HAL
open science

Etude multi-echelles des réactions de dénitrification dans les aquifères hétérogènes: Approches expérimentales de l'influence des écoulements sur la réactivité biogéochimique

Alexandre Boisson

To cite this version:

Alexandre Boisson. Etude multi-echelles des réactions de dénitrification dans les aquifères hétérogènes: Approches expérimentales de l'influence des écoulements sur la réactivité biogéochimique. Hydrologie. Université Rennes 1, 2011. Français. NNT : . tel-00593708

HAL Id: tel-00593708

https://theses.hal.science/tel-00593708v1

Submitted on 17 May 2011

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.

N° d'ordre : 4309 **ANNÉE 2011**

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Sciences de la Terre

Ecole doctorale Sciences de la Matière

présentée par

Alexandre BOISSON

préparée à l'unité de recherche (UMR 6118 CNRS)
(Géosciences Rennes)
(U.F.R Structure et Propriété de la Matière)

Etude multi-échelles des réactions de dénitrification dans les aquifères hétérogènes :

Approches expérimentales de l'influence des écoulements sur la réactivité biogéochimique

Thèse soutenue à Rennes le 20 Janvier 2011

devant le jury composé de :

Hélène PAUWELS
Chercheur - chef de projet BRGM / *rapporteur*

Philippe ACKERER
Directeur de recherche CNRS – Univ. Strasbourg / *rapporteur*

Anniet LAVERMAN
Chargée de recherche CNRS Univ-Paris 6 / *examinateur*

Philippe DAVY
Directeur de recherche CNRS – Univ-rennes 1 / *examinateur*

Gilles PINAY
Professeur Univ Birmingham / *examinateur*

Luc AQUILINA
Professeur Univ. Rennes 1 / *directeur de thèse*

Olivier BOUR
Professeur Univ. Rennes 1 / co-*directeur de thèse*

Remerciements

Cette thèse n’aurait pu aboutir sans la participation de personnes que je tiens ici à remercier.

Je remercie tout particulièrement mes directeurs de thèse Luc et Olivier avec qui j’ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Ils ont su m’orienter, me motiver et ont su supporter un certain nombre de mes aprioris négatifs sur mes résultats expérimentaux et ainsi m’aider à ouvrir les yeux en mettant valeur mon travail. Merci pour ces échanges scientifiques et personnels qui m’ont permis de construire ce travail.

Je tiens à remercier tous les membres de l’équipe EAU au sein de laquelle j’ai eu beaucoup de plaisir à travailler durant ce doctorat notamment Tanguy, Jean-Raynald et Philippe qui grâce à leurs réflexions et conseils m’ont aidé dans l’orientation de mes recherches.

Ce travail se concluant par une soutenance, je souhaite remercier les membres du jury qui grâce aux échanges et remarques m’ont donné l’envie de poursuivre au delà de ce doctorat.

Je tiens aussi à remercier Mr Jean Pierre, Odile, Thierry, Nico, Martine et Patrice qui ont toujours été présents pour m’aider, me conseiller dans la réalisation des nombreuses analyses et manips, ils ont contribué à faire avancer cette thèse.

Merci à toute ma famille qui m’a toujours soutenu, s‘est inquiétée à ma place et tout particulièrement à mes grands parents qui m’ont donné l’envie et la motivation de faire un travail que j’aime.

Je tiens aussi à remercier les personnes qui n’ont pas toujours aidé à une production scientifique efficace et directe mais qui ont en revanche été très actifs dans le déroulement de cette thèse. Je pense tout particulièrement à la Droub, Kéké et Stéphane qui, en allant boire "juste une bière rapidement" m’ont permis de nombreuses fois de décompresser. Merci à Virgi qui m’a donné la motivation, l’énergie et la confiance pour réaliser ce travail. Merci aussi à Pietro et sa cuisine Italienne ainsi qu’à Etienne et sa cuisine par téléphone qui en plus de me nourrir m’ont permis de finir dans des conditions agréables. Je remercie aussi les "geeks" Seb et Jeremy qui en plus des bons moments m’ont aussi évité d’immoler mon matériel informatique. Merci aussi à cette équipe du troisième Morgane, Clément, Rebecca, Anne, Remi, Thibault et les autres qui en plus de m’apporter le café permettant un travail

efficace à tout moment de la journée ont aussi été les sources de nombreuses discussions scientifiques (notamment sur la dissolution du sucre). Merci aussi à tous les autres doctorants, Cristoff, Eline, Claudine, Fabien, Gwen, Jo…qui font de Géosciences un laboratoire particulièrement agréable.

Même si leur intérêt pour les sciences de la terre est limité, je remercie aussi les Lorientais, Ptit Lo, Seb, Gawelle, Steven, Marco, Fanch… qui m'ont de nombreuses fois permis de changer d'air et de aplonger dans la mer. Merci aussi à Annaig pour son aide dans la préparation de cette soutenance.

Pour conclure, cette thèse bien qu'ayant comporté de nombreux moments difficiles déjà en partie oubliés, a été grâce à ces nombreuses rencontres un moment agréable et enrichissant de ma vie.

Résumé / Abstract

Résumé

L'effet de l'hétérogénéité du milieu physique sur le transport de solutés dans les eaux souterraines est bien connu, mais le couplage avec les processus biochimiques en milieu hétérogène est un problème plus complexe générant des processus non linéaires dépendants de la nature du milieu et des cinétiques de réactions. Certaines réactions telles que la dénitrification font intervenir une activité biologique pour laquelle l'influence des conditions de transport reste peu connue. Cette étude cherche à caractériser l'influence des vitesses d'écoulement sur la réactivité. Les mécanismes contrôlant les processus biogéochimiques sont dépendants de l'échelle d'étude. A l'échelle d'un tube de diamètre 2 mm, où une réaction de dénitrification s'opère sous différentes contraintes d'écoulement, les expériences montrent tout d'abord un contrôle biologique de la réactivité qui devient par la suite un contrôle physique pouvant s'expliquer par des phénomènes de diffusion au sein du biofilm formé. A l'échelle d'un milieu poreux ces travaux ont permis d'identifier une réaction de dénitrification incluant de la biotite comme donneur d'électron. A l'échelle du site des essais de push-pull ont permis de quantifier les cinétiques de dégradation des nitrates ainsi que les cinétiques de production des sous produits de réaction tels que le protoxyde d'azote. Ces informations permettent d'estimer l'influence de cette réaction à l'échelle du site. Ces travaux permettent d'améliorer des connaissances sur la réactivité dans les aquifères à différentes échelles.

Mots clés : Dénitrification ; Push-pull test ; Hydrogéologie ; Biogéochimie ; Biofilms

Abstract

Impact of physical heterogeneity on solute transport in groundwater is well known. However, the links with biogeochemical processes are more complex and create non linear processes dependent on the media's structure and the reaction kinetics. Some reactions such as denitrification are controlled by biological activity. The influence of transport properties on these processes is not clearly known. This study aims at characterizing the influence of flow velocity on reactivity at different scales. At the scale of a 2 mm diameter tube, where a denitrification reaction occurs, experiments shows a biologically controlled reaction which becomes with time physically controlled. Diffusion properties inside the developed biofilm seem to explain the observed concentrations. In porous media, biotite-related denitrification has been observed. At field scale, push-pull test allowed to quantify the effect of reaction kinetics on nitrate degradation and nitrous oxide formation. This field information allows assessing the influence of this reaction at field scale. This work improves the knowledge on reactivity in groundwater at multi-scales.

Keywords: Denitrification; Push-pull test; Hydrogeology; Biogeochemistry; Biofilms

Table des matières

Introduction générale **5**

Contexte et problématiques de l'étude **9**

I. Echelles représentatives 11

II. Réduction des nitrates 13

III. Populations bactériennes dans les milieux souterrains 17

IV. Interactions entre biofilms et écoulements 20

V. Implications à l'échelle du site 23

VI. Objectifs 24

PARTIE I:

Influence de l'hydrodynamique sur une réaction de dénitrification hétérotrophe à l'échelle du pore **27**

Chapitre 1 : Mise en place d'un protocole d'étude de l'influence de l'hydrodynamique sur la réactivité biogéochimique à méso-échelle **29**

I. Introduction 29

II. Dispositifs expérimentaux existants 30

III. Choix du dispositif expérimental 33

IV. Expérimentation en batch – Validation de la réaction 40

V. Dispositif expérimental en flux continu 50

VI. Conclusion 54

Chapitre 2 : Impact de la vitesse d'écoulement sur les processus de dénitrification à meso-échelle. Résultats expérimentaux et modélisation **55**

Résumé de l'article 55

Article: Flow velocity impact on denitrification process at the pore-scale: experiment and modelling 57

Chapitre 3 : Stabilisation de la réactivité dans une expérience à l'échelle du pore sous contraintes dynamiques **81**

Résumé de l'article 81

Article: Results of cyclic variations of hydrodynamic conditions on reactivity processes in long term pore-scale experiments 83

Chapitre 4 : Mise en place et évolution d'un front de réaction à méso-échelle **103**

I. Introduction 103

II. Suivi continu de l'évolution des concentrations en sortie de tuyaux 104

III. Evolution des profils de concentration dans les tuyaux 105

IV. Evolution du carbone organique produit 111
V. Evolution des concentrations en nitrites 114
VI. Influence du chemiotaxisme 115
VII. Discussion – développement d'un modèle conceptuel 117
VIII. Conclusion 119
Conclusions et perspectives 121
I. Conclusion 121
II. Perspectives 123

PARTIE II:

Réactions de dénitrification autotrophe à l'échelle du site 127
Chapitre 1 : Contexte local et caractérisation des sites d'étude 129
I. Introduction 129
II. Le site de Ploemeur-Kermadoye 129
III. Caractérisation du site de Loyan 135
IV. Modèle conceptuel du site de Loyan 147
Chapitre 2 : Mesure en continu in situ des concentrations en nitrates dans les eaux souterraines par spectrophotométrie 149
I. Introduction 149
II. Techniques et mesures des nitrates *in situ* 150
III. Présentation des sondes utilisées 154
IV. Validation en laboratoire des mesures de la sonde S::CAN 158
V. Utilisation in situ des sondes 165
VI. Conclusion 169
Chapitre 3 : Etude des réactions de dénitrification autotrophes en batchs 171
I. Introduction 171
II. Matériel et méthodes 174
III. Résultats 177
IV. Discussion – Batchs 186
V. Dispositif dynamique 192
VI. Conclusion 195
Chapitre 4 : Quantification d'une dénitrification autotrophe par essai de "Push-Pull" réactif 197
I. Introduction 197
II. Matériel et méthodes 202

III. Résultats 209
IV. Discussion 229
V. Conclusion 232
Conclusion 233
Conclusions générales 235
et perspectives 235
Conclusions générales 237
Perspectives générales 239
Annexes 245
Annexe 1 : Données de diagraphies et de tests d'interférences sur le site de Loyan . 247
Annexe 2: Compléments d'informations sur le chapitre : Identification de la dénitrification autotrophe sur le site de Ploemeur 251
Annexe 3 : Modèle numérique d'écoulement sur le site de Ploemeur 263
Table des figures 269
Références 277

Introduction générale

Introduction

En raison de quantités limitées et de pollutions nombreuses, l'eau douce est une ressource subissant de fortes pressions. D'un point de vue quantitatif, les eaux souterraines présentent une grande partie des eaux douces utilisables. Cependant, les possibilités d'extraction sont très variables allant des aquifères poreux sédimentaires relativement homogènes où l'extraction de grandes quantités est aisée, à de petits aquifères fracturés de roches cristallines. En raison de développements industriels, une part de plus en plus importante de cette ressource fait l'objet de pollutions nombreuses et variées. Elles vont de la pollution ponctuelle (ex: présence d'hydrocarbures dans les nappes) à des pollutions plus diffuses telles que celles générées par l'agriculture (ex: nitrates) ainsi qu'à une surexploitation de la ressource pour l'irrigation accélérant les processus géochimiques naturels d'érosion (cas du fluor en Inde).

Ces problèmes, à la fois quantitatifs et qualitatifs, imposent une gestion raisonnée de la ressource. Ceci passe par des connaissances précises des milieux et des réactions chimiques se déroulant dans les aquifères. Dans une large gamme de cas, les réactions chimiques dans les aquifères sont contrôlées par des communautés biologiques. L'amélioration des connaissances dans ce domaine passe donc par un approfondissement des connaissances sur le couplage entre les propriétés physiques du milieu (structure des écoulements), la chimie du milieu (type de réaction) et le fonctionnement biologique (catalyse et contrôle des réactions par les activités biologiques). La complexité du système est de plus liée à des effets d'échelles. En effet, alors que l'exploitation d'un aquifère nécessite des connaissances à une échelle macroscopique (plusieurs kilomètres), l'hétérogénéité du milieu influe sur les réactions chimiques à méso-échelle (quelques cm à quelques centaines de mètres) alors que le contrôle microbien opère à micro-échelle (µm).

Pour explorer le couplage physique - biogéochimie, nous nous sommes intéressés tout d'abord au cas du comportement des nitrates et de leur atténuation par des réactions de dénitrification à l'échelle d'un pore de 2 mm de diamètre. Par la suite nous nous sommes intéressés à l'identification plus précise de la réaction à l'échelle d'un milieu poreux reconstitué (échelle de 50 cm) avant d'évaluer les cinétiques de réaction dans le cadre d'aquifères de socles fracturés (échelle de 1 à 100 m).

Nous présenterons dans un premier temps le contexte de l'étude et ses objectifs. Il ne s'agit pas d'une analyse exhaustive des réactions de dénitrification, des processus microbiens ayant cours ou des aquifères fracturés mais vise à présenter au lecteur les concepts utilisés dans cette étude. Le document est ensuite divisé en deux parties. La première partie du document explore une réaction synthétique entre de l'eau du site de Ploemeur (Site de l'observatoire H^+) et le substrat carboné de tubes plastiques sous différentes contraintes d'écoulements. Bien que cette réaction soit différente de celles qui se déroulent sur le site, les processus analysés dans ces expériences de laboratoire sont représentatifs de comportements observables sur site. La seconde partie est centrée sur une réaction de dénitrification autotrophe entre l'eau et la roche du site d'étude. Cette partie présente les sites d'études puis les développements méthodologiques via l'utilisation de spectrophotomètres de terrain qui permettent un suivi long terme en continu ainsi que de la réalisation de profils de concentration pour avoir une information temporelle et spatiale nécessaire à la compréhension des processus à différentes échelles. Cette partie comprend de plus des expérimentations à une échelle de quelques centimètres (batchs et colonnes) qui permettent d'identifier les réactions de dénitrification ayant lieu sur le site. Cette partie se termine par des mesures in situ des taux de réaction par essai de "push-pull". Ceci permet d'évaluer par la suite l'impact de ces réactions à l'échelle du site et de quantifier le contrôle qu'elles exercent sur les concentrations en nitrates observées.

Bien que cette étude soit focalisée sur la dégradation des nitrates dans les aquifères fracturés, les applications de ces travaux sont plus larges et peuvent être transposées à d'autres types de milieux ainsi qu'à d'autres réactions. Le point principal est le couplage entre les aspects physiques des écoulements et la réactivité chimique liée à des activités biologiques. Ce type de couplage participe fondamentalement à tous les processus biogéochimiques des milieux hétérogènes complexes et recouvre donc un ensemble extrêmement vaste d'applications, des zones humides au confinement des déchets nucléaires.

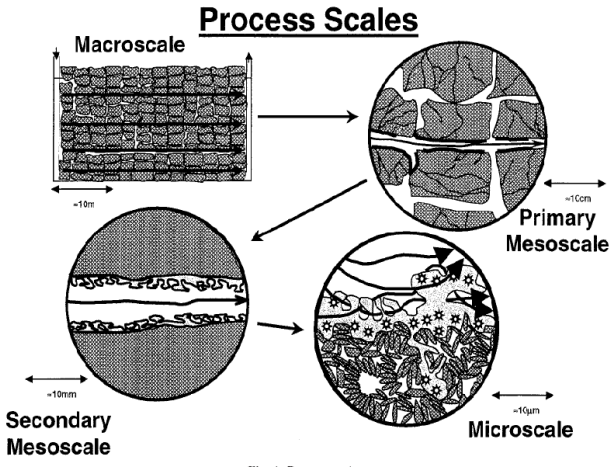
Contexte et problématiques de l'étude

Contexte et problématiques de l'étude

Pour introduire les problématiques de cette étude, il est nécessaire de définir la réaction de dénitrification et les interactions entre flux et biofilms bactériens. La description de ces éléments amènera à discuter les implications à l'échelle du site et les objectifs de cette étude. Les aspects bibliographiques spécifiques aux chapitres des différentes parties seront discutés au sein de ces chapitres.

I. Echelles représentatives

Les aspects fondamentaux de l'atténuation naturelle de composés et de la bioremédiation sont des phénomènes multi-échelles. Ils sont généralement étudiés à l'échelle du laboratoire et nécessitent par la suite une augmentation d'échelle par le biais d'homogénéisations pour être appliqués à l'échelle du site. Dans les milieux fracturés, en raison d'une forte hétérogénéité structurelle, certaines hypothèses d'homogénéisation ne sont pas valables. Il a notamment longtemps été considéré comme impraticable d'effectuer des bioremédiations dans ces milieux (Hiscock et al., 1991; Howard, 1985). Effectivement dans ces milieux hétérogènes, une répartition uniforme des bactéries et des réactifs est impossible car la géologie et les écoulements influent sur cette répartition (Murphy et al., 1997). Il est donc essentiel de définir les processus dominants (physiques, chimiques et biologiques) ainsi que les phénomènes limitants à différentes échelles. Ces échelles peuvent être définies de la façon suivante (Tompkins et al., 2001).



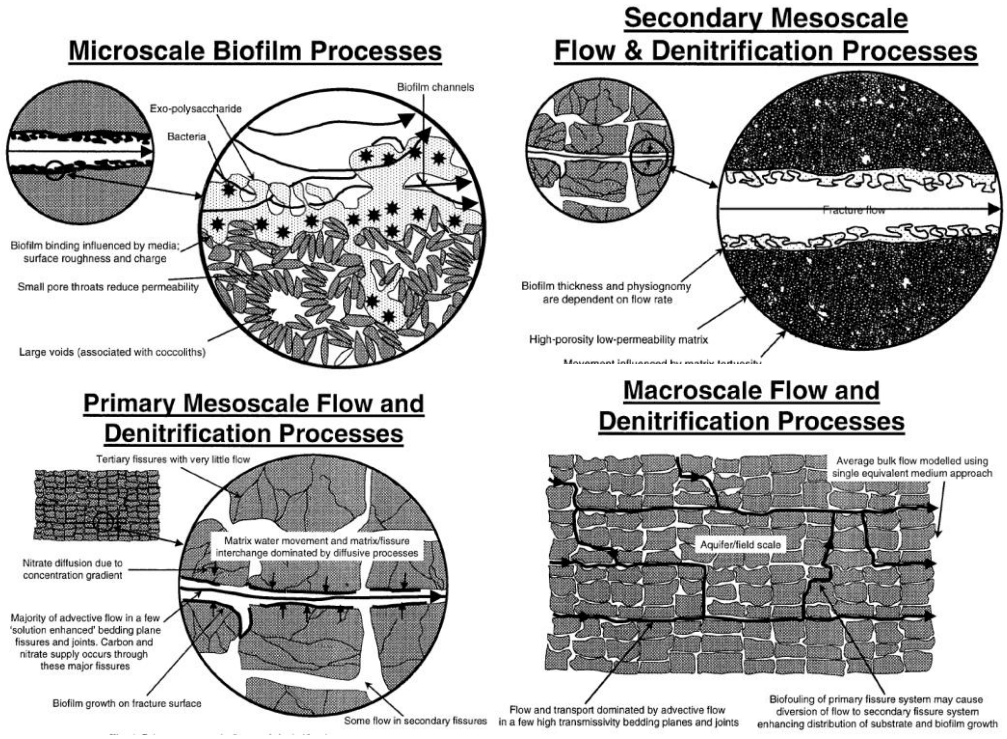


Figure 1: Définition des échelles représentatives selon Tompkins et al. (2001)

L'échelle micro correspond à l'échelle d'un biofilm, des limites de grains et/ou de micro-fissures. A cette échelle les processus micro-biochimiques sont souvent considérés comme indépendants des processus de transport. La seconde échelle est la seconde méso-échelle et correspond à l'échelle d'une fracture (µm-mm). A cette échelle les processus hydrodynamiques sont importants. Ils sont contrôlés par l'ouverture de la fracture et ont une influence sur l'attachement du biofilm, son développent et le transfert d'éléments au sein de celui-ci. Cette échelle représente l'interface de transfert entre la matrice solide (roche) et la phase mobile (eau libre) via le développement de biofilms. La troisième échelle d'intérêt est appelée première méso-échelle. C'est l'échelle de plusieurs fractures (mm-cm). Les processus régulant le flux sont ici la connectivité, la densité et la distribution des fractures. L'échelle macro est celle du site (km-m) où les écoulements sont principalement contrôlés par la connectivité entre puits. C'est l'échelle opérationnelle des systèmes de bioremédiation. A cette échelle la modélisation implique de nombreuses hypothèses de simplification et d'homogénéisation.

II. Réduction des nitrates

En raison des larges problèmes de pollution liés aux rejets azotés (potabilité, eutrophisation, marées vertes…), de nombreux champs de recherches s'intéressent à la réaction de dénitrification (atténuation naturelle, traitement des eaux potables ou industrielles, transferts entre zone non saturée et zone saturée, gestion agricole…). Les réactions impliquées dans le cycle de l'azote dans le milieu naturel sont connues (Figure 2). L'apport de fertilisants organiques ou d'engrais chimiques induit une augmentation de l'azote dans les sols sous forme de nitrates (NO_3^-) ou sous forme d'azote ammoniacal (NH_3). L'azote ammoniacal, en présence d'oxygène, peut être rapidement oxydé en nitrates ce qui provoque une forte augmentation de l'azote dans les sols et les eaux sous forme de nitrates (NO_3^-).

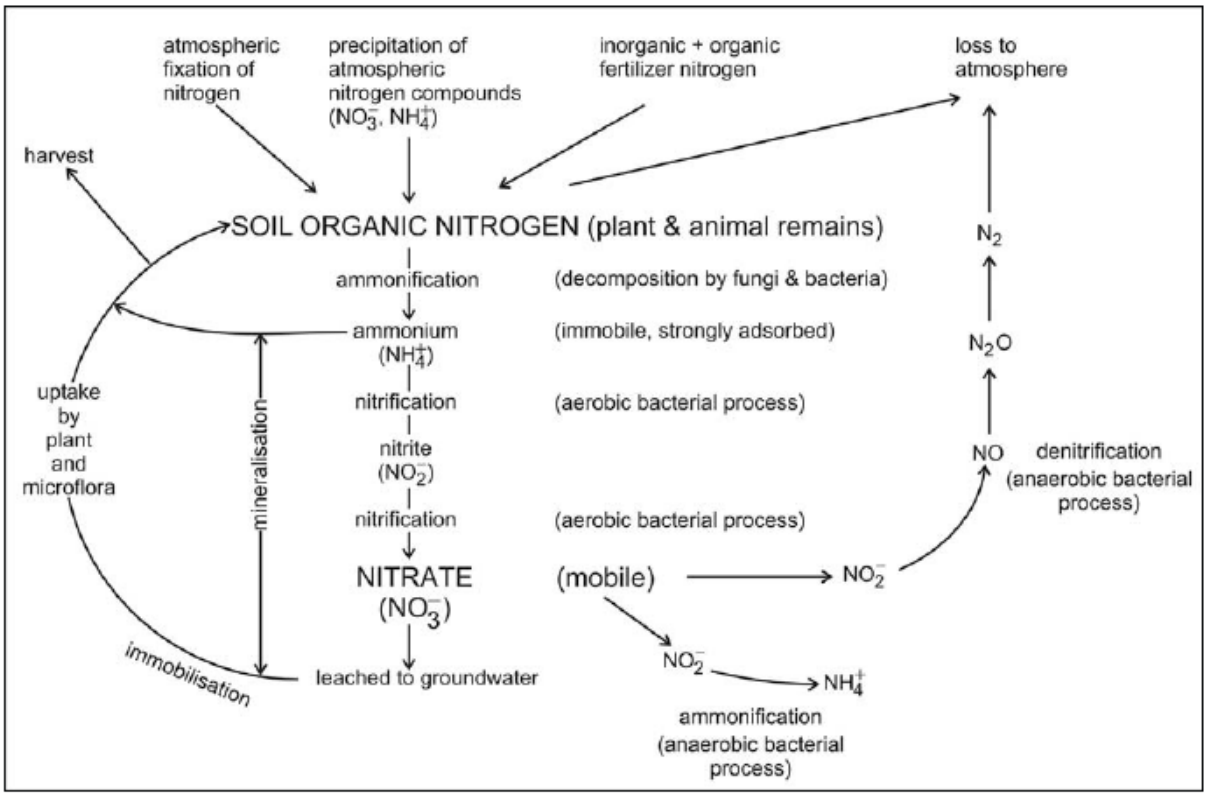


Figure 2: Cycle de l'azote (Hiscock et al., 1991)

Divers processus peuvent amener à une diminution des concentrations en nitrates dans le milieu tel que la réduction chimique ou l'assimilation (Figure 2). La dénitrification est l'ensemble des processus entrainant une sortie d'azote du système sous forme gazeuse et n'intègre donc pas ces processus. En fonction du donneur d'électrons et de la forme finale de l'azote, différentes réactions de réduction des nitrates peuvent être définies (Figure 3).

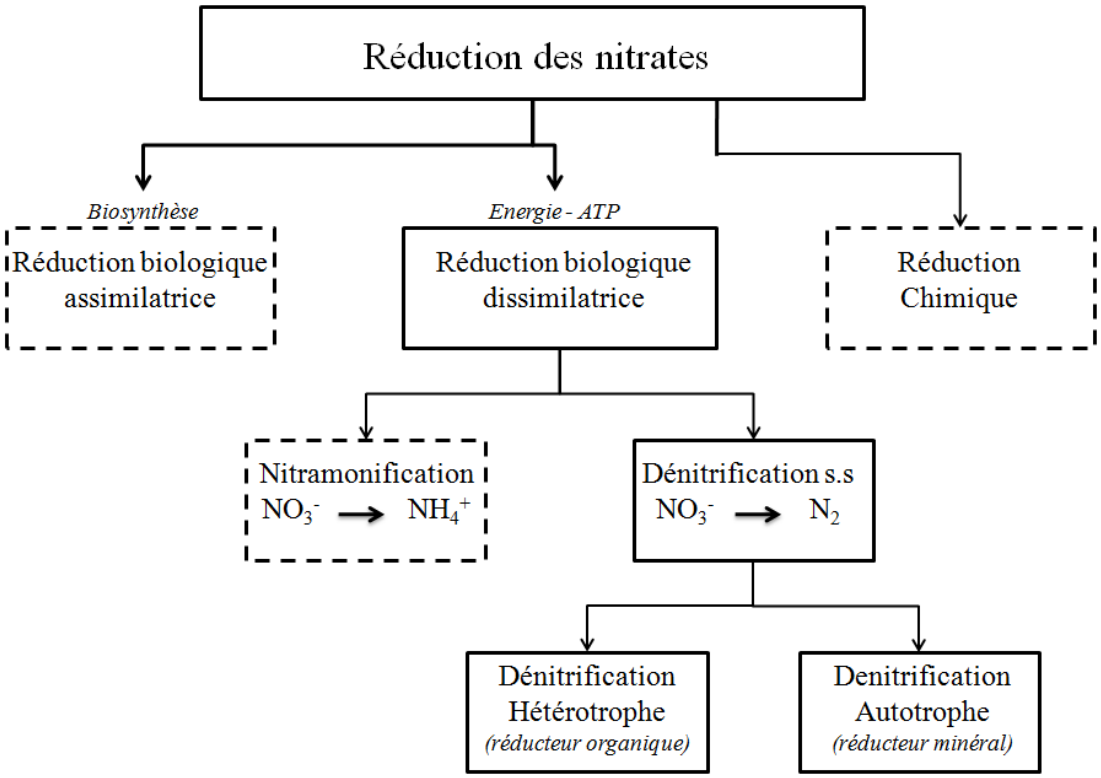


Figure 3: Voies de réduction des nitrates (modifié de (Chatelier, 2010))

1. La réduction assimilatrice

Cette réaction est une réaction biologique permettant la production d'azote organique (azote inclus dans les protéines, les acides aminés, les acides nucléiques…) pour la croissance des organismes (plantes, bactéries, champignons). Ce processus est aussi appelé immobilisation. Dans le cadre de cette réaction, les nitrates sont dans un premier temps réduits en nitrites puis en ammonium avant d'être convertis en matière organique (i.e. biomasse) (Chapelle, 2001a). La quantité de biomasse produite par quantité de nitrates réduits définit le rendement cellulaire. Cette réaction ne permet pas une réelle perte d'azote dans le système car l'azote est ré-oxydable à la mort de l'organisme. Cependant ce processus permet de limiter le lessivage de nitrates vers les nappes.

2. Réduction dissimilatrice ou dénitrification

Cette réaction biologique désigne les processus qui entrainent une réduction de l'ion nitrate NO_3^- sous forme gazeuse N_2 qui n'est ainsi plus susceptible d'être réutilisé dans le cycle biogéochimique de l'azote (Mariotti, 1986). Cette réduction dissimilatrice consiste pour

l'organisme qui la réalise à récupérer directement l'énergie produite par la réduction pour son fonctionnement (respiration). La demi-réaction d'oxydoréduction est la suivante :

$$^{1}/_{5}\ NO_3^- + {}^{6}/_{5}\ H^+ + e^- \rightarrow {}^{1}/_{10}\ N_2 + {}^{3}/_{2}\ H_2O \qquad (1)$$

Cette dénitrification ou respiration azotée permet aux bactéries de produire l'énergie nécessaire sous forme d'ATP (Adénosine-Tri-Phosphate) pour leur activité cellulaire et la synthèse de nouvelles cellules. Cette réaction prend place en conditions anaérobies lorsque la concentration en oxygène dissous n'est plus suffisante pour maintenir une respiration aérobie énergétiquement plus favorable. Il est noté dans plusieurs cas que la réaction de dénitrification peut commencer même en présence d'oxygène si celui-ci est en faible concentration en raison de la présence dans le milieu de microsites ou de zonations dans les biofilms.

La dénitrification est un ensemble de quatre réactions d'oxydoréduction conduisant à l'apparition de sous-produits de réaction.

$$NO_3^-{}_{(aq)} \rightarrow NO_2^-{}_{(aq)} \rightarrow NO_{(gaz)} \rightarrow N_2O_{(gaz)} \rightarrow N_{2(gaz)} \qquad (2)$$

Cette réduction séquentielle est catalysée par des enzymes différentes. Parmi les composés intermédiaires de réaction seuls les nitrites sont présents en phase liquide, les autres étant présent sous forme gazeuse. Les ratios de production entre ces différents éléments sont fonction du type de microorganismes et du type de donneur d'électrons.

La diversité microbiologique a un fort impact sur les réactions observées. Ainsi en fonction du matériel enzymatique dont dispose une souche bactérienne, on distingue des bactéries dénitrifiantes strictes ou partielles. Alors que les premières possèdent l'intégralité du matériel enzymatique pour assurer la réduction des nitrates en azote gazeux, les bactéries dénitrifiantes partielles ne possèdent qu'une partie de ce matériel (Betlach and Tiedje, 1981; Constantin and Fick, 1997). Certaines sont donc capables grâce à la nitrate réductase (NaR) d'une réduction des nitrates en nitrites et ne possèdent pas la nitrite réductase (NiR) permettant de continuer la chaine de réaction. Les nitrites sont donc, dans ce cas, les produits finaux de la réaction. Dans ce cas la réaction de dénitrification est incomplète. D'autres espèces en revanche ne possèdent pas NaR mais possèdent NiR, ainsi la dénitrification complète vers le diazote gazeux nécessite une interaction entre différentes communautés. Les cinétiques de réduction de ces différents éléments varient et donc des phases d'accumulation sont souvent observées (Betlach and Tiedje, 1981). La présence de ces sous-produits de réaction induit un

développement d'autres populations ou une adaptation des populations existantes (Marazioti et al., 2003) pouvant permettre de continuer la réaction. Une grande diversité de populations existe dans le milieu naturel (Griebler and Lueders, 2009). Les interactions et évolutions de ces populations ont une forte influence sur la réactivité dans le milieu naturel. Ces intéractions ne restent que partiellement connues car il est extrêmement difficile de contraindre ces développements même avec des souches initiales connues en conditions controlées (Koenig et al., 2005). Le détail des voies physiologiques et biochimiques par lesquelles s'opère cette réaction est présenté dans les revues de Knowles (1982) et Payne (1973). Suivant le type de donneurs d'électrons utilisé (organique ou minéral) deux sous-types de dénitrification existent.

a. Dénitrification hétérotrophe

La dénitrification hétérotrophe est la réaction par laquelle les microorganismes utilisent le carbone organique comme source d'énergie et de carbone cellulaire. Cette réaction peut être effectuée par de nombreux genres bactériens tels que *Pseudomonas sp, Alcaligènes sp*….(Gamble et al., 1977). Ces bactéries sont capables d'utiliser de nombreuses sources de carbone comme donneurs d'électrons (sucres, alcools, acides organiques). Cette réaction est courante dans les milieux hydromorphes, les tourbières et certaines nappes phréatiques.

$$CH_20 + {}^{4}/_{5}\ NO_3^- + {}^{4}/_{5}\ H^+ \longrightarrow CO_2 + {}^{2}/_{5}N_2 + {}^{7}/_{5}\ H2O \qquad (3)$$

Ce type de réaction avec des donneurs d'électrons solides, tels que du papier ou de la sciure de bois (Schipper and Vojvodic-Vukovic, 2000), peut être utilisé dans la conception de barrières bio-réactives dans les aquifères.

b. Dénitrification autotrophe

Dans les milieux pauvres en matière organique, certaines phases minérales peuvent être oxydées. Comme discuté dans la section II.4, ce mécanisme est très lent et est négligeable en comparaison des réactions catalysées par des microorganismes. La principale espèce minérale considérée (en raison de son abondance) pour cette réaction est la pyrite (FeS_2) qui permet une réduction des nitrates par oxydation du soufre. Ce type de sulfure est couramment observé dans de nombreux aquifères aussi bien calcaires (Kimblin and Johnson, 1992), sableux (Engesgaard and Kipp, 1992; Postma et al., 1991; Schwientek et al., 2008) que cristallins

(Negrel and Pauwels, 2004; Pauwels et al., 1998; Tarits et al., 2006). Une forte augmentation des sulfates dans les eaux est bien souvent attribuée à cette réaction (4).

$$5\ FeS_2 + 14\ NO_3^- + 4\ H^+ \rightarrow 7\ N_2 + 10\ SO_4^{2-} + 2\ H_2O + 5\ Fe^{2+} \quad (4)$$

Bien que le soufre soit considéré comme le principal réducteur des nitrates dans les réactions impliquant de la pyrite, le fer peut également constituer un réducteur. Le fer ferreux (Fe^{2+}) en solution, provenant de l'oxydation de la pyrite ou d'autres phases minérales telles que la biotite, peut lui aussi être oxydé par les nitrates. Les microorganismes catalysant cette réaction sont en revanche moins connus (Weber et al., 2001).

$$5\ Fe^{2+} + NO_3^- + 7\ H_2O \rightarrow 5\ FeOOH + ½\ N_2 + 9\ H^+ \quad (5)$$

3. Nitrammonification

Cette réduction biologique dissimilatrice n'est pas considérée comme étant une réelle dénitrification (Knowles, 1982) car l'ammonium produit reste potentiellement ré-oxydable dans le milieu. Elle apparait dans des conditions strictes d'anaérobie et lorsque la matière organique fermentescible est importante (Fazzolari et al., 1990).

4. Réduction chimique

Différentes études sur des sédiments ou des échantillons de roche ont montré qu'une réduction des nitrates pouvait avoir lieu via une réaction purement chimique avec des formes réduites du fer ou du manganèse (Huang and Zhang, 2004). Cependant, en plus de conditions de pH, de température et de stœchiométrie qui limitent grandement leur influence, ces réactions sont considérées comme très lentes et sont en général négligées au regard des réactions catalysées par la biologie (Jorgensen et al., 2009).

III. Populations bactériennes dans les milieux souterrains

La diversité et le rôle des communautés de microorganismes dans les eaux souterraines sont encore très mal connus (Bekins, 2000; Chapelle, 2000; Chapelle, 2001a). Cette recherche a débuté dans les années 80 dans le cadre de l'étude de la dégradation des hydrocarbures dans les aquifères. Ces études se sont principalement intéressées aux bactéries hétérotrophes qui utilisent le carbone organique. Bien que les eaux souterraines soient réputées oligotrophes (pauvres en nutriments), les microorganismes y sont présents à grande profondeur (Pedersen,

1997). Dans ces milieux oligotrophes profonds certains genres de microorganismes communs sont observés mais les analyses moléculaires montrent qu'un grand nombre d'espèces reste non identifié à ce jour (Bougon et al., 2009; Griebler and Lueders, 2009). De nombreux microorganismes vivant dans les milieux oligotrophes sont autotrophes et utilisent les minéraux (sulfures, carbonates…) comme source d'énergie. La plasticité métabolique de certaines bactéries leur permet d'utiliser plusieurs accepteurs d'électrons dans leur chaine respiratoire (O_2, NO_3^-) ce qui leur confère une grande capacité d'adaptation. Dans ce cas les bactéries sont dites anaérobies facultatives.

Bien que présentes dans l'eau libre, les bactéries sont principalement actives lorsqu'elles sont attachées aux minéraux. Le développement de cette phase fixe génère des amas discontinus appelés biofilms (Rittmann, 1993). En présence de grandes quantités de substrats et sur des temps longs, ces biofilms peuvent devenir continus. Le développement de biofilms est le résultat de l'attachement, de la croissance, de la mort et du détachement du biofilm schématisé Figure 4.

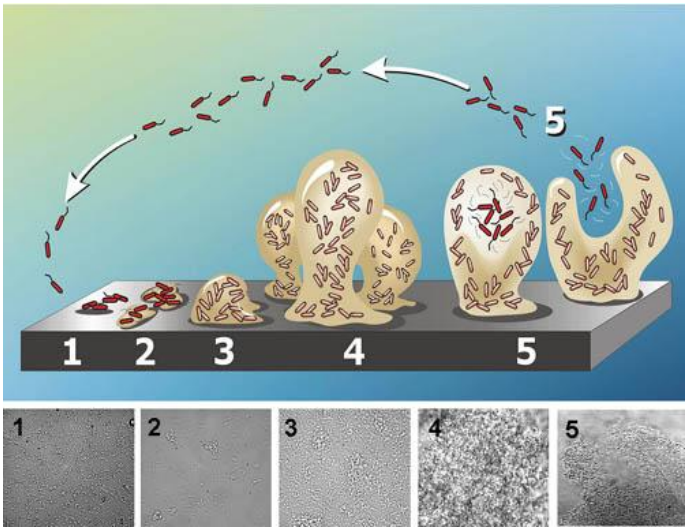


Figure 4: Schéma et photos d'un biofilm bactérien de P. aeruginosa (Dirk and Davies, 2005).

Les biofilms sont des milieux poreux complexes. Ils sont composés de cellules vivantes, de cellules mortes, de polysaccharides extracellulaires, de protéines et d'éléments inorganiques déposés. Les biofilms sont souvent composés de populations différentes en interactions les unes avec les autres (Horn and Hempel, 1997) et présentent des variations spatiales et temporelles. Les propriétés structurelles des biofilms sont fonction de leur type et de leur environnement de développement. Ces propriétés (telles que la densité et la porosité) varient spatialement et temporellement avec l'épaisseur du biofilm. Ainsi Zhang and Bishop (1994)

ont observé des densités de matériaux constitutifs dix fois plus fortes au niveau des couches profondes (proche du support d'attachement) qu'au niveau des couches supérieures sur des biofilms hétérotrophes. Ils observent aussi qu'alors que le taux de cellules vivantes sur les couches supérieures est de 91%, cette proportion est de 30% dans les couches plus profondes. La porosité décroît aussi avec la profondeur du biofilm de 91 à 58%. La variation de ces propriétés (porosité et densité), peut avoir un impact sur le transport des solutés dans les biofilms et donc sur la réactivité.

Les réactions au sein de ces biofilms ne sont pas homogènes et dépendent de la profondeur de pénétration des nutriments dans le biofilm. Cette profondeur de pénétration est contrôlée par les processus diffusifs et réactifs. Les réactions d'oxydoréduction ne peuvent avoir lieu que dans un ordre fixé par l'énergie libre (ΔG_0) fournie par la réaction. Selon les principes de la thermodynamique les réactions exergoniques sont favorisées. Ainsi l'oxygène est principalement consommé dans les couches supérieures des biofilms ce qui induit des conditions anaérobies à la base du biofilm. Ceci crée des gradients de concentration d'éléments en fonction de la profondeur. Le taux de dégradation d'un substrat est donc lié à l'épaisseur du biofilm. Celui-ci augmente avec l'épaisseur du biofilm jusqu'à une épaisseur critique au delà de laquelle le taux de consommation devient constant (Characklis, 1981). Quant la profondeur de pénétration d'un élément est inférieure à celle du biofilm, le taux de consommation n'est plus affecté par la croissance. La présence de biofilms peut générer à la surface des minéraux des conditions redox différentes (concentration en O_2, pH…) entre l'eau libre et la base du biofilm. Une des questions restant souvent en suspend est notamment le facteur limitant qu'exerce l'épaisseur du biofilm sur les possibilités de diffusion des éléments au sein de celui-ci. Bien que ces réactions soient régies par la thermodynamique, en raison des hétérogénéités des milieux, des temps de résidence ainsi qu'en raison de la zonation existant au sein des biofilms, il est courant d'observer une réduction d'un oxydant (ex : NO_3^-) alors qu'un autre oxydant plus fort (ex : O_2) est toujours présent dans le milieu en faible concentration.

Dans les eaux souterraines à faible concentration en matière organique, les principaux oxydants sont : O_2, NO_3^-, MnO_4, Fe^{3+} et SO_4^{2-}. L'utilisation de ces éléments génère dans le milieu naturel des zones distinctes de composition chimique (Lovley et al., 1994). Les bactéries ont ainsi un impact fort sur les cycles de C, O, N, S, Fe et Mn en accélérant un grand nombre de réactions ayant lieu dans le milieu naturel (Chapelle, 2001a).

IV. Interactions entre biofilms et écoulements

Dans les milieux cristallins il est considéré que la majorité des flux passe par des fractures. Or une forte hétérogénéité physique du milieu existe à l'échelle d'une fracture unique (Figure 5). Alors qu'au centre de la fracture les vitesses d'écoulements peuvent être rapides, des vitesses nulles aux bords des parois sont induites par frottement. De plus, la présence de micro-fractures, des degrés d'altérations chimiques variables (précipitation, recristallisation, altération) et des zones de "bras-morts" induisent de larges champs de vitesses d'écoulement. Ceci est complété par les phénomènes de diffusion dans la matrice rocheuse qui contribuent à une très forte hétérogénéité physique des écoulements. Les aspects théoriques sur ces éléments étant bien connus et définis dans différents livres (Bedient et al., 1999; Fetter, 1999), ils ne sont pas rappelés ici.

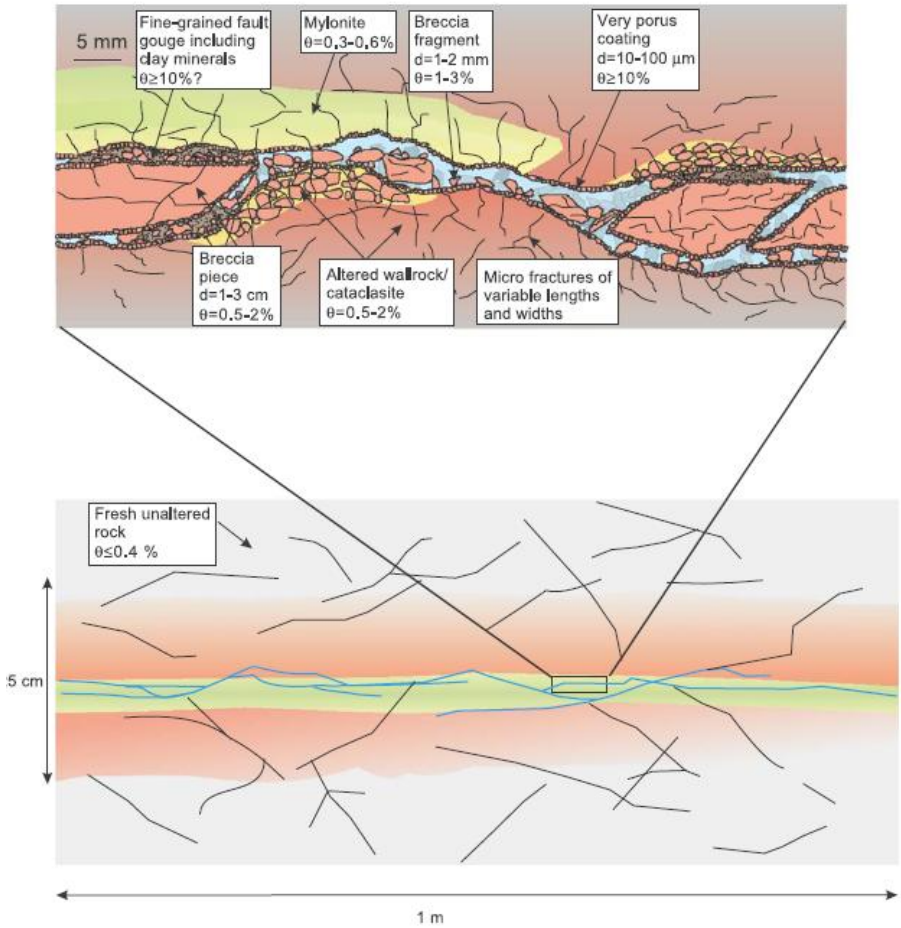


Figure 5: Représentation schématique des hétérogénéités au sein d'une fracture (Andersson et al., 2004)

Cette hétérogénéité a un rôle majeur sur la réactivité chimique car elle contrôle dans le milieu les phénomènes de mélange entre les réactifs ainsi que les phénomènes de dilution et de diffusion. De plus les vitesses d'écoulement peuvent avoir une influence sur les biofilms.

Dans les milieux dynamiques tels que les eaux souterraines, les interactions entre l'écoulement et le biofilm sont nombreuses mais l'absence d'état stationnaire dans le développement des biofilms rend difficile leur étude systématique (Garny et al., 2009; Lewandowski et al., 2007; Lewandowski et al., 2004). Les liens entre le développement de biofilms et les écoulements restent donc difficiles à établir. Ceux-ci sont schématisés Figure 6.

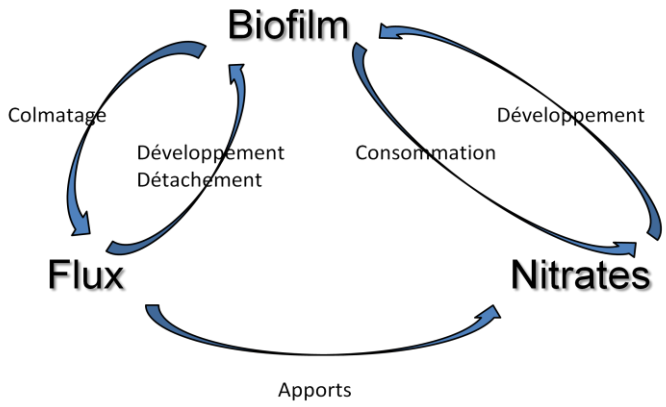


Figure 6: Schéma des interactions entre flux, biofilm et quantité de nutriments

Ainsi le flux d'eau contrôle les apports en nitrates qui permettent le développement du biofilm. En retour la croissance du biofilm engendre une baisse de la concentration en nitrates par sa consommation. Comme observé par de nombreux expérimentateurs (Ross et al., 2007; Ross et al., 2001; Thullner et al., 2002a; Thullner et al., 2005; Thullner et al., 2000), les biofilms se développement principalement dans les zones d'apport de nutriments. Ceci crée un gradient de développement en fonction de la baisse de concentration. Par son développement le biofilm induit une modification des flux en colmatant les pores (Chatelier, 2010; Taylor and Jaffe, 1990). Il peut également modifier les propriétés de diffusion dans les roches (Charbonneau et al., 2006). Des réductions de perméabilité sur trois ordres de grandeur ont été observées (Taylor and Jaffe, 1990). Ceci peut conduire à un colmatage total et à un changement des zones principales d'écoulement dans les milieux poreux (Manz et al., 2003; Stoodley et al., 1994; Xia et al., 1998). En retour, le flux, par la force de cisaillement qu'il exerce, peut avoir une action sur le détachement. Cette force induit deux effets. Premièrement elle contrôle l'épaisseur du biofilm (Characklis, 1981), celui-ci étant moins épais pour des

vitesses importantes, et contrôle donc l'épaisseur de la couche réactive. Deuxièmement elle affecte le transport des bactéries en permettant leur transport sur de longues distances (Horn et al., 2003; Wanner et al., 1995). Ces distances de transport dépendent également du type de bactéries (Albinger et al., 1994; Hendry et al., 1999; Simoni et al., 1998).

Les biofilms sont des milieux poreux complexes dont les paramètres tels que la porosité et la densité sont variables, difficilement observables (Zhang and Bishop, 1994) et dépendants de l'environnement. La densité des biofilms dépend souvent des écoulements avec une augmentation de celle-ci avec la vitesse. Les écoulements peuvent ainsi avoir un impact sur le transport de masse par diffusion ou advection dans le biofilm (Debeer et al., 1994; Falkentoft et al., 2001; Rasmussen and Lewandowski, 1998; Zinn et al., 2004). Ceci induit que les cinétiques de réaction obtenues en conditions statiques (batchs) sont difficilement transposables aux conditions dynamiques et que la vitesse d'écoulement a un effet sur la réactivité à l'échelle macroscopique (Langner et al., 1998). La Figure 7 synthétise les éléments précédemment cités.

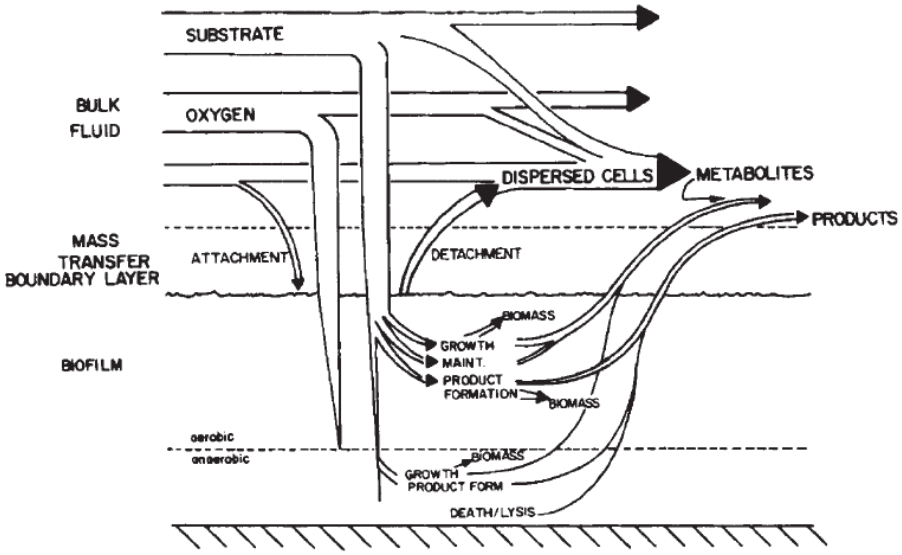


Figure 7: Diagramme fonctionnel d'un biofilm (Characklis, 1981)

Différents modèles conceptuels et numériques sont en developpement pour comprendre les interactions entre la réactivité des biofilms et les écoulements dans le milieu. Ceci est fait notamment sur le transport de masse par diffusion au sein du biofilm (Golfier et al., 2007; Orgogozo et al., 2010).

V. Implications à l'échelle du site

Les aquifères de socle sont constitués de roches cristallines d'origine plutonique (e.g. granites) et métamorphiques (gneiss schiste, micaschistes…). Les propriétés hydrogéologiques de ces aquifères se caractérisent principalement par la perméabilité des discontinuités, fractures et/ou fissures et leur connectivité. Ces structures génèrent des discontinuités hydrologiques et une forte variabilité spatiale.

Cette hétérogénéité physique a des implications à l'échelle du site. D'un point de vue biologique, la répartition et la diversité microbienne au sein des aquifères varient en fonction des conditions chimiques, physiques et des possibles connexions entre les niches écologiques (Griebler and Lueders, 2009; Murphy et al., 1997). Ceci induit une grande diversité et héterogénéité biologique au sein des aquifères. Actuellement les interactions entre les différents éléments (attachement/detachement, concentration de substrat, dynamique des populations, vitesses d'écoulement, chemotaxis, mélanges et dispersion de substrats…) controlant cette répartition ne sont que partiellement connues (Ginn et al., 2002). L'intéraction de ces éléments physiques et biologiques induit une variabilité chimique au sein des aquifères. La réactivité à cette échelle du site est fonction de la vitesse d'écoulement des eaux et des minéraux ainsi que des pollutions et des populations bactériennes présentes. Ceci induit généralement des zones aux conditions redox distinctes sous conditions de gradient naturel.

Les intéractions entre les paramètres physiques du site et la réactivité chimique restent encore peu connues et font actuellement l'objet d'études (Cozzarelli et al., 1999; Green et al., 2010; Schroth et al., 1998). La mise en pompage d'un site peu aussi avoir une influence sur la répartition des espèces chimiques en modifiant les chemins préférentiels d'écoulement, en augmentant les vitesses d'écoulement et en reconnectant des zones peu connectées en conditions naturelles ce qui induit des phénomènes de mélanges.

Ainsi sur le site cristallin de Ploemeur-Kermadoye, une évolution des concentrations en chlorures sulfates et nitrates est clairement corrélée à la mise en pompage du site. L'évolution de ces paramètres est présentée Figure 8.

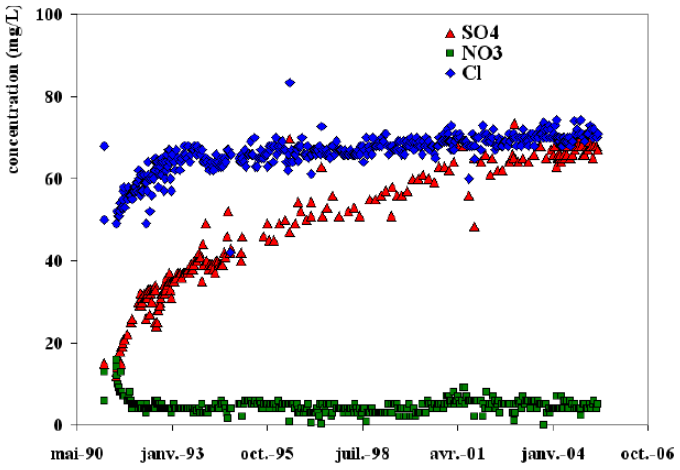


Figure 8: Evolution des chlorures, sulfates et nitrates au cours du temps au puits de pompage sur le site de Ploemeur

Le site mis en pompage en 1991 voit depuis ce temps une évolution de la chimie de l'eau pompée. Dans un premier temps, on observe une décroissance des nitrates puis une stabilisation de la concentration de ceux-ci. Cependant depuis le début de la mise en pompage on observe une forte hausse des sulfates. Cette hausse est supposée être liée, du moins en partie, à une réaction de dénitrification autotrophe. Cependant, cette hausse s'accompagne aussi d'une hausse nettement plus faible des chlorures et donc met en avant des possibilités de mélanges. Ces possibilités seront discutées dans la partie II.

VI. Objectifs

L'objectif principal de cette étude est d'améliorer les connaissances sur le couplage des facteurs physiques, biologiques et chimiques qui contrôlent les réactions biogéochimiques dans les aquifères. Ce travail, principalement expérimental, vise à obtenir les informations nécessaires pour la compréhension des interactions entre les différents paramètres (physiques, chimiques et biologiques) d'intérêt afin de permettre le développement de modèles prédictifs. Cette étude cherche à intégrer différentes échelles allant de celle d'un macro-pore à celle d'un site.

La réactivité est une interaction entre processus physiques, chimiques et biologiques mais les liens entre ces éléments en conditions transitoires ne sont que partiellement connus. La problématique de cette étude est de définir par quels processus les vitesses d'écoulement ont un effet sur la réactivité du système.

Les flux d'eau peuvent contrôler les temps de résidence des nutriments dans les milieux et les quantités apportées ainsi qu'avoir une influence sur l'altération des minéraux, sur la structure des biofilms et sur leur réactivité. Le contrôle de la réactivité et des concentrations en est-il pour autant purement physique ou ce contrôle est-il principalement effectué par la biologie ou la chimie ? Quelles sont les principaux contrôles aux différentes échelles d'études à prendre en compte pour la gestion de la ressource en eau ? Les facteurs contrôlant la réactivité sont-ils constants dans le temps et l'espace?

Cette étude débute à l'échelle d'un macro-pore où l'objectif est de caractériser l'évolution de la réactivité en fonction du développement d'un biofilm et d'évaluer la réponse de ce système à différentes contraintes de flux. Ceci nécessite de définir un dispositif expérimental innovateur où les conditions de transfert des donneurs et accepteurs d'électrons sont en analogie avec les conditions des aquifères intérêts (accepteur d'électron (nitrates) en phase fluide et donneur en phase solide (minéraux)). Ce dispositif doit aussi permettre de tester dans ces conditions les hypothèses de limitation de la réaction par transfert de masse au sein du biofilm. Cet élément est développé dans la première partie de ce document.

Aux échelles du site et de milieux poreux reconstitués les objectifs sont dans un premier temps d'identifier les réactions de dénitrification ayant lieu sur les sites d'études de la ville de Ploemeur (présentés partie II - chapitre 1). Ceci est réalisé partie II - chapitre 3 par des expérimentations en batchs. Le chapitre 2 présente le développement de techniques de mesures in situ innovantes pour le suivi spatial et temporel des nitrates dans les aquifères. Ceci est réalisé en forage grâce à l'utilisation de spectrophotomètres. Ces outils permettent un suivi temporel haute fréquence ainsi qu'un accès aux concentrations en profondeur permettant une représentation tridimensionnelle des concentrations. Le développement de ces techniques est un point essentiel pour aller vers une compréhension globale des phénomènes ayant cours à l'échelle du site. Dans le contexte d'aquifères fracturés hétérogènes où différentes zones de l'aquifère peuvent présenter des eaux aux compositions chimiques contrastées, cette information tridimensionnelle permettra une meilleure compréhension des sites.

Le dernier point de cette étude développé dans la troisième partie est de mesurer directement *in situ* les capacités de dénitrification du milieu. Ceci est effectué par essai de push pull et permet l'obtention des paramètres cinétiques des réactions. Les informations obtenues sont ensuite appliquées au site de Ploemeur-Kermadoye et permettent une amélioration de la

compréhension du système à l'échelle du site et de définir comment les vitesses d'écoulement à cette échelle peuvent contraindre la variabilité spatiale de la chimie du site.

L'évaluation de l'influence des paramètres physiques (vitesse d'écoulement), chimiques (type de minéraux) et biologiques (développement et efficacité des biofilms) à différentes échelles doit permettre d'identifier à chacune de ces échelles les processus principaux à prendre en compte.

Cette thématique est menée dans le cadre de recherches en cours depuis plusieurs années au laboratoire Géosciences Rennes et dans le cadre du service national d'observation H^+. Ces travaux s'incluent plus particulièrement dans les thématiques de l'équipe EAU qui développe des projets sur les écoulements en milieux fracturés et sur la géochimie de ces aquifères avec une attention particulière portée sur les réactions de dénitrification.

Partie I :

Influence de l'hydrodynamique sur une réaction de dénitrification hétérotrophe à l'échelle du pore

Chapitre 1 :
Mise en place d'un protocole d'étude de l'influence de l'hydrodynamique sur la réactivité biogéochimique à méso-échelle
- Motivations et protocole -

I. Introduction

Dans le cas de réactions contrôlées par la microbiologie telle que la dénitrification, les connaissances sur la localisation de la réactivité et du développement des biofilms bactériens en conditions transitoires sont indispensables pour comprendre les processus ayant cours. En conditions statiques (sans écoulements), les cinétiques des réactions chimiques sont généralement bien contraintes mais l'influence de facteurs physiques tels que les vitesses d'écoulement le sont beaucoup moins. Characklis (1981) note que les écoulements peuvent avoir une influence sur les réactions biogéochimiques. Les vitesses d'écoulement contraignent le temps de résidence d'un volume d'eau dans le milieu et donc le temps possible d'interaction avec les surfaces du milieu. Les écoulements régulent aussi les quantités de réactifs fournis dans le milieu. Les écoulements peuvent de plus avoir une influence sur le développement de biofilms à la fois au niveau de la taille et de la forme des structures. Les écoulements peuvent aussi avoir une influence sur les phénomènes d'attachement et détachement des populations bactériennes, en raison des contraintes qu'ils appliquent sur les biofilms (Albinger et al., 1994). Ces différents impacts sont intégrés dans des modèles de transport réactif de plus en plus nombreux et performants. Cependant il existe peu de données expérimentales explicites reliant les vitesses d'écoulement et la réactivité dans un milieu.

Dans cette partie, nous cherchons à développer un dispositif expérimental permettant d'évaluer l'influence de ce facteur physique qu'est la vitesse d'écoulement sur une réaction de dénitrification. Afin de mettre en lien ces expérimentations et nos observations de terrain qui seront discutées dans la suite de ce document, nous cherchons à étudier une réaction mettant en jeu des nitrates et dont la réactivité (temps de réaction et cinétique) est proche de la réactivité observée avec les matériaux du site d'étude de Ploemeur. L'objectif des travaux effectués dans cette partie est de réaliser des expériences de réactivité dans un milieu où les vitesses d'écoulement sont connues et bien contraintes. La géométrie la plus simple pouvant

être utilisée est donc celle d'un tube. Dans la plupart des dispositifs étudiant les réactions chimiques sous contraintes de flux dans des milieux synthétiques, les donneurs et accepteurs d'électrons sont fournis en entrée du système ce qui produit une contrainte forte sur la localisation du front de réaction. Dans les milieux naturels, les accepteurs d'électrons (nitrates) sont présents en phase liquide et les donneurs d'électrons (minéraux) le sont en phase solide (minéraux le long des fractures). Nous chercherons dans notre dispositif à reproduire cette répartition spatiale des éléments. Pour garder cette répartition spatiale des éléments nous avons utilisé une source de carbone initialement solide grâce à des tubes plastiques.

Dans le premier chapitre de cette partie, nous présenterons les principaux dispositifs expérimentaux utilisés pour l'étude des réactions biogéochimiques à l'échelle du laboratoire ainsi que pour évaluer l'influence de l'hydrodynamique sur les biofilms. Nous montrerons par la suite que des tubes en PVC plastifié sont capables de fournir le carbone nécessaire à la croissance microbiologique qui peut ainsi soutenir une réaction de dénitrification. Les réactions et dispositifs expérimentaux en conditions dynamiques utilisés dans les chapitres 2, 3 et 4 seront également présentés. Le but de cette partie est d'observer l'évolution dynamique de la réactivité à l'échelle d'un macro-pore sous différentes contraintes de flux pour identifier les principaux processus régulant les réactions biogéochimiques en conditions dynamiques.

II. Dispositifs expérimentaux existants

1. Cas des colonnes [oxydoréduction]

Le principal outil pour étudier les réactions d'oxydoréduction sous une contrainte de flux est de réaliser des colonnes au travers desquelles un flux circule.

Différentes études sur des colonnes ont été réalisées pour évaluer les processus d'oxydoréduction et leur évolution. Ainsi Vongunten et Zobrist étudient la dégradation du lactate dans une colonne de sable avec apport de nutriments en flux continu (Vongunten and Zobrist, 1993). Sinke et al. évaluent l'effet de la fluctuation de niveaux de nappes sur une colonne de sable avec injection continue d'oxygène, nitrate, sulfate, acétate et formate (Sinke et al., 1998). Postma et Appelo (2000) étudient la réduction des oxydes de manganèse par du fer dans des colonnes de sable. Samson et al. (2005) évaluent les taux de dissolution de la biotite par ces moyens. Kim et al. (2001) étudient la dégradation du toluène dans des colonnes

de sable et notent la présence de respiration et de dénitrification sur une même zone, ce qui suppose la présence de microsites et donc un large panel de vitesses des écoulements. Peu de travaux évaluent la réactivité du milieu en laboratoire sous des contraintes de flux imposés dans des dispositifs autres que des colonnes. Parmi ceux-ci, Mascopinto (2007) fait passer un flux chargé en azote (NO_2^- ; NO_3^- ; NH_4^+) au travers de fractures rugueuses synthétiques de calcaire.

Les études effectuées en flux continu ou avec des variations de charges hydrauliques ne permettent pas, en raison de vitesses d'étude uniques, une évaluation de la réponse du milieu à différentes vitesses d'écoulement. Parmi les études s'intéressant aux vitesses de flux, Gu et al. (2007) étudient la consommation de nitrates dans des colonnes de sédiments et Willems et al. (1997) l'étudient sur des colonnes de sols de différents types en même temps que d'autres paramètres en considérant la colonne dans son ensemble. Ces systèmes ne permettent pas de localisation de la réactivité car seuls sont considérées les différences entre l'entrée et la sortie des systèmes.

2. Cas des milieux poreux [biofilms et réactivité]

De nombreux travaux s'intéressent au développement de biofilms en réponse à un apport de nutriments dans les milieux poreux (Clement et al., 1997; Falkentoft et al., 1999). Taylor et Jaffe s'intéressent au développement de biofilms et à son influence sur la conductivité hydraulique dans des colonnes de sable où le développement de biofilm est permis par des ajouts de méthanol (Taylor and Jaffe, 1990). Cunningham et al. utilisent des colonnes de verre et/ou de sable avec injection de carbone en entrée (Cunningham et al., 1991). Thullner et al. s'intéressent à l'interaction entre le flux d'eau et le développement de la biomasse dans un milieu poreux en 2D (Thullner et al., 2002a). Dans cette étude, les éléments nécessaires à la croissance bactérienne (excepté le carbone via le glucose) sont présents initialement dans les milieux poreux synthétiques préparés en phase liquide. Par la suite la même mixture est injectée en continu en amont de l'injection de glucose. Thullner et al. observent une consommation du nitrate injecté mais ne cherchent pas à évaluer et localiser la réactivité (Thullner et al., 2002a). La consommation d'éléments n'a lieu que dans la zone où l'accepteur d'électrons (nitrate) et le donneur d'électrons (glucose) se mélangent en raison de l'injection séparée des deux éléments. Kildsgaard et Engesgaard dans une autre expérience sur un milieu 2D observent aussi un phénomène de colmatage dont la structure est différente en raison de

l'injection simultanée de nitrates et carbone (Kildsgaard and Engesgaard, 2002). Un des principaux problèmes lié à l'utilisation de colonnes de milieux poreux et/ou de milieux poreux 2D est la création de zones d'écoulements préférentiels liées aux développements de biofilms pouvant colmater les pores. Certaines études s'intéressent aussi aux propriétés de transport des bactéries (Simoni et al., 1998).

3. Cas des milieux fracturés (biofilm)

Pour les milieux fracturés beaucoup moins de recherches ont été conduites. Hill et Sleep observent le développement d'un biofilm et son influence sur la conductivité hydraulique sur une fracture composée de deux plaques de verre (Hill and Sleep, 2002). Le système est alimenté à son entrée par tous les nutriments nécessaires au développement du biofilm. Une structure en agrégats de différents types pouvant provenir de populations différentes caractérise le développement du biofilm. Après un certain temps le biofilm devient continu. Hill et Sleep montrent qu'après un certain temps la présence de biofilm engendre des zones de circulations préférentielles qui ont donc une forte influence sur les flux (Hill and Sleep, 2002). Le biofilm se développe principalement à l'entrée de la fracture. Ross et al., dans une expérience avec une fracture de verre de 2 m, évaluent l'importance du développement des biofilms en conditions de stimulation puis de famine et avec une augmentation de flux pour évaluer le détachement (Ross et al., 2007). Lors de ces expériences il n'y a pas d'évaluation directe de la réactivité du milieu. Ces études sur le phénomène de colmatage quantifient de différentes manières les quantités de biomasse et d'EPS (extracellular polymeric substances) dans le milieu. Cependant comme il a été remarqué par différents auteurs (Thullner et al., 2002a), cette quantification n'est pas toujours représentative de la réactivité biochimique.

4. Tubes

Des études sur des dispositifs de type tubes existent aussi. Ces dispositifs sont utilisés dans deux grands domaines. Premièrement afin de comprendre le développement de biofilms dans les conduites d'adduction d'eau (Boe-Hansen et al., 2002; Faby, 1980; Gauthier, 2002). En effet, il a été remarqué que les populations microbiennes pouvaient se développer sur la quasi-totalité des matériaux utilisés (Chang and Jung, 2004; Levi et al., 1992). Les conséquences de ces développements sont multiples. Le développement des populations microbiennes peut grandement augmenter les phénomènes de corrosion notamment sur les matériaux métalliques

et donc avoir un impact sur la durée de vie du système. De plus, le biofilm peut en agglomérant non seulement des substances organiques mais aussi des matières inorganiques former des agglomérats diminuant la section effective des tubes. Les objectifs de ces études se situent à une échelle macroscopique.

L'autre grand champ d'utilisation des systèmes de type tubes est dédié à l'étude directe des biofilms, par exemple celle conduites par Lewandowski et al. (Lewandowski et al., 2007; Lewandowski et al., 2004). Ces études utilisent des dispositifs appelés "flow through tube reactors" et sont utilisés en effectuant des boucles de recirculation. Ces études s'intéressent principalement au développement de biofilms (Horn and Hempel, 1997), à l'aspect structural des biofilms (Wimpenny et al., 2000; Zhang and Bishop, 1994), à l'écoulement et transport au sein des biofilms (Debeer et al., 1994; Stoodley et al., 1994), aux phénomènes de détachement (Horn et al., 2003) et au développement d'outils d'analyse des écoulements au sein de ces biofilms (Manz et al., 2003; Xia et al., 1998). Toutefois certaines études prennent en compte la réactivité du système mais sans chercher à évaluer explicitement l'influence de la vitesse d'écoulement sur le système réactif (Garny et al., 2009).

5. Bilan des dispositifs existants

Ce rapide tour d'horizon montre que de nombreux dispositifs permettant une étude des réactions biogéochimiques existent. Ces dispositifs ont tous des avantages et des inconvénients et peuvent être empruntés à différents champs d'études tels que la géochimie (cas des colonnes d'oxydoréduction), la biologie (cas de l'étude des biofilms), le génie hydraulique (canalisations) ou la toxicologie (impact sanitaire du développement microbien). Cependant, en raison d'objectifs divers, aucun de ces dispositifs ne correspond pleinement à nos objectifs en termes de physiques des écoulements, de répartition spatiale des nutriments ou en termes d'espèces chimiques (nitrates). Pour ces différentes raisons nous avons choisi de développer un nouveau dispositif expérimental.

III. Choix du dispositif expérimental

1. Objectifs et contraintes de cette étude

Dans les expérimentations présentées précédemment, tous les nutriments (donneurs et accepteurs d'électrons) nécessaires pour le développement de biofilms sont fournis à l'entrée

du système, ce qui en plus de contraindre fortement les zones de développement ne correspond pas à la situation observable dans le cas d'une dénitrification autotrophe dans un aquifère. Lors de cette réaction, les nitrates sont apportés par l'eau alors que les autres éléments (donneurs d'électrons) sont fournis par la roche et sont donc présents initialement et immobiles dans le milieu. Pour être plus proche des conditions naturelles, nous cherchons à développer un protocole expérimental où les accepteurs d'électrons (nitrates) et les donneurs d'électrons (carbone, fer…) sont présents dans le milieu et où leur accessibilité peut provenir de phénomènes de diffusion ou être liée à une dégradation par les bactéries.

La première échelle d'étude où l'influence de l'hydrodynamique semble être prépondérante est l'échelle d'un macro-pore ou d'une fracture (Tompkins et al., 2001). Nous souhaitons donc mener des expériences à cette échelle. Le choix de cette échelle engendre des contraintes géométriques fortes sur notre système d'étude. De plus, le fait de vouloir évaluer explicitement l'influence de la vitesse d'écoulement sur la bio-réactivité nécessite l'utilisation d'un système où les champs de vitesses sont clairement définis. Ces différentes contraintes écartent l'utilisation de roches pouvant permettre un lien avec nos travaux de terrain. En effet l'utilisation de roche implique une certaine rugosité (ne permettant pas une contrainte forte des vitesses d'écoulement), une répartition non uniforme des minéraux et empêche une visualisation du développement bactérien. Pour ces raisons, nous n'avons pu réaliser notre étude sur une réaction de dénitrification autotrophe.

Nous avons donc choisi de travailler sur une réaction de dénitrification hétérotrophe. La réaction étudiée n'est pas identique à celle observée sur le terrain mais le cadre de cette étude visant à caractériser les processus de contrôle de la réactivité, l'utilisation d'une autre réaction reste cohérent avec nos questions de recherche. Différents types de supports peuvent exister pour la croissance bactérienne tel que celui présenté dans (Vrtovsek and Ros, 2006) composé de PVC et de charbon actif. Les polymères biodégradables tels que présentés dans (Zhao et al., 2009), avec des adaptations géométriques, pourraient permettre également ce type d'étude. Mowla et Ahmadi utilisent des billes de PVC comme support dans leurs milieux poreux sans qu'elles soient considérées comme un possible apport de carbone (car négligeable dans les conditions de l'article) (Mowla and Ahmadi, 2007). Nous avons choisi pour des raisons pratiques l'utilisation de tuyaux en plastique souple pour servir de support à notre expérimentation.

Les travaux réalisés dans cette partie montrent que des tuyaux "PVC Double Manifold Watson-Marlow®" peuvent être utilisés comme support pour la croissance de bactéries hétérotrophes. L'utilisation de ces tuyaux a de nombreux avantages. Les vitesses d'écoulement dans un tube varient en fonction du rayon mais suivent un profil de Poiseuille bien connu. Une telle contrainte des vitesses d'écoulement n'est pas possible avec des milieux poreux. L'autre avantage est une homogénéité chimique du système. En effet, dans une colonne de roche le milieu est composé de différentes phases minérales et la préférence de populations bactériennes pour l'utilisation de telle ou telle phase pour son développement ne peut pas être observée. Dans le cas de tuyaux, le système peut être considéré comme homogène chimiquement au début de l'expérience. Ainsi, la taille, la géométrie et l'homogénéité chimique en font d'excellents candidats pour l'étude des phénomènes géochimiques à méso-échelle sous contraintes de flux. Il sera démontré de plus que les temps caractéristiques de la réaction sont proches de ceux observés avec la roche dans le milieu naturel.

On présentera succinctement les phénomènes de dégradation des plastiques et on définira la réaction étudiée dans les sections suivantes de ce document avant d'aboutir aux dispositifs expérimentaux qui seront utilisés dans les chapitres 2, 3 et 4 de cette partie.

2. Processus de biodégradation des plastiques

Depuis l'apparition des plastiques, des recherches ont essayé d'ameliorer leur résistance aux developpements bactériennes (Shah et al., 2008). On trouve toujours cependant des colonisations dans les systèmes d'aduction d'eau jusque dans les stations spatiales (Gu, 2007). Les plastiques sont résistants faces aux attaques microbiennes car leur présence récente dans l'environnement n'a pas permis à l'évolution naturelle de créer de nouvelles structures enzymatiques capables de dégrader ces polymères (Mueller, 2006). Actuellement, les objectifs de recherche tendent plutôt vers le développement de la biodégradation des plastiques en raison des problèmes environnementaux des déchets plastiques. Avec un ensemble de bactéries, une majorité des plastiques sont partiellement "dégradables" dans le sens où une partie du carbone organique qu'ils contiennent est accessible aux bactéries. Dans le domaine de la distribution des eaux, differentes études s'intéressent au developpement de biofilms dans les canalisations. Il a notament été remarqué (Chang and Jung, 2004) que le

developpement de biofilms dans les canalisations est plus lié au type de matériaux (types de métaux ou plastiques) qu'à la chime de l'eau y circulant.

a. Processus de dégradation de plastiques

La capacité de biodégradation des polymères dépend des conditions environnementales et de la flore indigène mais aussi du poids moléculaire, des liaisons chimiques (notament C-C) et des microorganismes participants (Gu, 2007). La fixation initiale des bactéries sur les surfaces des matériaux est également relative aux caractéristiques physiques telles que l'hydrophobie et la rugosité. Les polymères à poids moléculaire élevé sont moins dégradables ou se dégradent plus lentement que ceux de faible poids moléculaire. Une augmentation du poids moléculaire des polymères décroit la solubilité dans l'eau, ce qui les rend moins sensibles aux attaques bactériennes. En effet, les bactéries ont généralement besoin que le substrat soit transporté dans un premier temps au travers de la membrane cellulaire avant d'être dégradé/métabolisé par des enzymes cellulaires puis assimilé. Après une phase initiale d'attachement des microorganismes à la surface des matériaux, leur croissance forme des biofilms extensifs et des dommages causés aux matériaux peuvent être observés.

Les biofilms qui sont composés à la fois de microorganismes et de leurs polysaccharides extracellulaires sont extrêmement variables à la fois dans le temps et dans l'espace (Gu, 2003). Les biofilms sont très organisés et divers (Gu, 2003) et references infra. Potentiellement tous les matériaux sont susceptibles de constituer un support à la formation de biofilms en conditions humides. La Figure 9 (Gu, 2007) présente un exemple de biofilm à la surface d'un polymère. Ceci illustre la large hétérogénéité des biofilms en termes de composition microbienne, de forme physique et de répartition spatiale.

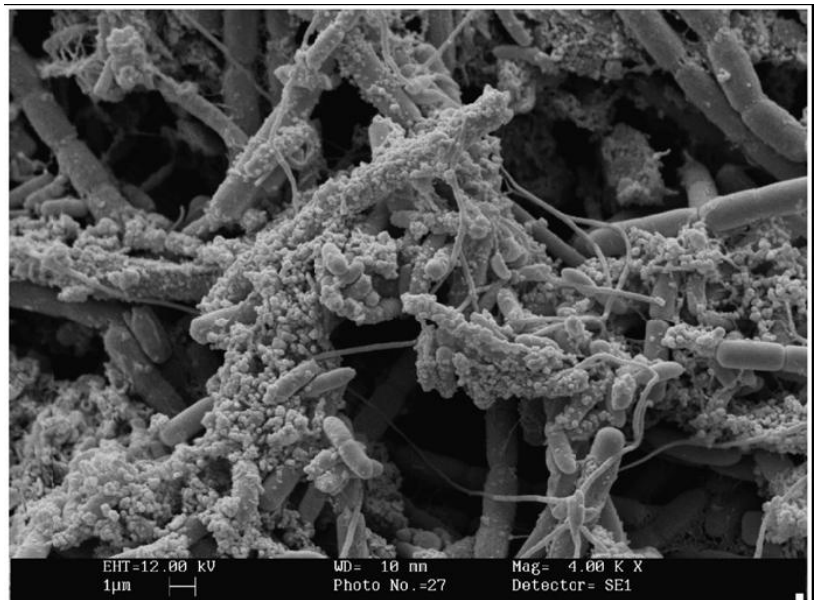


Figure 9: Biofilm bactérien développé sur la surface d'un polymère au microscope électronique à balayage (GU 2007).

Durant les processus de dégradation, des exoenzymes produites par les microorganismes cassent les liaisons des polymères complexes et donnent lieu à la naissance de chaines plus courtes (oligomeres, dimers, monomeres) et plus hydrophiles. Les nouvelles chaînes sont suffisament petites pour traverser les membranes semi-perméables des microorganismes et peuvent être utilisées comme sources d'énergie ou de matériaux. Ce processus correspond à la dépolymérisation. Un second processus de dégradation, la minéralisation, génère des produits finaux : CO_2, H_2O ou CH_4. Au moins deux categories d'enzymes sont impliquées dans la dégradation des polymeres: les dépolymérases extracellulaires et intracellulaires.

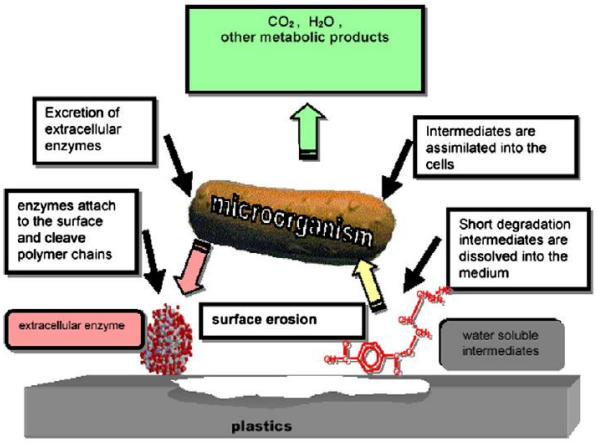


Figure 10: Mécanismes généraux de la dégradation des plastiques sous conditions aérobies (Mueller et al 2003).

En raison de ces réactions, les polymeres et spécialement les plastiques sont des substrats potentiels pour les microorganismes hétérotrophiques. De très nombreuses espèces de bactéries peuvent intervenir dans la dégradation de plastiques tels que les *pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *fungi Penicillium simplicissimum*. Les différents processus et étapes de dégradation (solubilisation, ionisation, hydrolyse, hydrolyse enzymatique, dégradations microbiennes) sont présentés dans (Singh and Sharma, 2008).

La phase de dégradation s'arrête à la fragmentation des polymères. C'est seulement si ces fragments sont consommés par des microorganismes comme substrat ou source d'énergie que le composé polymérique est considéré comme biodégradable. La figure suivante présente les différences entre dégradation et biodégradation.

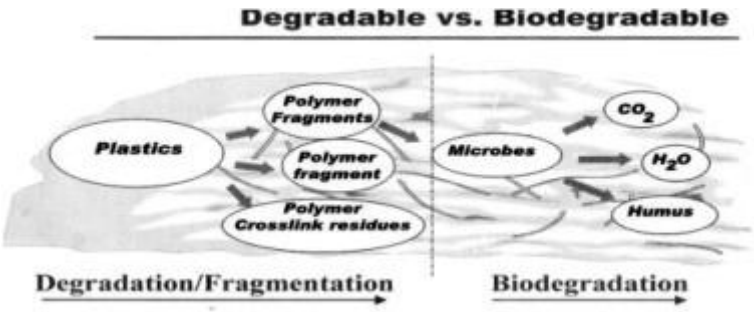


Figure 11: Représentation schématique des processus de détérioration et biodégradation (Mohee et al., 2008)

b. Deux types de biodégradation : aérobique/anaérobique

Une fois la dégradation des longues chaines de polymères effectuée, la suite de la dégradation peut s'effectuer en conditions aérobiques ou anaérobiques. Ces processus sont synthétisés Figure 12.

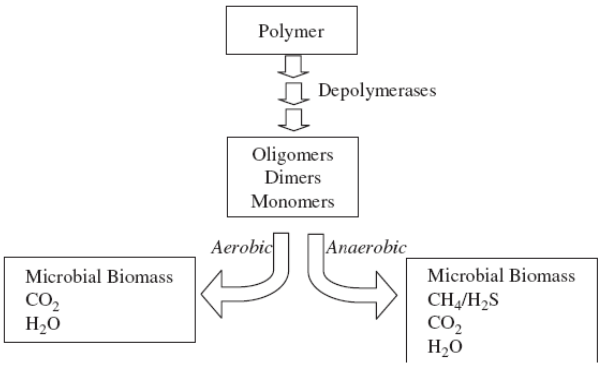


Figure 12: Processus impliqués dans la dégradation des plastiques (Gu et al., 2003)

Quand l'oxygène est accessible, les organismes aérobies sont les principaux acteurs de la destruction de matériaux complexes. Dans ce cas les produits finaux de la dégradation seront : la biomasse microbienne, CO_2 et H_2O. Dans ce cas, la consommation d'oxygène ou la formation de dioxyde de carbone sont des bons indicateurs de la dégradation des polymères. Ce suivi est souvent utilisé dans les tests de laboratoire. A contrario, dans des conditions strictement anaérobies (ex: dans un biofilm épais où l'oxygène peut être limité en raison du transport par diffusion), les organismes anaérobies incluant par exemple les fermenteurs ou les bactéries sulfato-reductrices peuvent être responsables de la dégradation des polymères. Les produits finaux de la détérioration seront la biomasse microbienne, CO_2, CH_4, H_2O, NH_3 et H_2S en conditions de méthanogénèse. Le suivi de cette réaction est souvent fait en observant les biogazs (Mohee et al., 2008).

En raison de ces différentes conditions environnementales, et donc de la présence de microorganismes différents, les processus de dégradation peuvent conduire à des produits de dégradation finaux différents même si les processus biochimiques d'hydrolyse sont identiques. Ces processus ont lieu consécutivement à une série de réactions réalisées par différents microorganismes. Dans le cas de notre étude, même avec des plastiques biodégradables, les temps de dégradation sont lents (ex :(Mohee et al., 2008) : 32 jours). Les conditions environnementales permettant une dégradation sont très largement observables dans les environnements naturels et peuvent être simulées en laboratoire. De plus, les microorganismes aérobies et anaérobies peuvent coexister dans les environnements naturels en étroite association. Chacun des membres peut bénéficier des ces associations en étant spatialement séparé mais biochimiquement connecté.

c. Méconnaissance des bactéries

Le contrôle de la croissances microbienne peut être effectué par une sélection de matériaux plus réfractaires à l'utilisation par les microorganismes (Gu, 2004). Cependant il est extrêmement difficile d'éviter totalement les développements bactériens (Gu, 2007). Un manque de connaissances important existe concernant les bactéries à croissance lente qui cependant peuvent être plus efficaces dans l'utilisation des polymères que les bactéries à croissance rapide (Gu, 2007). La compréhension des interactions entre microflore et détérioration des polymères est récente mais reste très incomplète.

d. Cas du PVC (PolyVinyl Chloride)

Le PVC est un plastique dur qui résiste à l'abrasion, aux produits chimiques et qui a une faible adsorption de l'humidité. Des formes de PVC souples appelés PVC plastifiés sont quant à eux plus facilement dégradables par les communautés bacteriennes. Il existe de nombreuses études sur la détérioration du PVC en lien avec la lumière ou la chaleur (Cho and Choi, 2001) mais très peu sont accessibles sur sa biodegradation. Il est connu que le PVC peut être colonisé par des bactéries dans les conduites d'eau (Zacheus et al., 2000) comme sur du materiel medical (Balazs et al., 2004). Des éléments de ces PVC peuvent être mis en solution. Hasley estime ainsi que le taux de carbone organique assimilable relargué (présent en phase liquide) par le PVC plastifié est de 0,95 ug/cm^2/J et reste constant dans le temps (Hasley, 1993). Pour le PVC non plastifié, il n'est que de 0,225 ug/cm^2/J et diminue à 0,012 ug/cm^2/J après un mois. Le relarguage estimé pour le polyéthilène (PE) n'est que de 0,045 ug/cm^2/J et chute lui aussi rapidement. Rogers et al. evaluent le relargage de TOC (carbone organique total) par differents matériaux utilisés pour les canalisations (Rogers et al., 1994). Ils observent qu'après trois jours, l'eau a une concentration en carbone organique total de 6 mg/L avec du PVC. Le PVC est aussi connu pour relarguer des produits toxiques lors de sa dégradation tels que le HCl, phtalates et divers composés organiques volatils.

Ces éléments sur la dégradation des polymères montrent que les plastiques peuvent fournir du carbone organique dans les eaux. Ce carbone organique peut ensuite être utilisé par les populations microbiennes pour leur croissance. Un des objectifs de notre dispositif expérimental est de fournir les donneurs d'électrons par le biais d'un support solide de manière continue dans le temps. Ce type support solide sera donc utilsé pour la suite de nos expériences car il permet de fournir, à partir d'une surface solide, les donneurs d'électrons nécéssaires pour la réaction de dénitrification.

IV. Expérimentation en batch – Validation de la réaction

1. Introduction

Les informations données dans la partie précédente montrent que les plastiques peuvent supporter un développement microbien. Afin de vérifier l'utilisation possible de matériaux plastiques comme donneurs d'électrons dans une réaction de dénitrification hétérotrophe nous avons réalisé des expérimentations en batchs. Ceci a permis d'évaluer les cinétiques de

réactions et les différences de réactivité de différents matériaux plastiques ainsi que de comparer la réactivité d'une réaction de dénitrification hétérotrophe utilisant des plastiques avec une réaction autotrophe utilisant du granite du site d'étude.

Cette évaluation de la réaction a été effectuée en batchs. Le système de batch est couramment utilisé pour l'évaluation des cinétiques de réaction et l'influence de différents facteurs sur ces réactions (Darbi et al., 2002; Huang et al., 2003; Jobbagy et al., 2000; Liu and Koenig, 2002; Zhang and Lampe, 1999). Il est aussi utilisé pour l'étude des interactions entre les communautés bactériennes (Marazioti et al., 2003).

Le principe est ici de mélanger de l'eau prélevée sur le site d'étude (contenant naturellement des nitrates et une certaine population microbienne) avec des morceaux de tubes plastiques pouvant être utilisés sur des pompes péristaltiques. L'ensemble est placé en conditions anaérobies afin de permettre une réaction de dénitrification.

