant Extractants : $CaCl_2$ (14,7 g.L^{-1}) $Na_4P_2O_7$ (1 g.L^{-1}) Solution pour dosage de glucose (3,5-DNS) Eau dégazée stérile Solution Cardiff sans glucose (milieu nutritif pour l'incubation), voir annexe E. Solution Cardiff à 0,25 g.L^{-1} de glucose (milieu pour la préparation de l'inoculum, les dénombrements) Gélose TY à 0,25 g.L^{-1} de glucose (dénombrements)

Equipements matériel pour construction des galettes (presse, cylindre et plaques en inox, moule en plexiglas) microcosmes, support pour manipulation sous hotte, supports pour incubation, statifs. vortex, balance de précision, pipetman, cutter, compteur à scintillation liquide, centrifugeuse, agitateur par retournement, spectrophotomètre de paillasse, oxidizer, broyeur à billes, étuve, analyseur Skalaar, dessicateur, bain thermostaté

Préparatifs

- préparation de la solution marquée
- repiquage de la souche 2 à 4 jours avant l'incubation (en tubes de gélose TY à 0,25 g.L-1 de 2,4-D)
- préparation des milieux de croissance
- préparation des tubes de dilution et boîtes de Pétri pour dénombrement
- saturation des plaques poreuses en les plaçant dans de l'eau sans les plonger complétement 24h, puis stérilisation par autoclave en les plongeant dans un bécher d'eau recouvert d'aluminium
- autoclave pour stérilisation du matériel et pour la stérilisation et le dégazage de l'eau
- nettoyage à l'éthanol des microcosmes (J-1)
- mesure de la teneur en eau d'un sachet stérilisé (un sachet pour toutes les incubations futures)
- installer le matériel nettoyé sous PSM (notamment la balance de précision)

Mode opératoire

Lancement de l'incubation

Prélèvement du sol et ajustement de l'humidité à 20,5% (sous PSM) Matériel : 2 cristallisoirs stériles, spatules stériles, sachets de sol stérilisé, pipette 1000 mL, cônes stériles, eau stérile, boîtes de Pétri stériles de Φ 14 cm

Prévoir une masse de sol frais supérieure à la masse nécessaire (un sachet de sol stérile par échantillon). Transvaser le contenu d'un sachet dans une boîte de Pétri. Installer la boîte de Pétri sur balance. Apporter la quantité d'eau stérile nécessaire pour atteindre la teneur en eau de 20,5%, goutte à goutte à la pipette en contrôlant la masse. Fermer la boîte et laisser 20 minutes. Homogénéiser délicatement à la spatule stérile.

Montage des microcosmes et mise à saturation (sous PSM) Matériel : microcosme, tuyaux, exutoire, vannes 3 voies, 2 plaques poreuses (dont une de secours), seringues stériles 50 mL, eau dégazée, portoir de manipulation, portoir d'incubation, mettre ruban (ajustement hauteur exutoire).

Assembler les différentes pièces des microcosmes en deux ensemble (embase + tuyaux ; cylindre + couvercle. Placer l'embase sur le portoir de manipulation. Mettre en eau les tuyaux : injecter de l'eau le niveau jusqu'à inonder le fond de l'embase (h= + 1 / +2 cm). Enfoncer une plaque poreuse saturée dans l'embase, vanne ouverte. Baisser la hauteur de l'exutoire pour obtenir h=0 cm. Recouvrir l'exutoire d'un parafilm percé d'un trou à l'aiguille. Fermer le couvercle du microcosme. Fermer la vanne 3 voies pour le transfert. Transférer le microcosme et l'installer hors PSM, sur un portoir d'incubation sur paillasse. Replacer l'exutoire à h=0 cm si nécessaire. Rouvrir la vanne.

Préparation de l'inoculum (sous PSM) Matériel : souche repiquée, tubes stériles de 50ml (Falcon) + support, pipettes jetables stériles, oeses, cuves spectrométriques + portoir, un flacon de 100 mL de milieu Cardiff à 0,25 g.L^{-1} de glucose, vortex, poubelle déchets biologiques, spectromètre visible réglé sur 600 nm

Dans tube stérile de 50 mL, introduire 20 mL de milieu Cardiff et ensemencer avec la souche à l'aide d'une ose, vortexer. Prélever stérilement 2 mL d'inoculum à transférer dans une cuve spectrométrique. Mesurer la densité optique. Diluer dans des tubes stériles de manière à obtenir la valeur désirée, précédemment calculée d'après l'équation d'étalonnage pour approcher la concentration désirée pour l'inoculum (2.10^8 CFU.mL^{-1}). La relation d'étalonnage suivante entre la concentration exprimée en $\log_{10}$(CFU.mL^{-1}) et la DO_{600} a été utilisée : C = DO_{600} x 1,062 + 8,137 (cf annexe J).

