



HAL
open science

Suivi de la biodégradation des hydrocarbures par le couplage des mesures géophysiques électriques du sol (polarisation provoquée) et des analyses des gaz (concentration du CO₂ et isotopie du carbone)

Cécile Noel

► **To cite this version:**

Cécile Noel. Suivi de la biodégradation des hydrocarbures par le couplage des mesures géophysiques électriques du sol (polarisation provoquée) et des analyses des gaz (concentration du CO₂ et isotopie du carbone). Autre. Université d'Orléans, 2014. Français. NNT : 2014ORLE2041 . tel-01145264

HAL Id: tel-01145264

<https://theses.hal.science/tel-01145264>

Submitted on 23 Apr 2015

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.

**ÉCOLE DOCTORALE
ENERGIE, MATERIAUX, SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS**

Laboratoire de Physique et Chimie de l'Environnement et de l'Espace (CNRS) –
Bureau de Recherche Géologique et Minière (BRGM)

THÈSE présentée par :

Cécile Noel

soutenue le : **10 décembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Terre et de l'Atmosphère

Suivi de la biodégradation des hydrocarbures par le couplage des mesures géophysiques électriques du sol (polarisation provoquée) et des analyses des gaz (concentration du CO₂ et isotopie du carbone)

THÈSE codirigée par :

**Christophe Guimbaud
Ioannis Ignatiadis**

Professeur, Université d'Orléans
Dr d'État ès Sciences Physiques, BRGM, Orléans

RAPPORTEURS :

**Olivier Kaufmann
Michel Chouteau**

Professeur, Université de Mons, Belgique
Professeur, École Polytechnique de Montréal, Canada

JURY :

Olivier Atteia

Professeur, ENSEGID, Institut Polytechnique de
Bordeaux, Président du jury

Éric van Hullebusch

Maître de conférences, UPEM Université Paris-Est

Alexis Maineult

Chargé de recherche CNRS, UPMC Université Paris 6

INVITES :

Sébastien Dehez

Total, Exploration Production, Pau

Antoine Joubert

Serpol, Vénissieux

Jean-Christophe Gourry

BRGM, Orléans

REMERCIEMENTS

Dans ce paragraphe, je voudrais exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ces trois années de travail. La principale difficulté étant de n'oublier personne, je remercie par avance tous ceux dont le nom n'apparaîtra pas mais qui m'ont soutenue, de près ou de loin.

En premier lieu, j'adresse mes plus sincères remerciements à mes deux directeurs de thèse, Ioannis Ignatiadis pour avoir cru en moi et soutenu ma candidature et Christophe Guimbaud pour m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt légères que j'avais en octobre 2011 en géochimie isotopique. Ils ont toujours montré de l'intérêt pour mes travaux et répondu à mes sollicitations lorsque le besoin s'en faisait sentir.

Je tiens également à remercier les initiateurs du projet ANR BIOPHY, en particulier Jean-Christophe Gourry, pour avoir créé un cadre de recherche intéressant et m'avoir alloué des moyens expérimentaux importants.

Je remercie Olivier Kaufmann et Michel Chouteau de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Olivier Atteia, Eric van Hullebusch et Alexis Maineult d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci pour le regard critique et avisé qu'ils porteront sur ce travail.

Je remercie aussi tous les autres encadrants qui ont été indispensables à la progression de ce travail multidisciplinaire. Je pense ici à Jean-Christophe Gourry, Véronique Naudet remplacée par Jacques Deparis, pour leur soutien très pédagogique en géophysique.

Merci à Mickaëla Blessing, Christine Flehoc, Éric Proust et Patrick Albéric pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour leur implication dans les analyses isotopiques.

Merci aussi à Marie-Christine Dictor, Caroline Michel, Fabienne Battaglia-Brunet et Catherine Jouliau, l'équipe des « bios » qui a bien évolué au cours de cette thèse, pour leurs contributions respectives et leurs suggestions pertinentes.

Je remercie ici l'IFP-EN qui nous a fourni gracieusement les souches de *Rhodococcus wratislaviensis*.

Pour leurs encouragements et leur assistance aussi bien matérielle que morale, je remercie également Frédéric Garnier, Stéphanie Betelu (indissociable de Ioannis) et Monsieur Bizi pour cet aparté sur le potentiel zêta.

J'exprime toute ma reconnaissance à « l'équipe du G1 » pour leur accueil, leur soutien et leur bonne humeur pendant deux ans de manip à la Halle. Pierrot pour son appui technique sur le montage des colonnes, Noémie, Mickaël et tous ceux que j'ai pu embêter avec l'autoclave, Dominique, Mickaël, Pascal, Gina, Catherine, Benoît (SOS dépannage μ GC)...

Je tiens également à remercier les deux stagiaires avec qui j'ai eu le plaisir de travailler sur BIOPHY : Jordan Bureau et Paul Gaudry. Merci aussi à Sarah Williams que j'aurai peu vue, mais qui a beaucoup participé au travail de terrain BIOPHY sur SPIRIT. Et un grand merci aux stagiaires que j'ai côtoyés à la Halle et qui ont su égayer le labo d'avril à septembre 2012, 2013 et 2014 !

Enfin, merci au personnel des différents services du BRGM, DRP, D3E et LAB, dans lesquels j'ai pu évoluer et qui n'a pas pu être cité ici.

Côté LPC2E, je remercie particulièrement Claude Robert pour la conception du SPIRIT. Merci aussi à Stéphane, Gilles et Thierry pour avoir fait les navettes BRGM-LPC2E pour transporter l'engin.

Merci à ma commission des thèses, Jean-Mathias Griessmeier et Xavier Vallières, pour leur suivi régulier. A Michel Tagger, directeur du LPC2E, pour son soutien à l'AGU à San Francisco, juste avant mon oral. Et à tout le personnel du labo, même si j'ai eu peu l'occasion de le côtoyer.

J'exprime ma profonde gratitude à toutes les personnes que j'ai sollicitées pour obtenir des infos et partager leur compétence pour la réalisation de ce travail : Alexis Maineult et Thomas Kremer pour ces électrodes « qui marchent », Samia et Elicia pour leur travail de thèse, les organisateurs et participants du 3rd IP workshop d'avril 2014 sur l'île d'Oléron. Rencontrer des chercheurs (jeunes et moins jeunes) qui travaillent sur des sujets analogues (et qui rencontrent les mêmes difficultés) redonne de la motivation pour continuer.

Cela va de soi, je remercie évidemment ma famille et mes amis pour leur soutien inconditionnel. Merci à l'ADSO (membres passés et présents), NoNo et Clément, Benjamin, Antonine,... Merci à mes parents qui m'ont permis de réaliser de si longues études. Un grand merci à Wilfrid qui a dû partager mon quotidien, ainsi qu'à sa famille qui, avec cette question récurrente « quand est-ce que tu soutiens ta thèse ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'a permis de ne pas dévier de mon objectif final !

Merci à tous !

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	3
Table des matières	5
Liste des figures	10
Glossaire	16
A. Géophysique	16
B. Géochimie	17
C. Microbiologie	18
D. Sites et sols pollués	19
E. Autres	19
I. Introduction	21
A. La problématique des sols pollués et leur dépollution	21
1. Réhabilitation des sols et des eaux souterraines : la réglementation et le marché français de la dépollution	21
2. Les techniques de dépollution	22
B. Besoin de nouvelles techniques de surveillance <i>in situ</i>	23
C. Le projet BIOPHY	24
D. Structure du manuscrit	25
Partie 1 : Etat de l'Art	27
II. Biodégradation	29
A. Contexte	29
1. Les hydrocarbures pétroliers	29
2. Distribution des microorganismes dans le sol	29
B. Les bactéries	30
1. Structure	30
2. Biofilms	31
3. Métabolismes et biodégradation	33
C. Techniques de monitoring	34
1. Utilisation de puits de surveillance	34
2. Utilisation des méthodes électriques en géophysique environnementale	34
3. Potentiel du suivi de l'isotopie du CO ₂ comme outil de monitoring	35
III. Polarisation provoquée	37
A. Historique	37
B. Rappels sur les mesures de résistivité électrique	38
1. Définitions	38
2. Dépendance de la résistivité électrique à certains paramètres	39

3.	Dispositifs de mesure	41
4.	Concept d'inversion	42
C.	Polarisation provoquée	43
1.	Concept de polarisation et de déplacement diélectrique	43
2.	La double couche électrique	46
3.	Mécanismes de la polarisation dans un milieu poreux	47
4.	Techniques de mesure et paramètres de la polarisation provoquée	49
5.	Distribution des charges électriques en présence de bactéries	52
D.	Utilisation de la PP pour l'étude de la biodégradation	55
1.	La PP appliquée à la détection de contaminants organiques et au suivi de l'activité bactérienne	55
2.	Dispositifs de mesure PP utilisés sur le terrain	57
3.	Dispositifs de mesure en laboratoire	58
E.	Conclusion	59
IV.	Analyse du CO ₂ : Flux et Isotopie du carbone	61
A.	Emissions de CO ₂ et variations de l'isotopie du carbone	61
B.	Mesure des émissions de CO ₂ et du rapport isotopique du carbone par spectroscopie Infra-rouge	64
1.	Principe de la spectroscopie Infra-Rouge (IR)	64
2.	Isotopie du carbone : IRIS (Isotope Ratio Infrared Spectrometry) vs IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry)	65
C.	Utilisation de l'isotopie du carbone pour le suivi de la biodégradation	65
1.	Analyse des polluants résiduels	65
2.	Analyse du CO ₂	66
3.	Conclusion	68
	Partie 2 : Matériel et méthodes	69
V.	Matériel et méthodes – Expériences en colonnes	71
A.	Vue d'ensemble du montage expérimental	71
1.	Structure et dimensionnement des colonnes	71
2.	Système de circulation des fluides	73
3.	Détermination de la porosité	75
4.	Les bactéries et leur milieu de culture	76
5.	Potentiel zêta des bactéries	77
B.	Mesure de la résistivité complexe	79
1.	Appareils de mesure	79
2.	Electrodes de potentiel	80
3.	Détermination des facteurs géométriques	81
4.	Détermination du facteur de formation	82
5.	Calculs d'erreur	83
C.	Analyse du CO ₂ par spectroscopie laser Infra Rouge	83
1.	Le SPectromètre Infra-Rouge In situ Troposphérique (SPIRIT, du LPC2E)	83