2. Matériel et méthodes

a. Caractéristiques physico-chimiques de l'eau utilisée

Nous considérons dans cette étude que les facteurs pouvant affecter les communautés bactériennes dans le milieu naturel sont très nombreux et ne peuvent être identifiés et traités de manière indépendante à l'échelle du site. De plus, des études précédentes (e.g. (Bekins, 2000; Bougon et al., 2009; Chapelle, 2000; Griebler and Lueders, 2009; Pedersen, 1996) ont montré que la plupart des bactéries présentes dans les milieux souterrains n'étaient pas répertoriées et pouvaient grandement évoluer en fonction des variations physico-chimiques. Koenig et al. ont aussi montré que même dans le cas d'une expérience avec des communautés bactériennes identifiées et isolées au début de l'expérience, des développements de microorganismes incontrôlés peuvent apparaitre et amener des changements de communautés importants (Koenig et al., 2005). Le but est ici d'évaluer la réaction en utilisant la totalité de la communauté microbienne présente et non d'utiliser une souche unique. Les réactions de dégradation peuvent être régies par différentes communautés dans le milieu naturel et leur implication peut évoluer au cours du temps. Ceci est également vrai pour la dégradation de plastiques. De plus il est également admis que différents types de bactéries peuvent avoir des comportements très différents vis-à-vis des vitesses de réaction et de la création de sous-produits (e.g. (Carlson and Ingraham, 1983). Aussi nous avons choisi de conserver

l'intégralité des communautés présentes dans le milieu naturel. La description des communautés et leur évolution ne sont pas étudiées. Pour ces raisons, l'eau utilisée dans ces expériences est directement puisée du site d'étude (Ploemeur, France ; décrit dans la suite de ce document) à 60 m de profondeur du piézomètre F34 et ne reçoit aucun traitement afin de conserver les communautés bactériennes aussi complètes que possible. La chimie de l'eau utilisée est donnée dans le tableau suivant :

Elément	**Cl^-**	**$N0_2^-$**	**Br^-**	**$N0_3^-$**	**$P0_4^{2-}$**	**$S0_4^{2-}$**
Concentration (mg/L)	59,3	0,00	0,33	41,0	0,34	10,9

Tableau I.1.1:Composition de l'eau utilisée pour les batchs

L'eau puisée a été stockée à 5°C. Avant d'être utilisée dans les batchs, l'eau est désoxygénée par bullage sous argon dans un bidon pour obtenir une concentration en oxygène inférieure à 0,5 mg/L. Le suivi de la concentration en oxygène est effectué en utilisant une sonde portable de terrain WTW composée d'un boitier WTW 315i et d'une sonde oxygène WTW CondOx.

b. Batchs

Les principaux matériaux utilisables dans les pompes péristaltiques sont les suivants : PVC, Teflon, Silicone, Tygon, Pharmed®. Ces matériaux sont donc utilisés ici dans l'évaluation de la réactivité. Etant donné que de nombreux types de PVC ou tygon existent, les résultats présentés ici ne sont pas intégralement généralisables à la totalité des matériaux de ces classes. Les matériaux utilisés sont les suivants : PVC Double Manifold Tubing [Watson Marlow]"; "Pharmed BPT tubing [Masterflex]" ;"Silicone tubing, Platinum cured [Masterflex]"; "Tygon R3607 [Cole Parmer]"; "Teflon - *TFT 250 11 Natural [Alpha Wire Corporation]* ". Afin de comparer la réactivité des plastiques avec la réactivité de la roche du site, un batch a été constitué avec de la roche granitique provenant du site de Ploemeur. Les batchs ont été réalisés dans des flacons de 500 ml en verre fermés par des bouchons plastiques hermétiques (voir Figure 13). L'air initialement présent dans les flacons après l'ajout des plastiques et de l'eau est remplacé par de l'argon. Les expérimentations sont suivies durant 815 heures. Les batchs sont régulièrement agités manuellement.

Figure 13: Batchs

Les quantités d'eau et de matériaux utilisés lors de ces expérimentations sont répertoriées dans le Tableau 2. Les tubes plastiques sont coupés en petits fragments et les surfaces réactives des tubes sont calculées en prenant en compte les surfaces internes et externes des tubes ainsi que leur section. La surface spécifique de la roche est estimée en considérant une organisation sphérique des grains. Ainsi S est approximativement égal à 6/d avec d diamètre moyen des grains (ici 0,6 mm). La surface spécifique est donc de 10000 m^2/m^3.

Batch		Masse tubes (g)	Masse H_20 (g)	Surface réactive (mm^2)
Batch 1	**Temoin**	0	202,61	0
Batch 2	**PVC**	7,95	146,08	18400
Batch 3	**Pharmed**	5,18	154,56	15090
Batch 4	**Teflon**	6,61	132,11	16625
Batch 5	**Silicone**	10,52	175,20	17100
Batch 7	**Tygon**	5,96	125,00	13770
Batch 6	**Roche**	139,07	191,40	751000

Tableau 2: Quantité de matériaux utilisés dans les batchs

c. Analyses chimiques

Les anions ont été analysés par chromatographie ionique avec un DIONEX DX 120 et les cations par ICP-MS. Les échantillons prélevés pour analyses par ICP-MS ont préalablement été acidifiés avec du HNO_3^- supra pur. Le carbone organique a été analysé avec un analyseur de carbone Shimadzu 5050A (carbone organique et inorganique). Les échantillons ont été

filtrés (Sartorius® 0,2 µm) puis conservés au réfrigérateur à 5°C avant les analyses effectués en moins de trois jours. Les volumes prélevés pour chacune de ces analyses étaient de 5 ml.

3. Résultats

L'évolution des concentrations en nitrates, nitrites, carbone organique total et carbone inorganique est présentée sur les Figure 14, Figure 15 et Figure 16.

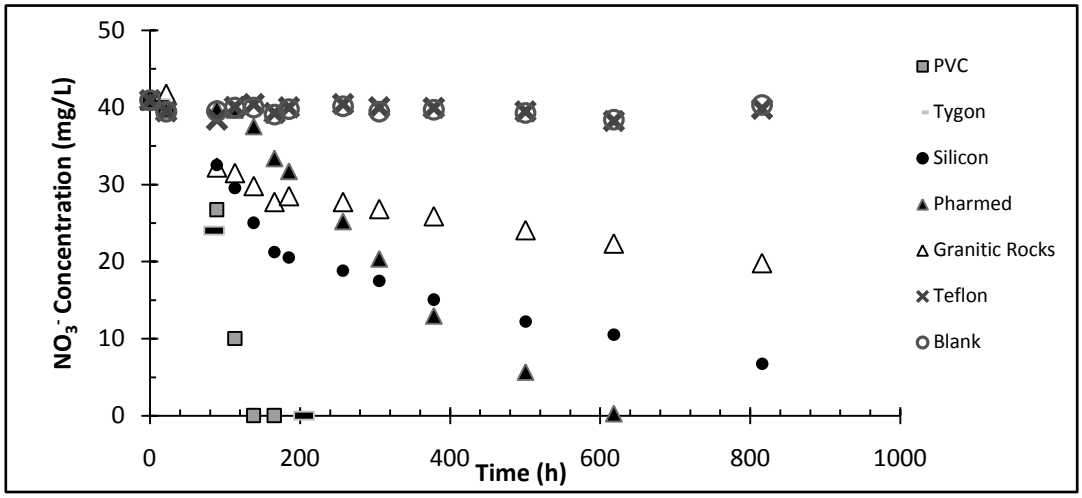


Figure 14: Evolution de la concentration en nitrates dans les batchs

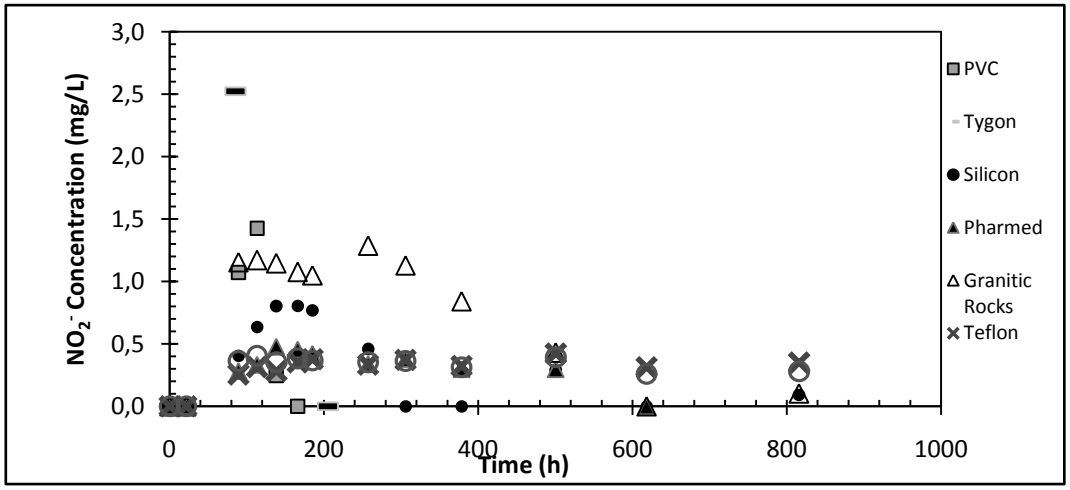


Figure 15: Evolution de la concentration en nitrites dans les batchs

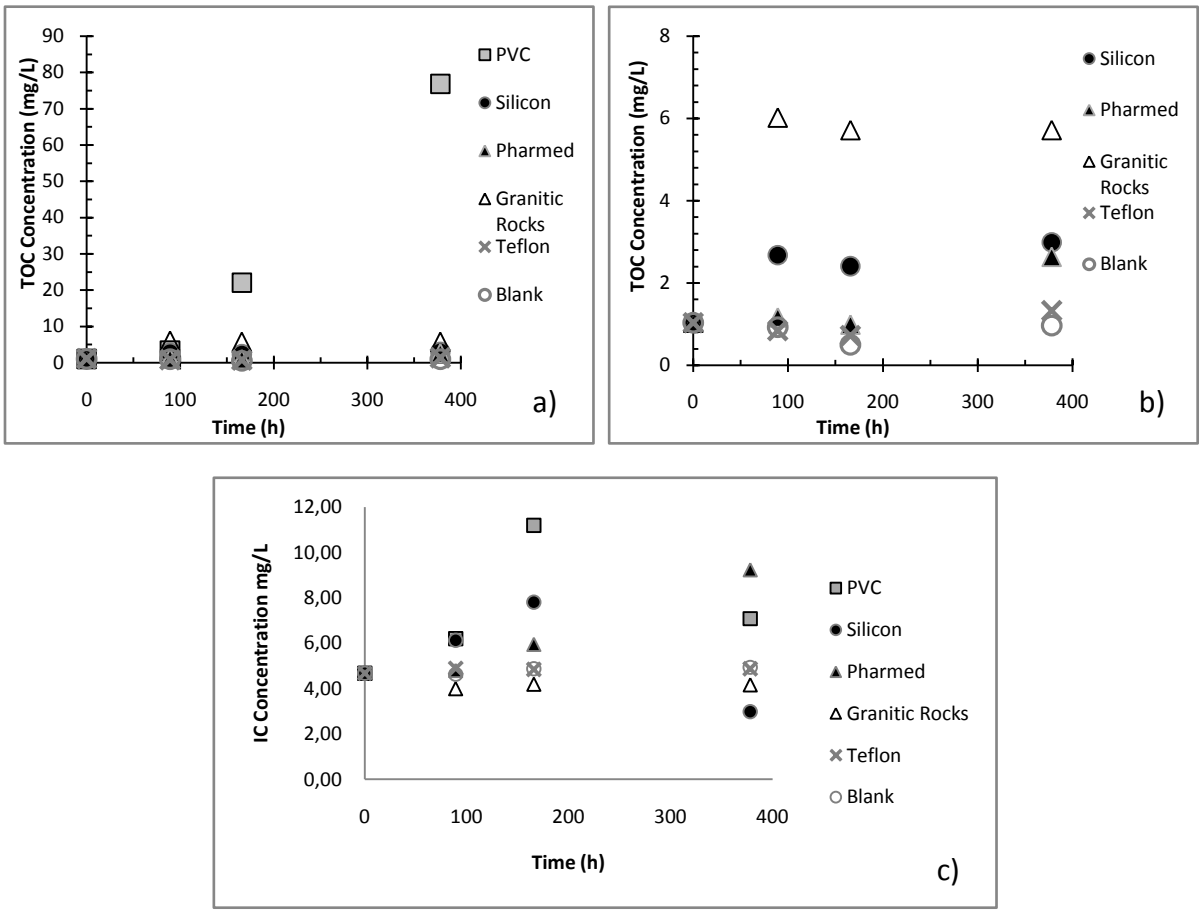


Figure 16: Evolution du carbone organique total dans les batchs ; a) Ensemble des batchs, b) Zoom : Mêmes batchs sans le batch PVC) c) Carbone inorganique

Le batch ne contenant que de l'eau ne réagit pas. Dans ce batch, seule une légère augmentation en nitrites (0,4 mg/L) est observable. Cette hausse intervient dès la première mesure puis reste constante durant la suite de l'expérience. Le batch contenant du téflon montre exactement le même comportement et les même valeurs.

Dans les batchs contenant du PVC et du Tygon, la concentration en nitrates est reduite à 0 en moins de 138 heures. Cette baisse s'acompagne d'une forte hausse en nitrites (1,4 mg/L après 113 heures pour le PVC). La hausse atteint même 2,5 mg/L pour le Tygon après 72 h. Un résultat identique (2,5 mg/L après 72 h) avait aussi été atteint avec du PVC dans une autre série d'expériences conduites dans les mêmes conditions (résultats non présentés). Les deux batchs ont le même comportement vis-à-vis des nitrites avec tout d'abord une forte hausse puis une baisse avant de revenir à une concentration nulle en nitrites. Paralèlement, on observe une hausse du carbone organique total dans le batch PVC jusqu'a une concentration de 76,8 mg/L (Figure 16 a).

Le batch contenant du Pharmed a une tendance similaire avec une cinétique plus lente. 113 heures sont nécessaires avant d'observer une décroissance importante de la concentration en nitrates. Par la suite, plus de 600 heures sont nécéssaires pour observer une décroissance de la concentration en nitrates à une concentration de 0 mg/L. La concentration en nitrites augmente lentement pour atteindre une concentration maximale de 0,5mg/L au bout de 138 h puis baisse lentement pour revenir à 0 en même temps que la concentration en nitrates atteint la concentration 0 mg/L. Dans le même temps, la hausse de concentration en carbone organique reste faible, de 1 mg/L à 2,6 mg/L. Cette hausse n'est observable que lors de la dernière mesure.

Le batch contenant du silicone possède un comportement différent. La baisse de la concentration en nitrates intervient rapidement puis la réactivité décroit brutalement après 165 h. Dans le même temps, une hausse de nitrites est observée créant un pic allant jusqu'à 0,8 mg/L à 165 h. Le suivi de l'évolution de la concentration de carbone montre une hausse de la concentration de 2 mg/L aparaissant dès le début de l'expérience puis restant constante. Les résultats concernant le batch de granite seront discutés ultérieurement.

4. Interprétation des résultats

Malgré un comportement global proche et une réactivité observée dans une majorité des cas, de nettes différences existent entre les différents batchs. Les batchs ne contenant que de l'eau ou de l'eau et du téflon ne réagissent pas. Ceci montre que dans ces conditions une réaction ne peut pas se passer uniquement dans l'eau et donc qu'un élément extérieur est nécessaire pour observer une réactivité. Le téflon n'est pas en mesure de fournir cet élément.

Les batchs contenant du Tygon ainsi que du PVC montrent une très grande réactivité à la fois du point de vue des nitrates, des nitrites et du carbone. La hausse du carbone organique est représentative d'un développement bactérien. La réactivité ne peut pas être directement déduite de la quantité de carbone organique ou de la quantité de microorganismes (Thullner et al., 2002a; Thullner et al., 2002b). Ces batchs montrent cependant que ce type de PVC peut être efficacement utilisé comme support pour la croissance de bactéries hétérotrophes.

Le batch contenant du Pharmed a une tendance similaire avec une cinétique plus lente de la consommation de nitrates. Le temps de latence avant le début d'une consommation importante des nitrates est représentatif des réactions liées aux populations bactériennes. Ceci

correspond au temps de mise en place des populations mais peut aussi montrer une certaine résistance de ce support au développement bactérien. La différence d'évolution du carbone organique dans ce batch comparé au batch PVC semble indiquer une limitation par la quantité de carbone accessible.

Le batch contenant du silicone montre une certaine réactivité. Cependant, la réactivité semble clairement limitée étant donné le changement brutal de régime observé (rupture de pente nette). Il semblerait que certains éléments présents au début sur les tuyaux permettent le développement de bactéries. Ces éléments en quantité limitée ne permettent pas un important développement bactérien et limitent par la suite la population mise en place. Le silicone n'étant théoriquement pas susceptible d'être utilisé par les bactéries, il pourrait s'agir d'un dépôt de plastifiants du tuyau présents initialement.

La présence dans chacun des batchs d'un pic de nitrites qui disparait au bout d'un certain temps peut être liée à l'utilisation de cet élément par différentes populations microbiennes. (Constantin and Fick, 1997) utilisent des populations complémentaires permettant une dénitrification par des bactéries de manière séquentielle. La première population *pseudomonas sp.* change les nitrates en nitrites (dans un ratio de 44%) et en azote gazeux et la seconde population (*cocci sp.*) transforme directement les nitrites et nitrates en azote gazeux. La seconde population n'apparait qu'après un certain temps de réaction. Ceci peut dans notre cas induire un pic dans la mesure où la première population produit des nitrites permettant le développement de la seconde qui les consomme. Cette consommation peut aussi provenir d'une évolution des enzymes produites telles que décrit dans (Her and Huang, 1995). Ces hypothèses n'ont pas été vérifiées.

5. Comparaison avec le batch de granite

Afin de comparer la réactivité de la roche et des matériaux plastiques, un batch contenant de la roche broyée prélevée sur le site a été réalisé en parallèle aux batchs plastiques. L'évolution des concentrations de ce batch est présentée sur les Figure 14, Figure 15 et Figure 16 pour les concentrations en nitrates, nitrites et TOC. Dans ce batch nous nous attendons à une réaction de type autotrophe utilisant de la pyrite suivant l'équation (1) :

$$5FeS_2 + 14NO_3^- + 4H^+ \longrightarrow 7N_2 + 10SO_4^{2-} + 2H_2O + 5Fe^{2+} \qquad (1)$$

On observe dans un premier temps une forte baisse des nitrates avec une concentration passant de 41,8 mg/L à 28,5 mg/L en 165 h, puis un brusque changement s'opère et la réactivité devient plus faible. A la fin de l'expérimentation, la concentration de 0 mg/L n'est pas atteinte mais la décroissance continue. On observe dans ce batch comme dans les autres batchs plastiques réactifs un pic de nitrites aux premiers temps qui disparait ensuite avec le temps. La concentration en carbone organique augmente dès le début puis reste constante à une concentration de 5,7 mg/L.

Cette comparaison montre que les réactions ayant lieu entre les tubes PVC et la roche ne sont pas les mêmes en raison d'une production de sulfates et une production de carbone organique moindre. Cependant les cinétiques réactionnelles sont, d'un point de vue des nitrates, du même ordre de grandeur et permettent ainsi de faire le lien entre ces expériences et les travaux sur site.

6. Conclusion

Ces expériences apportent des informations importantes concernant la réactivité des matériaux de laboratoire. Ces résultats montrent qu'un grand nombre de matériaux plastiques peuvent servir de substrat pour la croissance de bactéries hétérotrophes et ainsi soutenir une réaction de dénitrification importante dans les conditions adéquates.

Les nitrates peuvent être utilisés par les bactéries à la place de l'oxygène et ils peuvent prendre part à un processus de dégradation. Il est couramment accepté que les bactéries utilisent l'oxygène pour la dégradation des plastiques. Cependant la possible utilisation des nitrates n'est pas discutée dans la littérature et ce pour deux raisons. Premièrement, les cas où les nitrates et les plastiques peuvent interagir dans des conditions réductrices sont rares. Dans le champ de recherche de la biodégradation des plastiques, cette réaction est négligée en termes d'efficacité pour dégrader une importante quantité de plastiques. Ainsi même si cette réaction parait sans intérêt à grande échelle, dans le cadre d'expériences liant nitrates et polymères à l'échelle du laboratoire, cette réaction peut être assez efficace pour dégrader des quantités non négligeables de nitrates.

Les batchs réalisés ont montré des cinétiques de réactions différentes en fonction des matériaux utilisés. Les batchs de téflon et d'eau montrent que les nitrates et les éléments dans l'eau ne sont pas suffisants pour permettre une réaction. Dans le cas des batchs de PVC et de

Tygon la dégradation des nitrates et des nitrites étant totale, les nitrates semblent être le facteur limitant de la réaction et le carbone utilisable est en excès. De plus, le développement rapide de la réaction montre que le carbone est facilement accessible. Le cas du batch contenant du Pharmed présente le même type de résultats mais avec une cinétique nettement plus lente. Les batchs contenant de la roche et du silicone ont des tendances symptomatiques de l'influence d'un facteur limitant. Initialement présent dans le milieu, il permet de soutenir la réaction avant de disparaitre limitant ainsi la vitesse de réaction. On note que la réaction ne s'arrête pas complètement et donc qu'un type de carbone reste accessible dans le milieu. Celui-ci pouvant provenir du relarguage d'éléments par les bactéries et/ou d'une utilisation cannibale des cellules mortes. Tous les batchs présentent une consommation complète des nitrites après un pic important. Ceci peut être attribué a une coopération bactérienne telle que celle soutenue dans (Marazioti et al., 2003) ou à une évolution des enzymes (Her and Huang, 1995). Comme cela a déjà été discuté par différents auteurs, le développement de colonies bactériennes peut être difficile à contraindre et à évaluer étant donné que les réactions peuvent être gérées par différentes communautés en symbiose ou en compétition. Les processus au sein des biofilms contenant de multiples bactéries sont toujours partiellement incompris.

Cette expérience montre de plus qu'à l'échelle du laboratoire, différentes réactions inattendues peuvent interférer avec le processus étudié. Sous certaines conditions, un grand nombre de matériaux plastiques peuvent réagir suffisamment et ainsi créer un biais dans les manipulations. Ceci est à prendre en compte lors de la mise en place de dispositifs expérimentaux visant à l'étude des réactions lentes et de faible amplitude. Ce phénomène est particulièrement important dans le cas de l'utilisation de pompes péristaltiques pour lesquelles le fluide passe au travers de tubes en raison d'un important ratio surface / volume. Les temps représentatifs de ces réactions peuvent aussi être du même ordre de grandeur que certaines réactions étudiées. Dans le cas de l'utilisation d'une souche unique de bactéries ce problème ne devrait pas exister étant donné que la dépolymérisation qui est la première étape de la dégradation et l'assimilation qui en est une suivante ne sont pas effectuées par les mêmes organismes. Cependant, le maintien d'une population unique de bactéries dans un milieu est extrêmement difficile à obtenir comme l'ont démontré (Koenig et al., 2005). Ce type de réaction peut être d'importance moindre dans le cas d'expériences avec apport direct de carbone tel que les expériences de (Amirbahman et al., 2003; Sinke et al., 1998; Vongunten and Zobrist, 1993; Wang et al., 2009) en raison d'une plus grande accessibilité de ce carbone.

Cependant, cette réaction existe et peut avoir une importance dans différents types d'expérimentations. Des expériences où il est noté une réactivité dans un bidon de stockage ne sont pas très nombreuses mais existent (Wang et al., 2009). Les indicateurs de ces réactions ne sont pas évidents et sont difficilement identifiables dans un dispositif expérimental complexe. Il est donc recommandé d'évaluer la possible interaction des matériaux avant la réalisation de l'expérience.

V. Dispositif expérimental en flux continu

Ces expériences en batchs ont conduit à mettre en place un dispositif expérimental qui sera utilisé pour les chapitres suivants de cette partie. Il a été utilisé selon deux variantes décrites ci-dessous. Une première série d'expériences a été réalisée sur des temps courts (900 heures) avec des tuyaux de longueurs identiques et des vitesses d'écoulement différentes entre les tuyaux. Les résultats de cette expérience sont décrits dans le chapitre 2 de cette partie. Le second dispositif a été utilisé sur des temps plus longs (1700 heures) avec des tuyaux de longueurs différentes pour permettre de suivre l'évolution du front de réaction. Dans cette expérience les vitesses d'écoulement sont identiques entre les tuyaux. Les résultats de ces expériences sont décrits dans les chapitres 3 et 4 de cette partie. Pour des raisons de simplicité de lecture la première expérience sera appelée expérience cout terme et la seconde expérience long terme bien que le temps d'expérience ne soit pas le seul élément variant entre les deux.

1. Dispositif général

Le dispositif expérimental est le même pour l'intégralité des éléments excepté pour les longueurs des tubes réactifs qui varient entre les expériences. Le dispositif utilisé permet de faire circuler de l'eau dans des tubes plastiques pouvant servir de substrat au développement de bactéries hétérotrophes en conditions dénitrifiantes. Ce dispositif expérimental se compose d'un bidon en polyéthylène haute densité (Manutan©) de 20L. Ce bidon est relié à une bouteille d'argon équipée d'un manomètre permettant un apport d'argon dans le bidon à une pression voulue. Ce bidon permet à la fois la désoxygénation de l'eau utilisée ainsi que son maintien en conditions anaérobies durant toute la durée de l'expérience. L'eau provenant du site y est introduite pour être désoxygénée par bullage pendant un minimum de deux heures. L'eau utilisée dans ces différentes expériences ne présente pas de différences chimiques majeures. Le bon mélange durant le dégazage dans le bidon est assuré en maintenant une

différence de pression supérieure à 0,5 bars entre le tuyau d'entrée de l'argon et la sortie à l'atmosphère. Le bidon est équipé d'un manomètre afin de contrôler les pressions. La concentration en oxygène est contrôlée en sortie de bidon via un tuyau Teflon grâce à une sonde portable de terrain WTW composée d'un boitier WTW 315i et d'une sonde oxygène WTW CondOx. Le dégazage de l'eau est arrêté lorsque la concentration mesurée est inférieure à 0,5 mg/L assurant ainsi une très faible concentration en oxygène dans le milieu. Ce bidon permet la conservation de l'eau en conditions anaérobies grâce à un maintien sous une atmosphère d'argon en légère surpression (0,2 bars). L'eau stockée dans ce bidon est régulièrement suivie pour les paramètres oxygène, pH, Eh, conductivité et anions (F,NO_2^-, NO_3^-,SO_4^{2-},Cl^-,Br^- et PO_4^{2-}) afin de vérifier la non variabilité du signal d'entrée du système.

Divers tubes en Téflon (Diamètre interne 2mm *[Alpha Wire Corporation :TFT 250 11 Natural]*) semi-rigides d'une longueur de 7 cm partent de ce bidon. Ils sont par la suite reliés à des tubes "Pharmed BPT®" [Cole-Parmer instrument company] de diamètre 1,85 mm et longueur 30 cm. Ces derniers sont placés sur une pompe péristaltique Watson Marlow 205U. La rigidité relative des tubes téflon ne permet pas leur utilisation directe sur une pompe péristaltique. Les tubes Téflon ne réagissent pas avec les nitrates et ne permettent pas de développements bactériens. Les tubes Pharmed® peuvent avoir une certaine réactivité vis-à-vis des nitrates et sont donc utilisés uniquement sur les galets de la pompe péristaltique afin de limiter leur possible influence. La non réactivité des ces tubes est suivie durant la totalité des expériences.

2. Expérience 1 : Suivi court terme

Pour cette première série d'expériences les tubes Pharmed sont connectés à des tubes "PVC Double Manifold Watson-Marlow®" de 2,05 mm de diamètre d'une longueur de 135 cm. Grâce aux pompes péristaltiques, différentes vitesses d'écoulement sont imposées dans les tubes pour observer l'influence de ces vitesses. Les expériences ont été conduites avec des réplicas pour les vitesses suivantes 35 mm/min (8 réplicas), 13 mm/min (10 réplicas) et 6,2 mm/min (3 réplicas). Lors de cette série d'expériences les évolutions en carbone organique et inorganique sont suivies tous les trois jours et analysées par un Shimadzu 5050A Total Organic Carbon analyzer.

Le schéma de l'expérience est donné Figure 17.

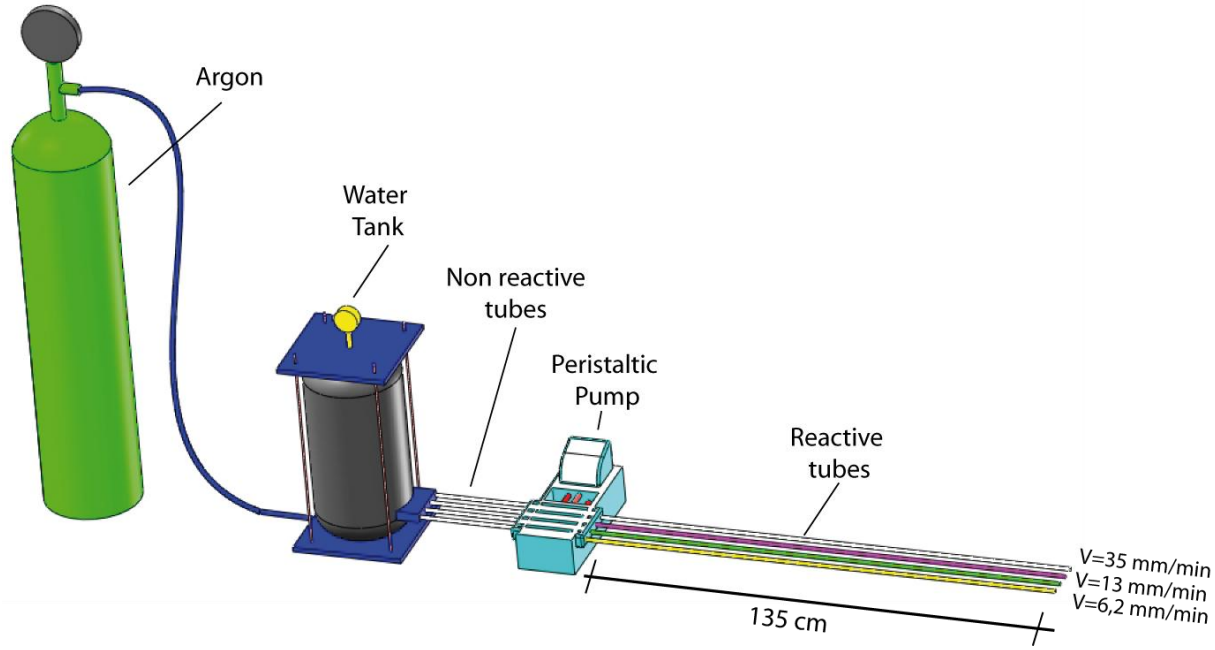


Figure 17: Schéma du dispositif expérimental court

Une photo du dispositif expérimental est présentée Figure 18:

Figure 18: Photo du dispositif expérimental court

3. Expérience 2 : Suivi continu long terme

Pour ce second dispositif, on utilise 6 tubes différents. Les tubes Pharmed sont reliés à des tubes "PVC Double Manifold Watson-Marlow®" de 2,05 mm de diamètre. Sur les 6 tubes Pharmed placés sur la pompe péristaltique, différentes longueurs de tubes PVC sont fixées. Sur le premier, aucun élément en PVC n'est rajouté. Il servira de contrôle du signal d'entrée dans les tubes en PVC. Sur le second, 45 cm de tubes PVC sont rajoutés. Sur les

tuyaux 3 et 4, 90 cm de tuyaux PVC sont rajoutés. Deux tuyaux de longueurs identiques sont utilisés afin d'avoir un contrôle sur la variabilité du milieu. Sur le tube 5, 135 cm de PVC sont rajoutés et sur le tube 6, 180 cm. Ce dispositif expérimental permet à la fois un suivi temporel des concentrations en sortie de chaque tuyau et, en considérant que les phénomènes ayant lieu dans les différents tuyaux sont identiques, de réaliser des profils de concentrations en fonction de la distance. On peut ainsi considérer qu'un prélèvement sur un tuyau de 90 cm est représentatif de ce qui ce passe dans un tuyau de 180 cm à 90 cm (Figure 19).

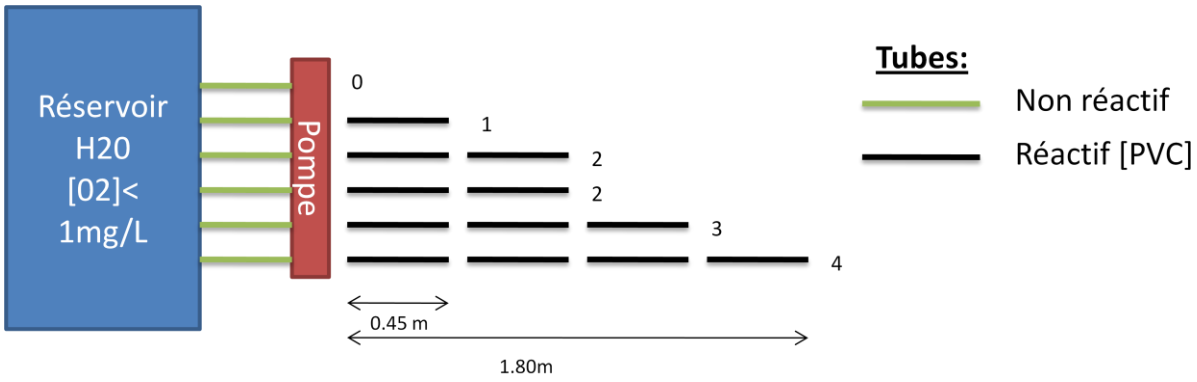


Figure 19 : Schéma du dispositif expérimental

Une photo du dispositif expérimental est présenté Figure 20:

Figure 20: Photo du dispositif expérimental long

VI. Conclusion

Ce premier chapitre a permis de définir nos motivations pour mettre en place un dispositif expérimental permettant d'évaluer l'influence des vitesses d'écoulement sur la réactivité biochimique. Les expérimentations en batchs montrent que des tubes PVC plastifiés peuvent fournir le carbone nécessaire à la croissance de populations microbiologiques permettant ainsi une consommation des nitrates. Ces expérimentations ont conduit à la réalisation de dispositifs expérimentaux permettant de reproduire des apports en accepteurs d'électrons (nitrates) dans une phase liquide et en donneurs d'électrons (carbone) dans une phase solide. Ces modes d'apports permettent une analogie avec le milieu naturel où les accepteurs d'électrons peuvent être présents en phase liquide alors que les donneurs d'électrons (minéraux) sont présents en phase solide. Contrairement à une majorité des dispositifs expérimentaux, cette répartition spatiale permet de fournir des donneurs d'électrons de manière homogène sur toute la longueur du dispositif ce qui permet un développement de la réaction sur toute la longueur. La seconde originalité de ce dispositif est l'échelle d'étude. En effet, ces dispositifs permettent une étude de l'influence de la vitesse dans un cadre où celle-ci est bien contrainte en faisant un des rares dispositifs expérimentaux possibles permettant l'évaluation directe à méso-échelle de l'influence sur la réactivité biochimique.

En plus d'amener à la réalisation de dispositifs expérimentaux, ces expériences ont montré que certains matériaux plastiques peuvent, en permettant des développements microbiologiques, générer une réaction consommant des nitrates et que celle-ci peut avoir un impact sur différents dispositifs expérimentaux.

Les chapitres suivants de cette partie présenteront les résultats expérimentaux. Le chapitre 2 présentera les résultats de l'expérience court terme où l'influence de la vitesse sur la réaction est évaluée. Un modèle sera de plus présenté pour expliquer le comportement observé. Le chapitre 3 présente l'expérience long terme et montre un arrêt de la réactivité générant un comportement oscillatoire n'amenant jamais à un état stationnaire. Le quatrième chapitre s'intéresse à l'évolution spatiale du front de réaction dans le tube et montrera une évolution spatiale de celui-ci amenant à une localisation de la réactivité.

Chapitre 2 :
Impact de la vitesse d'écoulement sur les processus de dénitrification à meso-échelle. Résultats expérimentaux et modélisation

Le chapitre précédent a présenté une réaction de dénitrification hétérotrophe en batchs utilisant des nitrates naturellement présents dans l'eau du site de Ploemeur (Tarits et al., 2006) et du carbone provenant de la dégradation de tuyaux plastiques. Dans ce chapitre nous étudierons l'influence de la vitesse d'écoulement sur cette réaction à l'échelle d'un tube plastique de 2 mm de diamètre. Ce chapitre a été rédigé sous la forme d'un article qui sera soumis à "Journal of Contaminant Hydrology".

Résumé de l'article

Bien que les processus hydrodynamiques soient connus pour avoir un impact sur les réactions biogéochimiques, leur influence directe n'est toujours pas bien identifiée. En particulier l'effet de la vitesse d'écoulement et des processus de diffusion au sein des biofilms reste partiellement incompris. Dans ce chapitre nous proposons un dispositif expérimental ainsi qu'un modèle pour étudier les relations entre les paramètres hydrodynamiques et la réactivité à l'échelle d'un macro-pore. Le dispositif expérimental consiste à suivre un processus de dénitrification ayant cours entre de l'eau du site d'étude contenant des nitrates et passant de manière continue dans des tubes en plastique servant de source de carbone. Ceci est effectué pour différentes vitesses d'écoulements de 6,2 mm/min à 35 mm/min. Les expériences montrent différentes phases. Lors de la première phase, la consommation de nitrates est contrôlée biologiquement. Celle-ci est suivie d'une seconde phase où le contrôle de la concentration de nitrates est un contrôle physique. Une troisième phase d'arrêt de la réaction est aussi observée dans ce système. La complexité de cette réactivité met en exergue l'intérêt des expérimentations en conditions dynamiques en comparaison des expériences en conditions statiques pour la compréhension de l'intégralité des processus pouvant avoir lieu dans le milieu. Par la suite nous proposons un modèle conceptuel où les nitrates sont présents dans une phase mobile alors que la réactivité est localisée dans un biofilm immobile. Tout comme dans notre expérience, le système est contraint dans un premier temps par un facteur biologique de croissance du biofilm puis la contrainte devient physique par effet de la

diffusion dans ce même biofilm. Ce modèle permet de définir des paramètres équivalents pour l'épaisseur effective du biofilm ainsi que pour le coefficient de diffusion dans le système.

Flow velocity impact on denitrification process at the pore-scale: experiment and modelling

Alexandre Boisson[1*], Delphine Roubinet[1], Luc Aquilina[1], Olivier Bour[1], Jean-Raynald de Dreuzy[1], and Philippe Davy[1]

[1]UMR Geosciences Rennes CNRS 6118 , University of Rennes 1, Rennes, France (*Correspondance :alexandre.boisson@univ-rennes1.fr).

Abstract

Although hydrodynamic processes are known to impact on biogeochemical reactions, their influence is still not well identified. Particularly, the effects of physical factors such as pore-scale flow velocity versus diffusion within biofilms need to be evaluated. We propose an experimental approach to study the relationship between hydrodynamic parameters and reactivity at the pore-scale. The experimental set-up allows monitoring denitrification process for nitrate rich site water passing continuously through plastic tubes (carbon source). For several flow velocities (from 6.2 to 35 mm/min), the experiments show two main phases: a first phase where the nitrate consumption is biologically controlled and a second phase where the nitrate consumption is physically controlled. The complexity of the reactivity highlights the relevance of dynamic experiments over static ones for the understanding of this process. We finally propose a conceptual model where nitrates are present in a mobile phase while the reactivity occurs in the immobile biofilm phase. As in our experiment, the system is firstly biologically constraint (biofilm growth) and then physically constraint (flow velocity effect on diffusion in the biofilm). This model allows the definition of equivalent parameters for the biofilm effective thickness and the diffusion coefficient of the system. The current study show

how biological and physical processes may be coupled for controlling the initiation of denitrification process at the pore-scale.

I. Introduction

Worldwide, nitrate leaching to groundwater represent a long term risk for groundwater quality (Spalding and Exner, 1993). Natural attenuation of this compound by biological degradation (denitrification) has been extensively studied from the batch scale (Kornaros and Lyberatos, 1997; Marazioti et al., 2003) to the aquifer scale (Clement et al., 2003; Korom, 1992; Tarits et al., 2006). A full understanding of denitrification processes in natural systems implies a structural description of the different scales involved and the determination of dominant physical, chemical and biological processes at each scale (Sturman et al., 1995). As reactivity in complex natural media is partially driven by physical heterogeneities (Tompkins et al., 2001), the understanding of reaction kinetics, well developed for static experiments (Hiscock et al., 1991; Korom, 1992), needs further development for dynamic experiments. Effects of physical heterogeneities have been studied on reactive columns (Sinke et al., 1998; Vongunten and Zobrist, 1993) on 2D systems (Thullner et al., 2002b), or on other simple geometries such as tubes (Garny et al., 2009; Lewandowski et al., 2007; Lewandowski et al., 2004). Most of these studies are devoted to biofilm development related to reactivity processes (Garny et al., 2009; Lewandowski et al., 2007; Lewandowski et al., 2004) or to physical parameters (Beyenal and Lewandowski, 2002; Garny et al., 2009; Lau and Liu, 1993; Stoodley et al., 1994). More precisely, Characklis discusses the influence of hydraulic conditions on biofilm development (shape, size and reactive layer) and nutrient availability (Characklis, 1981). However, there is a lack of knowledge about the direct impact of physical parameters on the bulk reactivity although physical parameters such as velocity may be a key-

control of the overall reactivity in natural media where mobile water is usually interacting with a non mobile mineral phase.

The global comprehension of hydrodynamic parameter effects on bioreactivity implies an accurate understanding of this relationship at the pore-scale. With experiments in plastic tubes (equivalent to a 1D flow system), the system geometry is perfectly known and the hydraulic parameters are well controlled. It is thus the most convenient configuration scale to assess the influence of hydrodynamic parameters such as advection and diffusion on a single flow line. It avoids dealing with the flow complexity of columns which are always a sum of processes occurring on a large number of flow lines. The experiment presented here gives information linking mobile (bulk water) and immobile phases (matrix and/or biofilm) relevant for understanding reactive processes in natural media.

In order to understand physical and biological controls on the reactivity, we measure the reactivity evolution of nitrate-rich water passing through PVC tubes with different velocities. We aim at determining the mechanisms that are hydrodynamic-dependant during the denitrification process due to biofilm development. Using a new conceptual model based on a mobile / immobile representation of the system, we investigate the key parameters of the denitrification experiment. The material and methods used for the denitrification experience are described in section 2 and the experiment results and their interpretation are presented in section 3. Section 4 is devoted to the conceptual model description and its application on experiment results. We then discuss how both experiment and model may be a simplification of natural media where nitrates flowing with water (mobile phase) interact with a mineral source (immobile phase).

II. Material and methods

The experiment consists in a continuous injection of nitrate-rich water in plastic tubes (1D flow) and monitoring the nitrate consumption due to bacteria development. Bacteria grow using carbon from the tubes and nitrates from the water. Plastic compounds are known to serve as substrate for heterotrophic bacterial growth (Mohee et al., 2008; Shah et al., 2008). All experiments are conducted with similar experimental setup. The experiments are made in the dark at a constant temperature of 18°C with three different velocities (6.2mm/min, 13mm/min and 35mm/min). In the experiments, water is delivered from a tank to reacting PVC tubes through non-reactive Teflon and Pharmed tubes placed in a peristaltic pump (Watson Marlow 205U; Figure 1). The PVC tubes have a length of 135 cm so that water takes from 40 mn to 3h 40 to go through depending on the flow velocities.

1. Materials

We use “reactive” tubes providing carbon (“Watson Marlow® PVC double manifold” tubes) and non reactive tubes (Pharmed® or Teflon tubes) with an inner diameter of 2mm. The PVC tubes are transparent and thus allow biofilm observation. The nitrate-rich water (45mg/L) has been collected in the Ploemeur site (Brittany, France) where natural denitrification has been observed (Tarits et al., 2006) and do not receive any treatment. The water is coming from the same piezometer but sampling has been made at different dates within a year. No water chemistry changes have been observed during this period. Although part of the developing microbial population may come from the tubes as no sterilisation was made, bacteria are supposed to come from the water since *i)* they are naturally present in such groundwater (Bekins, 2000; Bougon et al., 2009); *ii)* several experiments of crushed granite and water from the Ploemeur site have showed denitrification processes (Ayraud, 2006; Tarits et al.,

2006).The inoculation of the medium occurs by bacterial attachment. The water prior to injection in the tube is maintained under argon atmosphere in high density polyethylene (whose non reactivity is controlled) where regular injections of argon allow deoxygenation of the water by bubbling and keep it in anoxic conditions. The organic carbon concentration in the injected water remains below 0.5 ppm during the whole experiment.

2. Analysis

All samples are filtered with a 45 µm Sartorius filter before analyses. Major anions (NO_3^-, SO_4^{2-}, Cl^-, F^-) are analyzed daily using a Dionex DX 120 ion chromatograph. Organic and inorganic carbons are analyzed every three days using a Shimadzu 5050A Total Organic Carbon analyzer. The volume used for analyses (5 ml) is equal to the full volume of the tube here after called pore volume. It corresponds to a volume that passed only once in the system. Thus the sampling protocol is independent of the velocity. Dissolved oxygen is measured using a WTW315i-CondOX probe. Flow is measured daily by weighting at the tube outlet: its variations are below 2% in weighted mass.

3. Preliminary experiment in batch

Using the experimental tubes and water, a preliminary batch experiment is performed to check the occurrence of the denitrification process with plastic tubes and immobile water. 150 ml of deoxygenated water is placed in glass flasks under argon atmosphere with plastic tube fragments (with a mass of 8 g and a reactive surface of 0.018 m^2). Other batches are made containing the same water only. Experiments are conducted in duplicates. In the case of site water and tubes, a complete consumption of the nitrates is observed within 130 hours. In the batch containing only water the concentration of the nitrates does not evolve, which confirms that the denitrification reaction occurs between the tube carbon and the water solutes and is

not only related to water compounds. Consequently, plastic tubes can be considered as the carbon source of the denitrification reaction.

4. Flow through experiments

In the flow through experiments (Figure 1), it is checked during all the experiments that no reaction occurs in this setup before the PVC tubes. Experiments are performed at three different flow velocities: V_1=35 mm/min, V_2=13 mm/min and V_3=6.2 mm/min. Such velocities are typical to what is expected in the field, especially at the Ploemeur site. We recall that it implies residence-times in the tubes ranging from 40 min to 3h 40min. The whole experiment lasts 900 hours. To take in account the inherent variability of biogeochemical reactions, experiments are performed with several replicates for each velocity (8 replicates for v_1=35 mm/min, 10 replicates for V_2=13 mm/min and 3 replicates for V_3=6.2 mm/min). The different experiments were done in three phases within 1 year to ensure the reproducibility of the results.

III. Results

Figure 2 shows the nitrate consumption versus time for the three different flow velocities. Errors bars show the variability of the results among the different replicates. Three phases of nitrate consumption can be identified. Nitrate consumption first increases (i.e. the differences $NO_{3outlet} - NO_{3intlet}$ increases), secondly it becomes constant and thirdly it decreases. Compared to batch experiments that were just characterized by a decrease of nitrate concentration, dynamic flow conditions involve different phases of nitrate consumption. Thus it leads to more complex reactive processes. The secondary and third phases were not observed in batch experiments and can be attributed to the dynamic conditions of the flow through experiment. Biofilm development is clearly observed during the experiment (Figure

3). Its thickness has not been measured but constant outlet flow indicates that this development do not lead to a significant tube clogging.

1. Initiation of the degradation process (Phase 1)

The first phase (points included in the dashed square of Figure 2) corresponds to a linear nitrate consumption increase. This increase is similar whatever the flow velocity. However, this nitrate consumption increases ends when the concentration reaches thresholds (phase 2) that depends on the flow velocity. Note that the concentration at the inlet remains constant. It implies that reactivity – the mass of nitrate consumed per unit surface and per unit time – increases with time (Figure 2). Since residence times are different depending on the flow velocities, the reactivity increase through time is greater for higher flow velocities. Nevertheless, what is remarkable is that the concentration at the outlet is similar during phase 1 whatever the flow velocity (Figure 2).

In Figure 4, we present experimental results expressed as the reactivity and not as the nitrate consumption. To analyse how reactivity may be controlled by the mass on nitrate brought into the system, the reaction rate ($mg.m^{-2}.s^{-1}$) evolution is plotted versus pore volume instead of versus time. By doing so, it appears that the consumption rate or the degradation rate of the nitrates (Figure) does not depend on the velocity but only on the quantity of water passed through the experiment (i.e. the number of pore volume). The mass of nitrates consumed per pore volume is thus independent on the residence time. The maximum reaction rate values are observed for the same pore volume whatever the flow velocity.

The increase with time of the reaction rate (Figure 4) is linked to the development of the biofilm. The biofilm first appears as clusters from the millimeter scale to the centimeter scale at the beginning of the experiment (<600 hrs) (Figure3a) before spreading continuously along

the tubes (Figure b). As nitrate and organic carbon are present at the tube outlets (carbon concentration ranging from 6.5 to 21 ppm), they are in excess in the system and cannot be considered as a limiting factor. The limiting factor controlling this first phase is the bacterial growth rate that can be characterized by the degradation rate (Figure 4). Note that since the reaction rate is linked to bacterial development, the integrated consumed mass is the critical parameter in this situation whereas in batch only the limitation via nitrate consumption could be observed.

2. Nitrate consumption threshold (Phase 2)

The second phase corresponds to the minimum nitrate concentration. This value is reached for a nitrate consumption threshold that depends on the tube flow velocity (Figure 2). It represents the maximum nitrate consumption for a given flow velocity. The maximum reaction rates (Figure 4) reached for each velocity is presented Table 1. As carbon and nitrates (the main reactants) are still in excess at the tube outlets, their availability is once more not the limiting factor. We interpret the velocity dependence of the thresholds as the diffusion capacity of the nitrates within the biofilm. This diffusion process is in turn linked to the velocity within the tube. This process is further described in section IV.

We notice that variability increases with experimental time. This increase of the variability was expected as biofilms are difficult to reproduce over long experimental time and may evolve differently from identical initial conditions (Lewandowski et al., 2007; Lewandowski et al., 2004).

3. Slow down of the nitrate degradation (Phase 3)

We observe in most cases (Figure blue and red curves) that the nitrate consumption may decrease ($NO_{3outlet} - NO_{3inlet}$ tends towards zero) after reaching the maximum reaction rate.

The reactivity decrease takes place slowly as the water residence time in the tubes is much smaller than the experimental time. This phenomenon will be discussed more in the details elsewhere (Boisson et al, in prep).

IV. Interpretation using a mobile / immobile model

Experimental results show evidence of a complex reactive evolution that can be characterized by three phases. The good reproducibility of the experimental results should be emphasized. The beginning of the experiment corresponds obviously to the initiation of the reactive process and is mainly linked to the development of the biofilm in relation with the nitrate mass brought into the system. The second phase is characterized by a constant value of nitrate at the outlet, value that depends on the flow velocity. This plateau does not seem to be related to biological limiting factor but seems to be physically controlled. Among the different physical parameters that may play a role is the thickness of the biofilm that may exceed the typical distance of diffusion for the given residence time. In the following sections, we investigate this assumption through a simple conceptual model. The challenge is the building of a consistent model able to reproduce both phases biologically or physically controlled. Note that phase 3 will not be considered in the model.

We aim at building a conceptual model able to reproduce the reaction dynamic from a biologically limited reaction in the first phase to a physically limited reaction in the second phase. We argue that the system can be represented by a mobile part (advective flow which transport nitrates) and an immobile part (biofilm) where nutrients (nitrate and carbon) are accessible through diffusion. While the biofilm thickness is small (first phase), nutrients can diffuse through all the thickness of the biofilm and the nitrate consumption is thus limited by the biofilm size (Figure 5a). Then, the biofilm reaches a critical size (second phase) above

which only a part of its thickness is accessible by diffusion (Figure 5b). In the second phase, we will show that the nitrate consumption limited by the diffusion capacity is linked to the flow velocity of the mobile part. The following subsections describe the mathematical formalism of the conceptual model and show its consistency with the experimental results.

1. Model description

The mobile / immobile model assumes a simple representation of the system with 1D advection in the mobile part and 1D diffusion in the immobile part (perpendicular to the mobile part). The main parameters are i) the thicknesses of the mobile / immobile parts, ii) the porosity and the diffusion properties of the immobile part and iii) the flow velocity of the mobile part.

Two main kinds of mobile-immobile models are classically used. The continuous ones take into account the finite size of the immobile part (Lim and Aziz, 1995; Noetinger and Estebenet, 2000) and the discrete ones take into account the physical parameters of the mobile part (Cvetkovic et al., 2004; Neretnieks, 2002). With the latter one, nutrients are displaced by advection in the mobile part surrounded by an infinite immobile part. Nutrient diffusion in the immobile part is physically restricted by the diffusion capacity x_k (characteristic distance covered by diffusion) (Roubinet, 2010)

$$x_k = \frac{\emptyset D}{d v_k} L \qquad (1)$$

where $\emptyset$ and D are the immobile part porosity and diffusion, d and L are the mobile part thickness and length and v_k is the flow velocity in the mobile part. The diffusion capacity x_k depends on the velocity of the mobile part v_k. If nutrients are travelling fast enough in the mobile part (high flow velocity), the opportunities of diffusing inside the immobile part are

small and the diffusion capacity is restricted to a small area around the mobile part. Conversely, if the nutrients travel slowly in the mobile part flow (small flow velocity), the opportunities of diffusing are greater and the diffusion capacity represents a larger proportion of the immobile part.

The thickness of the immobile part is noted e_b and its growth is modeled by a pore volume dependent function $f(V)$

$$e_b = f(V(t)) \tag{2}$$

where $V(t)$ the pore volume (equal to the volume of the tube) characterizes the nitrate mass brought into the system. By simplicity, the mobile part thickness, as well as the velocity, is considered as constant with time. This assumption will be discussed in section V.

We define the effective biofilm thickness e_{eff} as the thickness that nitrates cover by diffusion inside the immobile part. The nitrate are consumed only within this layer and the nitrate consumption ΔC is assumed to be directly proportional to e_{eff} by

$$\Delta C = \alpha e_{eff} \tag{3}$$

with α the nitrate consumption per unit of effective biofilm thickness. e_{eff} increases first with time when nutrients diffuse through all the biofilm thickness (e_b) in the first phase and levels up to the diffusion capacity (x_k) in the second phase. Consequently, the reaction rate is controlled by the biofilm growth for short times (Figure 5a) and by the diffusion capacity for longer times (Figure 5b). It is expressed as

$$\Delta C = \begin{cases} \alpha f(V(t)), \ t \leq \tau_c \ (a) \\ \alpha \frac{\emptyset D}{d v_k} L, \ t \geq \tau_c \ (b) \end{cases} \tag{4}$$

where τ_c is the characteristic time for which the biofilm thickness becomes larger than the diffusion capacity ($e_b > x_k$). The transition between the two phases is related to a characteristic biofilm thickness which is reached when enough nitrates have been brought to the system by a given number of pore volumes.

By describing a nitrate consumption biologically controlled (biofilm growth) and then physically controlled (flow velocity), the conceptual model reproduces the nature and dynamic of the experimental control factors during the first two phases.

2. Model application

The model parameters are the nitrate consumption per space unit (α), the biofilm growth law ($f(V(t))$) and porosity ($\emptyset$), the diffusion coefficient (D), the tube length (L) and diameter (d) and the flow velocity (v_k) (Figure 5). The parameters linked to the mobile part (flow velocity and tube length and diameter) are known and fixed in the model and the parameters describing the immobile part are determined from the experimental results (Figure 2). The linear behavior of the nitrate consumption with time (first phase) corresponds to the biological control of the reaction modeled by the equation (4a). Assuming a linear evolution of the biofilm thickness ($f(V(t)) = at$), the coefficients α and a are determined from the slope of the first phase. The second phase, modeled by the equation (4b), offers three threshold values (one per velocity) to fit the product of the parameters α, $\emptyset$ and D. As the first regime is described by one coefficient with the results and two with the model, the model has one freedom level.

The parameters are determined by manual fitting and restricted to realistic values from the literature. Figure 2 shows a good agreement between experimental data and model results for the parameters given in the Table 2. The fitted biofilm porosity corresponds to the lowest

value of the classically known range (Lewandowski, 2000) and the model diffusion coefficient is one order of magnitude lower than the diffusion coefficient of nitrates in water (Li and Gregory, 1974). It means that the formation factor of the system, which relates the diffusion coefficient in water and in biofilm (Horn and Morgenroth, 2006), is close to 0.2 (classical values being around 0.18). For the biofilm growth law, the applied linear law corresponds to the exponential phase described by Chapelle (2001b).

V. Discussion

1. Experiment

This study reveals three main regimes of the reaction behaviour: the reaction is limited by the biofilm growth in the first regime and by the flow velocity in the second. The first regime is thus biologically controlled whereas the second regime, corresponding to a maximum reaction rate, is physically controlled. Then the final decrease of the reaction efficiency shows the action of another control operating. We suppose that it could result from a biochemical limitation due to reaction by-products. This third phase will be discussed elsewhere in details (Boisson et al, in preparation).

We should also note that different behaviours between static and dynamic experiment are observed. In batch experiments, a nitrite production is measured followed by a consumption. In flow through experiments, only a constant nitrite production can be observed. Thus, it appears that the flow dynamic certainly have also a great impact on the development of a particular microbial community or on microbial activity bacterial evolution. To improve our understanding of the biological system, microbial community investigation is required and will be done in a future work. Although the microbial communities are not characterized in

the present manuscript, we are quite confident about the experimental results which present a good reproducibility.

2. Model

With the presented conceptual model, the biofilm structure and its dynamic development are strongly simplified and the chosen configuration is minimalist to focus on physical processes. The mobile / immobile representation assumes two main assumptions. Firstly, advection in the mobile part is the dominant process of the system in terms of hydraulic dynamic. Secondly, there is no flow in the immobile part. The amplitude of the fluid velocities used in the experiments implies the validity of the first assumption. However, the second assumption (no flow in the biofilm) is more questionable, as it depends on the biofilm shape and density. For a homogeneous and dense biofilm, the previous assumption is valid and the determined parameters will be the “real” parameters of the domain. Conversely, for a heterogeneous and sparse biofilm, the determined parameters will be the equivalent parameters of the domain (equivalent to a dense biofilm).

System representation is also simplified by considering that the mobile part thickness and its velocity are constant. We argue that the approximations done are negligible. This assumption could be verified by developing a more complex model with time-dependent thickness and velocity of the mobile part. Finally, the definition of the reactivity rate by equation (4) assumes that the reaction time has the same order of magnitude than the diffusion time.

3. Application

The presented experiment and the conceptual model aim at reproducing natural attenuation with electron acceptors provided by the water and electron donors provided by the minerals (pyrite or other minerals in case of autotrophic denitrification) immobile in the system. This

system may be obviously applied to porous media, but even if the link with this tube geometry is not straight forward it can also be applied to fractured media.

For the fractured media, the heterogeneity mainly comes from the presence of fractures at several scales with various geometrical and hydrodynamic properties (Davy et al., 2006). Most of the homogenization methods existing for these media are not able to represent the hydraulic heterogeneities of the network (Roubinet et al., 2010). However, as fractures are opened channels favorable to microbial development and nutrient circulation, most of the denitrification process should occur within the fractures (Johnson et al., 1998). At the domain scale, even if this assumption needs more studies, it implies that the fracture network structure, with the heterogeneity of geometry and hydraulic properties, has a strong impact on the denitrification performance (Tompkins et al., 2001). At the Ploemeur crystalline site (Ruelleu et al., 2010), a drastic chemical evolution including denitrification was indeed observed in conjunction with fluxes variation due to the starting of the pumping (Tarits et al., 2006). To improve the understanding of denitrification process in fractured media, a first required step is the study of previously cited key parameters for this process at the fracture scale.

VI. Conclusions

We propose an innovative experimental setup linking biogeochemical reactivity to a physical parameter: the flow velocity. We show that reaction limiting processes in transient conditions vary with experimental time. The reaction is firstly biologically controlled (microbial growth), then physically controlled (diffusion and nutrient supply) and finally biochemically controlled (inhibition by by-products). Flow dynamics have also a direct impact on the population development and/or activity. This highlights that experiments in dynamic conditions are of

prime importance as, contrary to static experiments, they exhibit the whole complexity of the reaction. We also develop a conceptual model to explain the variation with time of the limiting processes. The system description by equivalent parameters allows predicting the time-evolution of the reaction controlling processes.

The current study enhances the comprehension of denitrification process in porous and fractured media. Further investigations are needed to understand all the complexity of the processes inside the tubes and the reasons of the reaction end. Other works in progress focus on the long time behaviour of such systems. Information brought by dynamic experiments is essential to deal with the domain scale and for understanding and predicting the changes that may be due to the exploitation of groundwater resources.

Acknowledgements

The French National Research Agency ANR is acknowledged for its financial funding through the MOHINI project (ANR-07-VULN-008) as well as The National Observatory for Research in Environment H+(SNO H +) for the support the field data investigation.

Figure captions

Figure 1: Schematic representation of the experimental setup .The water is maintained under argon atmosphere under a tank. The water passes through non reactive tubes from the tank to the peristaltic pump. From this point the water passes through reactive tubes at different velocity. Number of tubes depends on the experiment. On each experiment a non reactive tube of the same length is used in parallel to assess the inlet concentration.

Figure 2: Evolution of Nitrates consumption ($[NO_3^-]_{outlet}$-$[NO_3^-]_{inlet}$) through time for the different experiments. Points represent data sample while solid lines represent the model described in section IV. The dashed rectangle delimits the phase 1. Error bars indicate the mean square deviation

Figure 3: Biofilm development in the tubes a) millimeter and centimeter long clusters; b) continuous biofilm

Figure 4: Degradation rate (Nitrate mass consumed per time) versus number of pore volumes (number of tube volume passed through the system)

Figure 5: Modeling of the experiment in tubes. The cylinders represent portions of the tubes and the white and grey areas correspond to the immobile part (biofilm) and the mobile part (advective flow), respectively. e_{eff} is the effective biofilm thickness, e_b is the real biofilm thickness and x_k is the diffusion capacity associated to the flow velocity v_k. For short and long times, e_{eff} is equal to e_b and x_k respectively. For long times, the diffusion capacity and thus the effective biofilm thickness increases by decreasing the velocity ($x_1<x_2$ for $v_1>v_2$).

Figures

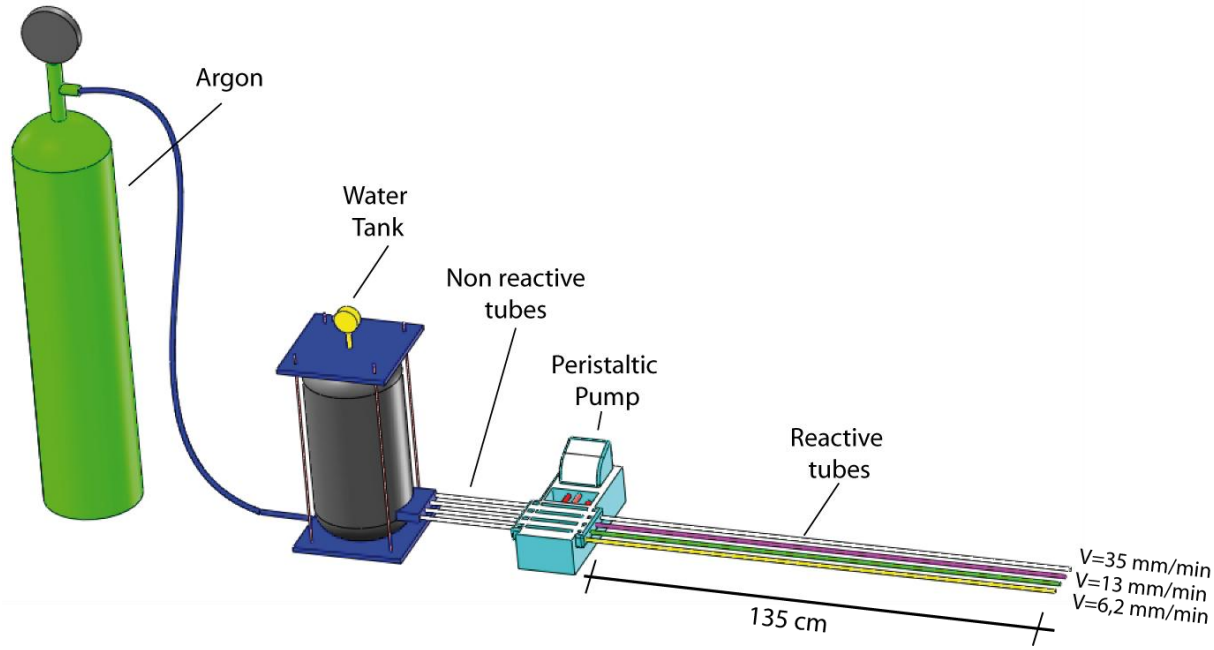


Figure 1: Schematic representation of the experimental setup .The water is maintained under argon atmosphere under a tank. The water passes through non reactive tubes from the tank to the peristaltic pump. From this point the water passes through reactive tubes at different velocity. Number of tubes depends on the experiment. On each experiment a non reactive tube of the same length is used in parallel to assess the inlet concentration.

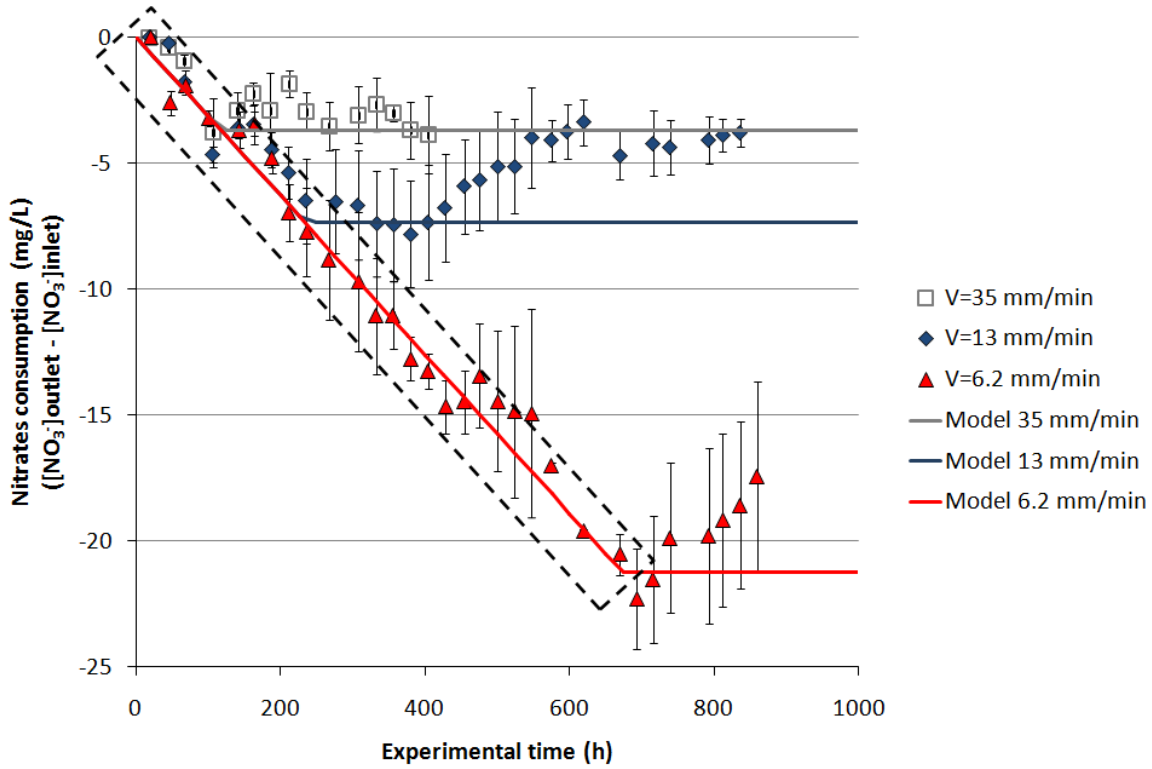


Figure 2: Evolution of Nitrates consumption ($[NO_3^-]_{outlet}$-$[NO_3^-]_{inlet}$) through time for the different experiments. Points represent data sample while solid lines represent the model described in section IV. The dashed rectangle delimits the phase 1. Error bars indicate the mean square deviation

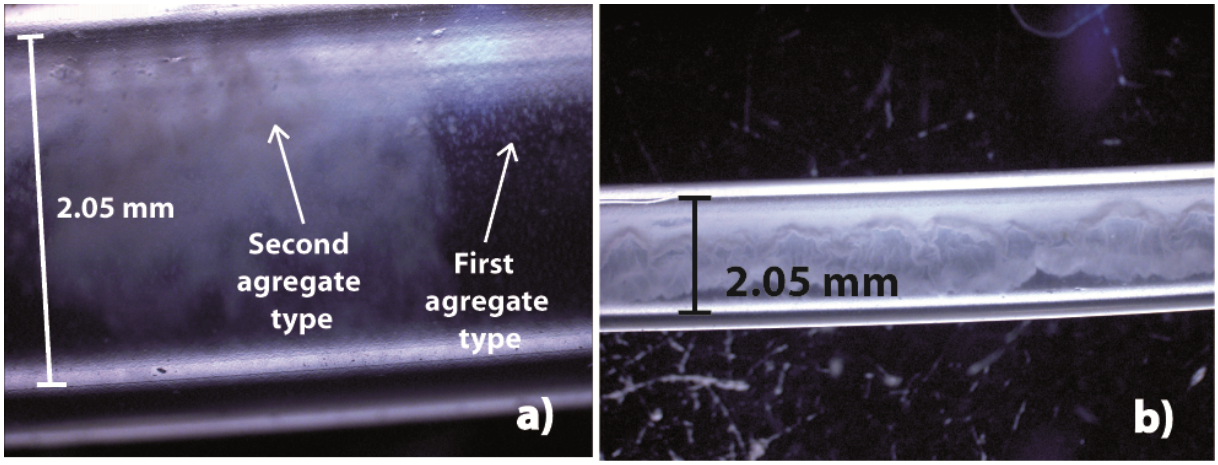


Figure 3: Biofilm development in the tubes a) millimeter and centimeter long clusters; b) continuous biofilm

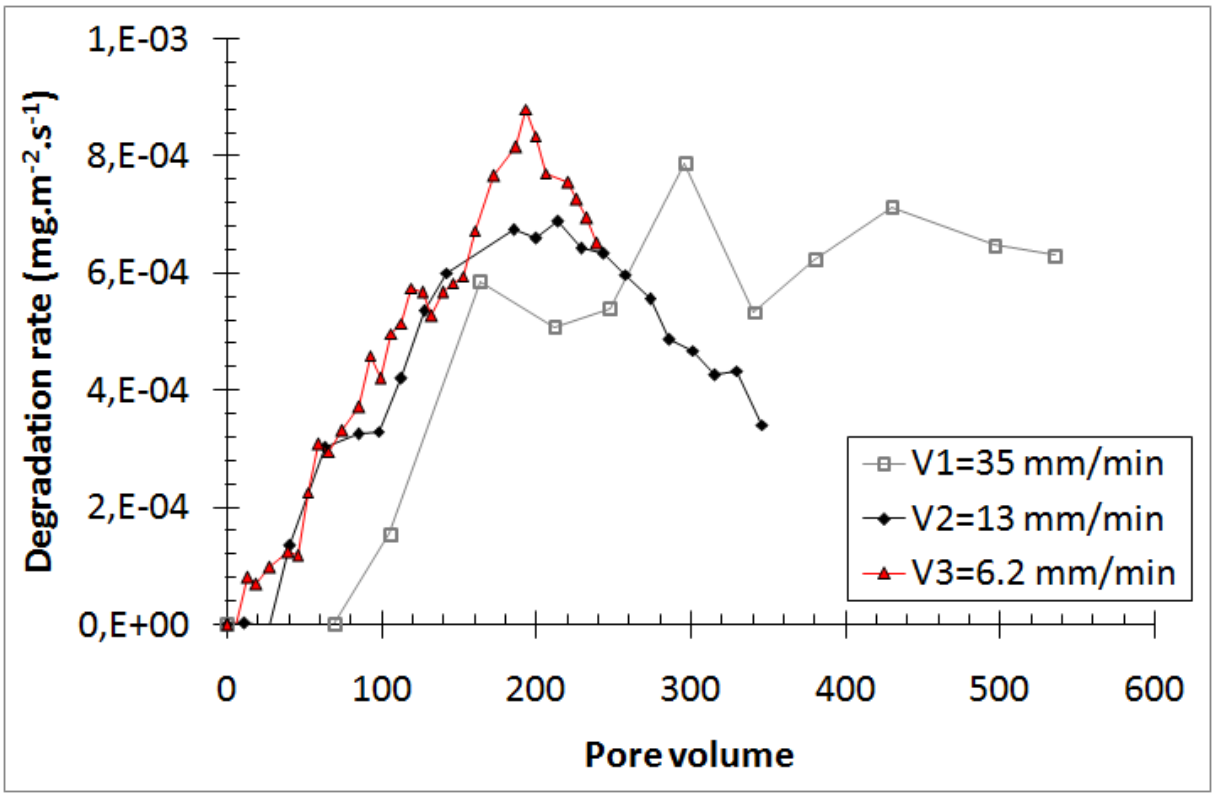


Figure 4: Degradation rate (Nitrate mass consumed per time) versus number of pore volumes (number of tube volume passed through the system)

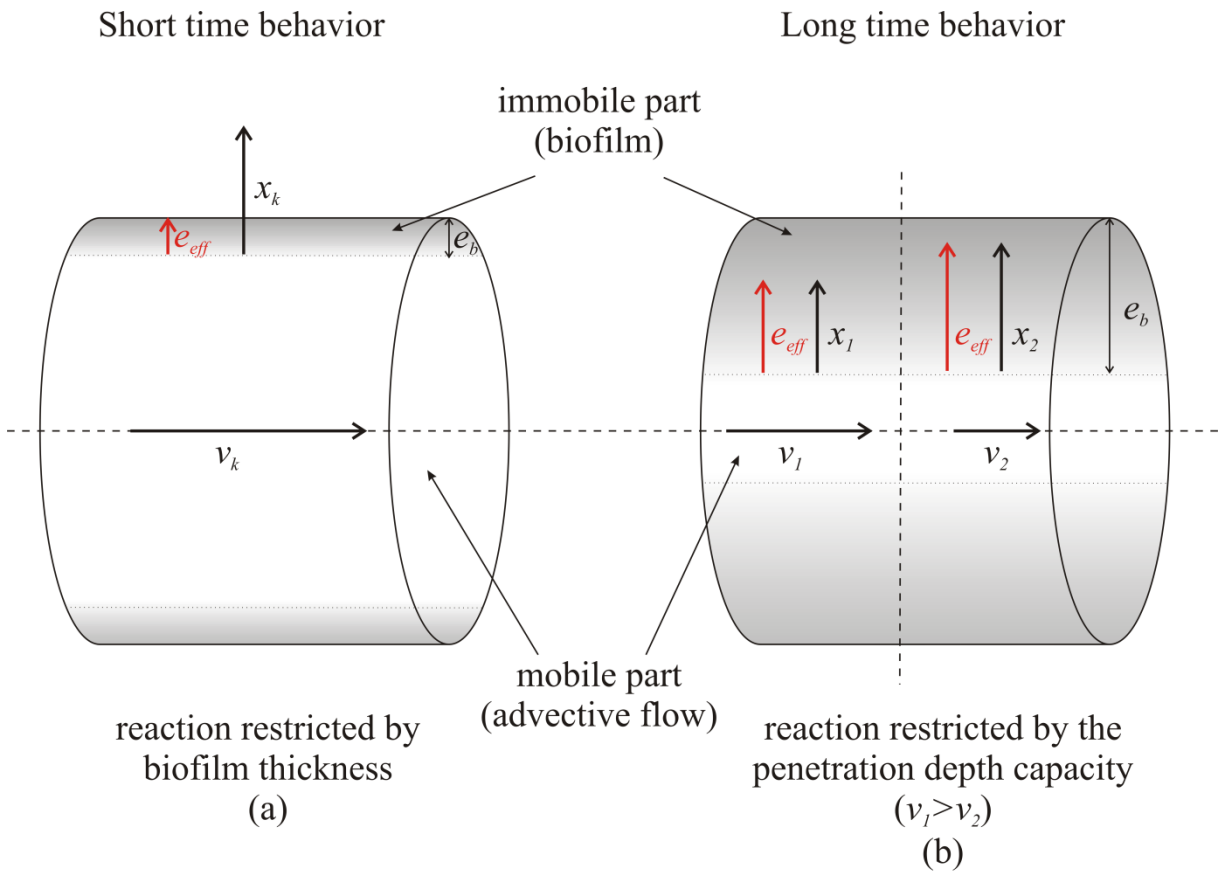


Figure 5: Modeling of the experiment in tubes. The cylinders represent portions of the tubes and the white and grey areas correspond to the immobile part (biofilm) and the mobile part (advective flow), respectively. e_{eff} is the effective biofilm thickness, e_b is the real biofilm thickness and x_k is the diffusion capacity associated to the flow velocity v_k. For short and long times, e_{eff} is equal to e_b and x_k respectively. For long times, the diffusion capacity and thus the effective biofilm thickness increases by decreasing the velocity (x_1<x_2 for v_1>v_2).

Tables

Velocity ($mm.min^{-1}$)	Maximum reaction rate ($mg.m^{-2}.s^{-1}$)
6.2	$8.8.10^{-4}$
13	$6.8.10^{-4}$
35	$6.3.10^{-4}$

Table 1: Maximum reaction rate for the different experiments

Parameter	Value	Unit
Nitrate consumption per space unit (α)	**$2\ 10^{4}$**	
Biofilm growth law *f(V(t))*	**$1.58\ 10^{-6}\ t$**	
Biofilm porosity (ϕ)	**60**	**%**
Diffusion coefficient (D)	**$2{,}8\ 10^{-10}$**	**m^2/s**
Tube length (L)	1,35	M
Tube diameter (d)	0,00205	M

Table 2 : Parameter values of the model. Parameters in regular case are fixed parameters and parameters in bold case are fitted parameters.

References

Ayraud, V., 2006. Détermination du temps de résidence des eaux souterraines: application au transfert d'azote dans les aquifères fracturés hétérogènes, Université de Rennes 1, Rennes, 297 pp.

Bekins, B., 2000. Preface - Groundwater and microbial processes. Hydrogeology Journal, 8(1): 2-3.

Beyenal, H. and Lewandowski, Z., 2002. Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities. Biotechnology Progress, 18(1): 55-61.

Boisson, A., Aquilina, L., and Bour, O., Results of cyclic variations of hydrodynamics on reactvity processes in long term pore scale experiment. (in prep)

Bougon, N., Aquilina, L., Briand, M.P., Coedel, S. and Vandenkoornhuyse, P., 2009. Influence of hydrological fluxes on the structure of nitrate-reducing bacteria communities in a peatland. Soil Biology & Biochemistry, 41(6): 1289-1300.

Chapelle, F.H., 2001. Ground-Water Microbiology and Geochemistry. Wiley.

Characklis, W.G., 1981. Fouling biofilm development - A process analysis. Biotechnology and Bioengineering, 23(9): 1923-1960.

Clement, J.C. et al., 2003. Hydrological flowpaths and nitrate removal rates within a riparian floodplain along a fourth-order stream in Brittany (France). Hydrological Processes, 17(6): 1177-1195.

Cvetkovic, V., Painter, S., Outters, N. and Selroos, J.O., 2004. Stochastic simulation of radionuclide migration in discretely fractured rock near the Äspö Hard Rock Laboratory. Water Resources Research, 40.

Davy, P., Bour, O., De Dreuzy, J.R. and Darcel, C., 2006. Flow in multiscale fractal fracture networks. In: G. Cello and B.D. Malamud (Editors), Fractal Analysis for Natural Hazards. Geological Society Special Publication. Geological Soc Publishing House, Bath, pp. 31-45.

Garny, K., Neu, T.R. and Horn, H., 2009. Sloughing and limited substrate conditions trigger filamentous growth in heterotrophic biofilms-Measurements in flow-through tube reactor. Chemical Engineering Science, 64(11): 2723-2732.

Hiscock, K.M., Lloyd, J.W. and Lerner, D.N., 1991. Review of natural and artificial denitrification of groundwater. Water Research, 25(9): 1099-1111.

Horn, H. and Morgenroth, E., 2006. Transport of oxygen, sodium chloride, and sodium nitrate in biofilms. Chemical Engineering Science, 61(5): 1347-1356.

Johnson, A.C., Hughes, C.D., Williams, R.J. and Chilton, P.J., 1998. Potential for aerobic isoproturon biodegradation and sorption in the unsaturated and saturated zones of a chalk aquifer. Journal of Contaminant Hydrology, 30(3-4): 281-297.

Kornaros, M. and Lyberatos, G., 1997. Kinetics of aerobic growth of a denitrifying bacterium, Pseudomonas denitrificans, in the presence of nitrates and/or nitrites. Water Research, 31(3): 479-488.

Korom, S.F., 1992. Natural denitrification in the saturated zone - A review. Water Resources Research, 28(6): 1657-1668.

Lau, Y.L. and Liu, D., 1993. Effect of flow-rate on biofilm accumulation in open channels. Water Research, 27(3): 355-360.

Lewandowski, Z., 2000. Notes on biofilm porosity. Water Research, 34(9): 2620-2624.

Lewandowski, Z., Beyenal, H., Myers, J. and Stookey, D., 2007. The effect of detachment on biofilm structure and activity: the oscillating pattern of biofilm accumulation. Water Science and Technology, 55(8-9): 429-436.

Lewandowski, Z., Beyenal, H. and Stookey, D., 2004. Reproducibility of biofilm processes and the meaning of steady state in biofilm reactors. Water Science and Technology, 49(11-12): 359-364.

Li, Y.H. and Gregory, S., 1974. Diffusion of ions in sea-water and in deep-sea sediments. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 38(5): 703-714.

Lim, K.T. and Aziz, K., 1995. Matrix-fracture transfer shape factors for dual-porosity simulators. Journal of Petroleum Science and Engineering, 13(3-4): 169-178.

Marazioti, C., Kornaros, M. and Lyberatos, G., 2003. Kinetic modeling of a mixed culture of Pseudomonas denitrificans and Bacillus subtilis under aerobic and anoxic operating conditions. Water Research, 37(6): 1239-1251.

Mohee, R., Unmar, G.D., Mudhoo, A. and Khadoo, P., 2008. Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. Waste Management, 28(9): 1624-1629.

Neretnieks, I., 2002. A stochastic multi-channel model for solute transport - analysis of tracer tests in fractured rock. Journal of Contaminant Hydrology, 55(3-4): 175-211.

Noetinger, B. and Estebenet, T., 2000. Up-scaling of double porosity fractured media using continuous-time random walks methods. Transport in Porous Media, 39(3): 315-337.

Roubinet, D., de Dreuzy, J.R. and Davy, P., 2010. Connectivity-consistent mapping method for 2-D discrete fracture networks. Water Resources Research, 46: 15.

Roubinet, D., H.-H. Liu, J.-R. de Dreuzy, 2010a. A new particle-tracking approach to simulating transport in heterogeneous fractured porous media. Water Resources Research, in revision.

Ruelleu, S., Moreau, F., Bour, O., Gapais, D. and Martelet, G., 2010. Impact of gently dipping discontinuities on basement aquifer recharge: An example from Ploemeur (Brittany, France). Journal of Applied Geophysics, 70(2): 161-168.

Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A. and Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnology Advances, 26(3): 246-265.

Sinke, A.J.C., Dury, O. and Zobrist, J., 1998. Effects of a fluctuating water table: column study on redox dynamics and fate of some organic pollutants. Journal of Contaminant Hydrology, 33(1-2): 231-246.

Spalding, R.F. and Exner, M.E., 1993. Occurence of nitrates in groundwater - A review. Journal of Environmental Quality, 22(3): 392-402.

Stoodley, P., Debeer, D. and Lewandowski, Z., 1994. Liquid flow in biofilm systems. Applied and Environmental Microbiology, 60(8): 2711-2716.

Sturman, P.J., Stewart, P.S., Cunningham, A.B., Bouwer, E.J. and Wolfram, J.H., 1995. Engineering scale-up of in-situ bioremediation processes - A review. Journal of Contaminant Hydrology, 19(3): 171-203.

Tarits, C., Aquilina, L., Ayraud, V., Pauwels, H., Davy, P., Touchard, F., and Bour, O., 2006. Oxido-reduction sequence related to flux variations of groundwater from a fractured basement aquifer (Ploemeur area, France). Applied Geochemistry, 21(1): 29-47.

Thullner, M., Zeyer, J. and Kinzelbach, W., 2002. Influence of microbial growth on hydraulic properties of pore networks. Transport in Porous Media, 49(1): 99-122.

Tompkins, J.A., Smith, S.R., Cartmell, E. and Wheater, H.S., 2001. In-situ bioremediation is a viable option for denitrification of Chalk groundwaters. Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology, 34: 111-125.

Vongunten, U. and Zobrist, J., 1993. Biogeochemical changes in groundwater-infiltration systems - Column studies. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 57(16): 3895-3906.

.

Chapitre 3 :
Stabilisation de la réactivité dans une expérience à l'échelle du pore sous contraintes dynamiques

Nous avons montré dans le chapitre précédent que le système étudié présentait une certaine variabilité temporelle lié au développement de biofilms. Dans ce chapitre nous nous intéresserons à l'observation, par des dispositifs expérimentaux similaires, de la reproductibilité du phénomène observé.

Ce chapitre à été rédigé sous forme d'article. Un résumé de celui-ci est présenté dans le paragraphe suivant.

Résumé de l'article

Pour étudier le contrôle qu'exerce l'hydrodynamique sur des réactions biochimiques nous avons réalisé une expérience durant laquelle une réaction de dénitrification est suivie au sein de tubes plastiques. Nous étudions plus particulièrement l'évolution de la réactivité en réponse à des variations cycliques de vitesses d'écoulement. Ces expériences révèlent un comportement complexe non observable dans le cas d'expériences statiques. Le contrôle de la réactivité est initialement biologique et devient physique lorsque la réaction tend vers son maximum. Ces résultats prévisibles sont en accord avec nos expériences précédentes (Boisson et al., *in preparation*). Cependant, les expériences long terme engendrent un comportement oscillatoire de la réactivité. Cette évolution implique différents contrôles à la fois biologiques et physiques tels que la croissance du biofilm, la bioaccumulation de sous-produits de réaction mais aussi le temps de résidence, la profondeur de diffusion et les contraintes de cisaillement. D'un point de vue de la réactivité, cette expérience est durant une majorité du temps en conditions transitoires malgré des conditions d'écoulements simples. Ceci met en exergue que la réactivité biologique peut être très dépendante de l'historique du système et qu'un schéma réactif complexe peut réguler le système sur des temps longs.

.

Results of cyclic variations of hydrodynamic conditions on reactivity processes in long term pore-scale experiments

BOISSON.A[1*], AQUILINA.L[1], BOUR.O[1]

[1]Géosciences Rennes, UMR 6118, 35000 Rennes, France (*Correspondence : alexandre.boisson@univ-rennes1.fr)

Abstract

To investigate how biochemical reactions are controlled by hydrodynamic fluxes, we achieve pore-scale experiments in plastic tubes where denitrification is assessed using field groundwater. In particular, we study the reactivity response to cyclic variations of tube flow velocities. Dynamic experiments reveal complex reaction scheme unobservable in static experiments. Initially the control of the reactivity is biological and becomes physically constrained as the reaction evolves to the maximum reaction rate. These observations are predictable and are in full agreement with previous similar experiments (Boisson et al., Submitted). However the long term assessment of the system reveals a complex reactive scheme leading to an oscillatory behavior of the reactivity. This complex evolution of reactivity to cyclic hydrodynamic conditions involves different biological and physical controls such as biofilm growth, bioaccumulation of by-products but also residence times, diffusion depth in the biofilm and shear stresses. The experiment is mostly in transient conditions from a reactivity point of view despite simple physical conditions. It highlights that biologically mediated reactivity may be highly dependent upon the historic of the system and that a complex reactive scheme controls the system on long term experiments.

I. Introduction

Biofilms development have an important impact on reactivity and control bioremediation processes in natural systems (Tompkins et al., 2001) as well as in water distribution systems (Zacheus et al., 2000). The characterization of biofilm activity is a multi scale problem. Micro-scale observations allow getting information about the spatial distribution of factors affecting microbial activity. However, despite of complex processes occurring at micro-scale, the global behavior is usually described at macro-scale. As discussed in Lewandowski et al., macro-scale observations generate information about the overall properties and activity of the entire biofilm system (Lewandowski et al., 2007). Hydrodynamic parameters rule nutrient availability, shear stress acting on the biofilm, diffusion length etc… that control partly biofilm development and in particular its shape and density(Characklis, 1981).

The role of hydrodynamic parameters on microbial reactivity has been studied at the micro-scale (Beyenal and Lewandowski, 2002; Garny et al., 2009; Lau and Liu, 1993; Stoodley et al., 1994). More recently, (Boisson et al., Submitted) studied the initiation of reactivity processes on pore-scale experiments. They showed a biological(ly driven) control of the reactivity (biomass growth as limiting factor) in the initial phase of the reaction which becomes physically constrained (diffusion limitation in the biofilm) at the maximum reaction rate. Whatever the constant flow velocity imposed, experimental results were nicely reproduced by a simple model linking flow velocity and reactivity. Nevertheless, latest measurements in these experiments indicate a reactivity decrease after reaching the maximum reaction rate which may indicate that the steady state may not be reached.

On micro-scale tube flow through experiments, Lewandowski et al., showed that even if at micro-scale biofilm density vary with time in the system and do not reach a steady state, the reactivity at macro-scale may be stable (Lewandowski et al., 2007). Garny et al., in a biofilm

study in pipes showed that the reaction rate may also vary with time due to sloughing events (attachment, growth, detachment and new colonization) (Garny et al., 2009). Both studies however agree with the fact that before the first sloughing event the biofilm development is reproducible under controlled conditions. However the long term reactivity and this evolution seem to be more complex and need further investigations. Biofilm structure is known to evolve continuously, with increasing density as organisms die and extracellular polymeric substances accumulate. The impact of this development on reactivity in transient conditions is not fully understood as well as the occurrence of steady state in such systems.

Such possible variations through time of the reactivity challenge the long-time behavior of our previous experiments (Boisson et al., Submitted). To test the stability of the reactivity depending on the flow velocity imposed, we run long-term experiments under cyclic hydrodynamic conditions (cyclic variation of flow velocity). The first objective was to assess the reproducibility of our results, in particular during the initiation of reactivity processes. The second main objective was to investigate if a constant-rate reactivity could be reached in long term experiments with velocity variations through time. It will allow us to assess also the predictive capability of the model developed in (Boisson et al., Submitted) in which the maximum reaction-rate is velocity dependant and which successfully describe our previous results.

The experimental setup that is similar to the one used in Boisson et al., (submitted) is described in the next sections. The results obtained in Boisson et al. (submitted) will be rapidly recalled. We will show that the initial phases of the new long-term experiment are quite similar to previous experiments. However, a sudden flow velocity decrease results in complex reactivity evolution. This experiment will show that the system does not reach a

steady state due to an inhibition / competition phase. In late time, this variable reaction rate leads to oscillatory behavior of the outlet concentrations.

II. Material and methods

This paper discusses the results of two distinct experiments made with the same site water, materials and protocols. We use tube geometry as it allows a simple and well constraint range of velocities. The experimental conditions (dark at a constant temperature of 18°C) are also similar. The experiments consist in a continuous injection of nitrate-rich water in plastic tubes (1D flow) and the monitoring of nitrate consumption due to bacteria development. The differences between both experiments are the tubes length and the experiment duration and date. Bacteria grow using carbon from the tubes and nitrates from the water. Plastic compounds are known to serve as substrate for heterotrophic bacterial growth (Mohee et al., 2008; Shah et al., 2008). Previous batchs experiments were carried out to characterize the reaction in non dynamic conditions. These batchs in which denitrification reactions is assessed in glass flasks containing site water and PVC tubes under anoxic conditions shows complete nitrate consumption within (130 hours). No reaction was observable in the batchs containing only water. Further information on these batchs are available in (Boisson et al., Submitted).