Préparation des colonnes de sol (sous PSM) Matériel : inoculum, presse, cylindre et plaques inox, moules plexiglass, balance de précision, spatules stériles, pipette 200 μL réglée (100 μL), cônes stériles, eau stérile

Sur la balance, placer le moule cylindrique sur une plaque inox et tarer. Verser dans le moule un quart de la masse totale (12,37 g sec). (Noter les masses exactes de sol pesées) Hors balance, ajouter les 0,1 mL d'inoculum à la pipette en nombreuses gouttelettes réparties le plus régulièrement possible et en évitant les bords. Sur la balance, ajouter le reste du sol en trois apport. Aplanir la surface avec le cylindre en inox. Placer l'ensemble dans la presse et presser à l'aide du poids métallique jusqu'à la hauteur préalablement marquée (21 mm). Couvrir la colonne avec un couvercle de boite de pétri stérile pour éviter le dessèchement de la colonne.

Mise en place de la colonne dans le microcosme (sous PSM) et mise à saturation (hors PSM) Matériel : microcosmes, portoir de manipulation, galettes dans cylindre, tournevis pour ouvrir les microcosmes, pipettes, cônes stériles

Ramener les microcosmes sur leur portoir sous PSM (vanne fermée pendant transfert). Ouvrir le microcosme par le bas à l'aide d'un tournevis (jonction embase / cylindre). Evacuer éventuellement l'excès d'eau avec une pipette. Placer la colonne (maintenue dans son moule plexiglass) sur la plaque poreuse du montage. Fermer le microcosme. Transférer hors PSM sur la paillasse. Réinstaller l'exutoire à h=0 cm et ouvrir la vanne. Laisser à saturation (h=0 cm) les galettes pendant 1 heure environ.

Ajustement des galettes au potentiel de travail (hors PSM) Descendre graduellement le niveau de l'exutoire jusqu'au potentiel souhaité. Par pallier de 5 cm toutes les 3 – 5 minutes de 0 à -30 cm et de 10 cm toutes les 3-5 minutes pour h<-30 cm Laisser équilibrer pendant 1 heure environ.

Préparation de la soude à 2N (sous PSM) Matériel sous PSM : piluliers polypropylène stérilisés (5 mL), un flacon vide de 20 mL stérile, un flacon de 50 mL d'eau distillée stérile, deux pipettes 5000 mL (l'une réglée sur 4,6 mL, l'autre sur 5 mL), une bouteille de NaOH commerciale à 32% (10N), cônes stériles, contenant stérile (boîte à cône vide).

Porter des gants nitrile (risque chimique) Dans le flacon stérile, verser 4,6 ml de soude 10 N et quatre fois 5 mL d'eau. Fermer et agiter. Prélever 5 mL de soude 2 N et verser dans pilulier. Boucher les piluliers. Les installer dans le contenant stérile.

Apport du glucose (sous PSM) Matériel : un plateau ^{14}C avec la solution de glucose ^{14}C et la poubelle ^{14}C, pipette 200 μL réglée (150 μL), cônes stériles, boîte de Pétri stérile (Φ 9 cm), poubelle déchets biologiques, microcosmes, tournevis, microcosme, portoir d'incubation, portoir de manipulation, grande pince à épiler.

Porter des gants nitrile (risque radioisotopique) Fermer la vanne d'arrêt. Transférer les microcosmes sous PSM sur portoir de manipulation. Ouvrir le microcosme le bas à l'aide du tournevis et poser le cylindre sur un couvercle de boite de pétri stérile. Ajouter 150 μL de solution de glucose ^{14}C, en gouttelettes réparties sur toute la surface, en évitant les bords. Fermer le microcosme. Retirer le bouchon de silicone du socle du microcosme. Ouvrir un pilulier de soude et l'insérer dans son support, par l'orifice central du couvercle. Replacer le bouchon de silicone. Transférer les montages en chambre d'incubation à 28°C. Réajuster la hauteur d'eau si nécessaire et ouvrir la vanne 3 voies.