2.	Méthode des ajouts dosés _____	87
3.	Calcul de la concentration en CO ₂ de la colonne _____	89
4.	Détermination du rapport isotopique - Méthode du Keeling plot _____	90
5.	Analyses isotopiques complémentaires _____	90
D.	Analyses géochimiques et microbiologiques _____	91
1.	Dosage du toluène _____	91
2.	Dosage de l'alcalinité _____	93
3.	Comptages bactériens _____	93
4.	Mesure des paramètres physico-chimiques _____	95
E.	Expériences _____	96
1.	Stérilisation et remplissage des colonnes _____	96
2.	Ensemencement des bactéries _____	97
3.	Calendrier des expériences _____	97
VI.	Matériel et méthodes – Application sur site pilote _____	99
A.	Présentation du site pilote _____	99
1.	Historique connu du site (établi par SERPOL en mai 2012) _____	99
2.	Caractérisation hydrogéologique du site (d'après les données du projet ATTENA, Brgm et Ademe, 2012) _____	100
3.	Diagnostic chimique préliminaire _____	100
4.	Analyses microbiologiques _____	102
5.	Campagne géophysique préliminaire _____	103
6.	Analyses de gaz préliminaires _____	103
7.	Stratégie de traitement _____	105
B.	Monitoring de la biodépollution _____	105
1.	Suivi électrique _____	105
2.	SPIRIT _____	106
3.	Suivi physico-chimique en forages _____	106
4.	Suivi microbiologique _____	107
Partie 3 : Résultats _____		109
VII.	Résultats – Expériences en colonnes _____	111
A.	Validation du dispositif de mesures électriques _____	111
1.	Mesures sur un circuit R(RC) _____	111
2.	Mesures sur de l'eau salée _____	112
3.	Mesures sur du sable saturé _____	114
B.	Validation des mesures du SPIRIT _____	115
1.	Mesures sur bouteilles d'air standard _____	115
2.	Comparaison SPIRIT et GC-IRMS (Gas Bench) _____	115
C.	Résultats expérimentaux _____	116
1.	Evolution de la population bactérienne _____	116

2.	Potentiel zêta des bactéries _____	118
3.	Evolution de la teneur en toluène _____	119
4.	Analyse du Carbone _____	120
5.	Mesures électriques _____	128
D.	Conclusion _____	137
VIII.	Résultats– Application sur site pilote _____	139
A.	Résultats de la campagne préliminaire _____	139
1.	Géophysique _____	139
2.	Analyses du CO ₂ _____	140
3.	Conclusion _____	141
B.	Début du suivi de la biodégradation _____	141
1.	Géophysique _____	141
2.	Analyses du CO ₂ _____	145
D.	Conclusion _____	150
IX.	Conclusion générale et perspectives _____	151
	Références _____	153
	Annexes _____	167
	Annexe 1 : Chimie de surface, échange ionique et double couche électrique _____	169
A.	Importance des processus de surface _____	169
B.	Nature de la surface des oxydes _____	169
C.	Point de charge nulle _____	169
D.	Double couche électrique _____	170
E.	Echange d'ions _____	171
F.	Le cas des bactéries _____	171
G.	Potentiel zêta des bactéries _____	171
	Annexe 2 : Modélisation de la réponse PP d'un milieu granulaire _____	173
A.	Modélisation phénoménologique de la réponse PP d'un milieu granulaire : Le modèle de type Cole-Cole généralisé _____	173
B.	Modèles mécanistiques de la réponse PP d'un mélange sable et argiles : de Waxman et Smits (1968) à Révil <i>et al.</i> (2013) _____	174
C.	Modèles mécanistiques de la réponse PP d'un milieu granulaire partiellement saturé en huile : de Vinegar et Waxman (1984) à Schmutz <i>et al.</i> (2010) _____	176
	Annexe 3 : Revue bibliographique des mesures électriques sur colonnes pour l'étude de l'activité bactérienne _____	179
A.	Résumés et principaux résultats _____	179
B.	Matériel _____	186
C.	Conditions géochimiques et biologiques _____	196
D.	Mesures réalisées _____	209
	Annexe 4 : Sable de Fontainebleau (Sibelco, France) _____	221

Annexe 5 : milieu de culture des bactéries _____	223
Annexe 6 : Protocole d'utilisation du GDP 32II (24 bits) pour les mesures de laboratoire BIOPHY _____	225
A. Description du GDP-32II et de ses accessoires _____	225
1. GDP 32II _____	225
2. LDT-10 _____	227
3. ISO-1B _____	227
B. Démarrer l'appareil _____	227
C. Calibration _____	228
D. Mesures _____	229
E. Sauvegarde des données _____	230
F. Transfert des données sur le PC _____	230
Annexe 7 : Electrodes de potentiel Cu/CuSO ₄ _____	231
A. Fabrication de deux types d'électrodes Cu/CuSO ₄ _____	231
1. Electrode type tube _____	231
2. Electrode type cône _____	231
B. Test de stabilité des électrodes : mesure de différence de potentiel (ddp) _____	232
C. Test des électrodes sur colonnes d'eau : mesures PP _____	235
1. Comparaison des deux types d'électrodes _____	235
2. Influence de la position des électrodes sur la colonne _____	236
3. Comparaison des appareils de mesure _____	237
4. Evolution dans le temps _____	239
D. Test des électrodes sur colonnes de sable saturé : mesures PP _____	243
1. Comparaison des types d'électrodes _____	243
2. Influence de la position des électrodes sur la colonne _____	243
3. Evolution dans le temps _____	244
E. amplitude de la résistivité complexe _____	247
F. Conclusion _____	249
Annexe 8 : Dimensions des colonnes BIOPHY comparées au porte échantillon défini par Zimmermann et al. (2010). _____	251
Annexe 9 : Profils de diversité des colonnes inoculées par méthode CE-SSCP _____	253
A. Description de la méthode _____	253
B. Application aux colonnes inoculées BIOPHY C1 et C2 (Mars 2014) _____	253

LISTE DES FIGURES

Figure II-1 : Structure de la paroi des bactéries Gram+ et Gram- : Les bactéries à Gram+ possèdent une paroi constituée d'une épaisse couche de peptidoglycane, alors que les bactéries à Gram- présentent une fine couche de peptidoglycane localisée dans le périplasma entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe. D'après Lebleu, 2007.....	31
Figure II-2 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm (D'après Ploux et al., 2007).	32
Figure II-3 : Schéma simplifié illustrant le mouvement des électrons à travers une chaîne de bactéries reliées par des nanowires (D'après Revil et al., 2012).	32
Figure III-1 : Exemple de configuration d'un dispositif électrique. A et B sont les électrodes d'injection (de courant) et M et N sont les électrodes de mesure (de potentiel).	41
Figure III-2 : Dispositifs d'acquisition électrique les plus répandus.....	42
Figure III-3 : Manifestation de l'effet PP au niveau de la tension mesurée V_{MN} lorsque le courant injecté I_{AB} est interrompu.....	43
Figure III-4 : a) Modèle de la triple couche électrique et Mécanismes de la polarisation b) de la couche de Stern, c) de la couche diffuse et d) de membrane. Modifié d'après Slater et al., 2005 ; Titov et al., 2004 ; Vaudelet et al., 2011.	48
Figure III-5 : Principe de mesure de la polarisation provoquée en domaine temporel. Un courant en créneaux d'intensité I_0 est injecté. Le milieu se charge JUSQU'À une différence de potentiel V_0 . Lorsque le courant est coupé, Le voltage observé immédiatement après la coupure est noté V_p . Le potentiel $V(t)$ décroît jusqu'à prendre une valeur nulle. L'intégration de la courbe de décroissance de $V(t)$ entre deux temps donnés t_i et t_{i+1} permet de calculer la chargeabilité M	49
Figure III-6 : Principe de mesure de la polarisation provoquée spectrale. Un déphasage ϕ est mesuré entre La différence de potentiel (trait pointillé rouge) qui est en retard par rapport au courant injecté (trait continu noir) et une différence d'amplitude $ \rho^* $ entre les deux signaux.	50
Figure III-7 : Schéma illustrant la répartition des charges autour d'une bactérie et l'influence des bactéries dans le milieu granulaire : a) Surface bactérienne chargée négativement et entourée d'une couche de contre-ions ; b) Polarisation de la couche de contre-ions sous l'influence d'un champ électrique externe, c) Modification des propriétés électriques du milieu granulaire en présence de bactéries : changement de la surface spécifique du grain grâce aux bactéries adsorbées à la surface minérale et modification de la structure de la double couche électrique (DCE) du grain. Inspiré de Abdel Aal et al., (2006) et Revil et al. (2012).....	53
Figure III-8 : Diagramme représentant l'influence de la croissance des bactéries sur les propriétés physico-chimiques et géophysiques du milieu poreux. D'après Atekwana et Atekwana (2010).....	57
Figure IV-1 : Exemples de signature isotopiques du C du CO_2 pour différentes sources de CO_2 , D'après [Aggarwal and Hinchey, 1991 ; Boutton, 1991].....	62
Figure IV-2 : a) Equilibres CO_2 aqueux et CO_2 gaz et Précipitation/Dissolution des carbonates ; B) Fractionnements isotopiques associés au passage des différentes phases (d'après Mook and Tan, 1991).	63
Figure IV-3 : Répartition des espèces carbonatées en solution en fonction du pH à 25°C (D'après Stumm and Morgan, 2012).	63
Figure IV-4 : Représentation du spectre de la lumière. Y sont identifiés les régions du spectre en fonction de la longueur d'onde λ , ainsi que les différents niveaux d'énergie fournis par chaque domaine.	64
Figure V-1 : Photo annotée d'une colonne BIOPHY. A gauche, on retrouve l'équipement nécessaire aux mesures de résistivité électrique complexe : deux électrodes d'injection (A et B) sont situées à chaque extrémité de la colonne ; six électrodes de potentiel sont réparties sur la hauteur de la colonne. En haut de la colonne, un robinet permet de prélever du gaz en tête de colonne afin de pouvoir analyser la quantité de CO_2 ainsi que sa signature isotopique. Sur la droite, il y a trois robinets (S1, S2 et S3) pour des prélèvements de fluide en vue d'analyses chimiques et microbiologiques complémentaires.	72
Figure V-2 : A/ Photographie de Deux colonnes BIOPHY et leur alimentation placées dans une enceinte thermique aero-régulée à 25°C. B/ Schéma du circuit hydraulique : 1/ le circuit commence à l'alimentation, composée de milieu de culture avec ou sans toluène ; 2/ le fluide est entraîné par une pompe péristaltique vers l'entrée des colonnes ; 3/ le fluide d'alimentation ainsi que de l' H_2O_2 diluée entre en bas de la colonne et monte par percolation ; 4/ le fluide sort par débordement, 5 cm avant le sommet de la colonne ; 5/ le fluide de sortie passe par un porte-sondes : le pH, le potentiel redox, la température, la conductivité et l'oxygène dissous sont mesurés. Enfin, 6a/	