1. Materials

We use “reactive” tubes providing carbon (“Watson Marlow® PVC double manifold” tubes) and non reactive tubes (Pharmed® and Teflon tubes) with an inner diameter of 2 mm. The PVC tubes are transparent and thus allow biofilm observation. The nitrate-rich water (41 mg/L) has been collected in the Ploemeur site (Brittany, France) where natural denitrification has been observed (Tarits et al., 2006) and do not receive any treatment. For all experiments the water is sampled from the same piezometer at different dates within a year. No relevant

water chemistry changes have been observed during this period. Although part of the developing microbial population may come from the tubes since no sterilisation was made before use, bacteria are supposed to come from the water since *i)* they are naturally present in such groundwater (Bekins, 2000; Bougon et al., 2009); *ii)* several experiments of crushed granite and water from the Ploemeur site have showed denitrification processes (Ayraud, 2006). The inoculation of the medium occurs by bacterial attachment. The water prior to injection in the tube is maintained under argon atmosphere in high density polyethylene (where non reactivity is controlled) where regular injection of argon allows deoxygenation of the water by bubbling and kept it in anoxic conditions. The organic carbon concentration in the injected water remains below 0.5 ppm during the whole experiment.

2. Analysis

All samples are filtered with a 0.45 µm Sartorius filter before analyses. Major anions (NO_3^-, SO_4^{2-}, Cl^-, F^-) are analyzed daily using a Dionex DX 120 ion chromatograph. Organic and inorganic carbons are analyzed every three days (for experiment 1 only) using a Shimadzu 5050A Total Organic Carbon analyzer. The volume used for all analyses (5 ml) is equal to the full volume of the tube. It corresponds to a volume that passed only once in the system. Thus the sampling protocol is independent of the velocity. Dissolved oxygen is measured using a WTW315i-CondOX probe. Flow is measured daily by weighting at the tube outlet: its variations are below 2% in weighted mass.

3. Flow through experiments

Experiment 1: Short term experiment

In the first flow through experiment, water comes from the tank through the Teflon to Pharmed tubes placed in a peristaltic pump (Watson Marlow 205U) Figure 1. It is checked

during all the experiments that no reaction occurs in this setup before the PVC tubes. The PVC tubes (135 cm length) are placed at the end of the Pharmed tubes. Experiments are performed at the three different averaged flow velocities V_1=35 mm/min (8 replicates), V_2=13mm/min (10 replicates) and V_3=6.2 mm/min (3 replicates). Residence times in the tubes range from 40 min to 3h 40 min. These velocities are of the order of magnitude of the ones observed in situ in groundwater. Experiments were performed with replicates to take in account the inherent variability of biochemical reactions. This experiment and its interpretation is extensively described in (Boisson et al., Submitted). However, results are given on Figure 2 and we will recall the main results hereafter.

These experiments have shown, in the initial phase of the reactivity evolution, that the nitrates concentrations at the outlet of the tubes are identical whatever the velocity (in dashed square on Figure 2). The reaction rate during this phase is driven by the biofilm development which is controlled by the mass of nitrates passed through the system. Thus, at a given time and for a higher velocity, more nitrates have passed through the system implying a faster biofilm development and a more efficient reactivity. After a while, a maximum of reactivity is reached leading to a concentration threshold. This behavior has been explained as controlled by diffusion in the biofilm and residence time (Boisson et al, submitted). In this latter case, the system is physically constrained.

Experiment 2: Long term experiment

The second experiment use the same experimental setup but the length of the PVC tubes is different between the tubes as specified on the Figure 3. In this experimental setup, one tube is non reactive and is used as an inlet control. The reactive PVC tubes of 45, 90, 135 and 180 cm are placed as described Figure 3. These different tubes length aim assessing the variability of the reactivity depending of the system length. In this experiment the flow rate change in

four phases during the experiment: firstly, a flow velocity of 39 mm/min is applied then it decreases to 11 mm/min before increasing to its previous value of 39 mm/min and once again reaching 11 mm/min in the late stage of the experiment. In total, the experiments last for 1700 hours. By imposing these hydrodynamics changes, we aim at assessing the reproducibility of the behavior between two successive phases. Phase's durations are plotted in Figure 5. The flow rate in the tubes is always the same for all tubes at a given moment.

III. Results

As described in the previous section, the long-term experiment is divided in four phases according to four flow regimes. The evolutions of the nitrates and nitrites concentrations for each tube outlet during the whole experiment are given on Figure 5. The behavior of all the tubes is very similar qualitatively although a quantitative length effect can be distinguished on the 3 first phases of the experiment. For clarity reasons, values in this section are firstly described for the longest tube (180 cm) whose nitrates and nitrites concentration evolution at the outlet are given on Figure 6. During the first phase of the experiment (from time 0 to 440 hours) which corresponds to a mean flow velocity of 39 mm/min, the nitrate concentration at the outlet decreases from 41 to 36 mg/l in 100 hours implying and increase of reactivity through time. A constant nitrate concentration at the outlet is observed between 100 and 440 hours meaning that the reaction rate is constant. During this phase a small nitrite increase is observed, although values are close to the detection limit. This phase expresses the same behavior as the ones observed in the first experiment with very comparable results (Boisson et al., Submitted).

At time 440 hours (beginning of the second phase), the tube flow velocity is decreased to 11mm/min. As a consequence, the nitrate concentration at the outlet starts a gradual decrease. After 750 hours, a concentration near 15 mg/L is reached. The nitrites concentration during

the same period increases in an anti-correlated manner (Figure dot lines). However, instead of remaining at the same concentration, the nitrate concentration increase to the initial outlet concentration of 41 mg/L. Thus, the reaction slowly ends. During this reactivity decrease, the nitrite concentration decreases in accordance to nitrate consumption reduction. Once the concentration at the tube outlet becomes equal to the initial concentration (41 mg/L after 1220 hours), the flow velocity is newly set at 39 mm/min. This starts a second cycle of variations of high-low flow velocities. The reaction restarts and reaches the same concentration threshold at 36 mg/L as previously observed for the same flow velocity. After 1344 hours (phase 4), the flow velocity is newly fixed at 11 mm/min. The nitrate concentration decreases once again to a concentration around 15 mg/L. The decrease to this concentration is faster than the one observed at the beginning of the phase 2. When the 15 mg/L nitrate concentration is reached the reactivity decreases newly and, as a result, the concentration of nitrates at the tubes outlets increases (Figure 6). The next measurements exhibit the same evolution with a decrease of nitrate concentration followed by an increase once the value of 15 mg/L has been reached. During this fourth phase, an oscillatory regime seems to rule the system. Each time the nitrate concentration reaches 15 mg/L the reactivity decreases. Oscillation frequency is much greater than during the second phase of the experiment. Note that the nitrites concentration is always anti-correlated to nitrates concentration during this fourth phase (Figure 6).

Similar results are observed for all tubes (Figure 5). During the first phase of the experiment, all tubes provide similar concentrations at the outlet. Slight differences are observed in nitrate concentrations depending on the tube length, but are not distinguishable on Figure 5. During the second phase, we clearly observe that tube length controls the reactivity which is enhanced for longer tubes. Nevertheless, this phase seems to be characterized by a greater variability in the results for a given set of parameters. Anyway, the evolution of

concentrations is qualitatively very similar. For the third phase, similar results than during the first phase are observed. However, the variability related to the tubes length during the first phases of the experiment is no more observable during the fourth phase where all the tube reacts in the same way indifferently of the length (Figure 5). We clearly observe that the system variability from the outlet concentration decreases with experimental time.

Biofilm was not directly measured but the transparency of the tubes allows following its development. During all the experiment, the biofilm develops continuously over the tubes walls from cluster of a millimeter length (Figure 7a) to centimeter long to a continuous colonization to the complete tubes (Figure 7b). The biofilm colonization starts from the tube outlet and migrate to the tube inlet.

IV. Discussion

The long term experiment exhibits a more complex reactive pattern than the previously cited short experiment (Boisson et al., Submitted). It seems that transient behavior is more the rule than steady-state, particularly at the end of the experiment. However, some results are very similar between both experiments.

The short term experiment provides information on the reaction establishment for different velocities. The identical concentration at the tubes outlets during the first phase of the experiment regardless of the velocity (linear increase of the nitrates consumption showed in dashed square on Figure 2) indicates a biological control through growth limitation. This limitation is due to the nitrogen mass passed through the system used for biofilm development and is not related to the residence time. During the second phase, the control of the reaction efficiency is driven by physical factors which are the residence time and the diffusion thickness within the biofilm, both parameters are controlled by the flow velocity. These

controls lead to thresholds of the maximum reaction rates which are velocity dependents. In the present long term experiment, we observe exactly the same behavior with an increase of the reaction rate leading to a decrease of the nitrates concentrations at the tube outlet. We may notice however that the reactivity of the second experiment is slightly higher, probably due to a different biological composition of the water changing initial conditions. In both experiments the decrease of the nitrates outlet-concentration is followed by a plateau with constant concentration. The model we previously developed may be applied to this case. This highlights the reproducibility of the results.

The second phase (associated to a tube flow velocity decrease) exhibits a slow decrease of the concentration due to an increase of the reaction rate. This slow decrease is somehow surprising as we may consider the previous concentration threshold as a steady state. In the case of a steady state with a fully developed effective biofilm, an abrupt change in the flow velocity should result in an abrupt change of the concentration at the outlet. This is not the case here where a smooth decrease is observed. It may be due to a new growth of the biofilm due to a smaller shear stress associated to the flow velocity decrease. Thus, the maximum reaction rates observed in the first phase are maybe limited by residence time and diffusion but may also be dependent on flow velocity through shear stress acting on biofilm development. During this second phase, the nitrates outlet-concentration reaches a minimum of 14 mg/L. From this lowest concentration a reactivity decrease is continuous until a total ending of the reactivity (t= 1250 hours on Figure 5) when the outlet concentration equals the inlet concentration. This behavior will be discussed later.

During the third phase of the experirnent, the concentration outlet decreases once again to the same threshold as observed in the first phase of the experiment for the same velocity, indicating a good reproducibility of this result. Nevertheless, the initial decrease of nitrate

concentration is quicker than during the first phase, in agreement with the fact that the biofilm is already developed. Thus, one may assume that during this third phase, the processes involved in microbial reactivity are similar to those described for the first phase.

During the fourth phase, the nitrates concentration decreases rapidly to reach the same threshold value than during the second phase (15 mg/l). An important point is that during all the fourth phase the outlet concentrations are the same for all tubes. The identical behavior of all the tubes during the last phase of the experiment emphasizes the localization with time of the reactivity. This indicates that the reactivity occurs mainly at the system entrance as no effect of the tubes length is observable. After reaching 15 mg/l the concentration increase more quickly than previously observed and decrease once again. This phenomenon appears various times leading to an oscillatory behavior (Figure 5). Note that the observed concentrations are dependent on the sampling time of the experiment. Reasons of this oscillatory behavior are not fully understood however some hypotheses may be discussed.

The first hypothesis is that the system is biologically controlled through bacterial competition. A first population develops within the tubes while a second one develops upon the first one. This prey/predator like behavior is well known to produce oscillatory behavior. Competition may occur as populations may continuously evolve in the system (Garny et al., 2009; Koenig et al., 2005). A second type of hypothesis which may be formulated involves biochemical processes. The population may remains the same but adapts to different conditions. These new conditions may come from by-products of the reaction. PVC's are known to release toxic by-products during degradation which may have an impact on microbial populations. These products may kill or inhibit bacterial activity from the tube outlet to the inlet leading to a slow decrease of the nitrates consumption. Either by-products may accumulate within microorganisms (critical mass) or by-products may be present at too high concentrations

within the fluid phase (critical concentration) *i)* If inhibition is induced by a critical concentration, a constant nitrates concentration should be expected. We should expect a stabilization of the reaction, but not an ending of the reactivity. For this reason, we do not believe that this process may be responsible of the concentration evolutions measured. *ii)* If the reaction ending is related to a critical mass, the number of pore-volumes passing through the system before the reaction stops should be the same. Results of the first experiment have shown that the maximum reaction rate is reached for almost the same pore volume passed in the system (Boisson et al., Submitted). For this reason, inhibition by by-products related to a critical mass is most likely to occur. The oscillation occurring in the long time experiment shows that the reaction never reaches a steady state threshold but never stops completely neither. This reactivity decrease is not controlled by a reactant missing in the system but more likely by by-products produced in the system. We also notice that the slope of the reaction increases through time for the different phase (Figure) showing a memory effect within the system.

In the experiment, biofilm evolves continuously from small cluster to a continuous biofilm development. But the reaction rates highly vary with time, so biofilm and reactivity seems to be at least partially not correlated. Note that biofilm observations rely on total biomass and not on active biomass and may not be a good indicator. The link between biofilm development and reactivity is so not straight forward. For (Lewandowski et al., 2007) the biofilm structure (porosity) evolves continuously but the reaction rate remains unchanged. In opposite, for (Garny et al., 2009) the reaction rate evolves with the biofilm structure. Ideally, a characterization of active biomass during experiments should bring very useful insights for understanding the complex interactions in these biochemical processes.

V. Conclusion

The presented experiment shows a complex biochemical reactivity response to flow variations within plastic reactive tubes. Distinct phases are clearly distinguished under simple flow conditions. During the initial phase, the evolution of nitrate concentration at the outlet is very similar to previous experiments, confirming previous results (Boisson et al., submitted and figure 2). However we observed that the long term behavior of the experiment is highly different of its initiation and that prediction of these long term behavior needs a full understanding of a complex reaction scheme. Firstly, a decrease of flow velocity leads to an increase of reactivity but the response time does not correspond to the ones expected from the initial phase. Secondly, this nitrate concentration decrease is followed by a reduction on nitrate consumption until reactions stops. Finally, identical cyclic hydraulic conditions may lead to different behaviors, in particular for the end of the experiment characterized by a cyclic evolution of concentrations while flow tube flow velocity is kept constant. Although the concentration evolutions may be different, the maximum reaction-rate are the same thorough the experiment. The maximum concentration variations between inlet and outlet are velocity-dependent: smaller is the velocity, greater are the variations. During all the experiment, nitrites are anti-correlated to nitrates concentration.

This complex evolution of reactivity to cyclic hydrodynamic conditions involves different biological and physical controls. In particular, we discuss the role biological controls like biofilm growth and bioaccumulation of by-products to explain increase or decrease of reactivity. Maximum reaction-rates seem to be mainly controlled by physical parameters such as residence times, diffusion depth in the biofilm and shear stresses. The observed reaction never completely ends but neither completely keeps constancy. Even under constant physical conditions no steady states seems to take place and an oscillatory behavior may even rule the

system during a long time. Thus, the experiment is mostly in transient conditions in a reactivity point of view despite simple physical conditions. It highlights the question of steady states in biofilm which is a current and convenient hypothesis in biofilm modeling. Historic of the reactive system is here a key parameter, and emphasizes the need to take in account the long time behavior of the studied system in case of dynamic flow conditions.

Acknowledgements

The French National Research Agency ANR is acknowledged for its financial funding through the MOHINI project (ANR-07-VULN-008) as well as The National Observatory for Research in Environment H+(SNO H +) for the support the field data investigation.

Figure captions

Figure 1: Experimental setup 1: Short time experiment

Figure 2: Concentration variation between the tube outlet and inlet in experiment 1. Error bars are the mean square error

Figure 3: Experimental setup 2: Long time experiment

Figure 4: Organic carbon evolution through time

Figure 5: Nitrate and nitrite concentration at the tubes outlet in experiment 2

Figure 6: Nitrates and nitrite concentration evolution at the 180 cm tube outlet. Red zones indicate the high velocity phases (39 mm/min) and the white ones the low velocity zones (11 mm/min). Red line represents the high velocity concentration minimum and the blue line the low velocity concentration minimum

Figure 7: Biofilm development during the experiment

Figures

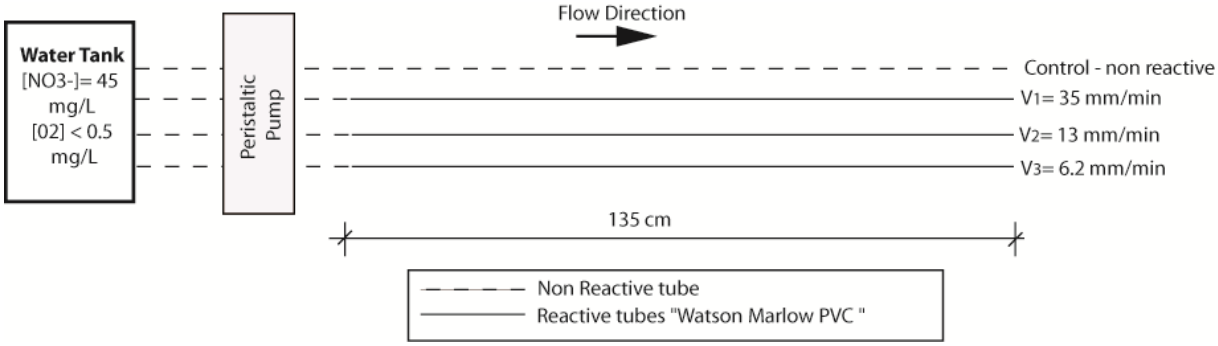


Figure 1: Experimental setup 1: Short time experiment

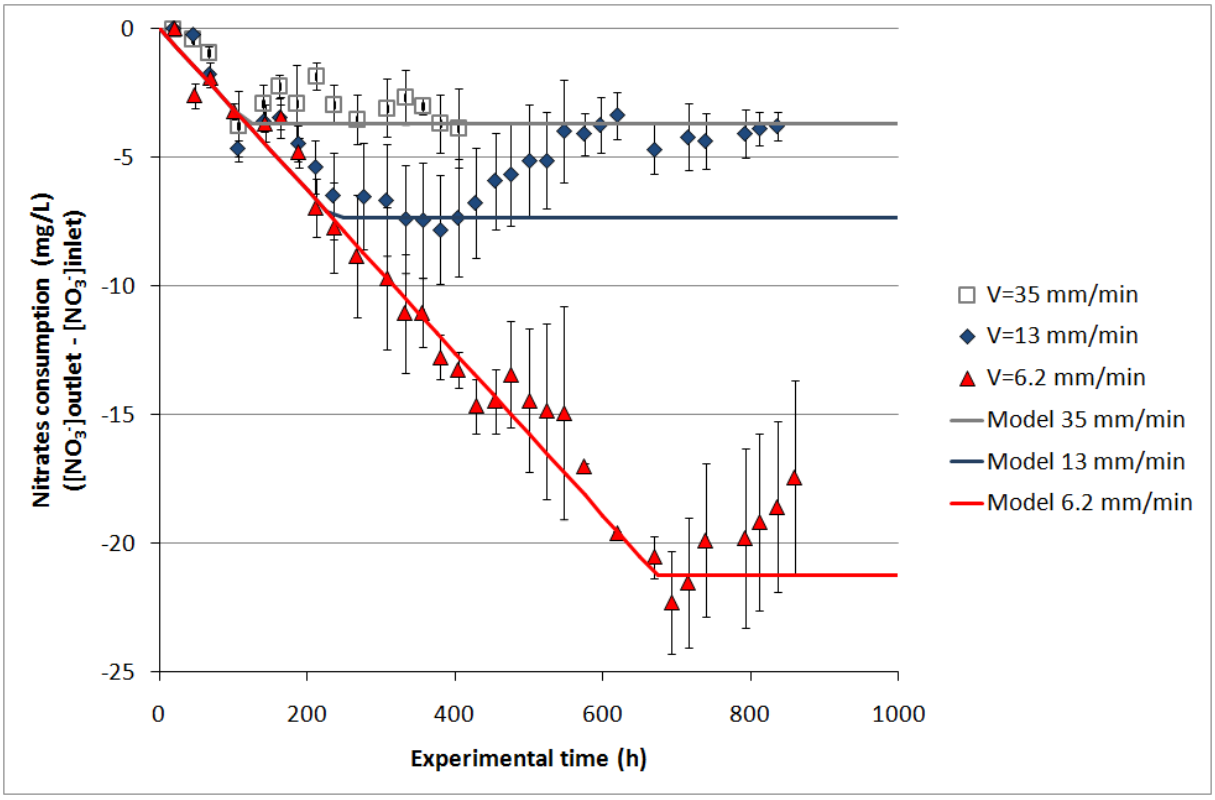


Figure 2: Concentration variation between the tube outlet and inlet in experiment 1. Error bars are the mean square error

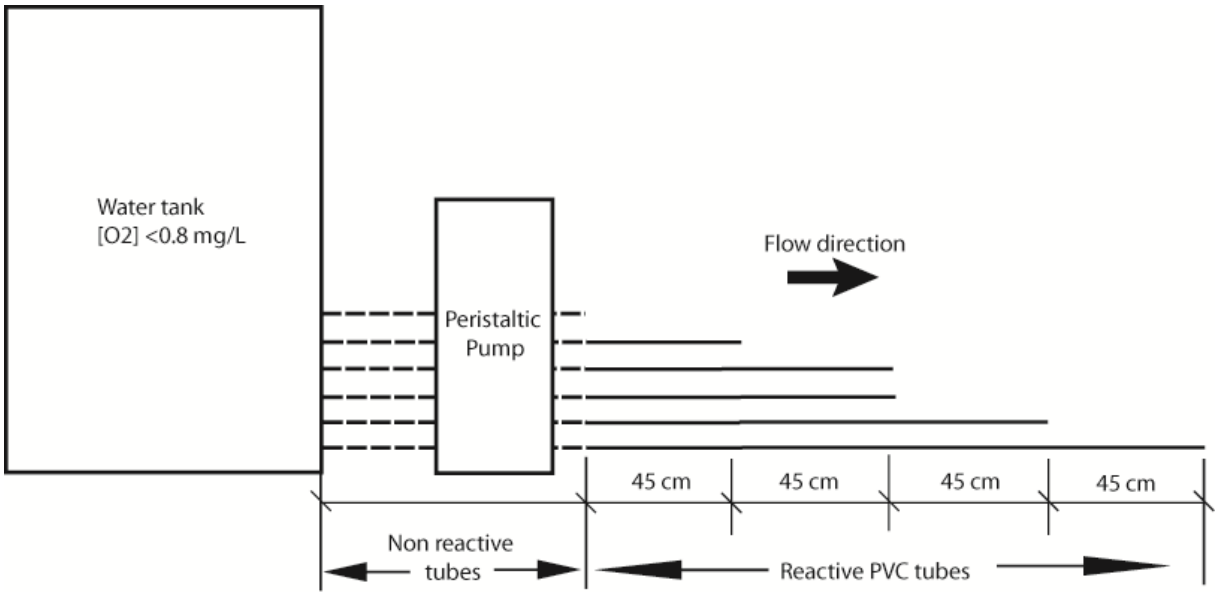


Figure 3: Experimental setup 2: Long time experiment

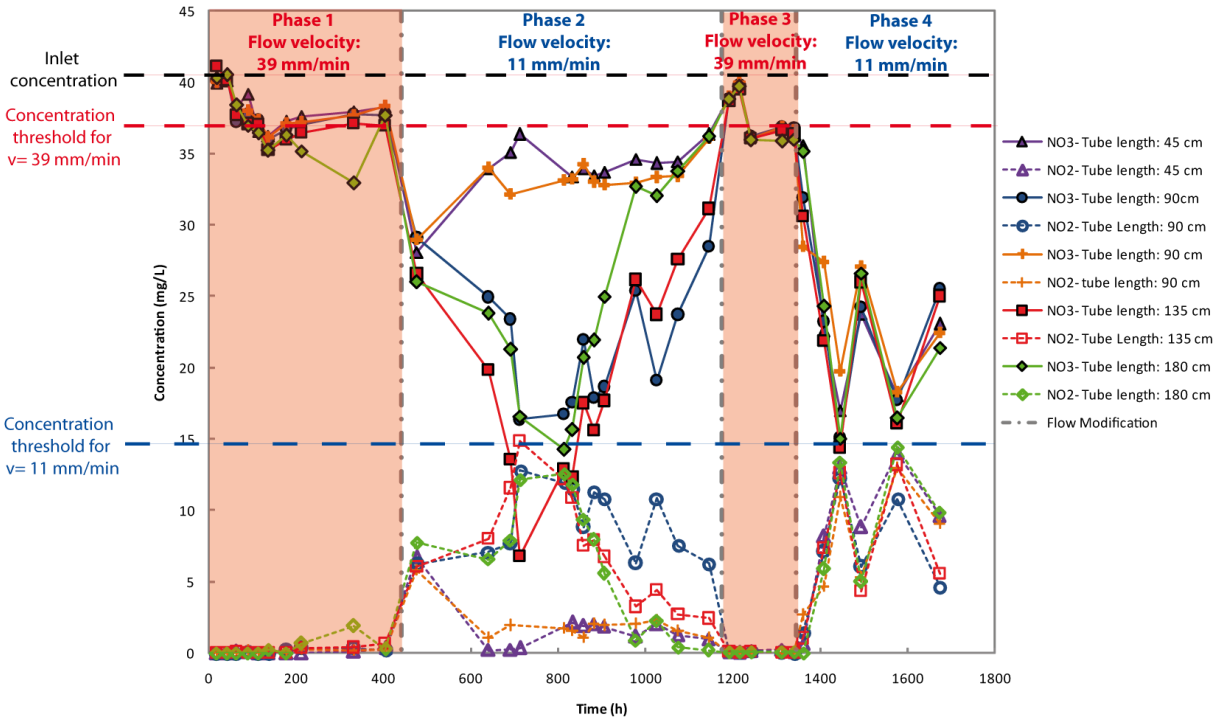


Figure 5: Nitrate and nitrite concentration at the tubes outlet in experiment 2. Orange zones indicate the high velocity phases (39 mm/min) and the white ones the low velocity zones (11 mm/min).

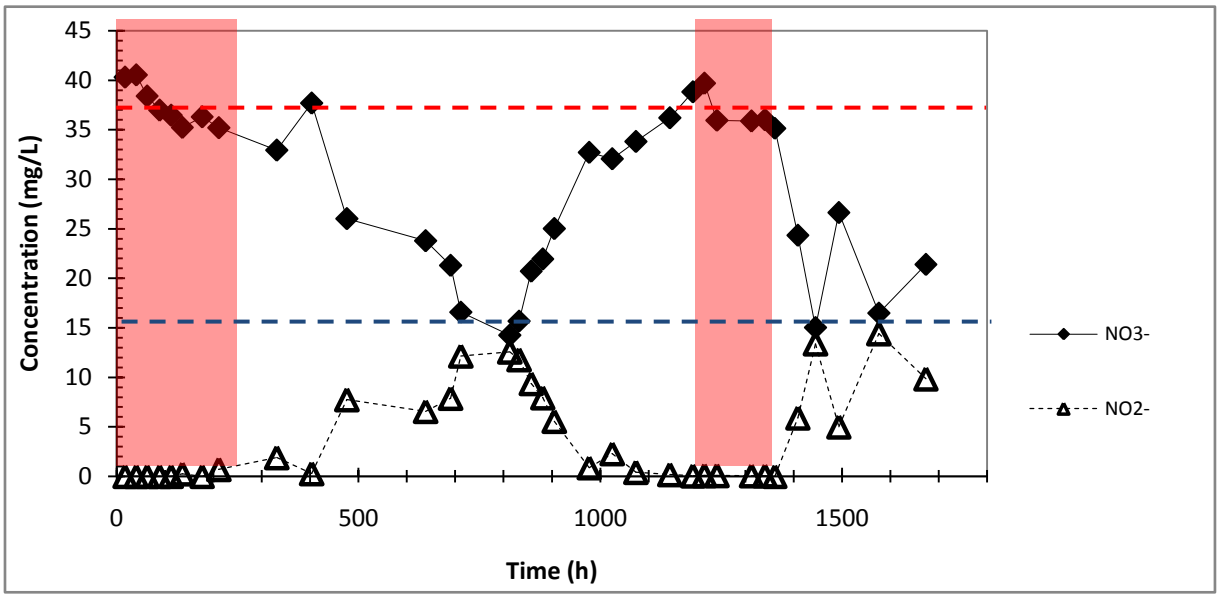


Figure 6: Nitrates and nitrite concentration evolution at the 180 cm tube outlet. Red zones indicate the high velocity phases (39 mm/min) and the white ones the low velocity zones (11 mm/min). Red line represents the high velocity concentration minimum and the blue line the low velocity concentration minimum.

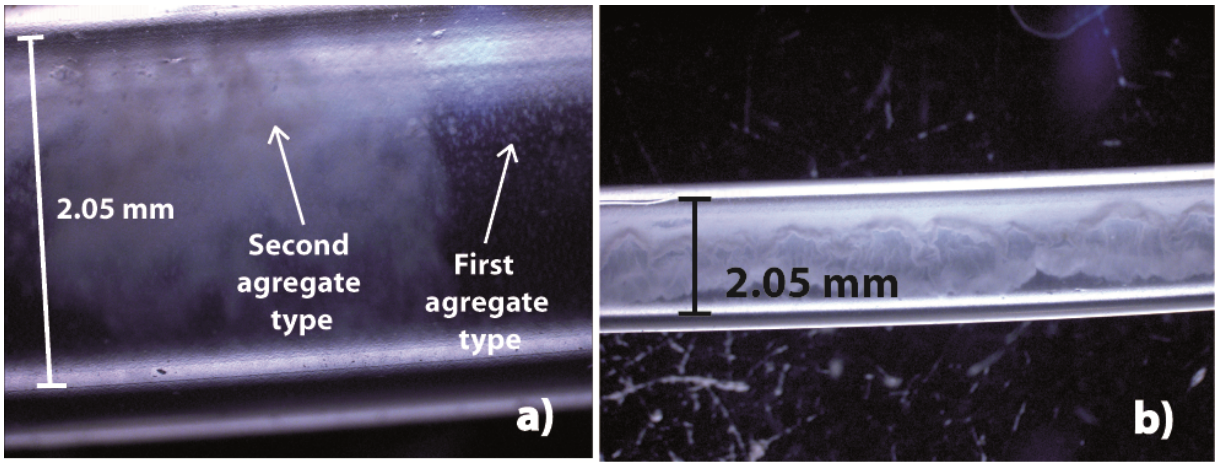


Figure 7: Biofilm development during the experiment

References

Ayraud, V., 2006. Détermination du temps de résidence des eaux souterraines: application au transfert d'azote dans les aquifères fracturés hétérogènes, Université de Rennes 1, Rennes, 297 pp.

Bekins, B., 2000. Preface - Groundwater and microbial processes. Hydrogeology Journal, 8(1): 2-3.

Beyenal, H. and Lewandowski, Z., 2002. Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities. Biotechnology Progress, 18(1): 55-61.

Boisson, A. et al., Submitted. Flow velocity impact on denitrification process at the pore-scale: experiment and modelling. Journal of contaminant hydrology.

Bougon, N., Aquilina, L., Briand, M.P., Coedel, S. and Vandenkoornhuyse, P., 2009. Influence of hydrological fluxes on the structure of nitrate-reducing bacteria communities in a peatland. Soil Biology & Biochemistry, 41(6): 1289-1300.

Characklis, W.G., 1981. Fouling biofilm development - A process analysis. Biotechnology and Bioengineering, 23(9): 1923-1960.

Garny, K., Neu, T.R. and Horn, H., 2009. Sloughing and limited substrate conditions trigger filamentous growth in heterotrophic biofilms-Measurements in flow-through tube reactor. Chemical Engineering Science, 64(11): 2723-2732.

Koenig, A., Zhang, T., Liu, L.H. and Fang, H.H.P., 2005. Microbial community and biochemistry process in auto sulfurotrophic denitrifying biofilm. Chemosphere, 58(8): 1041-1047.

Lau, Y.L. and Liu, D., 1993. Effect of flow-rate on biofilm accumulation in open channels. Water Research, 27(3): 355-360.

Lewandowski, Z., Beyenal, H., Myers, J. and Stookey, D., 2007. The effect of detachment on biofilm structure and activity: the oscillating pattern of biofilm accumulation. Water Science and Technology, 55(8-9): 429-436.

Mohee, R., Unmar, G.D., Mudhoo, A. and Khadoo, P., 2008. Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. Waste Management, 28(9): 1624-1629.

Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A. and Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnology Advances, 26(3): 246-265.

Stoodley, P., Debeer, D. and Lewandowski, Z., 1994. Liquid flow in biofilm systems. Applied and Environmental Microbiology, 60(8): 2711-2716.

Tarits, C. et al., 2006. Oxido-reduction sequence related to flux variations of groundwater from a fractured basement aquifer (Ploemeur area, France). Applied Geochemistry, 21(1): 29-47.

Tompkins, J.A., Smith, S.R., Cartmell, E. and Wheater, H.S., 2001. In-situ bioremediation is a viable option for denitrification of Chalk groundwaters. Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology, 34: 111-125.

Zacheus, O.M., Iivanainen, E.K., Nissinen, T.K., Lehtola, M.J. and Martikainen, P.J., 2000. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. Water Research, 34(1): 63-70.

Chapitre 4 :
Mise en place et évolution d'un front de réaction à méso-échelle
– Evolution spatiale de la réaction –

I. Introduction

Nous avons caractérisé dans les chapitres précédents de cette partie le comportement global d'un système expérimental permettant une étude de la dénitrification à l'échelle du pore. Comme on l'a vu précédemment, peu de dispositifs expérimentaux permettent une étude de l'influence d'une vitesse d'écoulement sur la réactivité à la méso-échelle d'un macro-pore. Les dispositifs qui permettent, en plus de la caractérisation d'un comportement global, de suivre l'évolution du front de réaction à cette échelle sont encore moins nombreux. La connaissance de l'évolution du front de réaction (déplacement, taille, amplitude) est un élément important qui permet une compréhension plus fine des phénomènes se déroulant dans le système. Un autre intérêt majeur de notre dispositif expérimental provient du dispositif d'apport des réactifs. En effet dans une majorité des expériences visant à évaluer le développement de biofilms et/ou la réactivité d'un système biochimique l'intégralité des éléments nutritifs est fournie en entrée de système. Dans notre dispositif expérimental, les nitrates (accepteur d'électrons) sont apportés par une phase mobile (eau) et le carbone (donneur d'électron) est apporté par une phase immobile (tuyau) tout au long du dispositif. Cette répartition est identique aux conditions d'atténuation naturelle des nitrates dans un aquifère où les réactions ont lieu avec une phase minérale immobile, le long d'une fracture en milieu naturel ou d'une conduite dans les systèmes d'adduction d'eau potable.

Les profils de concentration permettent de déterminer finement le type de cinétique, ce qui est impossible avec des mesures limitées à l'entrée et à la sortie du système. En effet en conditions stationnaires deux points de mesures ne peuvent pas permettre de définir si une cinétique d'ordre 0, 1 ou de type Monod est plus à même de représenter l'évolution des concentrations. La densité de mesures a un effet important sur la définition des cinétiques et les cinétiques d'ordre 0 ou 1 sont souvent utilisées sans discrimination dans des contextes où le nombre de mesures est limité. Ces deux cinétiques peuvent être vue dans ce cas comme des

simplifications des cinétiques de Monod (Bekins et al., 1998). Ce chapitre se propose (1) de montrer l'efficacité du dispositif expérimental mis en place pour le suivi en continu de l'évolution des profils de réaction dans une expérience de dénitrification à l'échelle du pore, (2) de montrer les apports de cette information sur la détermination et la compréhension du système et (3) de discuter les conséquences de l'évolution des profils de réaction. Le dispositif expérimental utilisé dans ce chapitre a été présenté dans le chapitre 1. Il est ici utilisé dans l'expérience présentée dans le chapitre 3 de cette partie pour permettre le suivi long terme de la réaction pour des contraintes de flux variables et des tuyaux de longueurs différentes. L'apport de ces informations permettra en fin de chapitre de proposer un modèle conceptuel de fonctionnement.

II. Suivi continu de l'évolution des concentrations en sortie de tuyaux

Cette section présente le suivi long terme de l'évolution des concentrations en nitrates lors de l'expérience (chapitre 3). Durant la totalité de l'expérience, des prélèvements sont effectués simultanément à la sortie de chaque tuyau. Les concentrations en nitrates et nitrites sont présentées Figure 21 pour la totalité des tuyaux.

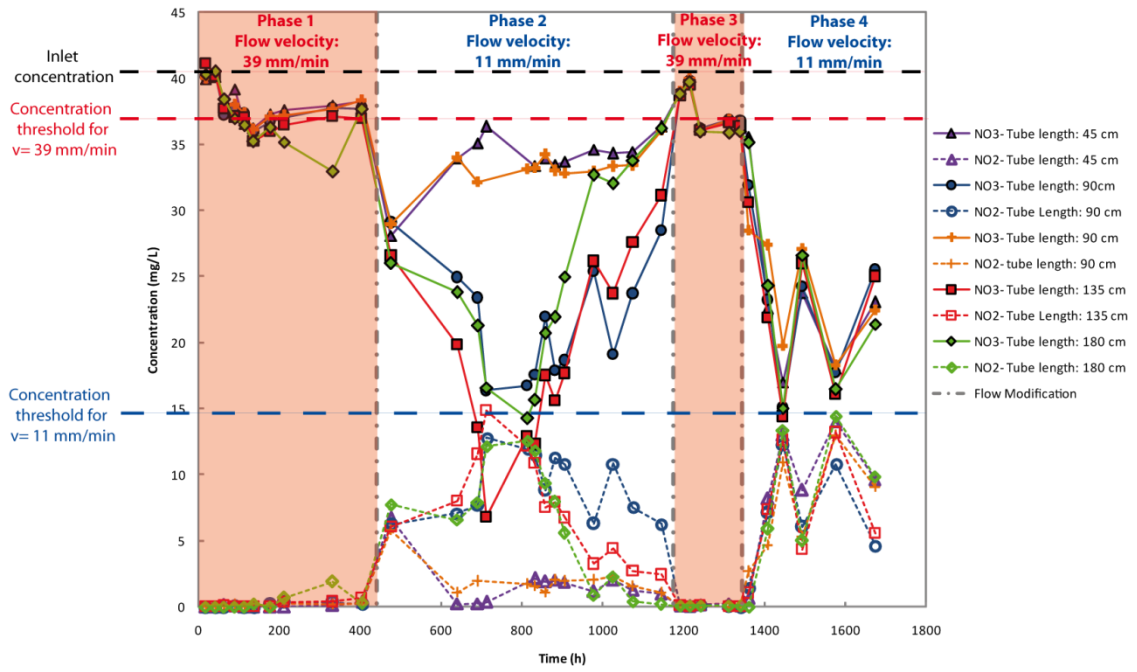


Figure 21: Evolution en fonction du temps des concentrations en nitrates et nitrites sur la totalité des tuyaux ; Les lignes continues représentent les concentrations en nitrates et les lignes pointillées en nitrites ; les phases colorées indiquent les changements de débits (rouge vitesses rapides 39 mm/min ; Blanc vitesses lentes 11 mm/min)

Le comportement observable est identique sur tous les tuyaux avec des amplitudes légèrement différentes en fonction de la longueur de tuyau (Figure 21). Plus le tuyau est long plus les concentrations en nitrates sont faibles et plus les concentrations en nitrites sont fortes. Les valeurs données dans le paragraphe suivant concernent toutes le tuyau le plus long considéré comme la sortie du système. Les concentrations en nitrites sont toujours anti-corrélées à la variation de concentration en nitrates. Aucune variation de la chimie des eaux n'est observable dans le réservoir de stockage.

On note 5 phases durant cette expérience (Figure 21):

- Phase 1 (0 à 476 h) - Mise en place de la réaction pour une vitesse de 39 mm/min avec une décroissance de la concentration en sortie de 41 mg/L à 36 mg/L.
- Phase 2 (476 h à 813 h) - Mise en place de la réaction pour une vitesse de 11 mm/min avec une décroissance de la concentration en sortie de 41 mg/L à 14,25 mg/L.
- Phase 3 (813 h à 1215 h) - Arrêt progressif de la réaction pour une vitesse constante de 11 mm/min
- Phase 4 (1215 h à 1344 h) - Reprise de la réaction pour une vitesse de 39 mm/min et obtention d'un palier de concentration à 36 mg/L
- Phase 5 (1344 h à 1673 h) – Oscillations des concentrations pour une vitesse de 11 mm/min

Les principaux points de cette expérience sont :

- Que des paliers de concentrations identiques sont obtenus pour des vitesses d'écoulements identiques
- Que les arrêts de réactions observés pour les vitesses faibles ne sont pas continus dans le temps et engendrent un phénomène oscillatoire pour l'ensemble des tuyaux
- Que les différences liées à la longueur des tuyaux ne sont plus observables après 1344 h d'expérience
- Que les concentrations en nitrites sont anti-corrélées à la consommation des nitrates.

III. Evolution des profils de concentration dans les tuyaux

Cette section s'intéresse à la localisation de la réactivité le long des tuyaux. Pour cela nous faisons l'hypothèse d'un comportement homogène entre les tuyaux. Les tuyaux ayant des longueurs différentes, un prélèvement en sortie de tuyau est considéré comme représentatif de

la concentration à cette distance de l'entrée du système. Ceci permet de reconstituer artificiellement les profils de concentrations le long d'un tuyau unique fictif de 180 cm de longueur et ce de manière continue. En effet, en raison des faibles débits mis en jeu ici, prélever directement dans le tuyau, en plus des difficultés techniques, mettrait en péril le devenir de l'expérimentation. Un profil est réalisé pour chaque temps de prélèvement présenté Figure 21.

1. Phase 1 : Mise en place de la réaction et validation des hypothèses

La vitesse d'écoulement lors de cette phase est de 39 mm/min et l'on observe une variation de la concentration de 41 mg/L à 36 mg/L avec obtention d'un palier autour de cette concentration.

Les profils de concentration en nitrates réalisés durant la première phase de cette expérimentation sont présentés en noir sur la Figure 22. Toutes les concentrations sont normalisées aux chlorures pour corriger les effets d'évaporation et exprimées en relatif par rapport au signal d'entrée (C_{out}-C_{in}). Pour limiter le nombre de profils (par souci de lisibilité) et accentuer les tendances, des moyennes entre les profils sont réalisées deux à deux.

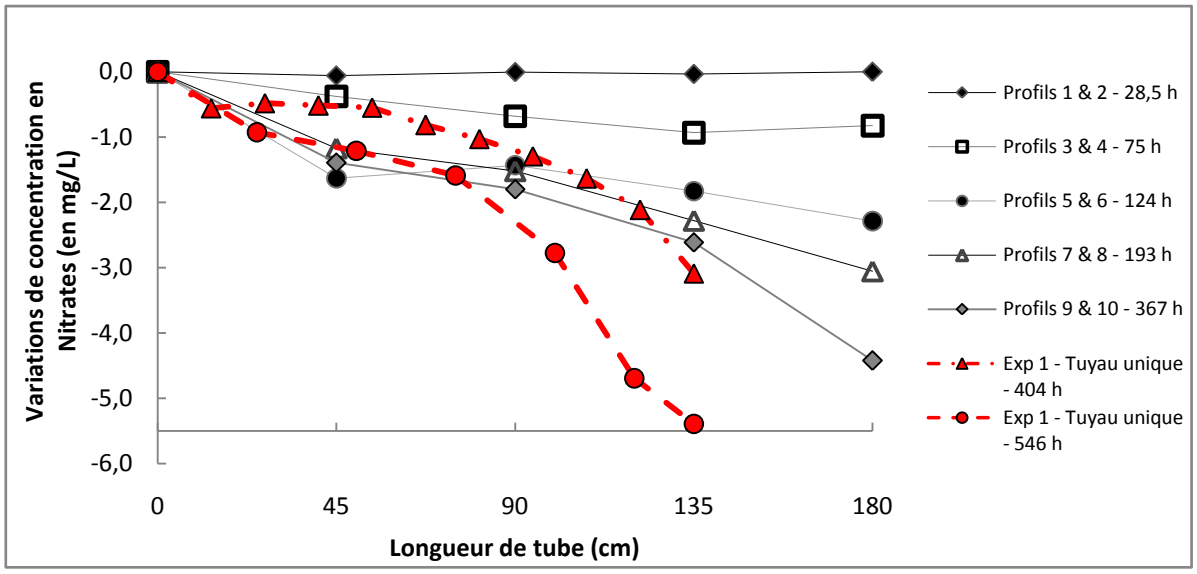


Figure 22: Evolution des profils lors de la première phase de l'expérience.

<u>Traits continus :</u> Moyenne, deux à deux, des variations de concentrations en nitrates des 10 premiers profils (Variation calculée en fonction du signal d'entrée (C_{out}-C_{in}) et normalisée aux chlorures) ; <u>Tirets :</u> Profils réalisés sur des tuyaux uniques lors de l'expérience 1-court terme pour des vitesses d'écoulement de 35 mm/min

On observe sur les 8 premiers profils (en noir) une variation de concentration linéaire avec la longueur et qui augmente avec le temps. La moyenne des deux derniers profils (8 et 9) montre une accélération de la réactivité vers la fin du tuyau (augmentation de la pente).

L'évolution de réactions liées à des développements de microorganismes pouvant être sujet à une forte variabilité (Lewandowski et al., 2004) nous avons vérifié la validité de notre hypothèse de réalisation de profils sur des tuyaux uniques présentés en rouge Figure 212. Ces résultats proviennent de l'expérience court terme présentée chapitre 2. Un tuyau unique est coupé et prélevé pour différentes longueurs permettant un profil d'un seul et unique tuyau. Bien que réalisé pour des vitesses d'écoulement plus faibles (35 mm/min au lieu de 39 mm/min) et à des temps plus longs, ces profils indiquent des valeurs proches avec les mêmes tendances et une accélération de la réaction en fin de tuyau. Ceci valide donc l'hypothèse retenue pour la réalisation de profils.

2. Phase 2 : Développement de la réactivité sous faible vitesse d'écoulement.

Cette seconde phase entre 476 et 813 heures où le débit est réduit à 2,34 ml/h et les vitesses d'écoulements à 11 mm/min présente une nouvelle décroissance de la concentration en nitrates jusqu'à une valeur de 14,2 mg/L. Cette baisse est accompagnée d'une forte hausse des concentrations en nitrites (12,5 mg/L). La Figure 23 présente les profils de concentration des nitrates le long du tuyau fictif durant cette phase. Le tuyau 4 (90 cm) a brusquement changé de comportement et a cessé d'avoir une réactivité significative durant cette période. Il n'est pas pris en compte dans les profils présentés Figure 23.

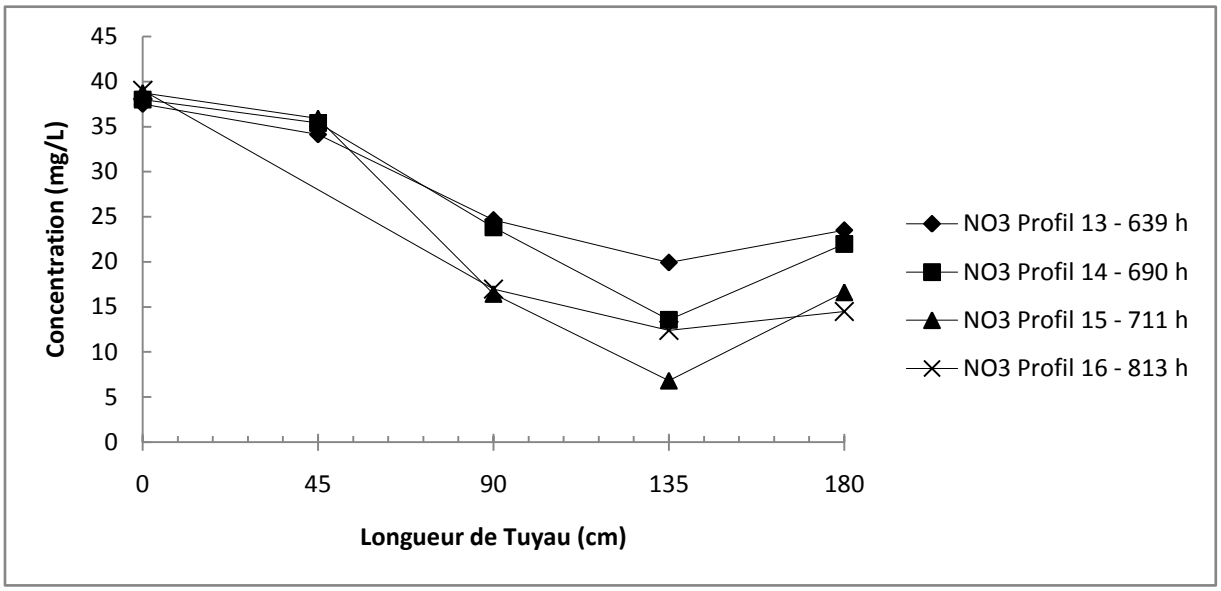


Figure 23: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites le long du tuyau fictif (valeurs normalisées aux chlorures)

Les profils observés dans les tuyaux ont tous la même forme avec une décroissance progressive des concentrations en nitrates entre 0 et 135 cm puis une légère remontée de la concentration à 180 cm. La baisse de concentration des nitrates augmente avec le temps le long des tuyaux. Les concentrations en nitrites (non présentées) sont anti-corrélées avec les concentrations en nitrates sur la totalité de la longueur. Les résultats sont cohérents au sein de l'expérience, même si l'on peut observer une variabilité du signal exprimée par une concentration en nitrates plus importante au niveau du point à 180 cm. On peut ainsi globalement considérer que la variation de concentration est faible entre 90 et 180 cm. Cependant, il est également possible que l'on observe ici les premiers effets de la phase suivante décrite ci-dessous.

3. Phase 3 – Arrêt progressif de la réaction

Lors de cette troisième phase un arrêt progressif de la réactivité est observé alors que le débit est maintenu constant à 2,3ml/h entre 813 h et 1174 h. Avec le temps, la décroissance des nitrates est de moins en moins importante pour chacun des points. Les profils indiquent que plus le tuyau est long plus la réaction semble s'arrêter rapidement. Les profils de concentration observés ici ne sont donc plus cohérents avec l'hypothèse d'un tuyau unique car la concentration en nitrates est plus importante pour le dernier point (180 cm) que pour les points précédents.

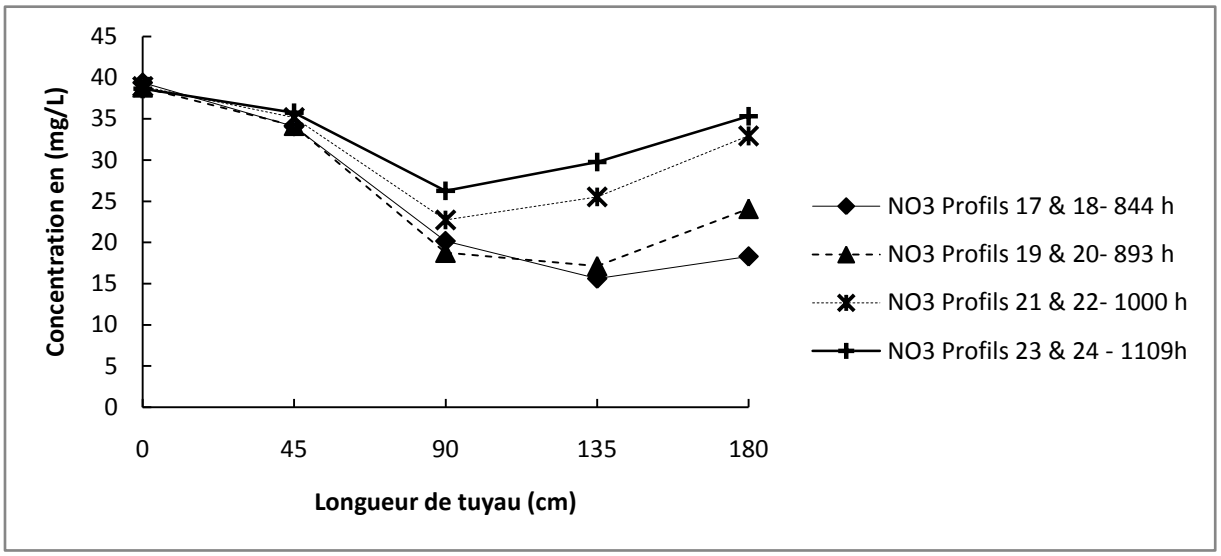


Figure 24: Evolution des concentrations en nitrates le long des tuyaux. Les profils présentés sont les moyennes deux à deux des profils de cette phase (Les valeurs sont normalisées aux chlorures).

4. Phase 4 : Palier de concentration pour une vitesse de 39 mm/min

Cette phase (entre 1174 h et 1343 h) durant laquelle le débit à été maintenu à 7,8 ml/h présente un palier de concentration à 36 mg/L identique à celui de la phase 1 obtenu pour une vitesse identique. Lors de cette phase, une légère baisse du signal d'entrée (tuyau non réactif) à 38,5 mg/L réduit l'amplitude du signal et limite les interprétations possibles des profils durant cette phase. Les profils indiquant une variation de concentration sur toute la longueur sont tout de même présentés Figure 25.

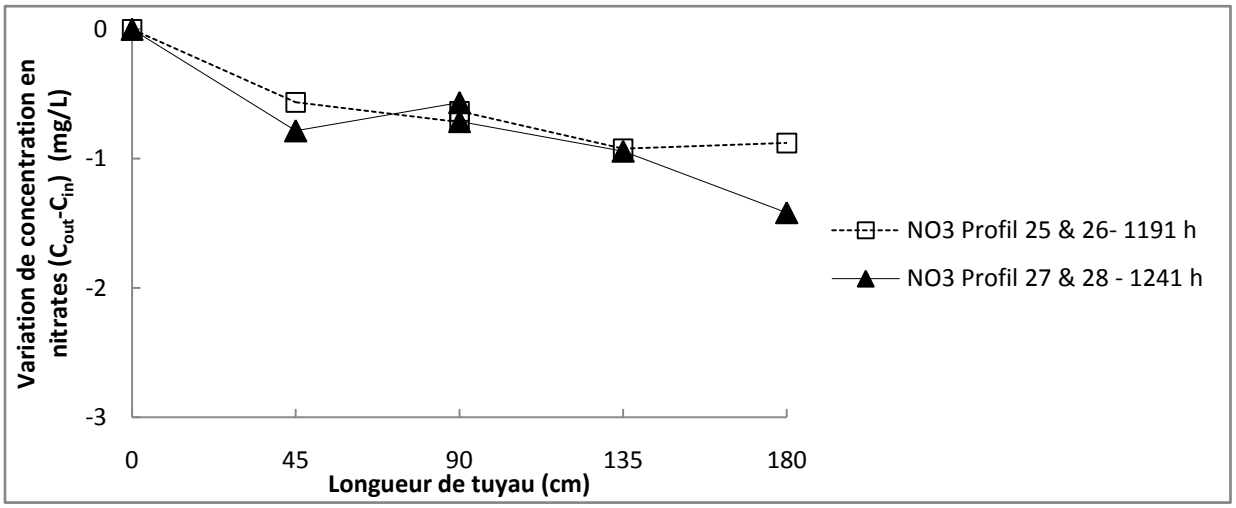


Figure 25: Variation de concentration en nitrates par rapport au point 0 (Moyennes de deux profils normalisés aux chlorures)

5. Phase 5 : Comportement oscillatoire à vitesse constante

Cette phase commençant après 1344 heures d'expérience présente un caractère oscillatoire pour une vitesse d'écoulement constante de 11 mm/min (Figure 26). Comme le montre cette même figure, les concentrations en nitrites sont toujours anti-corrélées.

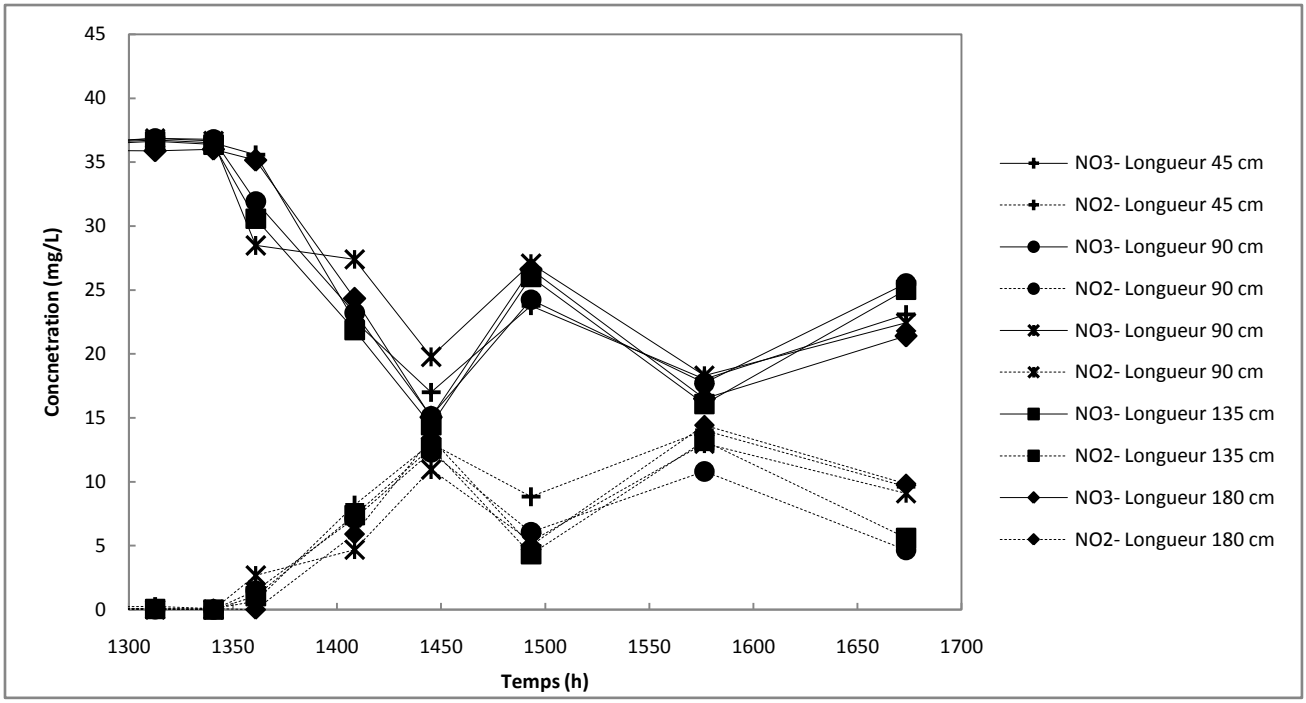


Figure 26: Evolutions temporelles des concentrations en nitrites et nitrates de tous les tuyaux lors de la quatrième phase de l'expérience (Zoom de la figure 21)

La réalisation de profils durant cette phase (Figure 27) montre que la totalité de la réactivité est localisée dans les 45 premiers centimètres des tuyaux. Après ce point, il n'y a plus de réactivité significative sur les ¾ de la longueur des tuyaux. La limite de résolution pour observer la zone réactive est ici de 45 centimètres. En raison de limites temporelles et techniques il n'a pas été possible de contraindre plus précisément l'extension de cette zone réactive.

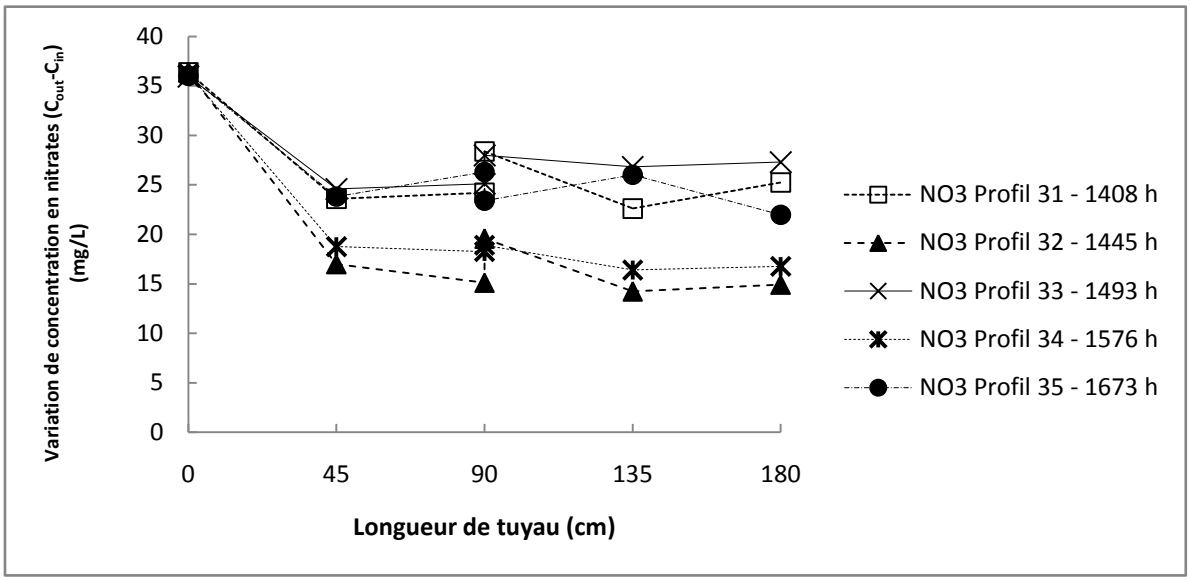


Figure 27: Profils de concentrations en nitrates lors de la dernière phase de l'expérimentation [données normalisées aux chlorures]

IV. Evolution du carbone organique produit

Nous avons vu par les expériences en batchs précédentes (Partie 2- Chapitre 1) que le carbone des tuyaux était un élément prépondérant de la réaction. Nous avons suivi sur la série d'expériences courtes l'évolution du carbone organique et du carbone inorganique en sortie de tuyau. Le carbone organique n'a pas été mesuré durant cette expérience longue, cependant, en raison de la similitude des concentrations en nitrates entre les deux séries d'expériences (Figure 28) on peut supposer que le comportement du carbone est aussi similaire entre les expériences. Pour cette raison, les mesures de carbone effectuées lors de l'expérience court terme sont utilisées pour l'interprétation de cette série long terme. Ces mesures apportent des informations importantes pour la compréhension de l'apport de cet élément dans le système.

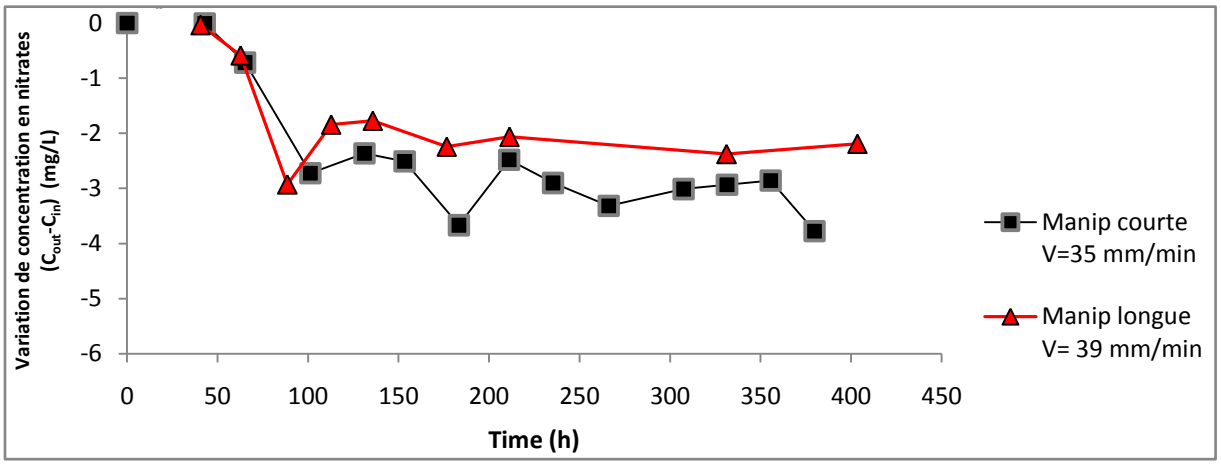


Figure 28: Comparaison de l'évolution des concentrations en nitrates entre les deux séries d'expériences

Les données de carbone en sortie de tuyau au cours du temps dans l'expérience court terme avec 3 vitesses différentes et trois réplicas sont présentées Figure 29:

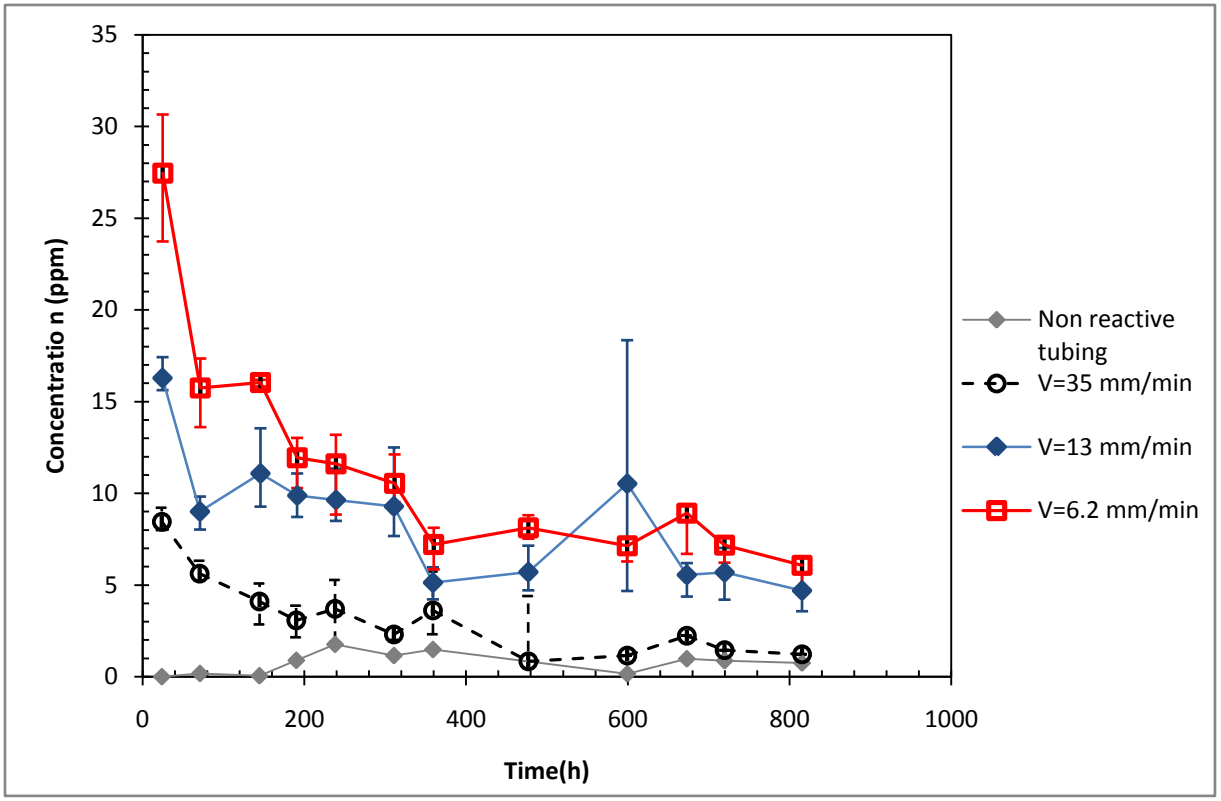


Figure 29: Evolution du carbone organique en sortie de tuyaux

La production de carbone lors du premier point de mesure étant plus importante que par la suite nous faisons l'hypothèse que ce phénomène est un phénomène de diffusion abiotique. La baisse de concentration par la suite est donc considérée comme une consommation lors de la réaction de dénitrification.

La Figure 30 suivante présente les concentrations en carbone mesurées en sortie des tuyaux en fonction du temps de résidence pour le premier point (t =38 h) de mesure (losanges), pour le dernier point de mesure (carrées; t = 217 h) ainsi que la variation de concentration entre ces points (triangles). La linéarité des concentrations en fonction du temps de résidence indique une production constante dans le système qui peut être assimilée à un processus de diffusion. Ce type de processus entraine effectivement, sans réactivité, des profils de concentration linéaires en fonction de la distance dans le tuyau.

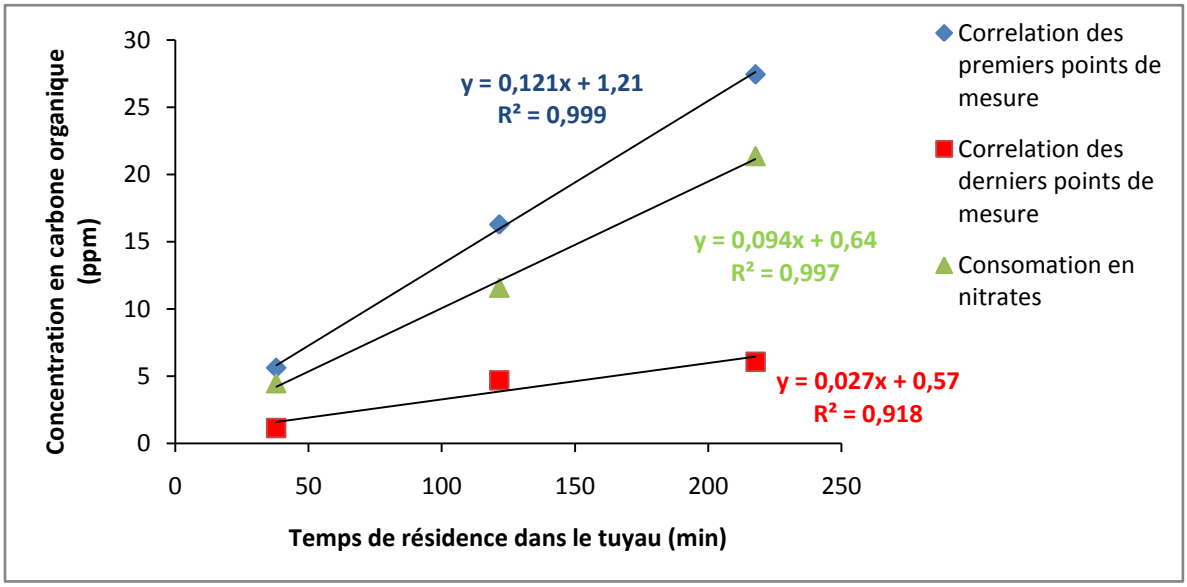


Figure 30: Evolution de la concentration en carbone organique en fonction du temps de résidence pour : a) le premier point de mesure (Bleu) ;b) le dernier point de mesure (Rouge) ; c) la variation de concentration (vert)

Ces résultats indiquent que l'hypothèse de diffusion est cohérente. Cette hypothèse est principalement basée sur le premier point de mesure en raison de la possible consommation du carbone organique dans la suite de l'expérience. Cependant, la concentration lors du dernier point de mesure est aussi linéairement corrélée au temps de résidence dans le système. La pente est différente comme le montre la consommation représentée Figure 30. Cette différence indique que la consommation n'est pas identique et augmente quand la vitesse diminue. Le fait que les concentrations en fin d'expérience ne soient pas nulles indique soit un temps de résidence trop faible ne permettant pas une consommation totale du carbone soit la présence d'un carbone organique non assimilable par les microorganismes.

V. Evolution des concentrations en nitrites

La réaction de dénitrification est une réaction séquentielle qui comporte plusieurs étapes. Dans un premier temps, les nitrates sont réduits en nitrites puis en monoxyde d'azote puis en protoxyde d'azote avant d'être transformés en diazote :

$$NO_3^-{}_{(aq)} \rightarrow NO_2^-{}_{(aq)} \rightarrow NO \rightarrow N_2O_{(gas)} \rightarrow N_{2(gas)}$$

Le dispositif expérimental ne permettant pas le suivi des gaz, seuls les nitrates et nitrites sont ici pris en considération. Ces transformations peuvent être opérées par différents microorganismes. Certaines telles que *pseudomonas sp.* transforment une partie des nitrates en nitrites et une autre partie en azote gazeux alors que d'autres telles que *cocci sp.* transforment à la fois les nitrates et les nitrites en azote gazeux (Constantin and Fick, 1997). Il est noté par plusieurs auteurs que les populations peuvent évoluer et se développer en fonction des concentrations en nitrites (Marazioti et al., 2003) ou adapter leur production d'enzymes. Une anti-corrélation très nette est observée entre les concentrations en nitrates et en nitrites dans cette expérience (voir Figure 21). Bien que les données ne soient pas présentées, cette anti-corrélation est nette sur l'ensemble des profils réalisés Figure 23 à Figure 27.

La Figure 31 montre la corrélation entre nitrites produits et nitrates consommés. Cette relation est linéaire et indique une production de nitrites constante, fonction de la consommation de nitrates. Cette corrélation n'est pas visible aux premiers points de mesures soit en raison d'une consommation des nitrites pour les faibles concentrations soit en raison d'une limite de détection trop faibles des analyses par chromatographie 0,25 mg/L.

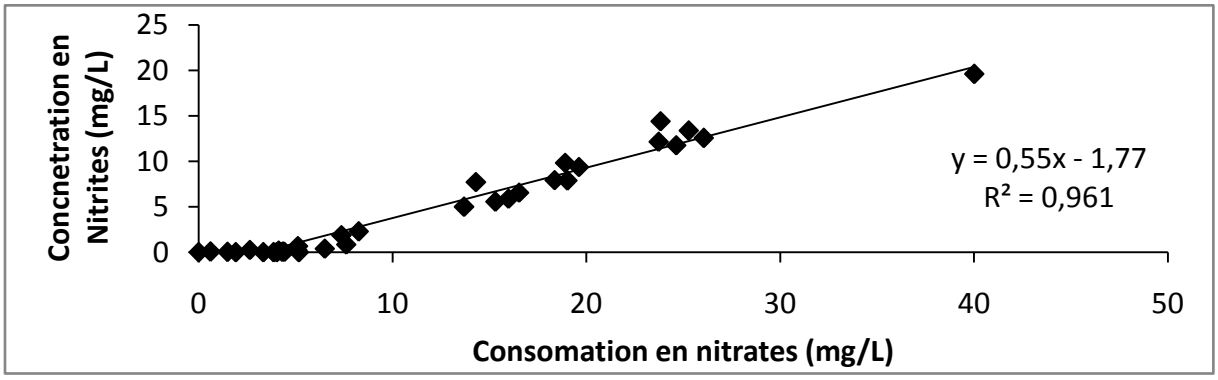


Figure 31: Production de nitrites VS consommation de nitrates (C_{inital}-C_t).

La pente de la courbe de tendance (Figure 31, coefficient directeur 0,55) montre que la concentration de nitrates transformée en gaz (NO, N_2O ou N_2) est proche de la concentration observée en nitrites qui est égale à la moitié de la concentration en nitrates. Le fait que, malgré une consommation des nitrates variable, le ratio NO_2^- produit/ NO_3^- consommé reste constant montre qu'il n'y a pas de consommation de nitrites telle que observé dans les expériences en batchs (chapitre 1). On remarque donc que l'aspect dynamique des écoulements a un effet sur la dynamique des populations ou leurs activités par rapport aux conditions statiques. Les résultats montrent que les flux contraignent le rendement de la réaction qui reste constant au cours du temps ce qui semble indiquer qu'il n'y a pas d'évolution des populations d'un point de vue de la consommation en nitrites.

VI. Influence du chemiotaxisme

Un autre mécanisme, le chimiotaxisme, peut aussi avoir une influence sur la migration du front de réaction. La chimiotaxie est le phénomène par lequel les bactéries, ainsi que les autres organismes unicellulaire ou multicellulaires dirigent leurs mouvements en fonction de certaines espèces chimiques présentes dans l'environnement. Trouver de la nourriture (par exemple du glucose) en se dirigeant vers sa concentration la plus élevée est très important pour les bactéries, aussi bien qu'éviter les agents nuisibles (tels que le phénol par exemple).

Bien que connu depuis 1930, l'influence de ce phénomène n'a été que récemment étudiée en lien avec l'hydrogéologie. Ce phénomène peut avoir une influence non négligeable dans le cadre de bioremédiations en raison d'une affinité accrue pour les espèces chimiques permettant une augmentation des coefficients de diffusion vers les solutés (Ford and Harvey, 2007; Lanning et al., 2008). Différentes études montrent l'influence de ce phénomène sur les processus d'attachement et de détachement (Camesano and Logan, 1998). Certains travaux visent à effectuer des changements d'échelles afin d'intégrer ces phénomènes dans des modèles macroscopiques (Long and Hilpert, 2008; Valdes-Parada et al., 2009).

Dans le cadre de la migration du front de réaction dans notre système expérimental et bien que les espèces soient inconnues, une estimation spatiale de l'influence de ce phénomène peut être effectuée. Faisant l'hypothèse que le développement du biofilm n'a pas d'influence sur le champ de vitesse dans notre expérience et en estimant un profil de poiseuille, la répartition radiale de la vitesse peut être définie comme suit :

$$V_{(r)} = V_{max}(1 - \frac{r^2}{R^2})$$

$$v_{max} = 2V_q$$

$$V_q = \frac{4Q}{\pi D^2}$$

Avec :

$V_{(r)}$=vitesse radiale
V_{max}= Vitesse maximale dans le tube
V_q=Vitesse débitante
r=rayon d'intérêt
R= Rayon du tube (D =Diamètre)
Q=Débit

Données expérimentales :

D =0,0025m
Q1=1,22 ml/h
Q2= 7,25 ml/h

Selon (Ford and Harvey, 2007) les bactéries ayant cette propriété peuvent "nager" à une vitesse de 25 µm/s. Considérant Vr = 25 µm/s, nous pouvons donc définir le rayon où ce phénomène ne peut avoir une influence (r_{inf}) tel que :

$$r_{inf} = \sqrt{\frac{R^2(V_r - V_{max})}{-V_{max}}}$$

On obtient dans nos conditions expérimentales les résultats consignés dans le Tableau 3 :

Vitesse d'écoulement (mm/min)	Débit (m^3/s)	Vmax (m/s)	Rayon de non influence (m)	Section d'influence (m^2)	Pourcentage de la surface d'influence
6,2	$3,38.10^{-10}$	$2,48.10^{-4}$	$9,5\ 4.10^{-4}$	$4,4.10^{-7}$	13,3 %
35	$2,01.10^{-9}$	$1,22.10^{-3}$	$1,01.10^{-3}$	$3,17.10^{-36}$	0.1%

Tableau 3: influence spatiale du chemotactisme

Dans le cadre de ces conditions expérimentales ce phénomène peut avoir une influence pour les vitesses faibles mais pour les vitesses les plus importantes il semble pouvoir être négligé. On peut noter que les pourcentages de surface d'influence sur la section sont potentiellement sous-estimés dans la mesure où la présence d'un biofilm engendrerait en raison de sa

perméabilité une baisse des vitesses au sein de celui-ci et une variation du profil de vitesse de l'eau libre.

VII. Discussion – développement d'un modèle conceptuel

Mise en place et migration du front de réaction

La réalisation des profils de concentration en nitrates durant la totalité de cette expérience a permis de suivre l'évolution du front de réaction. On peut grâce aux profils distinguer différentes phases de mise en place de la réaction. Premièrement (Figure 22) on observe une variation linéaire des profils de concentration, indiquant une répartition homogène de la réactivité tout le long du tuyau. Dans un second temps, bien qu'une réactivité soit maintenue sur toute la longueur du tuyau, on remarque une baisse plus importante des concentrations en nitrates vers la fin du tuyau. Ceci montre une augmentation de la réactivité vers la fin du tube (Figure 22). Par la suite la zone de réactivité préférentielle migre vers l'entrée du tuyau (Figure 23). Sur la Figure 23, on dénombre trois zones. Entre 0 et 45 cm une zone où une faible réactivité est présente, une zone entre 45 et 135 cm où la réactivité est plus importante, ce qui localise le front de réaction entre 45 et 135 cm. Après 135 cm, la réactivité est très faible voir négligeable. La Figure 27, dernière étape du développement, montre quant à elle que la totalité de la réactivité est localisée dans les 45 premiers centimètres et que le reste du tuyau peut être considéré comme inactif d'un point de vue biochimique.

La première phase linéaire est cohérente avec une cinétique d'ordre 0 où la réactivité est indépendante de la concentration. L'évolution de la pente indique quant à elle une évolution du taux de réaction liée à un développement bactérien qui est homogène sur toute la longueur. Dans un deuxième temps (Figure 23), l'accélération de la réactivité en fin de tuyau montre qu'un élément modifie localement le taux de réaction. Couramment, les réactions intégrant une croissance bactérienne sont modélisées en utilisant les cinétiques de Monod où la biomasse croit en fonction des concentrations du donneur et de l'accepteur d'électrons (nitrates en tant qu'accepteur et carbone en tant que donneur dans notre cas). La linéarité des concentrations en carbone en fonction des temps de résidence permet de modéliser les apports de carbone par une production constante. La consommation de carbone peut ensuite être modélisée par un terme de Monod prenant en compte le carbone et les nitrates

On a noté dans les observations que la reprise de la réaction lors de la phase 2 (retour à une vitesse rapide après la première phase d'arrêt de la réaction) induit un nouveau développement du taux de réaction, à un niveau identique à la première phase, à vitesse identique. Ceci indique une limitation du taux de réaction par la vitesse et qu'un changement de celle-ci induit un nouveau développement du taux de réaction. Un terme liant le maximum de réactivité et la vitesse d'écoulement est nécessaire pour reproduire ce comportement. Cependant, les informations obtenues actuellement ne permettent pas une formulation claire de ce terme qui peut constituer une limitation de la croissance bactérienne.

Arrêt de la réaction

Suite à la mise en place progressive de la réaction, nous avons observé un arrêt progressif de cette même réaction. Le type de modèle proposé pour la mise en place de la réaction ne permet pas de prendre en compte la décroissance de la réaction observée (Figure 21). Différentes hypothèses peuvent être formulées pour l'arrêt de cette réaction. Cependant les résultats des profils de concentration lors de ces phases de l'expérience ne permettent qu'une interprétation limitée.

La première hypothèse peut être que cet arrêt est lié à une compétition bactérienne. Cependant, des analyses des populations microbiennes qui n'ont pu être effectuées jusqu'à présent sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Des travaux de modélisation sont actuellement en cours pour comprendre le comportement de ce type d'action.

Cet arrêt de la réaction peut aussi être lié à une accumulation de produits toxiques provenant de la dégradation du PVC (phtalates, HCl…). Ces produits n'ont pas été analysés et il n'est pas actuellement possible de valider cette hypothèse. La constance du rendement de production des nitrites indique une réaction unique constante dans le temps. Ainsi les nitrites peuvent être utilisés comme indicateurs des sous-produits de réaction. L'arrêt progressif, de la réaction tout comme la non réactivité de la fin du tuyau semble davantage indiquer l'impact d'un phénomène d'accumulation que celui d'une concentration critique. En effet une concentration critique arrêtant la réaction conduirait à la présence de paliers de concentration constants et non à un arrêt total de la réaction. L'arrêt de la réaction n'est donc pas lié à une valeur seuil de concentration en nitrites. De nombreuses informations sont manquantes (concentration initiale en biomasse, constantes de saturation…) ce qui induit un trop grand nombre de paramètres pour obtenir un modèle fiable actuellement. Suite à cet arrêt total de la

réaction, la concentration en nitrites redevient nulle et la réaction de dénitrification recommence créant une oscillation des concentrations en nitrates en sortie. La fréquence des oscillations augmente ensuite avec le temps.

VIII. Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre que le dispositif permettait une observation de l'évolution spatiale du front de réaction. Nous avons ainsi pointé une forme spécifique de celui-ci qui apporte de nombreuses informations sur les cinétiques et processus de réaction ayant lieu dans le système. Ceci montre que la donnée spatiale est très importante dans la compréhension des processus. Cependant de nombreuses interrogations subsistent notamment sur les raisons de l'arrêt de la réaction et de sa reprise menant à un comportement oscillatoire.

Conclusions et perspectives

I. Conclusion

Cette partie était consacrée à l'évaluation du rôle de l'hydrodynamique sur la réactivité biochimique à l'échelle d'un macro-pore. Par ces expériences nous souhaitions identifier les processus exerçant un contrôle sur la réactivité biochimique sous contraintes de flux. Nous avons dans un premier temps établi que certains plastiques pouvaient permettre le développement de microorganismes et ainsi soutenir une réaction de dénitrification. D'un point de vue technique ceci révèle que ce type de matériaux peut avoir une influence sur différents dispositifs expérimentaux. Ceci nous a aussi permis de mettre en place un dispositif expérimental innovant permettant une étude de la réactivité biochimique à l'échelle d'un macro-pore.

Nous avons montré que la réactivité était fonction des écoulements et avons prouvé l'intérêt de réaliser des expérimentations en conditions dynamiques. La réactivité est fonction de la vitesse d'écoulement avec des consommations de nitrates plus importantes pour des vitesses d'écoulement plus faibles. Ce résultat était attendu compte tenu qu'à une vitesse plus faible les temps de résidence dans le système sont plus longs et laissent ainsi plus de temps pour la réaction. Cependant, bien que le temps de résidence ait une importance sur le contrôle des réactions, nous avons montré qu'il n'est pas le seul élément d'importance et que l'écoulement a également une influence sur la réactivité.

A travers ces expériences, nous avons mis en évidence une évolution de la nature du facteur de contrôle de la réactivité. En effet, l'expérience court terme a dévoilé que durant la phase de mise en place de la réactivité, les temps de résidence n'avaient pas d'influence sur la concentration en sortie du système. L'élément contrôlant ces concentrations est le développement du biofilm. Celui-ci se développe en fonction des quantités de nutriments apportés dans le système. Ainsi pour une vitesse d'écoulement plus rapide, plus de nutriments sont apportés, le biofilm se développe plus vite et la réactivité est plus importante. Ainsi les concentrations en sortie du système sont indépendantes du temps de résidence. Ces observations mettent en exergue un contrôle biologique de la réaction. Par la suite (phase 2 de l'expérience court terme), les concentrations sont dépendantes de la vitesse mais une fois encore les concentrations observées n'évoluent pas linéairement avec le temps de résidence

dans le système. Nous avons grâce à un modèle physique reproduit à la fois l'évolution des concentrations indépendantes du temps de résidence ainsi que ses paliers de concentrations en prenant en compte l'épaisseur du biofilm et l'épaisseur maximale de diffusion au sein de celui-ci. Bien que très simplificatrice, cette représentation donne des résultats satisfaisants. Nous avons donc observé un contrôle physique de la réactivité. La réponse du système provient aussi de la répartition non homogène de la réactivité qui a été décrite dans le chapitre 4.

La seconde série d'expériences (chapitre 3) réalisée sur des temps plus longs a permis de confirmer nos précédentes observations. Cependant, lors de cette seconde série d'expériences, nous avons observé un comportement plus complexe lié à un arrêt de la réaction suite aux deux phases initialement observées. Cette troisième phase (arrêt de la réaction), bien que restant partiellement inexpliquée, met en avant un contrôle biochimique. Il semble à la vue des résultats qu'une exposition longue à des sous-produits de réaction induise une mort des microorganismes ou une inhibition de la réactivité. L'arrêt lent de la réaction n'est pas lié à un élément en concentration trop importante à un moment donné car cela créerait des paliers constants. Ainsi, alors que le maximum de réaction semble contrôlé par des processus physiques, les phases de croissance et d'arrêt de la réaction semblent contrôlées par des processus biologiques et chimiques.

Bon nombre d'études cherchent à estimer les maximums de réaction (souvent pour des raisons d'efficacité dans les processus de traitement). Ces maximums de réactivité sont en général les valeurs utilisées pour les modèles prédictifs car elles sont considérées comme représentatives d'états stationnaires. Nous avons vu grâce à l'expérience long terme que cette hypothèse d'états stationnaires à l'échelle des biofilms pouvait fortement être remise en cause. Dans nos expériences l'obtention d'un état de réactivité maximum n'est que temporaire. Dans le cas de vitesses d'écoulement lentes, il ne constitue qu'une faible proportion de la durée de l'expérience. Les régimes "transitoires" représentent la plus grande partie du temps de l'expérience. Ces expériences montrent qu'à cette échelle, même en conditions d'écoulement constant, un comportement complexe oscillatoire peut apparaitre. Ces expériences ont aussi démontré l'importance de l'information spatiale qui est nécessaire pour une compréhension des processus dans le cas d'expériences dynamiques.

Le dernier point mis en avant par ces expérimentations est l'influence des écoulements sur l'activité des populations de microorganismes. Bien que ces populations n'aient pas été étudiées, la comparaison des batchs (statiques) et des expériences en flux continu a montré des comportements différents. Alors que les nitrites sont rapidement consommés dans les batchs après un temps d'adaptation, ceux-ci ne sont jamais consommés dans les expériences dynamiques. Ainsi le contrôle des écoulements sur l'adaptation des populations est illustré sans observation directe de celles-ci. Tous ces effets montrent que la compréhension des processus réactifs nécessite des expérimentations en conditions dynamiques car les études en conditions statiques peuvent potentiellement conduire à un schéma réactionnel inadéquat.

II. Perspectives

Les expérimentations réalisées ont apporté de nombreuses informations sur les contrôles de la réactivité en lien avec les écoulements. Cependant, de nombreuses questions subsistent. Comme nous l'avons vu précédemment, une modélisation de toutes les phases observées, impliquant des processus différents dans un système physico-biochimique n'est pas actuellement possible.

Modélisation de la réactivité

Nous avons proposé un modèle mettant en avant l'influence des processus de diffusion sur la réactivité au sein du biofilm durant l'expérience court terme. Le schéma réactionnel dans ce modèle très simplifié ne dépend que de l'épaisseur du biofilm. Ce modèle donne de bonnes estimations au premier ordre mais ne permet pas de reproduire l'évolution spatiale de la réaction observée chapitre 4 ni les phases de décroissance de la réactivité observées chapitre 3. Pour exprimer toutes ces phases, un modèle réactionnel plus complexe est nécessaire. Quelques éléments semblent toutefois acquis.

Nous avons montré que le processus d'apport du carbone pouvait être expliqué par une production constante. Dans un système dynamique, selon cette hypothèse, le carbone peut être modélisé par l'équation d'advection-diffusion-réaction selon l'équation suivante. La concentration en carbone est nulle en entrée du tube et initialement dans le tube.

$$\frac{\partial C_1}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C_1}{\partial x^2} - v\frac{\partial C_1}{\partial x} + R_{C1}$$

Où: $D\frac{\partial^2 C_1}{\partial x^2}$ est le terme prenant en compte les phénomènes de diffusion, $v\frac{\partial C_1}{\partial x}$ est le terme d'advection (avec *v* la vitesse d'écoulement) et R_{C1} est le terme de réaction qui peut être dans ce cas une constante. Cette équation produit une augmentation de concentration linéaire en fonction de la longueur du tube et donc induit une concentration plus forte en fin de tube. La concentration en sortie du tube est fonction du temps de résidence et est plus importante pour des vitesses faibles.

Les données ont exprimé une augmentation du taux de réaction qui est attribuée à la croissance du biofilm. Dans ce cas la biomasse peut être considérée comme immobile. La croissance des populations bactériennes est généralement modélisée suivant les cinétiques de Monod où la croissance est fonction des concentrations en nitrates et en carbone selon l'équation suivante :

$$\frac{\partial X}{\partial t} = X\mu_{max}\left(\frac{NO_3^-}{K_{NO3} + NO_3^-}\right)\left(\frac{C_1}{K_{C_1} + C_1}\right) - R_{Decay}$$

Avec

X : concentration en biomasse (mg/L)

K_{NO3} : Constante de demi-saturation en nitrates (mg/L)

K_{C1} : Constante de demi-saturation en carbone (mg/L)

Le terme R_{decay} représente un facteur limitant la croissance de la biomasse. Dans l'état actuel de nos connaissances la forme de l'expression R_{decay} ainsi que les facteurs (quantité de biomasse, inhibition par des sous-produits…) ne sont pas connus.