Mesures en cinétique non destructives

Fréquence : journalière Préparer la soude 2 N sous PSM (voir étape 7 de mise en route) Préparer un plateau ^{14}C avec éthanol, sopalin, grande pince à épiler, gants nitriles. En chambre d'incubation, nettoyer le plateau, la pince, les gants à l'éthanol. Ouvrir la boîte contenant les piluliers, en ouvrir un. Ouvrir l'orifice central du couvercle du microcosme et insérer le pilulier dans son emplacement. Refermer rapidement l'orifice avec le bouchon en silicone. Réajuster la hauteur d'eau dans l'exutoire pour compenser les pertes par évaporation.

Dosage du $^{14}CO_2$ voir annexe I Prélever 1 mL et conserver les piluliers dans un dessiccateur avant analyse du CO_2 total.

Mesure du CO_2 total voir annexe I

Mesures destructives en cinétique

Dates de sacrifices : 2h, 18h, 170h

Découpe des galettes par tranche (sous PSM) Matériel : balance de précision, grande pince à épiler, bouchons de flacon à scintillation, flacons de centrifugation de 250 mL stériles, spatule stérile, cutter, cylindre en inox, plaques inox stériles, 3 boîtes de Pétri stériles de 140 mm,1 boîte de Pétri de 90 mm par galette, tournevis, plateau avec poubelle ^{14}C.

Sous PSM : Porter des gants nitrile pour le risque radioisotopique Fermer la vanne 3 voies. Transférer un microcosme sous PSM, en le plaçant sur le portoir de manipulation. Enlever le pilulier de soude, le boucher. Ouvrir le microcosme par le bas, à l'aide du tournevis. Saisir le moule et la galette et les déposer sur une plaque inox. Protéger avec une boîte de Pétri de 90 mm. Peser et annoter trois boîtes de Pétri de 140 mm vides. Disposer les deux parties d'une boîte. Basculer délicatement le moule à l'horizontal au dessus de l'une des deux. Placer le cylindre en inox à une extrémité et enfoncer

jusqu'à atteindre la première graduation (7 mm). Découper la tranche de galette dépassant du moule à l'aide du cutter. Ouvrir une nouvelle boîte et y déposer l'ensemble moule+galette+cylindre inox. Découper à la deuxième graduation au dessus de la boîte de Pétri. Déposer la troisième tranche dans la dernière boîte de Pétri. Peser chacune des tranches.

Extraction (sous PSM) Matériel : trois flacons stériles de 50 mL (Falcon) pour centrifugation, solutions d'extraction ($CaCl_2$ à 14,7 $g.L^{-1}$ et $Na_4P_2O_7$ à 1 $g.L^{-1}$), balance de précision, pipettes de 10 mL, cônes stériles, filtres 0,2 μm, vortex, flacons stériles.

Filtrer chacune des solutions d'extraction et les verser dans des flacons stériles. Tarer avec un flacon stérile et y ajouter le sol d'une tranche. Ajouter la même masse d'extractant (avec des proportions de 0,9 et 0,1 pour $Na_4P_2O_7$ et $CaCl_2$ respectivement). Fermer, peser la masse totale, vortexer longuement jusqu'à obtenir une suspension homogène. Mettre à agiter sur agitateur rotatif pendant 10 minutes.

Dénombrement voir annexe I

Centrifugation Matériel : centrifugeuse, balance de précision, piluliers en plastique refermables (50 mL) pour conservation éventuelle à -20°C, plateau et poubelle ^{14}C.

Porter des gants nitrile pour le risque radioisotopique Centrifugation des tubes de 50 mL à 15 000 RCF pendant 10 minutes. Sur balance tarée, transférer le surnageant dans un pilulier. Peser le surnageant et le tube de centrifugation contenant le culot humide. Mettre les tubes de centrifugation ouverts à l'étuve pour déshydratation (30°C).

Dosage du DO^{14}C (sous PSM) voir annexe I

Dosage du glucose (sous PSM) voir annexe I

Dosage du carbone organique marqué non extrait voir annexe I

Nettoyage

Nettoyage des plaques poreuses par trempage dans du méthanol dilués à 1/3 puis trempages successifs de l'eau. Nettoyage des microcosmes et des instruments ayant servi lors de l'extraction ou des mesures avec un chiffon imbibé d'éthanol. Contrôle du nettoyage par frottis 14C. Trempage de la verrerie souillée en bain détergent. Vérification de la radioactivité de tout le matériel et de la zone de travail (notamment PSM). Gestion des déchets comme indiqué plus haut.