le fluide retourne dans l'alimentation et repart dans le circuit (circuit fermé) ou 6b/ le fluide sort du circuit (boucle ouverte).....	74
Figure V-3 : Traçage du passage d'une solution de KCl 0,1 M, à débit constant $Q = 500 \text{ mL/h}$, à travers une colonne de sable saturé en eau distillée. En haut : suivi géophysique : évolution de la résistivité électrique au cours du temps à 5 niveaux de la colonne ; en bas : suivi par sonde conductimétrique : evolution de la conductivité du fluide en sortie de colonne.....	76
Figure V-4 : Images de <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> . 1/ image au microscope optique de bactéries planctoniques ; 2/ image au microscope optique de bactéries en biofilm ; 3/ Bactéries imagées par AFM (microscopie à force atomique) [Dhahri, 2013] ; 4/ Liens entre bactéries imagés par AFM [Dhahri, 2013].....	77
Figure V-5 : a) Représentation schématique du potentiel zêta d'une bactérie ; b) Evolution du potentiel électrostatique en fonction de la distance par rapport à la surface chargée de la bactérie [Ruiz, 2009].....	78
Figure V-6 : Aperçu des appareils utilisés au laboratoire pour les mesures électriques : A/ Syscal R1 pour la mesure de résistivité classique ; B/ GDP 32II pour les mesures SIP et C/ Potentiostat-galvanostat (modèle 273A de PAR) et analyseur de la réponse en fréquence (5210 de par) pour la spectroscopie d'impédance.....	79
Figure V-7 : Photo des deux types d'électrodes de potentiel utilisées pendant les expériences BIOPHY. a) Electrodes Ag/AgCl du commerce (Warner Instruments, Hamden, USA) ; b) Electrodes Cu/CuSO ₄ réalisées à partir du modèle de Mainault (2004).....	80
Figure V-8 : Schéma d'une colonne BIOPHY où figurent les distances entre électrodes.....	81
Figure V-9 : Calcul du facteur de formation F du sable de Fontainebleau.....	83
Figure V-10 : Schéma de la structure du SPIRIT : le chemin parcouru par le laser est représenté par le trait rouge. d'après [Guimbaud et al., 2011].....	85
Figure V-11 : Spectre de transmission du CO ₂ avec le laser de SPIRIT ($2310,4 \rightarrow 2309,7 \text{ cm}^{-1}$) obtenu d'après la base de données HITRAN 2004 [Rothman et al., 2005]. Les raies d'absorption du CO ₂ sont visibles à $2310.0025 \text{ cm}^{-1}$, $2310.2056 \text{ cm}^{-1}$ et $2310.3470 \text{ cm}^{-1}$ pour ¹² C ¹⁶ O ₂ , ¹² C ¹⁸ O ₂ et ¹³ C ¹⁶ O ₂ respectivement.....	85
Figure V-12 : A/ Photographie du SPIRIT au laboratoire. On identifie le SPIRIT avec son banc optique relié à la chambre d'accumulation des gaz par une pompe à vide. B/ Schéma représentant les différentes étapes de l'analyse des gaz. Une fois injecté (1), l'échantillon de gaz est emmené par une pompe à vide vers le banc optique (2), où il est analysé (3). Il est ensuite réintroduit dans la chambre d'accumulation (boucle fermée) (4).....	87
Figure V-13 : Evolution de la concentration en CO ₂ (haut) et du $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ (bas) en fonction du temps, après 4 injections de gaz provenant d'une colonne BIOPHY, et après calibration à l'aide d'une bouteille de gaz étalon ($[\text{CO}_2] = 380 \text{ ppmV}$, $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2) = -40,5 \text{ ‰}$) en fin de mesure.....	88
Figure V-14 : Principe du Keeling plot. A/ Détermination de la concentration en CO ₂ ; B/ Détermination du rapport isotopique de ce CO ₂	90
Figure V-15 : Différentes étapes réalisées pour le dosage du toluène par μGC	92
Figure V-16 : Schéma d'une cellule de Thoma.....	94
Figure V-17 : Photographie prise au microscope optique, grossissement x 1000, après coloration LIVE/DEAD d'un échantillon d'une colonne BIOPHY (Juillet 2012). Les bactéries vivantes sont colorées en vert, alors que les bactéries mortes sont colorées en rouge.....	95
Figure V-18 : Acquisition des paramètres physico-chimiques.....	95
Figure V-19 : Photographie de la dameuse manuelle : une masse mobile de 500 g est écartée de 20 cm du socle posé sur le sable, puis lâchée. L'opération est répétée trois fois à trois hauteurs de la colonne pour tasser le sable.....	96
Figure V-20 : Présentation d'une expérience BIOPHY complète à quatre colonnes : deux inoculées identiques (C1 et C2) pour un duplicat des mesures. Et deux non-inoculées, une avec (C3) et une sans (C4) toluène, comme témoins.....	97
Figure V-21 : Différents types d'essais menés pendant la thèse : A/ Colonnes non-inoculées en boucle fermée ; B/ Colonnes Inoculées en boucle fermée et C/ Colonnes inoculées en boucle ouverte.....	98
Figure VI-1 : Diagramme donnant la section géologique du terrain d'étude.....	100
Figure VI-2 : Cartes des concentrations en BTEX mesurées dans les puits de surveillance (Septembre 2013) : A/ Benzène, B/ Toluène, C/ Ethyle-benzène et D/ Xylènes. L'ancien parc à cuves correspond à la zone source de la pollution, et la flèche indique le flux de direction Nord-Ouest de la nappe.....	101

<i>Figure VI-3 : Cartes des concentrations en accepteurs d'électrons dans les puits de surveillance (Septembre 2013) : A/ sulfates et B/ nitrates. L'ancien parc à cuves correspond à la zone source de la pollution, et la flèche indique le flux de direction Nord-Ouest de la nappe .</i>	102
<i>Figure VI-4 : Cartes de l'emplacement A/ des 4 profils électriques et B/ des 21 embases utilisées pour poser la chambre du SPIRIT, pour la campagne de mesures préliminaires (géophysique : mai 2012, Gaz : Septembre 2013).</i>	104
<i>Figure VI-5 : Configuration dipôle-dipôle du profil permanent : une flûte d'électrodes est utilisée pour l'injection de courant, et une autre flûte pour la mesure du potentiel.</i>	106
<i>Figure VI-6 : Cartes de l'emplacement A/ Des puits de surveillance, de la barrière réactive, et des puits de pompage et injection de la barrière ; B/ des profils électriques : un permanent perpendiculaire à la barrière P1 (une mesure tous les deux jours), un temporaire parallèle à la barrière P2 (1 mesure par mois) ; et C/ des 21 embases utilisées pour poser la chambre du SPIRIT.</i>	108
<i>Figure VII-1 : A/ circuit R(RC) connu et Mesures de la réponse électrique complexe du circuit obtenues sur B/ le GDP 32II (Zonge), sur C/ un Potentiostat/Galvanostat récent (PAR nouveau) et sur D/ un Potentiostat/ Galvanostat ancien (PAR ancien), comparées au modèle théorique.</i>	112
<i>Figure VII-2 : Phase de la résistivité complexe d'une colonne d'eau salée ($\sigma = 2050 \mu\text{S}/\text{cm}$), mesurée sur trois couples d'électrodes Cu/CuSO₄, B/ avec le GDP 32II, C/ avec le PAR récent et D/ avec le Par ancien.</i>	113
<i>Figure VII-3 : Amplitude de la résistivité complexe d'une colonne d'EAU salée ($\sigma = 2050 \mu\text{S}/\text{cm}$), mesurée sur trois couples d'électrodes Cu/CuSO₄, B/ avec le GDP 32II, C/ avec le PAR récent et D/ avec le Par ancien.</i>	114
<i>Figure VII-4 : Phase de la résistivité complexe d'une colonne de sable saturé d'eau salée ($\sigma = 1858 \mu\text{S}/\text{cm}$), mesurée sur trois couples d'électrodes Cu/CuSO₄, avec le GDP 32II, et sur un couple avec le PAR récent.</i>	115
<i>Figure VII-5 : Evolution de la population bactérienne dans les colonnes inoculées C1 et C2, à gauche, et pour les colonnes non inoculées C3 et C4, à droite. Pour les colonnes C1 et C2, en circuit ouvert, la flèche bleue indique l'ouverture du circuit après une période d'inoculation en circuit fermé.</i>	117
<i>Figure VII-6 : Photographie prise au microscope optique du biofilm bactérien détaché d'un échantillon de sable, prélevé en tête de colonne C1 (jour 22). Le Biofilm semble inclure une gouttelette de toluène.</i>	117
<i>Figure VII-7 : Graphique des quantités cumulées de toluène perdues dans la colonne non-inoculée C3 (ronds noirs) et dans les colonnes inoculées C1 et C2 (carrés oranges et triangles bleus respectivement). La flèche noire indique l'injection de toluène dans la colonne C3 ; les flèches bleues indiquent la première injection de toluène dans les colonnes C1 et C2, et le moment où la concentration de toluène a été multipliée par deux.</i>	119
<i>Figure VII-8 : Evolution de la concentration en CO₂, du $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ et $\delta^{13}\text{C}(\text{toluène})$ en S3 dans les colonnes inoculées C1 et C2, à gauche, et Evolution de la concentration en CO₂ et $\delta^{13}\text{C}(\text{toluène})$ en S3 pour les colonnes non inoculées C3 et C4, à droite. Pour les colonnes C1 et C2, en circuit ouvert, la première flèche bleue indique l'ouverture du circuit après une période d'inoculation en circuit fermé et le premier ajout de toluène, la deuxième flèche indique le moment où la concentration en toluène a été multipliée par deux.</i>	121
<i>Figure VII-9 : Evolution de la concentration en toluène dans l'alimentation, en S1 et S3, et evolution du $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ en fonction du volume d'eau déplacé dans la colonne pour les colonnes inoculées C1 et C2. Les triangles rouges figurent les ajouts de toluène dans la bonbonne d'alimentation.</i>	122
<i>Figure VII-10 : Evolution de la concentration en CO₂, du $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ et $\delta^{13}\text{C}(\text{toluène})$ en S3 dans les colonnes inoculées C1_bis et C2_bis.</i>	123
<i>Figure VII-11 : Evolution de $\delta^{13}\text{C}(\text{toluène})$ en S1 et S3 en fonction du temps pour les deux colonnes inoculées C1 et C2.</i>	123
<i>Figure VII-12 : Evolution de $\delta^{13}\text{C}(\text{toluène})$ en S1 et S3 (en haut) et de $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ (en bas), en fonction de la concentration en toluène et en CO₂ respectivement, pour les deux colonnes inoculées C1 et C2.</i>	124
<i>Figure VII-13 : Evolution de $\delta^{13}\text{C}(\text{DIC})$ en S1, S3 et en sortie en fonction du temps pour les deux colonnes inoculées C1 et C2.</i>	125
<i>Figure VII-14 : Evolution de $\delta^{13}\text{C}(\text{DOC})$ dans l'alimentation, en S1, S3 et en sortie en fonction du temps pour les deux colonnes inoculées C1 et C2.</i>	125
<i>Figure VII-15 : Evolution de l'alcalinité du fluide à différents niveaux des colonnes C1 et C2 (alimentation, S1 et S3), et évolution du pH au cours du temps.</i>	126