Les nitrates étant mobiles ils suivent l'équation d'advection dispersion et ils sont consommés suivant une cinétique de Monod. On obtient donc l'équation suivante.

$$\frac{\partial NO_3^-}{\partial t} = D\frac{\partial^2 NO_3^-}{\partial x^2} - v\frac{\partial NO_3^-}{\partial x} - X\mu_{max}\left(\frac{NO_3^-}{K_{NO3} + NO_3^-}\right)\left(\frac{C_1}{K_{C_1} + C_1}\right)$$

Le carbone étant aussi consommé suivant la même cinétique, il doit intégrer cette dégradation et peut être représenté selon l'équation suivante :

$$\frac{\partial C_1}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C_1}{\partial x^2} - v\frac{\partial C_1}{\partial x} + R_{C1} - X\mu_{max}\left(\frac{NO_3^-}{K_{NO3} + NO_3^-}\right)\left(\frac{C_1}{K_{C_1} + C_1}\right)$$

Ce modèle induit un taux de croissance plus important dans les zones où le carbone et les nitrates sont présents en concentrations plus importantes. Initialement le taux de réaction faible le long du tube induit une concentration sub-homogène sur toute la longueur du tube et une concentration plus importante en carbone à la sortie du tube. Ainsi la biomasse aura une croissance plus importante vers la fin du tube ce qui est cohérent avec nos observations. Au cours du temps le taux de croissance de la biomasse va augmenter sur toute la longueur du biofilm en se déplaçant de la sortie vers l'entrée du système. Cependant dans le cas de ce système d'équations, la réactivité sera toujours plus importante vers la fin du tube que vers l'entrée les réactifs que sont les nitrates et le carbone n'étant pas limités. La phase d'arrêt de la réaction ne peut être reproduite par ces équations. Il est donc nécessaire de travailler sur les possibles expressions permettant cet arrêt de la réaction.

Le nombre de paramètres inconnus (X, K_{NO3}, K_{C1} μ_{max}, R_{decay}) dans ce modèle réactif est actuellement trop important.

Caractérisation biologique de la réactivité

Pour permettre une vision complète des processus ayant cours de nouvelles données sont nécessaires. Il serait ainsi nécessaire de caractériser les activités microbiennes par des analyses enzymatiques d'une part et au travers d'un séquençage d'ARN ce qui permettrait d'évaluer les activités des microorganismes et d'avoir des informations sur les structures et dynamiques des communautés. De plus il apparait nécessaire de caractériser les lois de croissances des microorganismes en effectuant un suivi quantitatif des populations. Pour définir clairement les interactions entre biofilms et écoulements (notamment sur les aspects diffusifs au sein des biofilms), il est nécessaire d'avoir un accès aux propriétés physiques des biofilms (densité, porosité). Une spatialisation fine du développement de biofilms permettrait aussi de contraindre, avec une représentation plus fine, une variabilité possible des zones réactives.

La phase de décroissance et d'arrêt de la réactivité reste aussi une question ouverte. Identifier, les possibles éléments inhibiteurs de la réaction pourrait fournir les informations pour comprendre les mécanismes en jeu (accumulation). Il est possible de penser que les éléments inhibiteurs sont spécifiques au protocole utilisé ici (éléments pouvant provenir de la décomposition du PVC et donc non présents dans le milieu naturel). Cependant, le phénomène de reprise de la réaction après un arrêt total ne doit pas être spécifique au système.

Les processus impliquant différentes communautés microbiennes ne sont pour l'instant que peu connus. Le dispositif utilisé ici peut donc servir à comprendre ces phénomènes de recolonisation du milieu ou de reprise d'une activité dans un cadre où différentes communautés peuvent exister.

Menés conjointement, des travaux de modélisation et l'obtention de nouvelles données permettraient une meilleure compréhension des processus pouvant réguler la réactivité dans les systèmes dynamiques.

Partie II :

Réactions de dénitrification autotrophe à l'échelle du site

Chapitre 1 :
Contexte local et caractérisation des sites d'étude

I. Introduction

L'exploitation viable d'une ressource en eau à l'échelle d'une ville nécessite la prise en compte des paramètres physiques tels que la géologie qui régule les écoulements et les quantités pouvant être prélevées ainsi que les processus chimiques qui régulent la qualité des eaux et permettent l'utilisation d'une ressource d'eau potable. Cette partie de terrain se propose de faire le lien entre ces éléments. Cette étude prend place dans le cadre de travaux menés depuis plusieurs années par le laboratoire Géosciences Rennes sur le site de Ploemeur. Ces travaux sont réalisés en lien avec la régie "eau et assainissement" de la ville.

Les aquifères fracturés cristallins sont généralement de faible extension et ont des potentiels de productions faibles. Ceci est vrai dans une majorité des cas mais le site de Ploemeur, bien que d'extension limitée, permet une exploitation importante d'1 millions de m^3/an. Cette ressource importante offre donc un attrait particulier qui est une des raisons du développement scientifique de ce site.

Les travaux réalisés durant cette étude ont été appliqués à deux sites de la commune : Kermadoye et Loyan. Nous présentons dans ce chapitre ces deux sites.

II. Le site de Ploemeur-Kermadoye

1. Contexte

Ce site, utilisé depuis 1991 et situé dans le Morbihan, a été initialement développé afin de permettre un complément d'approvisionnement en eau de la ville pendant la période estivale. Cependant les débits accessibles se sont révélés supérieurs aux attentes avec un débit supérieur à 1 000 000 m^3 par an pompé actuellement. Cette exploitation permet une alimentation pérenne de la totalité de la population actuelle de la ville (18 000 habitants). Une telle quantité accessible est très rare dans le cas de milieux cristallins où les roches encaissantes principales (granite et schiste) sont réputées peu perméables. Cette spécificité donne à ce site un intérêt particulier pour l'étude de l'hydrogéologie dans les milieux

fracturés. De plus, ce site présente une forte hétérogénéité physique qui induit des écoulements localisés et est donc un bon support d'étude pour ce type de milieux. D'un point de vue chimique ce site présente aussi des particularités avec une forte variation de la chimie globale du site depuis le début de la mise en pompage. La mise en pompage semble en effet avoir augmenté les capacités de dénitrification du site et induit une évolution continue de la chimie qui n'est toujours pas stabilisée à l'heure actuelle. C'est aussi un des rares sites cristallins aussi bien instrumenté (forages et outils de mesure) ce qui permet un accès complet et continu à un grand nombre de données. Ce site fait d'ailleurs parti depuis 2002 du service national d'observation H^+ (initialement Observatoire de Recherche en Environnement avant sa labellisation par l'INSU-CNRS). Ce site fait l'objet de nombreux projets de recherche sur l'étude de la réactivité chimique, la vulnérabilité des aquifères, l'étude de la déformation des sols, le développement de mesures spécifiques aux milieux fracturés et sert de support au développement de modèles numériques.

Un autre site, sur une commune avoisinante (Guidel), permet une exploitation de ressources en eaux encore plus importante sur des structures géologiques identiques. Ces sites ainsi que les sites annexes de Loyan et Stang er Brune (dont les utilisations sont principalement scientifiques) sont localisés Figure 32.

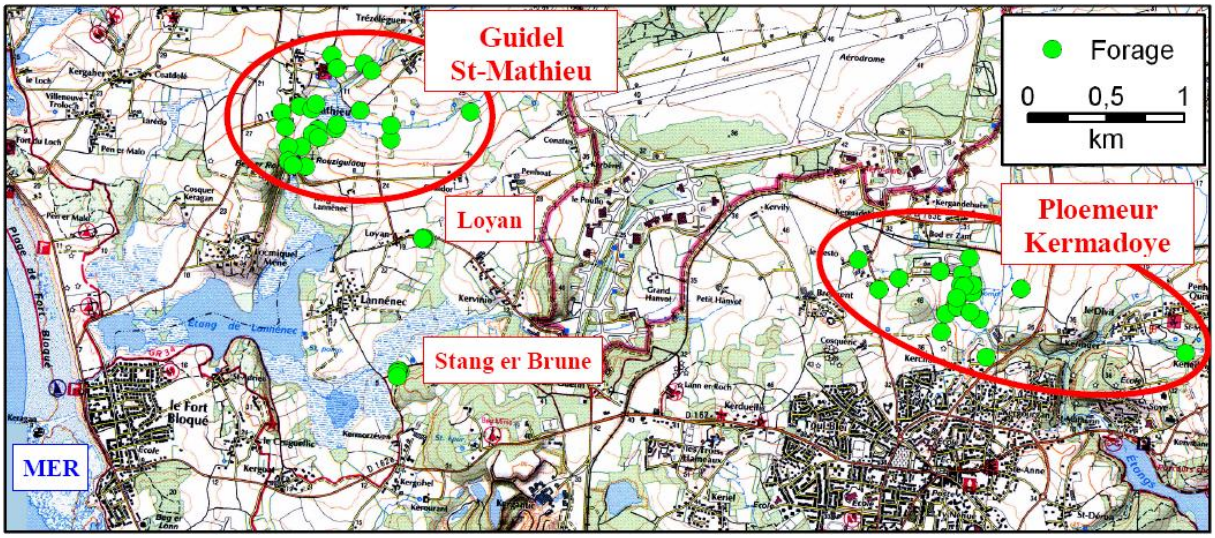


Figure 32: Localisation des sites (Laurencelle et al 2010)

2. Géologie et écoulements

Le site de Ploemeur-Kermadoye se situe sur des roches de socle appartenant au massif armoricain et est localisé à l'interface entre les micaschistes du Pouldu et le leucogranite de

Ploemeur (Figure 33b). La transition entre micaschistes et granites est orientée principalement selon un axe est-ouest (Figure 33a). Cette transition est régulièrement décalée le long d'accidents N20°. Le site de pompage se situe sur une de ces failles N20°. Ces éléments sont représentés Figure 33. Le site de Loyan (second site de cette étude) est lui aussi situé au niveau du contact entre micaschiste et granite. Ce contact entre roches différentes a généré une fracturation très importante de ces zones. Cette fracturation induit donc une perméabilité plus forte du milieu qui permet ainsi une exploitation de la ressource en eau. Sur le site de Ploemeur-Kermadoye, on suppose que la majorité des écoulements a lieu dans une zone fracturée principale d'orientation N20°. Les détails sur la géologie du site contenant notamment l'analyse de puits carottés sont présentés dans (Ruelleu, 2010; Ruelleu et al., 2010; Touchard, 1999).

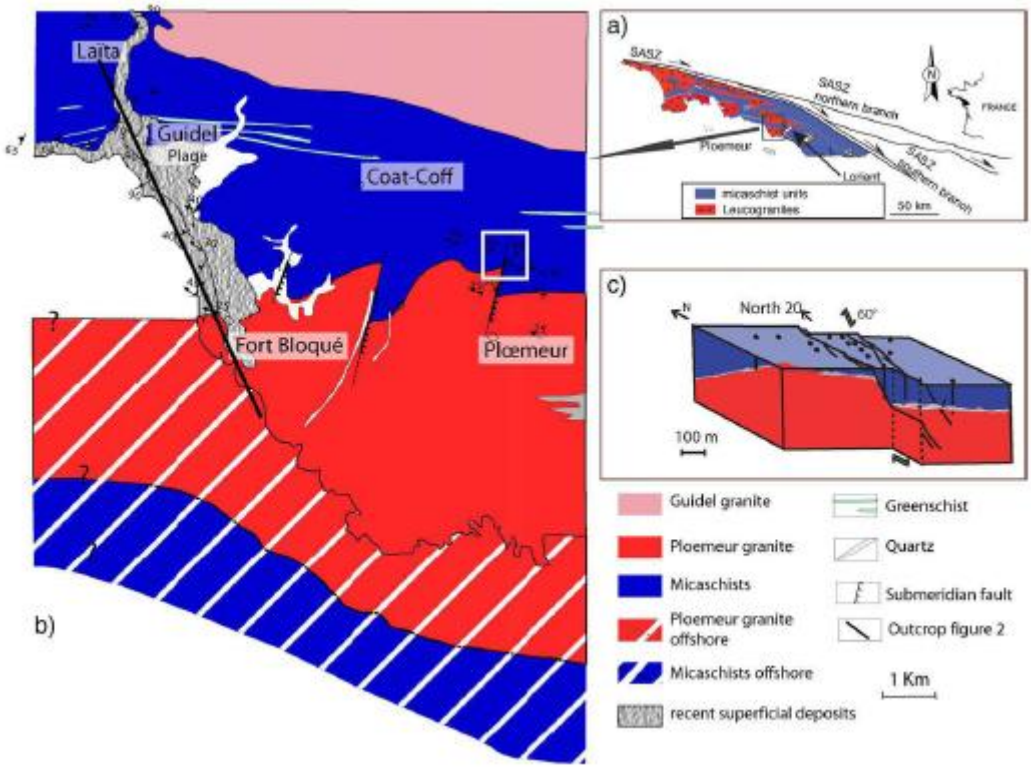


Figure 33: Schéma structural de la zone. a) Localisation et contexte géologique du site de Ploemeur ; b) carte synthétique de la zone de contact ; c) schéma du contact local à pendage Nord recoupé par des fractures subverticales décrochantes de direction Nord 20 (Ruelleu et al., 2010).

La structure du site induit des écoulements rapides et très localisés dans quelques fractures connectées. Cependant, à l'échelle de la zone le comportement global est moins hétérogène que supposé par l'identification des flux dans les forages. Les mesures des propriétés hydrogéologiques de la zone ont montré une forte transmissivité de 2.10^{-3} m^2/s dans la zone

de contact intensément fracturée (Le Borgne et al., 2006a). Ce paramètre très variable à une échelle locale tend vers une homogénéisation avec une augmentation de la distance entre les points de mesure (Figure 34).

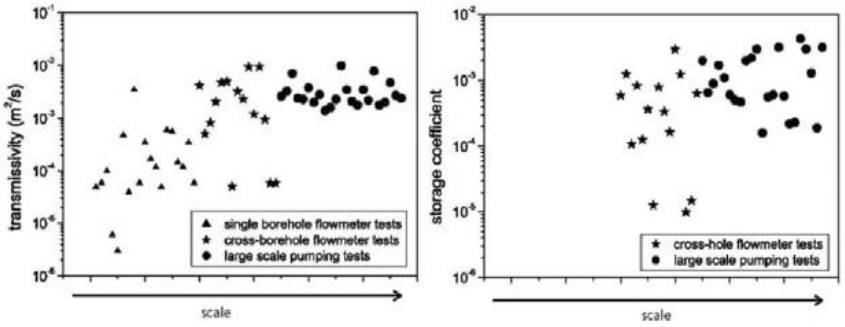


Figure 34: Estimation des propriétés hydrogéologiques du site de Ploemeur en fonction de l'échelle d'investigation (Le Borgne et al 2006)

Ainsi le rabattement induit par le pompage à l'échelle du site n'indique pas une hétérogénéité forte. Sur la carte piézométrique présentée Figure 35, on observe que le rabattement n'est pas très hétérogène malgré un niveau piézométrique plus bas à l'est des puits de pompage (PE, F29, F31) que à l'ouest. Cette propriété permet d'utiliser en partie des simplifications du milieu et des études ne nécessitant pas pour chacun des paramètres la prise en compte explicite de toutes les hétérogénéités du milieu. Ce site permet donc une compréhension de l'influence de l'hétérogénéité locale sur le comportement global d'un site.

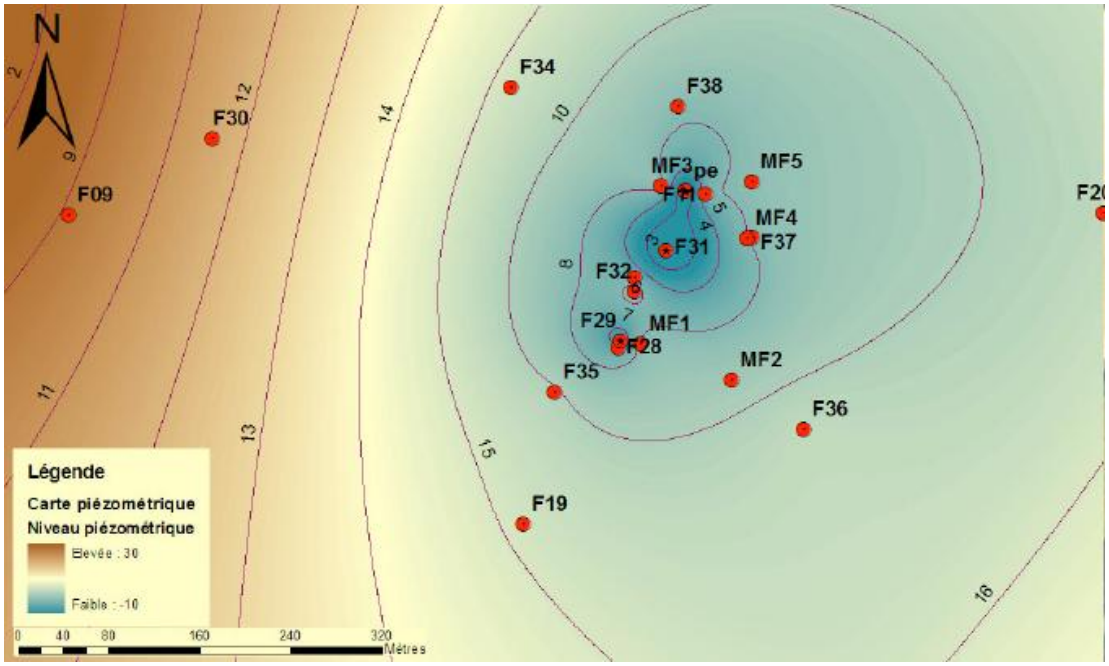


Figure 35: Carte piézométrique le 30/11/2006 sur le site de Kermadoye (Puits de pompages situés en PE, F29 et F31)

3. Caractérisation chimique du site de Ploemeur

Ce site a fait l'objet de campagnes régulières de suivi chimique. De plus, différentes études des processus à l'origine des changements biogéochimiques depuis sa mise en pompage (Ayraud, 2006; Tarits et al., 2006) ont été réalisées. Cette mise en pompage a engendré un abaissement des concentrations en nitrates dans le puits de pompage alors que des concentrations en nitrates relativement importantes restent observables tout autour de la zone de pompage. Ce phénomène est présenté sur la Figure 8.

Une étude récente des données chimiques par analyse en composantes principales (Laurencelle et al., 2010) a montré que la majorité des chimies des puits du site pouvait être reproduite par des mélanges entre trois pôles chimiques. Le premier pôle comprend des eaux de surface ayant une circulation rapide vers l'aquifère. Ce pôle peut être représenté par la chimie du puits F9. Ces eaux sont riches en nitrates (> 50 mg/L) mais peu concentrées en sulfates (10 mg/L) et chlorures (50mg /L). Le second pôle est défini par les piézomètres superficiels tels que MF1. Ces piézomètres sont situés dans des zones d'altérites et présentent de faibles concentrations en nitrates (0,4 mg/L), de fortes concentrations en sulfates (200 mg/L) et des concentrations faibles en chlorures (50 mg/L). Le troisième pôle est représenté par les eaux de F38 qui est considéré comme étant un pôle profond. En effet la forte température des eaux de ce type indique des eaux provenant d'une profondeur estimée à 300 m (selon le gradient géothermique qui augmente avec la profondeur). Ces eaux sont chargées en chlorures (88 mg/L), en sulfates (94 mg/L) et en manganèse (224 ppb) et ne contiennent quasiment pas de nitrates. L'âge moyen de l'eau pompée au puits principal PE est de 25 ans alors qu'il est de 40 ans pour les eaux de type F38 et de 10 ans pour les eaux de type F9. Les eaux arrivant au puits de pompage semblent être un mélange de ces différents pôles où le pôle profond est le plus ancien. Un modèle conceptuel des phénomènes de mélange est présenté Figure 36.

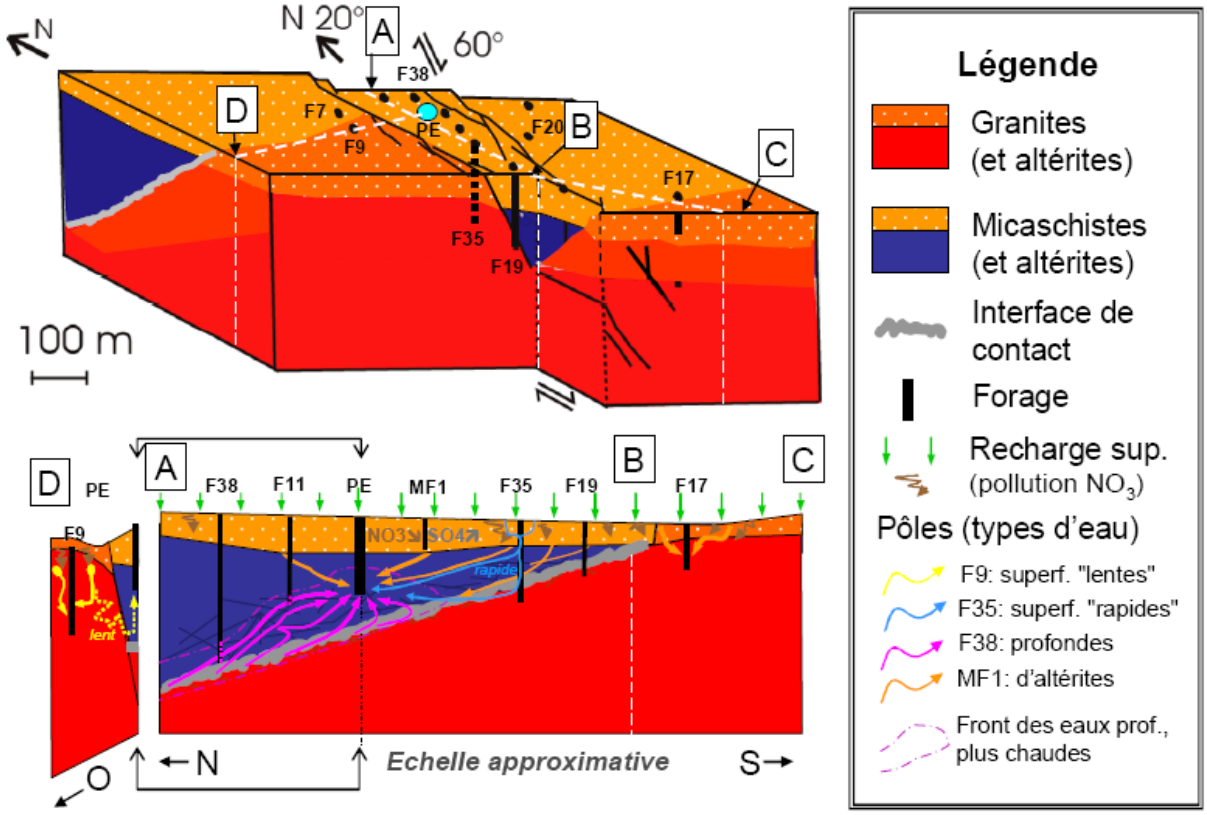


Figure 36:Modèle conceptuel des phénomènes de mélange entre les différents pôles chimiques

La mise en pompage du site a augmenté les phénomènes de mélange entre ces différents pôles. Laurencelle et al. ont montré que l'augmentation des sulfates présentée Figure 8 pouvait principalement être expliquée par mélange (Laurencelle et al., 2010). Cette étude indique tout de même une consommation des nitrates par dénitrification. L'influence présupposée de la pyrite sur la réaction de dénitrification observée sur le site est donc en partie remise en cause.

La mise en pompage peut aussi avoir une influence sur la réactivité du site en influant sur le transport des masses d'eau. Ainsi, alors que dans les zones d'altérites le pompage a pu accélérer les temps de transfert, et donc réduire les temps de résidence ayant pour effet de diminuer la réactivité de ces zones, la mise en mouvement de masses d'eau a pu aussi amener des eaux superficielles dans des conditions plus réductrices et donc augmenter les possibles réactions sur ces masses d'eaux. L'influence de la réactivité sur les concentrations en nitrates lors du transfert des masses d'eaux de surface vers le puits de pompage sera discutée dans le dernier chapitre de ce document.

III. Caractérisation du site de Loyan

Le site de Ploemeur étant utilisé pour l'alimentation en eau de la ville, nos expérimentations pour la détermination des cinétiques de réactions ont été effectuées sur le site annexe de Loyan situé sur la même commune (Figure 32). En effet pour ces expériences nous souhaitions injecter des traceurs sans présenter de risques pour la qualité de l'eau de la ville. De plus, la mise en pompage constante et la gestion par la ville des débits de pompage empêche un contrôle des conditions ambiantes nécessaires à ce type de manipulation. Le site de Loyan est composé de quatre piézomètres. Trois de ces piézomètres (F13, F21, F26) sont très proches et forment un triangle dont le plus long coté est de 4,80 m. Le quatrième piézomètre est à une distance inférieure à 20 m des trois autres. Le détail de l'implantation est donné sur la figure suivante. Tous les piézomètres sont tubés sur toute leur longueur et sont crépinés pour les profondeurs de plus de 40m.

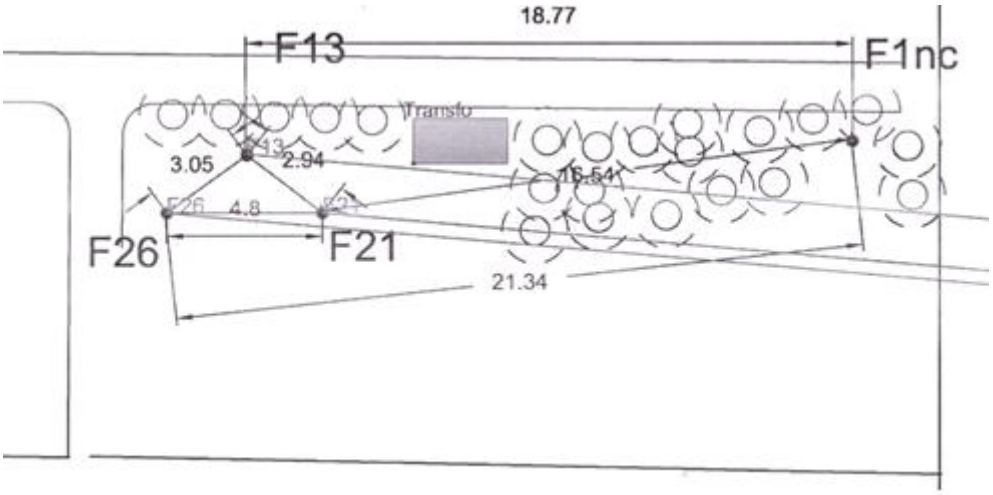


Figure 37: Implantation des piézomètres sur le site de Loyan

Ce site de Loyan est, comme le site de Kermadoye, localisé au droit de l'interface entre micaschistes et granite. Il présente ainsi la même géologie et des écoulements localisés en raison d'une fracturation principale au niveau du contact entre ces roches. Le suivi des variations piézométriques indique que nous sommes dans un aquifère captif (observation de phénomènes de marées terrestres). Ce site a été développé pour servir de complément d'apport en eau pour la commune en période estivale. Les premiers essais de pompage ont été effectués sur le piézomètre F13 et ont montré une bonne capacité de production d'eau. Cependant lors d'un pompage prolongé effectué pour évaluer à long terme la capacité du site,

l'évolution de la chimie des eaux a montré une augmentation des chlorures. Par crainte d'une évolution des concentrations à long terme qui ne permettrait pas de garantir une potabilité de cette ressource, le site a été abandonné.

Le site n'étant que faiblement connu d'un point de vue hydrogéologique, la partie suivante présente les travaux de caractérisation réalisés dans le cadre de cette thèse sur le site de Loyan pour obtenir les informations nécessaires à une compréhension physico-chimique du milieu.

1. Choix du site d'étude et motivations du travail de caractérisation

Ce site d'étude a été choisi pour différentes raisons. Tout d'abord, ce site distant de 4,5 Km de Kermadoye n'est pas influencé par le pompage AEP. Ce site étant déconnecté du site principal il est possible d'effectuer des essais de traçages sans risques pour la qualité de l'eau du site de pompage. Nous avons donc accès à un site où l'écoulement naturel est maintenu tout en étant proche d'un point de vue géologique du site principal de pompage. De plus la forte densité, bien que très locale de l'implantation des piézomètres (F13, F21, et F26) permet une échelle d'étude intéressante pour des travaux de géochimie en milieu naturel. En plus de ces raisons pratiques, le site a montré dans le cadre du suivi chimique long terme effectué par le laboratoire Géosciences Rennes une très forte hétérogénéité chimique avec la présence de zones très réductrices. Les détails de cette chimie seront discutés par la suite.

Un des objectifs de ce travail sur site est de démontrer et quantifier les capacités de dénitrification in situ de ce site. Les milieux fracturés induisent des écoulements fortement localisés et hétérogènes. Dans le cadre de ces milieux fracturés une connaissance très précise de la physique et chimie du site sont nécessaires car les capacités d'extractions ainsi que les connexions entre différentes zones sont contrôlées par la fracturation entre ces zones. La réalisation d'essais de traçages réactifs en milieux fracturés nécessite une connaissance fine de la connectivité pour pouvoir être menés avec succès.

Les travaux de quantification des réactions chimiques seront présentés dans le chapitre 4. Nous ne présenterons ici que les travaux prospectifs nécessaires à une caractérisation du milieu.

2. Perméabilité et écoulements

Les premiers tests réalisés sur le site ont été des essais de pompage. Ils permettent d'obtenir les informations primordiales que sont la transmissivité et le coefficient d'emmagasinement ainsi que d'avoir une première information intégrative des connexions entre les différents puits. Des essais de pompages ont été effectués dans chacun des puits (d'une durée de 5 à 9h). Le détail des données n'est pas présenté ici. Les coefficients d'emmagasinement et données de transmissivité sont calculés selon la méthode de Theis. Les valeurs de transmissivités des meilleurs calages sont présentées dans le tableau suivant :

Puits	T (m^2/s)
F13	$2,40.10^{-04}$
F26	$1,60.10^{-05}$
F21	$2,0.10^{-04}$

Tableau 4: Transmissivités obtenues à partir des essais de pompage pour chacun des puits

Le puits F26 est localement très peu perméable mais un essai de pompage de 9h a montré la présence d'une zone de réalimentation limitant le rabattement dans ce puits. Aucune connexion n'à été observée avec le forage Finc. Celui-ci a donc été abandonné pour la suite de ces travaux.

3. Flux ambiants et connectivité entre puits

La connectivité entre puits a été évaluée par des tests d'interférences en utilisant un débitmètre par impulsion de chaleur (Heat Pulse Flow Meter- HPFM).

a. Principe de la méthode

La méthode de mesure consiste à émettre un pulse de chaleur dans le milieu et à mesurer son temps d'arrivée à un capteur situé en haut (pour la mesure des flux ascendants) ou en bas (pour la mesure des flux descendants) du point d'émission. Le temps d'arrivée au capteur ramené à la distance entre injecteur et capteur permet d'obtenir la vitesse d'écoulement.

La sonde de mesure de flux verticaux utilisée a été développée par l'US Geological Survey. Une photo de l'appareil ainsi qu'un schéma de principe de la sonde sont présentés Figure 38. La sonde est tout d'abord plongée dans le puits à une profondeur donnée. La géométrie de la sonde permet un écoulement du flux au sein de celle-ci. En son centre un thermistor permet

d'émettre des signaux de chaleur. Deux capteurs de température sont placés à 5 cm au-dessus et 5 cm au-dessous du thermistor permettant de détecter le signal thermique envoyé par le thermistor. Le temps entre l'envoi du pulse de chaleur et son arrivée au récepteur est mesuré donnant ainsi le temps de transfert et donc la vitesse d'écoulement du fluide. Pour chaque point de mesure, la sonde doit être stabilisée pour éviter une perturbation des flux. Elle permet de mesurer des vitesses d'écoulement de l'ordre du mm/s. Les mesures sont répétées jusqu'à l'obtention d'une mesure constante. Les débits sont calculés en fonction de la vitesse d'écoulement grâce à une calibration de l'appareil effectuée pour chaque diamètre de puits. Bien que permettant une mesure très précise des vitesses d'écoulement verticales ce type de mesure présente l'inconvénient du temps nécessaire pour chaque point de mesure (légèrement inférieur à 10 min). Plus de détails sur cette technique de mesure et son utilisation sont disponibles dans (Le Borgne, 2005; Le Borgne et al., 2006a; Le Borgne et al., 2006b).

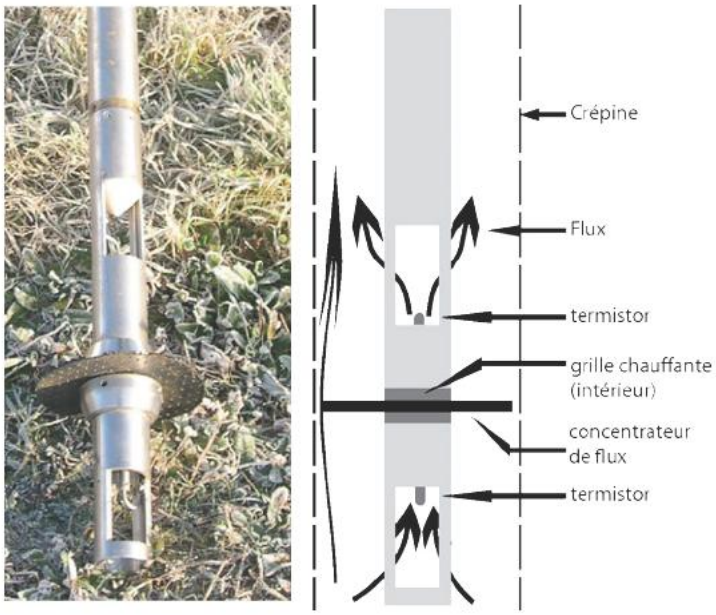


Figure 38: Photo et schéma de principe du "Heat Pulse Flow Meter" (Ruelleu et al 2010)

b. Utilisation

Le but de ces mesures de vitesses est de localiser précisément les fractures productives dans les puits et de définir les connexions hydrauliques entre les puits créées par ces fractures. Ce type de sonde de mesure de débit peut donc être utilisé de différentes façons.

Différences de charges naturelles

Cette sonde permet dans un premier temps de mesurer les débits ambiants. Dans ce cas, les mesures sont effectuées sans stimulation du milieu (pompage). La mesure de flux ambiant peut aider à la compréhension du milieu dans le cadre de milieux hétérogènes. Un flux est systématiquement généré par une différence de charge. La présence d'un flux vertical en conditions ambiantes induit donc une connexion créée par le puits entre deux zones de charges différentes.

Identification des fractures productives – Débitmétrie en puits unique

Dans le milieu naturel, les fractures au sein d'un puits peuvent être très nombreuses, cependant dans bien des cas seule une faible proportion de celles-ci permettent des apports d'eau significatifs (Le Borgne et al., 2007; Le Borgne et al., 2006b). L'identification des fractures productives est un élément prépondérant pour caractériser les écoulements dans les milieux fracturés. Le débitmètre à impulsion de chaleur peut être utilisé pour identifier ces fractures et mesurer leur influence. Pour ce type de mesure un pompage est mis en place dans le puits d'intérêt et des mesures de vitesses d'écoulement sont effectuées tout le long de ce même puits. Les augmentations de débit observées permettent une localisation des fractures et une mesure des apports d'eau possible. Une augmentation brutale des vitesses indique une fracture unique alors qu'une augmentation plus continue indique la présence d'une zone fracturée. Les résultats de cette procédure seront présentés Figure 39 pour le puits F26 et Figure 40 pour les trois puits principaux.

Connectivité inter-puits – Tests d'interférence

Tout comme une partie seulement des fractures d'un puits peuvent être productives en eau, celles-ci ne sont pas toutes connectées entre elles. Ainsi certains puits très proches géographiquement peuvent ne pas être connectés hydrogéologiquement par manque de fractures connectées. Pour identifier les fractures connectant les différents puits nous utilisons la technique des tests d'interférences. Dans ce cas un pompage est effectué dans un puits et les vitesses d'écoulement sont mesurées dans un puits voisin. Les sens d'écoulement s'orientent vers la fracture connectée. Ainsi les sens d'écoulements permettent une localisation de la ou des fractures connectées. Une baisse significative de la vitesse sans inversion de sens d'écoulement indique la présence d'une fracture secondaire.

c. Fractures et connexions à l'échelle du site

Flux ambiants

Aucun flux ambiant n'a été détecté sur les puits F21 et F13, en revanche, un flux ambiant ascendant à la limite de détection (2 L/min) a été détecté dans le forage F26 (Figure 39a). Les vitesses mesurées en conditions ambiantes sont à la limite de détection de l'outil, cependant la présence de ce flux concorde avec une anomalie de température observable sur la Figure 39c. La mesure de ce flux implique la présence de deux fractures ou zones perméables. La première vers 60 m et la seconde vers 30 m.

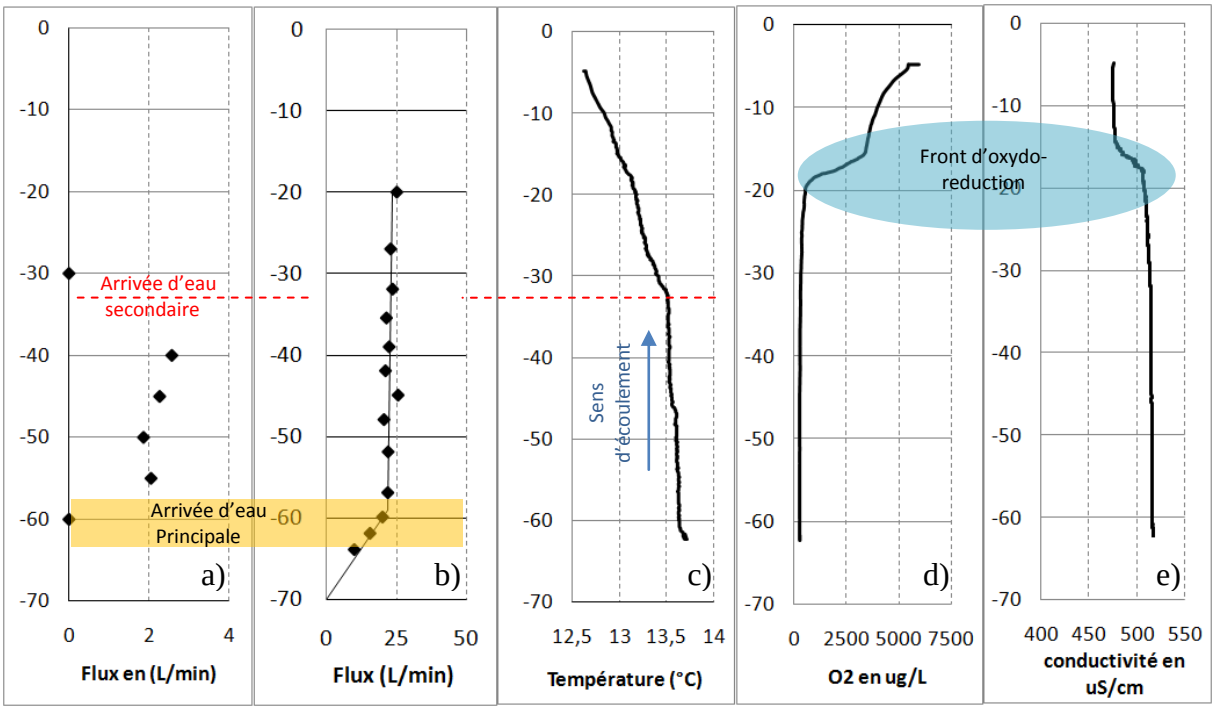


Figure 39: Diagraphies réalisées sur le puits 26 ; a) mesures de débitmétrie en flux ambiants ;b) mesures de débitmétrie en pompage ; c) profil de température en conditions ambiantes ; d) Profil de concentration en oxygène dissous ; e) profil de conductivité ; Les mesures des figures a, c, d et e sont réalisées en conditions ambiantes

Le puits Finc a été identifié comme non connecté aux trois autres et ne sera pas considéré dans la suite de cette partie. Les données collectées lors des tests de débitmétrie inter-puits ainsi que les diagraphies (O_2, T°, conductivité) des puits F13 et F21 sont fournies en annexe 1.

Détection des zones d'écoulement principales

La détection des zones principales d'écoulement pour le puits F26 est présentée Figure 39b. Ces données sont comparées aux diagraphies (O_2, conductivité, T°) sur cette Figure 39. Les

résultats de ces mesures en puits unique sont synthétisés pour l'ensemble des puits sur la Figure 40. Sur cette figure, sont représentés les flux observés durant la réalisation de mesures de débitmétrie en puits unique sur les trois graphiques montrant les débits observés en fonction de la profondeur. Une augmentation brusque du débit indique la présence très localisée d'une fracture productive alors qu'une augmentation plus diffuse sur plusieurs mètres est symptomatique de la présence d'une zone fracturée. Ainsi le puits F26 présente une arrivée diffuse (zone de fracturation) uniquement sous une profondeur de 59 m. Cette arrivée a été observée jusqu'à 65 m. Une déformation du puits empêchant une descente d'outils sous cette profondeur, la structure des arrivées d'eau sous cette profondeur est inconnue. Cependant, les données indiquent que une (des) arrivée(s) d'eau représentant environ de 30% du débit total est (sont) présente(s) sous cette profondeur. La fracture identifiée en haut du forage F26 (entre 30 et 40) n'est pas visible lors du test en pompage. Ceci indique que cette fracture est très peu productive en comparaison à celle présente entre 70 et 60 m de profondeur. La variation de conductivité observable (Figure 39e) n'est pas liée à une arrivée d'eau mais à des oxydes de fer qui, en présence d'oxygène, précipitent ayant ainsi une influence sur la conductivité.

Le puits F13 présente une zone de fracturation entre 70 et 60 m de profondeur avec une fracture principale identifiée à 60 m. Le puits F21 propose une fracturation entre 70 et 40 m avec des fractures principales à 42 et 50 m de profondeur.

Connectivité inter-puits

Les résultats des mesures des tests d'interférence pour le puits F26 sont donnés Figure 40. Pour les puits F13 et F21 les résultats sont donnés en annexes. Les pompages en F13 et F21 avec un suivi en F26 (Figure 40) créent de faibles variations de vitesses (observable sur les figures de variation de débit en fonction du temps) et indiquent une connexion entre ces deux puits en-dessous de 60 m de profondeur. Le pompage en F13 avec suivi en F21 indique que la zone de connexion se situe entre 57 et 67 m. Cependant, le pompage en F21 avec suivi en F13 n'induit pas de modifications des flux dans ce puits ne montrant ainsi pas de connexion. Ces deux résultats indiquent donc qu'une connexion existe entre F13 et F21 mais que l'apport de cette zone connectée lors d'un pompage en F21 reste faible en comparaison aux autres arrivées d'eau dans ce puits F21.

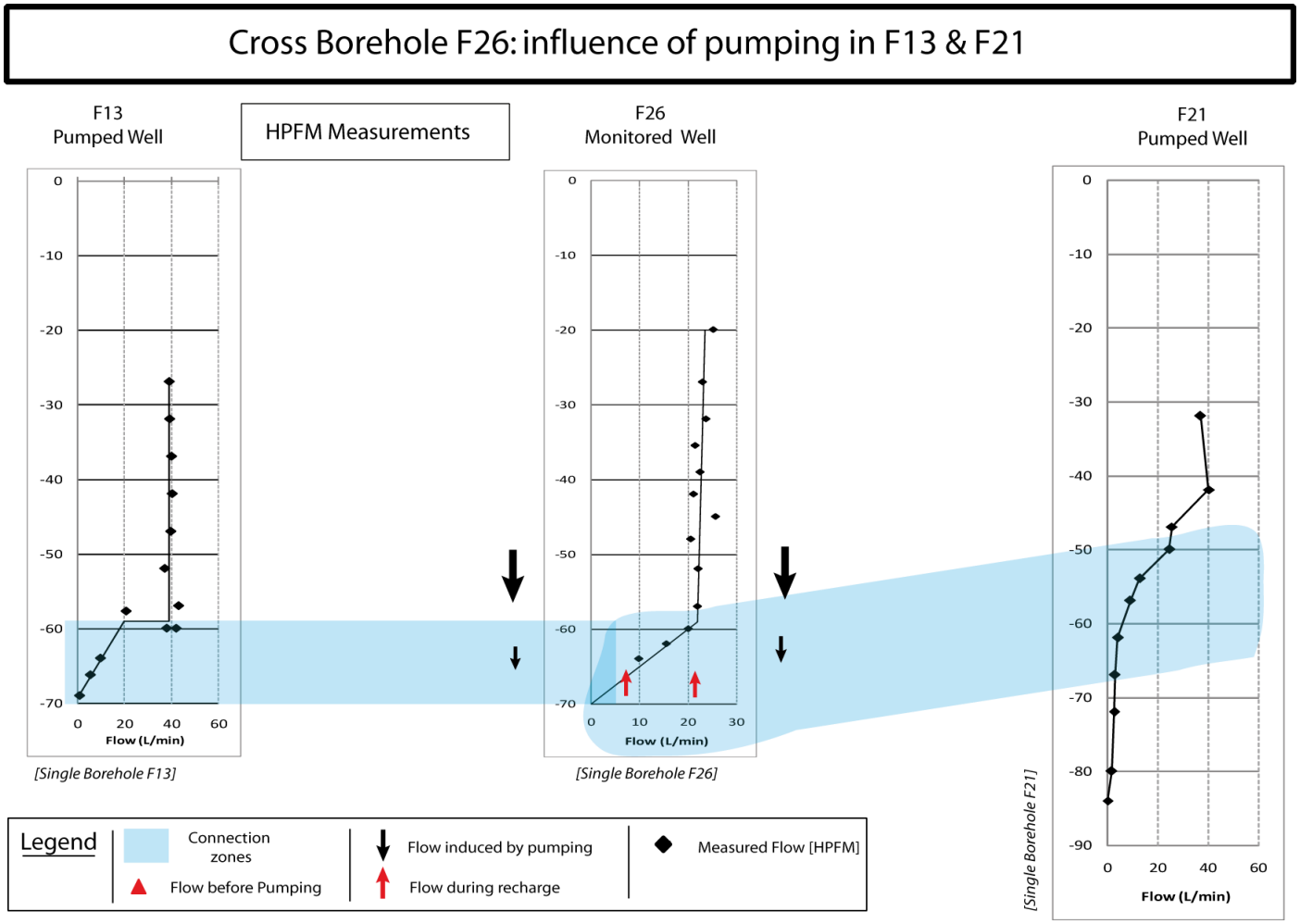


Figure 40: Identification des fractures pour chacun des puits et de la connectivité liant le puits F26 aux puits F21 et F13

Les graphiques de flux en fonction de la profondeur présentent les résultats des tests de débitmétrie en puits unique pour l'identification des zones fracturées. Les flèches donnent les variations de flux observés dans le puits F26 lors des tests d'interférence avec pompages dans les puits F21 et F13.

4. Comparaison des paramètres physico-chimiques

Des diagraphies de concentrations en oxygène, pH, T° et conductivité ont été effectuées en conditions ambiantes sur chacun des puits.

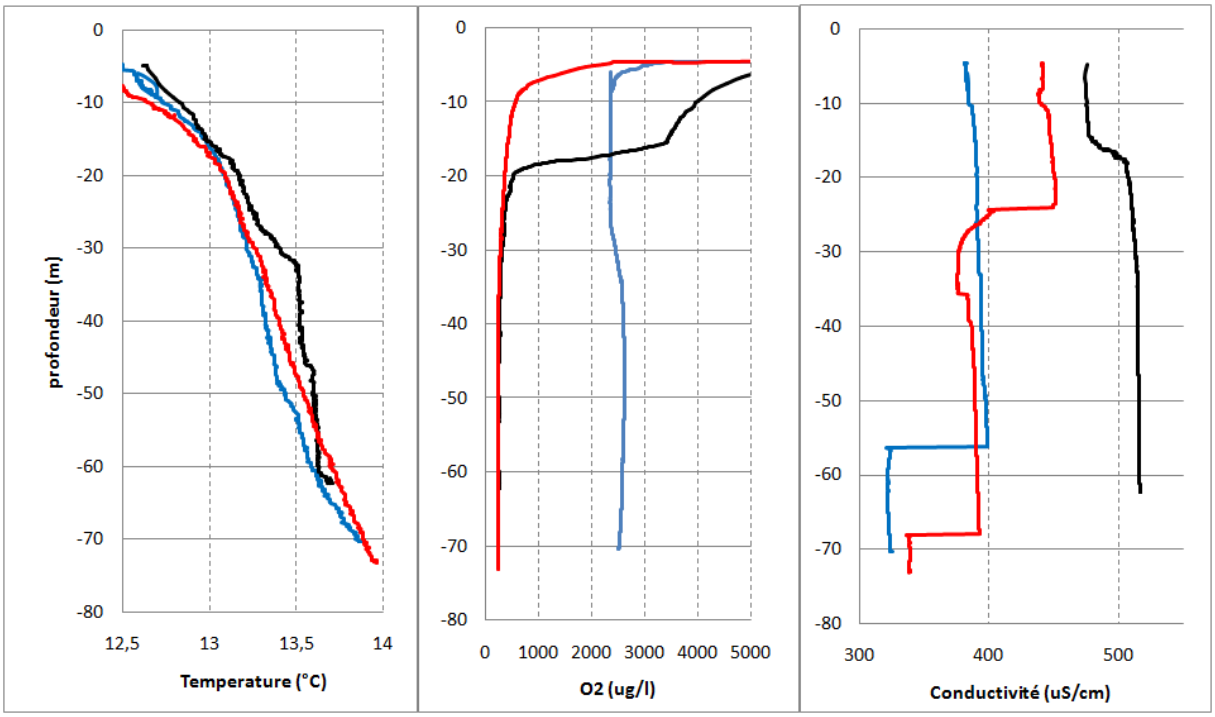


Figure 41: Profils de Température, Oxygène dissous et conductivité (F21-Bleu ; F13-Rouge ; F26-Noir)

Deux des puits, F21 et F13, ont des évolutions de température variant linéairement avec la profondeur de 0,5°C pour 30 m (inférieur au gradient géothermique moyen de 1°C tous les 33 m). La linéarité de cette évolution indique l'absence d'écoulements en conditions ambiantes. Le puits F26 présente quand à lui deux évolutions distinctes avec dans un premier temps une augmentation de la température avec la profondeur puis une augmentation plus faible de cette température avec la profondeur en-dessous de 35 m. Ce changement de gradient indique la présence d'un flux ambiant et est en accord avec la mesure observée au HPFM. La présence d'une eau plus chaude que le gradient observé sur les puits confirme la présence d'un écoulement ascendant. Dans les puits F26 et F13, l'oxygène est quasi inexistant (0,2 mg/L – limite de quantification de la sonde) alors que le puits F21 présente des concentrations en oxygène de 2,5 mg/L. Les profils de conductivité indiquent la présence de trois types d'eaux aux conductivités distinctes (320, 400 et 510 µS/cm). Des liens sont observables au niveau de la conductivité avec un lien entre F21 à 57 m et F13 à 70 m. Il est aussi possible de supposer un lien entre F13 et F26 aux alentours de 20 m sans que celui-ci ne soit réellement avéré.

5. Essai de traçage

a. Protocole

Un essai de traçage a été effectué entre les puits F21 [injection] et F13 [pompage]. Ce traçage vise à évaluer la porosité et la dispersivité entre ces puits. Une solution de traçage contenant de la fluorescéine (0,317 g dilué dans 100 L d'eau du site) a été injectée dans le puits F21. L'injection a été effectuée avec une perche d'injection (injection localisée sur 1m) équipée de concentrateurs en plastiques pour limiter l'influence des flux verticaux lors de l'injection. La profondeur d'injection est comprise entre 49,5 m et 50,5 m. Le pompage est effectué dans le puits F13 par une pompe MP1 (débit 1,95 m^3/h) située à 13 m de profondeur. Le fluorimètre est quant à lui situé à 17 m de profondeur dans le puits de pompage. Le pompage de récupération a duré près de 10 heures.

b. Interprétation

L'interprétation a été effectuée suivant les solutions 1D données dans (Leigbungut et al 2009). Maloszewski et Zuber montrent que l'équation (1) régissant le transport dans un milieu 1D peut aussi être utilisée dans le cas d'un flux radial convergent (Maloszewski and Zuber 1990).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - v \frac{\partial C}{\partial x} \tag{1}$$

La solution de cette équation dans le cas d'un écoulement radial convergent avec une injection ponctuelle est donnée par l'équation suivante :

$$C(x,t) = \frac{M}{Q} \frac{x}{\sqrt{4\pi D_L t^3}} \exp\left[\frac{(x-ct)^2}{4D_L t}\right] \tag{2}$$

<u>*Avec :*</u>

C : Concentration du traceur
x : Distance
DL : Dispersivité
T : temps
Q débit de pompage
M : masse de traceur injectée

Où *v* est défini par :

$$v = \frac{x}{t_0} \tag{3}$$

<u>*Avec :*</u>

t_0*: temps moyen d'arrivée*

La porosité peut être définie par :

$$n = \frac{Qt_0}{\pi x^2 H} \tag{4}$$

Selon les paramètres de l'essai de traçage réalisé où x = 2,94 m ; H = 10 m (épaisseur de la zone fracturée); M = 0,317 g de fluorescéine * 0,1 (pour la prise en compte de la perte dans le milieu, la courbe de masse cumulée montrant une restitution de 10%); Q = 1,95 m^3/h et t_0 = 142 min on obtient selon l'équation (4) une porosité n = 0,017 et une vitesse v = 1,24 m/h. Une valeur de porosité de 1,7% est couramment observée dans ce type de milieu où la porosité est très faible. De nombreuses études ont montré des porosité proches de 1,5% sur les sites d'Aspö (Andersson et al., 2004; Neretnieks, 2002), Mirror Lake (Shapiro, 2001) ou d'autres sites cristallins (Zhou et al., 2007). Le calage de la courbe de traçage réalisée et de la solution données équation (2) est présenté sur la figure suivante :

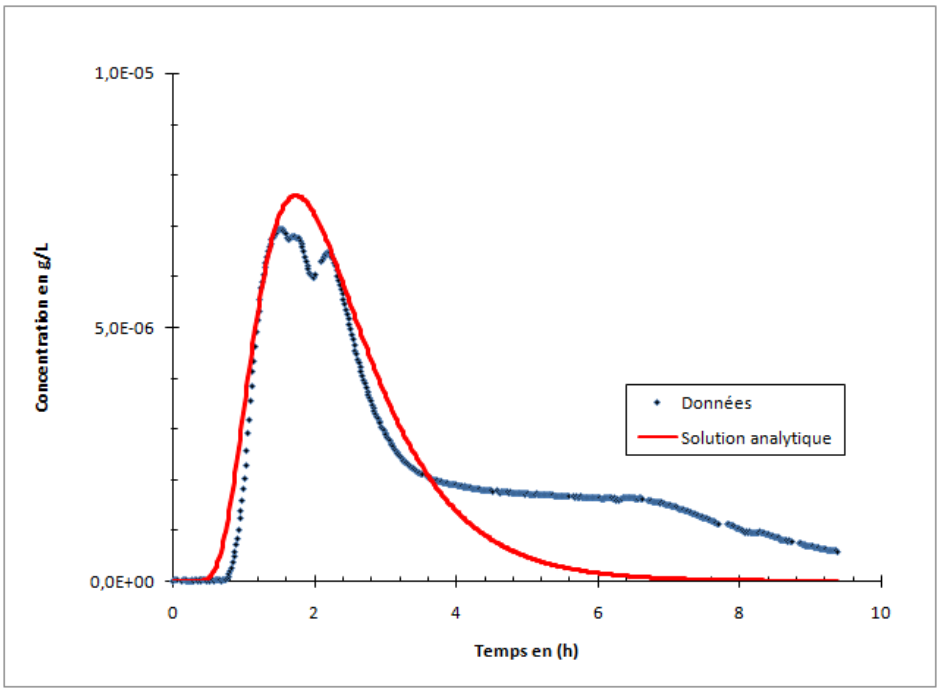


Tableau 5: Courbe de restitution du traçage et comparaison à la solution analytique

Le calage de la courbe a été effectué manuellement en faisant varier le paramètre D_L. Le calage présenté sur la figure précédente indique une dispersivité (D_L) de 38 cm. Le calage n'a été effectué que sur la première partie de la courbe. Une courbe de restitution telle que celle observée (avec une longue queue de restitution) est courante dans le cas des milieux fracturés. Cependant les solutions analytiques développées le sont dans le cadre de milieux homogènes isotropes.

6. Chimie des eaux

La chimie des eaux sur le site est suivie depuis 1991 pour le puits F13 et 1996 pour les autres forages. Les mesures régulières montrent des variations saisonnières (variation des concentrations en nitrates notamment variant de 45 à 20 mg/L dans le puits F21 et entre 0 et 10 mg/L en F13) mais aucun autre grand changement n'a été identifié. Les cations dont un exemple sera présenté chapitre 4 présentent des concentrations croissantes de Finc à F26 pour une majorité des éléments. Ceci est aussi observable au niveau des chlorures et bromures. Au contraire de la majorité des éléments on constate une forte diminution des concentrations en oxygène entre des puits en allant de Finc vers F21 puis F13 et enfin vers F26. La même tendance est observable au niveau des nitrates. Des datations des eaux ont été effectuées par l'intermédiaire des gaz CFC et SF6. Le détail du protocole de mesure et de datation est présenté dans (Ayraud et al., 2006). Ces datations ne présentent pas de différences majeures entre les puits. L'âge moyen de ces eaux ce situe autour de 30 ans. Ainsi, bien que possédant des caractéristiques différentes, ces eaux ont des âges proches.

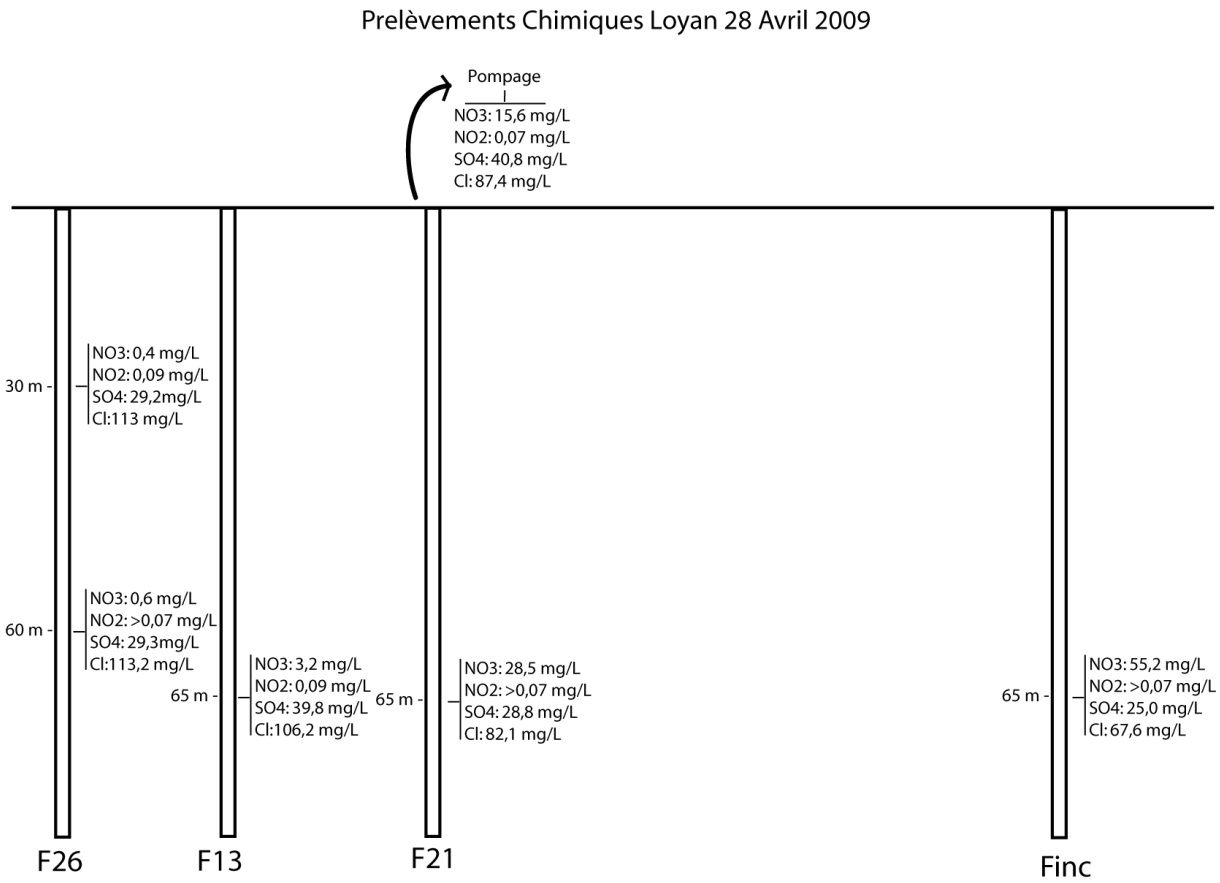


Figure 42: Chimie représentative du site de Loyan

IV. Modèle conceptuel du site de Loyan

Selon les informations obtenues nous pouvons présenter un modèle conceptuel de ce site. Ce modèle est schématisé Figure 43. D'un point de vue des écoulements, les connexions entre les trois puits principaux (F21, F13 et F26) se font au travers de zones de fracturation localisées dans les zones profondes des puits et ayant des épaisseurs d'environ 10 m. Le puits Finc ne semble en revanche (d'un point de vue des écoulements) pas connecté aux trois autres. La perméabilité entre les puits varie grandement. La perméabilité des puits est représentée sur la Figure 43 par la densité de fractures connectées (en noir avec contour rouge). Cette perméabilité décroit du puits Finc vers F26. D'un point de vue chimique, on observe une cohérence du système avec pourtant des chimies de puits très différentes. Bien que déconnecté hydrogéologiquement des autres puits, le puits Finc s'intègre parfaitement au schéma chimique d'une évolution d'un front d'oxydoréduction entre ces puits. Ainsi il semble que l'eau provenant de Finc s'appauvrit en oxygène, ainsi qu'en nitrates en se déplaçant en direction du puits F26. Ainsi ces deux éléments sont toujours présents dans le puits F21 en quantité moindre. Dans le puits F13 seuls les nitrates sont présents en faible quantité. Les concentrations en oxygène et nitrates sont nulles dans le puits F26. Une consommation de l'oxygène et des nitrates au cours du transport peut expliquer ces différences de concentration. Les puits ont des chimies globalement homogènes sur toute leur profondeur. Il semble qu'ici le front d'oxydoréduction soit principalement vertical et non horizontal. Ainsi bien que présentant une variabilité chimique importante, ces puits s'inscrivent dans une logique de zone de transition. Des mesures de vitesses de flux horizontales pourraient apporter des informations mais les vitesses en conditions ambiantes sont trop faibles pour être détectées. Cependant, si cette hypothèse peut être démontrée nous observons ainsi qu'une consommation des nitrates sur le site peut avoir lieu en une vingtaine de mètres. Cette estimation de distance ne peut actuellement pas être reliée à un temps de transfert ou à une cinétique de réaction. Ces deux éléments seront abordés par la suite.

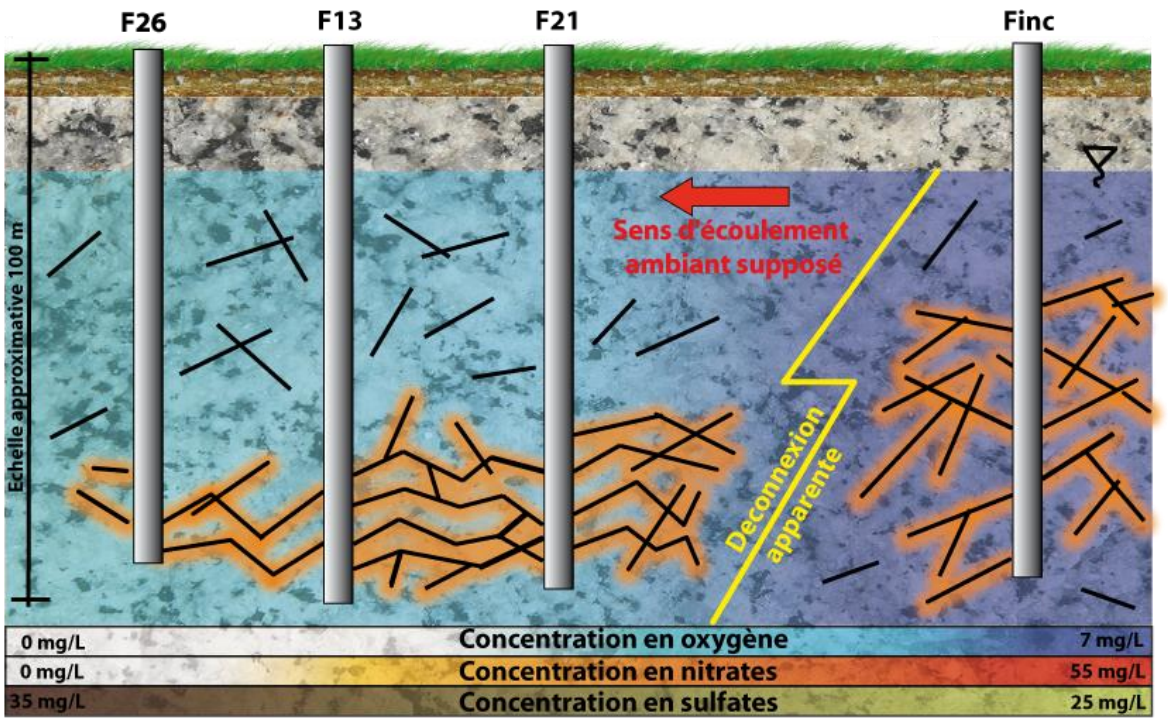


Figure 43: Modèle conceptuel du site de Loyan

Les puits sont représentés en gris. Les traits noirs représentent les fractures non connectées, les traits noirs entourés d'orange sont les fractures responsables de la connectivité entre puits qui sont les principaux acteurs de la perméabilité. La densité des fractures représentées fournit une estimation de la perméabilité. Les bandeaux colorés en bas de la figure schématisent une consommation totale de l'oxygène (passant de 7 mg/L en bleu à 0 mg/L en blanc) puis une consommation totale des nitrates (passant de 55 mg/L en rouge à 0 mg/L en blanc). Ces diminutions de concentration sont couplés à une légère hausse des sulfates (passant de 35 à 245 mg/L en vert) dont l'évolution est moins linéaire. Les échelles de cette figure sont approximatives

Chapitre 2 :
Mesure en continu in situ des concentrations en nitrates dans les eaux souterraines par spectrophotométrie

- Application aux fronts d'oxydoréduction en milieux fracturés -

I. Introduction

Dans les milieux fracturés, la forte hétérogénéité physique peut engendrer une forte variabilité chimique. La compréhension des processus d'oxydoréduction à l'échelle d'un site implique de connaitre la variabilité temporelle des éléments (liée à des variations saisonnières ou à de la réactivité), la localisation des fronts de réaction et implique d'avoir une connaissance des zones de mélanges entre des eaux de compositions chimiques différentes. Ce dernier point est crucial dans le cadre de l'étude des aquifères fracturés où ces mélanges peuvent être localisés à une fracture unique. Une vision tridimensionnelle dynamique du site est donc nécessaire pour l'évaluation d'un élément d'intérêt.

Cependant, les connaissances géochimiques à l'échelle du site sont grandement contraintes par la fréquence et la densité de prélèvements. L'obtention d'informations en hydrogéologie fait systématiquement face à un sous-échantillonnage du milieu. En effet, les surfaces accessibles (surface des piézomètres) et volumes accessibles (volumes de forages) ne représentent qu'une faible proportion du système aquifère d'étude. Les contraintes d'accès surfaciques et volumétriques de l'aquifère ne sont que très faiblement modifiables. La principale solution étant d'augmenter le nombre de forages ce qui peut induire une modification des flux dans le système d'intérêt (Boisson, 2007). Parmi les solutions alternatives, la géophysique de surface (telle que la sismique réflexion ou le potentiel spontané (Jouniaux et al., 2009)) permet un suivi spatial mais reste souvent limitée au niveau de la localisation en profondeur. Les techniques de mesures en forages permettent une connaissance plus fiable du paramètre d'intérêt en profondeur. Cependant, le matériel de forage fait face à différentes contraintes techniques telles que la taille de la sonde permettant une descente dans le forage, la transmission du signal (dépendant de la longueur de câble) et des contraintes de pression (liées à la colonne d'eau).

A l'heure actuelle, les moyens matériels permettant l'accès continu et immédiat à des concentrations en nitrates spatialement localisées en forage ne sont que très limités et un réel besoin pour ces informations existe. L'objectif de ce travail est de valider l'utilisation de sondes permettant en forage une mesure des concentrations en nitrates à la fois précise et continue tout en étant localisée spatialement. De plus dans le cadre de la réalisation in situ de traçages réactifs nous sommes à la recherche d'un appareil donnant une mesure instantanée et permettant l'utilisation de traceurs non réactifs sans altération du signal mesuré.

La première partie de ce chapitre présentera brièvement les principales méthodes de mesure des nitrates in situ. Pour plus de détails, le lecteur pourra se reporter à (Knodel et al., 2007). La seconde partie présentera les outils utilisés pour l'acquisition de données nitrates haute fréquence en forage que sont les spectrophotomètres Geovista et S::CAN. La dernière partie de ce chapitre discutera des données de terrain et les informations sur la répartition des fronts de réaction dans les aquifères fracturés.

II. Techniques et mesures des nitrates *in situ*

1. Prélèvements manuels

Le principal moyen d'obtention de données chimiques (dont les nitrates) est le prélèvement d'un échantillon d'eau par un préleveur manuel suivi d'une analyse en laboratoire. Dans ce cas, un préleveur (Figure 44) est descendu ouvert à la profondeur souhaitée puis refermé et remonté pour chaque point de mesure. Les analyses sont effectuées par la suite par chromatographie ionique dans le cas des nitrates.

Figure 44: Préleveur manuel

Ce système de mesure induit de nombreuses contraintes. La première est la densité de prélèvement. Un préleveur manuel nécessite une descente et remontée à chacun des points et donc un temps non négligeable de prélèvement pour un puits unique. La seconde contrainte est liée à la représentativité du prélèvement. La profondeur de prélèvement est uniquement donnée par la longueur du câble. De plus la réalisation de plusieurs prélèvements nécessite plusieurs allers et retours du préleveur et donc une perturbation de la colonne d'eau pouvant créer des phénomènes de mélange et modifier le front de réaction qui est un des principaux éléments d'intérêt dans le cadre de l'étude des processus d'oxydoréduction. Un autre inconvénient de ce système de prélèvement est le temps nécessaire pour l'obtention des résultats. En effet, suite à l'extraction d'un échantillon celui-ci doit être analysé en laboratoire. Ces analyses nécessitent du temps mais aussi un transport jusqu'au laboratoire et donc ne permettent pas d'avoir d'informations en direct sur site durant le temps de la mission. Ceci peut être un élément important lors de la réalisation d'essais de traçage par exemple. L'ultime inconvénient de ce système est que chaque prélèvement nécessite la présence d'un opérateur, induisant un coût supplémentaire et ne permettant pas un suivi continu de l'évolution de la chimie en un point. En revanche, ce système permet, une fois l'échantillon

extrait, d'effectuer tous types d'analyses et donc d'avoir une information globale sur la chimie de l'eau en ce point. Ce système permet en revanche d'utiliser par la suite la quasi-totalité des techniques d'analyses et donc l'obtention d'une excellente qualité de mesure pour chacun des paramètres.

2. Sondes à électrodes spécifiques (ISE)

La première famille de sonde permettant un suivi en continu et de qualité d'un paramètre est celle des sondes à électrodes spécifiques (ISE= ion specific electrode) (Capelo et al., 2007). Ce type de sonde est le plus couramment utilisé dans le cadre de suivi d'eaux naturelles in situ. Ce type d'électrodes spécifiques peut être adapté sur des sondes multi-paramètres pouvant être autonomes et permettant une acquisition aisée des données. De nombreux constructeurs, tels WTW, Hach-Lange, Ysi, Aqua, Winsitu, proposent des capteurs de ce type en autonome ou pouvant être montés sur des sondes multi-paramètres.

Ces méthodes de mesures potentiométriques sont basées sur la différence de potentiel à courant nul existant entre une électrode indicatrice et une électrode de référence. Cette méthode ne nécessite pas de consommation d'espèces chimiques. Un schéma de principe de cette méthode est donné Figure 45.

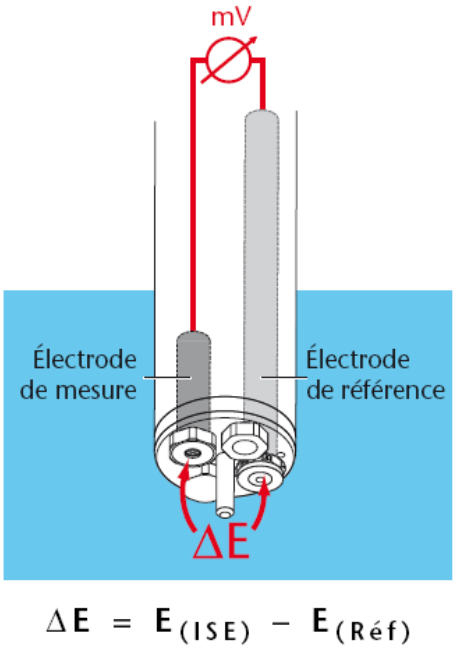


Figure 45: Schéma de principe des mesures potentiométriques (source : document WTW)

Ces sondes bien qu'efficaces ont plusieurs inconvénients. On note notamment une influence importante de la température, de la force ionique, de la matière organique et des matières en suspension. De ce fait une calibration pour chaque type de matrice d'eau est nécessaire ce qui complique la prise de mesure (Guigues et al., 2002). La présence de membranes nécessite un entretien pour des raisons de colmatage voir un changement de celles-ci à des durées d'utilisation variable. Ces sondes sont relativement peu couteuses et certaines peuvent être adaptées sur des sondes multi-paramètres (tel que la Troll 9500 de WinSitu©). Ces sondes peuvent être suffisamment compactes pour être utilisées en forage. Bien que certaines sondes puissent résister à des pressions importantes (Idronaut Nitrate Sensor pouvant être utilisée à une profondeur de 300 m pour des applications marines), peu de sondes du commerce (dans le cadre de mesures en eaux douces) ont une bonne résistance à la pression. Elles ne permettent donc pas de mesures en-dessous d'une certaine hauteur de colonne d'eau. Ce dernier élément interdit donc leur utilisation comme matériel de mesures en forage dans de nombreux cas.

3. Spectrophotomètres

Le dernier type de sonde utilisable en forage est le spectrophotomètre. Le principe de mesure est la spectrométrie dans UV-Visible (200 à 750 nm). Les substances contenues dans l'eau sont mesurées par une atténuation du faisceau lumineux dans le milieu. Le faisceau est émis par une lampe et son atténuation est mesurée. Chaque substance dissoute absorbe la lumière à certaines longueurs d'ondes connues (entre 200 et 250 nm pour les nitrates). Plus une substance est présente en forte concentration, plus l'atténuation de la lumière à une certaine longueur d'onde sera importante. L'extinction ou l'absorption est valable pour deux ratios d'intensité lumineuse : l'intensité de la lumière après que le faisceau ait traversé le milieu à mesurer et l'intensité de la lumière déterminée après que le faisceau soit passé à travers un milieu de référence (eau distillée). Il existe une augmentation linéaire de l'absorption avec une augmentation de la concentration.

Les spectrophotomètres sont utilisés en laboratoire depuis plus de 40 ans mais leurs applications in situ sont plus rares. D'importants efforts sont actuellement déployés pour appliquer ce type d'instruments pour des mesures de nitrates, bromures et bi-sulfite en milieux marins (Johnson and Coletti, 2002). Actuellement, quelques entreprises proposent des spectrophotomètres (NitraVis chez WTW ; Hach lange) mais ces outils ne résistent pas à des pressions supérieures à 1bar. Pour combler ce manque l'entreprise Geovista (matériel de

diagraphie) a développé une sonde de mesure en forage spécifique. La société S::CAN (mesure de paramètres chimiques par spectrophotométrie pour applications industrielles) propose un spectrophotomètre résistant à une pression de 10 bars. Nous avons donc testé ces deux outils afin d'évaluer leur potentielle d'application en forage.

III. Présentation des sondes utilisées

1. Geovista nitrate probe

Ce premier outil a été développé par l'entreprise Geovista spécialisée dans le développement d'outils de diagraphies en forages. Cette sonde permet la mesure des nitrates et du carbone organique dissous en mesurant l'atténuation de la lumière UV à des longueurs d'onde spécifiques. La source lumineuse utilisée est une lampe au deutérium qui produit une lumière entre 200 et 400 nm. Il a été montré que la présence de carbone organique dissous atténue la lumière à la même longueur d'onde que les nitrates (Edwards et al., 2001). Pour cette raison une autre longueur d'onde est utilisée pour la mesure du carbone organique dissous, permettant ainsi une correction du signal nitrates. Les longueurs d'onde utilisées sont 203 et 220 nm ce qui permet une mesure sur une gamme allant de 0 à 100 mg/L NO_3^-.

La sonde mesure l'intensité d'illumination (*I*) qui est calibrée en nano-ampères. Pour déterminer la concentration en nitrates en mg/L une fonction logarithmique est utilisée.

$$Log([NO3]) = a_0 + a_1 * I + a_2 * I^2 + a_3 * I^3$$

Les coefficients *a* sont déterminés après calibration de la sonde.

Les principaux intérêts de cette sonde, en raison de son développement par une entreprise de diagraphie, sont :

- Une compatibilité avec les autres outils produits par le groupe (gamma-ray, température, conductivité…). Ce qui permet de monter plusieurs appareils sur le même train de sonde et donc d'effectuer plusieurs diagraphies lors d'un même passage.
- Une résistance à la pression de 150 bars.
- Cette sonde peut être montée sur un treuil automatique permettant une utilisation facile sur le terrain

- Les données peuvent être facilement traitées via le logiciel WellCAD couramment utilisé en diagraphies.
- Cette sonde permet des mesures hautes fréquences (1Hz) permettant des vitesses de descente ou remonté rapides en forage, engendrant un gain de temps non négligeable.

Une photographie de la sonde est présentée Figure 46. La sonde est composée d'un corps de sonde comportant la lampe et l'alimentation électrique. Les mesures sont effectuées au travers de la petite fenêtre de mesure localisée sur la photographie suivante.

Figure 46: Sonde nitrate Geovita. a) Sonde, b) mise en place de la sonde

2. Sonde S ::CAN Spectrolyser

Le spectrophotomètre S::CAN mesure l'absorption de la lumière à 256 longueurs d'ondes, dans l'UV et le visible. Il est composé de trois éléments principaux : l'émetteur, la cellule de mesure et le récepteur (Figure 47 et Figure 48). L'émetteur est la source de lumière qui est composée d'une lampe à flash au xénon complétée par un système de guide optique du faisceau lumineux.

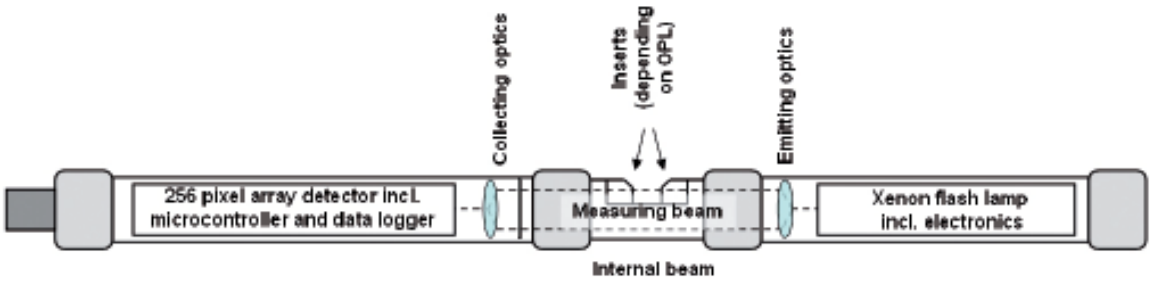


Figure 47: Schéma de la sonde S::CAN

1. *Beaming part (Xenon flash lamp with electronic)*
2. *Measuring path*
3. *Receiving part (detector with electronic)*
4. *Cable gland*
5. *Probe's cable*
6. *Probe's connector (Mil plug)*

Figure 48: Sonde S::CAN

Dans la section de mesure (Figure 49), la lumière passe au travers un espace rempli de l'échantillon situé entre deux fenêtres de mesure. Une seconde source de lumière (faisceau de compensation) est quant à elle guidée au sein de l'appareil.

Figure 49: Fenêtre de mesure du spectrophotomètre S::CAN

Ce système permet de compenser automatiquement les altérations du signal (ex: problèmes liés à l'intensité du faisceau lumineux lié à la lampe). La cellule de réception est située du côté de l'appareil relié au câble. La lumière reçue par le récepteur est divisée selon les

longueurs d'onde et guidée vers les 256 photodiodes fixes. La mesure de 256 longueurs d'onde permet l'obtention d'un spectre complet et donc l'obtention de nombreuses informations. Une présentation du spectre obtenu apparaît Figure 50.

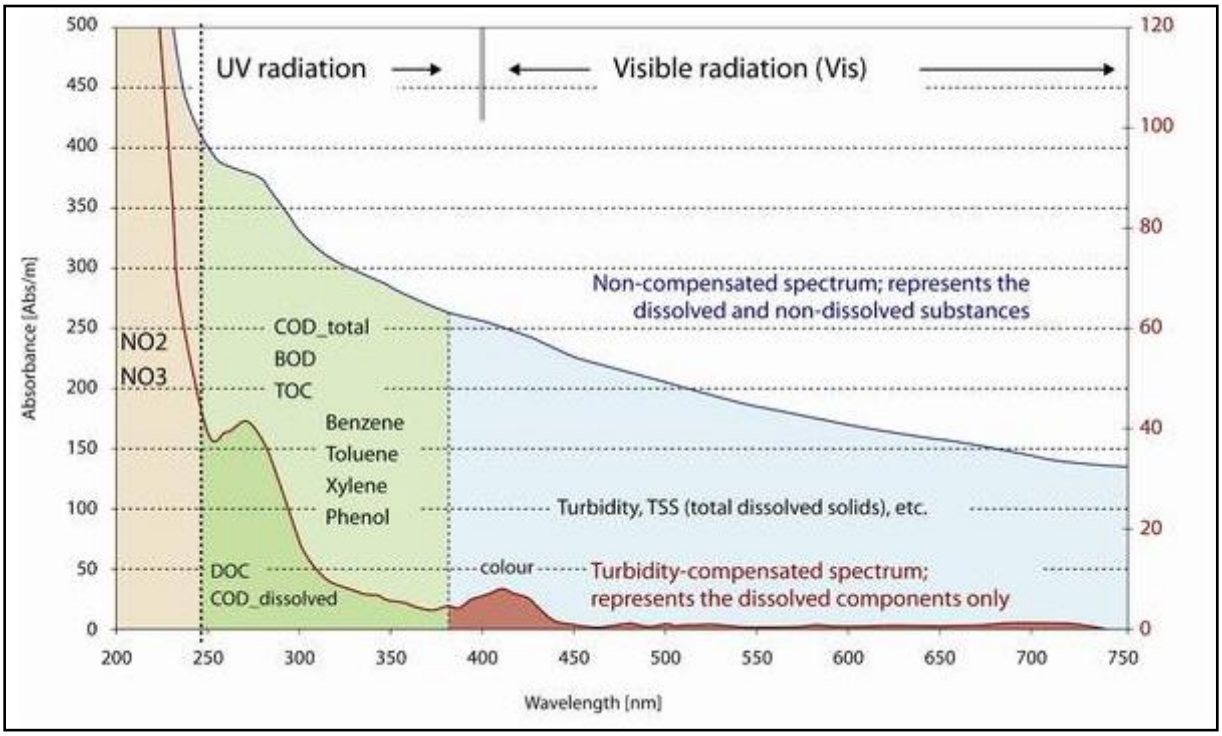


Figure 50: Spectre acquis avec la sonde S::CAN

Par traitement de ce signal, cette sonde permet l'obtention de données telles que les concentrations en nitrates, nitrites, carbone organique, couleur, turbidité…L'obtention de chacun de ces éléments nécessite un algorithme de traitement particulier. De nouveaux algorithmes sont en cours de développement pour un accès à d'autres paramètres. Différents articles discutent les utilisations de cette sonde (Van der Broeke et al., 2006). Plus de précisions sur les améliorations possibles liées au retraitement des spectres d'adsorption sont données dans (Torres and Bertrand-Krajewski, 2006).

Pour nos applications une sonde spécifique a été développée. Celle-ci a une résistance à la pression de 10 bars et possède un capteur de pression permettant l'obtention en continu de la profondeur de mesure. Elle est aussi équipée d'un capteur de température. Cette sonde couramment utilisée dans le cadre de suivis de stations d'épuration peut de plus être reliée à un compresseur permettant un nettoyage de la cellule de mesure afin de laisser la sonde en continu en un point fixe avec un nettoyage régulier sans déplacement du matériel. Cette sonde nécessite d'être alimentée électriquement ce qui impose une mesure à proximité d'un

branchement électrique ou le recours à un groupe électrogène. La fréquence de mesure est de 15 secondes, ce qui, en comparaison à la sonde Geovista induit un temps de réalisation plus important pour une diagraphie à densité de mesure identique. La sonde utilisée a une gamme de mesure de nitrates allant de 0 à 80 mg/L. Une gamme plus large peut être obtenue en raccourcissant le chemin optique présenté Figure 49. Pour son utilisation en forage la sonde a été équipée d'un centreur et de renforts de câble pour plus de sécurité.

IV. Validation en laboratoire des mesures de la sonde S::CAN

La sonde S::CAN nécessite une validation de ses capacités de mesures.

1. Calibration eau milliQ

Le premier test réalisé a été de vérifier la calibration "standard" de la sonde. Une courbe d'étalonnage a été effectuée sur la gamme de mesure de la sonde (de 0 à 80 mg/L). La courbe comprenait 10 solutions de concentrations : 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 45 mg/L, 60mg/L et 80 mg/L réalisées dans de l'eau MilliQ. Les dilutions ont été vérifiées par pesées et pour 4 points par chromatographie. Les échantillons sont placés dans le by-pass fourni avec la sonde. Les données mesurées avec la sonde en azote (mg/L-NO_3^-N) sont recalculées en mg/L-NO_3^- (correspondance par un facteur 4,426) et sont comparées sur la Figure 51. On observe sur ce graphique une très nette différence avec les concentrations mesurées, provenant d'une mauvaise calibration initiale pour ce type de milieu. Une nouvelle courbe de calibration a été réalisée dans le logiciel ana::pro fourni avec la sonde et a été utilisée pour une nouvelle série de mesures. Les résultats sont fournis sur le même graphique Figure 51.

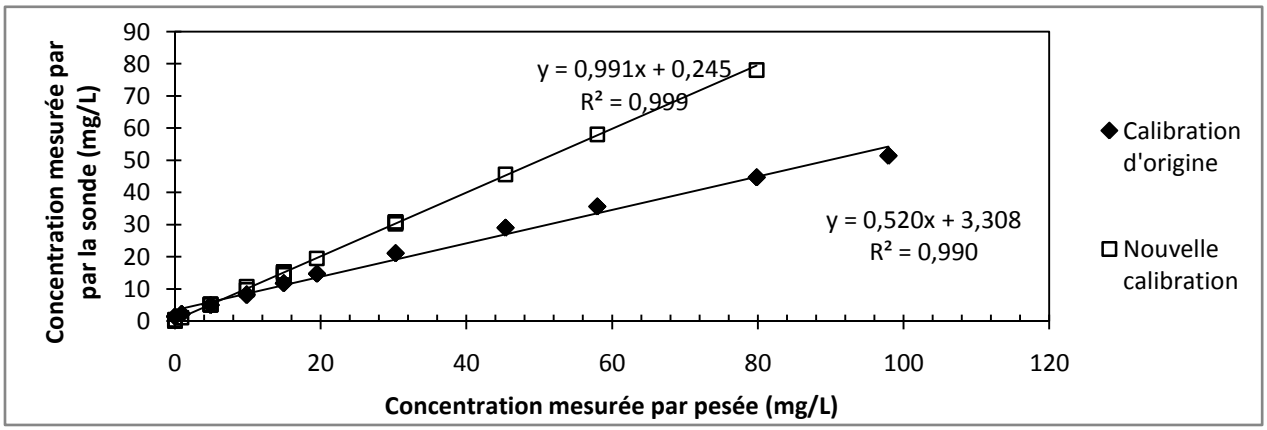


Figure 51: Comparaison des concentrations réelles et mesurées par la sonde

Les écarts mesurés avec la nouvelle calibration sont toujours inférieurs à 1 mg/L (sauf pour la solution à 79,8 mg/L en limite de gamme où l'écart est de 1,7 mg/l). Le pourcentage d'erreur est toujours inférieur à 6% (inférieur à 2% pour les valeurs supérieures à 5 mg/L). Ces mesures montrent une très bonne qualité des mesures et une bonne reproductibilité lors des mesures dans de l'eau MilliQ. Les mesures de carbone inorganique montrent une augmentation de celui-ci (de 0,4 à 2 mg/L) en lien avec la concentration de nitrates malgré son absence théorique. Ceci montre que les fortes concentrations en nitrates induisent une surestimation des concentrations en carbone organique.

2. Calibration avec de l'eau de forage (F26)

a. Mesure des concentrations

Un test visant à évaluer la qualité de mesure en conditions in situ a été conduit avec de l'eau du forage F26. L'eau de ce forage a été choisie en raison de sa turbidité et de la présence de fer pouvant avoir une influence sur le signal. L'eau de ce forage ne contient pas initialement de nitrates. Comme précédemment 10 solutions de concentration 0,8 mg/l, 5mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 45 mg/L, 60mg/L, 80 mg/L ont été réalisées. La correspondance entre les mesures de la sonde et les mesures de concentration par pesées est donnée sur la Figure 52 suivante.