Annexe I

Protocoles des méthodes de mesure utilisées dans les incubations microbiologiques

I.1 Estimations de la biomasse bactérienne

I.1.1 Estimation de la concentration bactérienne par numération cellulaire (dénombrement)

Principe Le dénombrement cellulaire permet de déduire la concentration cellulaire d'une solution en comptant des colonies millimétriques (en principe chacune issue de la multiplication d'une seule cellule) sur boîtes de gélose, après dilutions en cascade (de 10^{-1} à 10^{-9}) d'un extrait et culture sur boîtes pendant 72 h.

Conditions
- pour cultures en solution ou après extraction pour les milieux de culture comprenant du sol.
- avoir préparé au préalable les tubes de dilution et les boîtes de milieu gélosé
- sous PSM, dans la zone de stérilité du bec bunsen.

Matériel Extrait bactérien. Tubes de dilution contenant 9 mL de solution nutritive (Cardiff à 0,25 g.L^{-1} de glucose, voir annexe E.) Boîtes de gélose du même milieu de culture (milieu TY à 0,25 g.L^{-1} de glucose) Pipettes stériles de 2 mL de microbiologie et pipetman (ou pipette de chimie 1 mL et 200 μL, cônes stériles), râteaux stériles, vortex, étuve ou chambre thermostatée.

Mode opératoire Homogénéiser l'extrait bactérien au vortex. En prélever 1 mL et transférer dans un tube de dilution pour obtenir la dilution 10^{-1}. Homogénéiser au vortex. Prélever 1 mL de cette dilution et ajouter à un nouveau tube de dilution (10^{-1}). Procéder ainsi jusqu'à la dernière dilution. Pour chaque tube de dilution, procéder à l'ensemencement de trois boîtes de gélose. Homogénéiser le tube de dilution au vortex. Prélever 100 μL et déposer sur la gélose. Etaler au râteau la goutte. Retourner les boîtes ensemencées après 20 à 30 minutes. Mettre les boîtes à incuber à la température de croissance choisie (28°C) pendant 72 h. Compter le nombre de colonies pour les boîtes de 30 à 300 colonies.

Nettoyage, gestion des déchets Destruction de la souche inoculée par autoclavage des tubes de dilution, boîtes de gélose ensemencées, consommables ayant été en contact avec la souche. Si l'incubation implique l'emploi d'un substrat radiomarqué : vérification de la radioactivité dans l'autoclave, élimination des déchets autoclavés selon le niveau d'activité.

I.1.2 Estimation de la concentration bactérienne par densité optique

Principe Déduction de la concentration cellulaire en solution par la mesure de la turbidité de cette solution. L'absorbance du rayonnement à une longueur d'onde spécifique (600 nm) est proportionnelle à la concentration cellulaire selon la loi de Beer-Lambert.

Conditions
- pour les incubations en solution uniquement (sans matières turbides)
- avoir déterminé au préalable la relation entre concentration cellulaire et densité optique par dénombrement
- sous PSM, dans la zone de stérilité du bec bunsen

Matériel Spectrophotomètre, cuves spectrométriques pour rayonnement visible, pipettes stériles de microbiologie, pipetman, vortex.

Mode opératoire Régler le spectromètre à une longueur d'onde de 600 nm. Prélever 2 à 3 mL de milieu de croissance et transférer dans une cuve pour spectrophotomètre Homogénéiser l'extrait bactérien au vortex. En transférer 2 à 3 mL dans une cuve. Insérer la cuve de milieu dans le spectromètre et faire le blanc de mesure. Retirer la cuve et placer la cuve d'extrait bactérien. Lire l'absorbance. Si l'absorbance est supérieure à 1, diluer jusqu'à obtenir une densité optique inférieure à 1.

Nettoyage, gestion des déchets Stérilisation par autoclave des consommables ayant été en contact avec la souche. Si l'incubation implique l'emploi d'un substrat radiomarqué : vérification de la radioactivité dans l'autoclave, élimination des déchets autoclavés selon le niveau d'activité.