Figure VII-16 : A/ Répartition des espèces carbonatées en solution en fonction du pH à 25°C (D'après Stumm et Morgan, 2012). B/ Fractionnement isotopique au moment des changements de phase entre les différentes espèces carbonatées [Mook and Tan, 1991].	127
Figure VII-17 : Résultats de l'essai inoculé C1_ter : A/ Evolution de la phase et de l'amplitude de la résistivité complexe à 0.5 Hz mesurée en E2E5 (milieu de colonne) par le GDP 32II. B/ Evolution de la population bactérienne en S2 (milieu de colonne) et de la concentration en toluène en S2.	128
Figure VII-18 : Evolution de la résistivité complexe (phase et amplitude) a 0.5 Hz, mesurée avec le GDP 32II, pour trois couples de mesure des deux colonnes inoculées : E1E4, E2E5 et E3E6.	130
Figure VII-19 : Evolution de la résistivité complexe (phase et amplitude) a 0.5 Hz, mesurée avec le GDP 32II, pour trois autres couples de mesure des deux colonnes inoculées : E1E2, E3E4 et E5E6.	131
Figure VII-20 : Evolution de la résistivité complexe (phase et amplitude) a 0.5 Hz, mesurée avec le GDP 32II, pour trois couples de mesure des deux colonnes témoins : E1E4, E2E5 et E3E6.	132
Figure VII-21 : A/ Evolution de la phase et de l'amplitude de la résistivité complexe à 0.5 Hz mesurée en E2E5 (milieu de colonne) par le GDP 32II, de la concentration en CO ₂ et de la population bactérienne en S2 (milieu de colonne) sur les 15 premiers jours de l'essai C1. B/ Spectres de la phase de la résistivité complexe mesurée en E2E5 (milieu de colonne) par le GDP 32II.	133
Figure VII-22 : A/ Evolution de la phase et de l'amplitude de la résistivité complexe à 0.5 Hz mesurée en E2E5 (milieu de colonne) par le PAR ancien, de la concentration en CO ₂ et de la population bactérienne en S2 (milieu de colonne) sur les 15 premiers jours de l'essai C1. B/ Spectres de la phase de la résistivité complexe mesurée en E2E5 (milieu de colonne) par le PAR ancien.	134
Figure VII-23 : Spectres de la phase de la résistivité complexe mesurés avec le GDP 32II sur trois couples d'électrodes, pour l'état zéro des colonnes C1 et C2, et pour les mêmes colonnes remplies de sable saturé d'eau du robinet à la fin de l'essai de 58 jours.	135
Figure VII-24 : Evolution de la phase et de l'amplitude de la résistivité complexe à 0,5 Hz, mesurée en E2E5 (milieu de colonne) par le GDP 32II, de la concentration en CO ₂ et de la population bactérienne en S2 (milieu de colonne), pour l'essai C1.	137
Figure VIII-1 : coupes de résistivité électrique (en haut) et de la chargeabilité normalisée (en bas) des profils P1 et P3, transverses au panache de pollution.	139
Figure VIII-2 : Carte de la chargeabilité normalisée à 2,5 m de profondeur pour la campagne de géophysique préliminaire (mai 2012).	140
Figure VIII-3 : Cartes A/ des flux de CO ₂ en surface et B/ des rapports isotopiques du carbone du CO ₂ pour la campagne d'analyse des gaz préliminaire (septembre 2013).	141
Figure VIII-4 : Coupes de résistivité électrique (en haut) et de chargeabilité normalisée (en bas) du profil Permanent P1, mesurés en février (etat zéro), Mai et août 2014.	143
Figure VIII-5 : Coupes de résistivité électrique (en haut) et de la chargeabilité normalisée (en bas) du profil ponctuel P2, mesurés en février (etat zéro), Mai et août 2014.	144
Figure VIII-6 : Cartes des flux de CO ₂ mesurés en février 2014 (état zéro), et après l'activation de la barrière réactive en Avril 2014 (Avril à Aout 2014).	147
Figure VIII-7 : Cartes des $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ mesurés en février 2014 (état zéro), et après l'activation de la barrière réactive en Avril 2014 (Avril à Aout 2014).	148
Figure VIII-8 : Cartes des flux de CO ₂ corrigés du biais induit par la météo, par rapport à l'embase de référence n°7, pour Avril 2014 à Aout 2014.	149
Figure 0-1 : trois modèle de la double couche électrique. De Gauche à droite : modèle de Helmholtz, modèle de Gouy Chapman et modèle de la triple couche de Stern.	170
Figure 0-1 : Influence des paramètres Cole-Cole sur les spectres de la phase (en haut) et de l'amplitude (en bas) de la résistivité complexe.	174
Figure 0-1 : Schéma descriptif des différentes parties du GDP 32II.	225
Figure 0-2 : Schéma descriptif du couvercle du GDP 32II.	226
Figure 0-3 : Schéma descriptif du tableau de bord du GDP 32II.	226
Figure 0-4 : Photo du LDT-10.	227
Figure 0-5 : Ecran du mode CR.	228
Figure 0-6 : Schéma du dispositif de calibration du GDP-32.	228
Figure 0-7 : Ecran du mode Calibration	229

Figure 0-8 : Schéma de montage du GDP pour effectuer une mesure.....	230
Figure 0-1 : a) Electrode Cu/CuSO ₄ de type tube sur le modèle de l'IPGP ; b) Zoom sur le filtre en bout d'électrode ; c) Remplissage du filtre par une pompe à vide : l'extrémité de l'électrode est plongée dans la solution de CuSO ₄ et le gel est aspiré à l'intérieur du tube ; d) Gel de CuSO ₄	231
Figure 0-2 : a) Electrode Cu/CuSO ₄ de type cône ; b) Mise en place du bouchon de l'électrode ; c) Trois électrodes dans le bain à ultrasons ; d) Zoom sur le fritté Vycor en bout d'électrode.....	232
Figure 0-3 : Test de la stabilité de deux types d'électrodes Cu/CuSO ₄ : 4 électrodes sont plongées dans une cellule électrochimique remplie d'une solution de KCl. la ddp (mV) de chacune des électrode est mesurée par rapport à une électrodes de référence ECS.....	233
Figure 0-4 : Evolution de la différence de potentiel de quatre électrodes Cu/CuSO ₄ de type cône par rapport à une électrode de référence ECS, dans une solution de KCl, au cours du temps. Une fois l'électrode de référence régénérée (t=24h), la ddp des quatre électrodes Cu/CuSO ₄ est stable.....	234
Figure 0-5 : Evolution de la différence de potentiel de quatre électrodes Cu/CuSO ₄ de type tube par rapport à une électrode de référence ECS, dans une solution de KCl, au cours du temps. A 24h, l'électrode de référence a été régénérée ce qui explique le « saut » des ddp.....	234
Figure 0-6 : Electrodes Cu/CuSO ₄ placées sur les colonnes remplies d'une solution de KCl : type cône à gauche, type tube à droite. Injection de courant en haut et en bas de la colonne (électrodes A et B) et mesure de potentiel le long de la colonne (électrodes Cu/CuSO ₄ , E1 à E6).....	235
Figure 0-7 : Phase de la résistivité complexe d'une colonne d'eau salée, mesurée par le GDP 32 en mode 16 bits, pour le couple E2E5, sur les électrodes de type cône (ronds pleins) et de type tube (losanges vides). Les barres d'erreur correspondent à un écart type calculé sur 6 mesures par fréquence.....	236
Figure 0-8 : Phase de la résistivité complexe mesurée sur différents couples d'électrodes de mesures, avec le GDP 32 en mode 16 bits, pour les électrodes de type cône. Des fluctuations de la phase sont observées lorsqu'une ou les deux électrodes de mesure sont trop proches des électrodes d'injection.....	237
Figure 0-9 : Phase de la résistivité complexe mesurée avec différents appareils (GDP 32 en modes 16 et 24 bits, et les deux Princeton, l'ancien et le nouveau) pour les électrodes de type cône, pour le couple E2E5.....	238
Figure 0-10 : Phase de la résistivité complexe mesurée avec différents appareils (GDP 32 en modes 16 et 24 bits, et les deux appareils PAR, l'ancien et le nouveau) pour les électrodes de type tube, pour le couple E2E5.....	238
Figure 0-11 : Phase de la résistivité complexe mesurée le 28/10 (jour 1 après immersion), le 30/10 (jour 3) et le 4/11 (jour 8) avec le GDP en mode 16 bits, pour les électrodes de type cône, pour le couple E2E5.....	240
Figure 0-12 : Phase de la résistivité complexe mesurée le 28/10 (jour 1 après immersion), le 30/10 (jour 3) et le 4/11 (jour 8) avec le GDP en mode 16 bits, pour les électrodes de type tube, pour le couple E2E5.....	240
Figure 0-13 : Phase de la résistivité complexe mesurée une fois par jour avec les appareils PAR, pour les électrodes de type tube, pour le couple E2E5.....	241
Figure 0-14 : Phase de la résistivité complexe mesurée une fois par jour avec les appareils PAR, pour les électrodes de type cône, pour le couple E2E5.....	242
Figure 0-15 : Phase de la résistivité complexe d'une colonne de sable saturé, mesurée par le GDP 32 en mode 16 bits, pour le couple E2E5, sur les électrodes de type cône (ronds pleins) et de type tube (losanges vides). Les barres d'erreur correspondent un écart type calculé sur 6 mesures par fréquence.....	243
Figure 0-16 : Phase de la résistivité complexe mesurée sur une colonne de sable saturé, sur différents couples d'électrodes de mesures, avec le GDP 32 en mode 16 bits, pour les électrodes de type cône.....	244
Figure 0-17 : Phase de la résistivité complexe mesurée le 05/11 (jour 1 après immersion) et le 12/11 (jour 8) avec le GDP en mode 16 bits, pour les électrodes de type cône, pour le couple E2E5, sur une colonne de sable saturé.....	245
Figure 0-18 : Phase de la résistivité complexe mesurée le 05/11 (jour 1 après immersion) et le 12/11 (jour 8) avec le GDP en mode 16 bits, pour les électrodes de type tube, pour le couple E2E5, sur une colonne de sable saturé.....	246
Figure 0-19 : Phase de la résistivité complexe mesurée une fois par jour avec les appareils PAR, pour les électrodes de type tube, pour le couple E2E5, pour une colonne de sable saturé.....	246
Figure 0-20 : Phase de la résistivité complexe mesurée une fois par jour avec les appareils PAR, pour les électrodes de type cône, pour le couple E2E5, pour une colonne de sable saturé.....	247

<i>Figure 0-21 : Amplitude de la résistivité complexe d'une colonne d'eau salée, mesurée par le GDP 32 en mode 16 bits, pour le couple E2E5, sur les électrodes de type cône (ronds pleins) et de type tube (losanges vides). Les barres d'erreur correspondent un écart type calculé sur 6 mesures par fréquence.</i>	<i>248</i>
<i>Figure 0-22 : Amplitude de la résistivité complexe d'une colonne de sable saturé, mesurée par le GDP 32 en mode 16 bits, pour le couple E2E5, sur les électrodes de type cône (ronds pleins) et de type tube (losanges vides). Les barres d'erreur correspondent un écart type calculé sur 6 mesures par fréquence.</i>	<i>248</i>
<i>Figure 0-1 : Profils CE-SSCP établis pour les Colonnes C1 (en haut) et C2 (en bas), à différentes hauteurs (S1, S2 et S3), à T final.....</i>	<i>254</i>
<i>Figure 0-2 : Comparaison des Profils CE-SSCP C1_S1 et C2_S1 (en haut) et C1_S2 et C2_S2 (en bas), à T final. .</i>	<i>254</i>
<i>Figure 0-3 : Evolution au cours du temps des Profils CE-SSCP de la colonne C2.</i>	<i>255</i>

GLOSSAIRE

Liste des termes, variables, abréviations utilisés dans ce document.