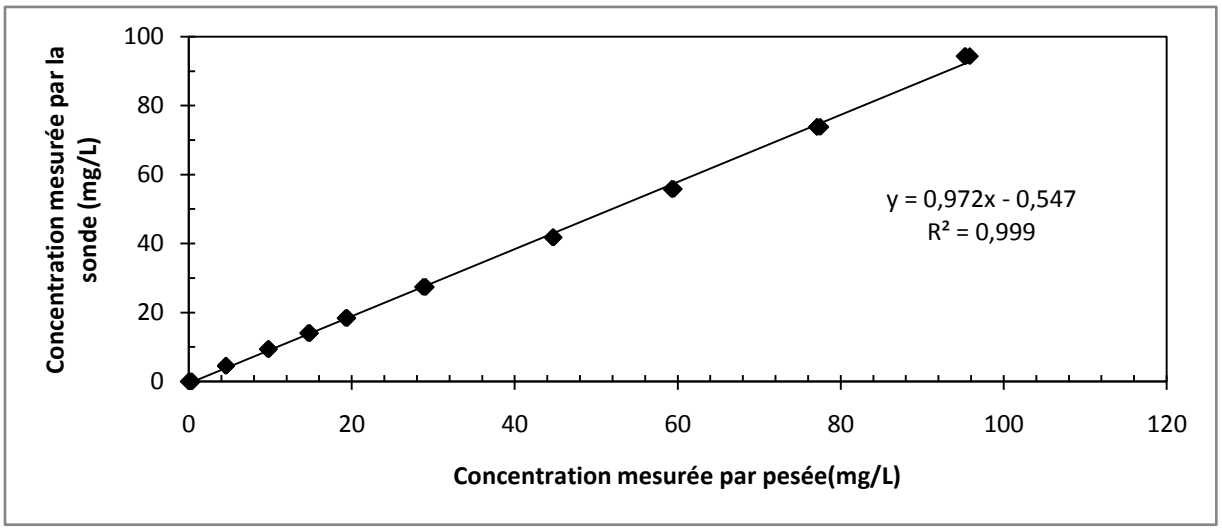


Figure 52: Comparaison des concentrations mesurées par la sonde et par pesée avec de l'eau de F26

La correspondance entre les mesures est bonne. Elle montre ainsi que la sonde est capable de mesures précises sans nouvelle calibration des concentrations en nitrates dans des eaux possédant une matrice très différente de l'eau milliQ précédemment utilisée.

b. Comparaison des spectres d'absorption

Les résultats étant quasi-identiques entre les solutions de concentrations identiques et de matrice différente, on peut comparer les spectres pour les deux types d'eau (Figure 53). On remarque que malgré les nettes différences au niveau des spectres, le signal nitrates est correctement interprété.

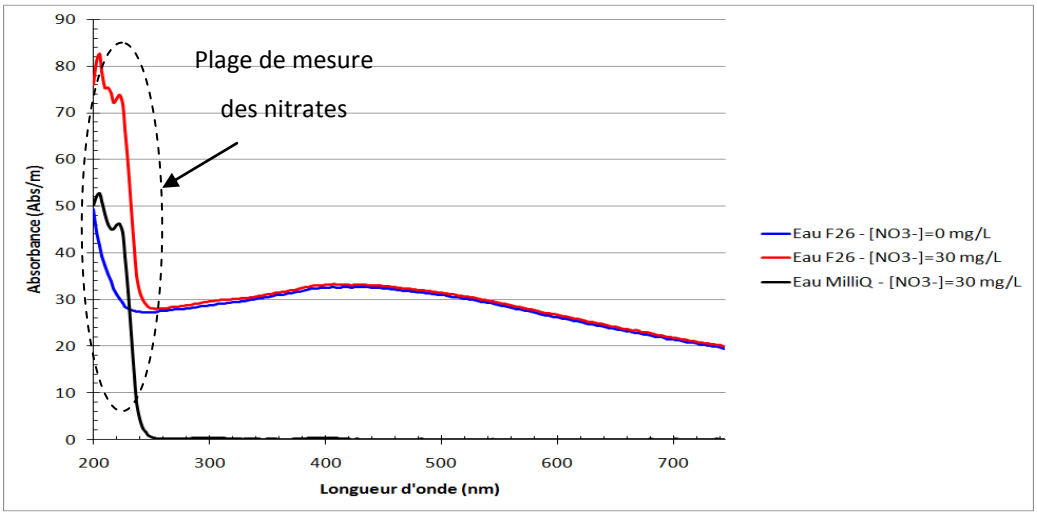


Figure 53: Comparaison des spectres entre différentes eaux

Dans le cas de l'eau provenant de F26 la présence de turbidité induit une absorbance sur la totalité du spectre.

3. Influence d'autres paramètres

Les principaux éléments connus pour avoir une influence possible sur la qualité de la mesure en nitrates sont les matières en suspension (MES) et le carbone organique (TOC). De plus, cette sonde étant destinée à être utilisée dans le cadre de traçages réactifs, il est nécessaire de connaitre la possible influence de différents traceurs non réactifs et d'autres éléments sur le signal nitrates.

a. Influence des matières en suspension

Des tests de fiabilité de mesure de la sonde en fonction de la concentration de matières en suspension dans l'eau ont été réalisés. Les particules utilisées proviennent du broyage de leucogranite et ont une granulométrie inférieure à 100µm. Quatre solutions, dont l'évaluation des concentrations a été effectuée par pesées, sont utilisées:

- Solution d'eau MilliQ (Solution 0)
- Une solution de nitrates (45,88 mg/L) et eau MilliQ (Solution 1)
- Une solution de nitrates (45,88 mg/L) et eau MilliQ et concentration en particules (0,67 g/L) (Solution 2) (visibilité ~ 20 cm)
- Une solution de nitrates (45,88 mg/L) et eau MilliQ et concentration en particules (1,22 g/L) (Solution 3) (visibilité ~ 5 cm)
- Une solution de nitrates (45,88 mg/L) et eau MilliQ et concentration en particules (3,38 g/L) (Solution 4) (visibilité ~ 1,5 cm)

La Figure 54 montre la concentration de chaque élément en fonction de la solution :

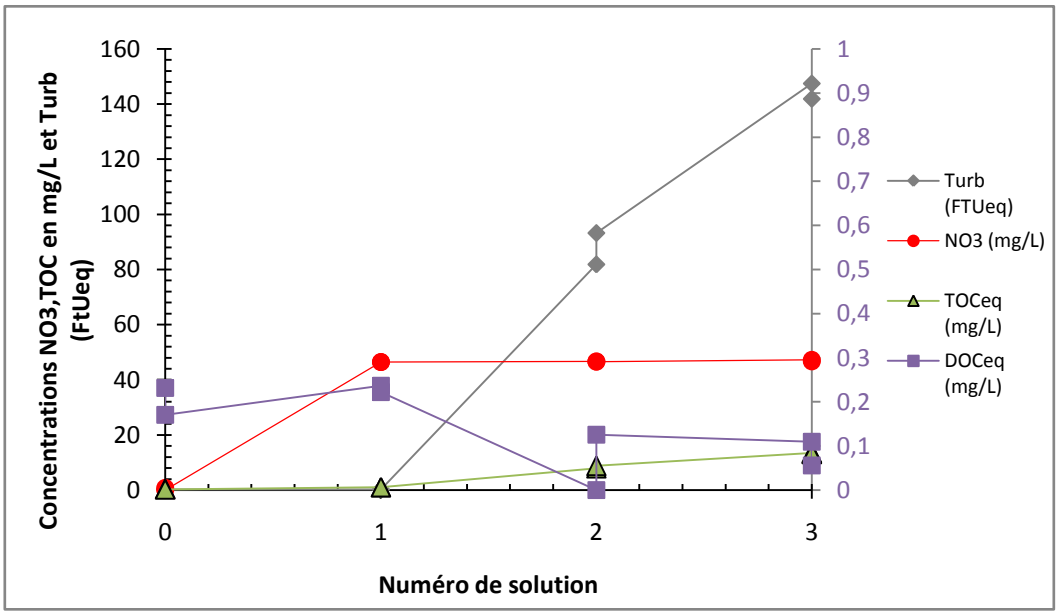


Figure 54: Evolution des concentrations sous l'influence de matières en suspension ; Turbidité ; Nitrates; TOC sont présentés sur l'axe de gauche et le DOC est présenté sur l'axe de droite.

Les spectres d'absorption sont présentés sur la Figure 55:

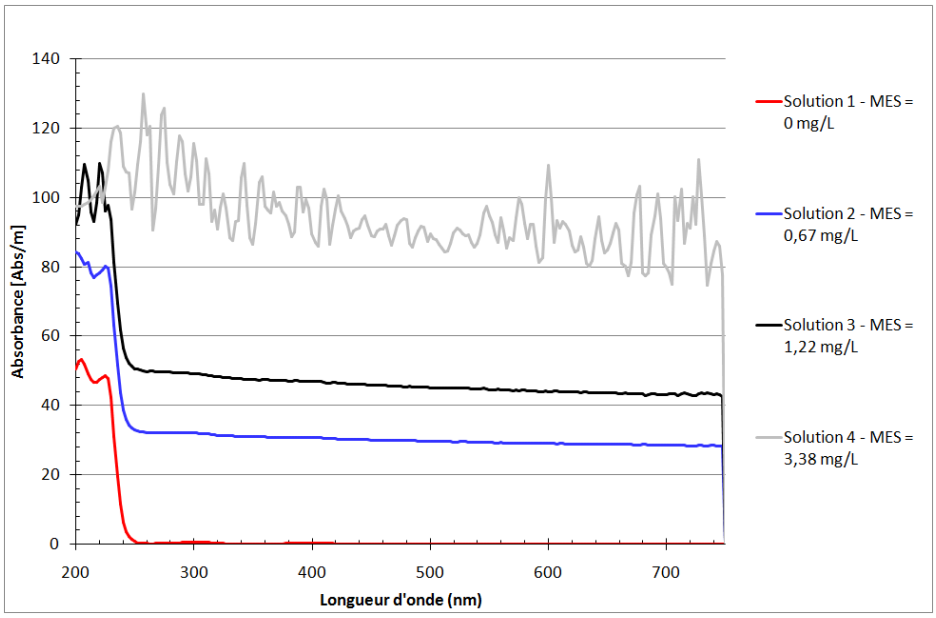


Figure 55: Spectre enregistré pour différents niveaux de turbidité ; Toutes les solutions ont la même concentration en nitrates.

Cette figure montre que malgré des spectres d'absorption très différents, la sonde est capable d'une très bonne fiabilité de la mesure sur une certaine gamme de turbidité. Toutes les concentrations de nitrates mesurées sont à 2% près celles définies par pesées. La dernière solution est hors de la gamme de mesure. Si cette gamme est dépassée, la sonde ne mesure plus et donc ne fournit pas de données erronées. La sonde semble donc adaptée pour les mesures en forages ou les turbidités sont en général inférieures à celles testées ici.

b. Influence de la concentration en carbone organique

Le carbone organique a des propriétés d'absorption proches de celles des nitrates (Edwards et al., 2001). La présence de carbone organique dans les eaux peut donc avoir une influence sur le signal en nitrates mesuré par la sonde. Les concentrations en carbone organique sont obtenues grâce à du phtalate de potassium couramment utilisé comme standard de calibration.

6 solutions ont été testées :

- Solution 0 : Eau MilliQ
- Solution 1 : [NO_3^-] = 50,0 mg/L ; [TOC]=0 mg/L
- Solution 2: [NO_3^-] = 40,0 mg/L ; [TOC]= 1,1 mg/L
- Solution 3 : [NO_3^-] = 49,6 mg/L ; [TOC]= 4,8 mg/L
- Solution 4 : [NO_3^-] = 49,1 mg/L ; [TOC]= 9,5 mg/L

- Solution 5 : [NO_3^-] = 47,7 mg/L ; [TOC]= 24,0 mg/L

Les concentrations mesurées par la sonde, par chromatographie et par analyse de carbone sont comparées aux concentrations définies par pesées (Figure 56). La solution 5 n'a pas pu être mesurée (indication de valeurs hors gamme par la sonde). La sonde indique aussi que la mesure des nitrates dans la solution 4 est hors de la gamme de fiabilité de mesure.

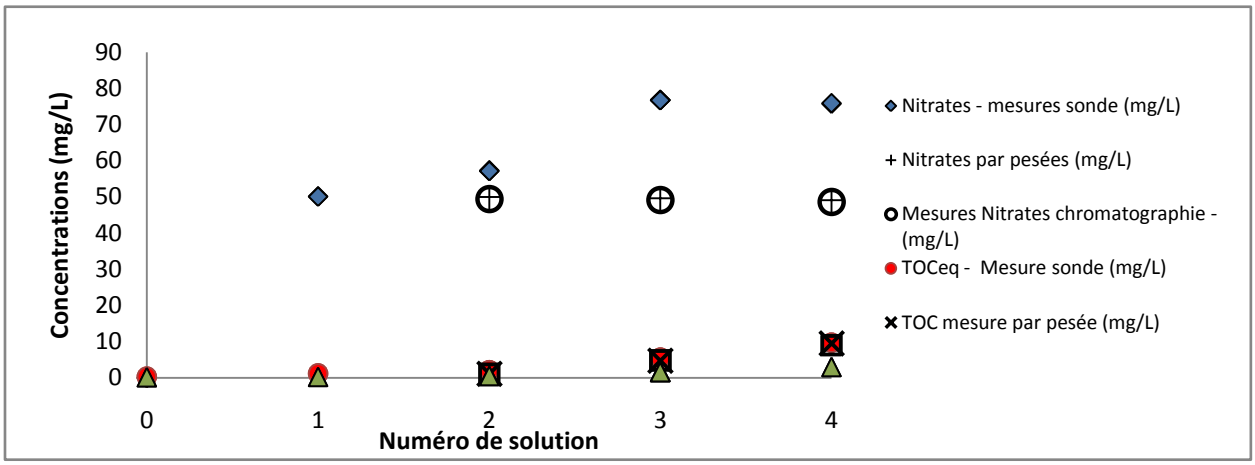


Figure 56: Concentration en nitrates et carbone organique total dans les solutions testées

Ces tests montrent une forte influence de la concentration en TOC sur la mesure en nitrates et ce dès 1ppm de TOC. Les mesures de concentration en TOC par la sonde sont bonnes malgré le fait qu'aucune nouvelle calibration n'ait été effectuée. Les spectres d'absorption sont présentés Figure 57:

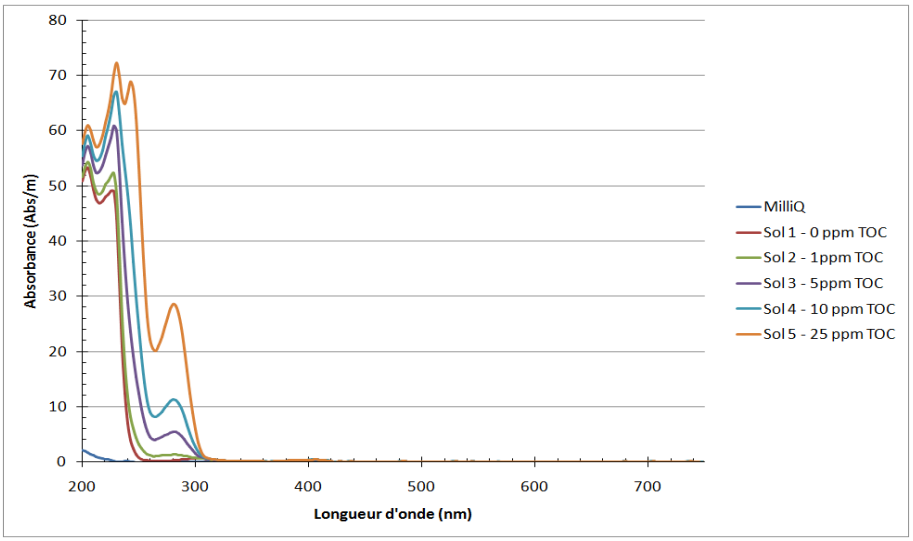


Figure 57: Spectres d'absorption lors des tests TOC

c. Influence du bromure de potassium KBr

Cette sonde devant être utilisée dans le cadre d'essais de traçages, l'influence possible du bromure de potassium (un des principaux traceurs salins) a été testée. Une comparaison du signal nitrate est effectuée dans de l'eau distillée entre une solution d'eau MilliQ contenant 45 mg/L de NO_3^- (solution 1) ; une solution d'eau milliQ contenant 45 mg/L de NO_3^- et 100 mg/L de KBr (solution 2) et une solution contenant 45 mg/L de NO_3^- et 200 mg/L de Br^- (solution 3). La courbe de calibration utilisée est la même que précédemment. La première solution est la solution 6 de la première partie et contient de 45,4 à 44,5 mg/L de NO_3^-.

La comparaison des spectres d'absorption montre une faible différence liée à la présence de bromure de potassium à des longueurs d'ondes de 300 et 400 nm qui n'ont pas d'influence sur la concentration en nitrates mesurée. L'ajout de bromure de potassium ne modifie donc pas les profils d'absorption. Le bromure de potassium peut donc être utilisé comme traceur non réactif conjointement aux nitrates avec cette sonde.

d. Influence d'autres colorants

Cas de la fluorescéine :

La fluorescéine a une forte influence sur le signal nitrate (non testée ici mais observée lors d'une visite au Cemagref). Ce type d'influence doit être identique pour tous types de traceurs fluorescents car ils présentent tous un signal dans l'UV servant pour la mesure des nitrates (malgré une légère différence de longueur d'onde principale pour chacun des traceurs).

Cas d'un traceur coloré :

Un traceur coloré (n'ayant pas d'absorption dans l'UV) ne devrait pas avoir d'influence sur la qualité du signal (non testé).

4. Conclusions sur la sonde

Selon ces tests cette sonde semble adaptée à la mesure de nitrates en forages. Les principaux points sont :

- La sonde S::CAN permet une mesure précise, répétable et reproductible des concentrations en nitrates
- La gamme de mesure nitrates est de 0 à 80 mg/L

- Une calibration globale semble suffisante dans une majorité de situations
- Une calibration linéaire ou polynomiale peut être utilisée en cas de nécessité
- L'influence des MES est négligeable sur la gamme pouvant être observée en forages
- Les signaux en TOC et DOC semblent moins fiables et peuvent être influencés par des concentrations en nitrates élevées (la calibration en TOC n'a pas été effectuée)
- Une forte concentration en TOC a une influence importante sur le signal nitrate
- Une forte concentration en nitrates a une influence importante sur le signal TOC
- Cette sonde peut être utilisée dans le cadre d'essais de traçages avec du KBr comme traceur non réactif (la détection maximale de 80 mg/L peut être problématique et nécessiterait des prélèvements)
- Cette sonde n'est pas utilisable conjointement à de la fluorescéine
- Les concentrations aberrantes ou hors gamme sont signalées lors de l'utilisation
- Les mesures dans des eaux contenant à la fois des nitrates et du carbone organique peuvent être problématiques
- La détection d'autres éléments peut être ajoutée sur commande (ajout de nouveaux algorithmes de traitement du signal)
- L'utilisation in situ contrainte par la fréquence de mesure (15 s), l'alimentation électrique et la nécessité de dérouler l'intégralité du câble avant utilisation.

V. Utilisation in situ des sondes

1. Sonde Geovista

Diverses diagraphies ont été réalisées avec cette sonde dans différents piézomètres du site de Ploemeur. Le détail des diagraphies réalisées est donné dans le Tableau 6.

		Type de diagraphies				Prélèvements chimiques		Pompage
Forage	**Profondeurs**	**Nitrates**	**Flux**	**Gamma Ray**	**Conductivité**	**Préleveur**	**sortie**	
F28	24,01 à 85,01m	x	x			x		Sans
SC39	25 à 80 m	x	x		x	x	x	Avec/Sans
MF1	19 à 24 m	x	x			x		Sans
F34	23 à 100 m	x	x	x		x		Sans
F38	23 à 146 m	x		x	x	x		Sans
F26	10 à 26 m	x	x			x	x	Avec/Sans
F21	10 à 89 m	x	x			x	x	Avec/Sans
B3	10 à 85 m	x				x	x	Avec/Sans

Tableau 6: Détails des diagraphies réalisées avec la sonde Geovista

Pour des raisons de synthèse seules deux diagraphies seront présentées Figure 58 (a et b), celle du forage F28 et celle du forage F26. La diagraphie du forage F28, situé sur le site d'AEP de la ville, a été réalisée pendant un pompage induisant des flux dans ce forage. Les écoulements verticaux ont été mesurés avec un débitmètre à impulsion de chaleur (HPFM).

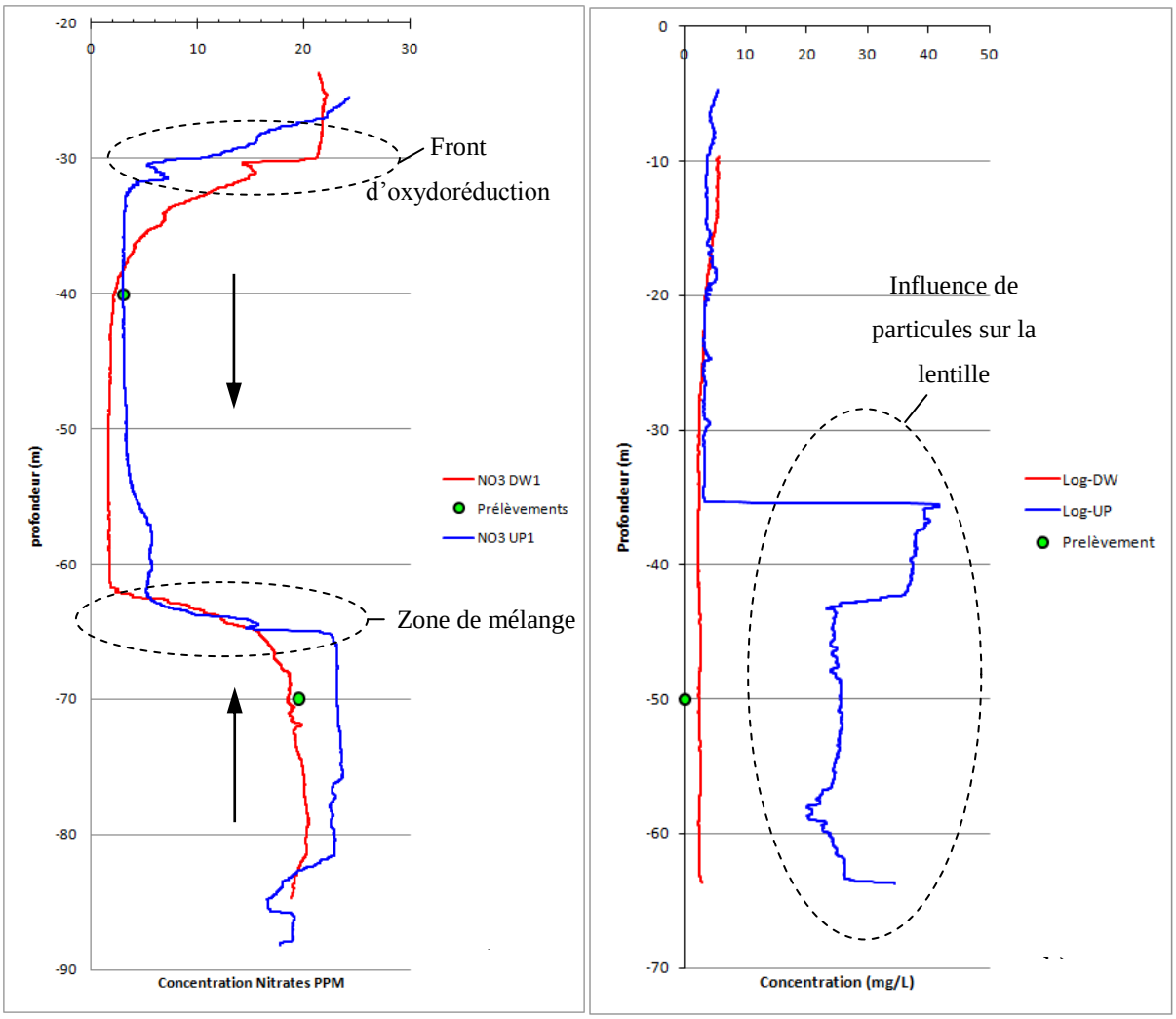


Figure 58: Diagraphies nitrates sonde Geovista; a) Forage F28; b) Forage F26

La Figure 58 présente deux diagraphies nitrates réalisées à l'aide de la sonde Geovista. La première provenant du forage F28 situé sur le site de pompage de Ploemeur indique deux zones aux concentrations en nitrates différentes. Les deux courbes représentent la concentration mesurée en descente de la sonde (rouge) et en remontée (bleu). Les points verts indiquent les concentrations mesurées par chromatographie ionique après prélèvement manuel. On remarque une bonne corrélation entre la remontée et la descente ainsi qu'avec les points de mesure par chromatographie. Trois zones sont observables. Une première au-dessus

de 30 m de profondeur avec une concentration en nitrates de 20 mg/L, une seconde à 30 m, où une forte baisse de la concentration des nitrates indique la présence d'un front d'oxydoréduction et une troisième après 64 m où une nouvelle hausse de la concentration est observable. Cette diagraphie ayant été couplée avec des données de HPFM (heat pulse flow meter) permettant de définir les sens et vitesses verticales d'écoulement (symbolisés par les flèches sur la figure) indique que cette deuxième variation est liée à un mélange en raison d'une fracture à 64 m. Cette première diagraphie montre une bonne précision de la sonde qui permet d'identifier le front d'oxydoréduction ainsi que de mesurer de manière précise un mélange entre deux pôles. Sur la totalité de la colonne d'eau la concentration en carbone est surestimée. Sur la seconde Figure 58b la diagraphie réalisée en descente (en rouge) montre peu de variations et indique une concentration en nitrates trop élevée (3mg/L au lieu de 0,1 mg/L par chromatographie ionique). Le signal de remontée (en bleu) indique un comportement très différent avec un changement brusque à 35 m de profondeur. Ce changement (ainsi que toute zone où la concentration est supérieure à 5 mg/L) est un artefact lié à la présence de particules sur la lentille de mesure (observable une fois la sonde remontée). De même la surestimation de la concentration est liée à la présence de turbidité changeant la concentration mesurée en nitrates. Cette surestimation est aussi observable au niveau du carbone organique où une concentration de 12 mg/L est mesurée alors que celle-ci est nulle selon les analyses de laboratoire.

Ces résultats montrent dans un premier temps que la sonde permet une mesure précise des concentrations en nitrates dans les eaux souterraines, mais que certaines conditions limitent son utilisation. En effet, la présence de turbidité induit une dérive de la mesure en nitrates rendant l'interprétation du signal difficile. L'utilisation de cette sonde est donc limitée à des milieux dont la turbidité est très faible avec peu de particules en suspension. Ce problème est aussi observable sur le signal en carbone organique dissous mesuré. Cette sonde a été utilisée sans centreur ce qui a pu induire lors de la descente de l'appareil des frottements aux parois pouvant détacher des particules et avoir une influence sur la qualité de la mesure.

2. Spectrolyser S::CAN

Les capacités de mesure de cette sonde ont été testées sur les sites de Beaulieu (35) et Loyan (56). Pour des raisons de synthèse, seules les diagraphies effectuées sur le site de Loyan sont

présentées ici. De plus cette sonde a été utilisée dans le cadre d'un essai de push-pull réactif sur le site de Loyan. Les résultats de ce push-pull seront présentés dans le chapitre suivant.

Des diagraphies nitrates et oxygènes ont été réalisées sur les piézomètres F21, F13 et F26 du site de Loyan. Les profils sont donnés Figure 59.

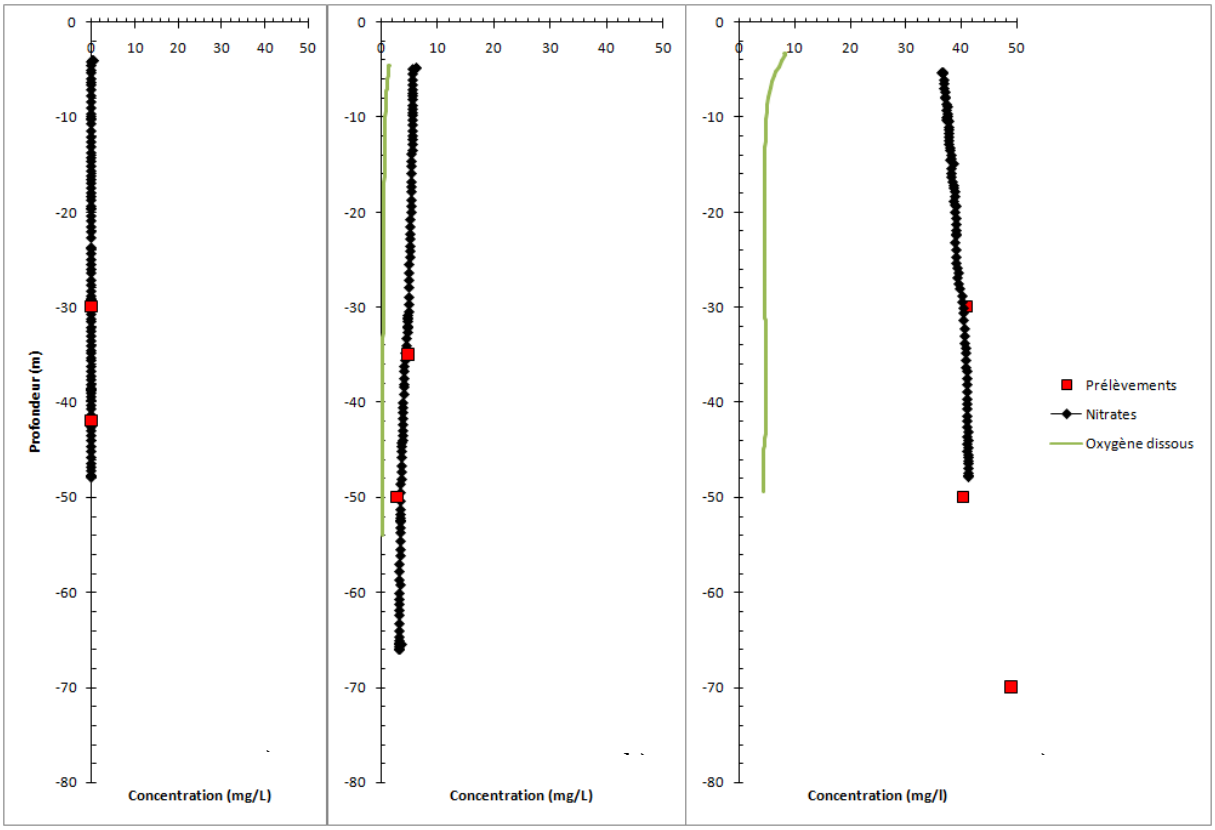


Figure 59: Diagraphies nitrates et oxygènes pour les puits de Loyan; a) F26, b) F13, c) F21

Les profils de concentration en nitrates et les analyses effectuées par chromatographie ionique après prélèvements montrent une très bonne cohérence (Figure 59). La turbidité étant très variable entre ces puits, ces mesures montrent une bonne capacité de mesure de la sonde dans des puits de chimie très différente. Ces trois puits sont situés à 3 m les uns des autres. Ceci montre une très forte variabilité chimique du site. Les données présentées lors du chapitre précédent indiquaient des mélanges et un écoulement naturel allant du puits F21 vers F26 via F13. On note que la dernière mesure de prélèvement (le plus profond) indique une concentration plus importante vers le fond du puits. Ceci indique la présence d'une arrivée d'eau plus concentrée en nitrates. Une connexion avait d'ailleurs été mesurée par débitmétrie verticale. Bien que ne permettant pas d'être défini avec certitude, ceci peut laisser supposer une connectivité ou du moins un chemin d'écoulement en lien avec Finc. La géométrie et des

problèmes dans le forage n'ont pas permis de descendre les sondes pour une mesure plus précise. Ces données montrent une verticalité des fronts de réactions et semble confirmer l'hypothèse présentée dans le chapitre précédent d'une réactivité entre les puits F21 et F26.

Cette observation montre l'intérêt des mesures en profondeur en continu des éléments chimiques tels que les nitrates. Les résultats de traçage réactif qui seront exposés au chapitre suivant montreront l'intérêt du suivi en continu.

VI. Conclusion

Les mesures in situ, par l'observation de fronts d'oxydoréduction, par l'identification spatiale de mélange (Figure 58a) et par l'identification de la variabilité chimique du milieu (Figure 59) ont montré l'intérêt de ce type de mesures pour une meilleure compréhension du milieu.

Ce chapitre a permis de présenter les techniques de mesure de nitrates en forages ainsi que de montrer les limites actuelles de ces techniques. Nous avons par la suite testé deux nouveaux outils répondant à des philosophies de développement différentes. Le premier est un spectrophotomètre développé par une entreprise spécialisée dans le développement d'outils de diagraphie alors que le second est l'application à la diagraphie d'un spectrophotomètre. Les deux outils présentent des résultats intéressants mais aussi des contraintes.

L'outil Geovista possède une facilité d'utilisation permettant un gain de temps important (fréquence de mesure ; couplage à d'autres outils) mais présente une plage d'utilisation restreinte en raison de la non prise en compte de la turbidité sur le signal. Ceci induit une forte limitation sur la fiabilité des mesures en valeurs absolues et relatives. Le second outil S::CAN est moins adapté à la réalisation de diagraphies d'un point de vue pratique (fréquence de mesure ; nécessité de dérouler l'intégralité du câble, alimentation électrique nécessaire en continu) mais possède une plage d'utilisation plus large en raison d'une bonne prise en compte de la turbidité. Ce système présente aussi l'avantage d'un système de nettoyage par air comprimé permettant une utilisation continue sur une longue période. Comme l'a montré cette comparaison, l'outil idéal n'est pas encore accessible mais ces deux outils apparaissent comme étant très complémentaires.

Chapitre 3 :
Etude des réactions de dénitrification autotrophes en batchs

I. Introduction

Nous avons présenté dans le chapitre introductif de cette thèse les différentes réactions de dénitrification pouvant avoir lieu sur site dans le cas d'aquifères ne contenant pas de matière organique. La pyrite étant le sulfure le plus important dans la nature, il est généralement considéré que la réaction prépondérante dans les aquifères est une réaction d'oxydoréduction impliquant la pyrite. Ceci a été observé dans le cadre d'aquifères sableux (Engesgaard and Kipp, 1992; Postma et al., 1991; Schwientek et al., 2008), carbonatés (Le Bideau, 1996), ainsi que dans le cadre d'aquifères cristallins (Ayraud et al., 2006; Negrel and Pauwels, 2004; Pauwels et al., 1998; Tarits et al., 2006). Bien que cette réaction utilisant la pyrite soit facilement acceptée comme étant responsable de la globalité de la réaction de dénitrification, les bilans massiques qui permettraient d'expliquer en intégralité cette réaction sont souvent incomplets (Negrel and Pauwels, 2004).

De plus, certains auteurs remettent en cause cette réaction utilisant la pyrite par des expériences de laboratoire car il ne semble pas possible d'obtenir d'oxydation de la pyrite par les nitrates dans des cas où le pH est proche de la neutralité (Haaijer et al., 2007; Schippers and Jorgensen, 2002). En revanche, des sulfures de fer (FeS) peuvent être oxydés par les nitrates. Cruz et al. montrent, dans le cas d'eaux de drainage de mines, que les potentiels d'oxydation de la pyrite peuvent grandement varier en fonction des impuretés présentes dans les minéraux et que la formation d'oxydes de fer sur la surface lors de la réaction peut diminuer fortement les taux de réaction (Cruz et al., 2001). Moses et Herman, dans une expérience d'oxydation de la pyrite utilisant O_2, montrent que la réaction à pH neutre est principalement contrôlée par Fe(III) et que la sorption de Fe(II) et SO_4^{2-} réduit la surface réactive de la pyrite (Moses and Herman, 1991). L'oxydation par Fe(III) peut être rapide mais ne reste pas continue dans le temps. Sur des mesures in situ, Schwientek et al. notent que les cinétiques de réaction avec la pyrite sont très lentes, ce qui peut expliquer l'impossibilité de les observer en laboratoire (Schwientek et al., 2008).

Dans le cadre de notre site d'étude (Ploemeur (56) France), des études précédentes ont identifié une réaction de dénitrification autotrophe mettant en jeu le rôle de la pyrite (Ayraud et al., 2008; Tarits et al., 2006). Ce site est un milieu fracturé principalement composé de granites et de schistes présentant des degrés d'altération variable. Malgré les études précédentes, les processus de dénitrification sur ce support cristallin et le potentiel de dénitrification du site restent partiellement inconnus. La réaction supposée sur ce site est donnée par les équations suivantes :

$$5FeS_2 + 14NO_3^- + 4H^+ \rightarrow 7N_2 + 10SO_4^{2-} + 2H_2O + 5Fe^{2+} \quad (1)$$

$$5\,Fe^{2+} + NO_3^- + 7\,H_2O \rightarrow 5\,FeOOH + ½\,N_2 + 9\,H^+ \quad (2)$$

Depuis le début de l'exploitation en 1991, le site de Ploemeur montre une évolution de la chimie de l'eau pompée (Figure 60). On observe d'abord une décroissance des nitrates, puis une stabilisation de leur concentration. Cette observation indique que la mise en pompage a augmentée la réaction de dénitrification entrainant une diminution des concentrations en nitrates et une hausse des concentrations en sulfates. Par ailleurs, on note que la dénitrification n'est jamais totale puisque les teneurs en nitrates restent basses mais non nulles depuis plus de 15 ans.

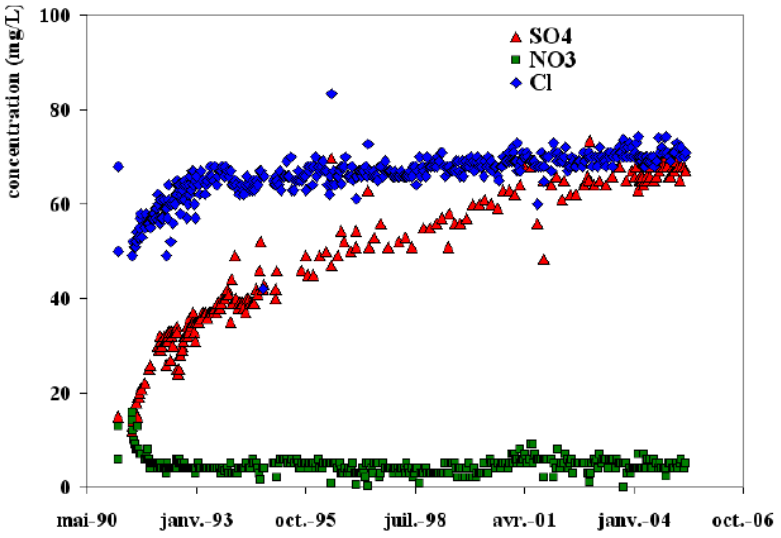


Figure 60: Evolution des concentrations en nitrates, sulfates et chlorures dans le puits d'exploitation (Ayraud et al., 2006)

Depuis le début de la mise en pompage, on observe également une forte hausse des concentrations en sulfates. Cette hausse est supposée être liée en partie à une réaction de

dénitrification autotrophe. Cette augmentation des sulfates s'accompagne d'une augmentation des chlorures plus faible mais continue depuis 1991. Cette observation laisse supposer des possibilités de mélange. Ainsi, (Tarits et al., 2006) montrent que l'augmentation des sulfates est liée *1)* à des phénomènes de mélanges et *2)* à une réaction de dénitrification autotrophe, n'expliquant pas toutefois l'intégralité de cette augmentation en sulfates (Tarits et al., 2006). Des analyses isotopiques du souffre et de l'azote confirment également la présence de cette réaction (Pauwels et al., 2010).

Cependant, bien qu'ayant été observée sur le site, la pyrite (FeS_2) ne semble présente qu'en quantité très limitée et dans des zones localisées (fractures).

Les études précédentes laissent en suspens plusieurs questions :

- Quelles sont les réactions en jeu ?
    - Quelle est l'importance de la réaction avec la pyrite ?
    - Quelle est l'importance du fer dans la réaction précédente ?
    - Une autre réaction liée à des phases minérales autres que la pyrite aurait-elle une importance ?
- Quels sont les liens entre la hausse des concentrations en sulfates et la réaction de dénitrification ?
- Comment évolue la chimie de l'eau en conditions transitoires ?
    - Quels sont les limitations de la réaction de dénitrification ? Sont-elles d'ordre physique (limitation par les flux) ; d'ordre chimique (limitation par la quantité de réactifs) ?

La compréhension plus fine de la réactivité à l'échelle du laboratoire permettrait d'évaluer à l'échelle du site la part relative des processus de mélange et la réactivité réelle du site. Cela permettrait également de préciser le rôle de l'exploitation sur la réactivité chimique.

Pour répondre à ces questions nous avons dans un premier temps mis en place différentes séries d'expériences en batchs afin d'évaluer le potentiel de réduction de milieux cristallins tels que Ploemeur ainsi que les effets d'un apport de pyrite cristalline dans ce milieu. Dans un second temps nous avons conduit une expérience en colonne pour mesurer l'influence d'un écoulement sur la réaction. Nous cherchons à observer si en conditions contrôlées de

laboratoire les coefficients stœchiométriques de la réaction sont respectés et dans le cas contraire nous cherchons à identifier la réaction annexe.

Nous avons effectué trois séries de batchs visant à évaluer la réaction dans différentes conditions afin d'avoir une vision globale des phénomènes observables sur le site. Nous avons utilisé trois types de granites d'altération variable et deux types d'eau. Il a été remarqué sur les parois des fractures des puits carottés la présence de dépôts d'oxydes de fer et de la pyrite en quantité limitée. Le degré d'altération de la roche peut donc avoir une influence sur la réaction en fonction des dépôts d'oxydes de fer sur les parois. Le premier batch provient du broyage d'une fracture. La seconde série mélange du granite sain et des zones de fractures. Pour ces deux premières séries l'eau utilisée est naturellement oxygénée et contient des nitrates. L'eau est désoxygénée afin d'induire des conditions plus réductrices, et de permettre ainsi d'évaluer l'évolution de la chimie de l'eau en contact avec une zone fracturée après consommation de l'oxygène. Dans la troisième série les nitrates sont injectés dans de l'eau plus réductrice ne contenant naturellement ni oxygène ni nitrates en présence de granite sain. Ceci correspond à la réaction possible avec la roche matricielle. Dans ces deux dernières séries l'influence de l'ajout de pyrite est aussi prise en compte.

II. Matériel et méthodes

Nous avons réalisé trois séries de batchs permettant de tester différents degrés d'altération de la roche et deux types d'eau. Les batchs sont réalisés dans des flacons en verre de 500 ml surmontés d'un septum permettant le prélèvement par aiguille.

1. Roches

Le granite utilisé a été préalablement broyé. Il provient de différentes parties du carottage du puits B2 du site de Loyan sur la commune de Ploemeur. L'altération de la roche varie entre les trois séries d'expériences. Pour la première série d'expériences, la roche provient d'une zone fracturée où des dépôts d'oxydes de fer étaient observables sur la paroi des fractures. Pour la seconde série d'expériences, la roche utilisée était un mélange de roche altérée et de roche saine. La roche de cette série a préalablement été lessivée lors d'une expérience en colonne décrite dans la dernière partie de ce chapitre. La troisième série d'expériences a été conduite avec de la roche saine.

L'analyse par extraction chimique, effectuée par le CRPG de Nancy, a donné la composition suivante pour la roche (échantillon représentatif de la seconde série d'expériences):

Elément	%
SiO_2	73,55
Al_2O_3	14,53
Fe_2O_3	0,72
MnO	0,012
MgO	0,18
CaO	0,39
Na_2O	3,81
K_2O	4,73
TiO_2	0,090
P_2O_5	0,21
Perte au feu	0,96

Tableau 7: Composition chimique du granite en %

Les analyses minéralogiques des carottes de ce puits ont montré dans ce granite une dominance de grands cristaux de muscovite et la présence de biotites dont une grande partie est transformée en chlorites. Les feldspaths potassiques et plagioclases sont présents, tout comme le quartz, sous forme de cristaux plus petits. On note aussi la présence d'apatites comme minéraux accessoires. La pyrite cristalline que nous avons broyée provient d'un échantillon du musée de Géologie de Rennes.

2. Eaux

Deux types d'eau ont été utilisés pour la réalisation de ces expériences. Le premier type d'eau provient du piézomètre F34 du site de Ploemeur. En conditions naturelles cette eau contient de l'oxygène (~5 mg/L) et des nitrates (41-35 mg/L). Les concentrations en anions de l'eau utilisée pour les deux premières séries d'expériences sont données dans le Tableau 8 ci-dessous. La troisième série a été conduite avec de l'eau provenant du forage F26 du site de Loyan. Ce forage est connu pour avoir les eaux les plus réductrices du site. Il ne contient ni oxygène (concentration inférieure à 0,2 mg/L), ni nitrates en conditions naturelles.

Elément	Fluorures	Chlorures	Nitrites	Bromures	Nitrates	Sulfates
Série 1	0,04	59,3	0,00	0,33	41,0	10,9
Série 2	0,05	55,0	0,03	0,22	35,9	11,9
Série 3	0,24	105,7	<0,07	1,20	64,0	48,9

Tableau 8: Concentration en anions (mg/L) dans les eaux utilisées dans les batchs

3. Analyses

Les échantillons prélevés ont été filtrés (Sartorius® 0,2µm) puis conservés au réfrigérateur à 5°C avant les analyses effectuées en moins de trois jours. Les volumes prélevés pour chacune de ces analyses sont de 5 ml. Les anions (F^-, NO_3^-, NO_2^-, Cl^-, SO_4^{2-}, Br^-) ont été analysés par chromatographie ionique avec un DIONEX DX 120 et les cations (K, Fe, Mg, Si, Mn, Na, Al, Ca) par ICPMS (HP-4500). Les échantillons prélevés pour analyses par ICPMS ont préalablement été acidifiés avec du HNO_3^-. Le carbone organique a été analysé par un analyseur de carbone Shimadzu 5050A. Les paramètres physico-chimiques pH, Eh, T°, et la concentration en oxygène dissous ont été mesurés à l'aide d'une sonde portable de terrain WTW composée d'un boitier WTW 315i et d'une sonde oxygène WTW CondOx. Le batch de la série 1 a été suivi en anions, ceux de la série 2 en anions et carbone (TC et IC), ceux de la série 3 en anions, cations, carbone, pH et Eh.

4. Dispositif expérimental

L'eau utilisée a été préalablement désoxygénée par bullage d'argon dans un réservoir hermétique pendant plusieurs heures. L'eau est mise au contact de la roche dans les flacons une fois qu'une concentration inférieure à 0,5 mg/L d'oxygène a été atteinte. Une recirculation d'argon dans les flacons permet d'éliminer l'oxygène présent. Le mélange eau/roche est ensuite maintenu en batchs sous atmosphère d'argon par une légère surpression.

Dans la troisième série de batchs, des nitrates sont injectés dans les flacons à l'aide d'une seringue. Les nitrates utilisés proviennent de $NaNO_3$ en poudre Fisher Scientifique dilué dans de l'eau distillée. Le détail des mélanges eau/roche/pyrite sont donnés dans le Tableau 9. La dénomination utilisée pour les batchs est la suivante : le numéro S1 à S3 indique la série de batchs de 1 à 3, les lettres indiquent la présence de roche (R) et de pyrite (P). Les batchs ne contenant que de l'eau sont notés (T) pour témoin.

Série d'expérience	Dénomination	Type de roche	Type d'eau	Masse roche (g)	Masse H_2O (g)	pyrite (g)
Série 1	S1-R	Altéré	F34	139,0	191,1	0,0
Série 2	S2-RP1	Altéré	F34	150,0	318,3	1,0
	S2-P	Altéré	F34	0,0	386,7	1,0
	S2-R	Altéré	F34	150,0	324,2	0,0
	S2-RP18	Altéré	F34	102,0	360,4	18,6
Série 3	S3-Pa	Saine	F26	0,0	492,2	14,2
	S3-Pb	Saine	F26	0,0	500,6	13,9
	S3-Pc	Saine	F26	0,0	494,6	13,8
	S3-RPa	Saine	F26	207,3	379,6	14,0
	S3-RPb	Saine	F26	212,8	405,0	14,0
	S3-RPc	Saine	F26	209,7	407,5	14,0
	S3-Ra	Saine	F26	223,9	396,8	0,0
	S3-Rb	Saine	F26	218,4	394,7	0,0
	S3-Rc	Saine	F26	219,9	396,4	0,0
	S3-Ta	Saine	F26	0,0	879,8	0,0
	S3-Tb	Saine	F26	0,0	876,5	0,0
	S3-Tc	Saine	F26	0,0	884,1	0,0

Tableau 9: Détail des batchs réalisés

La dénomination utilisée pour les batchs est la suivante : le Numéro S1 à S3 indique la série de batch de 1 à 3, les lettres indiquent la présence de roche (R) et de pyrite (P). Les batchs ne contenant que de l'eau sont notés (T) pour témoin.

Les expériences ont été conduites pendant 850 heures pour les séries 1 et 3 et près de 3000 heures pour la série 2.

III. Résultats

1. Cinétique de réaction entre les batchs

La Figure 61 présente l'évolution des concentrations entre les différents batchs. On note des cinétiques et des réactivités très différentes. Ceci est dû à des rapports eau/roche différents entre les batchs ainsi qu'à une chimie des eaux différente (pouvant de plus avoir des répercussions sur les espèces biologiques contenues dans l'eau). Les raisons de ces comportements seront discutées plus tard. Afin d'éliminer ces différences liées à des rapports eau roche et/ou à des conditions différentes entre les batchs, une comparaison des batchs

d'une même série permet d'avoir des informations fiables. En comparant les batchs de la série 2 (Figure 61) on remarque que l'ajout de pyrite provoque une légère augmentation de la réactivité. Cependant cette expérience a été réalisée pendant près de 3000 heures et cette tendance initiale n'est pas confirmée avec le temps sur le long terme. La comparaison des batchs de la série 3 (Figure 61) ne montre pas de différences majeures entre les batchs contenant de la pyrite et ceux n'en contenant pas. Ces deux comparaisons indiquent une faible influence de la pyrite sur la réactivité du système pour les temps d'observation considérés.

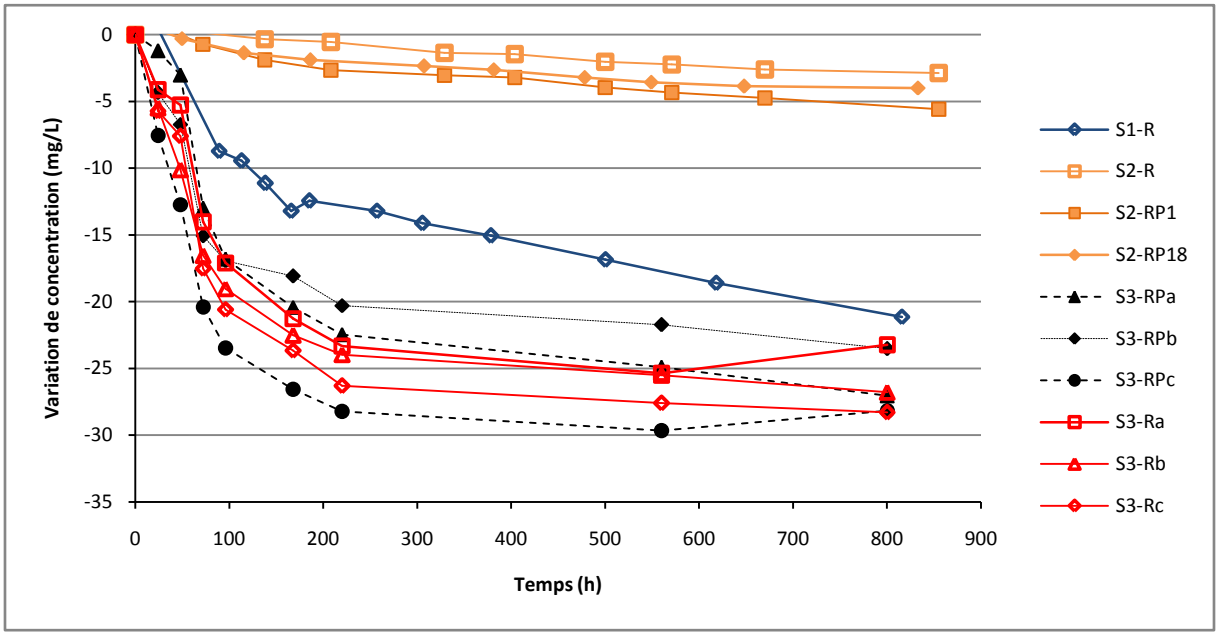


Figure 61: Evolutions temporelles des concentrations en nitrates dans les batchs ; Les symboles pleins indiquent la présence de pyrite dans le batch, les symboles vides indiquent son absence.

2. Rapports des anions

La figure suivante (Figure 62) présente les rapports de concentrations molaires entre les nitrates et les sulfates. Ceci permet de comparer les valeurs de ces rapports aux coefficients stœchiométriques théoriques et d'évaluer l'influence de la pyrite. Les concentrations discutées sont les concentrations relatives (C_j-$C_{initiale}$). Sur les batchs précédemment définis (Tableau 9) seuls les batchs contenant de la roche ont montré une réaction significative. En conséquence les autres batchs (S2-P, S3-P(a,b,c) S3-T(a,b,c)) ne seront plus discutés dans la suite des résultats.

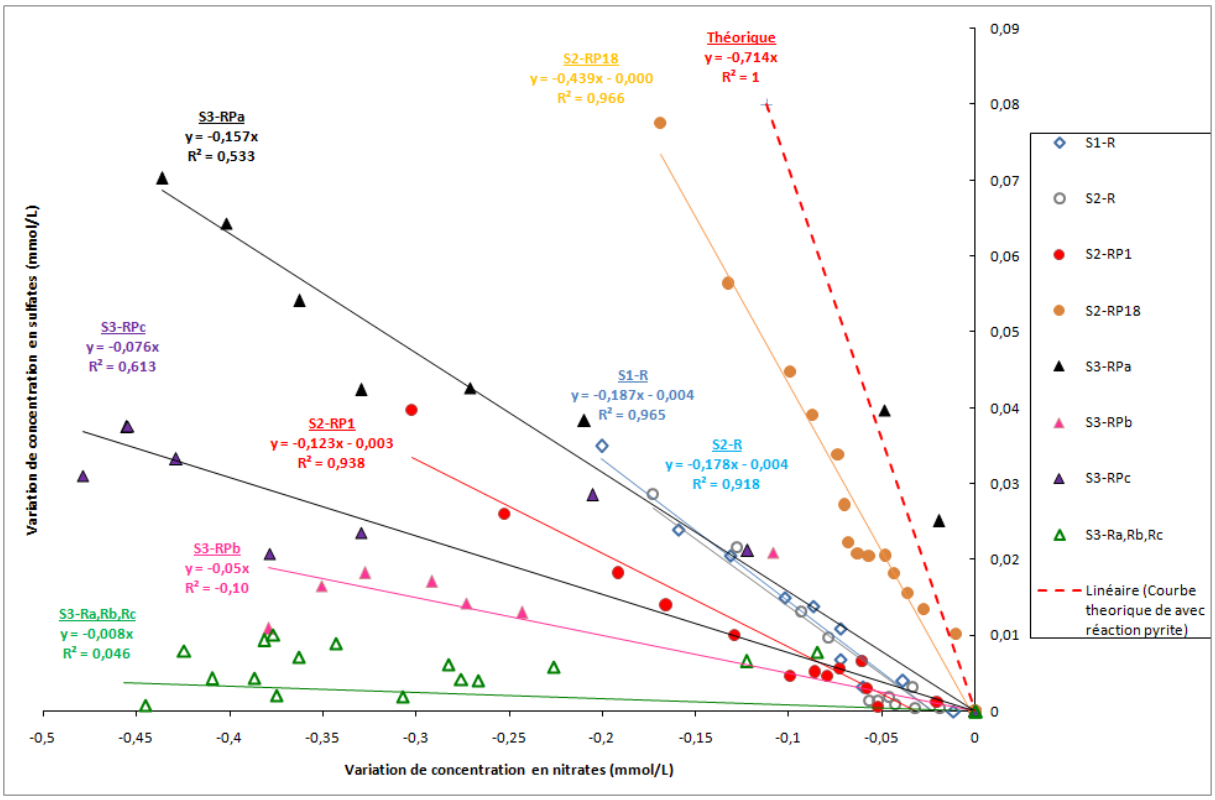


Figure 62: Comparaison des variations de concentrations en sulfates et nitrates dans les différents batchs.

Les droites indiquent les courbes de tendances linéaires pour chacun des batchs avec leurs équations ainsi que leurs coefficients de corrélation. Les symboles pleins indiquent les batchs contenant de la pyrite et les vides les batchs ne contenant pas de pyrite.

Sont présentés sur cette figure les rapports du batch de la série 1 (S1-R), des batchs de la série 2 contenant de la roche (S2-R, S2-RP1, S2-RP18) et les rapports de chacun des batchs de la série 3 contenant de la pyrite (S3-RPa, S3-RPb, S3-RPc). Les batchs sans pyrite de la série 3 (S3-R(a,b,c)) ont tous les mêmes tendances. Pour simplifier la Figure 62 ils sont regroupés dans la même série. Le rapport théorique (donné par l'équation (1)) d'une production de sulfates liée uniquement à la réaction avec la pyrite apparaît sur le graphique sous forme d'un trait en rouge tireté. Les courbes de tendances ainsi que leurs équations et leurs coefficients de corrélation sont données sur la Figure 62. On remarque tout d'abord qu'aucun des batchs ne suit la courbe théorique, ce qui implique en l'absence de précipitation, que la réaction donnée par l'équation (1) n'est pas unique. De plus, l'action simultanée des deux réactions données par les équations (1) et (2) ne fait que varier faiblement ce rapport. Le fort écart à ce rapport théorique indique qu'une troisième réaction doit avoir lieu.

On remarque sur cette figure deux groupes de batchs. Le premier est formé par tous les batchs contenant du granité altéré (intégralité des séries 1 et 2). Tous ces batchs, bien qu'étant

relativement éloignés du rapport théorique, présentent de forts coefficients de corrélation (R^2) entre nitrates et sulfates (tous supérieurs à 0,9) indiquant un lien entre ces deux éléments. Ceci indique qu'une réaction avec les sulfures existe (bien qu'elle n'explique pas la totalité de la réaction). L'apport de pyrite cristalline dans les batchs (S2-RP1 & S2-RP18) n'a qu'une influence limitée. En effet, le premier batch contenant 18 g de pyrite (S2-RP18) a un rapport proche du rapport théorique mais la réactivité du système est aussi la plus limitée car la variation de concentration en nitrates n'est que de -0,15 mmol/L (variation la plus faible observée entre les différents batchs à la fin de l'expérience qui a duré 3000 h). En revanche le batch (S2-RP1 contenant 1g de pyrite) a un rapport plus éloigné que les batchs contenant du granite altéré et ce sans ajout de pyrite (S1-R & S2-R en bleu sur la Figure 62). On remarque notamment que ces deux batchs, bien que réalisés avec des eaux légèrement différentes, ont des rapports identiques. Ceci montre une reproductibilité du système.

Le second groupe de batchs comprend tous les batchs de la série 3 (S3-RPa, S3-RPb, S3-RPc et S3-Ra, S3-Rb, S3-Rc) avec du granite sain. Parmi ces batchs, ceux sans pyrite (S3-Ra, S3-Rb, S3-Rc) ne montrent pas d'évolutions de la concentration en sulfate et ne présentent donc pas de corrélation avec les nitrates. Les trois autres batchs (avec pyrite) montrent une évolution des sulfates, indiquant une oxydation de la pyrite mais les coefficients de corrélation entre nitrates et sulfates restent faibles (R^2 entre 0,613 et -0,10). Ceci indique que bien qu'une oxydation de la pyrite semble avoir lieu, l'influence de cette oxydation sur la réduction des nitrates semble limitée.

Les batchs de la troisième série montrent un lien entre fluorures et nitrates. La corrélation entre ces éléments pour les batchs de la troisième série est présentée Figure 63.

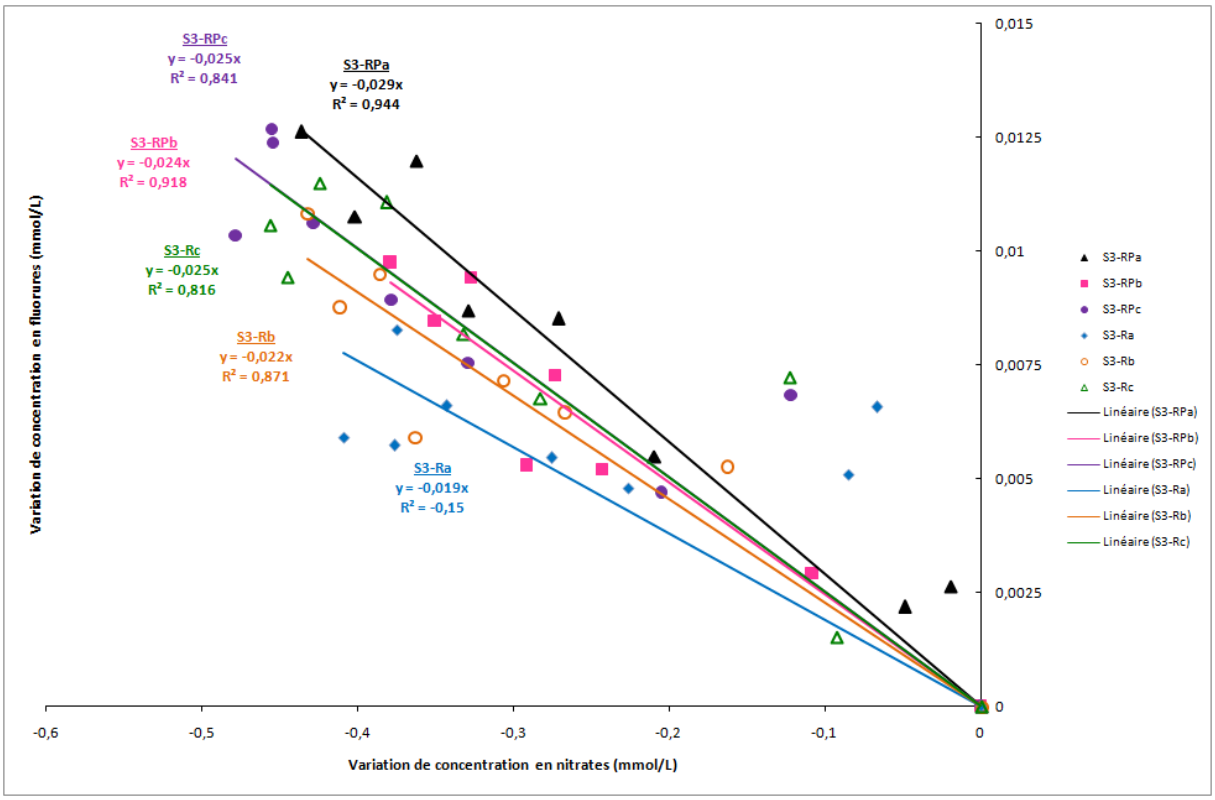


Figure 63: Comparaison des variations de concentrations en fluorures et nitrates dans les batchs de la série 3.

Les droites indiquent les courbes de tendances linéaires pour chacun des batchs avec leurs équations ainsi que leurs coefficients de corrélation. Les symboles pleins indiquent les batchs contenant de la pyrite et les vides les batchs sans pyrite

Une bonne corrélation entre les variations de concentrations en fluorures et en nitrates (avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,8) est observable Figure 63 (excepté le cas de S3-Ra où une forte production de fluorures est observable dès le début de la réaction). Les coefficients des courbes de tendance sont eux aussi proches (variant de 0,019 à 0,029). Pour la totalité de ces batchs on observe une meilleure corrélation entre les variations de concentrations en fluorures et nitrates qu'entre sulfates et nitrates. Une tendance différente est observable Figure 64 avec les batchs de granite altéré (séries 1 & 2).

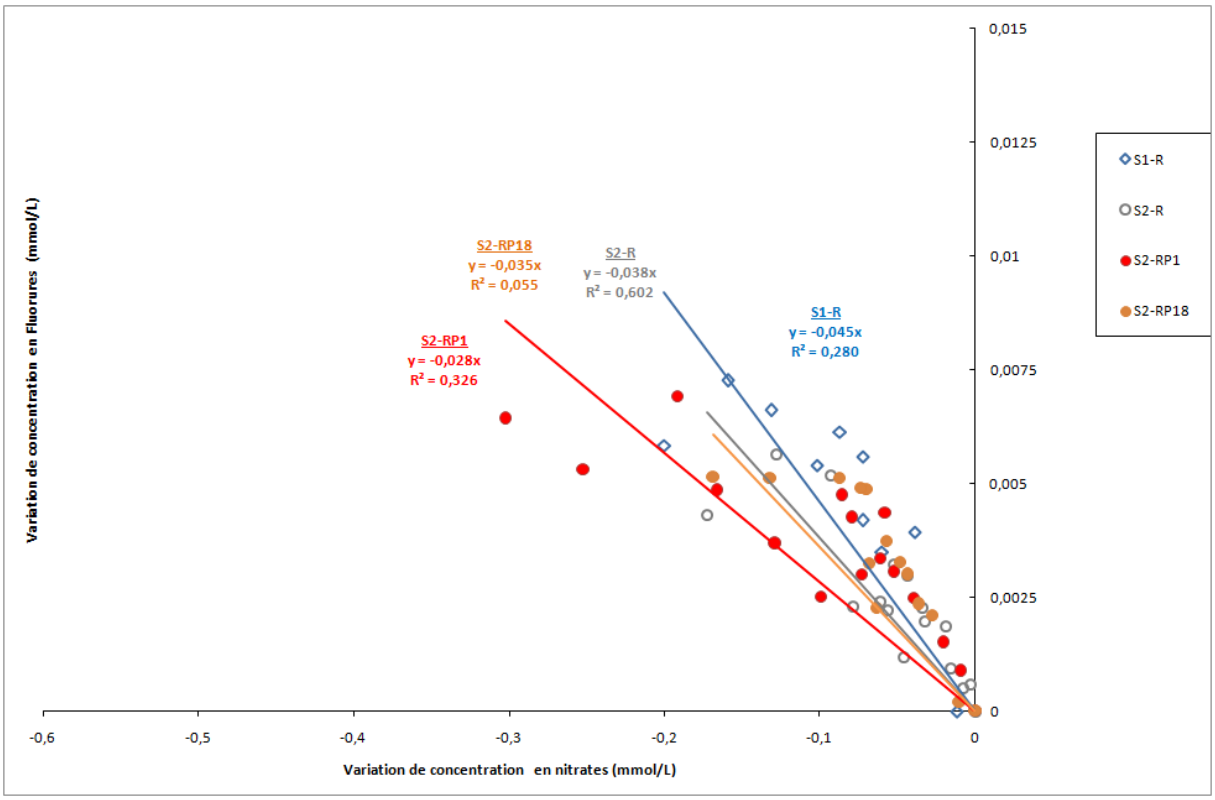


Figure 64: Comparaison des variations de concentrations en fluorures et nitrates dans les batchs des séries 1 & 2.

Les droites indiquent les courbes de tendances linéaires pour chacun des batchs avec leurs équations ainsi que leurs coefficients de corrélation. Les symboles pleins indiquent les batchs contenant de la pyrite et les vides les batchs sans pyrite

Dans ces batchs les coefficients de corrélation sont compris entre 0,55 et 0,6 et montrent peu de liens entre ces éléments. D'une manière générale (bien que les différences soient faibles) plus le coefficient de corrélation est grand entre sulfates et nitrates moins il l'est entre fluorures et nitrates pour ces 2 séries.

3. Evolution des nitrites

La réaction de dénitrification est une réaction séquentielle qui comporte plusieurs étapes. Dans un premier temps, les nitrates sont réduits en nitrites, puis en monoxyde d'azote et en protoxyde d'azote avant d'être transformés en diazote :

$$NO_3^-{}_{(aq)} \rightarrow NO_2^-{}_{(aq)} \rightarrow NO \rightarrow N_2O_{(gas)} \rightarrow N_{2(gas)}$$

Le dispositif expérimental ne permettant pas le suivi des gaz, seuls les nitrates et nitrites sont ici pris en considération. L'évolution du rapport nitrites produits sur nitrates consommés en mol/L est présentée Figure 65. L'évolution de ce rapport nous renseigne sur l'évolution de la réaction et l'adaptation des communautés bactériennes.

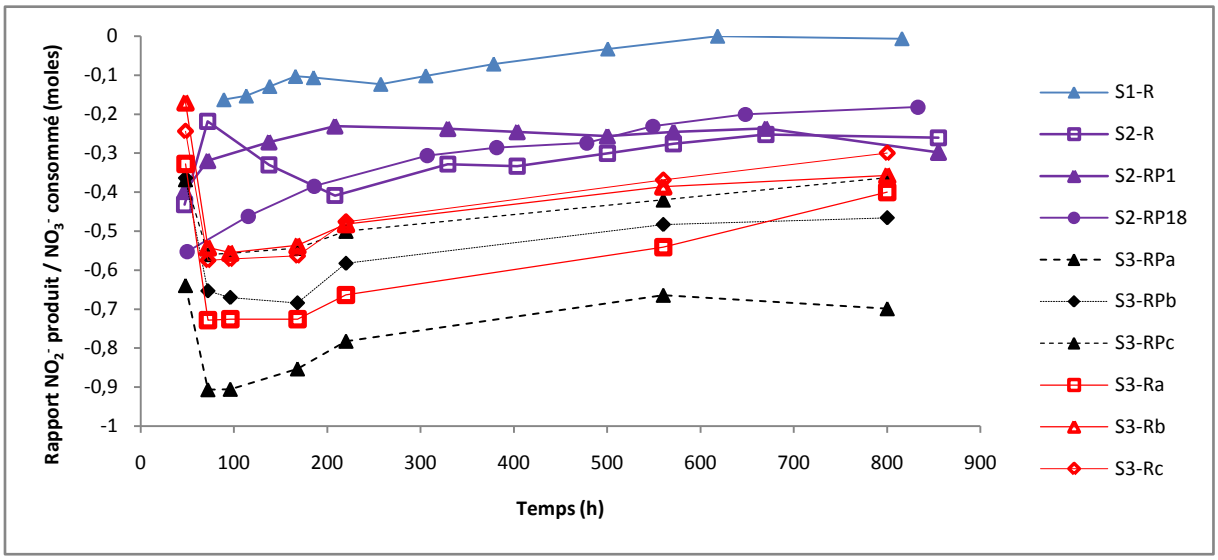


Figure 65: Evolutions du rapport molaire des nitrites produits / nitrates consommés

Dans un premier temps les rapports nitrites produits/nitrates consommés sont élevés et indiquent qu'une majorité des nitrates est transformée en nitrites. Au cours du temps ce rapport diminue indiquant une transformation de la réaction et une adaptation des communautés bactériennes. Ces transformations des nitrates en nitrites et/ou en gaz peuvent être opérées par différents microorganismes. Certains tels que *pseudomonas sp.* transforment une partie des nitrates en nitrites et une autre partie en azote gazeux alors que d'autres tels que *cocci sp.* transforment à la fois les nitrates et les nitrites en azote gazeux (Constantin and Fick, 1997). Il est noté par plusieurs auteurs que les populations peuvent évoluer en modifiant leur production enzymatique et se développer en fonction des concentrations en nitrites (Marazioti et al., 2003). La production d'enzymes différentes montre donc ici une évolution du type de population ou une évolution d'une même population. La pente d'évolution de ce rapport après 200 heures est proche entre les différents batchs quelque soit la réactivité (Figure 61), ce qui implique une constance de ce phénomène.

4. Evolution du carbone

L'évolution du carbone organique au cours du temps dans chacun des batchs est représentée Figure 66. On observe que le mélange eau/roche induit une augmentation du carbone organique en comparaison à l'eau seule. Cette augmentation reste toutefois très faible (autour de 4 mg/L). Ce carbone organique devait être initialement sur la roche et n'a pu être détecté en raison de sa faible quantité sur les analyses de roches. Dans aucun des batchs les concentrations en carbone organique observées ne peuvent permettre de soutenir une réaction

de dénitrification hétérotrophe. Suite à une augmentation de cette concentration dans les premiers temps de l'expérience, les concentrations ne varient plus.

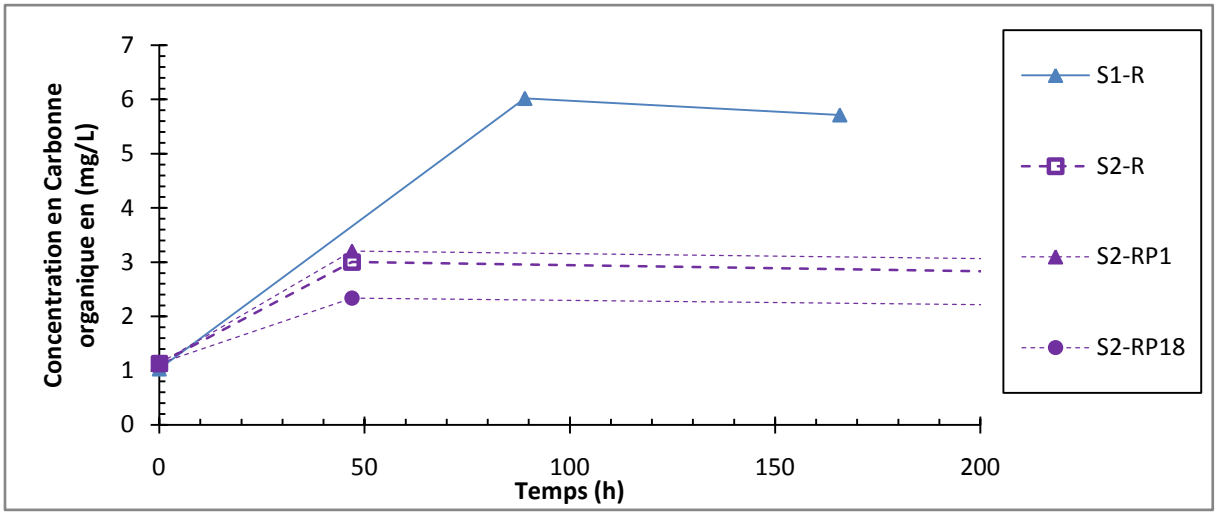


Figure 66: Evolution du carbone organique.

Les concentrations en carbone inorganique sont différentes en fonction des séries de batchs étudiées. Dans les séries 1 et 2 les concentrations sont aux alentours de 5 mg/L alors que dans la série 3 les concentrations sont de l'ordre de 16 mg/L. Le carbone inorganique ne présente pas de variations pour la majorité des batchs. Seuls les batchs de la série 3 (contenant de la roche) présentent une augmentation de 2 mg/L entre les temps 0 et 72 h.

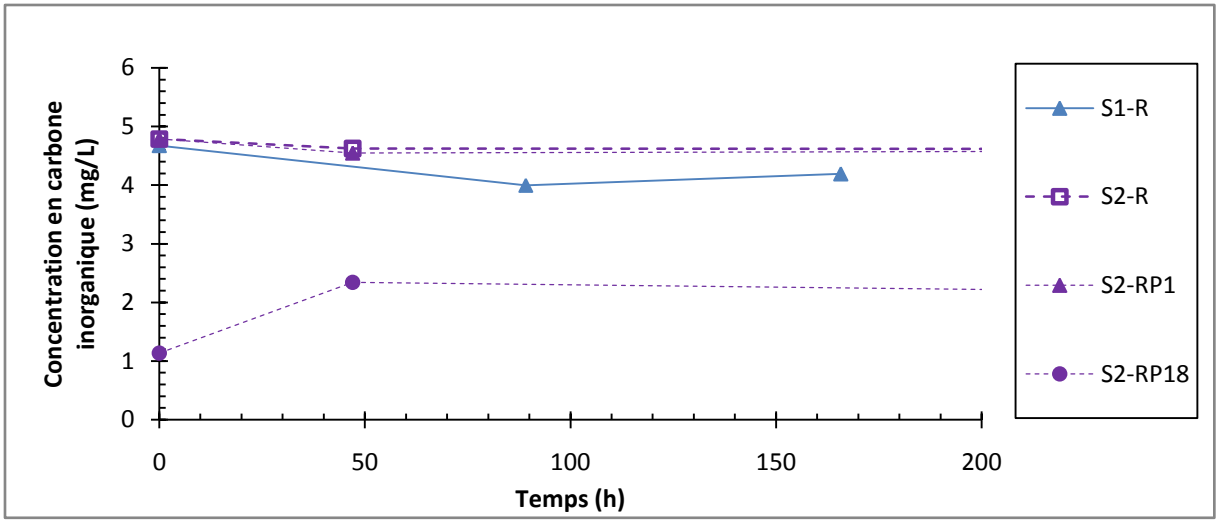


Figure 67: Evolution du carbone inorganique

5. Evolution des cations [Série 3]

Les cations ont seulement été analysés durant la troisième série d'expériences. Le détail de l'évolution des concentrations au cours du temps est présenté en annexe. Sur l'intégralité des éléments on note une très bonne corrélation entre les différents réplicas. D'une manière générale on constate l'existence de deux groupes de batchs ayant des comportements différents. Le premier groupe est composé des batchs ne contenant que de l'eau, ou de l'eau et de la pyrite, en l'absence de roche, ils ne présentent pas de grandes variations (batchs S3-T(a,b,c) et S3-P(a,b,c)). Le second groupe, batchs contenant de la roche (avec ou sans ajout de pyrite), présente quant à lui des variations (S3-R(a,b,c) et S3-RP(a,b,c)). Les différences entre ces groupes fournissent ainsi des informations sur les relargages liés à la roche dans les premiers temps de l'expérience ou sur les précipitations d'éléments. Ces différentes variations renseignent sur la réaction en cours. Dans une recherche de simplification, les différences entre les batchs sans roche et ceux avec roche sont présentées dans le tableau suivant.

Elément	Batchs	Evolution	Variation (mg/L)	Ecart type
Na	*Tous*	*Mise en solution*	7,7	1,78
Mg	*Tous*	*Précipitation*	1,58	0,34
Al	*Tous*	*Mise en solution*	0,0054	0,0045
Si	*Tous*	*Précipitation*	1,05	0,26
K	*Tous*	*Mise en solution*	1,81	0,29
Ca	*Tous*	*Mise en solution*	3,86	0,71
Mn	*Avec pyrite*	*Stable*	0	0,027
	Sans pyrite	*Précipitation*	0,1	0,027
Fe	*Avec pyrite*	*Mise en solution*	0,0047	0,0018
	Sans pyrite	*Précipitation*	0,0038	0,00323

Tableau 10: Comparaison des cations dans la troisième série de batchs entre batchs contenant de la roche et ceux n'en contenant pas. La variation est indiquée par rapport aux batchs ne contenant pas de roche.

D'une manière synthétique, on constate que les éléments suivants : fer, calcium, potassium, aluminium, sodium sont relargués par la roche alors que le magnésium, le manganèse et la silice précipitent.

6. Evolution du pH

Les mesures de pH sur la série 2 n'ont pas été effectuées de manière régulière mais on note d'une manière générale une acidification du milieu (entre 0,1 et 0,5 unité pH). Le batch contenant le plus de pyrite passe ainsi d'un pH de 7 à un pH de 6,5 en 7 jours (première mesure effectuée 6 jours après le début de l'expérience). Ceci concorde avec la réaction d'oxydation du fer présentée précédemment (2).

L'évolution du pH a été suivie de manière systématique lors de la troisième série d'expériences. L'évolution de celui-ci est donnée Figure 68. Dans un premier temps le pH augmente, avant de diminuer, puis d'augmenter de nouveau. On remarque que le pH est systématiquement plus faible pour le batch contenant de la pyrite. Ceci peut provenir d'une acidification ou d'un effet tampon décrit dans (Jha and Bose, 2005).

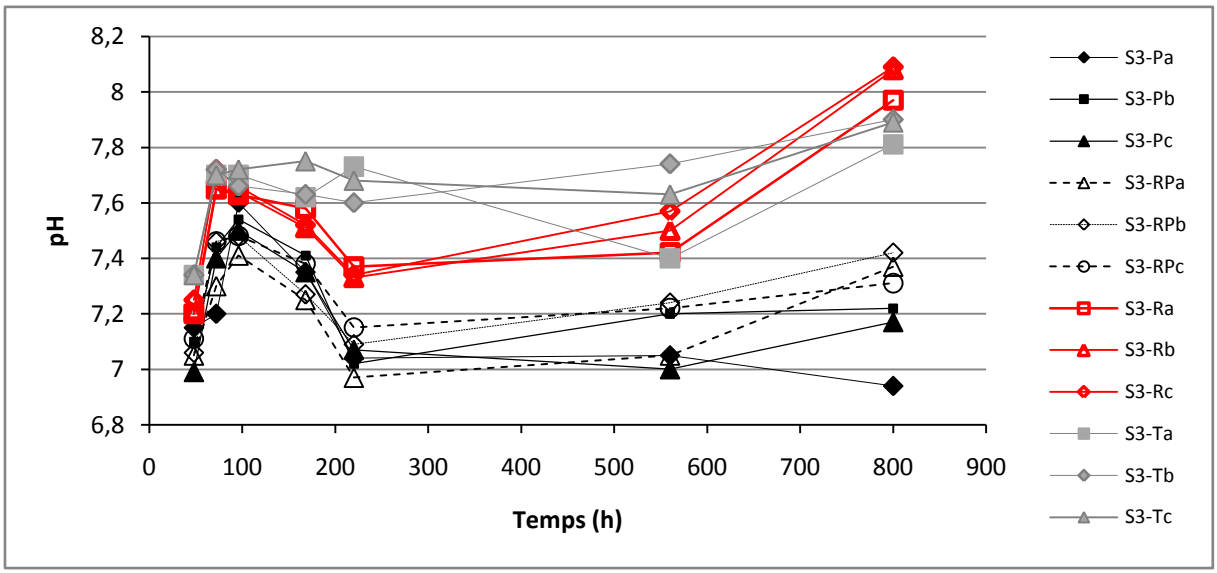


Figure 68: Evolution du pH dans la troisième série de batchs

IV. Discussion – Batchs

1. Potentiel de dénitrification global

Tous les batchs contenant de la roche et de l'eau (quelque soit leur composition chimique) ont montré une baisse significative de la concentration en nitrates confirmant le potentiel de dénitrification. Ainsi les batchs des séries 1 et 2 ont montré qu'une fois l'oxygène consommé, les nitrates présents dans l'eau peuvent être réduits, indiquant une adaptation des communautés microbiennes à des conditions anaérobies (bactéries aérobies facultatives). Les

batchs de la série 3 ont quant à eux montré qu'une injection de nitrates peut être dégradée. Les batchs sans roche n'ont pas montré de consommation de nitrates. Ceci indique que l'eau seule ne contient pas les éléments nécessaires à la consommation de nitrates et que les éléments contenus dans la roche sont de première importance pour la réactivité.

Les cinétiques de réaction sont différentes entre les séries de batchs (Figure 61). Ces différences de cinétiques peuvent provenir des différences conjointes de compostions chimiques de l'eau, de la roche, des conditions réductrices et de populations bactériennes. La roche de la série 2 avait été lessivée ce qui a pu éliminer certains éléments (dont les éléments facilement accessibles aux premiers temps de l'expérience) et donc réduire la réaction. D'autres mesures seraient nécessaires pour évaluer l'influence relative de ces facteurs.

Les faibles concentrations et évolutions du carbone organique (Figure 66) ne peuvent pas soutenir la thèse d'une activité hétérotrophe consommant des nitrates sur une durée de plus de 200 h comme observé. Ce manque de carbone organique indique que nous sommes face à une réaction de dénitrification autotrophe avec des échanges d'électrons avec des phases minérales.

2. Influence de la pyrite

En raison de son abondance, la pyrite est en général considérée comme le principal moteur des réactions de dénitrification autotrophe dans les aquifères fracturés.

L'une des motivations de cette étude était d'évaluer l'influence d'un apport de pyrite dans le système. Ceci a été effectué pour deux séries de batchs (séries 2 et 3). Pour chacune de ces séries, des batchs ne contenant que de l'eau et de la pyrite ont été réalisés (batchs S2-P et S3-P(a,b,c)). Chacun de ces batchs a présenté une augmentation faible des sulfates dans l'eau, prouvant ainsi une oxydation de la pyrite (liée à la présence d'une faible concentration initiale en oxygène). Cependant, aucun batch n'a permis d'observer une réduction significative des nitrates. Ceci induit : *1)* que les éléments nécessaires à une réduction biologique des nitrates via la pyrite (équation (1)) ne sont pas uniquement présents dans l'eau et que 2) une oxydation purement chimique de ce minéral par les nitrates n'est pas possible dans les conditions expérimentales (correspondant à celles du site).

Les batchs contenant de la pyrite et de la roche ont montré une réactivité avec des différences entre les séries. Cependant au sein d'une même série, l'ajout de pyrite cristalline n'a pas

permis une augmentation importante de la réactivité et des quantités consommées (Figure 61). Les rapports présentés Figure 62 montrent que l'ajout de pyrite, par un relargage de sulfates, génère des rapports plus proches de ceux théoriques (donnés par l'équation (1)) sans toutefois que ces différences soient importantes.

(Schippers et al., 1996) montrent que l'oxydation de la pyrite a lieu de manière indirecte, par étapes, produisant des ions thiosulfates $S_2O_3^{2-}$ et tetrathionates $S_4O_6^{2-}$ ainsi qu'un relargage de soufre élémentaire. La présence de ces produits de réaction peut donc fausser les bilans massiques que nous avons réalisés (où seuls les sulfates sont considérés). Cependant, les thiosulfates ont été analysés par chromatographie et n'ont jamais été détectés. Cette hypothèse ne semble donc pas pouvoir expliquer la divergence aux rapports théoriques. Le manque de réactivité lié à la pyrite peut éventuellement provenir du fait que la surface de la pyrite ne soit pas accessible à la réaction, soit par oxydation au contact de l'air, soit en raison de dépôts d'oxydes de fer. A l'inverse, l'absence d'impuretés peut rendre la pyrite non réactive du fait d'une demande d'énergie d'activation trop importante (Cruz et al., 2001). Ces hypothèses ne peuvent pas être prouvées sans analyses plus approfondies.

Ainsi, bien que la pyrite soit en général considérée comme le principal acteur de la dénitrification en milieu granitique, ces expérimentations, tout comme celles de (Haaijer et al., 2007) et (Schippers and Jorgensen, 2002) montrent que cette conclusion peut être remise en question. D'autres éléments pouvant contenir du soufre et pouvant donc contribuer à un relargage de sulfates dans les eaux peuvent avoir une influence.

3. Oxydation des sulfures

Malgré le fait qu'aucun sulfure n'ait été observé lors de l'analyse d'extraction chimique (Tableau 7), l'observation du rapport nitrates / sulfates montre une augmentation des sulfates et donc la présence initiale de sulfures. Les masses de sulfates observées dans ces batchs sont très faibles (ce qui induirait une masse de 0,82 mg de pyrite soit 0,32 % de la masse de roche dans le cadre du batch n°1) et ont ainsi pu ne pas être détectées.

Selon nos expériences et selon différents auteurs dont (Haaijer et al., 2007), il est possible de remettre en cause l'influence de la pyrite et de la réaction principale présentée précédemment (équation 1) et d'utiliser d'autres éléments pour la réduction des nitrates tel que des sulfures

de fer (FeS). Le système étudié par (Haaijer et al., 2007) correspond au système d'équations suivant :

$$FeS + H^+ \rightarrow Fe^{2+} + HS^- \qquad (3)$$

$$3\ H^+ + 5\ HS^- + 8NO_3^- \rightarrow 5\ SO_4^{2-} + 4\ N_2 + 4\ H_2O \qquad (4)$$

Toutefois, même en considérant cette réaction qui implique une mise en solution moindre des sulfates pour une même masse de nitrates consommée, le rapport molaire sulfates sur nitrates observé reste toujours trop faible pour expliquer cette réaction et ne peut expliquer que 35 % de la consommation en nitrates dans le batch n°1. Différents sulfures ou "rouilles vertes" contenant du soufre et dont l'interaction avec les nitrates n'est que partiellement connue peuvent aussi avoir une influence sur la réactivité (Christiansen et al., 2007; Hansen et al., 2001; Hansen et al., 1996; Trolard et al., 1997).

Pour expliquer la divergence aux rapports molaires théoriques il est possible qu'une partie des sulfates produits puisse précipiter, donnant lieu à une concentration insuffisante dans les eaux pour pouvoir effectuer un bilan de masse complet dans cette expérience. Cette hypothèse a déjà été mentionnée par différents auteurs. Pauwels et al. considèrent que la précipitation de jarosite ($K^+Fe^{3+}{}_3(OH^-)_6(SO_4^{2-})_2$) ou de natroalunite ($NaAl_3(SO_4)_2(OH)_6$) permet un contrôle et le maintien d'une faible quantité de sulfates malgré une consommation de pyrite (Pauwels et al., 1998). Cependant, dans nos conditions expérimentales, le fer précipiterait principalement sous forme d'hydroxydes de fer en raison d'un indice de saturation nettement plus faible. Ceci induit une faible précipitation de la jarosite. Ainsi dans notre cas une régulation par la jarosite ne semble donc pas cohérente.

4. Influence du fer

La pyrite ou d'autres sulfures ne permettent pas d'expliquer les bilans massiques de consommation des nitrates. Il semble qu'un autre élément joue un rôle dans la réaction. Cet autre élément serait un minéral constitutif du granite contenant à priori du fer et soutenant une réaction type :

$$5\ Fe^{2+} + NO_3^- + 7\ H_2O \rightarrow 5\ FeOOH + ½\ N_2 + 9\ H^+ \qquad (5)$$

La composition chimique par extraction de notre échantillon est donnée Tableau 7 et contient 0,72% de FeO_2. Bien que notre échantillon soit pauvre en fer (0,72% contre 2 à 3 % en

moyenne pour les granites) les masses de nitrates consommées (selon l'équation (5)) correspondent à une utilisation de 2 à 2,75% de la masse de fer présente dans l'échantillon. Cette réaction est donc réaliste de ce point de vue.

Le fer est difficilement mesurable dans nos conditions expérimentales en raison de précipitations. Il est ainsi rarement présent en quantités importantes en solution sur le site de Ploemeur. Cependant il est très présent en solution sur le site de Guidel. Nous devons donc utiliser un autre indicateur pour évaluer de quel minéral peut provenir ce fer. Les minéraux constitutifs du granite sont présentés dans le Tableau 11 :

Quartz		SiO_2
Micas	Biotite	$K(Mg,Fe)_3(OH,F)_2(Si_3AlO_{10})$ avec des traces de : Mn; Ti; Li; Ba; Na; Sr; Cs; Fe; Cl.
	Muscovite	$KAl_2[(OH,F)_2\|AlSi_3O_{10}]$ avec des traces de Cr, Li, Fe, V, Mn, Na, Cs, Rb, Ca, Mg, H2O
Feldspath	Feldspath potassique	$KAlSi_3O_8$ avec des traces de Na;Fe;Ba;Rb;Ca. (orthose)
	Albite	$(NaAlSi_3O_8)$ plagioclase sodique
	Anorthite	$(CaAl_2Si_2O_8)$ plagioclase calcique
Amphiboles	Hornblende	$(Ca,Na,K)_2(Mg,Fe^{2+},Fe^{3+},Al)_5[Si_6(Al,Si)_2O_{2\ 2}](OH,F)_2$

Tableau 11: Minéraux constitutifs du granite

Parmi ces minéraux, la biotite et la hornblende contiennent du fer. L'hornblende n'a jamais été détectée lors des analyses minéralogiques et peut donc être exclue. La Figure 63 montre une corrélation entre l'évolution de la concentration en nitrates et les fluorures. Parmi les minéraux constitutifs du granite peu sont susceptibles de contenir du fluor. C'est seulement le cas de la biotite. Ce minéral en raison du fer qu'il contient peut soutenir la réaction précédemment citée. Il a de plus souvent été observé comme fortement altéré sur les carottes des puits (sous forme de chlorite (Le Druillennec, 2007; Ruelleu, 2010)). Dans les aquifères de socle, il est accepté par différents auteurs que la biotite est une source de fluorures dans les eaux souterraines (Chae et al., 2006). Il est donc possible d'admettre que la biotite est principalement responsable de la réaction.