Etalonnage de la méthode d'estimation spectrométrique de la concentration cellulaire

Matériel Souche sur gélose (milieu TY à 0,25 g.L^{-1} de 2,4-D), repiquée 2 à 7 jours auparavant (délai idéal : 4 jours). Tubes de dilution (solution Cardiff à 0,25 g.L^{-1} de glucose) et boîtes de gélose (milieu TY à 0,25 g.L^{-1} de glucose) Tubes de dilutions primaires contenant 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mL de solution nutritive sans glucose (solution Cardiff à 0,25 g.L^{-1} de glucose) . Flacon de 200 mL de solution Cardiff à 0,25 g.L^{-1} de glucose Spectrophotomètre, cuves spectrométriques pour rayonnement visible, pipetman, pipettes stériles de 10 mL, pipettes stériles de 2 mL (ou pipette de chimie 1 mL et 200 μL, cônes stériles), râteaux stériles, vortex, étuve ou chambre thermostatée.

Mode opératoire Prélever à la pipette stérile 20 à 50 mL de solution Cardiff et transférer dans un flacon stérile. Ouvrir les tubes contenant la souche repiquée sur gélose. Prélever à l'oese du dépôt bactérien et ajouter à la solution Cardiff. Recommencer ainsi jusqu'à obtenir un trouble important correspondant à une densité optique supérieure à 1. Diluer avec du milieu Cardiff jusqu'à obtenir une DO_{600} de 1 exactement. Réaliser les dilutions primaires de 0,1 à 0,9 en complétant les tubes de dilutions primaires préremplis de milieu de culture à 10 mL. Réaliser le dénombrement à partir de chacune des dilutions primaires.

La relation d'étalonnage obtenue ici est présentée dans l'annexe J.

I.2 Carbone organique en phase liquide

I.2.1 Dosage colorimétrique du glucose

Principe Mesure colorimétrique de la concentration de glucose après ajout du réactif 3,5-DNS. La lecture de la densité optique se fait à une longueur d'onde de 530 nm.

Conditions

- sur solution de glucose ou après extraction au $CaCl_2$ et $Na_4P_2O_7$ pour les milieux comprenant du sol
- pour une gamme de concentration de 0,025 à 1,25 g.L^{-1}
- avoir étalonné au préalable la mesure à l'aide de dilutions d'une solution de glucose préparée
- sous sorbonne, avec gants nitrile (risque chimique)

Matériel solution de 3,5-DNS, eau distillée tubes à essai, bassine d'eau froide (4°C), bain thermostaté réglé à 100°C, pipette de 1 mL, pipette de 5 mL, vortex, spectrophotomètre, cuves spectrométriques, chronomètre

Mode opératoire Porter un bain marie à 100°C. Transférer 1 mL de surnageant dans un tube à essai, ajouter 1,5 mL de solution de 3,5-DNS, vortexer. Placer le portoir dans le bain marie réglé à 100°C et laisser 5 minutes exactement. Transférer dans un bain réfrigéré. Ajouter 7,5 mL d'eau dans chaque tube, vortexer et laisser reposer 15 minutes. Préparer de la même manière un blanc de dosage avec 1 mL d'eau distillée. Transférer 2-3 mL de chaque tube à essai dans une cuve spectrométrique et lire la DO_{530} après avoir fait le blanc de mesure.

Nettoyage, gestion des déchets Elimination en déchets chimiques corrosifs (vérification de l'activité au préalable dans le cas de glucose radiomarqué).

La relation d'étalonnage obtenue ici est présentée dans l'annexe J.

I.2.2 Dosage du carbone organique dissous (^{14}C)

Principe Un échantillon liquide est ajouté à une solution d'un composé scintillant (le liquide scintillant). Le scintillateur réagit aux désintégrations radioactives en émettant un rayonnement ionisant. Les photons émis lors du passage de l'échantillon sont détectées par un photodétecteur.

Matériel Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2100TR (Packard), Liquide scintillant (Ultima Gold XR), flacons polypropylène de 20 mL, pipette, cônes

Mode opératoire Homogénéiser l'extrait. En transférer 1 ou 2 mL dans un pilulier. Ajouter 10 mL de liquide scintillant. Agiter. Faire un blanc de mesure avec de l'eau. Insérer dans le compteur et lancer la procédure de comptage.

Nettoyage, gestion des déchets Jeter les piluliers fermés en déchets radiochimiques solides.