A. GÉOPHYSIQUE

a :	constante dépendant de la lithologie (loi d'Archie)
CR :	<i>Complex Resistivity</i> , méthode de résistivité complexe (= SIP)
I [A] :	intensité du courant électrique
IP :	<i>Induced polarization</i> (= PP)
D [C.m ⁻²] :	induction électrique
DCE :	Double Couche Électrique
ddp :	différence de potentiel (= ΔV)
ΔV [V] :	différence de potentiel électrique (= ddp)
E [V.m ⁻¹] :	champ électrique
EM :	électromagnétique
ER :	<i>Electric resistivity</i>
ϵ [F/m] :	permittivité diélectrique
ϵ_0 [F/m] :	permittivité diélectrique du vide
ϵ^* [F/m] :	permittivité diélectrique complexe (sous-entendue ϵ^*_{eff} , la permittivité diélectrique effective complexe)
f [Hz] :	fréquence
F :	facteur de formation (loi d'Archie)
GPR :	<i>Ground Penetrating Radar</i>
J [A.m ⁻²] :	densité de courant totale
J_c [A.m ⁻²] :	densité de courant de conduction
J_d [A.m ⁻²] :	densité de courant de déplacement
k [m] :	facteur géométrique (passage de la résistance à la résistivité électriques)
K_{eff} :	permittivité relative effective (permittivité électrique du milieu ramenée à celle du vide $K_{\text{eff}} = \epsilon^* / \epsilon_0$)
m :	facteur de cimentation (loi d'Archie)
M [mV/V] :	Chargeabilité
M _a [mV/V] :	Chargeabilité apparente définie par Seigel (1959)

M_n [$\mu\text{S/m}$] :	Chargeabilité normalisée définie par Slater et Lesmes, 2002. Chargeabilité divisée par la résistivité.
ω [rad.s^{-1}] :	pulsation ($= 2\pi f$)
\mathbf{P} [C.m^{-2}] :	polarisation
PP :	Polarisation Provoquée (= IP)
Φ [%] :	porosité
φ [rad] :	phase, déphasage de la résistivité complexe (<0) ou de la conductivité complexe (>0).
R [Ω] :	résistance électrique
ρ [$\Omega.\text{m}$] :	résistivité électrique (= résistivité DC)
ρ^* [$\Omega.\text{m}$] :	résistivité électrique complexe (sous-entendue ρ_{eff}^* , la résistivité électrique effective complexe), avec ρ' et ρ'' les parties réelles et imaginaires respectivement, et $ \rho^* $ son amplitude.
ρ_a [$\Omega.\text{m}$] :	résistivité apparente. Pondération de toutes les valeurs de résistivité vraie pour chaque composante du milieu.
ρ_w [$\Omega.\text{m}$] :	résistivité de l'eau d'imbibition
SIP :	<i>Spectral Induced Polarization</i> , Polarisation provoquée en domaine temporel (= CR)
S_w :	saturation en eau
σ [S/m] :	conductivité électrique
σ^* [S/m] :	conductivité électrique complexe (sous-entendue σ_{eff}^* , la conductivité électrique effective complexe), avec σ' et σ'' les parties réelles et imaginaires respectivement, et $ \sigma^* $ son amplitude.
σ_{surf} [S/m] :	conductivité dite de surface
σ_{el} [S/m] :	conductivité de l'électrolyte, dite de volume
σ_w [S/m] :	conductivité du fluide
TDIP :	<i>Time Domain Induced Polarization</i> , Polarisation provoquée en domaine temporel
Z^* [Ω] :	impédance complexe

B. GÉOCHIMIE

A :	absorbance de la lumière
$\alpha_{B/A}$:	facteur de fractionnement isotopique ou coefficient de fractionnement entre les phases A et B
CO_2 :	Dioxyde de carbone
CSIA :	<i>Compound-specific Stable Isotope Analysis</i>
DIC :	<i>Dissolved Inorganic Carbon</i> , carbone inorganique total

DOC :	<i>Dissolved Organic Carbon</i> , carbone organique dissous
$\delta^{13}\text{C}$ [‰] :	écart isotopique du carbone
Δ_{B-A} :	fractionnement isotopique entre deux phase A et B
Eh [mV] :	potentiel redox
ϵ [‰] :	facteur d'enrichissement isotopique ($= (\alpha-1)*1000$).
GC :	<i>Gas Chromatography</i>
GES :	Gaz à Effet de Serre
H ₂ O ₂	Eau oxygénée
IRIS :	<i>Isotope Ratio Infrared Spectrometry</i>
IRMS :	<i>Isotope Ratio Mass Spectroscopy</i>
λ [m] :	longueur d'onde
NPOC :	<i>Non Purgeable Organic Carbon</i>
O ₂ :	oxygène
pH :	potentiel hydrogène
ppb :	Partie par milliard
ppm :	Partie par million
ppmV :	Partie par million par volume
QCL :	Lasers à cascades quantiques
R :	rapport isotopique, rapport de l'isotope lourd et rare sur l'isotope léger et abondant
SPIRIT :	SPectromètre Infra-Rouge <i>In situ</i> Troposphérique
T :	transmission de la lumière
%T [%] :	pourcentage de transmission ou transmittance
VPDB	<i>Vienna Pee Dee Belmnite</i> (référence internationale pour le calcul du $\delta^{13}\text{C}$)

C. MICROBIOLOGIE

AFM :	microscopie à force atomique
Cellule de Thoma :	cellule de comptage des bactéries au MO
DO 600 :	Densité Optique à 600 nm
Formaldéhyde :	inhibiteur de la respiration bactérienne

MO :	Microscope Optique
Planctonique	Libre, dans le fluide (≠ Sessile)
Sessile	Fixé sur le substrat (≠ Planctonique)
<i>R. w.</i> :	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>

D. SITES ET SOLS POLLUÉS

ADEME :	Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.
Aérobie :	En présence d'oxygène (≠ Anaérobie)
Anaérobie :	En l'absence d'oxygène (≠ Aérobie)
Atténuation naturelle :	Procédé de traitement des sites et sols pollués qui regroupe tous les processus faisant intervenir des phénomènes de dispersion, dilution, adsorption, dégradation chimique ou biologique ayant pour effet de réduire la masse, le volume, la concentration, la disponibilité ou la toxicité d'une pollution.
BASIAS :	Banque de données gérée par le BRGM qui garde en mémoire l'ensemble des sites ayant connu une pollution d'origine industrielle.
BASOL :	Base de données du Ministère de l'Environnement qui recense l'ensemble des sites pollués français
Biodégradation	Désigne le processus de dégradation de substances organiques par l'action de micro-organismes aérobies ou anaérobies.
BTEX	Benzène, Toluène, Ethyle-benzène, Xylènes
DNAPL :	<i>Dense Non-Aqueous Phase Liquids</i> (≠ LNAPL)
LNAPL :	<i>Light Non-Aqueous Phase Liquids</i> (≠ DNAPL)
PCE :	perchloroéthylène

E. AUTRES

ANR :	Agence Nationale pour la Recherche
BIOPHY :	Optimisation de procédés de BIODépollution des eaux souterraines contaminées par des hydrocarbures par un monitoring géoPHYSIQUE et analyse de gaz en ligne. Projet ANR ECOTECH 2010.
BRGM :	Bureau de Recherche Géologique et Minière
CNRS :	Centre National de la Recherche Scientifique
GEIS :	<i>Galvanostatic Electrochemical Impedance Spectroscopy</i>
IFP-EN :	Institut Français du Pétrole – Energies Nouvelles
ISTO :	Institut des Sciences de la Terre d'Orléans (CNRS, Orléans)

LPC2E	Laboratoire de Physique et de Chimie de l'Environnement et de l'Espace (CNRS, Orléans)
MP35N :	alliage inoxydable à base de nickel/cobalt
PAR :	<i>Princeton Applied Research</i>
PVDF :	<i>PolyViniliDene Fluoride</i> , Polyfluorure de vinyldène ou Kynar®
SIE :	Spectroscopie d'Impédance Electrochimique
ζ [V] :	Potentiel zêta

I. INTRODUCTION

La France compte aujourd'hui 5775 sites industriels dont le sous-sol est pollué par des métaux lourds ou des hydrocarbures, qui présentent un risque pour la santé ou l'environnement et nécessitent la mise en œuvre de travaux de réhabilitation [BASOL - Ministère de l'Écologie, 2014].

Des traitements *in situ* comme la biodégradation, basée sur la dégradation des contaminants organiques par des micro-organismes, peuvent être envisagés dans le cadre de la dépollution. Il s'agit de techniques prometteuses mais qui nécessitent d'améliorer les outils de suivi de l'évolution de la décontamination. Actuellement, la surveillance se fait principalement à l'aide d'analyses d'échantillons prélevés dans des forages. Ces analyses permettent de déterminer avec précision le niveau de contamination. Cependant, les informations obtenues sont ponctuelles et leur représentativité à l'échelle de la zone étudiée est souvent difficile à déterminer. En outre, pour des raisons principalement économiques, le nombre de forages et d'analyses est souvent limité.

Dans le but de pallier le manque d'informations entre les forages et de proposer un suivi plus léger et à moindre coût, il serait avantageux d'utiliser des techniques non-destructrices et rapides qui permettent d'obtenir des données sur de larges surfaces. Les méthodes géophysiques, qui possèdent un caractère intégrateur, répondent à ces contraintes et offrent la possibilité de mesurer différents paramètres susceptibles d'être influencés par la variation des propriétés physico-chimiques du sous-sol. De ce fait, après avoir été largement utilisées en prospection pétrolière ou minière par exemple, elles sont de plus en plus mises en œuvre sur des sites pollués afin de délimiter les zones contaminées et de suivre leur dépollution.