Le second élément indiquant la dissolution de la biotite est le potassium. En effet celui-ci n'est pas présent dans les plagioclases calciques ou sodiques et donc une mise en solution de celui-ci indique une altération de muscovite, de feldspath potassique ou de biotite. La biotite étant le minéral le plus facilement altérable, on montre donc une altération de celui-ci par les

différences de concentration en potassium entre les batchs telles que observées Tableau 10. N'ayant pas de composition précise de la biotite contenue dans les roches utilisées, nous pouvons nous baser sur la formule de celle utilisée dans (Chae et al., 2006) pour estimer la quantité de potassium relarguée par ce minéral en se basant sur la quantité de fluorures observée. La formule de la biotite dans (Chae et al., 2006) est la suivante :

$$(K_{1.4}Na_{0.2}Ca_{0.2})_{1.8}(Mg_{0.8}Mn_{0.03}Fe_{2.6}Ti_{0.3}Al_{1})_{5.1}(Si_{6}Al_{2})_{8}O_{24}(OH_{1.8}F_{0.4}Cl_{0.03})_{2.2}$$

La production observée de 0,4 mg/L de fluorures (valeur moyenne sur les batchs de la série 3) induit une augmentation de concentration de potassium de 2,4 mg/l proche de celle observée (2,3 mg/L). A la vue de ces résultats on peut donc penser que la cinétique de dissolution de la biotite est l'élément contrôlant la réaction dans notre microcosme.

5. Evolution des nitrites

L'évolution des rapports molaires des nitrites produits sur nitrates consommés (Figure 65) implique une évolution des réactions mises en jeu. Dans un premier temps, une forte proportion des nitrates est réduite en nitrites. Par la suite le rapport évolue de manière linéaire avec une pente relativement proche entre les différents batchs. On note globalement une certaine convergence vers des valeurs entre -0.5 et -0.3 après 800 heures d'expérience. L'évolution indique qu'après une centaine d'heures (quelles que soient les conditions) les nitrites commencent à être réduits à la suite des nitrates.

Pour (Constantin and Fick, 1997), les rapports de nitrites produits sont liés aux types de bactéries présentes. Dans ce cas une première population convertit les nitrates en azote gazeux et en nitrites, puis une seconde se développe et commence une consommation des nitrites. Cependant, selon (Marazioti et al., 2003) la production d'enzymes d'une même colonie peut évoluer et ainsi le développement de nitrites réductases nécessite préalablement la présence de nitrites dans le milieu. Sans analyses qualitatives des populations bactériennes, nous montrons cependant ici que près d'une centaine d'heures est nécessaire pour que ce type d'évolution apparaisse. Le fait que les pentes et les constantes de temps soient identiques sans influence du type de batch indique que le contrôle de cette réaction est purement biologique.

V. Dispositif dynamique

Afin de compléter notre étude les réactions analysées ont été testées dans des conditions dynamiques avec des colonnes de roches. Il a en effet été observé que la vitesse d'écoulement pouvait avoir une influence sur les cinétiques de réaction à cette échelle (Langner et al., 1998).

Ce système de colonne où un flux passe à travers une roche concassée ou d'autres éléments réactifs tels que les sulfures est couramment utilisé afin d'évaluer des cinétiques de réaction en conditions dynamiques (Amirbahman et al., 2003; Clement et al., 1997; Jia et al., 2007; Koenig and Liu, 2001; Moon et al., 2004; Sinke et al., 1998; Vongunten and Zobrist, 1993). Ces systèmes servent souvent de point d'appui pour la réalisation de modèles (Clement et al., 1997; Darbi and Viraraghavan, 2003; Falkentoft et al., 1999; Furrer et al., 1996; Schafer et al., 1998a; Schafer et al., 1998b; von Gunten and Furrer, 2000).

1. Matériel et méthodes

Le système utilisé ici se compose d'un réservoir de 20L en polyéthylène haute densité (Manutan) duquel partent trois tubes Teflon et Pharmed d'une longueur de 80 cm et de 2 mm de diamètre. Ils sont reliés à une pompe péristaltique et alimentent une colonne en altuglas remplie de granite broyé (granulométrie 0,2-1 mm). L'eau rentre dans la colonne par le bas et en ressort par le haut. Les colonnes sont de plus équipées de tuyaux de prélèvements en Teflon à 2,5 ; 17 ; 31,5 et 46 cm de la base de la colonne. Un débit constant de 10 ml/h est imposé durant toute la durée de l'expérience. Ces éléments permettent de réaliser des profils de concentration le long de la colonne et ainsi de localiser les zones de réactivité. Le dispositif expérimental est présenté sur le schéma suivant (Figure 69):

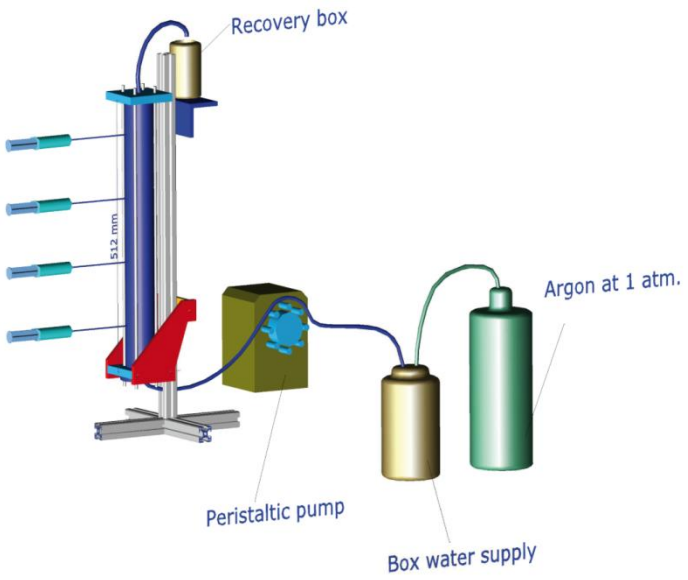


Figure 69: Dispositif expérimental en colonne

Durant la totalité de l'expérience, le réservoir d'eau est maintenu sous une atmosphère d'argon pour éviter toute entrée d'oxygène dans le système. Les anions (F^-, NO_3^-, SO_4^{2-}, NO_2^- Br^-) sont analysés par chromatographie ionique. Durant cette expérience des prélèvements sont effectués en sortie de colonne et le long des tuyaux de prélèvements. Les méthodes d'analyse sont identiques à celles décrites dans la section II.3 de ce chapitre.

2. Résultats

L'évolution des concentrations (NO_3^-, NO_2^-, F^- et SO_4^{2-}) en sortie de la colonne est présentée Figure 70. Contrairement aux batchs, dans ce dispositif dynamique, chaque point représente la concentration finale après qu'une eau de même composition initiale ait traversé l'ensemble de la colonne. Une diminution progressive traduit ainsi une augmentation de la réactivité avec le temps.

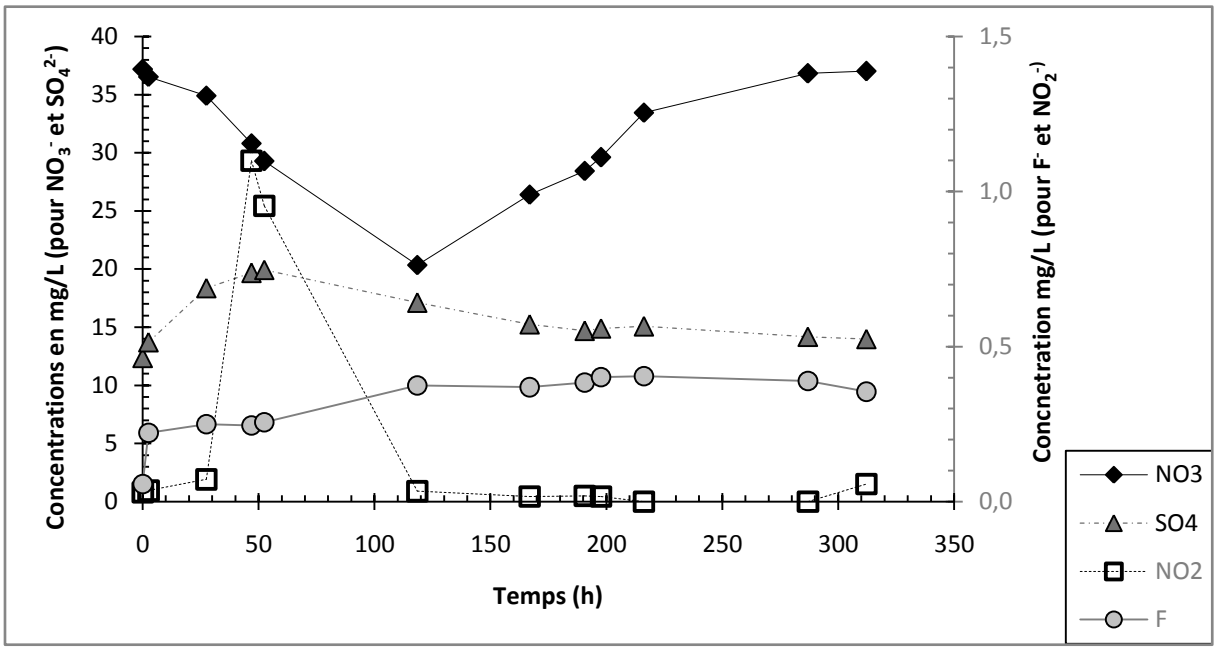


Figure 70: Evolution des anions en sortie de colonne (l'erreur sur les mesures est de 5%)

La baisse progressive des nitrates entre les temps 0 et 200 h (pour un même temps de résidence dans la colonne) montre une augmentation du taux de réaction. L'augmentation du taux de réaction indique un développement bactérien qu'il n'était pas nécessaire de prendre en compte dans les réactions en batchs. En effet dans les batchs le taux de réaction semblait dans un premier temps maximum puis diminuait avec la concentration de substrat. Ce type d'évolution est représentatif d'une cinétique d'ordre 1 (fonction de la quantité de substrat) et ne tient pas compte d'une croissance bactérienne. Durant cette phase de décroissance on note une augmentation de la concentration en sulfates et des fluorures. Cette augmentation des sulfates est progressive mais cesse aussi progressivement après 50 heures d'expérience.

On peut ainsi considérer que dans la colonne, un système de différentes réactions se met en place au cours du temps. La première de ces réactions met en jeu des sulfures et est relativement rapide. Cette réaction correspond à celle discutée dans la section IV.3 de ce chapitre (réaction 4 impliquant des sulfures). Cependant la réaction produisant des nitrites s'arrête et passe le relai à une autre réaction discutée dans la section IV.4 (impliquant de la biotite) correspondant au cas d'un granite sain avec une réaction liée à la biotite. Considérant cette réaction avec la biotite, la concentration en fluorures indique le taux de dissolution de la biotite et montre que cette dissolution est continue. Cependant on note un arrêt de la consommation de nitrates. La production continue de fluorures indique que la présence de biotite n'est pas un élément limitant et que le fer re-précipitant serait le facteur limitant tel que

observé dans (Akagawa et al., 2006). Cet arrêt de la réaction était aussi observable dans le cas des batchs où cette re-précipitation induirait un arrêt de la réaction.

VI. Conclusion

Les différentes expériences de ce chapitre permettent de proposer un modèle conceptuel de la réactivité au niveau du site. Dans les premières séries d'expériences (séries 1 et 2), la hausse des concentrations en sulfates indique une réaction mettant en jeux des sulfures. Cependant, les bilans massiques montrent que les sulfures ne peuvent pas être les seuls éléments de cette réaction. Nous avons montré que la pyrite n'avait pas d'influence importante sur la réaction. La présence de sulfates n'était observable que sur les batchs de granite altéré avec la présence de fractures et non dans les batchs de granite sain. Il semble donc que les sulfures réactifs dans ce cas proviennent plus de FeS ou de "rouilles vertes" tels que discuté dans (Christiansen et al., 2007; Hansen et al., 2001; Hansen et al., 1996; Trolard et al., 1997). Le soufre, n'étant pas présent dans la composition du granite, peut provenir de dépôts précipités lors des écoulements incluant un pôle profond riche en sulfates permettant la précipitation de FeS ou de "rouilles vertes". Ces "rouilles vertes" étant particulièrement instables, elles sont de ce fait difficilement visibles lors des observations des carottages. Cette réaction aurait lieu sur site principalement dans les fractures et serait combinée par la suite à une réaction utilisant du fer. Les résultats discutés section IV.4 montrent qu'une consommation de nitrates peut aussi exister sans l'intervention de sulfures et que la biotite est dans ce cas l'élément prépondérant. Ce comportement serait cette fois plus symptomatique du comportement dans la matrice ou du moins de zones d'écoulements moins altérées. Ces expérimentations montrent qu'un comportement très complexe peut avoir lieu à l'échelle du site avec des réactions différentes pouvant être localisées dans les fractures ou la matrice, pouvant ainsi réguler la réactivité du site. Peu d'études se sont intéressées à cette différenciation (Akagawa et al., 2006).

L'expérience dynamique indique une complémentarité de la réaction incluant des sulfures et de celle incluant la biotite. De plus cette expérience indique aussi que la re-précipitation d'oxydes de fer semble plus à même que la consommation totale d'un élément limitant d'arrêter la réaction de cette façon. Cette expérience pointe, par la lente mise en place du taux de réaction maximum, la nécessité de prendre en compte des termes de croissance bactérienne dans les conditions dynamiques ce qui n'est pas nécessaire dans le cas de réactions en batchs.

Une analyse par composantes principales (ACP) sur les chroniques chimiques a été réalisée sur le site de Ploemeur (Laurencelle et al., 2010). Cette analyse indique que, malgré l'identification d'une dénitrification, la présence de sulfates sur le site est principalement liée à un mélange de masses d'eaux aux propriétés chimiques différentes. Ainsi les premières études (Ayraud, 2006; Tarits et al., 2006) surestimaient le rôle de la réaction de dénitrification et notamment le rôle de la pyrite en raison de données incomplètes. Cependant, les expériences en batchs présentées ici ont montré l'existence de réactions de dénitrifications incluant partiellement des sulfures et principalement de la biotite. Ces expériences de laboratoire extrapolées à l'échelle du site montrent bien que la concentration de sulfates peut être principalement liée à des mélanges mais qu'un potentiel de dénitrification existe et que celui-ci peut varier en fonction des zones de circulation de l'eau (matrice ou fracture ouverte). Ces nouvelles données de terrain vont donc dans le sens des mesures de laboratoire analysées ici et semblent indiquer que le pompage a induit une réactivité de réduction des nitrates couplée à une oxydation de la biotite du fait de circulations actives dans la matrice rocheuse.

Chapitre 4 :
Quantification d'une dénitrification autotrophe par essai de "Push-Pull" réactif

I. Introduction

Des informations quantitatives sur les cinétiques de réaction et les activités microbiennes sont nécessaires pour améliorer notre compréhension des processus biogéochimiques dans les aquifères, pour quantifier les taux d'atténuation des polluants et pour développer des technologies efficaces de bioremédiation. Différentes méthodes sont utilisées pour identifier et quantifier ces réactions et leurs cinétiques. Des expérimentations ont été menées en batchs (Darbi et al., 2002) pour décrire les cinétiques de réaction, sur des réseaux de piézomètres pour quantifier l'atténuation naturelle de contaminants (McAllister and Chiang, 1994), en colonnes pour observer l'évolution des fronts d'oxydoréduction sous différentes contraintes de flux (Amirbahman et al., 2003; Cozzarelli et al., 1999; Darbi et al., 2003; Postma and Appelo, 2000; Sinke et al., 1998; Vongunten and Zobrist, 1993) ou à partir de l'observation directe en cultures permettant de quantifier les productions de sous-produits de réaction tels que les nitrites en fonction du type de bactéries et de leur evolution (Constantin and Fick, 1997; Marazioti et al., 2003; Murray et al., 1989). Ces informations peuvent également être traduites indirectement à partir d'analyses géochimiques pour l'évaluation des consommations en oxygène et nitrates dans des aquifères contaminés en hydrocarbures (Cozzarelli et al., ; 1999 Postma et al., 1991) pour identifier les réactions de dénitrifications en millieux cristallins (Cozzarelli et al., 1999; Pauwels et al., 2010; Postma et al., 1991; Tarits et al., 2006). Les avantages et inconvénients de ces méthodes sont discutés dans Chapelle (Chapelle, 2001a).

Les mesures *in situ* sont généralement considérées comme plus représentatives que celles de laboratoire. De plus, les expérimentations de laboratoire, en comparaison aux méthodes *in situ*, présentent différents inconvénients tels que les faibles quantités de matériaux du site utilisées (potentiellement non représentatives de la variabilité du site), les possibles contaminations bactériennes lors de la collecte des échantillons et les difficultés de réalisation de conditions analogues au site. Les conditions de laboratoire peuvent ainsi induire des développements bactériens différents et donc des cinétiques de réaction différentes de celles du terrain.

La méthode de "push-pull" utilisée dans ce chapitre est une extension des méthodes développées pour la détermination des paramètres physiques des aquifères in situ en forage. Parmi ces méthodes, celles n'utilisant qu'un puits unique sont particulièrement intéressantes car elles permettent de déterminer la variabilité des caractéristiques de l'aquifère en effectuant des mesures en différents points distincts (Schroth et al., 1998). Différentes méthodes existent pour déterminer les paramètres tels que la conductivité hydraulique (essais de pompages ou chocs hydrauliques (Barker, 1988; Butler and Liu, 1993)) ou déterminer les vitesses d'écoulement (Brouyere et al., 2008). Une autre méthode n'utilisant qu'un seul puits, le "push-pull", a été développée et utilisée pour déterminer les paramètres physiques des aquifères tels que la dispersion (Gelhar and Collins, 1971; Gouze et al., 2008; Le Borgne and Gouze, 2008) et la porosité (Hall, 1993; Hall et al., 1991). Le "push pull" consiste à injecter dans un puits une solution contenant des traceurs (push phase) puis, à la fin de l'injection ou suite à un temps de stabilisation, à récupérer le traceur (pull phase) pour obtenir des courbes de restitution. Les essais de push-pull réactifs sont utilisés depuis une dizaine d'années pour évaluer les cinétiques de réaction et processus redox dans les sédiments, dans des aquifères pollués en hydrocarbures (Istok et al., 1997; McGuire et al., 2002), dans les zones humides (Kneeshaw et al., 2007). L'utilisation de push-pull a aussi permis de démontrer la forte variabilité des consommations en oxygène et nitrates au sein d'un même aquifère (Schroth et al., 1998). Cette méthode a aussi été utilisée avec succès pour quantifier les cinétiques enzymatiques responsables de la production de *p*-nitrophenol (PNP) lors de la dégradation de *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (PNG) (Istok et al., 2001). Des essais de push pull ont été réalisés en laboratoire dans des milieux homogènes (Istok et al., 2001) pour confirmer les interprétations réalisées in situ. Ces mesures ont permis de développer des solutions analytiques permettant d'obtenir de ces essais les coefficients de réaction de premier ordre (Haggerty et al., 1998; Schroth and Istok, 2006) et d'ordre zéro (Snodgrass and Kitanidis, 1998). Des modèles numériques ont aussi été développés pour affiner les interprétations (Phanikumar and McGuire, 2010; Vandenbohede et al., 2008)

Nous souhaitons utiliser cette méthode de push-pull pour démontrer les possibilités de dénitrification sur le site de Ploemeur, pour identifier les cinétiques de consommation des nitrates ainsi que les cinétiques de formation des sous-produits de réaction tels que les nitrites et le protoxyde d'azote.

1. Objectifs

La méthode du "push-pull" a été utilisée à différentes reprises pour mesurer les cinétiques de réaction directement au sein des aquifères. Cette méthode a toujours été appliquée dans le cadre de zones humides ou dans des aquifères contenants de fortes concentrations en carbone organique mais n'a jamais été appliquée dans des aquifères fracturés. Ainsi, l'atténuation des nitrates selon une réaction de dénitrification autotrophe dans le cadre d'aquifères non pollués en hydrocarbures n'a jamais été réalisée. De plus à l'exception de Trudell et al. (Trudell et al., 1986), les piézomètres utilisés ne font généralement que quelques mètres de profondeur et les tests représentent des volumes faibles (quantités totales injectées inférieures à 100 L). Dans le cadre de réactions de dénitrification autotrophe, les réactions sont plus lentes que dans les cas précédents, il est donc nécessaire de vérifier les possibilités d'évaluation de cette réaction in situ par ce moyen.

Les objectifs scientifiques de cette partie sont de:

1) Valider et quantifier les réactions de dénitrification sur le site de Ploemeur en réalisant le premier essai de traçage réactif sur le site de Ploemeur
2) Identifier les réactions in situ.
3) Définir les cinétiques de réaction de la consommation en nitrates
4) Réaliser la première évaluation des cinétiques de production de protoxyde d'azote *in situ* de manière directe.
5) Démontrer le lien entre les hétérogénéités physiques et chimiques du milieu en lien avec les vitesses d'écoulement.

L'obtention de ces éléments permettra de discuter l'influence de l'hétérogénéité physique sur la variabilité chimique observée. Ceci est effectué en fin de chapitre grâce à des modèles. Ces modèles seront utilisés pour deux applications. La première vise à évaluer les possibilités d'évolution de la chimie entre les puits F21 et F26 du site de Loyan (voir figure finale chapitre 1 de cette partie). La seconde application a pour objectif d'estimer les distances caractéristiques nécessaires à la dégradation des nitrates présents en bordure du site de pompage de Ploemeur-Kermadoye lors de leur transfert au sein de la zone fracturée principale de l'aquifère.

En plus de ces buts scientifiques cette expérience de push pull a aussi des objectifs techniques qui sont de:

1) Valider le protocole de mesure par push pull en milieux fracturés.
2) Valider l'utilisation d'un spectrophotomètre de forage pour la réalisation d'essais de traçages.

Le détail de la caractérisation du site de Loyan ainsi que les raisons du choix de ce site ont été présentés chapitre 1 et ne seront que brièvement rappelés par la suite. Pour plus de détails, le lecteur est convié à se reporter à ce chapitre.

2. Principe de la méthode

Le push pull est une injection contrôlée d'une solution de traçage connue dans un piézomètre suivie par l'extraction de cette solution dans le même puits. Durant la phase d'injection, la solution migre radialement à partir du puits au sein de la zone saturée de l'aquifère. Le volume théorique d'échantillonnage est donc un cylindre. La géométrie impactée par le traçage dépend des hétérogénéités de l'aquifère, de la méthode d'injection, de sa durée et de la structure du puits. Pour les aquifères fracturés, où les hétérogénéités sont fortes, le volume impacté peut être différent d'un cylindre. Un schéma de principe appliqué aux aquifères fracturés est donné Figure 71. Durant la phase d'extraction, le flux est inversé et la solution migre vers le puits.

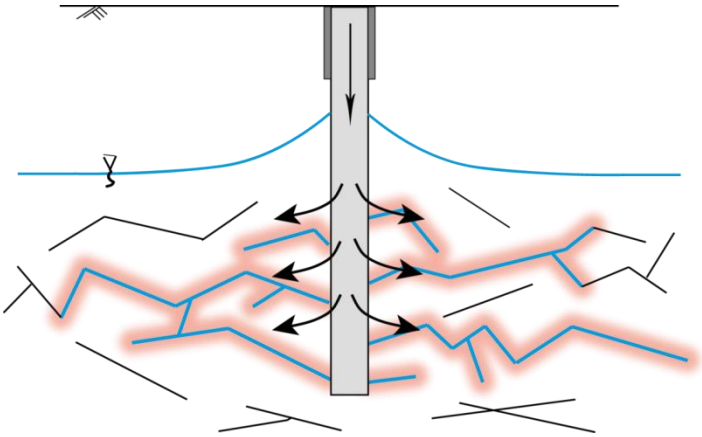


Figure 71: Schéma de principe de l'injection en push pull dans un aquifère fracturé.

Dans le cas d'un aquifère fracturé la solution injectée pénètre uniquement dans les fractures connectées (en bleu) et peut par la suite diffuser dans la matrice rocheuse environnante (en rouge). Les fractures non connectées (en noir) ne sont pas affectées par l'injection si la perméabilité du milieu est faible. L'injection engendre une augmentation locale du niveau piézométrique induisant un écoulement radial (surface piézométrique durant l'injection en bleu).

La solution de traçage dépend de l'objectif de l'essai mais elle est composée typiquement d'un traceur non réactif, et d'un ou plusieurs traceurs réactifs. Le volume et les quantités totales injectées doivent être connus. Durant la phase d'extraction, les échantillons sont collectés régulièrement pour établir des courbes de restitution des traceurs et des produits de réaction (Figure 72). La comparaison des courbes de restitution des traceurs réactifs et non réactifs permet une quantification de la réaction.

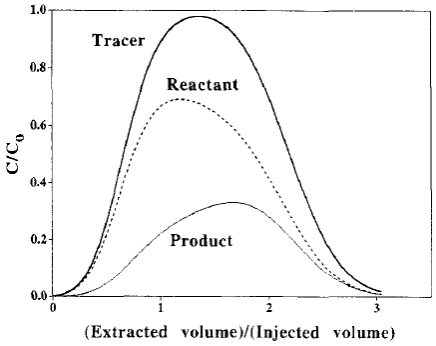


Figure 72: Courbe de restitution idéale pour un traceur et un réactif injecté ainsi que pour les sous-produits de réaction (Istok et al, 1997)

Dans le cadre de ces "push-pull", il est courant d'injecter dans un premier temps une solution de traçage puis de l'eau sans traceurs (appelé par la suite "chasseur") ce qui permet de pousser la première solution sans injecter des concentrations de traceur trop importantes. Il est aussi courant qu'après une phase d'injection, le traceur soit laissé en conditions ambiantes pour augmenter le temps de séjour de la solution dans le système. La chronologie de ces différentes phases ainsi que le chemin parcouru par la solution sont donnés Figure 73.

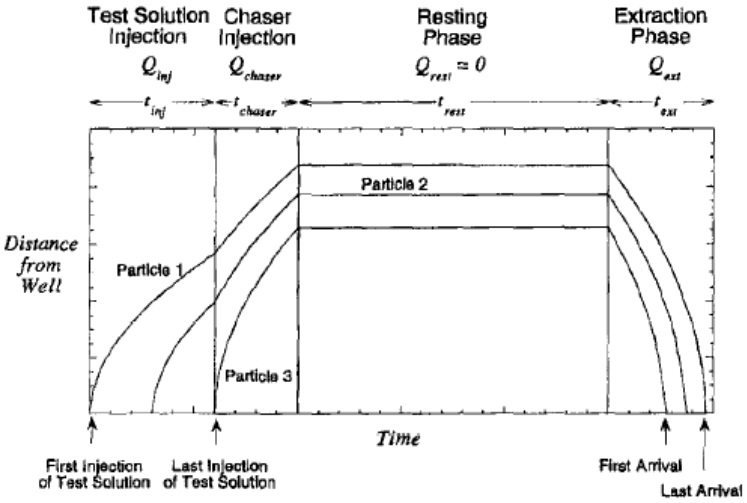


Figure 73: Représentation schématique du chemin parcouru par les particules migrant dans le milieu puis revenant vers le puits d'injection/extraction durant un test de "Push-Pull" (Haggerty et al., 1998)

Le volume total de l'aquifère investigué est :

$$V = (Q_{inj}t_{inj} + Q_{chaser}t_{chaser} - \pi r_w^2 b)/\theta \quad (1)$$

Avec :

Q_{inj}: Débit d'injection du traceur
T_{inj}: Temps d'injection
Q_{chaser}: Débit d'injection du chasseur (eau sans traceur)
T_{chaser}: Temps d'injection du chasseur
r_w: Rayon du puits
b: Epaisseur saturée

Les vitesses (v) d'écoulement en milieu homogène diminuent radialement en s'éloignant du puits selon l'équation suivante :

$$v = \frac{Q}{2\pi b\theta r} \quad (2)$$

Avec :

Q = Débit d'injection
r = Distance radiale au puits
θ = porosité

La position du front de réaction r_{inj} varie selon (cas d'un flux sphérique) :

$$r_{inj} = \left(\frac{3}{4}\frac{Q_{inj}\, t_{inj}}{\pi\theta} + r_w^3\right)^{1/3} \quad (3)$$

II. Matériel et méthodes

L'essai de push-pull réalisé consiste à injecter des nitrates et des bromures dans le puits F26 du site de Loyan déconnecté du site de pompage de Ploemeur-Kermadoye et choisi pour ces conditions réductrices (voir chapitre 1). Les chimies des eaux et la géologie de ces sites étant proches, les cinétiques qui seront mesurées ici sont théoriquement applicables au site de pompage principal permettant une application au site de Ploemeur-Kermadoye. De plus ce puits ne possède qu'une seule arrivée d'eau qui a été préalablement identifiée. Ce chapitre ne présente qu'un essai unique de push-pull car le temps nécessaire pour la caractérisation préliminaire (comprenant notamment des essais de traçage par transmission et présentée chapitre 1) n'a pas permis de renouveler l'expérience. D'autres essais sont en revanche déjà en projet.

1. Protocole expérimental

L'expérience de "push-pull" réalisée dans le puits F26 du site de Loyan consiste à injecter 200 L de solution contenant un traceur réactif (NO_3^-) et un traceur non réactif (Br^-) puis près de 1000 L d'eau du site ne contenant plus de traceurs. Le puits a été instrumenté de la façon suivante : la perche d'injection a été placée à 64 m de profondeur, la sonde nitrates S::CAN a été placée à 55m, la sonde multi-paramètres Troll 9500 à 50 m (Eh, pH, O_2) de profondeur et la pompe MP1 de pompage à 40 m. Celle-ci est surplombée par un capteur de pression STS à 30 m de profondeur. Un schéma de cette instrumentation est fourni Figure 74.

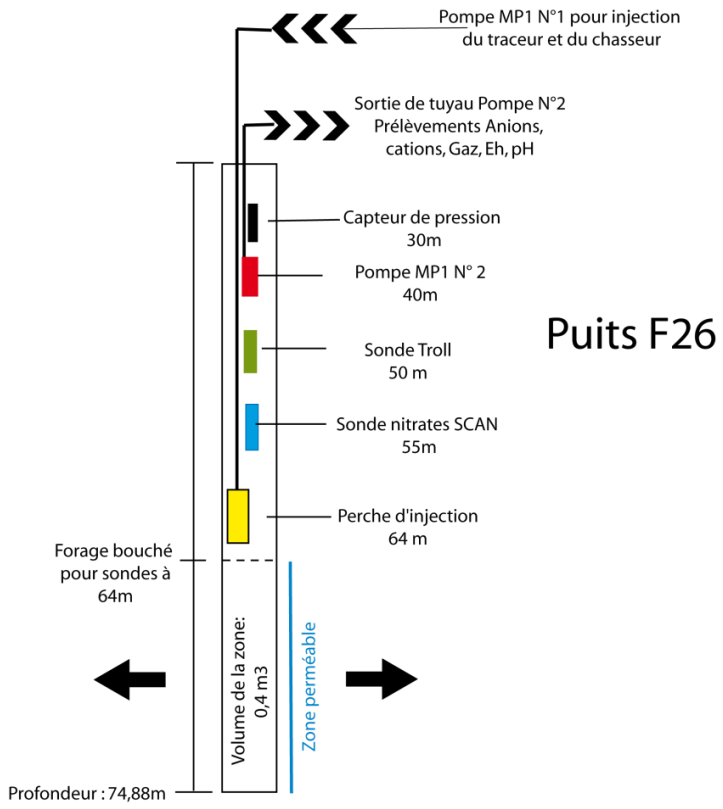


Figure 74: Instrumentation du puits F26

Le temps 0 considéré dans cette expérience correspond au début de l'injection du traceur. Celui-ci a été injecté pendant 14 min 40 s à un débit de 1 m^3/h pour un total de 180 L injectés, puis le chasseur est directement injecté pendant 55 minutes à un débit identique (total de 990 L injectés). Suite à cette injection le milieu est laissé au repos pendant 1 h 09 min avant la mise en pompage du puits pour la restitution des traceurs. Ce pompage de restitution a été effectué pendant 9 h 38 min, ce qui conduit à un temps maximum du traceur dans le milieu de 12 h. Durant le pompage, les échantillons ont été régulièrement prélevés pour des analyses de

cations, anions, carbone et gaz dissous effectuées ultérieurement en laboratoire. La chronologie détaillée des étapes est restituée dans le tableau suivant :

Temps en min	Etapes
0 14,66	Injection du traceur
15,83	Changement de pompe
70	Injection du chasseur
139	Temps de latence
720	Pompage de restitution et prélèvements

Tableau 12:Chronologie de l'expérience

2. Matériel

Les pompages et injections ont été effectués à l'aide d'une pompe immergée MP1 (Grundfos) à débit paramétrable de 0 à 2m^3/h. Les niveaux d'eau ont été suivis en continu dans chacun des puits grâce à des capteurs STS avec une fréquence d'acquisition de 30 s et ont été vérifiés par des mesures manuelles avec une sonde piézométrique.

Dans le puits F26, le suivi haute fréquence (une mesure toutes les 17 s) des concentrations en NOx a été effectué par un spectrophotomètre S::CAN dont le détail est donné dans le chapitre 3 de ce document. La température, la conductivité, le pH et l'oxygène dissous dans le puits d'injection/pompage ont été mesurés toutes les 10 secondes grâce à une sonde multi-paramètres Troll 9500 (WinSitu). Le suivi des paramètres pH, oxygène dissous, température, conductivité est également réalisé en sortie de pompage toutes les 20 minutes grâce à un boitier multi paramètres WTW composé d'un boitier WTW 315i et d'une sonde oxygène WTW CondOx.

Les injections de traceur et de chasseur sont effectuées à l'aide d'une perche d'injection métallique perforée de 1 m de long et de diamètre 2 cm. La perche est pourvue de deux concentrateurs (en haut et en bas) afin de limiter l'influence des possibles flux ambiants lors de l'injection. Le traceur est amené à la zone d'injection grâce à une pompe MP1 placée dans la cuve du traceur et passant par un tuyau de 2 cm de diamètre.

Figure 75: Instrumentation et équipement lors de l'essai de push-pull

3. Prélèvements et analyses chimiques

Les anions ont été prélevés en sortie du tuyau de pompage toutes les 10 minutes, les cations et les gaz dissous toutes les 20 minutes. Le carbone (organique et inorganique) a été prélevé toutes les 40 minutes.

Les échantillons prélevés ont été filtrés (Sartorius® 0,2µm) puis conservés au réfrigérateur à 5°C avant les analyses effectuées en moins de trois jours. Les volumes prélevés pour les analyses cations et anions sont de 5 ml. Les anions ont été analysés par chromatographie ionique avec un DIONEX DX 120 et les cations par ICP-MS (HP-4500). Les échantillons prélevés pour analyse par ICP-MS ont préalablement été acidifiés avec du HNO_3^-. Le carbone organique a été analysé par un analyseur carbone Shimadzu 5050A. Les gaz (N_2, N_2O, CH_4) sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (µGC/TDC thermal conductivity detector) comme décrit dans (Labasque and Aquilina, *in prep*).

4. Composition des eaux injectées

Préparation du traceur :

Le traceur a été réalisé avec 200 L d'eau du puits F26 à laquelle ont été ajouté 447,22 g de KBr (Fisher Scientific – Laboratory reagent grade) et 548,63 g de NaNO3 (Fisher Scientific – Analytical reagent grade) en poudre préalablement pesés avec une balance de précision. Ceci permet d'avoir initialement un traceur non réactif (Br^-) d'une concentration de 1,4 g/L et un traceur réactif (NO_3^-) d'une concentration de 2 g/L. Le détail de la composition du traceur est donné dans le Tableau 13.

Préparation du chasseur:

L'eau utilisée pour la préparation du chasseur a été pompée à 40 m de profondeur dans le puits F13 et stockée temporairement dans une cuve fermée de 1000 L. Les détails de sa composition sont fournis dans le Tableau 13. La cuve n'a été remplie que 1h avant sa réinjection pour éviter une oxygénation trop importante. Lors de son injection la concentration en oxygène dans le chasseur était inférieure à 1 mg/L. Le puits F13 a été choisi pour la préparation du chasseur pour :

1- Eviter l'injection d'une eau riche en oxygène et en nitrates (cas des puits F21 et Finc)
2- Eviter une perturbation importante des conditions chimiques du puits F26 peu perméable
3- Eviter d'utiliser un autre type d'eau pouvant contenir une forte concentration en oxygène pouvant avoir un effet limitant sur la réaction de dénitrification

Traceur	Anions	Elément	F	Cl	NO2	Br	NO3	S04	PO4
		Concentration (mg/L)	0,16	103,7	n.a.	1425,0	2030,0	31,1	0,05
	Cations	Élément	Na	Mg	Si	K	Ca	Mn	Fe
		Concentration (mg/L)	80,0	32,3	18,9	7,15	28,9	0,95	21,5
		Paramètre	O2	pH	T°(°C)	Eh (mV)	Cond (uS/cm)		IC (mg/L)
		Valeur	0,44	7,20	15,50		6377,00		22,80
Chasseur	Anions	Elément	F	Cl	NO2	Br	NO3	S04	PO4
		Concentration (mg/L)	0,17	96,9	n.a.	0,33	4,52	44,94	0,09
	Cations	Elément	Na	Mg	Si	K	Ca	Mn	Fe
		Concentration (mg/L)	65,5	21,1	15,55	7,03	18,7	0,4	0,8
		Paramètre	O2 (mg/L)	pH	T° (°C)	Eh (mV)	Cond (us/cm)		IC (mg/L)
		Valeur	0,55	6,30	13,80		535,00		18,9

Tableau 13:Composition du traceur et du chasseur

5. Conditions initiales

La réalisation d'essais de traçage réactifs ou de push-pull réactifs nécessite impérativement une connaissance précise de la chimie du site dans ses conditions initiales. Dans ce type d'expériences, l'évolution des concentrations en éléments chimiques est l'information prépondérante. Or, en raison de l'injection d'un traceur dans un milieu donné, nous avons systématiquement à évaluer un mélange entre eaux de différentes compositions. L'évaluation de ce mélange est aisée dans le cadre de l'utilisation de traceurs artificiels (traceurs fluorescents par exemple) mais peut devenir compliquée dans le cadre de l'utilisation de

traceurs naturels et à fortiori réactifs car ceux-ci sont initialement présents dans le milieu. Ceci est d'autant plus important dans le cadre de l'étude des milieux hétérogènes où, comme nous l'avons observé dans la partie de caractérisation du site chapitre 1 de cette partie, une forte hétérogénéité chimique peut exister entre des puits proches géographiquement. Dans ce cas, les mélanges d'eaux de plusieurs puits ne sont plus bipolaires mais comprennent un nombre indéterminé de pôles chimiques. L'identification précise de chacun des pôles, dans ce cas où le milieu est sous-échantillonné, est peu réaliste mais chaque information peut prendre d'autant plus d'importance. Les paramètres physiques ont été présentés précédemment (chapitre 1) et nous ne ferons ici que le bilan chimique avant le début de l'expérience.

Les figures suivantes présentent spatialement les résultats d'analyses d'anions (Figure 76) et cations (Figure 77).

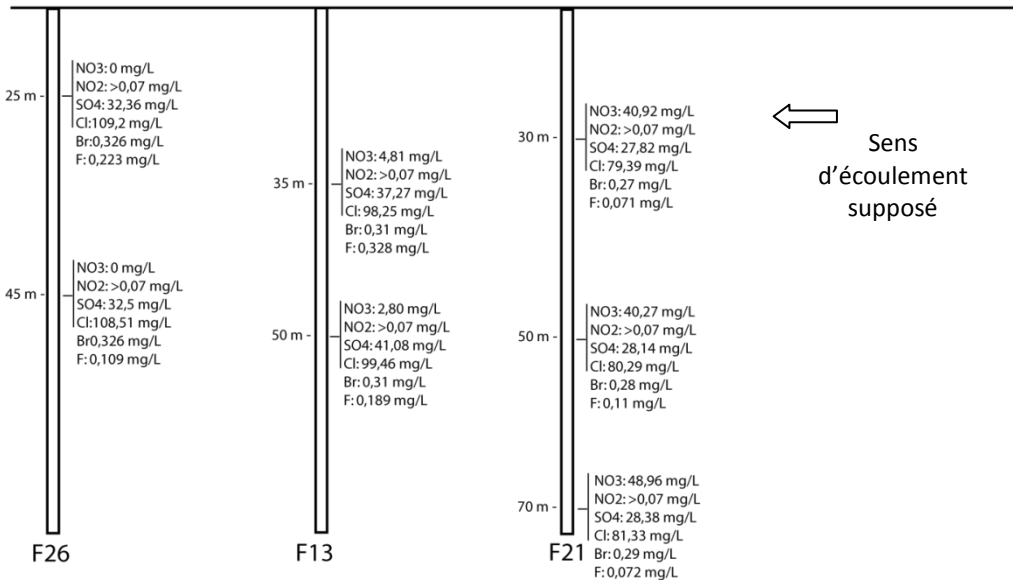


Figure 76: Concentration en anions dans les puits avant expérience (14/04/2010) ; les distances entre les puits ne sont pas respectées

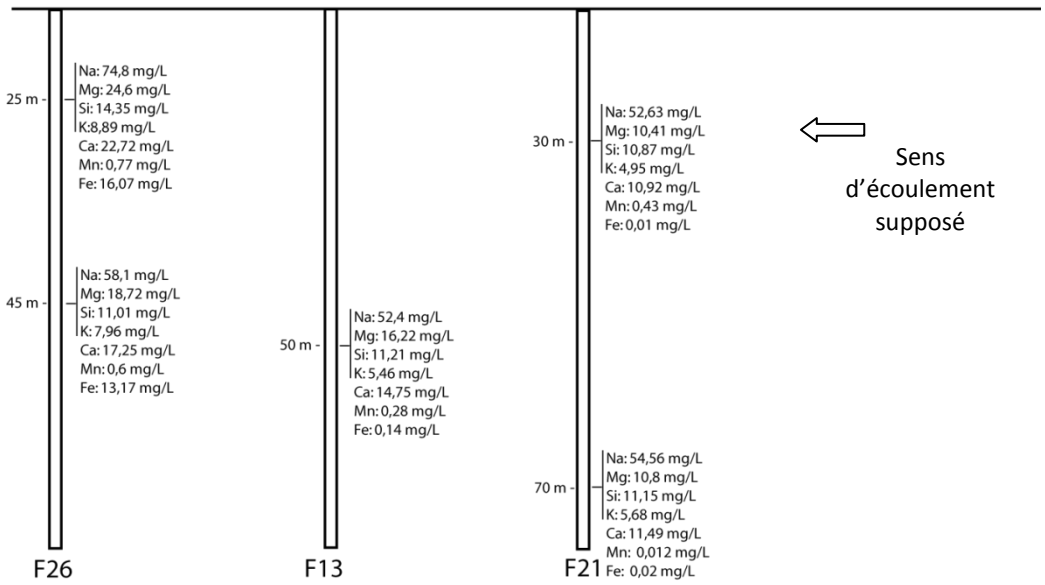


Figure 77: Concentration en cations dans les puits avant expérience (14/04/2010) ; les distances entre les puits ne sont pas respectées

Les prélèvements montrent une forte hétérogénéité chimique du site avec deux pôles principaux et une possible zone de mélange (puits F13):

- Le premier pôle, puits F21 ; possède de fortes concentrations en nitrates (>40 mg/l) et de faibles concentrations relatives en sulfates (28 mg/L), chlorures (80 mg/L) et bromures (0,28 mg/L).
- Le second ; puits F26 ne contient pas de nitrates et a des concentrations en sulfates (32 mg/L), chlorure (109 mg/L) et bromures (0,23 mg/L) plus importantes.
- Le puits F13 pourrait correspondre à une zone de mélange entre ces deux pôles excepté pour les valeurs en sulfates plus importantes (41mg/L à 50 m).

La comparaison avec un relevé effectué en juin et avril 2009 montre peu de variations temporelles au niveau du puits F26 mais des variations importantes pour les autres puits au niveau de la concentration en nitrates.

Des mesures de carbone organique et de carbone inorganique ont été effectuées dans les puits. Aucune concentration en carbone organique supérieure à 0,1 mg/L n'a été détectée. Les concentrations en carbone inorganique en fonction du puits et de la profondeur sont données dans le Tableau 14. L'eau est plus chargée en éléments de F21 vers F26 avec une diminution des concentrations en oxygène et nitrates (données présentées dans le chapitre 1 de cette partie). Ces différences entre les puits semblent indiquer une transition entre les puits F21 vers F26 via F13.

Puits	Profondeur	Concentration
F21	30	10,96
F21	70	11,42
F13	35	18,75
F13	50	18,82
F26	25	21,04
F26	45	20,91

Tableau 14: Concentration en carbone inorganique dans les puits

III. Résultats

1. Restitution des traceurs

a. Courbes de restitution et quantification de la réaction

Les courbes de restitution des anions lors de la phase de récupération sont données Figure 78.

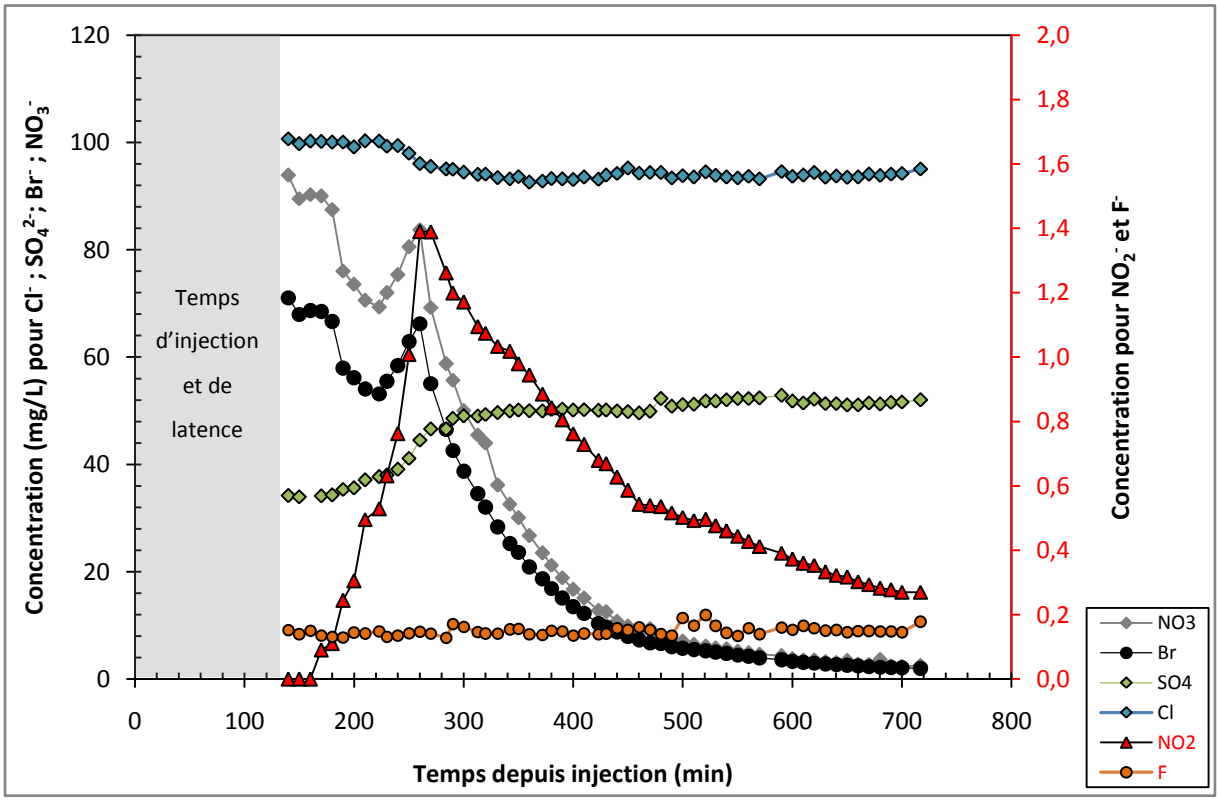


Figure 78: Courbe de restitution des anions lors du pompage de récupération ; les fluorures et nitrites sont sur l'axe de droite

Cette Figure 78 montre la présence de bromures et nitrates dès la première mesure de la mise en pompage. Ceci est dû à une injection à un débit trop important qui a fait remonter une

partie du traceur au dessus de la perche d'injection et donc de la zone transmissive. Ainsi une partie du traceur est restée dans le puits. Ceci a été observé par d'autres sondes présentes dans le forage. Nous pouvons considérer que le pic de restitution du traceur a lieu au temps 260 minutes après l'injection. Par la suite on observe une décroissance des nitrates et bromures. On observe aussi sur cette figure une forte production de nitrites, liée à la réactivité dans le milieu. L'augmentation en sulfates peut être attribuée principalement à un phénomène de mélange. Cependant, une production liée à une réaction de dénitrification autotrophe avec des sulfures n'est pas à exclure. Ceci sera discuté section III.3 de ce chapitre. Les chlorures montrent une légère baisse anti-corrélée avec les sulfates et les fluorures ne montrent pas de variations importantes mais une légère augmentation des concentrations.

La comparaison des concentrations normalisées (C/C_0 ; où C_0 est la concentration injectée) et de l'évolution de leurs rapports permet de quantifier la réaction (Figure 79).

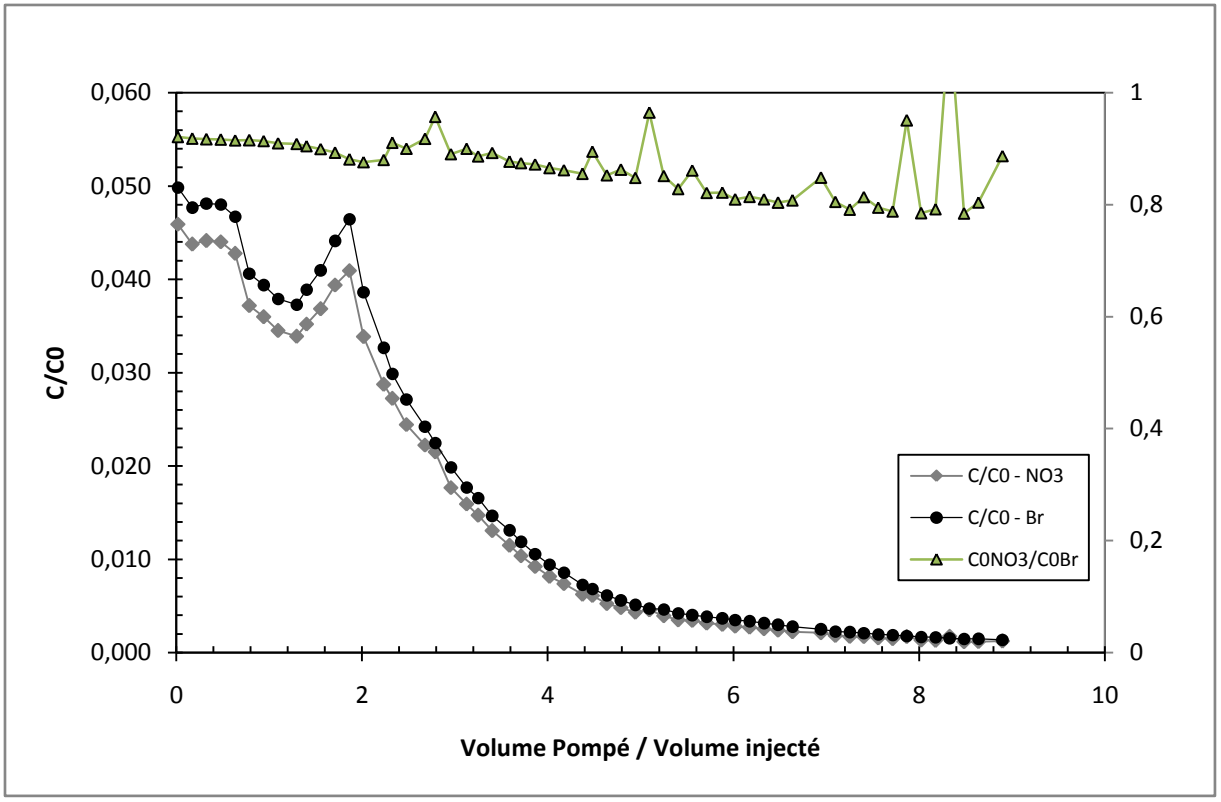


Figure 79: Evolution des concentrations C/CO des bromures et nitrates et évolution de leurs rapports $(C/C0_{NO3})/(C/C0_{Br})$

On remarque sur cette figure que la concentration relative en nitrates est dès les premiers temps inférieurs à la concentration en bromure. Ceci montre que la réaction démarre directement après l'injection ou du moins durant la phase de latence. La baisse du rapport

[C/C_0 NO_3^-] / [C/C_0 Br^-] montre que la réaction est de plus en plus importante avec le temps passé dans le milieu. L'évolution de ce rapport est linéaire et indique comme supposé que le temps de résidence a un contrôle sur les concentrations. Les faibles concentrations relatives initiales (C/C_0=0,05) sont dues à des phénomènes de dilution lors de l'injection du traceur dans le puits. Cette dilution a été mesurée avec la sonde S::CAN placée dans le puits.

La courbe de restitution du protoxyde d'azote (N_2O), Figure 80, montre un comportement similaire aux nitrites indiquant que la réaction de dénitrification n'est pas complète et que les sous-produits de réaction restent présents dans le milieu.

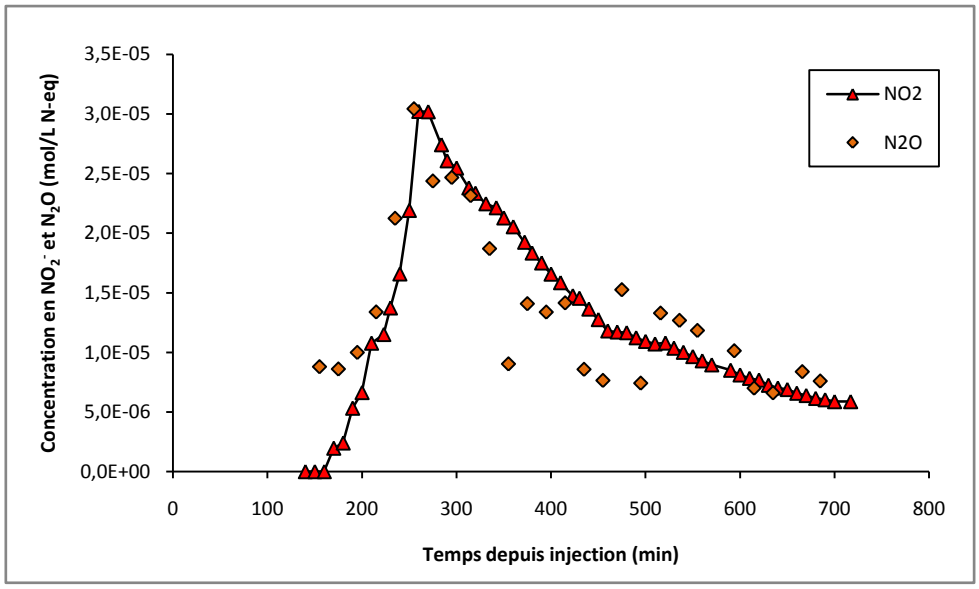


Figure 80: Evolution de N_2O et NO_2^- lors du pompage de restitution (en mol/L N-eq)

b. Bilan de Masse

Les courbes de masse cumulée obtenues lors de la récupération sont présentées Figure 81. Les données sont présentées en masse extraite sur masse injectée pour les nitrates et bromure (axe de gauche) et en masse molaire équivalent azote pour les nitrites et le protoxyde d'azote (axe de droite).

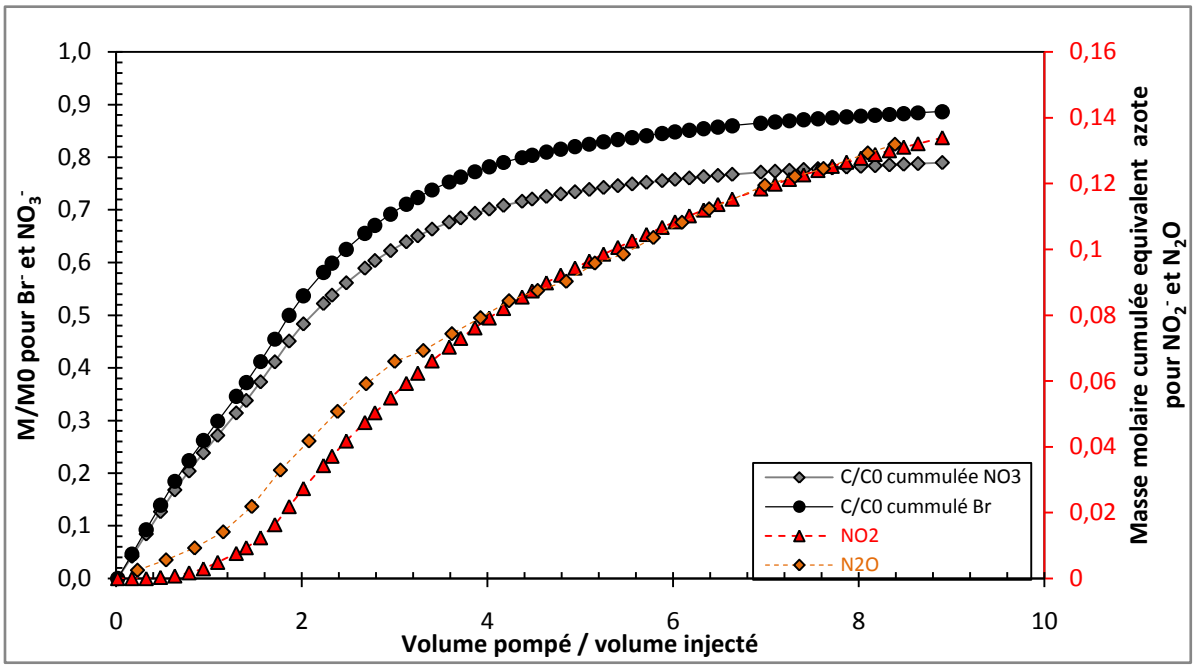


Figure 81: Courbes de masse cumulée pour NO_3^- ; Br^- ; NO_2^- et N_2O. Les données sont présentées en masse extraite sur masse injectée pour les nitrates et bromure (axe de gauche) et en masse molaire équivalent azote pour les nitrites et le protoxyde d'azote (axe de droite)

La masse totale d'azote introduite dans le milieu sous forme de nitrates est de 385,81g (NO_3^-) soit 6,22 moles d'azote N. La comparaison des courbes de restitution des bromures et des nitrates indique une consommation de 9,72 % de la masse initiale de nitrates injectée (0,6 moles). La réaction de dénitrification est une réaction se produisant par étapes suivant :

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$$

Pour pouvoir comparer ces éléments, les éléments sont traités en équivalents azote [NO_3^--Neq= NO_3^- /4,426 ; NO_2^--Neq=NO_2^-/3,284; N_2O-Neq=N_2O/1,57; N_2-Neq=N_2*2]. De ces éléments seul NO n'a pas été suivi par manque de moyens techniques.

Masse de NO_2^- récupérée:

A la fin du pompage 0,134 moles d'azote présent sous forme de nitrites ont été récupérées. Cette masse de nitrite récupérée correspond à 2,15% de la quantité d'azote introduite dans le milieu.

Masse de N_2O récupérée

0,0659 moles de N_2O ont été récupérées durant le pompage (considérant qu'il n'y a pas de bruit de fond) ce qui représente 2,12 % de la quantité d'azote introduite.

La comparaison des rapports moles récupérées / moles introduites NO_3^- (en moles) et M/M0 Br^- montre un écart de 9,72 % de la masse (soit 0,6045 moles). Cette masse de nitrates a été transformée en sous-produits. En soustrayant la production de nitrite et de protoxyde d'azote il reste donc 0,4562 moles transformées en N_2 ou NO. En considérant que la majorité de cette quantité est transformée en N_2 (NO n'étant pas mesuré et rarement observé) elle induirait une augmentation de concentration moyenne représentant environ 5% de la concentration initialement présente dans le milieu. L'observation d'une augmentation de concentration de cet ordre de grandeur semble confirmer cette production (Figure 82).

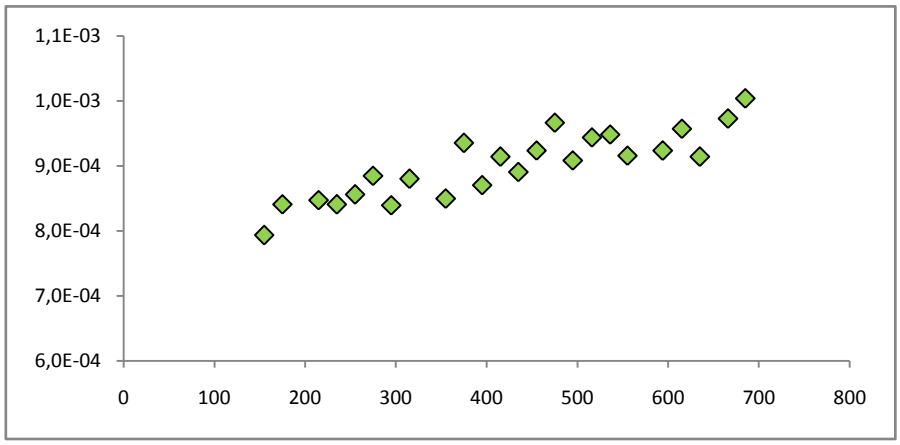


Figure 82: Evolution du diazote au cours du pompage

Le bilan de masse azote n'est donc pas complet mais est cohérent avec une dégradation de près de 10% de la masse molaire introduite.

2. Identification de la réaction

Les phénomènes de mélange ont été évalués en comparant les rapports des cations suivants (Cl, Li, Ca, Mn, Mg), les éléments Br, Na, K ne pouvant être utilisés pour cette évaluation en raison de leur présence dans la solution de traçage. Bien que pouvant être sujet à des phénomènes de sorption (excepté Cl), tous ces éléments indiquent un mélange à deux pôles composé des chimies représentatives des puits F26 et F13 (présentées dans le chapitre 1). La Figure 83 présente l'évolution de ce mélange pour les chlorures et sulfates. Les données sont ici séparées en deux séries temporelles (entre 0 et 450 min après injection et après 450 min après injection). Alors que la première série de données indique clairement un mélange, la seconde série présente des concentrations légèrement plus importantes en sulfates sans évolution des chlorures. Des concentrations en sulfates supérieures à 50 mg/L (cas de la seconde série) n'ont jamais été observées sur le site en conditions ambiantes. Ceci indique

donc une légère production de sulfates durant l'expérimentation malgré une dominance de l'augmentation de sulfates liée à un phénomène de mélange.

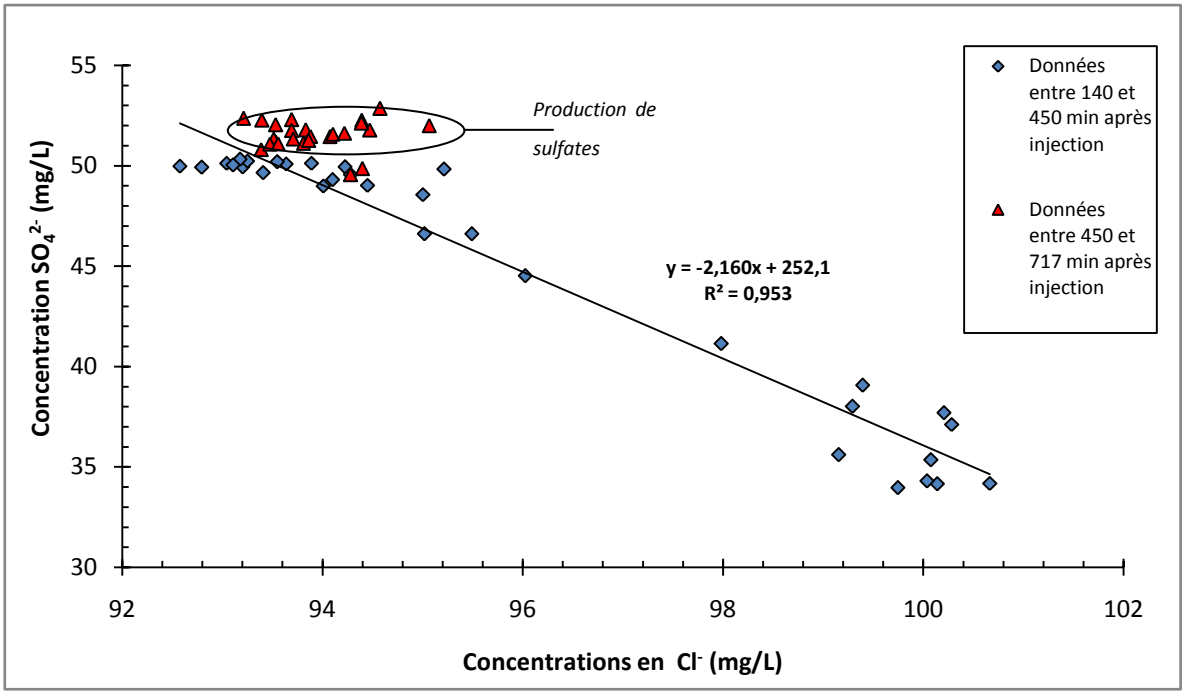


Figure 83: Evolution du rapport Cl^- / SO_4^{2-}

Le second élément non corrélé linéairement sur une droite de mélange à deux pôles est le fer total. Cependant la concentration de fer total est corrélée avec la consommation en nitrates (NO_3^- $_{Consommé}$ = ($C/C0_{NO3}$ - $C/C0_{Br}$) * Masse molaire)(Figure 84).

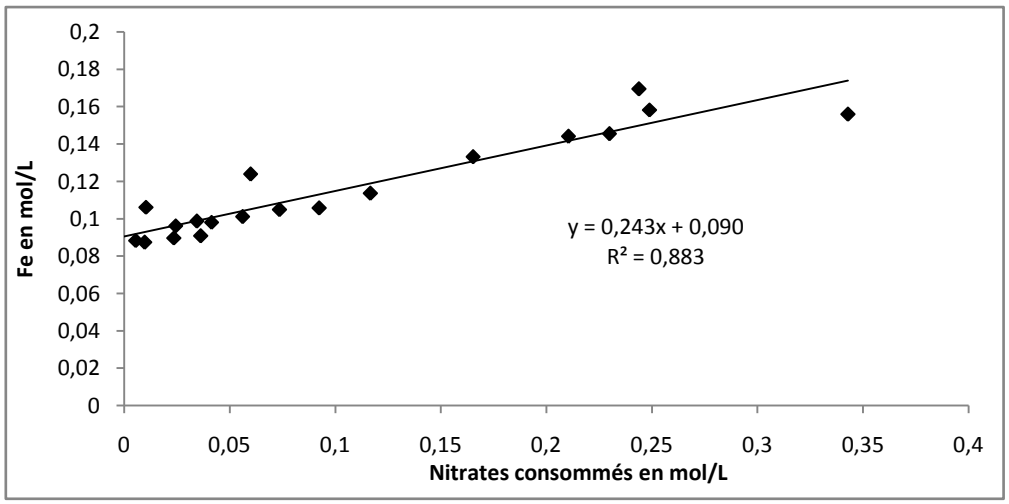


Figure 84: Rapport NO_3^- $_{consommé}$ / Fe $_{total}$ en mol

[NO_3^- $_{Consommé}$ = ($C/C0$ $_{NO3-}$ - $C/C0$ $_{Br-}$) * Masse molaire]

L'évolution de ces rapports indique donc la réaction suivante avec oxydation de la pyrite

$$5FeS_2 + 14NO_3^- + 4H^+ \rightarrow 7N_2 + 10SO_4^{2-} + 2H_2O + 5Fe^{2+} \quad (4)$$

$$5\ Fe^{2+} + NO_3^- + 7\ H_2O \rightarrow 5\ FeOOH + ½\ N_2 + 9\ H^+ \quad (5)$$

Ou avec oxydation d'un autre sulfure de fer tel que le prédit la réaction suivante :

$$FeS + H^+ \rightarrow Fe^{2+} + HS^- \quad (6)$$

$$3\ H^+ + 5\ HS^- + 8NO_3^- \rightarrow 5\ SO_4^{2-} + 4\ N_2 + 4\ H_2O \quad (7)$$

Les stœchiométries de ces réactions ne sont toutefois pas respectées en raison des possibles précipitations de fer. Il est possible que la réaction observée chapitre 2 de cette partie incluant la biotite ait une influence. Cependant, la faible augmentation en fluorures ne permet pas de conclure à une importance prépondérante de celle-ci.

3. Cinétiques de réaction

a. Consommation des nitrates

Les taux de dénitrification suivant une cinétique de premier ordre (taux de réaction fonction de la concentration en substrat) ont été estimés par la méthode présentée dans (Haggerty et al., 1998). Cette méthode est basée sur des hypothèses simplifiées (indépendantes de la porosité et dispersivité de l'aquifère). Ceci permet d'estimer les taux de réaction sans avoir recours à un modèle de transport réactif. Cette méthode est basée sur deux hypothèses principales : *1)* la solution injectée est bien mélangée dans la portion de l'aquifère investiguée durant le test et *2)* les facteurs de retard des deux traceurs sont identiques. Concernant la seconde hypothèse, (Schroth et al., 1997) ont démontré que NO_3^- et Br^- avaient les même propriétés de transport. Ces hypothèses sont couramment utilisées dans les réacteurs. Dans ce cas la concentration relative (concentration mesurée c divisé par la concentration injectée c_{inj} d'un réactif $c_d(t)$) suit une cinétique de premier ordre qui peut être calculée suivant :

$$C_d(t) = C_{tr}(t)e^{-kt} \quad (8)$$

Où $c_{tr}(t)$ est la concentration relative du traceur non réactif et k une constante de réaction. L'équation (1) peut ensuite être réécrite de la manière suivante :

$$\ln\left(\frac{C_d(t)}{C_{tr}(t)}\right) = -kt \quad (9)$$

Dans ce cas simple, il est possible d'obtenir une estimation de *k* en mesurant $c_{tr}(t)$ et $c_d(t)$ et en calant une fonction linéaire sur une représentation graphique de $ln\ (c_d(t)/c_{tr}(t))$ en fonction du temps.

Dans le cas d'un push-pull où la solution est injectée comme un pulse de temps fini (t_{inj}) et rapidement mélangée dans l'aquifère, la concentration relative du réactif à la fin de l'injection de la solution est donnée par :

$$c_d(t) = \frac{c_{tr}(t) \int_0^{t_{inj}} Q_{inj}\, e^{-kt}\, dt}{\int_0^{t_{inj}} Q_{inj}\, dt} \qquad (10)$$

Où Q_{inj} peut être une fonction de t.

Pour un Q constant en combinant l'équation (8) et (10) on obtient :

$$c_d(t^*) = \frac{c_{tr}(t^*)}{kt_{inj}} [e^{-kt^*} - e^{-k(t_{inj} + t^*}] \qquad (11)$$

Où t^* est le temps écoulé depuis la fin de l'injection. Cette équation (11) peut être réécrite sous une forme permettant d'estimer *k* seulement à partir de la concentration normalisée du traceur et du réactif défini comme le ratio de deux concentrations relatives $c_d(t^*)/c_{tr}(t^*)$:

$$\ln\left(\frac{c_d(t^*)}{c_{tr}(t^*)}\right) = \ln\left[\frac{1-e^{-kt_{inj}}}{kt_{inj}}\right] - kt^* \qquad (12)$$

En utilisant l'équation (12) on peut ainsi obtenir une estimation du coefficient *k* en mesurant $c_{tr}(t^*)$ et $c_d(t^*)$ durant un push-pull et en représentant graphiquement $ln(c_d(t^*)/c_{tr}(t^*)$ en fonction du temps t^*(Haggerty et al., 1998).

L'application de cette procédure est effectuée Figure 85 (droite rouge). L'hypothèse de mélange total de la solution de traçage étant connue pour surestimer les taux de réaction le calcul de ce taux de réaction a aussi été effectué en utilisant un modèle de piston (Schroth and Istok, 2006). Ce modèle considère qu'il n'y a pas de mélanges entre les masses d'eaux injectées. En raison du flux radial le premier volume injecté est le dernier volume extrait.

Ce modèle nécessite de calculer le temps de résidence de chaque échantillon ($t_{r,pf}$) selon :

$$t_{r,pf} = t_i - \frac{\left(1-\frac{M_i}{M_{ext}}\right)}{M_{ext}} T_{inj} \tag{13}$$

Où M_i est la masse extraite au temps t_i et M_{ext} est la masse totale extraite. Le coefficient k de réaction s'obtient ensuite suivant :

$$\ln\left(\frac{c_d(t_i)}{c_{tr}(t_i)}\right) = -k t_{r,pf} \tag{14}$$

Le calage réalisé sur les données est présenté Figure 85.

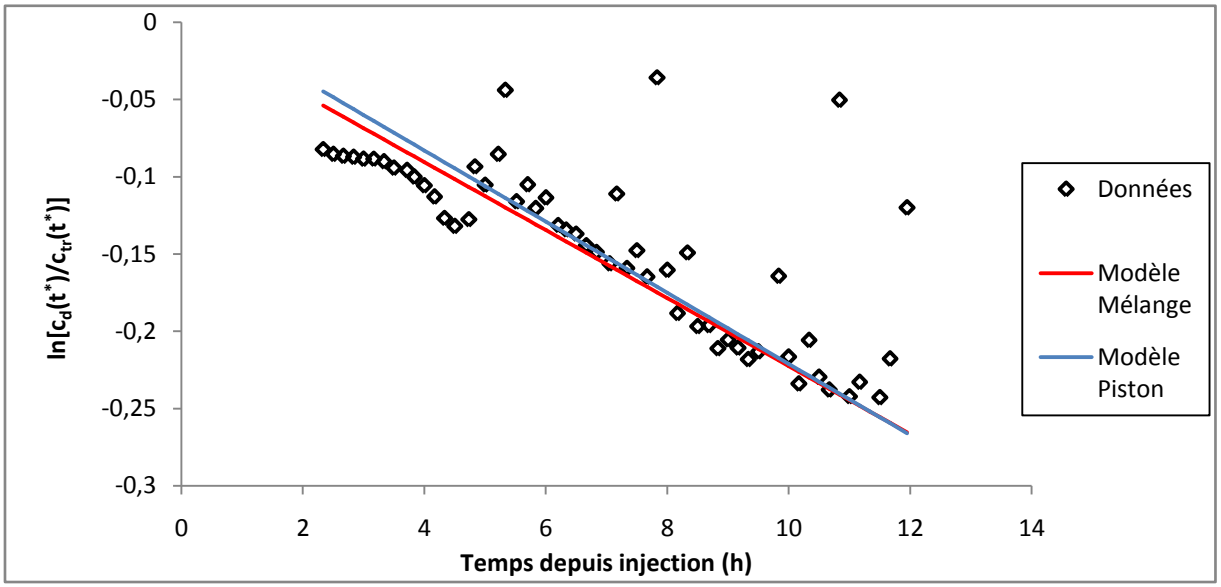


Figure 85: Estimation du coefficient k par solution définie dans (Haggerty et al., 1998)

Le calage du modèle a été effectué automatiquement (données entre les temps 4,4 h et 12 h ; les 4 points les plus dispersés n'étant pas pris en compte) et permet d'estimer un coefficient k de 0,022 hr^{-1} (écart type de 0,0014) pour le modèle homogénéisé et 0,023 hr^{-1} pour le modèle piston. Les estimations obtenues pour les deux modèles sont très proches. Ceci implique que les conditions d'homogénéisation de la solution n'ont que peu d'influence. Le coefficient obtenu est un ordre de gradeur moindre que ceux estimés dans (Istok et al., 1997; McGuire et al., 2002) dans le cadre de push pull dans des aquifères contenant des hydrocarbures. Cette différence est cohérente et correspond aux différences habituellement observées entre dénitrification hétérotrophe et autotrophes (Korom, 1992).

La détermination de ce coefficient permet une comparaison avec les données de batchs présentées dans le chapitre 2 de cette partie en se basant sur l'équation (8). Dans le cas des

batchs, les coefficients k sont proches de 0,0035 hr^{-1}. Ces écarts courants entre expérimentations in situ et de laboratoire peuvent provenir d'un mauvais mélange dans les batchs ou d'une limitation de la réaction par un autre élément. En effet il a été montré dans les batchs que la concentration en nitrates n'était pas limitante mais qu'un ralentissement de la réaction avait lieu.

b. Cinétiques de production des sous-produits de réaction (NO_2^- & N_2O)

Le protoxyde d'azote est connu pour être un important gaz à effet de serre. Celui-ci peut être produit par des réactions de dénitrification. Pour cette raison différentes recherches visant à quantifier sa production dans les sédiments ou les aquifères ont vu le jour. Ainsi Silvennoinen et al. reportent que cette production est en lien avec la concentration de nitrates dans des expériences de laboratoire utilisant des sédiments de rivière (Silvennoinen et al., 2008). Weymann et al. reportent aussi des cinétiques de premier ordre avec les nitrates dans des expériences de laboratoire utilisant les roches d'un aquifère sableux (Weymann et al., 2010). Laverman et al. reportent en revanche des cinétiques d'ordre zéro avec des sédiments (Laverman et al., 2010). Les mesures in situ sont plus rares. Weymann et al., par la mesure de l'excès de N_2 et les concentrations en N_2O, reconstituent les concentrations initiales de nitrates pour estimer les taux de production (Weymann et al., 2008). Cette méthode bien qu'efficace induit des incertitudes au niveau de la concentration initiale en nitrates qui nécessitent d'être estimées. Bien que montrant clairement le lien entre les nitrates et le protoxyde d'azote produit, ces résultats in situ ne permettent pas un accès aux paramètres cinétiques des réactions. De plus, bien que Weymann et al. (2010) montrent une bonne cohérence entre les cinétiques de réaction en laboratoire et les concentrations observées sur site, transposer des cinétiques obtenues au travers de batchs à l'échelle du site est toujours sujet à controverses.

Nous avons vu section III.1.a que la consommation de nitrates entrainait une production de NO_2^- et N_2O. L'apparition de ces éléments est contrôlée par des d'enzymes microbiennes. Les réactions enzymatiques sont connues pour suivre les cinétiques de Michaelis-Menten (données par l'équation 15).

$$v = \frac{V_{max}\, S}{k_m + S} \qquad (15)$$

Où v est la vitesse initiale de la réaction, V_{max} est le taux maximum d'utilisation du substrat, S la concentration de substrat et k_m la constante de Michaelis. Cette dernière correspond à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié du taux maximum d'utilisation du substrat (i.e $v = V_{max}/2$). Quand $k_m >> S$ cette équation est réduite à une expression linéaire :

$$v=(V_{max}/k_m)S=kS \tag{16}$$

Où k est le coefficient de réaction du premier ordre. De même si $S>>K_m$ l'équation se réduit à $v=V_{max}$ et la vitesse de réaction est constante (cinétique d'ordre 0) (Bekins et al., 1998). Nous avons observé en batchs (Chapitre 2) que les taux de production des nitrites étaient directement liés à la consommation de nitrates et que les rapports nitrites produits sur nitrates consommés étaient constants à l'échelle de temps de l'expérience. Les coefficients de Michaelis-Menten peuvent donc être considérés comme constants et être déterminés à partir d'un essai de "Push-pull" (Istok et al., 2001). L'utilisation de l'équation de Michaelis-Menten est de plus justifiée par le fait qu'il n'existe pas de consensus clair sur l'ordre de ces cinétiques de réaction dans la littérature (premier ordre pour (Silvennoinen et al., 2008; Weymann et al., 2010) et ordre zéro pour (Laverman et al., 2010)). Ces ordres de réaction peuvent être considérés comme des cas particuliers des cinétiques de Michaelis-Menten (Bekins et al., 1998).

Comme énoncé précédemment dans le cadre d'un modèle de type piston, le temps de résidence d'un certain volume d'eau peut être calculé par l'équation (13). Pour chaque échantillon nous calculons le temps de résidence par l'équation (13) et nous calculons la vitesse de réaction initiale v_i comme le taux de production $v_i=[Cprod]_i/t^*_i$, où $[Cprod]$ est la concentration du produit dans l'échantillon i. En représentant graphiquement les valeurs de v_i et $Cprod_i$ il est possible d'examiner l'influence de la concentration de substrat sur la vitesse de la réaction (Istok et al., 2001). Cette procédure a été réalisée pour obtenir les informations représentant les productions de NO_2^- (Figure 86) et N_2O (Figure 87).

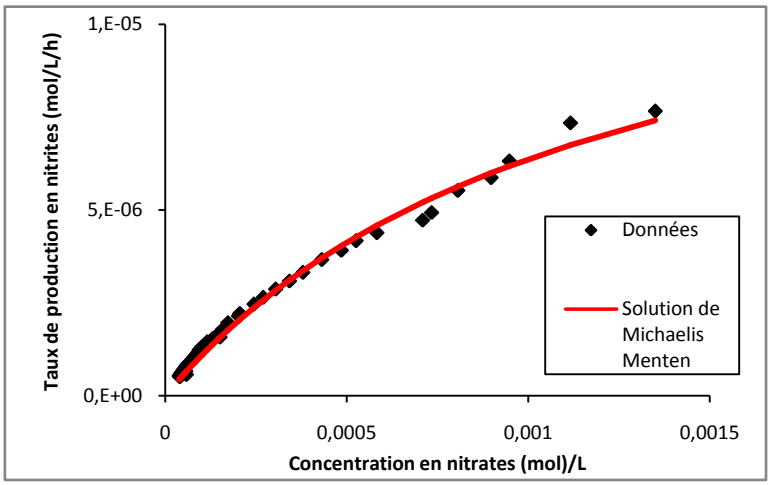


Figure 86: Production de nitrites en fonction de la concentration en nitrates; Les points représentent les données et la ligne continue rouge le calage de l'équation de Michaelis Menten pour la détermination de k_m et V_{max}

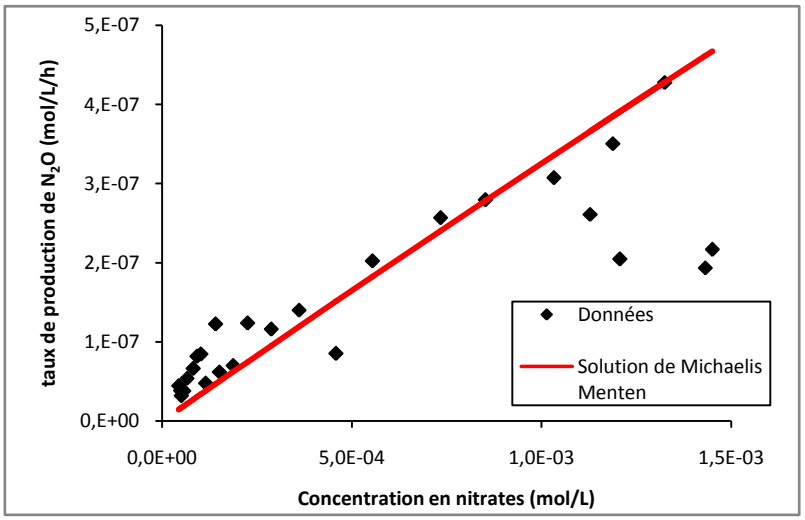


Figure 87: Production de protoxyde d'azote en fonction de la concentration en nitrates; Les points représentent les données et la ligne continue rouge le calage de l'équation de Michaelis Menten pour la détermination de k_m et V_{max}. Les données non utilisées pour le calage correspondent aux premiers temps de l'expérience.

Les paramètres obtenus sont V_{max}= 1,4.10^{-5} mol/L/h et k_m=1,2.10^{-3} mol/L pour la formation des nitrites et V_{max}= 1,4.10^{-5} mol/L/h et k_m= 4,2. 10^{-2} mol/L pour la formation du protoxyde d'azote. La formation du protoxyde d'azote peut être simplifiée sur cette gamme de valeurs par une réaction de premier ordre (augmentation linéaire du taux de production en fonction de la concentration en nitrates et $k_m >> S$). Une gamme plus grande de concentrations en nitrates devrait être testée pour définir avec plus de précision ces paramètres. Les taux de production sont ici dans la gamme supérieure de ceux observés par (Silvennoinen et al., 2008; Weymann et al., 2010) en raison d'un pourcentage de protoxyde d'azote produit sur nitrates consommés de 2% ici contre une gamme comprise entre 0,6% et 0,4% dans (Weymann et al., 2010). Ces résultats sont cohérents car des variations d'un ordre de grandeur sont observables en utilisant

les mêmes matériaux (eau et sédiments) dans des conditions expérimentales différentes (Laverman et al., 2010) et que les productions de protoxyde d'azote sont supérieurs dans le cas de réactions autotrophes en comparaison à des réactions hétérotrophes (Weymann et al., 2010). De plus ces résultats sont difficilement comparables dans la littérature car il s'agit ici de la première évaluation directe des cinétiques de production de protoxyde d'azote *in situ*.

4. Application des cinétiques de réactions aux sites de Ploemeur et Loyan

Les études précédentes (Ayraud et al., 2006; Tarits et al., 2006) sur le site de Ploemeur-Kermadoye ont permis de montrer l'existence d'une réaction de dénitrification sur le site. Cependant par manque d'informations sur les cinétiques de réaction l'influence de cette réaction sur les concentrations en nitrates à l'échelle du site ne reste que partiellement connue. Les mesures *in situ* par push-pull ont permis d'estimer les cinétiques de réaction du site. Dans les milieux hétérogènes, les vitesses d'écoulement varient sur plusieurs ordres de grandeur et ont donc une influence sur le temps de résidence des masses d'eau qui peut exercer un contrôle sur la réactivité. Nous allons estimer dans cette section les distances caractéristiques de réactions sur le site qui correspondent aux distances nécessaires pour la dégradation des nitrates dans les conditions hydrogéologiques des sites d'études (transmissivité, porosité, charge hydraulique). La première application vise à estimer l'influence de la réaction sur les concentrations lors de la transition des masses d'eaux sur le site de Loyan du puits F21 vers F26 via F13. Dans ce cas, la réaction est évaluée en conditions ambiantes (écoulement naturel sans pompage). Il est considéré sur le site de Ploemeur-Kermadoye qu'une part importante de l'eau pompée provient d'eaux récentes chargées en nitrates et passant par une zone de fracturation localisée (Bonel, 2007). La seconde application vise à estimer le potentiel de dénitrification lors des transferts de masse dans cette zone et ainsi à estimer le potentiel abattement de concentration par dénitrification.

a. Application au site de Loyan

Nous avons observé Figure 76 que la chimie en conditions naturelles des puits F21 et F26 semble indiquer une transition des masses d'eau de F21 vers F26 où F13 représente un point intermédiaire (Figure 76). On observe une baisse de concentration linéaire des éléments conservatifs entre ces puits. Cependant, les concentrations en nitrates ne suivent pas ce

mélange et présentent des concentrations très faibles (0mg/L en F26 et 2,8 mg/L en F13). Grâce aux cinétiques de réactions définies section 4, nous allons évaluer les capacités de réduction des nitrates entre ces puits. En conditions ambiantes, les vitesses de Darcy peuvent être estimées par la loi de Darcy (16) :

$$q = K\frac{\Delta h}{L} \tag{17}$$

Avec :

q= Vitesse de Darcy

K = Perméabilité (m/s)

Δh/L = Gradient piézométrique

Les vitesses d'écoulement réelles sont données par la relation suivante :

$$v = \frac{q}{\theta} \tag{18}$$

Avec : *θ= porosité*

Une transmissivité globale de la zone a été estimée à 2.10^{-4} m^2/s par essai de pompage. Une épaisseur de la zone fracturée a été estimée à 10 m par débitmétrie de puits (Chapitre 1), ce qui induit une conductivité hydraulique de 2.10^{-5} m/s.

La différence de niveau piézométrique de 10 cm est mesurée entre les puits F21 et F13 pour une distance de 2,94 m. La porosité a été estimée à 1,7 % par l'essai de traçage présenté chapitre 1. Ainsi la vitesse de Darcy est égale à $6,8.10^{-7}$ m/s et la vitesse réelle du fluide est égale à 4.10^{-5} m/s ce qui induit un temps de transfert entre les puits de 20,4 heures. Ce temps de transfert permet selon une cinétique d'ordre 1 aux coefficients précédemment mesurés un passage d'une concentration initiale de 41 mg/L à 26,17 mg/L ce qui est très supérieur aux concentrations observées dans le puits F13. Toutefois le temps de transfert est ici surestimé en raison de la précision de la mesure du niveau piezométrique. Le temps de transfert nécessaire pour une variation de concentration est donné par la relation (19) :

$$t = \frac{\ln\left(\frac{C}{C_0}\right)}{-k} \tag{19}$$

Le temps nécessaire pour un passage d'une concentration de 41 mg/L à 4,8 mg/L est ainsi de 121 heures.

La même application au passage de F13 à F26 dont la transmissivité proche a été estimée à $1.6.10^{-6}$ m^2/s et où la distance entre les puits induit un temps de transfert de 274,7 heures permet en revanche une dégradation totale des nitrates.

Ceci montre que les concentrations observées sont très dépendantes de l'hétérogénéité physique du site (conductivité hydraulique) qui pour des distances proches fait varier les distances caractéristiques pour la dégradation de 41 mg/L de nitrates de 14,5 m (perméabilité de 2.10^{-5} m^2/s) à 1,1 m (perméabilité de $1,6.10^{-6}$ m^2/s). Bien que sujet à de nombreuses approximations, inhérentes aux mesures en milieux hétérogènes, l'estimation de *k* (coefficient de réaction de premier ordre) semble pouvoir expliquer la chimie des puits du site. Ce coefficient semble toutefois sous-estimé dans le cas de l'évaluation entre F21 et F13. Cependant ce calcul ne prend pas en compte les possibles mélanges et les réactions pouvant avoir lieu dans le puits. On peut aussi observer que les concentrations en oxygène entre les puits sont différentes (2mg/L en F21 et 0,2 en F13). Il est donc nécessaire que l'oxygène présent soit en partie dégradé dans le milieu ce qui augmente le temps nécessaire pour une consommation des nitrates.

b. Application au site de Ploemeur - Kermadoye

L'estimation des distances représentatives de réactions est un élément prépondérant dans la détermination des périmètres de protection pour les sites d'alimentation en eau potable. De plus, bien que la réaction de dénitrification ait été démontrée sur le site ((Tarits et al., 2006) ainsi que cette étude), la quantification de l'impact de cette réaction sur les concentrations en nitrates observées n'a pas été effectuée.