I.2.3 Dosage du carbone organique dissous (non marqué)

Principe La concentration en carbone d'un échantillon liquide est dosée par mesure du rayonnement infrarouge émis lors de la production de CO_2 lors de sa combustion à haute température. L'analyse est automatisée. L'analyseur comprend un menu de commande, un passeur d'échantillon et préleveur, un catalyseur et le capteur mesurant l'émission de rayonnements infra-rouge.

Conditions sur échantillons liquides dépourvus de matières en suspension

Matériel Analyseur TOC analyzer 5050A Shimadzu (module liquide), tubes de 6 mL, parafilm, solutions de référence de carbone organique (hydrogénophtalate de potassium à 1 $g.L^{-1}$) et de carbone inorganique (bicarbonate de sodium à 1 $g.L^{-1}$), eau distillée.

Mode opératoire Respecter la procédure d'utilisation de l'appareil. Verser 5 mL d'échantillon par tube et protéger avec un parafilm. Placer les tubes dans le carrousel après trois tubes comprenant les solutions de référence et de l'eau distillée. Spécifier dans le menu la gamme de concentration supposée des échantillons. L'étalonnage fait l'objet d'une procédure particulaire. Il est gardé en mémoire une fois réalisé et n'a pas à être recommencé avant chaque analyse.

Nettoyage, gestion des déchets Vidange des échantillons à l'évier (échantillons non radiomarqués). Rinçage des tubes à l'eau distillée.

I.3 Dioxyde de carbone

I.3.1 Dosage du dioxyde de carbone radiomarqué ($^{14}CO_2$)

Principe Mesure du $^{14}CO_2$ issu de la biodégradation d'un substrat radiomarqué, capté dans une solution de soude par réaction acido-basique. Mesure de la radioactivité de la soude par comptage des scintillations liquides.

Matériel Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2100TR (Packard), Liquide scintillant (Ultima Gold XR), flacons polypropylène de 20 mL, pipette 1 mL, cônes

Mode opératoire Homogénéiser l'extrait. En transférer 1 mL dans un pilulier. Ajouter 10 mL de liquide scintillant. Agiter. Faire un blanc de mesure avec de l'eau.

Garder les piluliers à compter à l'obscurité pendant 6 heures minimum. Insérer dans le compteur et lancer une procédure de comptage adaptée aux échantillons contenant de la soude.

Nettoyage, gestion des déchets Conservation éventuelle des échantillons dans un dessiccateur avant mesure du CO2 total. Jeter les piluliers de comptage fermés en déchets radiochimiques solides. Jeter les échantillons en déchets radiochimiques liquides selon le niveau d'activité mesuré.

I.3.2 Dosage du dioxyde de carbone total ($^{12}CO_2$ + $^{14}CO_2$)

Principe Le piégeage du CO_2 dans les microcosmes implique la formation de carbonates de Sodium (Na_2CO_3) résultant d'une réaction acido-basique entre le CO_2 et la soude (NaOH). L'analyse par titrage colorimétrique consiste à provoquer la libération du CO2 capté par réaction des ions Na_2CO_3 avec un acide fort (H_2SO_4). Le CO_2 est alors capté à nouveau dans une solution carbonate-bicarbonate contenant un indicateur coloré (la phénolphtaléine) sensible à la diminution du pH. L'intensité de décoloration est mesurée par densité optique à 550 nm. Elle est proportionnelle à la concentration de CO_2 selon la loi de Beer-Lambert. L'analyse est automatisée grâce un ordinateur coordonnant notamment un passeur d'échantillons et préleveur, une pompe péristaltique délivrant l'échantillon et les réactifs, un spectrophotomètre.

Matériel Analyseur CO_2 (Skalar : sampler 1000, Pompe péristaltique 6010, Photomètre 6010), godets, parafilm, solutions pour l'analyse : H_2SO_4 50 $mol.L^{-1}$, H_2SO_4 3 $mol.L^{-1}$, tampon carbonate-bicarbonate, soude 6 $mol.L^{-1}$, anti-mousse Skalar, Brij 35 Skalar, phénolphtaléine 1%, solutions étalon Na_2CO_3, eau distillée

Mode opératoire Suivre la procédure d'utilisation de l'analyseur. Verser 2 à 3 mL d'échantillon dans un godet. Protéger avec du parafilm. Procéder à l'analyse des godets d'échantillons après des solutions de Na_2CO_3 étalon sur une gamme restreinte de concentrations. Si la concentration mesurée s'avère hors-gamme, diluer l'échantillon ou l'analyser ultérieurement avec une calibration plus adaptée.