De plus, les approches classiques basées sur le suivi de la concentration des polluants sont parfois insuffisantes pour démontrer formellement la biodégradation des polluants. En effet, cette diminution peut être due à des effets de sorption, de dilution, de dégazage... Seule la dégradation provoque une perte nette des polluants et la réduction durable de la pollution. Une approche isotopique, comme l'analyse de l'isotopie du carbone du CO₂ provenant de la biodégradation d'hydrocarbures, permettrait d'obtenir les informations nécessaires pour estimer l'efficacité des processus de dégradation.

Ce chapitre introductif détaille la problématique des sols pollués en France (réglementation, marché, techniques de dépollution), ainsi que le besoin de nouvelles techniques de surveillance. Il présente l'intérêt de la mise en place du couplage de deux méthodes non-destructrices, les méthodes géophysiques électriques et les analyses de gaz en surface, pour améliorer le suivi d'une biodégradation d'hydrocarbures.

A. LA PROBLÉMATIQUE DES SOLS POLLUÉS ET LEUR DÉPOLLUTION

Les sols pollués sont, le plus souvent, la conséquence d'activités industrielles plus ou moins récentes. La pollution anthropogénique est liée à l'énergie consommée (hydrocarbures) et aux divers procédés de transformation et de fabrication (par exemple, récupération métallurgique, traitement des métaux, fabrication de peinture,...). Les polluants se concentrent dans le sol, par infiltration, suite à des déversements ou à des fuites accidentelles de produits toxiques. Ce n'est pas uniquement la présence de polluants dans le sol qui pose un problème, mais le fait qu'ils puissent être mobiles, partiellement ou totalement solubles, et puissent atteindre sous forme de panache de pollution les eaux souterraines, voire les captages d'alimentation en eau potable (AEP) avec tous les risques que cela implique sur la faune, la flore et la santé des populations locales.

1. RÉHABILITATION DES SOLS ET DES EAUX SOUTERRAINES : LA RÉGLEMENTATION ET LE MARCHÉ FRANÇAIS DE LA DÉPOLLUTION

L'ensemble des sites pollués français est inscrit dans la base de données BASOL du Ministère de l'Environnement, créée dans les années 1990 (Arrêté du 17 octobre 1994 - JO n° 254 du 1^{er} novembre 1994). Cette inscription peut survenir lors d'une inspection des services de l'Etat, au moment d'une cessation d'activité ou à l'initiative des exploitants en cas de pollution accidentelle.

En France, la grande majorité de ces sites se trouvent dans des anciennes régions minières ou les régions les plus urbanisées comme l'Ile-de-France, le Nord-Pas-de-Calais ou la région Rhône-Alpes. Les polluants les plus souvent retrouvés dans les nappes phréatiques contaminées sont les hydrocarbures (25 % des sites recensés), dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAP (11 % des sites), les solvants halogénés (9,5%), et les métaux lourds (plomb 12 %, chrome 9,5 %, cuivre 9,5 %, arsenic 9 %, nickel 6,5 %, mercure 3,5 %) [BASOL - Ministère de l'Écologie, 2014].

Un peu plus de 11 % des 5775 sites recensés en 2014 ont été dépollués et entièrement banalisés. Une fois les sites nettoyés, ils sont supprimés de l'inventaire BASOL et rejoignent une autre banque de données, gérée par le BRGM (Bureau de recherches géologiques et minières), qui garde en mémoire l'ensemble des endroits ayant connu une pollution d'origine industrielle (BASIAS - Arrêté du 10 décembre 1998 - J.O. Numéro 89 du 16 avril 1999).

Après le recensement des sites qui permet d'identifier la nature des contaminants, des chantiers de réhabilitation peuvent être enclenchés. Théoriquement, c'est à l'exploitant responsable de la pollution ou, à défaut, le propriétaire du terrain, de procéder à la dépollution de la zone (Directive Européenne 2004/35/CE du 21 avril 2004). Mais, il arrive que les propriétaires restent introuvables. Ces sites, appelés « sites à propriétaires défaillants ou sites orphelins » sont de la responsabilité de la collectivité, et ils sont gérés par l'ADEME.

La politique de réhabilitation et de traitement des sites est une politique de gestion des risques en fonction de l'usage : le traitement d'un site doit être fait en fonction de son impact sur l'environnement et de l'usage auquel il est destiné. Ainsi, la circulaire du 10 décembre 1999 relative aux sites et sols pollués et aux principes de fixation des objectifs de réhabilitation, donne les outils pour le diagnostic approfondi et l'évaluation détaillée des risques (EDR). Cette politique fixe les usages des sols compatibles avec les pollutions résiduelles après traitement du site et elle instaure des actions de prévention et de surveillance de l'environnement autour des installations classées [Ministère de l'Ecologie].

Le chiffre d'affaires du marché de la dépollution des sols a été estimé à plus de 325 millions d'euros pour l'année 2010 [ADEME, 2012]. La demande était répartie comme suit : environ 70 % des terres polluées traitées provenaient de chantiers pour des clients industriels ; environ 30 % des terres polluées provenaient de chantiers d'aménagement : 17 % pour des aménageurs privés et 13 % pour des aménageurs publics. En ce qui concerne les chantiers de dépollution des eaux souterraines, 99% de la demande émanait des industriels.

Indépendamment de la réglementation française qui pousse les industriels à traiter les pollutions, la demande du secteur immobilier est un autre facteur important de ce secteur d'activités. En effet, en 2010, le nombre des permis de construire a augmenté de 14 % par rapport à 2009, ce qui reflète cette demande. En outre, la tendance actuelle en faveur du développement durable vise à limiter l'étalement urbain et favorise la réhabilitation de sites plutôt que l'aménagement de nouveaux sites naturels.

2. LES TECHNIQUES DE DÉPOLLUTION

Il existe plusieurs méthodes de dépollution pour traiter les sols et les nappes d'eaux souterraines contaminés. Elles se distinguent par leur mode de mise en œuvre : techniques hors site, sur site et *in situ* [Lecomte, 1998].

Les traitements hors site et sur site consistent à excaver les terres et/ou à pomper les eaux polluées pour, soit les acheminer vers un centre de dépollution (hors site), soit les traiter sur place grâce à une installation de dépollution temporaire (sur site). Les traitements *in situ* se réalisent directement dans le milieu pollué, sans bouger les terres contaminées.

La dépollution peut se faire par :

- Des traitements physico-chimiques, où les polluants sont dissous à l'aide de solvants pour les extraire ;
- Des traitements chimiques, qui consistent à injecter un réactif dans le sol qui entrera directement en contact avec le polluant pour le détruire ou le solubiliser et ainsi le transformer en un composé moins toxique ;

- Des traitements thermiques, où le principe est de porter le matériel pollué à haute température pour le détruire, le volatiliser, le solubiliser, l'extraire, l'immobiliser ;
- Confinement (piégeage) des eaux et terres polluées pour éviter la migration des polluants ;
- Des traitements biologiques, qui s'appuient sur le métabolisme et l'activité des êtres vivants (bactéries, champignons, plantes) pour dégrader les polluants : la biodégradation. Parmi les méthodes de biodégradation *in situ*, la bio-stimulation et la bio-augmentation consistent à dégrader les polluants par des microorganismes endogènes (présents naturellement dans le milieu) ou exogènes (étrangers au milieu, que l'on injecte) que l'on stimule par l'apport de nutriments et d'oxygène (bactéries aérobies) ou d'hydrogène (bactéries anaérobies). Une autre technique consiste à extraire les polluants du sol via des végétaux : la phyto-extraction. Cette technique est principalement appliquée aux pollutions par des métaux.

Le choix des techniques est guidé par un compromis technico-économique. Il dépend de la taille du chantier, du type de pollution, de la nature du sol, des délais de décontamination, des risques pour les opérateurs et des coûts des traitements. De plus, les textes réglementaires du 8 février 2007, dans une logique de développement durable, privilégient les traitements *in situ* plutôt que l'excavation et l'élimination hors site [ADEME, 2012].

L'étude qui suit concernera plus particulièrement les processus de bio-remédiation *in situ* : bio-stimulation et bio-augmentation aérobie.

B. BESOIN DE NOUVELLES TECHNIQUES DE SURVEILLANCE *IN SITU*

Les processus de biodégradation sont efficaces - les microflore de l'environnement ont des capacités élevées de dégradation de l'essence (plus de 85 %) [Majone *et al.*, 2014 ; Solano-Serena *et al.*, 2001] - et très compétitifs en termes de coûts, même si les durées de traitement (cinétiques des processus) sont généralement plus longues que dans le cas des techniques sur site ou hors site. Certains systèmes bactériens sont capables de rejeter uniquement des produits inoffensifs tels que l'eau et le dioxyde de carbone. Il y a donc un minimum d'impact sur l'écosystème et pas, ou peu, de production de déchets après traitement.

Le principal inconvénient de cette catégorie des techniques est le fait qu'elle nécessite la présence de bactéries compétentes, la survie et la croissance de ces bactéries. De plus, l'efficacité de la biodégradation est aussi liée à la disponibilité d'accepteurs et de donneurs d'électrons, de nutriments minéraux (riches en N, P, K, ...) et d'un pH adéquat au métabolisme bactérien.

Des variations de pH ou de température peuvent entraver la croissance bactérienne et diminuer les rendements de dépollution. Par conséquent, la biodégradation nécessite un monitoring approprié pour pouvoir ajuster les différents paramètres pour obtenir les meilleurs rendements de dépollution.

Les hétérogénéités de répartition de la pollution dans le sous-sol constituent également des freins à l'atteinte des objectifs de dépollution. En effet, la dispersion des polluants n'est pas homogène et il existe plusieurs zones sources disséminées dans le milieu (dites « *pool* » en anglais), ainsi que des zones de résurgences (« *back-diffusion* ») après une dépollution [Carey *et al.*, 2014] . Cette répartition irrégulière complexifie encore plus la dépollution.

La maîtrise de ces paramètres est primordiale pour l'émergence de ces techniques. En effet, ils posent des difficultés de pronostic des durées de traitement, de démonstration des atteintes des objectifs de dépollution et de coûts. Actuellement, une bio-dépollution est menée en grande partie en aveugle, excepté sur quelques forages de contrôle du site.

C. LE PROJET BIOPHY

Le projet ANR BIOPHY (Optimisation de procédés de BIODépollution des eaux souterraines contaminées par des hydrocarbures par un monitoring géoPHYsique et analyse de gaz en ligne) a été rédigé et proposé au financement de l'ANR en 2010 pour répondre au manque d'outils de suivi de la biodégradation de nappes d'eau souterraines contaminées par des mélanges de composés organiques d'origine pétrolière.

L'objectif du projet est le développement d'une nouvelle méthodologie de surveillance d'une bio-dépollution à l'aide de méthodes non destructives. Il s'agit d'optimiser le traitement grâce à un suivi continu dans le temps de l'activité bactérienne et des produits injectés (O₂, nutriments,...) et à un criblage haute résolution du terrain dépollué.