L'obtention des paramètres cinétiques permet d'évaluer la possible dégradation des nitrates dans les conditions de cet aquifère. Nous cherchons au travers de ce modèle à déterminer si les cinétiques de réaction quantifiées par push pull peuvent expliquer les baisses de concentrations observées sur le site. Ainsi nous souhaitons :

1) Evaluer les possibilités de dégradation des nitrates lors d'un transfert d'une masse d'eau en bordure de la zone d'influence du pompage (concentration de 52 mg/L ; cas du puits F19) jusqu'au puits de pompage (F29) distant de 241 m.

2) Estimer la distance minimale nécessaire pour l'observation d'une baisse de concentration de 52 mg/L (observée au puits F19) à 5 mg/L au puits de pompage (F29) avec les paramètres cinétiques mesurés par essai de push-pull
3) Evaluer le taux minimum de réactions équivalent pour une baisse de concentration de 52 à 5 mg/L entre les puits F19 (en bordure du site) et F29 (puits de pompage).

Ces informations, comparées aux données du puits F35 (concentration en nitrates de 16 mg/L à 77 m du puits de pompage) présent sur ce transect (Figure 88), permettent de discuter les mécanismes permettant de réguler les concentrations au puits de pompage.

La réaction de dénitrification nécessite à la fois un accepteur d'électrons (nitrates) et un donneur d'électrons (minéraux tels que la biotite ou les sulfures). Les mesures réalisées par push pull indiquent qu'une corrélation entre le taux de réaction et la concentration en nitrates semble être suffisante pour exprimer ce phénomène selon une cinétique de premier ordre. L'utilisation d'une cinétique de premier ordre en rapport uniquement avec les nitrates induit que le donneur d'électrons minéral est ici considéré comme ayant une répartition homogène et étant en excès dans le milieu. Ainsi en conditions stationnaires, la réaction n'est pas affectée par des phénomènes de mélanges ni par la dispersivité. Ceci a été vérifié par un modèle numérique dont le développement et les résultats sont fournis en annexes. Pour réaliser ce modèle, nous faisons l'hypothèse que l'ensemble du site est en conditions d'anaérobies permettant une dénitrification. Ces hypothèses nous permettent de développer une solution analytique pour l'estimation des concentrations sur le site.

Descriptif du modèle

Le transect d'étude est présenté Figure 88.

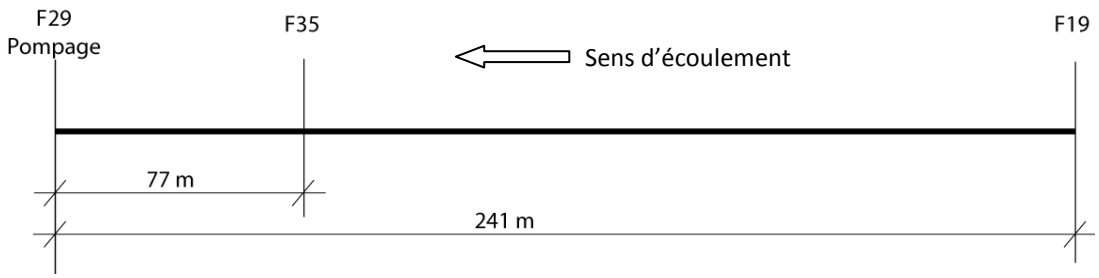


Figure 88: Transect d'étude

Le pompage étant mis en place depuis plusieurs mois au moment de la prise de données nous supposons pour ce modèle des conditions d'écoulements stationnaires. De plus nous considérons un modèle de perméabilité homogène. La perméabilité de la zone est estimée par la transmissivité ($T=2.3.10^{-3}$ m^2/s) mesurée dans Le Borgne et al. (2006a) rapportée à une hauteur de zone fracturée de 10 m. Les données piézométriques sont comparées à la solution de Dupuit pour une nappe captive donnée par l'équation suivante (20) :

$$h(r) - H = \frac{Q}{2\pi T} Ln\left(\frac{r}{R}\right) \tag{20}$$

Avec :

h(r)= Rabattement à une distance r du puits de pompage
Q = Débit au puits
T = Transmissivité (m^2/s)
R= Rayon de non influence du pompage, ici considéré au puits F19
H= Niveau piézométrique

Sur ce site, le pompage est réparti entre trois puits dont les débits sont inconnus. L'utilisation de cette solution permet d'estimer un débit équivalent ($Q= 1,7.\ 10^{-2}$ m^3/s). Ce débit est cohérent avec le débit réel pompé. Il représente environ 50% du débit maximum. La comparaison de la solution analytique et des données est effectuée Figure 89.

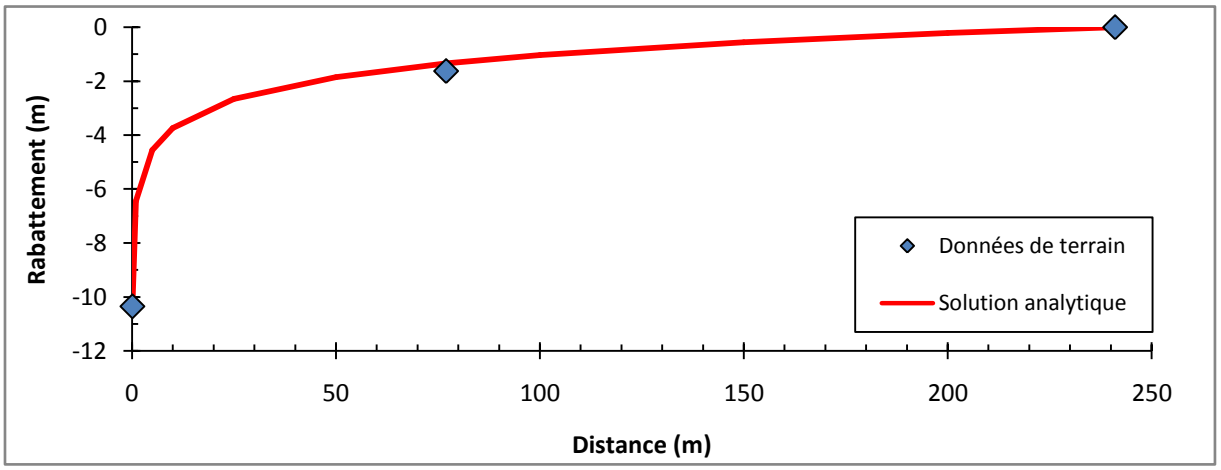


Figure 89: Validation du cône de rabattement

Les vitesses d'écoulements moyennes *q* (vitesse de Darcy) sont ensuite données par la loi de Darcy (équation (17)) et les vitesses réelles par l'équation (18) en lien avec la porosité du milieu.

Aucun essai de traçage n'ayant été réalisé sur le site, la porosité reste une inconnue. Celle-ci a cependant un effet prépondérant sur la vitesse d'écoulements et donc les distances parcourues.

L'essai de traçage présenté chapitre 1 sur le site annexe de Loyan indiquait une porosité de 1,7% donnant une valeur indicative. Afin d'estimer l'espace des possibles, les simulations sont réalisées avec des porosités de 1 et 10 % pour encadrer la gamme de porosité attendue. La porosité n'a pas d'influence directe sur la réactivité mais sur les vitesses d'écoulements réelles selon la loi donnée équation (18). La porosité contrôle ainsi le temps de résidence dans le milieu et donc le temps de réactivité.

Nous appliquons ici la même méthode que dans la section précédente. Dans ce cas, la géométrie de l'écoulement est radiale. Le temps de transfert d'un soluté dans un milieu radial 1D d'un point d'injection R_0 vers un autre point situé sur un rayon R en direction du pompage peut être défini par l'équation suivante :

$$t = \frac{\pi \theta h}{Q}[R_0^2 - R^2] \tag{21}$$

Avec :

θ= Porosité
h = Epaisseur de la zone fracturée
Q = Débit au puits de pompage (m^3/s)
R_0=Distance radiale au puits du point d'injection ou de concentration connue
R=Distance radiale au puits de pompage

Selon une cinétique de dégradation de premier ordre, la concentration en fonction du temps est donnée par l'équation (22) où k est le coefficient de cinétique de premier ordre :

$$C(t) = C_0 e^{-kt} \tag{22}$$

Les hypothèses énoncées précédement d'un régime permanent et une réaction de premier ordre permettent de négliger les phénomènes de dispersion et de mélange. La réactivité est ici essenciellement controlée par le temps de résidence. En combinant ces équations (21) et (22) on peut définir en tout point du système la concentration d'un soluté réactif par :

$$\frac{C_{(r)}}{C_{(R_0)}} = exp\left[\frac{-k\pi h\theta}{Q}(R_0^2 - R^2)\right] \tag{23}$$

L'un des objectifs de cette partie est de définir la distance minimale nécéssaire pour une consomation des nitrates pour une variation de concentration de 52 mg/L à 5 mg/L avec les paramètres cinétiques définis par push-pull (52 mg/L étant la concentration maximum observée sur le site et 5 mg/L la concentration moyenne observée au puits de pompage).

L'équation précédente peut être réarangée en considerant R=0 au puits de pompage. On peut ainsi calculer la distance minimale de dégradation par :

$$R = \sqrt{\frac{Q}{-k\pi h\theta}[ln\, C - ln\, C_0]} \tag{24}$$

Applications

Les résultats de l'équation (23) dans les différent cas d'intérêt sont présentés Figure 90 dans le cas d'une porosité de 1% et Figure 91 dans le cas d'une porosité de 10%. Sur ces figures les courbes continues noires représentent le cas d'une injection continue de 52 mg/L sur une couronne de rayon R (où $R=R_{F19}$) dans le cas où une dégradation de premier ordre a lieu avec un coefficient *k* de 0,022 h^{-1} (coefficient estimé par l'essai de push pull). On remarque que dans aucun de ces cas une concentration significative de nitrates n'atteint le puits de pompage. Les courbes en pointillés représentent le cas où une réaction suivant une cinétique de premier ordre induit une concentration de 52 mg/l au point F19 et une concentration de 5 mg/L au puits F29 (pompage). Ceci permet de déterminer les coefficients de réactions minimum pour observer de telles concentrations. Les coefficients obtenus sont de 0,0008 h^{-1} dans le cas d'une porosité de 10% et de 0,008 h^{-1} dans le cas d'une porosité de 1%. Les courbes en tirets représentent l'évolution spatiale des concentrations dans le cas où une concentration de 52 mg/L peut être dégradée pour observer une concentration de 5 mg/L au puits de pompage avec un coefficient k=0,022h^{-1}. La distance obtenue selon l'équation (24) est ainsi de 147,5 m pour une porosité de 1% et de 46,6 m pour une porosité de 10%. Ceci représente, en considérant que le coefficient k de 0,022 h^{-1} est un maximum de réactivité sur le site, le cas extrême de dégradation possible. Pour une concentration de 52 mg/L à une distance inférieure de celles calculées, les concentrations au puits de pompage seront supérieures à 5 mg/L. Le calcul des ces distances montre que les distances caractéristiques de réactions sur ce site sont du même ordre de grandeur que le site lui-même.

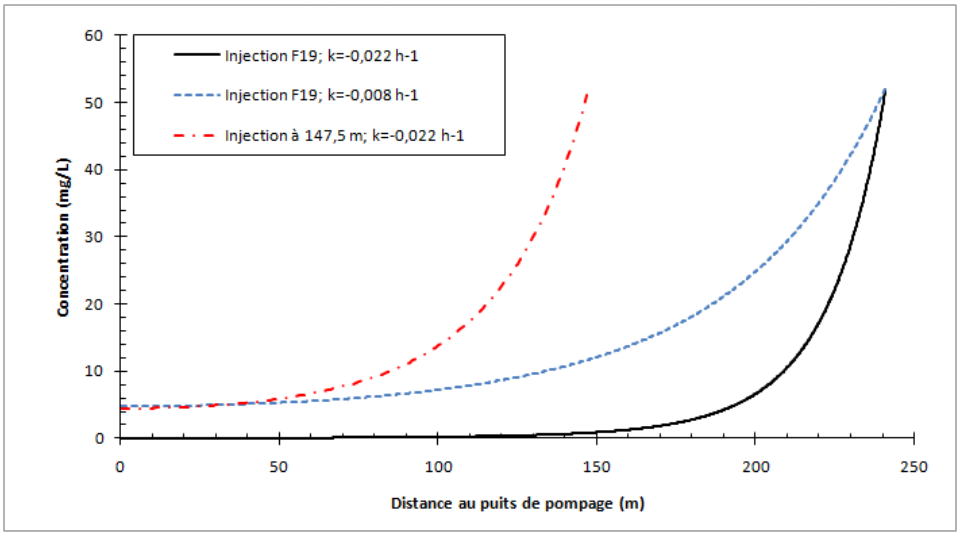


Figure 90:Courbes de concentrations pour une porosité de 1% dans les différents cas d'étude ;

La courbe continue représente le cas d'une injection à une distance $R=R_{F19}$ avec une constante de réactions $k=-0,022h^{-1}$; la courbe pointillée représente le cas où une concentration initiale de 52 mg/L atteint le puits de pompage à une concentration de 5 mg/L ; la courbe en tirets représente l'évolution de concentration sur la distance limite permettant un passage de concentration de 52 à 5 mg/L avec un coefficient $k=0,022\ h^{-1}$

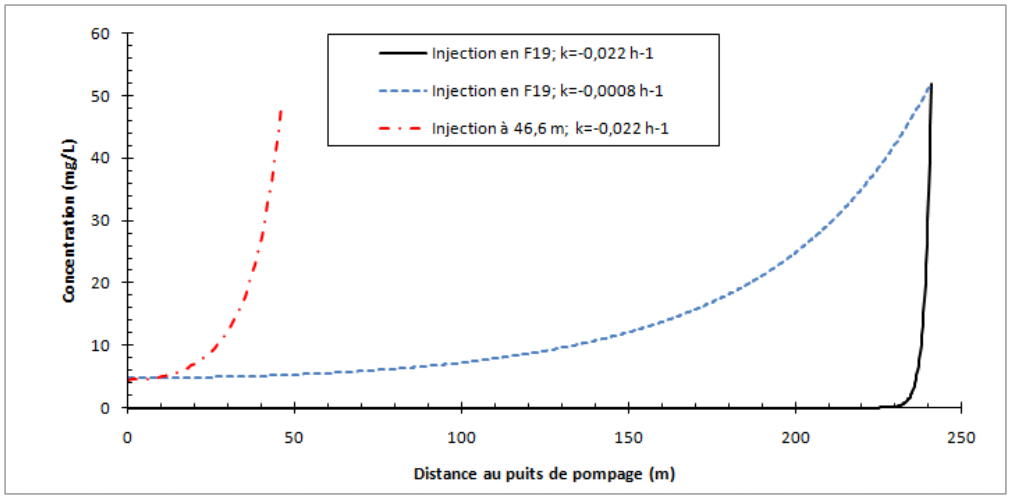


Figure 91: Courbes de concentrations pour une porosité de 10%

La courbe continue représente le cas d'une injection à une distance $R=R_{F19}$ avec une constante de réaction $k=-0,022h^{-1}$; la courbe pointillée représente le cas où une concentration initiale de 52 mg/L atteint le puits de pompage à une concentration de 5 mg/L ; la courbe en tirets représente l'évolution de concentration sur la distance limite permettant un passage de concentration de 52 à 5 mg/L avec un coefficient $k=0,022\ h^{-1}$

Ce modèle a été réalisé en considérant que l'intégralité du site permettait à une réaction de dénitrification de s'opérer. Or il est observé dans plusieurs forages la présence de concentrations en oxygène pouvant avoir un effet inhibiteur sur la réaction. Ceci sous-entend que les possibilités de dégradation calculées sont vraisemblablement surestimées. Si la porosité du site est proche de 1% il est donc peu probable que la réaction ait un effet majoritaire sur l'abattement des nitrates, les distances significatives étant du même ordre de

grandeur que le site. A la vue de ces résultats on peut supposer que le phénomène principal conduisant à l'abattement des concentrations est un phénomène de mélange.

A l'échelle du site une cinétique de dégradation de 1er ordre avec les nitrates ne semble pas suffisante pour expliquer les concentrations observées et il est donc nécessaire de prendre en compte :

1) les phénomènes de dilution par mélanges
2) des taux variables de dégradation sur le site
3) les cinétiques de dégradation de l'oxygène

Des mesures locales en différents points par essai de push pull seraient nécessaires pour estimer la variabilité de la réactivité en différents points du site. Des essais de traçages par transmission sont aussi nécessaires pour évaluer les phénomènes de mélanges. Ces différentes mesures permettraient d'évaluer la variabilité du potentiel de dénitrification sur le site et ainsi de diminuer les incertitudes de ce modèle.

IV. Discussion

Cet essai de push pull a permis de prouver les possibilités de dénitrification du site, ainsi que de quantifier la réaction de dénitrification. La réaction a pu être identifiée par la mise en solution de sulfates et de fer. De plus comme discuté lors du chapitre 2 de cette partie, différentes réactions peuvent avoir lieu simultanément. La détermination de la part relative de chacune d'entre elles n'est pas encore possible compte tenu de nos connaissances.

La présence de NO_2^- et N_2O montre que sous ces contraintes de flux et sur ce domaine de temps, la réaction n'est pas totale. Les paramètres nécessaires à une modélisation via les cinétiques de Michaelis-Menten ont été déterminés. Ces paramètres peuvent être variables car ils ont été mesurés à un endroit donné alors qu'une spatialisation de l'activité bactérienne, fonction de l'activité, pour la production de ces sous-produits a déjà été démontrée (Philippot et al., 2009). De plus cette observation a été effectuée à un temps donné, or nous avons vu dans le chapitre 2 que la dégradation de composés comme les nitrites nécessite un temps de latence important. Il est donc possible que sous des contraintes de substrats imposées sur le long terme, ces cinétiques (suivant les cinétiques de Monod avec une influence de la croissance bactérienne) ainsi que le rapport des sous-produits évoluent avec le temps. Les

cinétiques de consommation des sous-produits de réactions nécessiteraient des temps d'expérimentation plus longs et une étude plus complète au niveau de la caractérisation des microorganismes (à la fois quantitative et qualitative). L'évaluation des constantes de réactions (V_{max} et k_m) nécessiterait également des concentrations en nitrates plus importantes pour une meilleure caractérisation (observation claire de V_{max}). Il s'agit cependant de la première estimation de ces paramètres. Les concentrations utilisées lors de cette expérience sont identiques à celles observées sur site, les paramètres obtenus peuvent donc être considérés comme représentatifs des conditions du site et donnent une bonne estimation.

Le facteur k estimé pour la dégradation des nitrates selon une cinétique de premier ordre propose un coefficient apparent représentatif des conditions d'écoulement. En effet, les phénomènes de mélanges entre les différentes vitesses d'écoulement donnent un taux de réactions global dans la mesure où un prélèvement est un mélange de volumes d'eau et de solutés avec des temps de transferts différents et des historiques restant inconnus. Dans le cas d'écoulements lents les valeurs intrinsèques peuvent varier sur plus d'un ordre de grandeur (Green et al., 2010). Dans le cas des milieux fracturés certains volumes d'eau peuvent rester piégés dans des bras morts ou traverser la matrice et donc échantillonner des vitesses plus lentes. La localisation et la quantification de ces phénomènes restent toujours un élément d'étude. Ces paramètres intrinsèques ne sont donc pas mesurables sur site et les différences entre paramètres apparents et intrinsèques ne restent que partiellement comprises. Cependant à l'échelle opérationnelle du site les paramètres apparents restent les plus importants pour une estimation globale.

Dans le cadre des milieux hétérogènes, nous avons aussi vu au chapitre 1 et Figure 76 de ce chapitre qu'une forte hétérogénéité chimique existe sur de faibles distances. Cette hétérogénéité n'est que rarement prise en compte (Cozzarelli et al., 1999; Schroth et al., 1998). Ainsi il est évident à la vue des concentrations en oxygène et nitrates que la réaction de dénitrification n'a pas lieu au niveau du piézomètre F21 pourtant situé à 3 m de F26 où a été réalisé le push-pull. Les raisons de cette hétérogénéité chimique peuvent être de différentes natures : chimique, biologique et physique. La variabilité chimique s'exprime principalement par l'accessibilité aux donneurs d'électrons (minéraux dans le cas des aquifères à faible concentration en carbone organique) et à leurs états d'oxydation. La seconde raison pouvant expliquer cette hétérogénéité est d'ordre biologique. Bien que les bactéries dénitrifiantes soient considérées comme ubiquistes, il a été montré une forte variabilité spatiale de leur

nombre et de leur activité en lien avec les vitesses d'écoulement dans le milieu (Ginn et al., 2002; Griebler and Lueders, 2009; Murphy et al., 1997). Cet élément biologique n'a pas été évalué ici. Le dernier élément pouvant causer cette hétérogénéité est physique par la contrainte qu'impose la perméabilité sur les vitesses d'écoulement et donc sur les temps de résidence. Les cinétiques de réactions mesurées ici semblent indiquer que cette hétérogénéité physique peut expliquer en grande partie l'hétérogénéité chimique. Nous montrons ainsi l'influence des vitesses d'écoulement sur la réactivité du milieu. Il parait évident que cette hétérogénéité est la résultante de l'ensemble de ces conditions biogéochimiques. Estimer l'influence relative de tel ou tel élément à l'échelle du site semble actuellement hors de portée en raison du manque de connaissances sur les liens entre l'implantation des populations, la chimie des minéraux et les vitesses d'écoulement. L'influence de la vitesse sur le développement des biofilms à l'échelle de réseaux de pores a été montrée (Dupin and McCarty, 1999) ainsi que sur la densité de celui-ci (Characklis, 1981) et les phénomènes de détachement (Taylor and Jaffe, 1990) mais ceci a été réalisé principalement sur des milieux homogènes synthétiques. Il n'est pas actuellement possible de prendre en compte explicitement ces phénomènes lors d'études sur sites. L'obtention de ces informations nécessite une observation à une échelle plus fine.

A l'échelle globale d'un site de pompage, un autre élément d'importance intervient. En effet, considérant un aspect purement physique du contrôle des concentrations (par le temps de résidence) et un système biologiquement et chimiquement homogène, une majorité des écoulements se passent dans les zones de perméabilités fortes et donc à faible temps de résidence réduisant le potentiel global de dénitrification du site. Les zones de faibles perméabilités en revanche peuvent potentiellement avoir plus d'impact sur la réaction mais les masses d'eau les traversant sont plus faibles. Nous avons notamment vu sur l'application à l'échelle du site de Ploemeur – Kermadoye que les distances représentatives de réactions étaient du même ordre de grandeur que le site lui-même dans la zone d'écoulements rapides. Considérant un site hétérogène chimiquement il est peu probable qu'une atténuation complète des nitrates soit possible sur les temps de transfert de cette zone. Cependant, il est difficile de conclure sur le potentiel de cette réaction. Les données de site montrent la présence de cette hétérogénéité chimique ou du moins que la zone réactive potentielle à une extension inférieure à celle considérée lors de la modélisation. Bien que réalistes, les résultats des modélisations ne sont pas totalement en accord avec les données de terrain. Il semble donc à

la vue de ces résultats que les concentrations observées sur le site soient en partie liées à des phénomènes de mélanges.

V. Conclusion

Nous avions comme objectifs dans ce chapitre de quantifier les cinétiques de réactions de dénitrification in situ par essai de push pull. Pour avoir une information complète nous avons aussi cherché à quantifier les cinétiques de productions des sous-produits de réactions. L'obtention de ces cinétiques de réactions avait pour but d'évaluer l'influence de cette réaction de dénitrification sur les concentrations observées sur les sites d'étude.

La réalisation de cette expérience de push-pull a permis pour la première fois d'identifier et de quantifier une réaction de dénitrification sur le site de Ploemeur. Ceci montre l'applicabilité de cette technique dans le cadre de l'étude des milieux fracturés. Les paramètres cinétiques de premier ordre ont pu être obtenus pour la réduction des nitrates. Les paramètres de Michaelis - Menten pour la production de nitrites et de protoxydes d'azote ont aussi été déterminés pour la première fois par mesures directes *in situ*. Ces mesures, comparées aux concentrations relevées sur le site, ont permis de mettre en avant l'influence de l'hétérogénéité physique (vitesses d'écoulements) sur le contrôle de l'hétérogénéité chimique (variation des concentrations) à l'échelle du site. Nous avons de plus donné un ordre de grandeur pour les distances et les temps nécessaires à la réaction de dénitrification pour être totale dans le cas de ce site. Ceci indique que bien que théoriquement possible, les concentrations en nitrates observées sur le site sont en partie liées à des phénomènes de mélanges sur le site de Kermadoye. En revanche sur le site de Loyan, la seule action de cette réaction de dénitrification peut expliquer les concentrations observées. Bien que cela n'ait pas été discuté pour des raisons de synthèse dans ce chapitre cet essai de push-pull a de plus permis de valider le potentiel d'utilisation d'un spectrophotomètre de forage lors d'essais de traçage en raison d'un bonne adéquation entre prélèvements et mesures.

Conclusion

Les objectifs de cette partie étaient d'identifier les réactions de dénitrification pouvant avoir lieu sur le site de Ploemeur, d'évaluer l'influence des écoulements sur ces réactions et de vérifier les possibilités d'utilisation en forage de spectrophotomètres pour le suivi des nitrates. Le dernier objectif était de mesurer les cinétiques de dégradation des nitrates in situ ainsi que les cinétiques de production des sous-produits de réactions pour estimer l'influence de cette réaction sur les concentrations en nitrates observées in situ.

Les travaux réalisés dans cette partie ont permis d'identifier une réaction non prise en compte jusqu'à présent sur le site de Ploemeur. Nous avons démontré qu'une réaction de dénitrification autotrophe mettant en jeu la biotite était susceptible d'avoir lieu dans les conditions du site reproduites en laboratoire. Nous avons également montré lors d'expériences en colonnes que les taux de réactions variaient dans le temps. On a pu noter une augmentation initiale du taux de réactions. Cette augmentation du taux de réactions indique un développement microbien. Cette hausse est suivie d'une diminution liée à une baisse de l'accessibilité des minéraux en raison de phénomènes de précipitations limitant les surfaces réactives accessibles. Ceci met en avant les besoins de prendre en compte ces développements microbiens dans les modèles de transport réactif et donc d'améliorer nos connaissances sur les interactions entre biologie et réactions en conditions dynamiques.

Dans un second temps nous avons effectué une caractérisation physico-chimique d'un nouveau site d'étude. D'un point de vue technique nous avons montré la possible utilisation de spectrophotomètres de forage pour la réalisation de diagraphies nitrates ainsi que pour le suivi en continu de l'évolution des concentrations. Par des mesures in situ par push-pull nous avons pu quantifier la cinétique de premier ordre des réactions de dénitrification sur le site. Ceci représente la première quantification directe de cette réaction sur le site. L'obtention de ces paramètres cinétiques permet de quantifier les temps nécessaires pour que cette réaction puisse opérer. Cette observation permet de quantifier la variabilité spatiale du site étant donné que sur des puits distants de quelques mètres, les fluctuations des concentrations en nitrates et oxygène sont importantes. Ceci fournit une information spatiale sur les distances nécessaires pour la réaction ainsi qu'une information temporelle sur le temps nécessaire à cette dégradation. Les cinétiques obtenues ont permis d'évaluer le potentiel de dénitrification dans la zone fracturée principale du site de Ploemeur-Kermadoye. Ces estimations ont montré que

les concentrations observées pouvaient théoriquement s'expliquer par une réaction de dénitrification. Cependant les hypothèses effectuées montrent que cette réaction ne peut pas à elle seule expliquer l'intégralité des concentrations. Ces estimations permettent cependant de donner un ordre de grandeur des distances réactives représentatives.

Nous avons quantifié pour la première fois la production de protoxyde d'azote de manière directe in situ par un essai de push-pull. Nous avons ainsi montré que les productions de protoxyde d'azote étaient en lien avec la concentration en nitrates dans notre cas d'étude. Les cinétiques de production des nitrites ont aussi pu être quantifiées par le même moyen montrant ainsi que la production de ces éléments peut être prédite par des cinétiques de Michaelis-Menten dont les paramètres ont été estimés.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'influence des vitesses d'écoulement sur les réactions biogéochimiques à différentes échelles. Pour cela nous avons développé différentes approches expérimentales allant de l'échelle du pore à celle du site. Les travaux à l'échelle du pore ont été conduits en laboratoire grâce à un dispositif expérimental innovant permettant l'observation d'une réaction de dénitrification dans des tubes plastiques. Les travaux à l'échelle du site nécessitant une bonne connaissance des réactions pouvant avoir lieu, nous avons évalué les possibles réactions de dénitrification en laboratoire par des expériences en batchs et en colonne. Par la suite nous avons mesuré directement les taux de dégradation des nitrates par un essai de push-pull suivi avec un spectrophotomètre adapté pour la mesure des nitrates en forage.

Nous avons mis en évidence l'influence de l'écoulement sur la réactivité biogéochimique. La réactivité d'une réaction d'oxydoréduction dans un milieu dynamique est une interaction entre processus physiques (vitesses d'écoulement, apport de nutriments, diffusion et mélange des éléments), chimiques (interactions entre donneurs et accepteurs d'électrons) et biologiques (développement de biofilms, interactions entre populations, taux de croissance…). Cependant, en fonction des conditions physiques, chimiques et biologiques du milieu, la nature de l'élément contrôlant au premier ordre cette réactivité peut varier. Nous avons montré que les processus contrôlant la réactivité des milieux en conditions dynamiques variaient en fonction de l'échelle d'étude, de la durée de l'expérimentation et que la nature de ces contrôles (physiques, biologiques et chimiques) évoluait avec le temps.

Ainsi, à l'échelle d'un macro-pore nous avons montré que la réactivité était dans un premier temps contrôlée par la biologie par l'intermédiaire du taux de croissance du biofilm qui induit un abaissement des concentrations en nitrates identique quelque soit le temps de résidence dans le milieu. Dans un second temps le contrôle de la réactivité devient principalement physique car le taux de réaction maximum est contrôlé par la capacité des nutriments à diffuser dans la zone réactive du biofilm. Un contrôle biochimique peut ensuite intervenir par la présence de sous-produits de réaction pouvant diminuer l'activité des microorganismes. Nous avons de plus montré que la durée des phases réactives (augmentation, stabilisation et diminution des taux de réactions) variait en fonction de la vitesse d'écoulement et que le

système pouvait ne jamais atteindre d'état stationnaire. La comparaison des évolutions de concentrations en nitrates et nitrites entre batchs et expériences dynamiques montre que les écoulements ont une influence sur les dynamiques de populations. Ainsi alors que les nitrites sont consommés en batchs, ils ne le sont jamais en conditions dynamiques. Les liens entre vitesses d'adaptations et vitesses d'écoulements restent cependant à définir. Ainsi même dans le système physique simple étudié ici la présence d'un écoulement entraine un comportement complexe où les phases généralement considérées comme transitoires (phases d'évolution du taux de réaction) sont majoritaires. Il semble donc qu'à cette échelle du macro-pore, dans notre dispositif expérimental, nous soyons continuellement en régime transitoire d'un point de vue de la réactivité ce qui se traduit par un comportement oscillatoire. La fréquence des oscillations étant dépendante de l'historique du système réactif, ces comportements sont difficiles à prédire.

La seconde partie s'intéressant aux réactions de dénitrifications autotrophes a aussi fourni des informations importantes sur la réactivité in situ. Nous avons dans un premier temps identifié en batchs une réaction de dénitrification autotrophe utilisant la biotite comme phase minérale réactive. Cette réaction était jusqu'à présent négligée. Nous avons ainsi révélé qu'en fonction de la zone d'écoulement (fracture ou matrice) les réactions d'importance pouvaient être différentes. En fractures les réactions avec des sulfures sont importantes et peuvent expliquer 50% de la réaction mais ne sont pas les seules. Dans les zones sans sulfures (matrice) la biotite peut avoir une influence majoritaire.

Suite à cette identification en batchs, nous avons testé cette réaction en conditions d'écoulements dans une colonne de roche avec injection continue de nitrates. Lors de cette expérience nous avons observé dans une première phase une augmentation du taux de réaction avec le temps provenant d'une adaptation ou d'une mise en place des populations microbiennes (contrôle biologique). Puis nous avons observé une diminution graduelle du taux de réaction vraisemblablement liée à la précipitation d'oxydes de fer sur la surface des minéraux réactifs. Cette expérience, comme la précédente en tuyaux, n'a pas atteint de régime stationnaire. Le comportement long terme pourrait être à étudier.

A l'échelle du terrain, nous avons quantifié par essai de push-pull des réactions de dénitrification en montrant que celles-ci suivaient une cinétique d'ordre 1 en relation avec la concentration en nitrates. En plus de l'obtention des paramètres cinétiques de cette

dégradation, nous avons défini les cinétiques de production des sous-produits de réactions que sont les nitrites et le protoxyde d'azote. Nous avons montré que la formation de ces éléments pouvait être prédite par les équations de Michaelis-Menten. Nous n'avons pas pu réaliser suffisamment d'expériences sur le terrain sur des temps suffisamment longs pour mettre en évidence l'évolution des taux de réaction. Les évolutions des taux de réactions sont longues à observer et donc des expériences sur des temps plus longs seraient nécessaires. Cependant tout porte à croire à une évolution des taux de réactions avec le temps tels que cela a été observé dans les expériences de laboratoire précédentes. Cette évolution des taux de réactions implique de plus que la réactivité n'est pas seulement liée à la physique et à la chimie du milieu mais est aussi dépendante de l'histoire du milieu. Ainsi la mise en pompage d'un site, en modifiant les écoulements (connexions entre zones, augmentation des vitesses d'écoulement, interaction fracture matrice…) peut avoir une influence importante sur la réactivité. L'historique d'une zone peut induire des développements très localisés étant donné que les développements biologiques tendent vers une localisation de la réactivité et non vers une homogénéisation. Une évolution importante des taux de réactions à l'échelle du site (principalement dans le cas des milieux fracturés où les gammes de vitesses d'écoulements sont larges) induit une complexité rarement prise en compte pour la réalisation de modèles.

Perspectives générales

Les travaux effectués dans cette étude ont apporté des informations significatives à différentes échelles mais de nombreux développements seraient nécessaires pour les compléter et approfondir les connaissances sur le couplage entre écoulements et réactivité biochimique.

A l'échelle du macropore

Les travaux réalisés à cette échelle ont principalement été limités par des aspects biologiques. Pour parfaire notre étude il est primordial de mesurer les croissances microbiennes pour avoir un accès aux lois de croissance. L'obtention de ces lois de croissance à la fois en conditions statiques et d'écoulement permettrait d'évaluer l'influence des écoulements sur cet aspect biologique. La mesure de la croissance bactérienne par l'intermédiaire de la biomasse totale aux temps longs peut ne plus être représentative de la réactivité. En effet, cette biomasse totale prend en compte à la fois la biomasse active et la biomasse morte. Il est donc aussi nécessaire d'étudier l'évolution de l'activité des populations. Un accès aux propriétés

structurales des biofilms serait aussi utile. La connaissance de la perméabilité et de la porosité de ces biofilms permettrait de caractériser les échanges entre milieux mobile et immobile (biofilms).

Cette échelle nécessite de développer des modèles permettant la compréhension de l'influence des phénomènes de diffusion dans le biofilm et l'impact de ces phénomènes sur la réactivité. Différentes échelles pour cette modélisation sont nécessaires. Il est par exemple utile d'évaluer comment le mélange entre les éléments peut avoir lieu au sein du biofilm entre des apports provenant de la base du biofilm (carbone) et la surface (nitrates) et les conséquences de ces mélanges sur la réactivité. Une étude plus précise du comportement oscillatoire (notamment la phase d'arrêt de la réaction) serait importante pour améliorer la compréhension des phénomènes que nous mesurons. Il est aussi possible d'appliquer ce type de dispositifs à une géométrie de fractures pour une meilleure intégration de ces informations dans ce type de structures.

A l'échelle du milieu poreux

Le nombre d'expériences menées dans les colonnes en milieu poreux (Partie II-Chapitre 2) est très limité et ne permet pas d'intégrer explicitement le facteur de vitesse d'écoulement. Des expérimentations plus nombreuses avec différentes vitesses d'écoulement permettraient d'intégrer efficacement ce paramètre. Il est aussi possible avec ces dispositifs en colonne d'évaluer l'influence d'autres paramètres tels que la surface de réactivité, d'intégrer des zones d'écoulements rapides et d'écoulements lents. Une quantification de la biomasse dans le système permettrait aussi de relier ces processus à l'aspect biologique de contrôle de la réactivité. Nous avons montré que la réaction de dénitrification observée pouvait être constituée d'un ensemble de réactions. La première met en jeu des sulfures et la seconde de la biotite. L'évaluation de ces réactions en conditions dynamiques permettrait d'évaluer l'influence relative de chacune de ces réactions. Une connaissance plus précise de ces réactions permettrait une meilleure compréhension du milieu en identifiant les zones de réactivité. Si l'hypothèse d'une réaction liée aux sulfures ayant cours dans les fractures et une réaction mettant en jeu la biotite dans des zones moins perméables (ou du moins moins altérées, la matrice rocheuse) est vérifiée, ceci permettrait une identification et compréhension des échanges fracture-matrice ce qui est un objectif de nombreuses recherches (Roubinet 2010).

A l'échelle du site

En plus de nombreux résultats enrichissant la compréhension des processus de dénitrification à l'échelle du site, cette étude ouvre de larges perspectives. Nous avons mesuré in situ un taux de réaction pour une dénitrification de type autotrophe. Cependant, nous avons vu lors de notre expérience en colonne de roche (Partie II- Chapitre 2) ainsi que lors de nos expériences à l'échelle du pore (Partie I) que le taux de réaction pouvait évoluer avec le temps. De même nous avons observé lors des expériences en batchs qu'un temps de latence important était nécessaire pour une consommation des nitrites. Ceci est dû à une évolution des communautés bactériennes ou à une évolution de leurs activités (évolution de la production d'enzymes). On peut supposer le même phénomène pour la production de protoxyde d'azote observée lors de l'expérience de push-pull. Les taux de réduction des nitrates, de production des nitrites et de protoxyde d'azote proposés lors de cette étude varient avec la concentration de nitrates mais sont, pour une concentration de nitrates constante, constants dans le temps. Or, les réactions de biodégradation, dirigées par les microorganismes sont connues pour être dépendantes de la concentration de microorganismes et peuvent donc évoluer dans le temps. Ces réactions, dans le cadre d'expériences de laboratoire, sont souvent modélisées par des cinétiques de Monod prenant en compte une croissance bactérienne. Bien que des modèles de transport réactif intégrant des évolutions de croissances bactériennes soient développés (Kinzelbach et al., 1991; Widdowson et al., 1988), ce type de croissance n'est que rarement pris en compte pour la modélisation d'expériences de terrain en raison du manque d'informations sur les paramètres cinétiques. Les essais de push pull réalisés par (Kneeshaw et al., 2007) montrent la présence de temps de latence pouvant provenir de l'adaptation ou de la croissance des bactéries rappelant donc le besoin de mesures (qualitatives et quantitatives) in situ des populations de microorganismes.

La qualité des résultats à la fois de dégradation des nitrates et de production des sous-produits de réactions sont encourageants sur les possibilités de quantifier les cinétiques de croissances des microorganismes ainsi que l'évolution de leur activité. La production de protoxyde d'azote a été montrée comme non aléatoire et corrélée spatialement (Philippot et al., 2009) mais la variabilité temporelle sous des contraintes imposées de flux et de substrats ne sont pour l'instant que peu connues dans les eaux souterraines (Weymann et al., 2010).

Ce type de détermination nécessite des expérimentations longues qui ne peuvent que partiellement être évaluées par le biais de Push-Pull. En revanche un test de traçage longue durée par transmission utilisant un traceur non réactif et un traceur réactif (NO_3^-) peut être réalisé. Ceci doit être mené en utilisant au contraire d'une injection ponctuelle, une injection continue avec suivi des traceurs, couplée à une quantification de la diversité, de la dynamique des microorganismes et des activités enzymatiques. Ce type d'expérimentations fait l'objet d'un projet EC2CO actuellement soumis, à la suite de premiers essais réalisés sur le site de Loyan.

De plus, pour avoir une connaissance plus complète de la biodégradation sur le site, les cinétiques de consommation de l'oxygène nécessitent d'être connues pour obtenir une gamme plus large des processus ayant cours. Ceci peut être aisément effectué par push-pull. De plus la sonde de mesures de nitrates S::CAN couplée à la sonde multi-paramètres de mesures d'oxygène permet ces mesures directement dans le puits. Des mesures réalisées lors du push pull (non présentées ici) ont montré la fiabilité du système.

Nous avons aussi présenté en fin de ce chapitre, ainsi qu'en annexe une modélisation de transport réactif. Celle-ci est très simplifiée et ne prend en compte que les nitrates. Le bilan de masse complet au niveau des autres éléments reste toujours à investiguer. Il est cependant possible de réaliser une modélisation du Push-Pull via des modèles géochimiques (tels que PHREEQC (Parkhurst and Appelo, 1999)) couplés à des modèles de transport réactif (MT3DMS (Zheng, 2009) et PHT3D (Prommer et al., 2003)). Ceci permettrait l'évaluation des phénomènes de précipitations et d'échanges cationiques pour avoir une vision plus complète des mécanismes sous conditions de flux.

Un autre élément d'intérêt nécessitant toujours d'importantes recherches est l'interaction des processus ayant lieu entre les fractures et la matrice (MacQuarrie and Mayer, 2005). Ceci nécessite cependant plus d'apports de données expérimentales à l'échelle du site. La différentiation des réactions entre zone fracturée (avec des sulfures) et matrice moins perméable (réaction avec de la biotite) pouvant être faite (tel que montré dans le chapitre 2), cette différenciation peut aussi être mesurée in situ sur des essais de traçage en transmission de longue durée.

Il serait aussi intéressant d'évaluer comment un ensemble de signaux oscillatoires engendrerait un comportement global à l'échelle du site ou à une macro échelle. Ceci

donnerait des informations sur l'intérêt de prendre en compte des paramètres effectifs ou intrinsèques dont le lien n'est actuellement que peu connu (Green et al., 2010).

Annexes

Annexe 1 :
Données de diagraphies et de tests d'interférences sur le site de Loyan

Cette annexe présente les résultats des diagraphies de température, conductivité et concentrations en oxygène réalisées sur le site de Loyan. Les données de débitmétrie de puits effectuées en conditions de pompage en puits unique sont aussi fournies. Les figures suivantes A3, A4, A5 présentent les données de tests d'interférences réalisés entre les puits F26, F13 et F21.

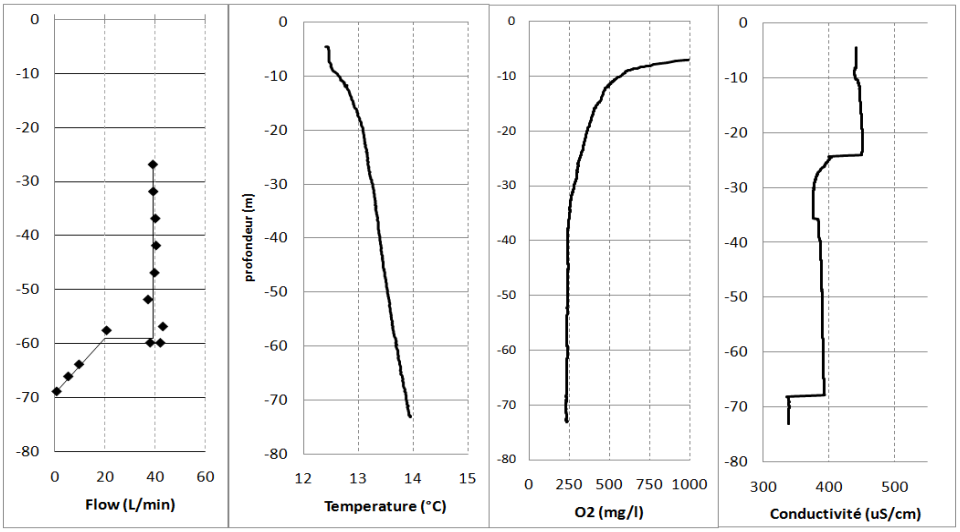


Figure A1.1: Profils de vitesses d'écoulement en pompage, de température, d'oxygène dissous et de conductivité sur puits F21

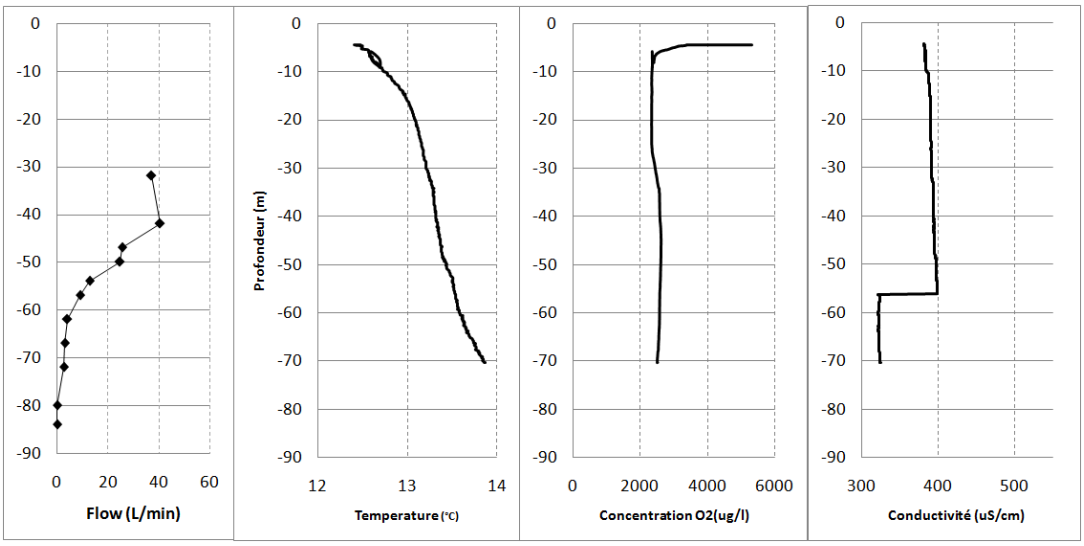
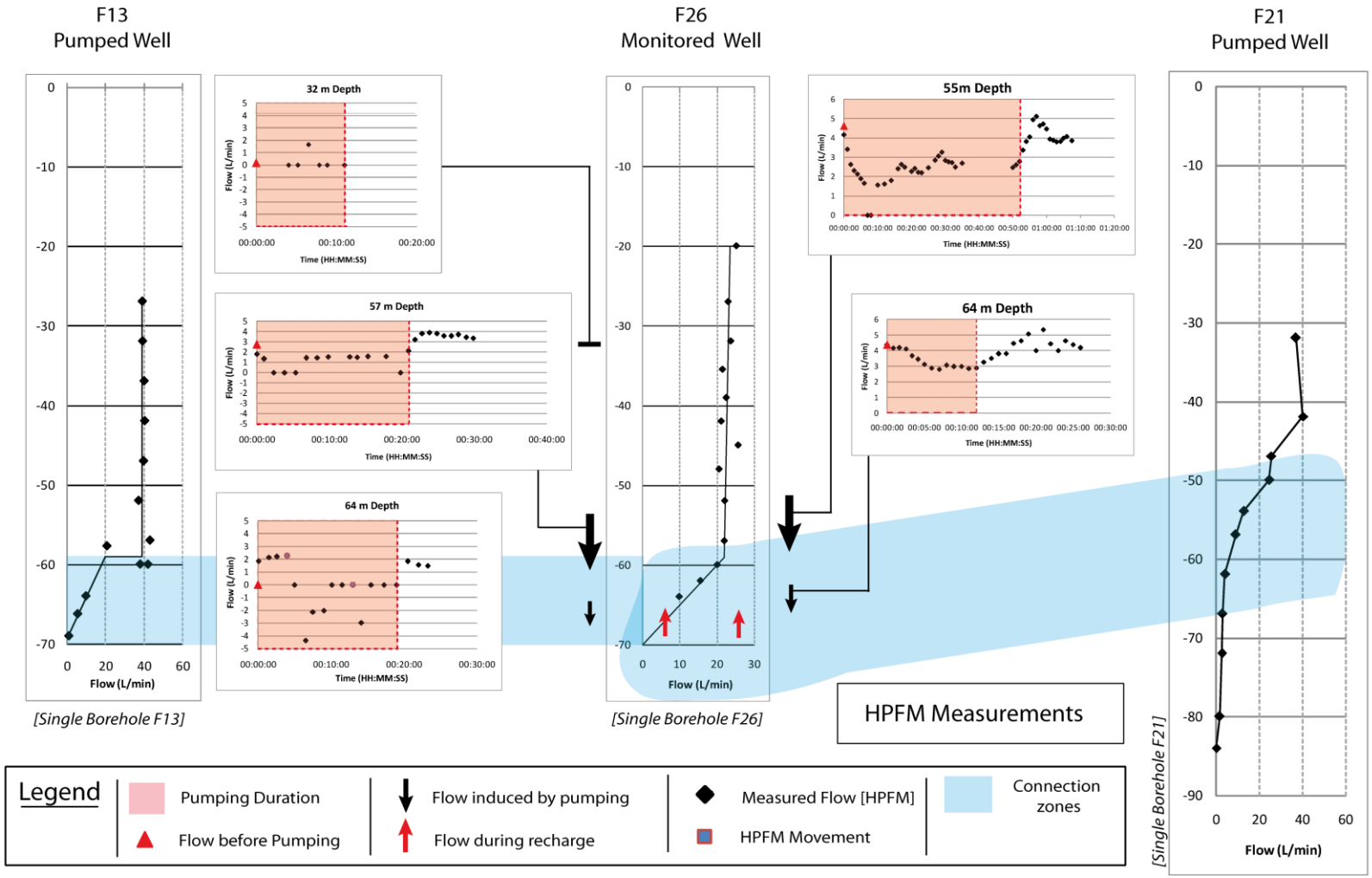
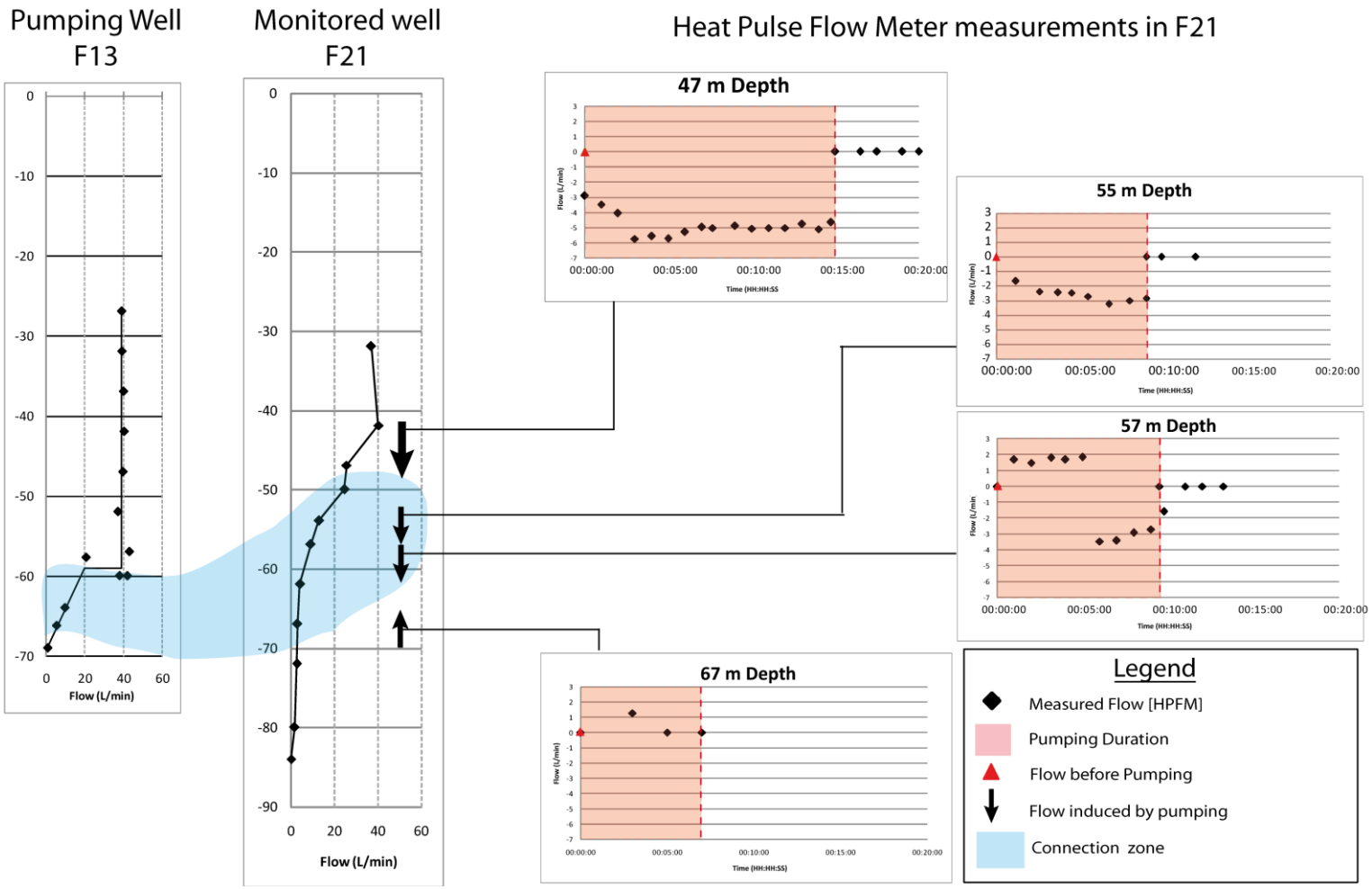


Figure A1.2: Profils de vitesses d'écoulement en pompage, de température, d'oxygène dissous et de conductivité sur puits F21

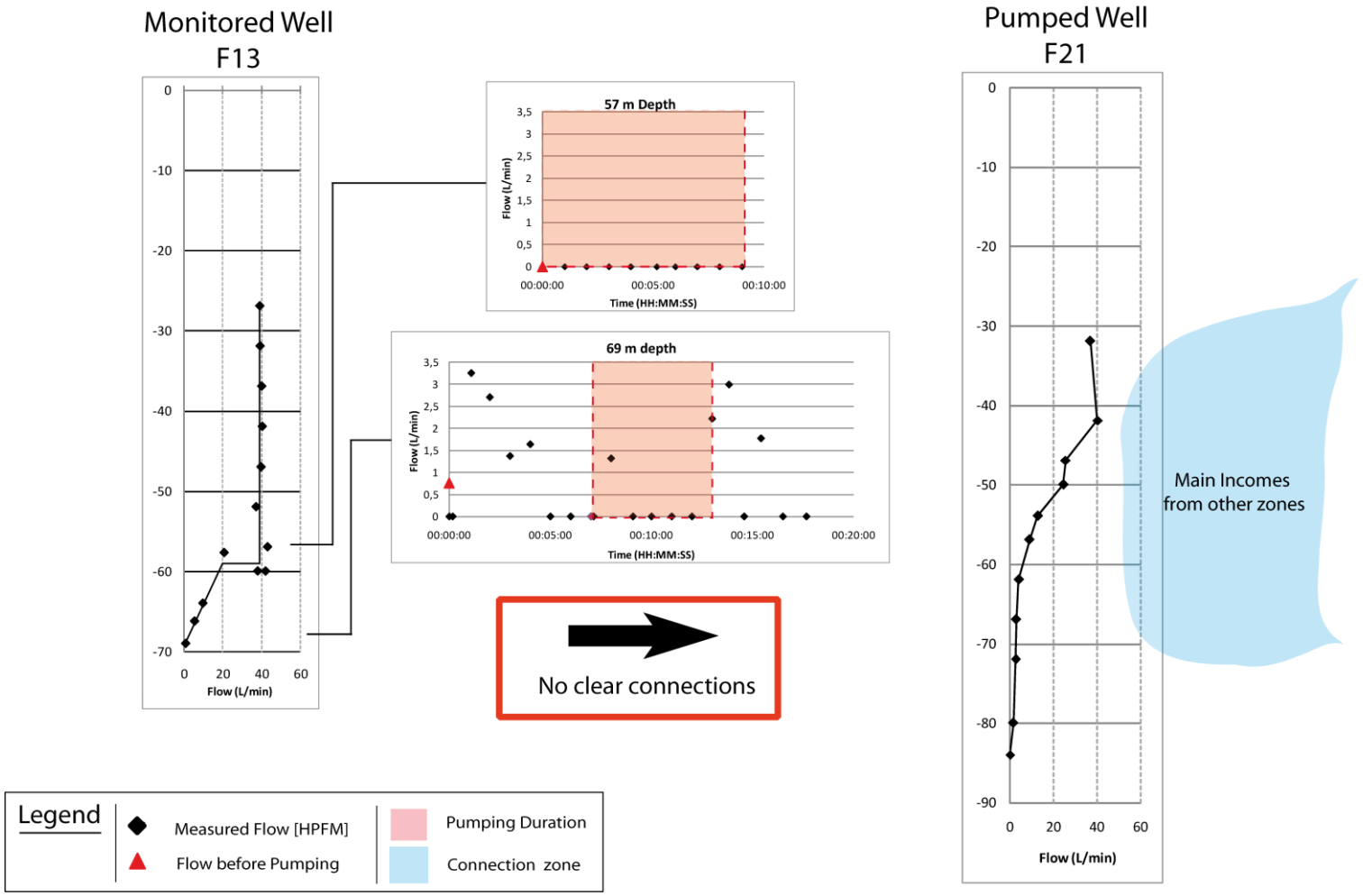
Cross Borehole F26: influence of pumping in F13 & F21



Cross Borehole F21- Influence of pumping in F13



Cross Borehole F13 - Influence of pumping in F21



Annexe 2:
Compléments d'informations sur le chapitre : Identification de la dénitrification autotrophe sur le site de Ploemeur
– Expérimentations de laboratoire –

Cette annexe présente les évolutions des cations et anions aux cours du temps pour chacune des séries réalisées présentées dans le chapitre : "Identification de la dénitrification autotrophe sur le site de Ploemeur – Expérimentations de laboratoire –"

Série 1

Les variations de concentrations des différents anions aux cours de la série 1 sont présentées sur la figure A1.

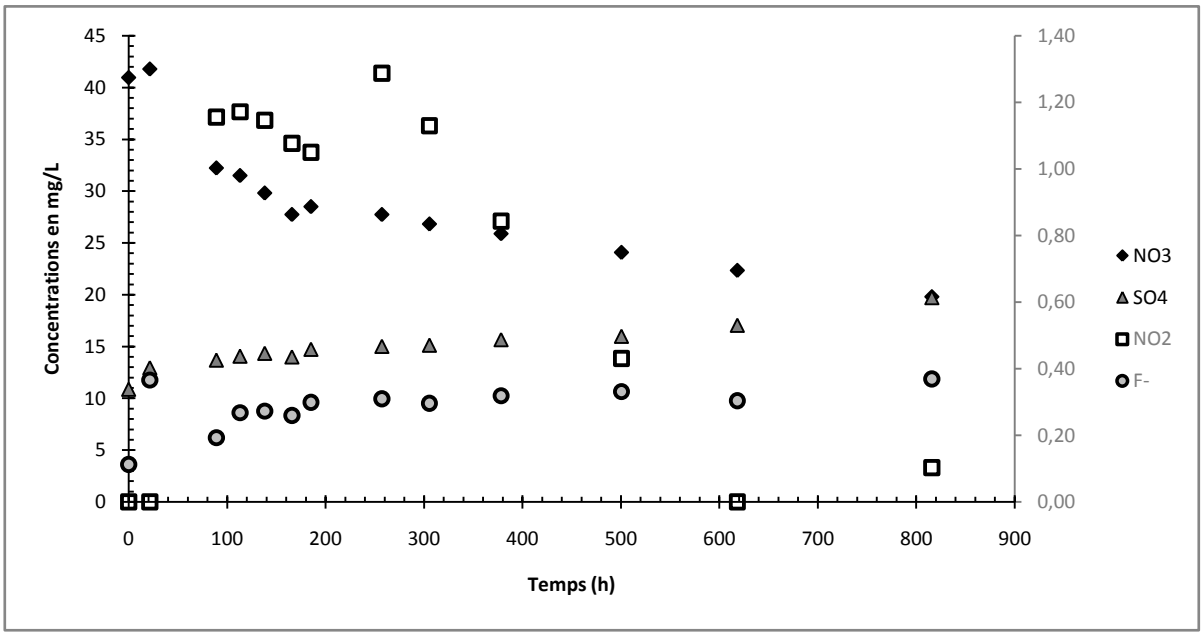


Figure A2.1 Evolution des concentrations en nitrates, nitrites, fluorures et sulfates dans le batch ; Les concentrations en nitrates et sulfates sont présentées sur l'axe de gauche et les concentrations en nitrites et fluorures sur l'axe de droite.

Série 2 :

L'évolution des concentrations des différents éléments dans ces batchs de la série 2 est présentée sur les figures suivantes :

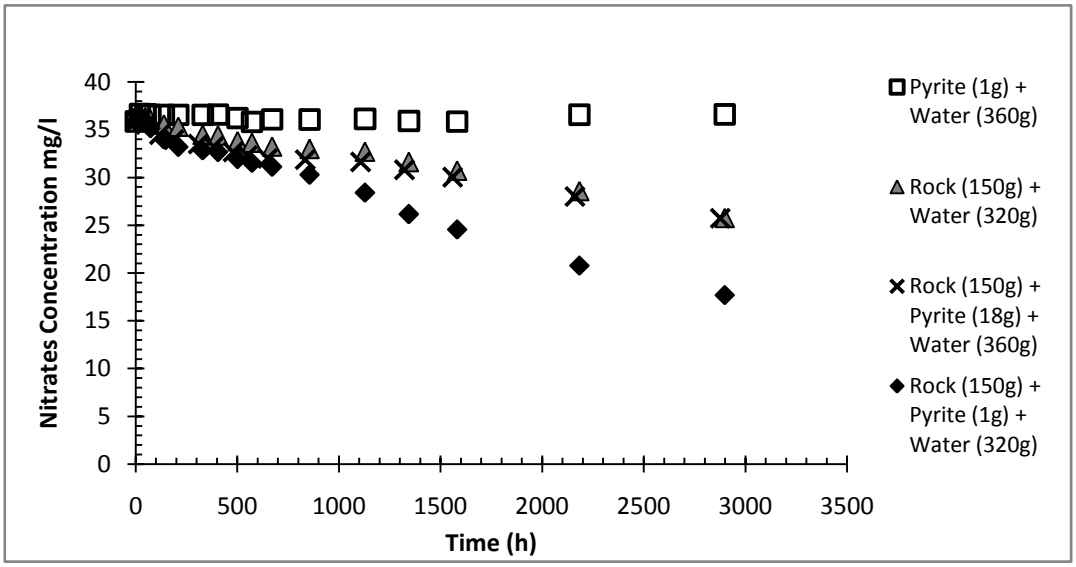


Figure A2.2: Concentrations en nitrates dans les batchs - Série 2

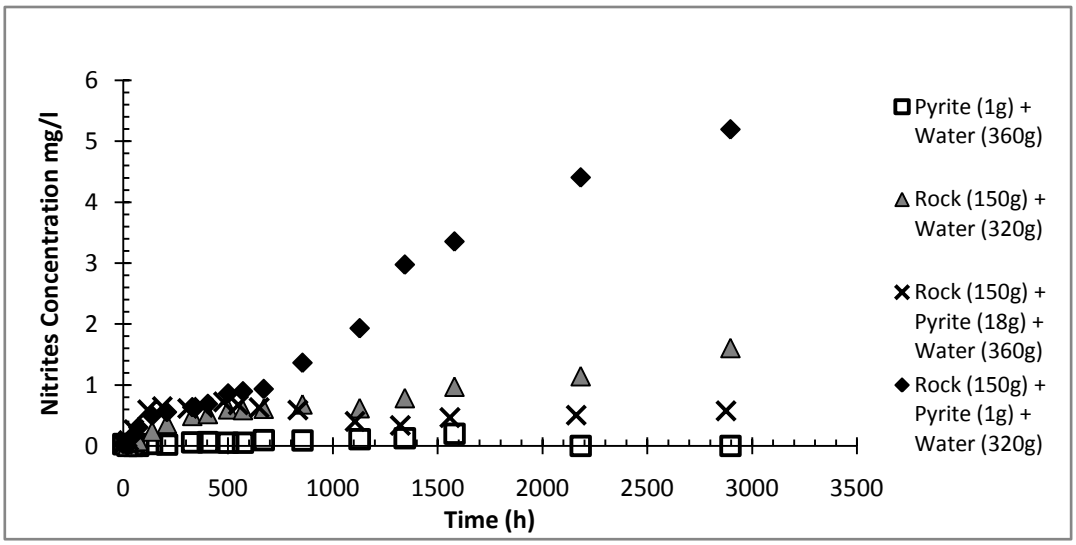


Figure A2.3: Concentrations en nitrites dans les batchs - Série 2

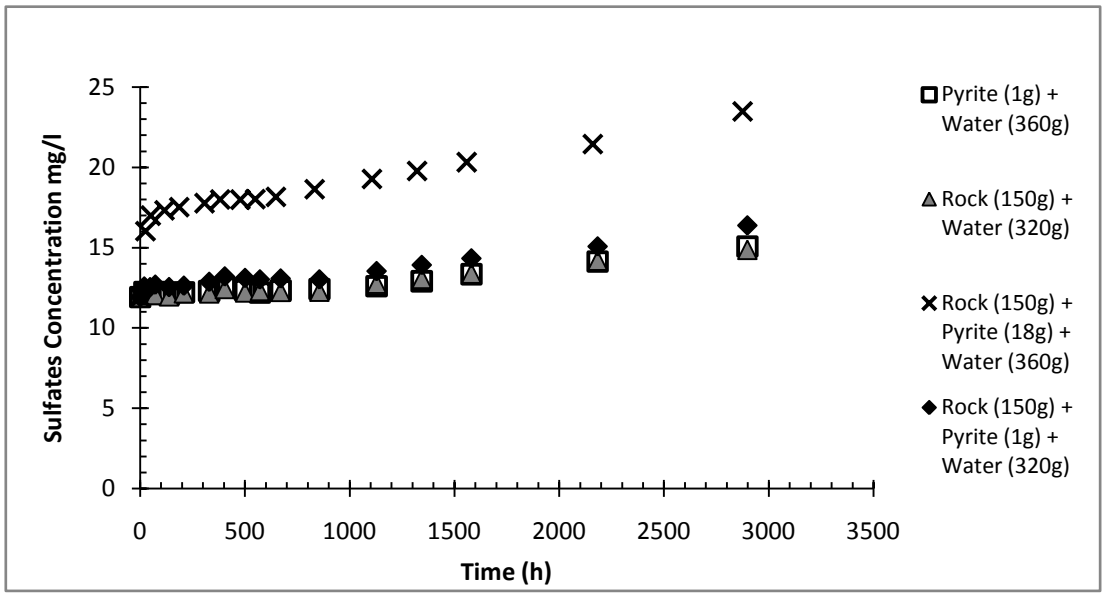


Figure A2.4: Concentrations en sulfates dans les batchs - Série 2

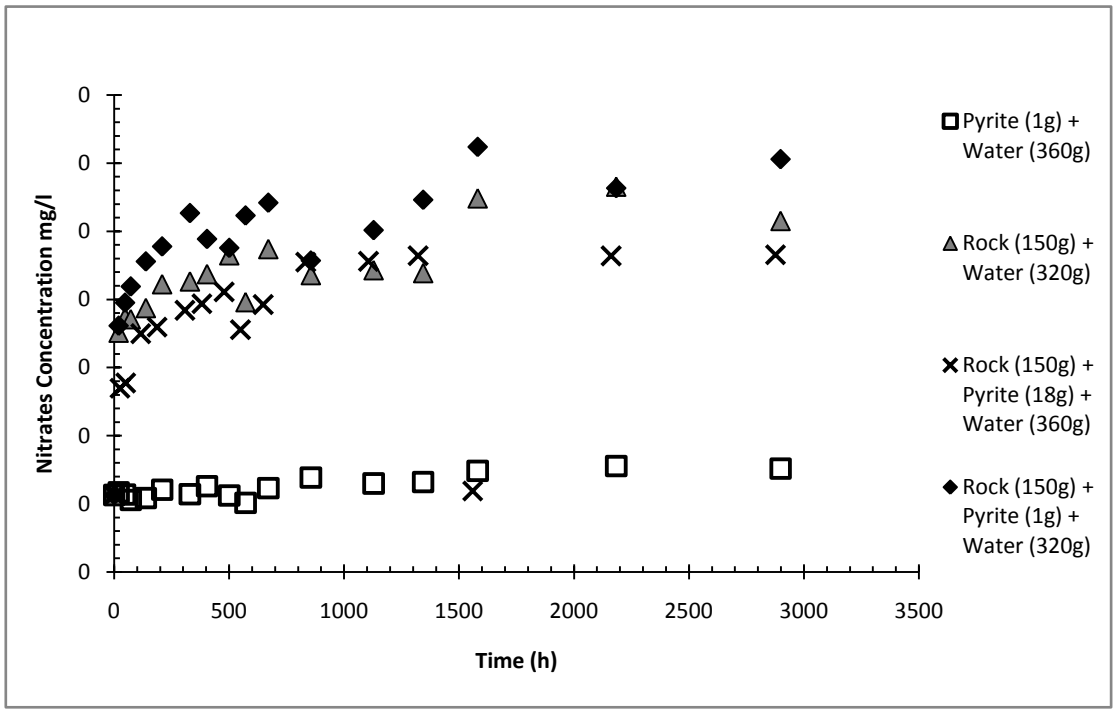


Figure A2.5: Concentrations en fluorures dans les batchs - Série 2

Sur la Figure A2. on remarque que trois des quatre batchs présentent une décroissance significative des nitrates. Le quatrième ne contenant que de la pyrite et de l'eau ne réagit pas. Les batchs ne contenant que de la roche ou de la roche et 18 g de pyrite ont le même comportement avec une lente décroissance des nitrates. Pour les deux batchs, cette décroissance s'accompagne d'une augmentation des nitrites allant jusqu'à 1,6 mg/L pour le batch de roche seule et 0,5 mg/L pour le batch roche + pyrite (18g). Le comportement au

niveau des sulfates est quand à lui différent avec une rapide hausse des sulfates dès le premier point de mesures puis une hausse progressive continue pour le batch roche + pyrite 18g. Le batch ne contenant que de la roche ne présente que la phase de croissance lente des sulfates qui est d'ailleurs identique pour les deux autres batchs. Le batch contenant de la roche et 1g de pyrite présente une baisse des nitrates plus importante que les autres et atteint une concentration de 17,6 mg/L au bout de 2897 h. Cette baisse s'accompagne aussi d'une hausse en nitrites la plus importante jusqu'à 5,19mg/L. On remarque pour chacun de ces batchs que la hausse de concentration en nitrites est continue et ne présente pas un pic comme cela était le cas pour le batch réalisé lors du test précédent. Les concentrations en nitrates (à gauche) et nitrites (à droite) sont anti-corrélées.

Série 3

Les figures suivantes présentent l'évolution des concentrations des différents anions lors de la troisième série:

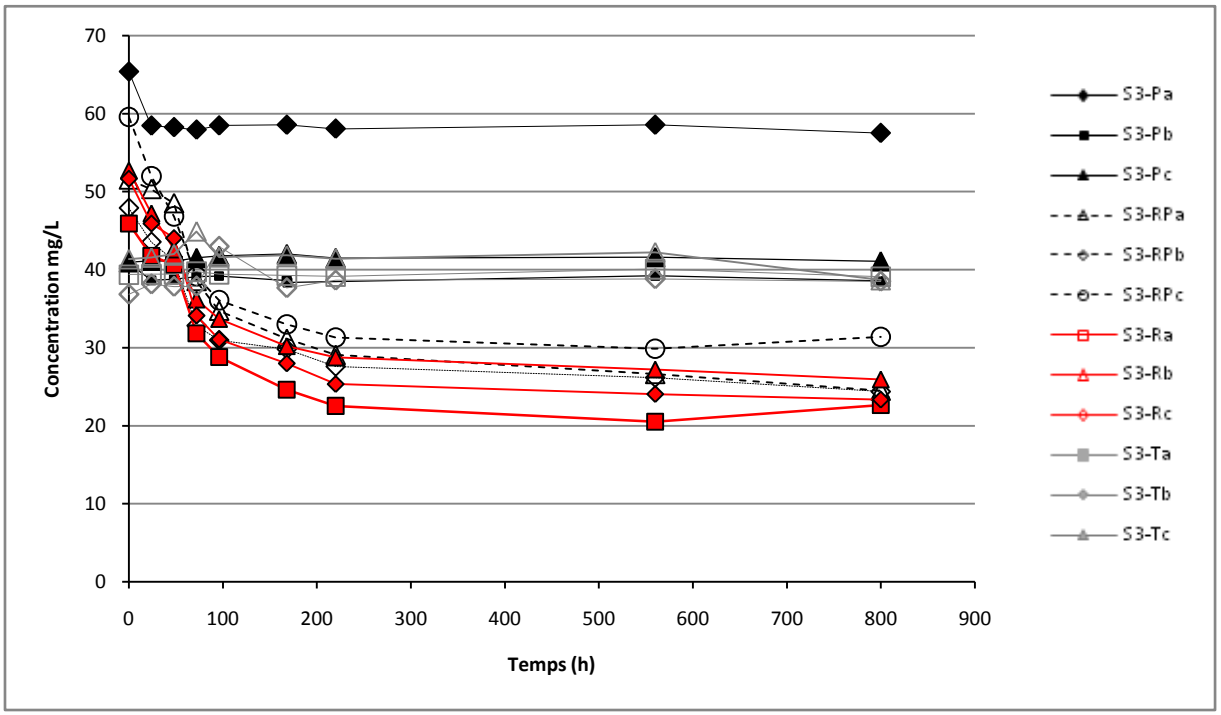


Figure A2.6: Evolution des concentrations en nitrates

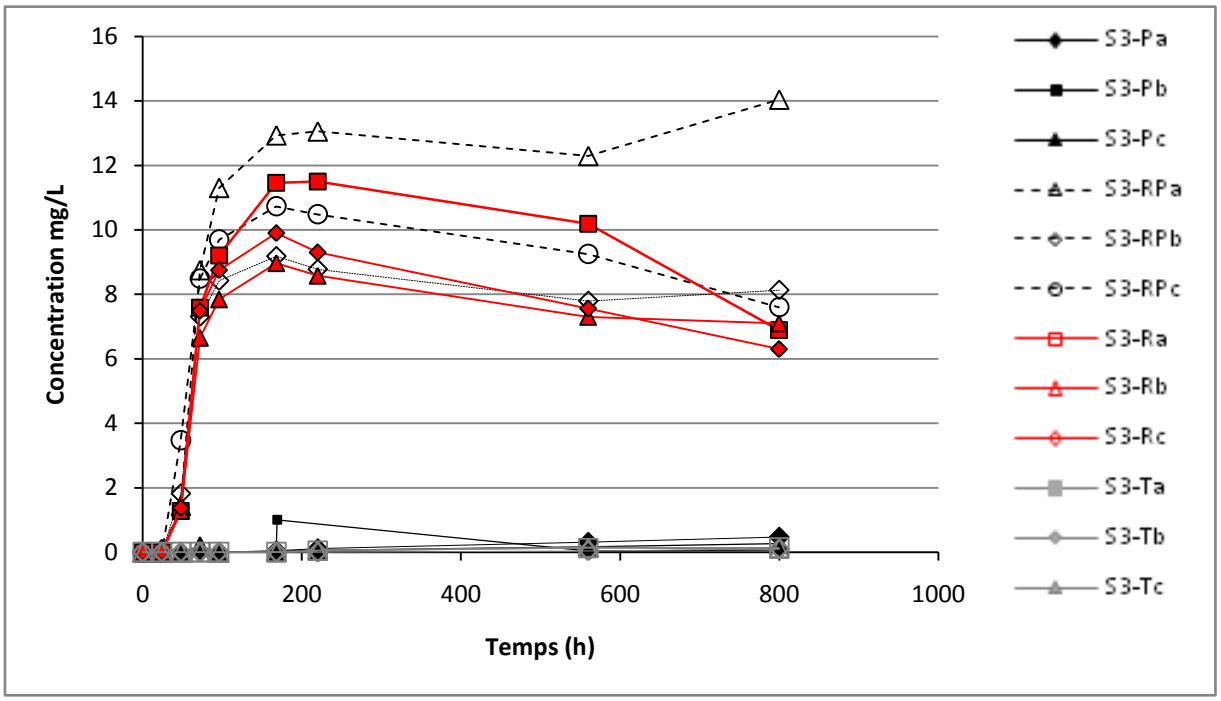


Figure A2.7: Evolution des concentrations en nitrites

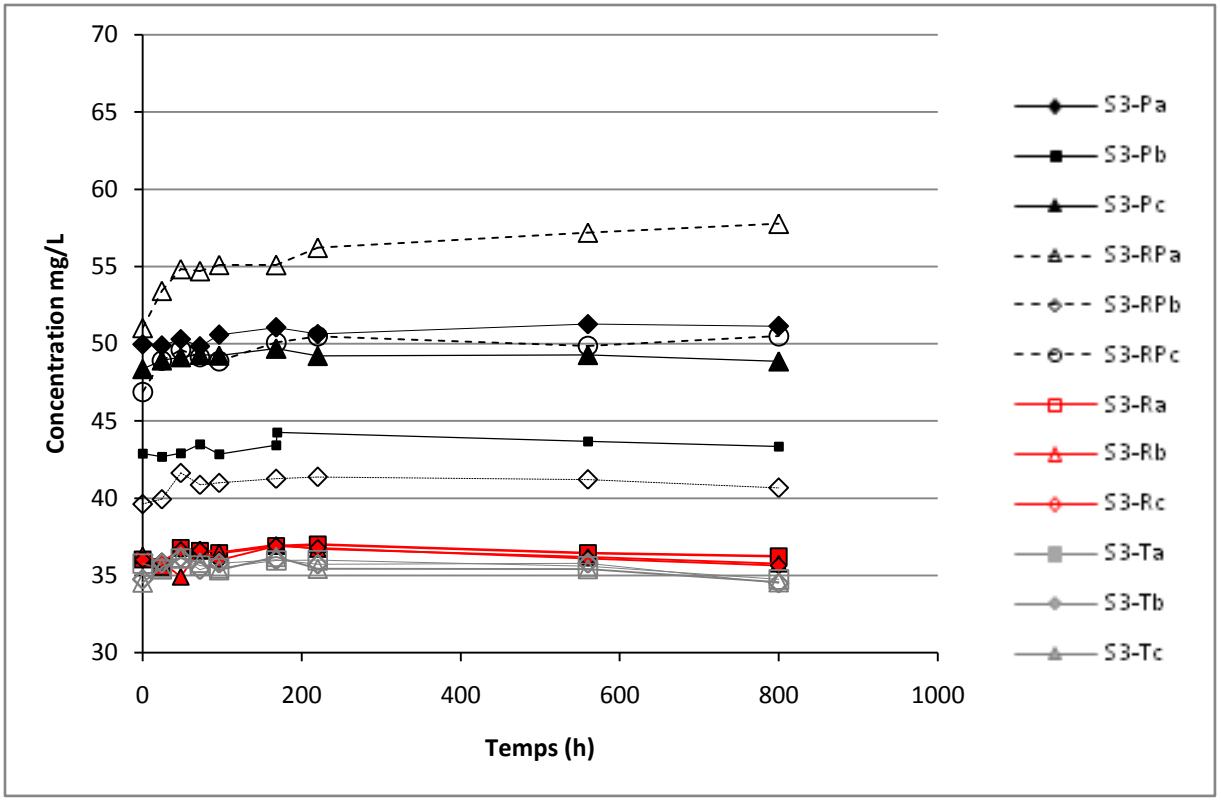


Figure A2.8: Evolution des concentrations en sulfates

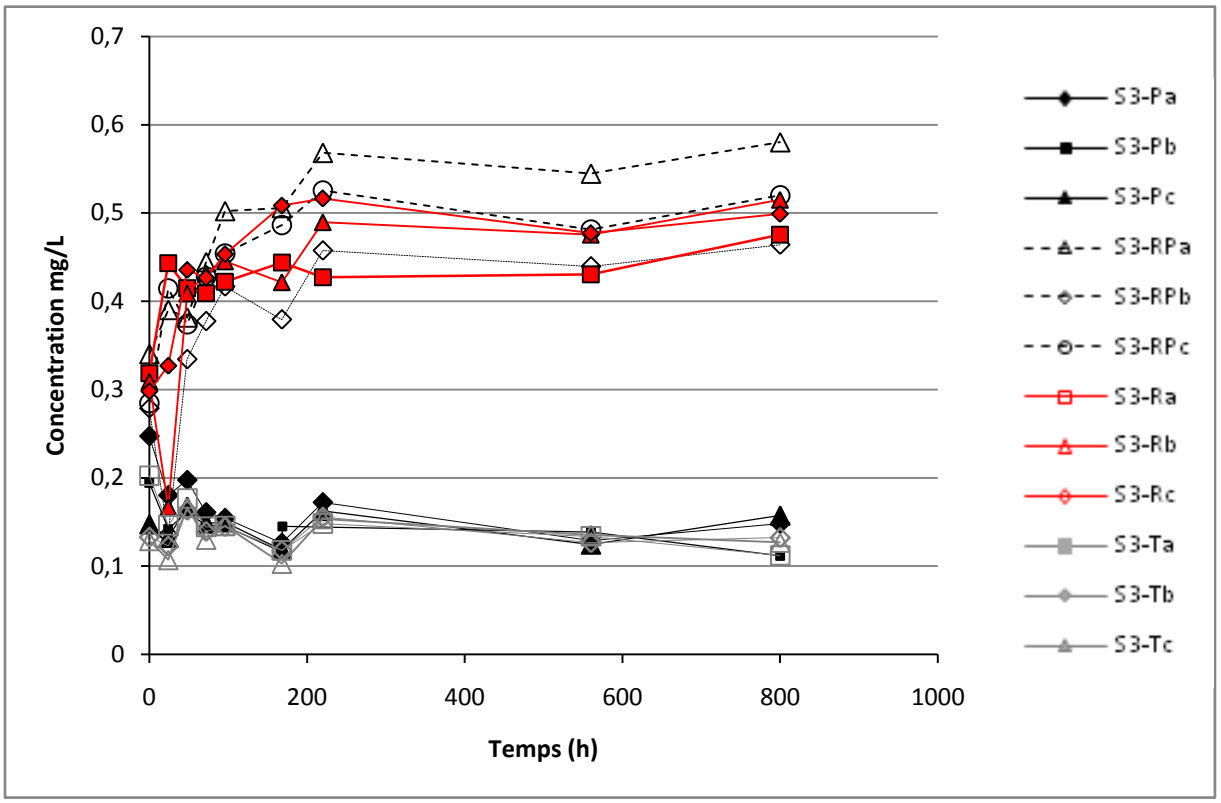


Figure A2.9 : Evolution des concentrations en fluorures

La Figure A2. présente l'évolution des concentrations en nitrates dans les batchs. Les batchs contenant uniquement de l'eau ou de l'eau et de la pyrite ne changent pas de concentration et ne permettent pas d'observer de réactions. Les batchs contenant à la fois de la roche et de la pyrite montrent quand à eux un abattement de la concentration en nitrates. On observe une forte baisse de concentrations pour ces six batchs entre les temps 0 et 200 heures puis une stabilisation. On note que les batchs contenant de la pyrite ont une réactivité légèrement moindre. Une bonne cohérence entre les résultats montre que les expériences sont répétables. La Figure A2. montre l'évolution des nitrites. N'ayant pas de réactions dans les batchs ne contenant pas de granite, il n'y a pas d'apparition de nitrites dans ces systèmes (les nitrites étant des sous-produits de la dénitrification). En revanche les batchs contenant du granite montrent une très forte augmentation des concentrations en nitrites jusqu'à 13 mg/L en 200 heures puis une légère baisse de concentration survient. La forte hausse de concentration au début correspond à la forte baisse des nitrates. On note qu'une très grande partie des nitrates consommés sont transformés en nitrites et donc que la réaction de dénitrification n'est pas complète. Le début de baisse des nitrites montre que la réaction continue mais que celle-ci devient très lente après une phase rapide ayant lieu durant les 200 premières heures. Les sulfates (Figure A2.) des batchs ne contenant pas de pyrite ne varient pas et montrent ainsi

qu'ils ne font pas partie de la réaction d'intérêt. Les batchs contenant de la pyrite ont tous des concentrations en sulfates plus importantes mais celles-ci n'évoluent pas au cours du temps. Les sulfates produits viennent donc de la pyrite mais leur rôle dans la réaction ne semble pas prédominant. Les fluorures (F^-) ont aussi été analysés Figure A2.. On remarque sur cette figure que les batchs ne contenant pas de granite ne présentent pas de variations et que les concentrations sont plus faibles. Dans le cas de batchs contenant des granites on constate une augmentation de la concentration forte dans les 200 premières heures suivie d'une relative stagnation. Ce signal est clairement anti-corrélé avec le signal des nitrates indiquant un lien entre ces différents éléments.