Nettoyage, gestion des déchets Jeter les piluliers de comptage fermés en déchets radiochimiques solides. Jeter les échantillons en déchets radiochimiques liquides selon le niveau d'activité mesuré.

I.4 Carbone organique en phase solide

I.4.1 Dosage du carbone organique ^{14}C non extrait

Principe La fraction non extraite du carbone issu de la transformation du substrat marqué est dosée en mesurant l'activité présente dans le culot de centrifugation. Le ^{14}C est dosé par analyse après oxydation catalytique. Le ^{14}C libéré par combustion à haute température sous flux continu d'oxygène puis entraîné par un flux d'azote et piégé par barbotage dans un mélange contenant du liquide scintillant. L'analyse est automatisée grâce à un appareil comprenant un menu de commande, un passeur d'échantillon, une chambre de combustion, un circuit contrôlant les flux gazeux (O_2, N_2) et délivrant la solution de liquide scintillant à doser.

Conditions pour les milieux contenant du sol, après extraction et séchage du culot en étuve (30°C)

Matériel broyeur à billes, oxidizer (OX-700, Zinsser), oxysolve C-400, compteur à scintillation liquide, nacelles céramique, sol témoin déshydraté et broyé, solution radiomarquée de référence, dessiccateur, balance de précision.

Mode opératoire Broyage : Après déshydratation complète en étuve, peser les tubes contenant le culot sec. Racler tout le contenu du tube à l'aide d'une spatule. Broyer pendant 10 minutes au broyeur à billes pour réduire le culot en poudre.

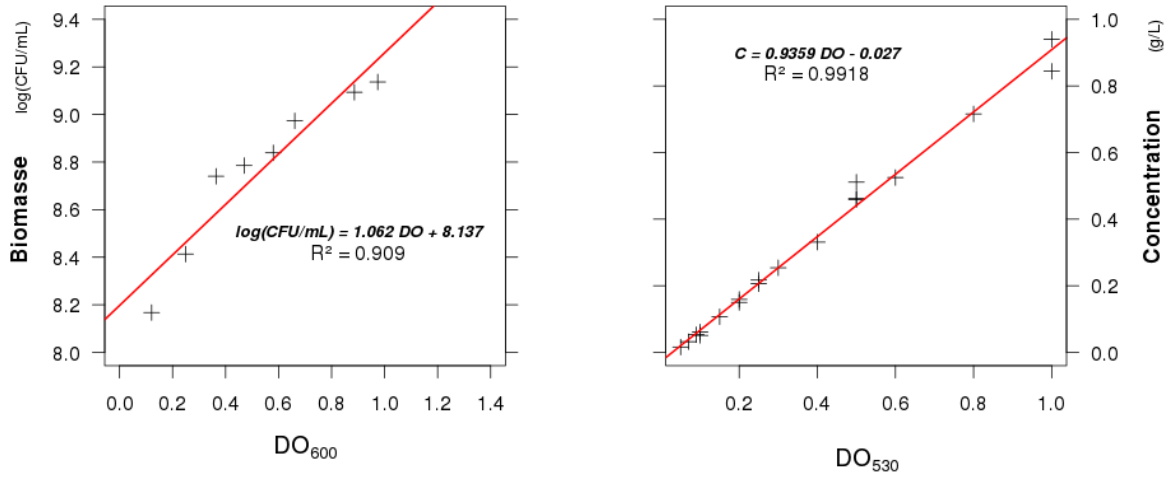
Préparation des échantillons pour calcul du rendement d'oxydation : Peser 500 mg de sol témoin sur une nacelle à combustion et y ajouter 250 μL d'une solution de référence (avec activité connue). Laisser en dessiccateur jusqu'à évaporation complète du liquide.

Combustion et dosage des échantillons et des témoins référence : Préparer deux nacelles par échantillon contenant 500 mg de culot broyé. Suivre la procédure d'utilisation de l'analyseur. Collecter les flacons d'analyse et les doser au compteur à scintillations liquides.

Nettoyage, gestion des déchets Jeter les piluliers de comptage fermés en déchets radiochimiques solides. Jeter les échantillons solides en déchets radiochimiques solides selon le niveau d'activité.

Annexe J

Relations d'étalonnage des mesures de dosage du glucose et de la biomasse par méthode spectrométriques



(a) (b)

FIGURE J.1 – **des mesures de dosage spectrométrique de la biomasse (a) et du glucose (b).**