Cette nouvelle méthodologie est basée sur un couplage de techniques géophysiques (variation de la conductivité électrique des eaux souterraines et effet de polarisation provoquée liée à l'activité bactérienne) et d'analyse de CO₂ (quantification de la respiration bactérienne par analyse de la teneur en CO₂ et du ratio isotopique ¹²C/¹³C de son carbone). Ces outils doivent apporter des informations manquantes aux procédés de traitement *in situ*, sur le lieu où la biodégradation se produit et sur son efficacité.

En effet, la biodégradation peut conduire à la minéralisation totale du carbone, c'est-à-dire à la transformation des composés organiques en eau et en CO₂. De plus, lors des processus de transformations biologiques naturels, les deux isotopes stables du carbone (¹²C et ¹³C) participent aux réactions, mais les liaisons entre les atomes légers seront plus rapidement dissociées [Meckenstock *et al.*, 2004]. Les molécules qui comprennent des isotopes ¹²C vont donc réagir préférentiellement et le CO₂ produit sera appauvri en ¹³C.

En outre, l'activité bactérienne modifie les propriétés physico-chimiques et électriques du milieu et elle peut être détectée par des méthodes géo-électriques. La réponse géophysique dépend de la nature du contaminant, de sa concentration, de son degré de dégradation (atténuation naturelle ou biostimulation) et du type de milieu affecté par la contamination. Malgré la diversité des réponses, de nombreuses expériences en laboratoire et sur le terrain ont montré que les sols pollués par des hydrocarbures matures (plus dégradés) étaient caractérisés par une plus forte conductivité électrique alors que les hydrocarbures sont électriquement résistifs, ainsi que par des effets de polarisation provoquée (phénomènes d'interactions aux interfaces) [Atekwana and Atekwana, 2010 ; Che-Alota *et al.*, 2009 ; Davis *et al.*, 2006 ; Abdel Aal *et al.*, 2006 ; Atekwana *et al.*, 2004 ; Sauck, 2000]. Néanmoins, les paramètres géophysiques mesurés (résistivité électrique, chargeabilité,...) ne peuvent pas être directement reliés aux paramètres chimiques (concentration en polluants). Ainsi, les méthodes géophysiques doivent s'accompagner d'autres mesures, comme l'outil isotopique, afin d'optimiser la qualité des diagnostics.

L'amélioration des outils de surveillance de l'activité de biodégradation doit amener un gain sur le coût et la durée de la décontamination. De plus, cela permettra de gagner en confiance sur les performances du traitement, et par conséquent favoriser l'acceptabilité de la technique par les prestataires de la dépollution.

Le projet rassemble plusieurs partenaires, universitaires et industriels :

- Le BRGM (Bureau de Recherche Géologique et minière) à Orléans, coordinateur du projet. Le BRGM travaille depuis plusieurs années dans le domaine du comportement des polluants organiques, du traitement des eaux et des sols pollués, ainsi que dans le développement de méthodologies de diagnostic et / ou de monitoring de sites pollués, couplant la géophysique, la chimie et les mesures *in situ*.
- Le LPC2E (Laboratoire de Physique et Chimie de l'Environnement et de l'Espace) à Orléans est une unité mixte de recherche (UMR 7328) qui dépend de l'Université d'Orléans et du Centre National de Recherche Scientifique (CNRS). Le LPC2E s'est intégré dans ce projet dans le but de mieux comprendre les mécanismes de production de gaz aux cours des processus de dépollution et de développer un capteur de gaz spécifique à l'analyse des flux de CO₂ et du rapport isotopique du carbone à l'interface sol-atmosphère, le SPIRIT (SPectromètre Infra-Rouge In situ Troposphérique).
- TOTAL Exploration Production, Pôle d'Etude et de Recherche de Lacq (PERL), France. Le projet BIOPHY s'inscrit pleinement dans les activités du pôle R&D puisqu'il s'agit de développer et d'évaluer de nouveaux

outils de surveillance des traitements *in situ* des nappes d'eau souterraine qui pourront être mis au profit des sites TOTAL.

- SERPOL, entreprise de dépollution, situé à Vénissieux, France. Dans le projet BIOPHY, SERPOL est l'industriel chargé de la mise en œuvre des procédés de dépollution sur site, et de leur utilisation future.
- Géosciences Montpellier (UMR 5243 de l'Université de Montpellier II). Ce laboratoire a été intégré à BIOPHY car un projet en cours portait sur l'étude des processus microbiens aux interfaces roches-fluides par des mesures électriques au niveau local (à l'échelle micrométrique).

Les travaux sont répartis en sept tâches et sur trois échelles. Outre la tâche 1 dont l'objectif est la coordination du projet, les actions entreprises visent, dans un premier temps, à développer et tester les nouveaux outils de monitoring à l'échelle du laboratoire au sein de trois tâches distinctes constituant la phase de recherche fondamentale :

- la tâche 2 était dédiée au développement du capteur de gaz spécifique à l'analyse des flux de CO₂ et du rapport isotopique du carbone du LPC2E, le SPIRIT (tâche terminée en janvier 2013) ;
- la tâche 3 visait l'étude des propriétés électriques de surface des bactéries à l'échelle microscopique, afin de déterminer l'origine des phénomènes observés aux grandes échelles (tâche en partie réalisée par la thèse de S. Dhahri à Géosciences Montpellier, soutenue en septembre 2013 [Dhahri, 2013]) ;
- la tâche 4 doit permettre de tester sur une même colonne de sol, à l'échelle du laboratoire, le couplage des deux techniques de monitoring pour le pilotage de tests de biodégradation aérobie d'hydrocarbures.

Dans un second temps, ces outils sont mis en œuvre sur un site expérimental en cours de dépollution. Cette phase de recherche technologique et appliquée est elle-même séparée en trois tâches distinctes :

- la tâche 5 vise au test à l'échelle du terrain du système de monitoring au cours d'une opération de dépollution avec pour objectif de permettre l'optimisation du procédé grâce au système de surveillance en ligne ;
- la tâche 6 est dédiée à l'étude des performances d'un bio-traitement par modélisation hydro-bio-géochimique et analyse isotopique, avec pour objectif de prédire l'efficacité du traitement en temps réel ;
- la tâche 7 aura pour objectif l'étude socio-économique de la filière développée couplant bio-traitement et surveillance en ligne.

Le projet BIOPHY vise à essayer de déplacer le marché de la dépollution vers des procédés efficaces pour l'amélioration de la qualité des eaux souterraines, à un coût financier raisonnable et dont l'efficacité pourrait être garantie par le prestataire.

D. STRUCTURE DU MANUSCRIT

Le travail présenté dans ce manuscrit de thèse correspond à la tâche 4 et à une partie de la tâche 5 du projet BIOPHY brièvement présenté préalablement :

- Tâche 4 : Monitoring géophysique et analyse de gaz sur colonne.

L'objectif de cette tâche est de comparer, à l'échelle du laboratoire, les indicateurs indirects de biodégradation développés dans le projet (analyse de gaz, propriétés électriques) à des indicateurs directs de biodégradation (comptage bactérien, isotopie du carbone, analyse de la concentration en hydrocarbure). La première étape a consisté à élaborer des colonnes remplies de sable avec circulation du fluide de percolation (recirculation ou circuit ouvert), sur lesquelles il a fallu installer à la fois des électrodes de mesure de la résistivité complexe, un système de prélèvement des gaz en tête de colonne pour une analyse en ligne et une batterie de capteurs en sortie de colonne pour une analyse en continu. Ces colonnes sont également équipées de points de prélèvement d'échantillons de fluide et de sol afin de pouvoir faire des comptages bactériens et des analyses physico-chimiques et isotopiques du carbone. Les expériences menées sur ces colonnes ont permis l'étude de la biodégradation aérobie du toluène par une souche bactérienne connue.

- Tâche 5 : test de surveillance de la biodégradation sur site pilote.

L'objectif de cette tâche est de valider sur un site réel en cours de dépollution l'aptitude du système de monitoring proposé à i) enregistrer en temps réel la dégradation des hydrocarbures *in situ* et ii) apporter à l'opérateur de la dépollution des informations lui permettant d'optimiser le procédé en particulier par la détection de zones où la dégradation ne semble pas efficace.

Ce travail est divisé en trois parties et neuf sous-chapitres. L'introduction du contexte et de la problématique, la description des objectifs et la structure de ce travail ont été développées dans ce premier chapitre (I).

Partie 1 : Etat de l'art, chapitres II à IV

Le second chapitre donne une description plus précise de la biodégradation, des processus bactériens mis en œuvre et des différentes techniques de suivi que l'on peut mettre en place. Le troisième chapitre introduit la méthode de résistivité complexe, les principes généraux et son application dans le domaine de la géophysique environnementale. L'intérêt d'utiliser cette méthode pour la surveillance de la biodégradation y sera démontré. Le quatrième chapitre concerne l'analyse du CO₂ et l'utilisation du rapport isotopique du carbone, ¹³C/¹²C dans le CO₂, comme indicateur de la biodégradation. Très utilisé sur les polluants résiduels, le potentiel de l'outil isotopie sur les gaz émis sera illustré.

Partie 2 : Matériel et méthodes, chapitres V et VI

Le cinquième chapitre correspond à la mise en place de la tâche 4 du projet BIOPHY. Il est dédié à la description des méthodes expérimentales utilisées en laboratoire. Il s'agit de décrire les dispositifs de mesures et les protocoles utilisés pour les expériences en colonnes. Le sixième chapitre introduit le dispositif mis en place sur un site pilote, une station-service en cours de dépollution, afin de répondre aux objectifs de la tâche 5.

Partie 3 : Résultats, discussions, conclusions et perspectives, chapitres VII à IX

Dans les deux chapitres suivants sont présentés les résultats obtenus en laboratoire (chapitre VII), puis sur le terrain (chapitre VIII). La validation du dispositif de mesure et la qualité des données obtenues seront traitées avec une grande attention et précaution. La faisabilité de la méthode en laboratoire et les premiers résultats encourageants obtenus sur le site y seront montrés. La conclusion générale (chapitre IX) tentera de faire le lien entre les mesures faites à l'échelle du laboratoire et celles obtenues sur site. Elle synthétise l'avancée du projet et met en avant les perspectives pour de futurs travaux.

Suivent les références bibliographiques consultées pour rendre cette étude plus pertinente. Et finalement, sont données les annexes qui présentent les rappels les plus importants ou les résultats d'études complémentaires qui sont nécessaires pour approfondir certains chapitres.

PARTIE 1 : ÉTAT DE L'ART

II. BIODÉGRADATION

La biodégradation correspond à la décomposition de polluants organiques par des micro-organismes (bactéries, champignons ou algues). Les polluants sont alors convertis en dioxyde de carbone (lorsque la biodégradation est totale), en eau et en énergie pour constituer de la biomasse.