Les cations mesurés par ICPMS sont présentés sur les figures suivantes :

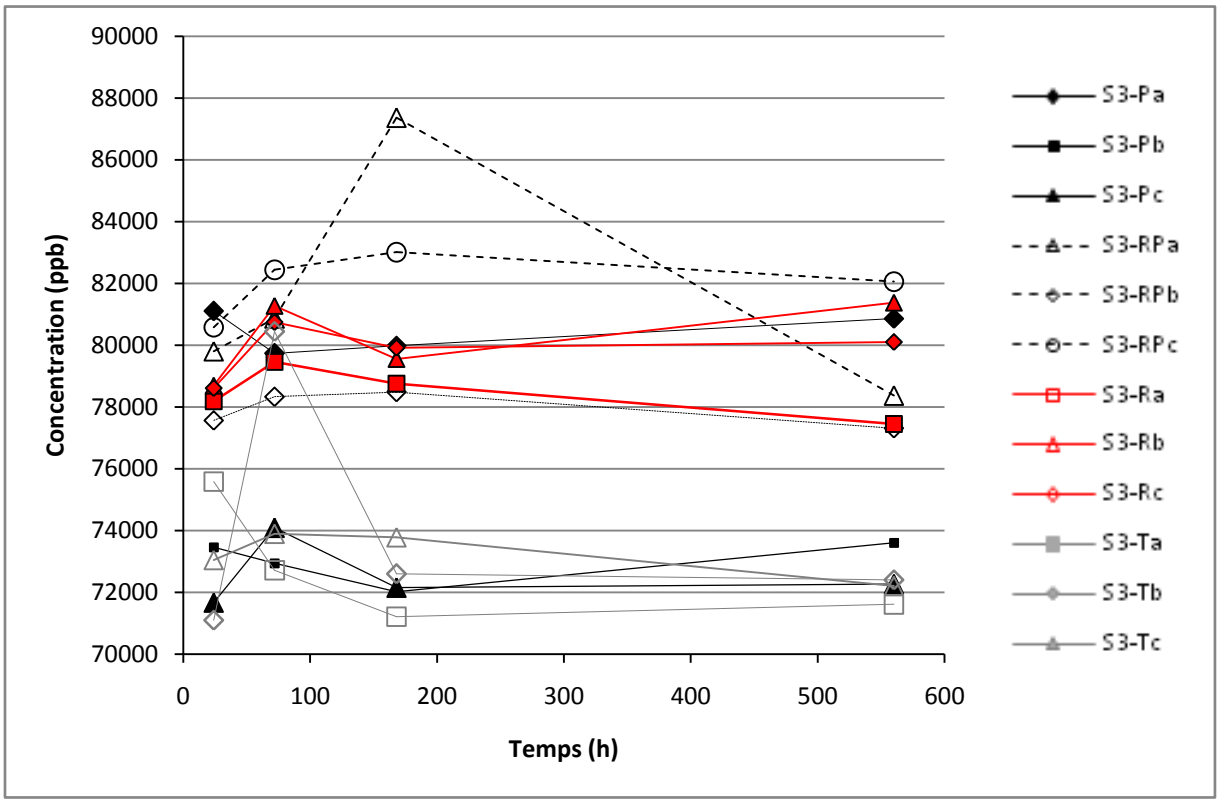


Figure A2.92: Evolution des concentrations en sodium

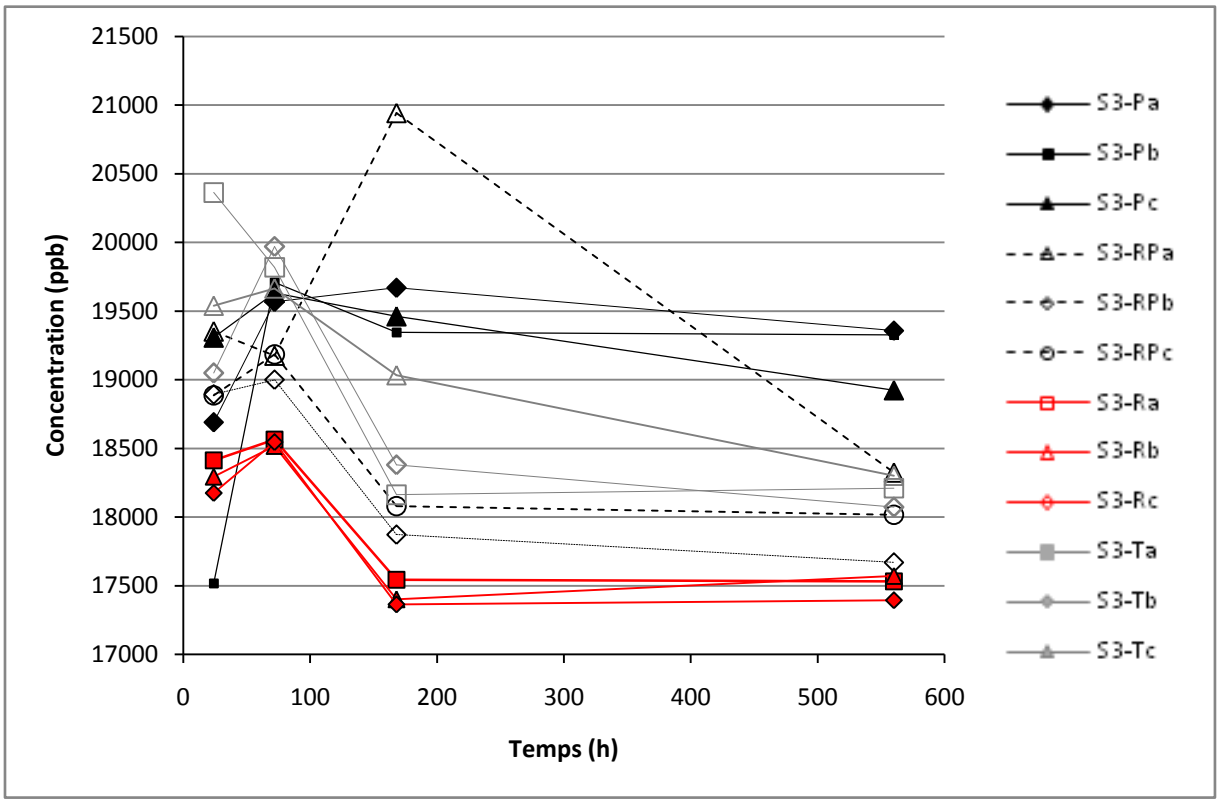


Figure A2.93: Evolution des concentrations en magnésium

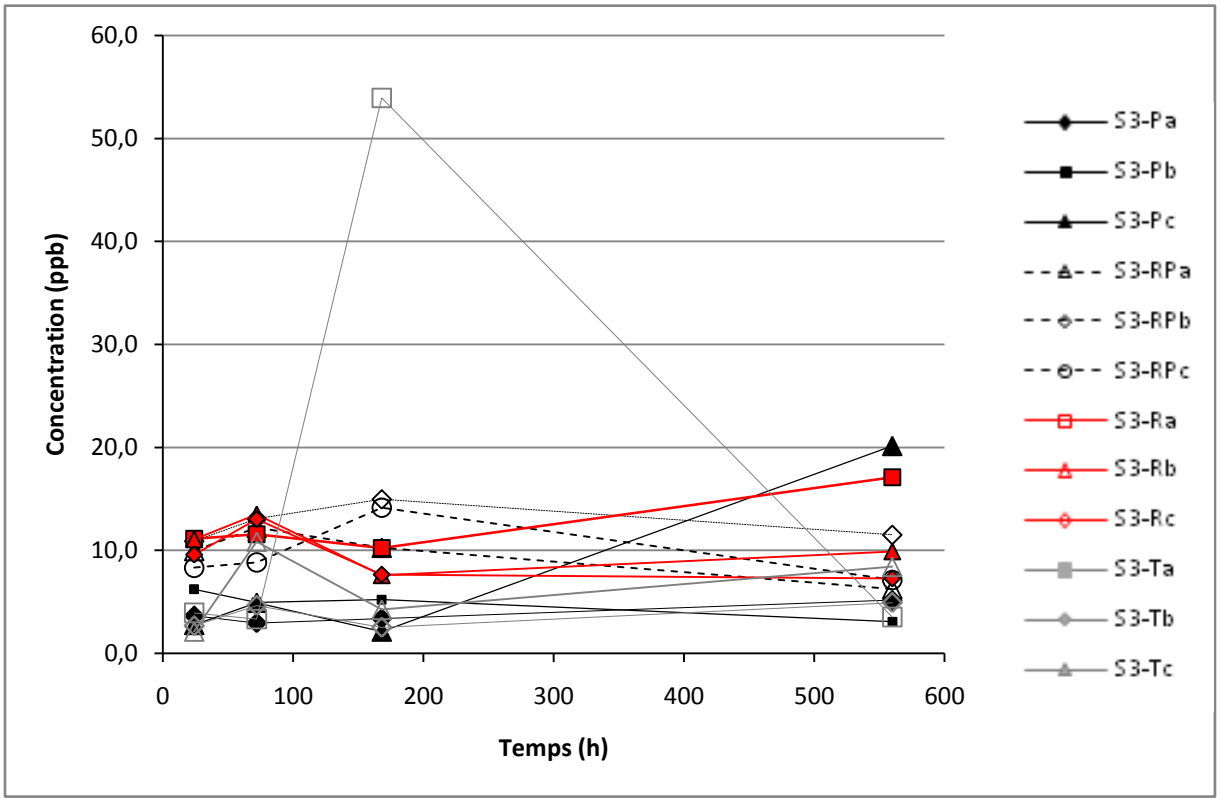


Figure A2.94: Evolution des concentrations en aluminium

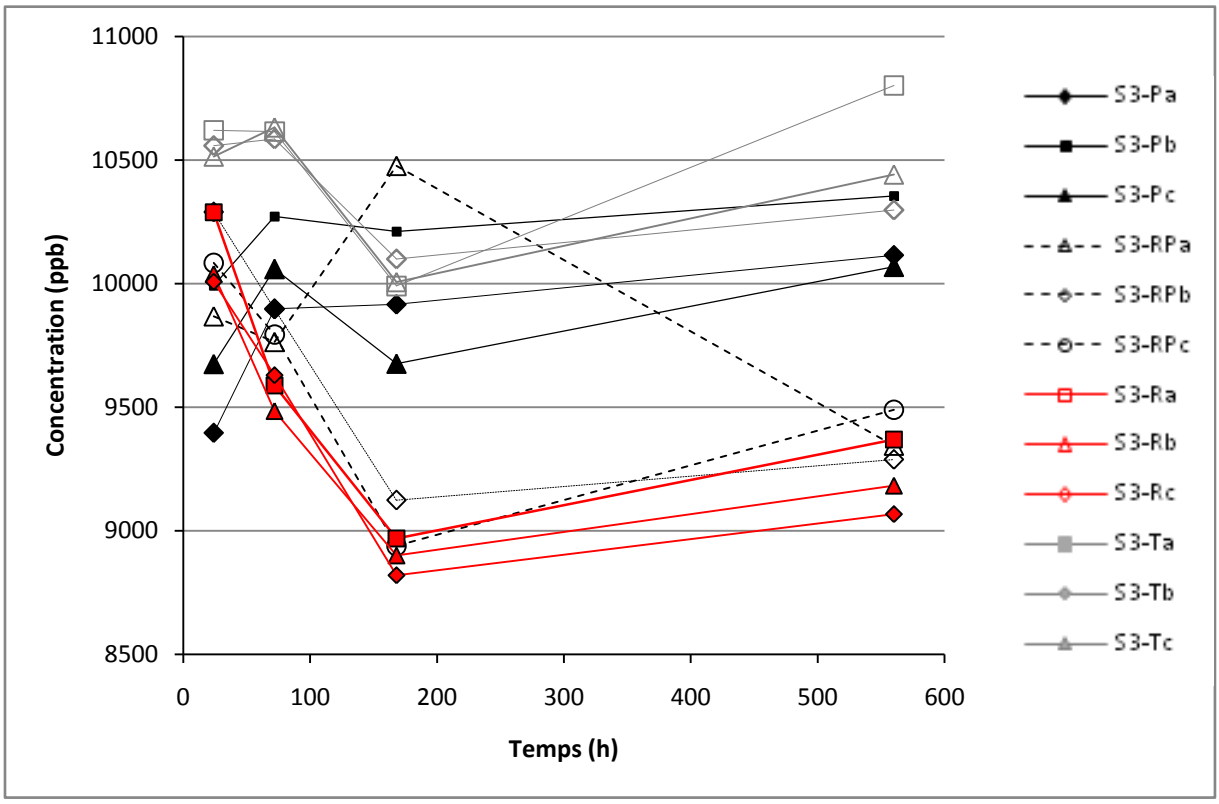


Figure A2.95: Evolution des concentrations en silice

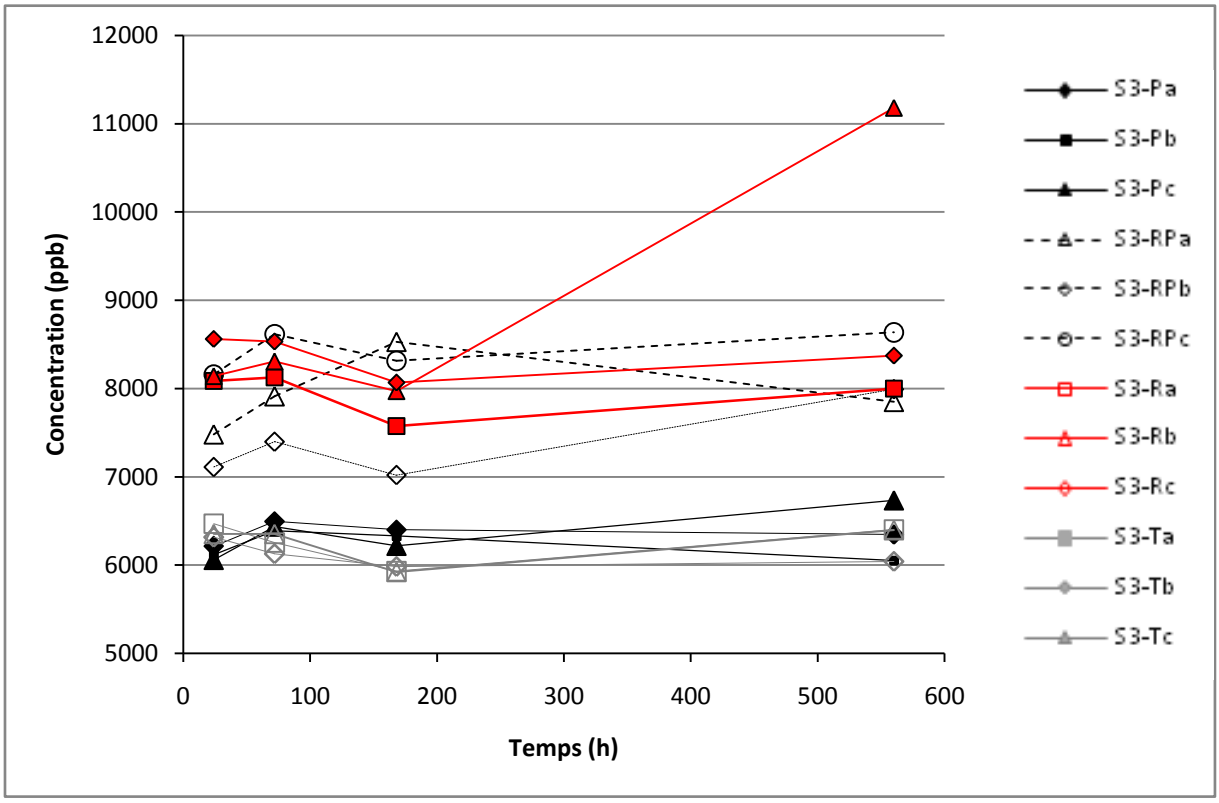


Figure A2.96: Evolution des concentrations en potassium

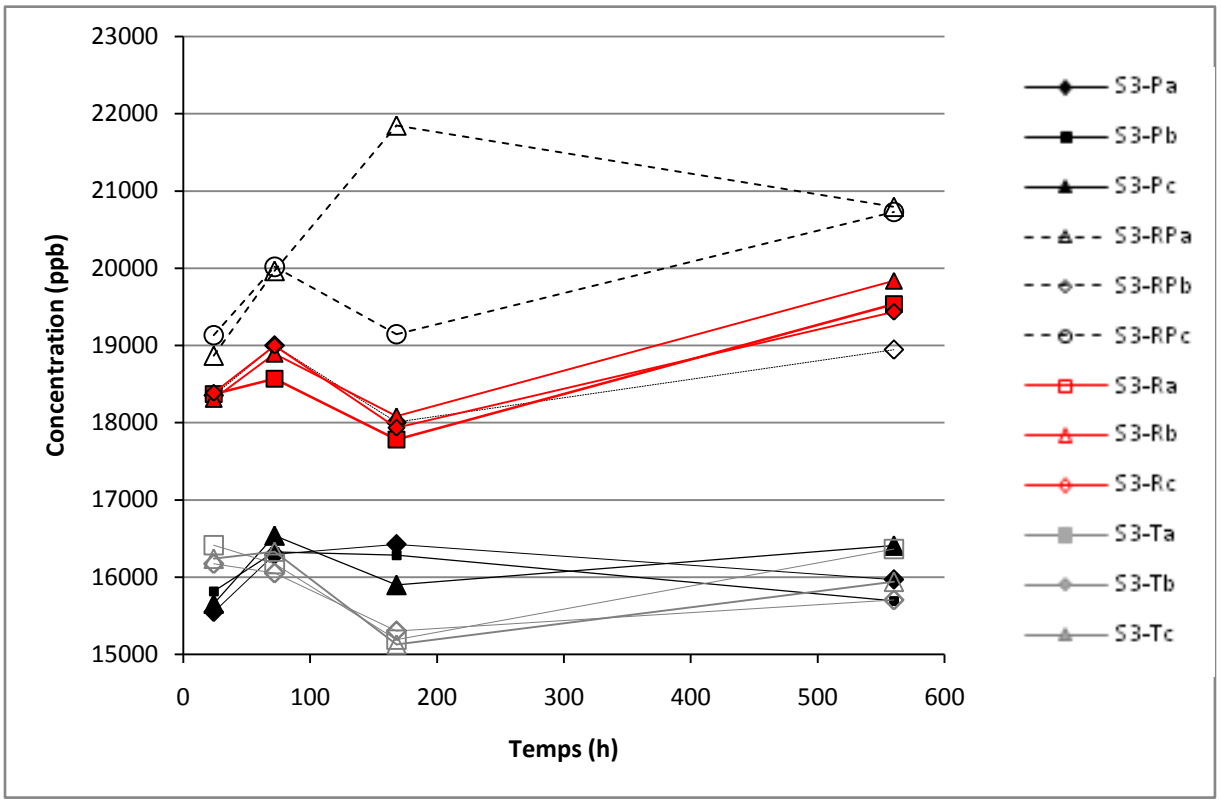


Figure A2.97: Evolution des concentrations en calcium

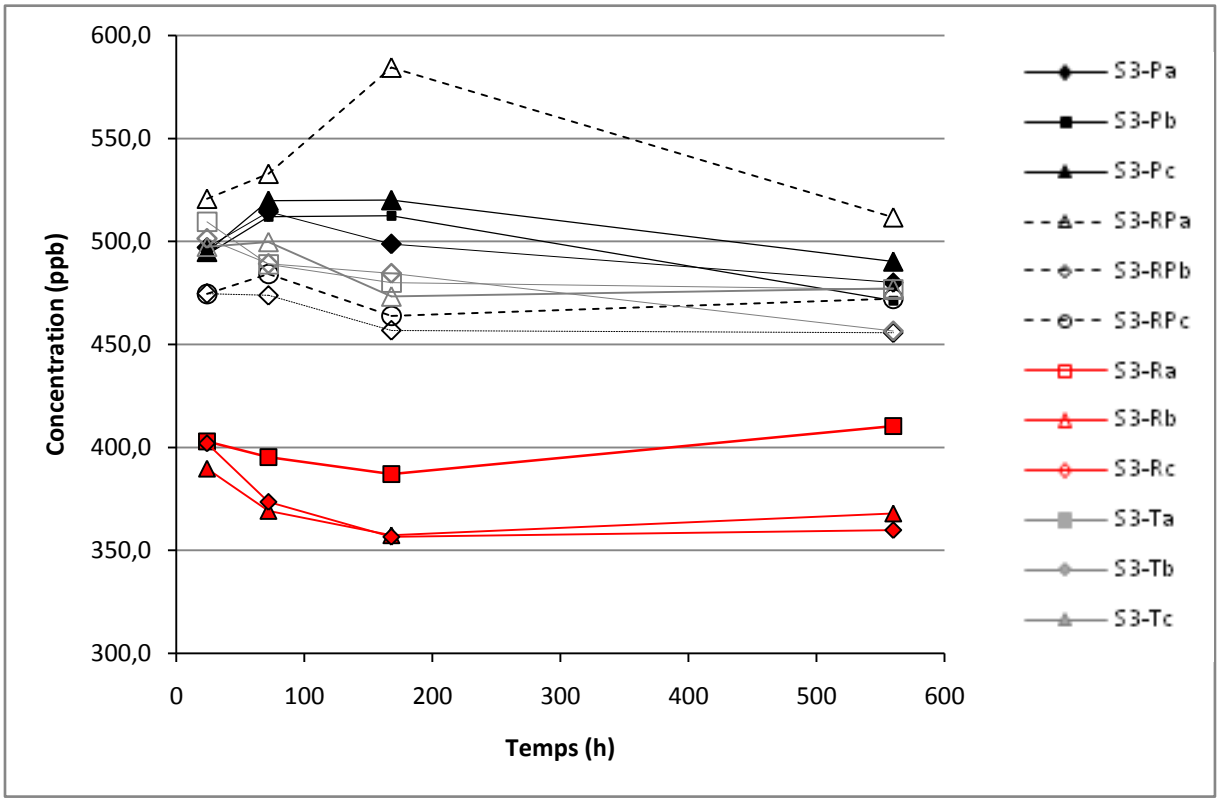


Figure A2.98: Evolution des concentrations en manganèse

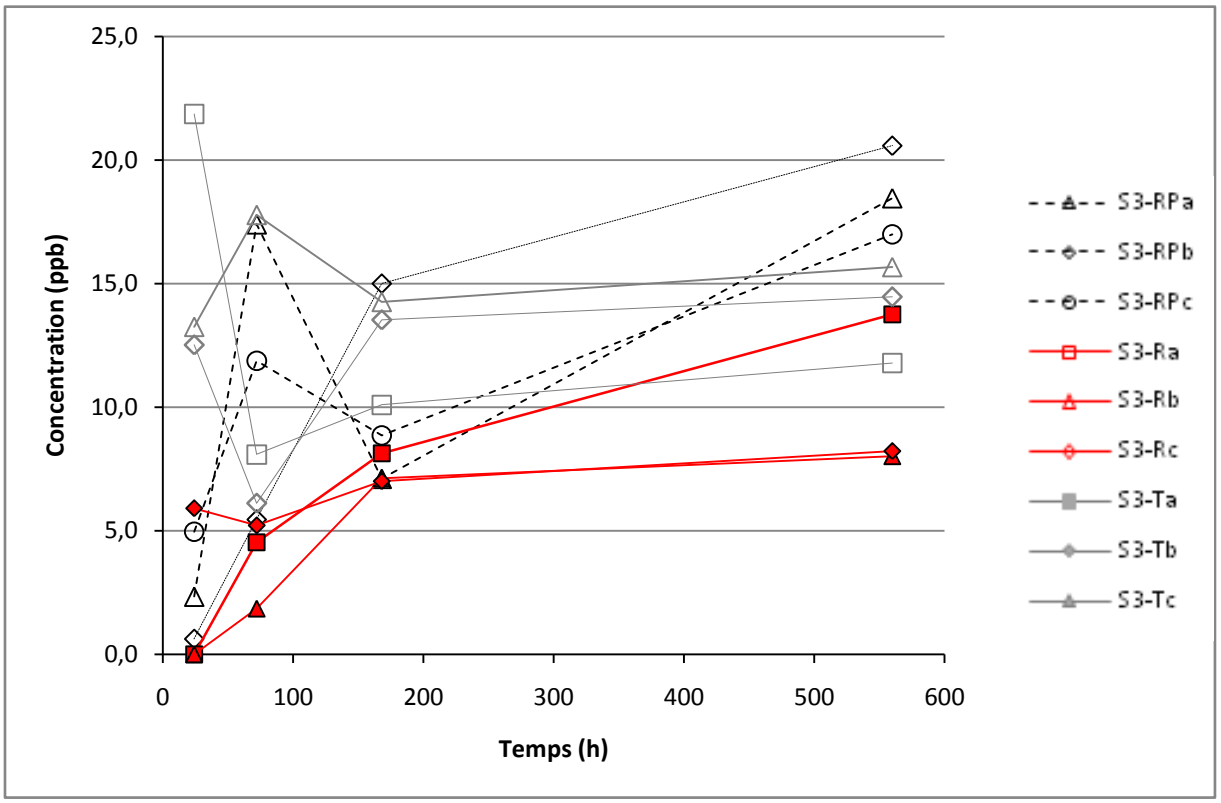


Figure A2.99: Evolution des concentrations en fer

Les tendances observables du point de vue des cations sont moins claires que celles des anions. Cependant les différentes variations renseignent sur la réaction en cours. D'une manière générale on constate l'existence de deux groupes de batchs ayant des comportements différents. Le premier groupe est composé des batchs ne contenant que de l'eau ou de l'eau et de la pyrite qui en l'absence de roche ne présente pas de grandes variations. Le second groupe composé des batchs contenant de la roche (avec ou sans ajout de pyrite) présente quand à lui des variations. Les différences entre ces groupes fournissent ainsi des informations sur les relarguages liés à la roche dans les premiers temps de l'expérience et compensent ainsi la relative faible densité de prélèvements aux temps courts. Cette description des résultats sur ces éléments sera principalement discutée en termes de tendances.

La Figure A2.92 donne l'évolution des concentrations en sodium. Les concentrations en sodium restent constantes dans le temps pour chacun des batchs, cependant tous les batchs contenant de la roche ont des concentrations plus élevées de l'ordre de 7 mg/L, ce qui indique une dissolution de cet élément. Concernant le magnésium (Figure A2.93) on observe une précipitation avec une baisse des concentrations (excepté pour les batchs de pyrite seule), ce qui implique une précipitation de cet élément avant une stagnation. Figure A2.94,

l'aluminium est en parti mis en solution à partir de la roche (concentrations plus élevées dans ces batchs) sans pour autant présenter de grandes variations. Le point dont la concentration est supérieure à 50 ppb peut être considéré comme aberrant. Ce point est d'ailleurs aberrant sur l'ensemble des éléments montrant vraisemblablement un problème de dilution. La silice (Figure A2.95) présente clairement une précipitation dans les premiers temps avant une stabilisation voir une légère remontée des concentrations. Le potassium (Figure A2.96) reste stable dans presque tous les batchs. On note toutefois qu'un relarguage a eu lieu car les batchs contenant de la roche ont des concentrations plus importantes. Le comportement du calcium est identique (Figure A2.97). Le manganèse reste constant dans tous les batchs mais les concentrations sont plus faibles dans les batchs ne contenant que de la roche. Le dernier élément analysé est le fer total (Figure A2.99). Les données des batchs ne contenant que de l'eau et de la pyrite ont été éliminées du graphique en raison de concentrations fortes (650 ppb et 90 ppb pour les premiers points de deux batchs avant des baisses draconiennes lors des points suivants). Ce fer provient clairement de la pyrite. Le batch ne contenant que de l'eau garde une concentration relativement constante de l'ordre de 15 ppb. Les deux batchs contenant de la roche présentent une claire augmentation même si celle-ci reste faible. Les batchs contenant de la pyrite ont une concentration légèrement plus importante. Les concentrations sont faibles en raison de précipitations dans ces conditions.

Annexe 3 :
Modèle numérique d'écoulement sur le site de Ploemeur

Cette annexe présente le modèle numérique développé en parallèle de la solution analytique présentée au sein du chapitre 4 de la seconde partie de ce document. L'objectif du modèle est de tester l'effet de la dispersivité sur la réaction et de valider les hypothèses de la solution analytique. Ce modèle servira de base pour le développement futur d'un modèle pouvant intégrer de plus larges processus géochimiques. La simplicité de ce modèle montre qu'il peut être intégré dans un modèle géochimique tel que PhreeqC. Ce modèle est appliqué sur le transfert d'un soluté d'une distance égale à la distance entre le puits F19 (en bordure du site où la concentration en nitrates observée est de 52 mg/L) et le puits F29 (puits de pompage où la concentration observée est de 5 mg/L)

Descriptif du modèle

Géométrie du modèle :

La géométrie du modèle est présentée sur la figure suivante. Le maillage est composé de 1920 points également répartis le long du segment.

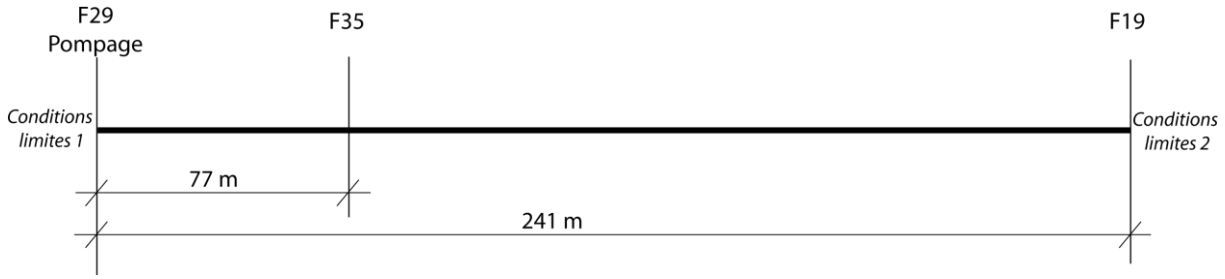


Figure A3.100: Géométrie du modèle

Modèle de flux :

Comme pour la solution analytique nous considérons que les écoulements sont en conditions stationnaires (le pompage étant mis en place depuis plusieurs mois au moment de la prise de données). Nous considérerons un modèle de perméabilité homogène où la perméabilité de la zone est estimée par la transmissivité ($T=2.3.10^{-3}$ m^2/s) mesurée dans (Le Borgne et al., 2006a) rapportée à une hauteur de zone fracturée de 10 m. Il est imposé des conditions limites

de charge imposée aux extrémités correspondant aux niveaux piézométriques mesurés le 26/09/2002 aux puits F19 et F29. Le modèle est validé en comparant la surface piézométrique générée aux données de terrain ainsi qu'a la solution analytique de Dupuit pour une nappe captive donnée par l'équation suivante :

$$h(r) - H = \frac{Q}{2\pi T} Ln\left(\frac{r}{R}\right)$$

Avec :

h(r)= Rabattement à une distance r du puits de pompage

Q = Débit au puits

T = Transmissivité (m^2/s)

R= Rayon de non influence du pompage, ici considéré au puits F19

H= Niveau piézométrique

La comparaison entre le modèle numérique et les données et la solution de Dupuit est présentée sur la figure suivante (Figure 89).

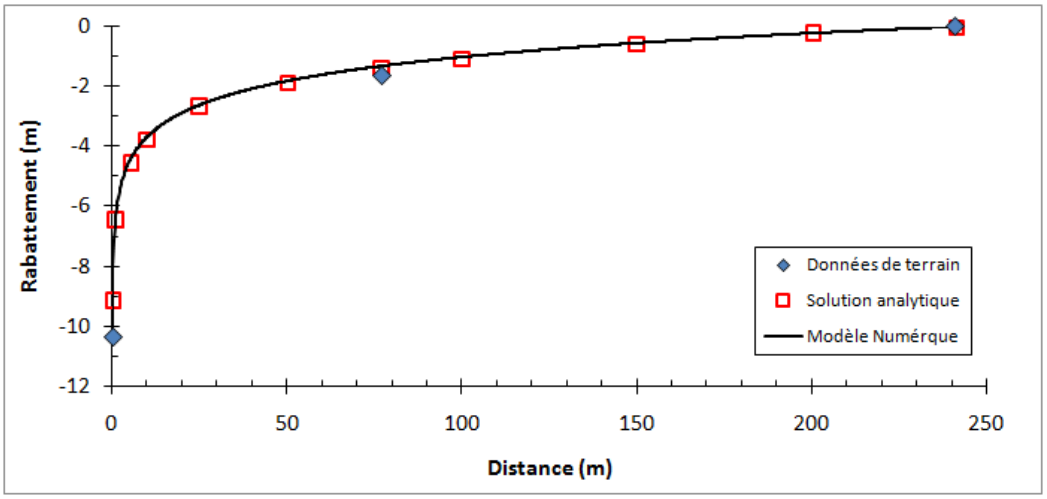


Figure A3.101:Validation du cône de rabattement

Les vitesses d'écoulements moyennes q (vitesse de Darcy) sont ensuite données par la loi de Darcy (équation (16)).

Modèle de transport :

Le transport radial d'un soluté non sujet à la sorption dans un aquifère homogène confiné est donné par l'équation suivante où $D\frac{\partial^2 C}{\partial r^2}$ est le terme de diffusion et $v\frac{\partial C}{\partial r}$ le terme d'advection.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} - v\frac{\partial C}{\partial r} - R$$

C est la concentration du soluté ; *r* est la distance au puits ; *D* est le coefficient de dispersion ; *v* est la vitesse moyenne d'écoulements dans les pores (donnée par : $v=q/\theta$ où θ est la porosité). *R* est un terme de réaction qui, selon la cinétique de premier ordre, est égal à $R = k*C$ avec *k* coefficient de la réaction. La validité des vitesses d'écoulements générées est vérifiée en comparant la distance de déplacement d'un soluté non réactif entre 241 m (puits F19) et 150 m mètres (zone où le gradient peut être considéré comme linéaire à la loi de Darcy). La validation du modèle en termes de réactivité est effectuée en comparant la solution analytique d'un soluté sans transport donnée par l'équation suivante et par notre modèle numérique en condition de flux nul.

$$C(t) = C_0 e^{-kt}$$

La comparaison des données et de la modélisation est donnée sur la figure suivante.

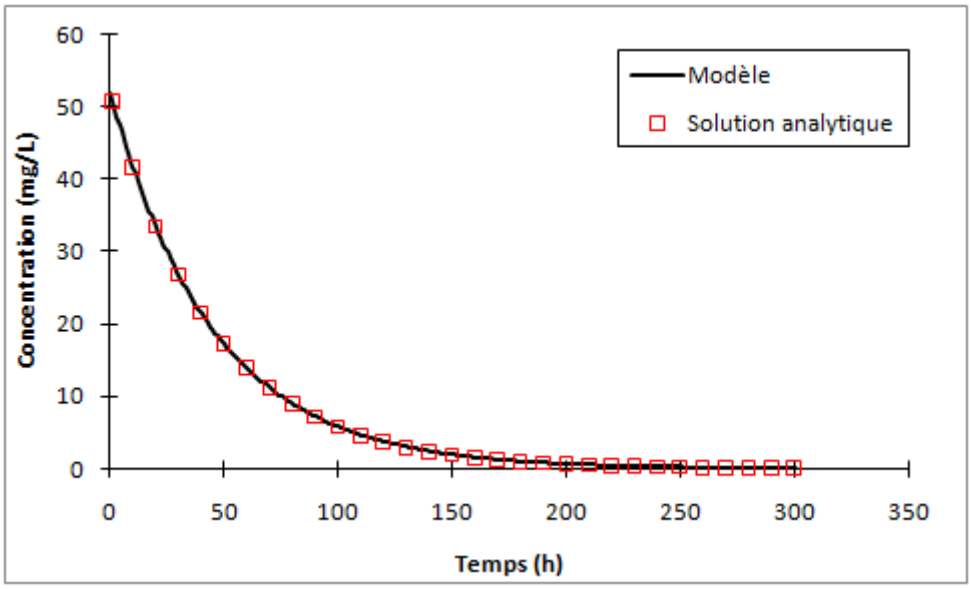


Figure A3.102: Validation de la cinétique de réaction

Le temps de dégradation d'un soluté par une cinétique de premier ordre est donné par l'équation suivante :

$$t = \frac{\ln\left(\frac{C}{C_0}\right)}{-k}$$

Notre application où la concentration maximale observée est de 52 mg/L et où nous considérerons une dégradation totale des nitrates à 0,001 mg/L donne un temps de réaction de 493 h. Les simulations seront donc conduites sur 500 h.

Applications

Aucun essai de traçage n'ayant été réalisé sur le site la porosité reste une inconnue mais celle-ci a un effet prépondérant sur la vitesse d'écoulement et donc les distances parcourues. Afin d'étudier deux cas limites les simulations sont réalisées avec des porosités de 1 et 10 % encadrant ainsi la gamme de porosité attendue. Pour chacun de ces modèles, les concentrations en solutés sont nulles au début de l'expérience. Les conditions limites sont des concentrations constantes de 52 mg/L à la distance du puits d'injection F19 et des concentrations nulles de l'autre côté. Lors de ces applications nous considérons que l'ensemble du site est en condition d'anaérobie permettant une dénitrification. Le flux est résolu en conditions stationnaires générant ainsi le champ de vitesse puis en fonction de ce champ de vitesse le transport est résolu en conditions transitoires.

Influence de la dispersivité

La solution analytique présentée dans le chapitre 4 ne prend pas en compte l'influence de la dispersivité. Pour tester l'influence de ce paramètre nous avons réalisé un modèle numérique incluant de la dispersivité (α=0,38 m ; provenant de l'essai de traçage présenté chapitre 1) et effectué une comparaison de la solution analytique et de la solution numérique. Afin d'augmenter les différences possibles, l'évolution des concentrations est présenté sur une échelle logarithmique. L'équation analytique utilisée est rappelée ici :

$$\frac{C_{(r)}}{C_{(R_0)}} = exp\left[\frac{-k\pi h\theta}{Q}(R_0^2 - R^2)\right]$$

L'équation précédente étant linéaire en échelle logarithmique avec R^2, l'unité de l'axe des abscisses est le carré de la distance au puits.

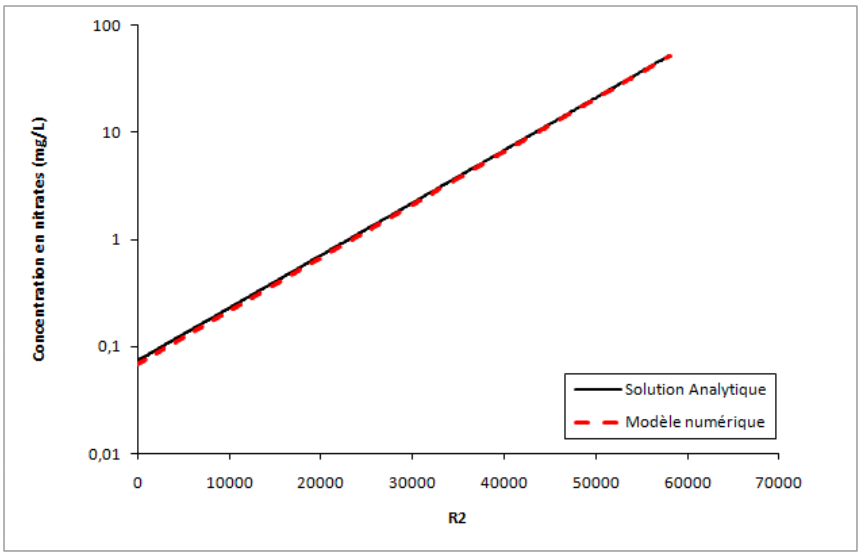


Figure A3.103: Comparaison des solutions analytique et numérique. L'axe des abscisses représente la distance au carré au puits de pompage R^2

Cas d'un transport d'une distance $R=R_{F19}$ vers F29

L'application vise à évaluer la distance nécessaire sous ces conditions idéales pour la dégradation des 52 mg/L observés dans le puits F19 sous ces contraintes de flux.

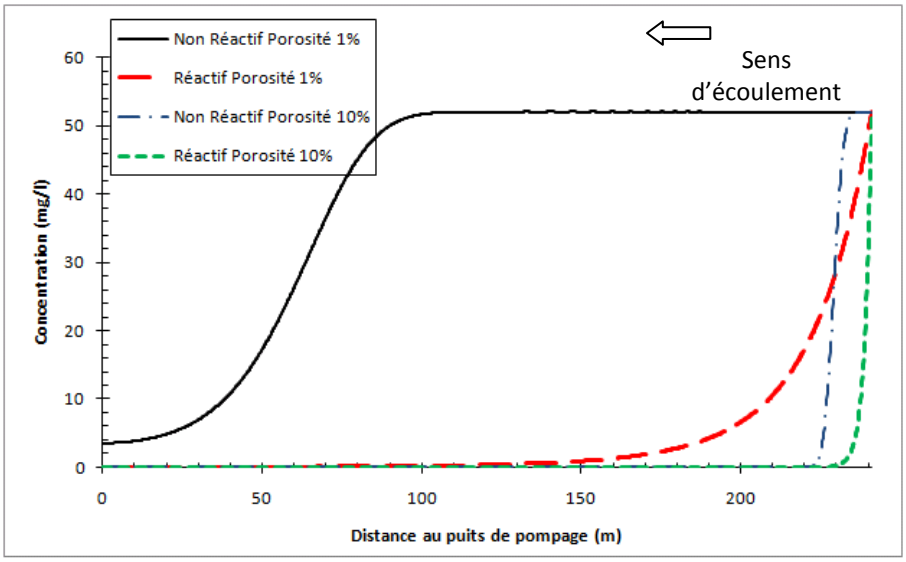


Figure A3.104:Evolution des traceurs depuis une injection en F19 après 300 heures

La **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** montre le transport de solutés non réactifs et de olutés réactifs (nitrates) injectés de manière continue sur une couronne de rayon $R=R_{F19}$ pour des milieux ayant des vitesses différentes liées à la porosité (1% et 10%). Les simulations sont conduites pendant 300 heures et correspondent donc à un état stationnaire pour les solutés réactifs (dont la concentration est supérieure à 0,1 mg/L). En effet, après 300 heures le temps

de résidence dans le milieu est suffisant pour que la réaction soit complète, une augmentation du temps n'entraine donc plus d'évolution. Les solutés non réactifs sont présentés aux même temps pour comparaison mais ne sont donc pas en conditions stationnaires. En conditions stationnaires, les solutés non réactifs auraient une concentration constante égale à C_0. Cette figure indique que dans le cas d'une porosité de 10% le traceur réactif est totalement consommé après 16 m alors que dans le cas d'une porosité de 1% celui-ci est présent en concentrations décroissantes avec la distance sur une longueur de 171 m avant d'atteindre une concentration de 0,1 mg/L. Ainsi dans ces conditions idéales, les nitrates ne peuvent en aucun cas atteindre le puits de pompage avec des concentrations significatives.

Conclusions

La réalisation de ce modèle montre que l'hypothèse de dispersivité négligeable aux temps longs pour le développement de la solution analytique est valide. Ceci n'est en revanche pas vrai aux temps courts où la réactivité au niveau du front de réaction peut être influencée. Ce modèle peut servir de base au développement de modèles géochimiques plus complexes.

Table des figures

Figure 1: Définition des échelles représentatives selon Tompkins et al. (2001)..... 12

Figure 2: Cycle de l'azote (Hiscock et al., 1991) 13

Figure 3: Voies de réduction des nitrates (modifié de (Chatelier, 2010))..... 14

Figure 4: Schéma et photos d'un biofilm bactérien de P. aeruginosa (Dirk and Davies, 2005). 18

Figure 5: Représentation schématique des hétérogénéités au sein d'une fracture (Andersson et al., 2004)..... 20

Figure 6: Schéma des interactions entre flux, biofilm et quantité de nutriments..... 21

Figure 7: Diagramme fonctionnel d'un biofilm (Characklis, 1981)..... 22

Figure 8: Evolution des chlorures, sulfates et nitrates au cours du temps au puits de pompage sur le site de Ploemeur 24

Figure 9: Biofilm bactérien développé sur la surface d'un polymère au microscope électronique à balayage (GU 2007)..... 37

Figure 10: Mécanismes généraux de la dégradation des plastiques sous conditions aérobies (Mueller et al 2003)..... 37

Figure 11: Représentation schématique des processus de détérioration et biodégradation (Mohee et al., 2008) 38

Figure 12: Processus impliqués dans la dégradation des plastiques (Gu et al., 2003)..... 38

Figure 13: Batchs 43

Figure 14: Evolution de la concentration en nitrates dans les batchs..... 44

Figure 15: Evolution de la concentration en nitrites dans les batchs 44

Figure 16: Evolution du carbone organique total dans les batchs ; a) Ensemble des batchs, b) Zoom : Mêmes batchs sans le batch PVC) c) Carbone inorganique..... 45

Figure 17: Schéma du dispositif expérimental court..... 52

Figure 18: Photo du dispositif expérimental court..... 52

Figure 19 : Schéma du dispositif expérimental..... 53

Figure 20: Photo du dispositif expérimental long 53

Figure 21: Evolution en fonction du temps des concentrations en nitrates et nitrites sur la totalité des tuyaux ; Les lignes continues représentent les concentrations en nitrates et les

lignes pointillées en nitrites ; les phases colorées indiquent les changements de débits (rouge vitesses rapides 39 mm/min ; Blanc vitesses lentes 11 mm/min) 104

Figure 22: Evolution des profils lors de la première phase de l'expérience. 106

Figure 23: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites le long du tuyau fictif (valeurs normalisées aux chlorures)..... 108

Figure 24: Evolution des concentrations en nitrates le long des tuyaux. Les profils présentés sont les moyennes deux à deux des profils de cette phase (Les valeurs sont normalisées aux chlorures)..... 109

Figure 25: Variation de concentration en nitrates par rapport au point 0 (Moyennes de deux profils normalisés aux chlorures) 109

Figure 26: Evolutions temporelles des concentrations en nitrites et nitrates de tous les tuyaux lors de la quatrième phase de l'expérience (Zoom de la figure 21) 110

Figure 27: Profils de concentrations en nitrates lors de la dernière phase de l'expérimentation [données normalisées aux chlorures] 111

Figure 28: Comparaison de l'évolution des concentrations en nitrates entre les deux séries d'expériences 112

Figure 29: Evolution du carbone organique en sortie de tuyaux..... 112

Figure 30: Evolution de la concentration en carbone organique en fonction du temps de résidence pour : a) le premier point de mesure (Bleu) ;b) le dernier point de mesure (Rouge) ; c) la variation de concentration (vert) 113

Figure 31: Production de nitrites VS consommation de nitrates (C_{inital}-C_t). 114

Figure 32: Localisation des sites (Laurencelle et al 2010)..... 130

Figure 33: Schéma structural de la zone. a) Localisation et contexte géologique du site de Ploemeur ; b) carte synthétique de la zone de contact ; c) schéma du contact local à pendage Nord recoupé par des fractures subverticales décrochantes de direction Nord 20 (Ruelleu et al., 2010)..... 131

Figure 34: Estimation des propriétés hydrogéologiques du site de Ploemeur en fonction de l'échelle d'investigation (Le Borgne et al 2006)..... 132

Figure 35: Carte piézométrique le 30/11/2006 sur le site de Kermadoye (Puits de pompages situés en PE, F29 et F31)..... 132

Figure 36:Modèle conceptuel des phénomènes de mélange entre les différents pôles chimiques 134

Figure 37: Implantation des piézomètres sur le site de Loyan 135

Figure 38: Photo et schéma de principe du "Heat Pulse Flow Meter" (Ruelleu et al 2010) .. 138

Figure 39: Diagraphies réalisées sur le puits 26 ; a) mesures de débitmétrie en flux ambiants ;b) mesures de débitmétrie en pompage ; c) profil de température en conditions ambiantes ; d) Profil de concentration en oxygène dissous ; e) profil de conductivité ; Les mesures des figures a, c, d et e sont réalisées en conditions ambiantes 140

Figure 40: Identification des fractures pour chacun des puits et de la connectivité liant le puits F26 aux puits F21 et F13 142

Figure 41: Profils de Température, Oxygène dissous et conductivité (F21-Bleu ; F13-Rouge ; F26-Noir) 143

Figure 42: Chimie représentative du site de Loyan 146

Figure 43: Modèle conceptuel du site de Loyan 148

Figure 44: Préleveur manuel 151

Figure 45: Schéma de principe des mesures potentiométriques (source : document WTW) 152

Figure 46: Sonde nitrate Geovita. a) Sonde, b) mise en place de la sonde 155

Figure 47: Schéma de la sonde S::CAN 156

Figure 48: Sonde S::CAN 156

Figure 49: Fenêtre de mesure du spectrophotomètre S::CAN 156

Figure 50: Spectre acquis avec la sonde S::CAN 157

Figure 51: Comparaison des concentrations réelles et mesurées par la sonde 158

Figure 52: Comparaison des concentrations mesurées par la sonde et par pesée avec de l'eau de F26 159

Figure 53: Comparaison des spectres entre différentes eaux 160

Figure 54: Evolution des concentrations sous l'influence de matières en suspension ; Turbidité ; Nitrates; TOC sont présentés sur l'axe de gauche et le DOC est présenté sur l'axe de droite. 161

Figure 55: Spectre enregistré pour différents niveaux de turbidité ; Toutes les solutions ont la même concentration en nitrates. 162

Figure 56: Concentration en nitrates et carbone organique total dans les solutions testées... 163

Figure 57: Spectres d'absorption lors des tests TOC 163

Figure 58: Diagraphies nitrates sonde Geovista; a) Forage F28; b) Forage F26 166

Figure 59: Diagraphies nitrates et oxygènes pour les puits de Loyan; a) F26, b) F13, c) F21 168

Figure 60: Evolution des concentrations en nitrates, sulfates et chlorures dans le puits d'exploitation (Ayraud et al., 2006)..... 172

Figure 61: Evolutions temporelles des concentrations en nitrates dans les batchs ; Les symboles pleins indiquent la présence de pyrite dans le batch, les symboles vides indiquent son absence. 178

Figure 62: Comparaison des variations de concentrations en sulfates et nitrates dans les différents batchs. 179

Figure 63: Comparaison des variations de concentrations en fluorures et nitrates dans les batchs de la série 3. 181

Figure 64: Comparaison des variations de concentrations en fluorures et nitrates dans les batchs des séries 1 & 2. 182

Figure 65: Evolutions du rapport molaire des nitrites produits / nitrates consommés 183

Figure 66: Evolution du carbone organique. 184

Figure 67: Evolution du carbone inorganique 184

Figure 68: Evolution du pH dans la troisième série de batchs 186

Figure 69: Dispositif expérimental en colonne 193

Figure 70: Evolution des anions en sortie de colonne (l'erreur sur les mesures est de 5%) .. 194

Figure 71: Schéma de principe de l'injection en push pull dans un aquifère fracturé. 200

Figure 72: Courbe de restitution idéale pour un traceur et un réactif injecté ainsi que pour les sous-produits de réaction (Istok et al, 1997) 201

Figure 73: Représentation schématique du chemin parcouru par les particules migrant dans le milieu puis revenant vers le puits d'injection/extraction durant un test de "Push-Pull" (Haggerty et al., 1998)..... 201

Figure 74: Instrumentation du puits F26 203

Figure 75: Instrumentation et équipement lors de l'essai de push-pull 205

Figure 76: Concentration en anions dans les puits avant expérience (14/04/2010) ; les distances entre les puits ne sont pas respectées 207

Figure 77: Concentration en cations dans les puits avant expérience (14/04/2010) ; les distances entre les puits ne sont pas respectées 208

Figure 78: Courbe de restitution des anions lors du pompage de récupération ; les fluorures et nitrites sont sur l'axe de droite 209

Figure 79: Evolution des concentrations C/CO des bromures et nitrates et évolution de leurs rapports $(C/C0_{NO3})/(C/C0_{Br})$ 210

Figure 80: Evolution de N_2O et NO_2^- lors du pompage de restitution (en mol/L N-eq) 211

Figure 81: Courbes de masse cumulée pour NO_3^- ; Br^- ; NO_2^- et N_2O. Les données sont présentées en masse extraite sur masse injectée pour les nitrates et bromure (axe de gauche) et en masse molaire équivalent azote pour les nitrites et le protoxyde d'azote (axe de droite) . 212

Figure 82: Evolution du diazote au cours du pompage 213

Figure 83: Evolution du rapport Cl^- / SO_4^{2-} 214

Figure 84: Rapport $NO_3^-{}_{consommé}$ / Fe_{total} en mol 214

Figure 85: Estimation du coefficient k par solution définie dans (Haggerty et al., 1998) 217

Figure 86: Production de nitrites en fonction de la concentration en nitrates; Les points représentent les données et la ligne continue rouge le calage de l'équation de Michaelis Menten pour la détermination de k_m et V_{max} 220

Figure 87: Production de protoxyde d'azote en fonction de la concentration en nitrates; Les points représentent les données et la ligne continue rouge le calage de l'équation de Michaelis Menten pour la détermination de k_m et V_{max}. Les données non utilisées pour le calage correspondent aux premiers temps de l'expérience. 220

Figure 88: Transect d'étude 224

Figure 89: Validation du cône de rabattement 225

Figure 90:Courbes de concentrations pour une porosité de 1% dans les différents cas d'étude ; 228

Figure 91: Courbes de concentrations pour une porosité de 10% 228

Figure A1.1: Profils de vitesses d'écoulement en pompage, de température, d'oxygène dissous et de conductivité sur puits F21 247

Figure A1.2: Profils de vitesses d'écoulement en pompage, de température, d'oxygène dissous et de conductivité sur puits F21 247

Figure A2.1 Evolution des concentrations en nitrates, nitrites, fluorures et sulfates dans le batch ; Les concentrations en nitrates et sulfates sont présentées sur l'axe de gauche et les concentrations en nitrites et fluorures sur l'axe de droite. 251

Figure A2.2: Concentrations en nitrates dans les batchs - Série 2 252

Figure A2.3: Concentrations en nitrites dans les batchs - Série 2 252

Figure A2.4: Concentrations en sulfates dans les batchs - Série 2 253

Figure A2.5: Concentrations en fluorures dans les batchs - Série 2 253

Figure A2.6: Evolution des concentrations en nitrates 254

Figure A2.7: Evolution des concentrations en nitrites 255

Figure A2.8: Evolution des concentrations en sulfates 255

Figure A2.9 : Evolution des concentrations en fluorures 256

Figure A2.10: Evolution des concentrations en sodium 257

Figure A2.11: Evolution des concentrations en magnésium 258

Figure A2.12: Evolution des concentrations en aluminium 258

Figure A2.13: Evolution des concentrations en silice 259

Figure A2.14: Evolution des concentrations en potassium 259

Figure A2.15: Evolution des concentrations en calcium 260

Figure A2.16: Evolution des concentrations en manganèse 260

Figure A2.17: Evolution des concentrations en fer 261

Figure A3.1: Géométrie du modèle 263

Figure A3. 2:Validation du cône de rabattement 264

Figure A3. 3: Validation de la cinétique de réaction 265

Figure A3.4: Comparaison des solutions analytique et numérique. L'axe des abscisses représente la distance au carré au puits de pompage R^2 267

Figure A3.5:Evolution des traceurs depuis une injection en F19 après 300 heures 267

Références

Akagawa, F., Yoshida, H., Yogo, S. and Yamomoto, K., 2006. Redox front formation in fractured crystalline rock: an analogue of matrix diffusion in an oxidizing front along water-conducting fractures. Geochemistry-Exploration Environment Analysis, 6: 49-56.

Albinger, O., Biesemeyer, B.K., Arnold, R.G. and Logan, B.E., 1994. Effect of bacterial heterogeneity on adhesion to uniform collectors by monoclonal populations. Fems Microbiology Letters, 124(3): 321-326.

Amirbahman, A., Schonenberger, R., Furrer, G. and Zobrist, J., 2003. Experimental study and steady-state simulation of biogeochemical processes in laboratory columns with aquifer material. Journal of Contaminant Hydrology, 64(3-4): 169-190.

Andersson, P. et al., 2004. In situ tracer tests to determine retention properties of a block scale fracture network in granitic rock at the Aspo Hard Rock Laboratory, Sweden. Journal of Contaminant Hydrology, 70(3-4): 271-297.

Ayraud, V., 2006. Détermination du temps de résidence des eaux souterraines: application au transfert d'azote dans les aquifères fracturés hétérogènes, Université de Rennes 1, Rennes, 297 pp.

Ayraud, V. et al., 2008. Compartmentalization of physical and chemical properties in hard-rock aquifers deduced from chemical and groundwater age analyses. Applied Geochemistry, 23(9): 2686-2707.

Ayraud, V. et al., 2006. Physical, biogeochemical and isotopic processes related to heterogeneity of a shallow crystalline rock aquifer. Biogeochemistry, 81(3): 331-347.

Balazs, D.J. et al., 2004. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. Biomaterials, 25(11): 2139-2151.

Barker, J.A., 1988. A generalized radial flow model for hydraulic tests in fractured rock. Water Resources Research, 24(10): 1796-1804.

Bedient, P.B., Rifai, H.S. and Newel, C.J., 1999. Groundwater contamination. Prentice hall.

Bekins, B., 2000. Preface - Groundwater and microbial processes. Hydrogeology Journal, 8(1): 2-3.

Bekins, B.A., Warren, E. and Godsy, E.M., 1998. A comparison of zero-order, first-order, and Monod biotransformation models. Ground Water, 36(2): 261-268.

Betlach, M.R. and Tiedje, J.M., 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric-oxide, and nitrous-oxide during bacterial denitrification. Applied and Environmental Microbiology, 42(6): 1074-1084.

Beyenal, H. and Lewandowski, Z., 2002. Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities. Biotechnology Progress, 18(1): 55-61.

Boe-Hansen, R., Albrechtsen, H.J., Arvin, E. and Jorgensen, C., 2002. Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions. Water Research, 36(18): 4477-4486.

Boisson, A., 2007. Caractérisation et modélisation des flux en milieux carbonatés fracturés ; Influence de la quantité de données en modélisation hydrogéologique, Université de Rennes 1, Rennes, 20 pp.

Boisson, A. et al., Submitted. Flow velocity impact on denitrification process at the pore-scale: experiment and modelling. Journal of contaminant hydrology.

Bonel, K., 2007. Modélisation des mécanismes de recharge en milieux cristallins: application au site de Ploemeur, Université de Rennes 1, Rennes, 20 pp.

Bougon, N., Aquilina, L., Briand, M.P., Coedel, S. and Vandenkoornhuyse, P., 2009. Influence of hydrological fluxes on the structure of nitrate-reducing bacteria communities in a peatland. Soil Biology & Biochemistry, 41(6): 1289-1300.

Brouyere, S., Batlle-Aguilar, J., Goderniaux, P. and Dassargues, A., 2008. A new tracer technique for monitoring groundwater fluxes: The Finite Volume Point Dilution Method. Journal of Contaminant Hydrology, 95(3-4): 121-140.

Butler, J.J. and Liu, W.Z., 1993. Pumping test in nonuniform aquifers - the radially asymetric case. Water Resources Research, 29(2): 259-269.

Camesano, T.A. and Logan, B.E., 1998. Influence of fluid velocity and cell concentration on the transport of motile and nonmotile bacteria in porous media. Environmental Science & Technology, 32(11): 1699-1708.

Capelo, S., Mira, E. and de Bettencourt, A.M., 2007. In situ continuous monitoring of chloride, nitrate and ammonium in a temporary stream Comparison with standard methods. Talanta, 71(3): 1166-1171.

Carlson, C.A. and Ingraham, J.L., 1983. Comparison of denitrification by Pseudomonas-Stutzeri, Pseudomonas-Aeruginosa, and Paracoccus-Denitrificans. Applied and Environmental Microbiology, 45(4): 1247-1253.

Chae, G.T., Yun, S.T., Kwon, M.J., Kim, Y.S. and Mayer, B., 2006. Batch dissolution of granite and biotite in water: Implication for fluorine geochemistry in groundwater. Geochemical Journal, 40(1): 95-102.

Chang, Y.C. and Jung, K., 2004. Effect of distribution system materials and water quality on heterotrophic plate counts and biofilm proliferation. Journal of Microbiology and Biotechnology, 14(6): 1114-1119.

Chapelle, F.H., 2000. The significance of microbial processes in hydrogeology and geochemistry. Hydrogeology Journal, 8(1): 41-46.

Chapelle, F.H., 2001a. Ground-Water Microbiology and Geochemistry. John Wiley & Sons, New York, 475 pp.

Chapelle, F.H., 2001b. Ground-Water Microbiology and Geochemistry. Wiley.

Characklis, W.G., 1981. Fouling biofilm development - A process analysis. Biotechnology and Bioengineering, 23(9): 1923-1960.

Charbonneau, A., Novakowski, K. and Ross, N., 2006. The effect of a biofilm on solute diffusion in fractured porous media. Journal of Contaminant Hydrology, 85(3-4): 212-228.

Chatelier, M., 2010. Faisabilité d'un pilote de dénitrification in situ dans un aquifère karstifié, Université de Poitiers, Poitiers, 226 pp.

Cho, S.M. and Choi, W.Y., 2001. Solid-phase photocatalytic degradation of PVC-TiO2 polymer composites. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 143(2-3): 221-228.

Christiansen, B.C., Balic-Zunic, T., Frandsen, C., Morup, S. and Stipp, S.L.S., 2007. Green rust sodium/potassium sulfate. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 71(15): A173-A173.

Clement, J.C. et al., 2003. Hydrological flowpaths and nitrate removal rates within a riparian floodplain along a fourth-order stream in Brittany (France). Hydrological Processes, 17(6): 1177-1195.

Clement, T.P., Peyton, B.M., Skeen, R.S., Jennings, D.A. and Petersen, J.N., 1997. Microbial growth and transport in porous media under denitrification conditions: Experiments and simulations. Journal of Contaminant Hydrology, 24(3-4): 269-285.

Constantin, H. and Fick, M., 1997. Influence of C-sources on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater. Water Research, 31(3): 583-589.

Cozzarelli, I.M., Herman, J.S., Baedecker, M.J. and Fischer, J.M., 1999. Geochemical heterogeneity of a gasoline-contaminated aquifer. Journal of Contaminant Hydrology, 40(3): 261-284.

Cruz, R., Bertrand, V., Monroy, M. and Gonzalez, I., 2001. Effect of sulfide impurities on the reactivity of pyrite and pyritic concentrates: a multi-tool approach. Applied Geochemistry, 16(7-8): 803-819.

Cunningham, A.B., Characklis, W.G., Abedeen, F. and Crawford, D., 1991. Influence of biofilm accumulation on porous-media hydrodynamics. Environmental Science & Technology, 25(7): 1305-1311.

Cvetkovic, V., Painter, S., Outters, N. and Selroos, J.O., 2004. Stochastic simulation of radionuclide migration in discretely fractured rock near the Äspö Hard Rock Laboratory. Water Resources Research, 40.

Darbi, A. and Viraraghavan, T., 2003. A kinetic model for autotrophic denitrification using sulphur : limestone reactors. Water Quality Research Journal of Canada, 38(1): 183-192.

Darbi, A., Viraraghavan, T., Butler, R. and Corkal, D., 2002. Batch studies on nitrate removal from potable water. Water Sa, 28(3): 319-322.

Darbi, A., Viraraghavan, T., Butler, R. and Corkal, D., 2003. Column studies on nitrate removal from potable water. Water Air and Soil Pollution, 150(1-4): 235-254.

Davy, P., Bour, O., De Dreuzy, J.R. and Darcel, C., 2006. Flow in multiscale fractal fracture networks. In: G. Cello and B.D. Malamud (Editors), Fractal Analysis for Natural Hazards. Geological Society Special Publication. Geological Soc Publishing House, Bath, pp. 31-45.

Debeer, D., Stoodley, P. and Lewandowski, Z., 1994. Liquid flow in heterogeneous biofilms. Biotechnology and Bioengineering, 44(5): 636-641.

Dirk, P. and Davies, D., 2005. "in Fighting bacteria with inside information, K. Dalke, web article." from http://www.genomenewsnetwork.org/articles/06_02/biofilms_image1.shtml.

Dupin, H.J. and McCarty, P.L., 1999. Mesoscale and microscale observations of biological growth in a silicon pore imaging element. Environmental Science & Technology, 33(8): 1230-1236.

Edwards, A.C., Hooda, P.S. and Cook, Y., 2001. Determination of nitrate in water containing dissolved organic carbon by ultraviolet spectroscopy. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 80(1): 49-59.

Engesgaard, P. and Kipp, K.L., 1992. A geochemical transport model for redox-controlled movement of mineral fronts in groundwater-flow systems - A case of nitrate removal by oxidation of pyrite. Water Resources Research, 28(10): 2829-2843.

Faby, J.-A., 1980. Degradation de la qualité de l'eau potable dans les réseaux.

Falkentoft, C.M. et al., 2001. Possible complication regarding phosphorus removal with a continuous flow biofilm system: Diffusion limitation. Biotechnology and Bioengineering, 76(1): 77-85.

Falkentoft, C.M., Harremoes, P. and Mosbaek, H., 1999. The significance of zonation in a denitrifying, phosphorus removing biofilm. Water Research, 33(15): 3303-3310.

Fazzolari, E., Mariotti, A. and Germon, J.C., 1990. Dissimilatory ammonia production vs denitrification invitro and inoculated agricultural soil samples. Canadian Journal of Microbiology, 36(11): 786-793.

Fetter, C.W., 1999. Contaminant hydrology. Prentice Hall.

Ford, R.M. and Harvey, R.W., 2007. Role of chemotaxis in the transport of bacteria through saturated porous media. Advances in Water Resources, 30(6-7): 1608-1617.

Furrer, G., vonGunten, U. and Zobrist, J., 1996. Steady-state modelling of biogeochemical processes in columns with aquifer material .1. Speciation and mass balances. Chemical Geology, 133(1-4): 15-28.

Gamble, T.N., Betlach, M.R. and Tiedje, J.M., 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. Applied and Environmental Microbiology, 33(4): 926-939.

Garny, K., Neu, T.R. and Horn, H., 2009. Sloughing and limited substrate conditions trigger filamentous growth in heterotrophic biofilms-Measurements in flow-through tube reactor. Chemical Engineering Science, 64(11): 2723-2732.

Gauthier, F., 2002. Biofilms et qualité biologique de l'eau potable au cours de sa distribution, Université d'Amiens, 78 pp.

Gelhar, L.W. and Collins, M.A., 1971. General analysis of longitudinal dispersion in nonuniform flow. Water Resources Research, 7(6): 1511-&.

Ginn, T.R. et al., 2002. Processes in microbial transport in the natural subsurface. Advances in Water Resources, 25(8-12): 1017-1042.

Golfier, F., Quintard, M., Cherblanc, F., Zinn, B.A. and Wood, B.D., 2007. Comparison of theory and experiment for solute transport in highly heterogeneous porous medium. Advances in Water Resources, 30(11): 2235-2261.

Gouze, P. et al., 2008. Non-Fickian dispersion in porous media: 1. Multiscale measurements using single-well injection withdrawal tracer tests. Water Resources Research, 44(6): 15.

Green, C.T., Bohlke, J.K., Bekins, B.A. and Phillips, S.P., 2010. Mixing effects on apparent reaction rates and isotope fractionation during denitrification in a heterogeneous aquifer. Water Resources Research, 46: 19.

Griebler, C. and Lueders, T., 2009. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. Freshwater Biology, 54(4): 649-677.

Gu, J.D., 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. International Biodeterioration & Biodegradation, 52(2): 69-91.

Gu, C.H., Hornberger, G.M., Mills, A.L., Herman, J.S. and Flewelling, S.A., 2007. Nitrate reduction in streambed sediments: Effects of flow and biogeochemical kinetics. Water Resources Research, 43(12): 10.

Gu, J.D., 2007. Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: A review. International Biodeterioration & Biodegradation, 59(3): 170-179.

Guigues, N., Roy, S. and Vaute, L., 2002. Mesure en continu in situ des concentrations en nitrates et chlorures dans les eau naturelles à l'aide d'une sonde multiparamètres.

Haaijer, S.C.M., Lamers, L.P.M., Smolders, A.J.P., Jetten, M.S.M. and den Camp, H., 2007. Iron sulfide and pyrite as potential electron donors for microbial nitrate reduction in freshwater wetlands. Geomicrobiology Journal, 24(5): 391-401.

Haggerty, R., Schroth, M.H. and Istok, J.D., 1998. Simplified method of "push-pull" test data analysis for determining in situ reaction rate coefficients. Ground Water, 36(2): 314-324.

Hall, S.H., 1993. Single well tracer tests in aquifer characterization. Ground Water Monitoring and Remediation, 13(2): 118-124.

Hall, S.H., Luttrell, S.P. and Cronin, W.E., 1991. A method for estimating effective porosity and groundwater velocity. Ground Water, 29(2): 171-174.

Hansen, H.C.B., Guldberg, S., Erbs, M. and Koch, C.B., 2001. Kinetics of nitrate reduction by green rusts - effects of interlayer anion and Fe(II): Fe(III) ratio. Applied Clay Science, 18(1-2): 81-91.

Hansen, H.C.B., Koch, C.B., NanckeKrogh, H., Borggaard, O.K. and Sorensen, J., 1996. Abiotic nitrate reduction to ammonium: Key role of green rust. Environmental Science & Technology, 30(6): 2053-2056.

Hasley, C., 1993. Microbiologie des eaux d'alimentation. In: H. Leclerc (Editor). Lavoisier.

Hendry, M.J., Lawrence, J.R. and Maloszewski, P., 1999. Effects of velocity on the transport of two bacteria through saturated sand. Ground Water, 37(1): 103-112.

Her, J.J. and Huang, J.S., 1995. Denitrifying kinetics involving the distributed ratio of reductases. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 62(3): 261-267.

Hill, D.D. and Sleep, B.E., 2002. Effects of biofilm growth on flow and transport through a glass parallel plate fracture. Journal of Contaminant Hydrology, 56(3-4): 227-246.

Hiscock, K.M., Lloyd, J.W. and Lerner, D.N., 1991. Review of natural and artificial denitrification of groundwater. Water Research, 25(9): 1099-1111.

Horn, H. and Hempel, D.C., 1997. Growth and decay in an auto-/heterotrophic biofilm. Water Research, 31(9): 2243-2252.

Horn, H. and Morgenroth, E., 2006. Transport of oxygen, sodium chloride, and sodium nitrate in biofilms. Chemical Engineering Science, 61(5): 1347-1356.

Horn, H., Reiff, H. and Morgenroth, E., 2003. Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions. Biotechnology and Bioengineering, 81(5): 607-617.

Howard, K.W.F., 1985. DENITRIFICATION IN A MAJOR LIMESTONE AQUIFER. Journal of Hydrology, 76(3-4): 265-280.

Huang, Y.H. and Zhang, T.C., 2004. Effects of low pH on nitrate reduction by iron powder. Water Research, 38(11): 2631-2642.

Huang, Y.H., Zhang, T.C., Shea, P.J. and Comfort, S.D., 2003. Effects of oxide coating and selected cations on nitrate reduction by iron metal. Journal of Environmental Quality, 32(4): 1306-1315.

Istok, J.D., Field, J.A. and Schroth, M.H., 2001. In situ determination of subsurface microbial enzyme kinetics. Ground Water, 39(3): 348-355.

Istok, J.D., Humphrey, M.D., Schroth, M.H., Hyman, M.R. and Oreilly, K.T., 1997. Single-well, "push-pull" test for in situ determination of microbial activities. Ground Water, 35(4): 619-631.

Jha, D. and Bose, P., 2005. Use of pyrite for pH control during hydrogenotrophic denitrification using metallic iron as the ultimate electron donor. Chemosphere, 61(7): 1020-1031.

Jia, Y., Breedveld, G.D. and Aagaard, P., 2007. Column studies on transport of deicing additive benzotriazole in a sandy aquifer and a zerovalent iron barrier. Chemosphere, 69: 1409-1418.

Jobbagy, A., Simon, J. and Plosz, B., 2000. The impact of oxygen penetration on the estimation of denitrification rates in anoxic processes. Water Research, 34(9): 2606-2609.

Johnson, A.C., Hughes, C.D., Williams, R.J. and Chilton, P.J., 1998. Potential for aerobic isoproturon biodegradation and sorption in the unsaturated and saturated zones of a chalk aquifer. Journal of Contaminant Hydrology, 30(3-4): 281-297.

Johnson, K.S. and Coletti, L.J., 2002. In situ ultraviolet spectrophotometry for high resolution and long-term monitoring of nitrate, bromide and bisulfide in the ocean. Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers, 49(7): 1291-1305.

Jorgensen, C.J., Jacobsen, O.S., Elberling, B. and Aamand, J., 2009. Microbial Oxidation of Pyrite Coupled to Nitrate Reduction in Anoxic Groundwater Sediment. Environmental Science & Technology, 43(13): 4851-4857.

Jouniaux, L., Maineult, A., Naudet, V., Pessel, M. and Sailhac, P., 2009. Review of self-potential methods in hydrogeophysics. Comptes Rendus Geoscience, 341(10-11): 928-936.

Kildsgaard, J. and Engesgaard, P., 2002. Tracer tests and image analysis of biological clogging in a two-dimensional sandbox experiment. Ground Water Monitoring and Remediation, 22(2): 60-67.

Kim, H.S., Jaffe, P.R. and Young, L.Y., 2001. Simulating biodegradation of toluene in sand column experiments at the macroscopic and pore-level scale for aerobic and denitrifying conditions, Fall Meeting of the American-Geophysical-Union held in honour of George F Pinder. Elsevier Sci Ltd, San Francisco, CA, pp. 335-348.

Kimblin, R.T. and Johnson, A.C., 1992. Recent localized sulfate reduction and pyrite formation in a fissured chalk aquifer. Chemical Geology, 100(1-2): 119-127.

Kinzelbach, W., Schafer, W. and Herzer, J., 1991. Numerical modeling of natural and enhanced denitrification processes in aquifers. Water Resources Research, 27(6): 1123-1135.

Kneeshaw, T.A., McGuire, J.T., Smith, E.W. and Cozzarelli, I.M., 2007. Evaluation of sulfate reduction at experimentally induced mixing interfaces using small-scale push-pull tests in an aquifer-wetland system. Applied Geochemistry, 22(12): 2618-2629.

Knodel, K., Lange, G. and Voigt, H.-J., 2007. Environmental Geology - Handbook of field methods and case studies. Springer, New York, 1350 pp.

Knowles, R., 1982. Denitrification. Microbiological Reviews, 46(1): 43-70.

Koenig, A. and Liu, L.H., 2001. Kinetic model of autotrophic denitrification in sulphur packed-bed reactors. Water Research, 35(8): 1969-1978.

Koenig, A., Zhang, T., Liu, L.H. and Fang, H.H.P., 2005. Microbial community and biochemistry process in auto sulfurotrophic denitrifying biofilm. Chemosphere, 58(8): 1041-1047.

Kornaros, M. and Lyberatos, G., 1997. Kinetics of aerobic growth of a denitrifying bacterium, Pseudomonas denitrificans, in the presence of nitrates and/or nitrites. Water Research, 31(3): 479-488.

Korom, S.F., 1992. Natural denitrification in the saturated zone - A review. Water Resources Research, 28(6): 1657-1668.

Labasque, T. and Aquilina, L., in prep. Simultaneous and rapid analysis of dissolved gases (Ne, Ar, N2, O2, CO2, CH4 and N2O) in water for hydrogeochemical applications.

Langner, H.W. et al., 1998. Pore water velocity and residence time effects on the degradation of 2,4-D during transport. Environmental Science & Technology, 32(9): 1308-1315.

Lanning, L.M., Ford, R.M. and Long, T., 2008. Bacterial chemotaxis transverse to axial flow in a microfluidic channel. Biotechnology and Bioengineering, 100(4): 653-663.

Lau, Y.L. and Liu, D., 1993. Effect of flow-rate on biofilm accumulation in open channels. Water Research, 27(3): 355-360.

Laurencelle, M., Aquilina, L. and Bour, O., 2010. Influence des processus de mélange sur la chimie des eaux souterraines - Application au site de Ploemeur -. CAREN/Géosciences Rennes, Rennes, pp. 20.

Laverman, A.M., Garnier, J.A., Mounier, E.M. and Roose-Amsaleg, C.L., 2010. Nitrous oxide production kinetics during nitrate reduction in river sediments. Water Research, 44(6): 1753-1764.

Le Bideau, L., 1996. Mécanismes de dénitrification de la nappe de l'Oxfordien supérieur au droit du site de Beuxes (Vienne), Université de Poitiers, Poitiers, 325 pp.

Le Borgne, T., 2005. Mesure in situ et modélisation de l'hétérogénéité des écoulements dans les milieux géologiques, Université de Rennes 1, Rennes, 175 pp.

Le Borgne, T., Bour, O., Paillet, F.L. and Caudal, J.P., 2006a. Assessment of preferential flow path connectivity, and hydraulic properties at single-borehole and cross-borehole scales in a fractured aquifer. Journal of Hydrology, 328(1-2): 347-359.

Le Borgne, T. et al., 2007. Comparison of alternative methodologies for identifying and characterizing preferential flow paths in heterogeneous aquifers. Journal of Hydrology, 345(3-4): 134-148.

Le Borgne, T. and Gouze, P., 2008. Non-Fickian dispersion in porous media: 2. Model validation from measurements at different scales. Water Resources Research, 44(6): 10.

Le Borgne, T., Paillet, F., Bour, O. and Caudal, J.P., 2006b. Cross-borehole flowmeter tests for transient heads in heterogeneous aquifers. Ground Water, 44(3): 444-452.

Le Druillennec, T., 2007. Influence de l'hydrogéologie, de la lithologie et de la géochimie sur la variabilité des concentrations en Radon-222 dans un aquifère en milieu fracturé de socle: Exemple du site de Ploemeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 253 pp.

Levi, Y. et al., 1992. Etude d'un réseau à très faible teneur en matière organique biodégradable: Le réseau de la ville de Nice, Revue des sciences de l'eau, pp. 225-243.

Lewandowski, Z., 2000. Notes on biofilm porosity. Water Research, 34(9): 2620-2624.

Lewandowski, Z., Beyenal, H., Myers, J. and Stookey, D., 2007. The effect of detachment on biofilm structure and activity: the oscillating pattern of biofilm accumulation. Water Science and Technology, 55(8-9): 429-436.

Lewandowski, Z., Beyenal, H. and Stookey, D., 2004. Reproducibility of biofilm processes and the meaning of steady state in biofilm reactors. Water Science and Technology, 49(11-12): 359-364.

Li, Y.H. and Gregory, S., 1974. Diffusion of ions in sea-water and in deep-sea sediments. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 38(5): 703-714.

Lim, K.T. and Aziz, K., 1995. Matrix-fracture transfer shape factors for dual-porosity simulators. Journal of Petroleum Science and Engineering, 13(3-4): 169-178.

Liu, L.H. and Koenig, A., 2002. Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification: Batch experiments. Process Biochemistry, 37(8): 885-893.

Long, W. and Hilpert, M., 2008. Lattice-Boltzmann modeling of contaminant degradation by chemotactic bacteria: Exploring the formation and movement of bacterial bands. Water Resources Research, 44(9): 15.

Lovley, D.R., Chapelle, F.H. and Woodward, J.C., 1994. Use of dissolved H2 concentration to determine distribution of microbially catalyzed redox reactions in anoxic groundwater. Environmental Science & Technology, 28(7): 1205-1210.

MacQuarrie, K.T.B. and Mayer, K.U., 2005. Reactive transport modeling in fractured rock: A state-of-the-science review. Earth-Science Reviews, 72(3-4): 189-227.

Manz, B., Volke, F., Goll, D. and Horn, H., 2003. Measuring local flow velocities and biofilm structure in biofilm systems with magnetic resonance imaging (MRI). Biotechnology and Bioengineering, 84(4): 424-432.

Marazioti, C., Kornaros, M. and Lyberatos, G., 2003. Kinetic modeling of a mixed culture of Pseudomonas denitrificans and Bacillus subtilis under aerobic and anoxic operating conditions. Water Research, 37(6): 1239-1251.

Mariotti, A., 1986. Denitrification in groundwaters, principles and methods for its identification - A review. Journal of Hydrology, 88(1-2): 1-23.

Masciopinto, C., 2007. Biodegradation of wastewater nitrogen compounds in fractures: Laboratory tests and field observations. Journal of Contaminant Hydrology, 92(3-4): 230-254.

McAllister, P.M. and Chiang, C.Y., 1994. A practical approach to evaluating natural attenuation of contaminant in groundwater. Ground Water Monitoring and Remediation, 14(2): 161-173.

McGuire, J.T., Long, D.T., Klug, M.J., Haack, S.K. and Hyndman, D.W., 2002. Evaluating behavior of oxygen, nitrate, and sulfate during recharge and quantifying reduction rates in a contaminated aquifer. Environmental Science & Technology, 36(12): 2693-2700.

Mohee, R., Unmar, G.D., Mudhoo, A. and Khadoo, P., 2008. Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. Waste Management, 28(9): 1624-1629.

Moon, H.S., Ahn, K.H., Lee, S., Nam, K. and Kim, J.Y., 2004. Use of autotrophic sulfur-oxidizers to remove nitrate from bank filtrate in a permeable reactive barrier system. Environmental Pollution, 129: 499-507.

Moses, C.O. and Herman, J.S., 1991. Pyrite oxidation at circumneutral pH. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 55(2): 471-482.

Mowla, D. and Ahmadi, A., 2007. Theoretical and experimental investigation of biodegradation of hydrocarbon polluted water in a three phase fluidized-bed bioreactor with PVC biofilm support. Biochemical Engineering Journal, 36(2): 147-156.

Murphy, E.M. et al., 1997. The influence of physical heterogeneity on microbial degradation and distribution in porous media. Water Resources Research, 33(5): 1087-1103.

Murray, R.E., Parsons, L.L. and Smith, M.S., 1989. Kinetics of nitrate utilisation by mixed populations of denitrifying bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 55(3): 717-721.

Negrel, P. and Pauwels, H., 2004. Interaction between different groundwaters in Brittany catchments (France): Characterizing multiple sources through strontium- and sulphur isotope tracing. Water Air and Soil Pollution, 151(1-4): 261-285.

Neretnieks, I., 2002. A stochastic multi-channel model for solute transport - analysis of tracer tests in fractured rock. Journal of Contaminant Hydrology, 55(3-4): 175-211.

Noetinger, B. and Estebenet, T., 2000. Up-scaling of double porosity fractured media using continuous-time random walks methods. Transport in Porous Media, 39(3): 315-337.

Orgogozo, L., Golfier, F., Bues, M. and Quintard, M., 2010. Upscaling of transport processes in porous media with biofilms in non-equilibrium conditions. Advances in Water Resources, 33(5): 585-600.

Parkhurst, D.L. and Appelo, C.A.J., 1999. User's guide to PHREEQC (version 2)--A computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations. U.S Geological Survey, pp. 312.

Pauwels, H., Ayraud-Vergnaud, V., Aquilina, L. and Molenat, J., 2010. The fate of nitrogen and sulfur in hard-rock aquifers as shown by sulfate-isotope tracing. Applied Geochemistry, 25(1): 105-115.

Pauwels, H., Kloppmann, W., Foucher, J.C., Martelat, A. and Fritsche, V., 1998. Field tracer test for denitrification in a pyrite-bearing schist aquifer. Applied Geochemistry, 13(6): 767-778.

Payne, W.J., 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriological Reviews, 37(4): 409-452.

Pedersen, K., 1996. Microbial life in deep granitic rock, Symposium on Subsurface Microbiology. Elsevier Science Bv, Davos, Switzerland, pp. 399-414.

Pedersen, K., 1997. Microbial life in deep granitic rock. Episodes, 20(1): 7-9.

Phanikumar, M.S. and McGuire, J.T., 2010. A multi-species reactive transport model to estimate biogeochemical rates based on single-well push-pull test data. Computers & Geosciences, 36(8): 997-1004.

Philippot, L. et al., 2009. Mapping field-scale spatial patterns of size and activity of the denitrifier community. Environmental Microbiology, 11(6): 1518-1526.

Postma, D. and Appelo, C.A.J., 2000. Reduction of Mn-oxides by ferrous iron in a flow system: Column experiment and reactive transport modeling. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 64(7): 1237-1247.

Postma, D., Boesen, C., Kristiansen, H. and Larsen, F., 1991. Nitrate reduction in an unconfined sandy aquifer - Water chemistry, reduction processes, and geochemical modeling. Water Resources Research, 27(8): 2027-2045.

Prommer, H., Barry, D.A. and Zheng, C., 2003. MODFLOW/MT3DMS-based reactive multicomponent transport modeling. Ground Water, 41(2): 247-257.

Rasmussen, K. and Lewandowski, Z., 1998. Microelectrode measurements of local mass transport rates in heterogeneous biofilms. Biotechnology and Bioengineering, 59(3): 302-309.

Rittmann, B.E., 1993. The significance of biofilms in porous-media. Water Resources Research, 29(7): 2195-2202.

Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V. and Keevil, C.W., 1994. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of Legionella-Pneumophila in potable water-systems. Applied and Environmental Microbiology, 60(6): 1842-1851.

Ross, N., Novakowski, K.S., Lesage, S., Deschenes, L. and Samson, R., 2007. Development and resistance of a biofilm in a planar fracture during biostimulation, starvation, and varying flow conditions. Journal of Environmental Engineering and Science, 6(4): 377-388.

Ross, N., Villemur, R., Deschenes, L. and Samson, R., 2001. Clogging of a limestone fracture by stimulating groundwater microbes. Water Research, 35(8): 2029-2037.

Roubinet, D., de Dreuzy, J.R. and Davy, P., 2010. Connectivity-consistent mapping method for 2-D discrete fracture networks. Water Resources Research, 46: 15.

Roubinet, D., H.-H. Liu, J.-R. de Dreuzy, 2010. A new particle-tracking approach to simulating transport in heterogeneous fractured porous media. Water Resources Research, in revision.

Ruelleu, S., 2010. Caractérisation hydrogéophysique des milieux fracturés: Developpement instrumental et modélisation des vitesses d'écoulement en forage, Université de Rennes 1, Rennes, 248 pp.

Ruelleu, S., Moreau, F., Bour, O., Gapais, D. and Martelet, G., 2010. Impact of gently dipping discontinuities on basement aquifer recharge: An example from Ploemeur (Brittany, France). Journal of Applied Geophysics, 70(2): 161-168.

Samson, S.D., Nagy, K.L. and Cotton, W.B., 2005. Transient and quasi-steady-state dissolution of biotite at 22-25 degrees C in high pH, sodium, nitrate, and aluminate solutions. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 69(2): 399-413.

Schafer, D., Schafer, W. and Kinzelbach, W., 1998a. Simulation of reactive processes related to biodegradation in aquifers - 1. Structure of the three-dimensional reactive transport model. Journal of Contaminant Hydrology, 31(1-2): 167-186.

Schafer, D., Schafer, W. and Kinzelbach, W., 1998b. Simulation of reactive processes related to biodegradation in aquifers - 2. Model application to a column study on organic carbon degradation. Journal of Contaminant Hydrology, 31(1-2): 187-209.

Schipper, L.A. and Vojvodic-Vukovic, M., 2000. Nitrate removal from groundwater and denitrification rates in a porous treatment wall amended with sawdust. Ecological Engineering, 14(3): 269-278.

Schippers, A. and Jorgensen, B.B., 2002. Biogeochemistry of pyrite and iron sulfide oxidation in marine sediments. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 66(1): 85-92.

Schippers, A., Jozsa, P.G. and Sand, W., 1996. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. Applied and Environmental Microbiology, 62(9): 3424-3431.

Schroth, M.H., Istock, J.D., Hyman, M.R. and O'Reily, K.T., 1997. Field-scale measurement of in situ microbial activities. Battelle Press, Columbus, Ohio, pp. 387-392.

Schroth, M.H. and Istok, J.D., 2006. Models to determine first-order rate coefficients from single-well push-pull tests. Ground Water, 44(2): 275-283.

Schroth, M.H. et al., 1998. Spatial variability in in situ aerobic respiration and denitrification rates in a petroleum-contaminated aquifer. Ground Water, 36(6): 924-937.

Schwientek, M. et al., 2008. Evidence for denitrification regulated by pyrite oxidation in a heterogeneous porous groundwater system. Chemical Geology, 255(1-2): 60-67.

Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A. and Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnology Advances, 26(3): 246-265.

Shapiro, A.M., 2001. Effective matrix diffusion in kilometer-scale transport in fractured crystalline rock. Water Resources Research, 37(3): 507-522.

Silvennoinen, H., Liikanen, A., Torssonen, J., Stange, C.F. and Martikainen, P.J., 2008. Denitrification and nitrous oxide effluxes in boreal, eutrophic river sediments under increasing nitrate load: a laboratory microcosm study. Biogeochemistry, 91(2-3): 105-116.

Simoni, S.F., Harms, H., Bosma, T.N.P. and Zehnder, A.J.B., 1998. Population heterogeneity affects transport of bacteria through sand columns at low flow rates. Environmental Science & Technology, 32(14): 2100-2105.

Singh, B. and Sharma, N., 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. Polymer Degradation and Stability, 93(3): 561-584.

Sinke, A.J.C., Dury, O. and Zobrist, J., 1998. Effects of a fluctuating water table: column study on redox dynamics and fate of some organic pollutants. Journal of Contaminant Hydrology, 33(1-2): 231-246.

Snodgrass, M.F. and Kitanidis, P.K., 1998. A method to infer in situ reaction rates from push-pull experiments. Ground Water, 36(4): 645-650.

Spalding, R.F. and Exner, M.E., 1993. Occurence of nitrates in groundwater - A review. Journal of Environmental Quality, 22(3): 392-402.

Stoodley, P., Debeer, D. and Lewandowski, Z., 1994. LIQUID FLOW IN BIOFILM SYSTEMS. Applied and Environmental Microbiology, 60(8): 2711-2716.

Sturman, P.J., Stewart, P.S., Cunningham, A.B., Bouwer, E.J. and Wolfram, J.H., 1995. Engineering scale-up of in-situ bioremediation processes - A review. Journal of Contaminant Hydrology, 19(3): 171-203.

Tarits, C. et al., 2006. Oxido-reduction sequence related to flux variations of groundwater from a fractured basement aquifer (Ploemeur area, France). Applied Geochemistry, 21(1): 29-47.

Taylor, S.W. and Jaffe, P.R., 1990. Biofilms growth and the related changes in the physical-properties of a porous -medium. 1.Exprimental investigation. Water Resources Research, 26(9): 2153-2159.

Thullner, M., Mauclaire, L., Schroth, M.H., Kinzelbach, W. and Zeyer, J., 2002a. Interaction between water flow and spatial distribution of microbial growth in a two-dimensional flow field in saturated porous media. Journal of Contaminant Hydrology, 58(3-4): 169-189.

Thullner, M., Van Cappellen, P. and Regnier, P., 2005. Modeling the impact of microbial activity on redox dynamics in porous media. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 69(21): 5005-5019.

Thullner, M., Zeyer, J. and Kinzelbach, W., 2000. Influence of microbial growth on hydraulic properties of pore networks. Groundwater 2000: 45-46.

Thullner, M., Zeyer, J. and Kinzelbach, W., 2002b. Influence of microbial growth on hydraulic properties of pore networks. Transport in Porous Media, 49(1): 99-122.

Tompkins, J.A., Smith, S.R., Cartmell, E. and Wheater, H.S., 2001. In-situ bioremediation is a viable option for denitrification of Chalk groundwaters. Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology, 34: 111-125.

Torres, A. and Bertrand-Krajewski, J.-L., 2006. Amélioration des algorithmes d'étalonnage d'un spectromètre UV-visible pour le mesurage in situ en continu des polluants dans les effluents urbains, 24èmes Rencontres AUGC, pp. 1-8.

Touchard, F., 1999. Caractérisation hydrogéologique d'un aquifère en socle fracturé - Site de Ploemeur Morbihan, Université de Rennes 1, Rennes, 271 pp.

Trolard, F. et al., 1997. Identification of a green rust mineral in a reductomorphic soil by Mossbauer and Raman spectroscopies. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 61(5): 1107-1111.

Trudell, M.R., Gillham, R.W. and Cherry, J.A., 1986. An in situ study of the occurrence and rate of denitrification in a shallow unconfined sand aquifer. Journal of Hydrology, 83(3-4): 251-268.

Valdes-Parada, F.J., Porter, M.L., Narayanaswamy, K., Ford, R.M. and Wood, B.D., 2009. Upscaling microbial chemotaxis in porous media. Advances in Water Resources, 32(9): 1413-1428.

Van der Broeke, J., Langergruber, G. and Weingarber, A., 2006. On-line and in-situ UV/vis spectroscopy for multi-parameter measurements: a brief review. Spectroscopy Europe, 18(4): 4.

Vandenbohede, A., Louwyck, A. and Lebbe, L., 2008. Identification and reliability of microbial aerobic respiration and denitrification kinetics using a single-well push-pull field test. Journal of Contaminant Hydrology, 95(1-2): 42-56.

von Gunten, U. and Furrer, G., 2000. Steady-state modelling of biogeochemical processes in columns with aquifer material: 2. Dynamics of iron-sulfur interactions. Chemical Geology, 167(3-4): 271-284.

Vongunten, U. and Zobrist, J., 1993. Biogeochemical changes in groundwater-infiltration systems - Column studies. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 57(16): 3895-3906.

Vrtovsek, J. and Ros, M., 2006. Denitrification of groundwater in the biofilm reactor with a specific biomass support material. Acta Chimica Slovenica, 53(3): 396-400.

Wang, Q.H., Feng, C.P., Zhao, Y.X. and Hao, C.B., 2009. Denitrification of nitrate contaminated groundwater with a fiber-based biofilm reactor. Bioresource Technology, 100(7): 2223-2227.

Wanner, O., Cunningham, A.B. and Lundman, R., 1995. Modeling biofilm accumulation and mass transport in a porous media under high substrate loading. Biotechnology and Bioengineering, 47(6): 703-712.

Weber, K.A., Picardal, F.W. and Roden, E.E., 2001. Microbially catalyzed nitrate-dependent oxidation of biogenic solid-phase Fe(II) compounds. Environmental Science & Technology, 35(8): 1644-1650.

Weymann, D., Geistlinger, H., Well, R., von der Heide, C. and Flessa, H., 2010. Kinetics of N2O production and reduction in a nitrate-contaminated aquifer inferred from laboratory incubation experiments. Biogeosciences, 7(6): 1953-1972.

Weymann, D. et al., 2008. Groundwater N2O emission factors of nitrate-contaminated aquifers as derived from denitrification progress and N2O accumulation. Biogeosciences, 5(5): 1215-1226.

Widdowson, M.A., Molz, F.J. and Benefield, L.D., 1988. A numerical transport model for oxygen-based and nitrate based respiration linked to substrate and nutrient availability in porous-media. Water Resources Research, 24(9): 1553-1565.

Willems, H.P.L. et al., 1997. Nitrate removal in riparian wetland soils: Effects of flow rate, temperature, nitrate concentration and soil depth. Water Research, 31(4): 841-849.

Wimpenny, J., Manz, W. and Szewzyk, U., 2000. Heterogeneity in biofilms. Fems Microbiology Reviews, 24(5): 661-671.

Xia, F.H., Beyenal, H. and Lewandowski, Z., 1998. An electrochemical technique to measure local flow velocity in biofilms. Water Research, 32(12): 3631-3636.

Zacheus, O.M., Iivanainen, E.K., Nissinen, T.K., Lehtola, M.J. and Martikainen, P.J., 2000. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. Water Research, 34(1): 63-70.

Zhang, T.C. and Bishop, P.L., 1994. Density, porosity, and pore structure of biofilms. Water Research, 28(11): 2267-2277.

Zhang, T.C. and Lampe, D.G., 1999. Sulfur : limestone autotrophic denitrification processes for treatment of nitrate-contaminated water: Batch experiments. Water Research, 33(3): 599-608.

Zhao, X., Meng, X.L. and Wang, J.L., 2009. Biological denitrification of drinking water using biodegradable polymer. International Journal of Environment and Pollution, 38(3): 328-338.

Zheng, C.M., 2009. Recent Developments and Future Directions for MT3DMS and Related Transport Codes. Ground Water, 47(5): 620-625.

Zhou, Q.L., Liu, H.H., Molz, F.J., Zhang, Y.Q. and Bodvarsson, G.S., 2007. Field-scale effective matrix diffusion coefficient for fractured rock: Results from literature survey. Journal of Contaminant Hydrology, 93(1-4): 161-187.

Zinn, B. et al., 2004. Experimental visualization of solute transport and mass transfer processes in two-dimensional conductivity fields with connected regions of high conductivity. Environmental Science & Technology, 38(14): 3916-3926.