Les hydrocarbures pétroliers sont des polluants organiques qui sont soumis à la biodégradation dès que les micro-organismes capables de les utiliser se sont développés.

A. CONTEXTE

Les sols sont le déversoir de substances polluantes liées à l'activité industrielle. Par infiltration, ces pollutions, accidentelles ou consécutives à des mauvaises pratiques environnementales, peuvent atteindre les nappes phréatiques et menacent les écosystèmes et la santé des populations. Il est donc nécessaire de mettre en place des moyens afin de traiter ces zones dangereuses.

1. LES HYDROCARBURES PÉTROLIERS

Les hydrocarbures sont un mélange complexe de plusieurs composés. Plusieurs types de molécules se différencient par leur nombre d'atomes de carbone, le nombre et le type de liaisons entre atomes de carbone, le nombre d'hétéroatomes (O, N, S,...), et par leur géométrie spatiale : les hydrocarbures aliphatiques à chaînes ouvertes (molécules linéaires ou ramifiées en longues chaînes), les hydrocarbures aromatiques (constitués de cycles benzéniques) et les hydrocarbures hétérocycliques (cycles complexes renfermant des atomes autres que C).

Leur transfert à la nappe dépend en particulier de leur masse molaire et de leur solubilité dans l'eau. Deux catégories de composés peuvent être distinguées : les composés lourds (fuels lourds) qui ont une densité supérieure à celle de l'eau et qui vont s'accumuler au substratum de la nappe phréatique (les DNAPL, pour *Dense Non Aqueous Phase Liquids*) ; et les composés légers (essences), moins denses que l'eau, qui restent à la surface de la nappe. Ce sont des LNAPL (*Light Non Aqueous Phase Liquids*). Le travail présenté ici considère plutôt le cas des LNAPL. Les hydrocarbures les plus hydrosolubles sont les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène, xylènes), composés mono-aromatiques très volatils, présents notamment dans les essences sans plomb de type 95 et 98.

Ce sont des produits organiques biodégradables. Certains micro-organismes les utilisent en tant que donneurs d'électrons et contribuent ainsi à leur dégradation.

2. DISTRIBUTION DES MICROORGANISMES DANS LE SOL

La distribution des microorganismes dans le sol varie et elle est étroitement liée à la présence d'eau, d'un substrat (substance sur laquelle les cellules microbiennes vivent et se développent) et de nutriments (substance que l'organisme utilise dans son métabolisme pour produire de l'énergie). Dans les systèmes naturels, le substrat le plus utilisé par les microorganismes est la matière organique.

La matière organique du sol est principalement produite par la dégradation des plantes de la surface. Sous le sol, elle peut être transportée plus profondément, mais sa concentration diminue en général avec la profondeur (sauf dans les réservoirs diagénétiques de gaz et de pétrole). La population microbienne diminue avec la profondeur en corrélation avec la décroissance de matière organique.

Le sol peut être délimité en deux parties sur la base de son niveau de saturation en eau. La zone non saturée (ZNS), comprise entre la surface du sol et le toit de la nappe phréatique, se distingue de la zone saturée (ZS) qui correspond à la nappe d'eau libre située sous la ZNS. Du fait de la faible concentration en carbone organique dans la partie basse de la ZNS et dans la ZS, la plupart des bactéries sont dormantes, mais viables. L'infiltration

de polluants comme les LNAPL, vient amener ces éléments dans la ZNS. Or, une introduction de carbone organique et de nutriments peut permettre de lancer l'activité bactérienne et d'augmenter la population de microorganismes. Des micro-organismes capables d'utiliser les hydrocarbures pétroliers au cours de leur métabolisme apparaissent donc dès que la pollution est introduite dans le milieu.

Un sol qui contient des hydrocarbures va modifier l'activité des microorganismes. La pollution exerce une pression sélective sur la capacité des bactéries à dégrader les hydrocarbures : elles doivent adapter leur activité enzymatique afin de pouvoir s'y attaquer. Cela engendre des modifications des capacités métaboliques. Une augmentation de la population des organismes capables de transformer les composants présents est aussi observée [Leahy and Colwell, 1990].

L'activité humaine, au travers des multiples sources de pollution, favorise l'apparition de nouvelles souches aptes à la dégradation des hydrocarbures [van der Meer et al., 1992]. La plupart des bactéries impliquées dans la dégradation des hydrocarbures font partie des genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* et *Nocardia*. Et les champignons les plus actifs dans la dégradation appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Gongronella* et *Fusarium* [Cao et al., 2009; Chaîneau et al., 1995; Leahy and Colwell, 1990].

B. LES BACTÉRIES

La réussite des traitements par biodégradation repose sur la présence de bactéries capables de biodégrader les polluants présents.

1. STRUCTURE

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires [UMVF, 2014]. Elles sont composées d'un cytoplasme entouré par une membrane plasmique et une paroi cellulaire. Ce sont des procaryotes, car elles ne possèdent pas de noyau ni d'organites. L'ADN (acide désoxyribonucléique) forme un chromosome circulaire unique. La plupart des bactéries sont des cellules de forme ovoïde ou en bâtonnet (bacille), d'une taille allant de 1 à 10 microns (μm) [Lebleu, 2007]. Elles se reproduisent par des divisions cellulaires et sont capables de croître rapidement. La division donne deux cellules-filles identiques qui peuvent se séparer ou rester attachées pour former une chaîne ou un filament.

Grâce à la coloration de Gram (1884), les bactéries peuvent être réparties en deux groupes : les bactéries dites à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Figure II-1). Cette diversité est le fait d'une différence de la structure et de la composition chimique de la paroi cellulaire [Costerton and Cheng, 1975]. En effet, les bactéries à Gram positif possèdent à l'extérieur de la membrane plasmique une paroi constituée d'une épaisse couche de peptidoglycane (ou muréine), traversée par des acides teichoïques. Ce peptidoglycane épais peut représenter jusqu'à 90 % des constituants de la paroi bactérienne [Lambert, 2002]. Les acides teichoïques sont riches en groupements phosphates. Ils permettent la fixation du peptidoglycane sur la membrane plasmique des bactéries.

Les bactéries Gram négatives [Lugtenberg and Van Alphen, 1983] ont un peptidoglycane très fin : il n'y a qu'une seule ou au plus deux couches de peptidoglycane qui ne représentent que 5 à 20 % des constituants de la paroi bactérienne. Mais, elles possèdent une membrane externe qui est constituée d'une double couche de phospholipides associés à des molécules de lipopolysaccharides (LPS ou endotoxines) sur la couche externe. La partie la plus externe des LPS (la chaîne O) est riche en groupes phosphates et carboxyles. La membrane externe et la membrane plasmique sont imperméables et elles délimitent l'espace périplasmique (ou periplasme), qui contient de nombreuses enzymes.

D'autres structures externes peuvent être présentes chez certaines bactéries, par exemple, les cils ou flagelles. Ce sont des appendices filamenteux, composés entièrement de protéines, de 6 à 15 μm de long [UMVF, 2014]. Ils constituent les organes de locomotion pour les bactéries qui en possèdent.

Les bactéries possèdent des dispositifs d'adhésion sous la forme de protéines ligands, les adhésines, et des appendices cellulaires, des pilis ou des fimbriae. Ce sont des structures protéiques filamenteuses, de 2 à 3 μm de long, disposées régulièrement à la surface de la bactérie [UPMC].

Le glycocalyx lui, est un feutrage de substances extra polymériques (EPS en anglais pour *extra-cellular polymeric substances*) présent à la surface des bactéries dans leur milieu naturel. Chez certaines espèces bactériennes, des quantités importantes d'EPS sont synthétisées et engluent les cellules bactériennes et favorisent leur adhésion.

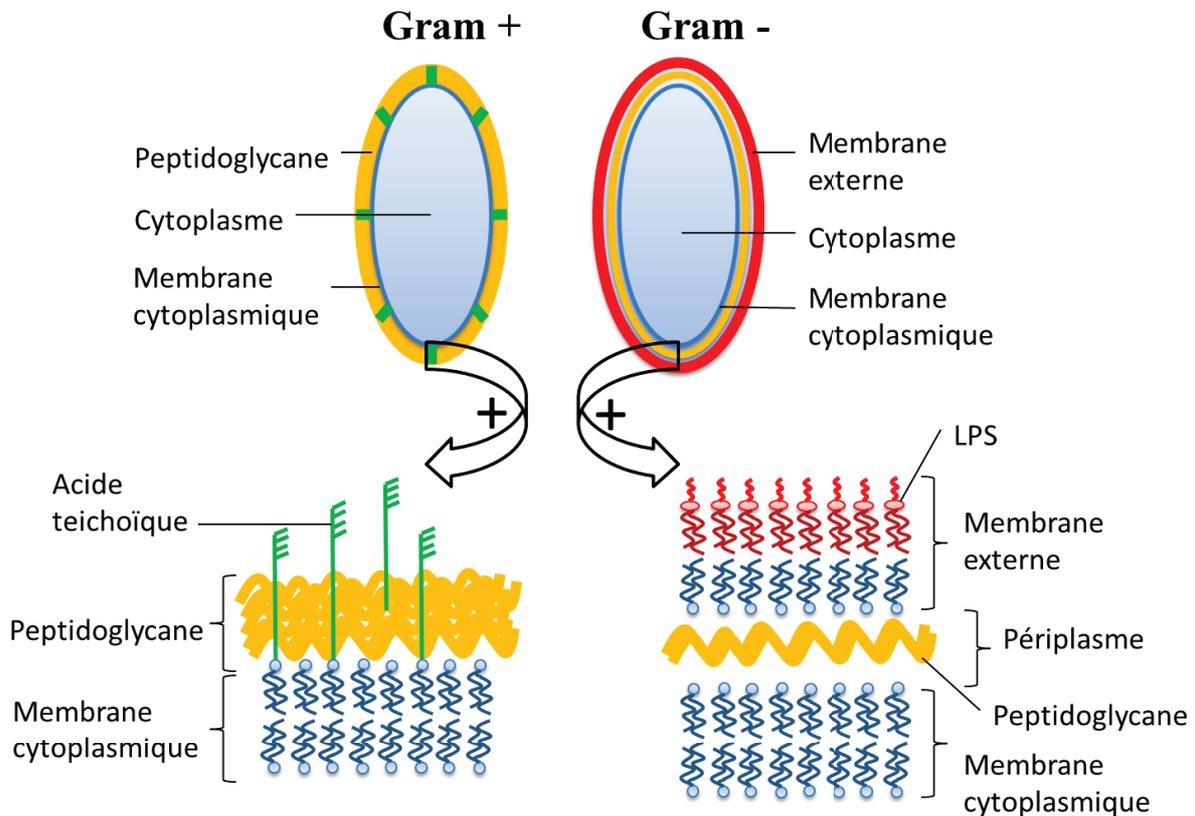


FIGURE II-1 : STRUCTURE DE LA PAROI DES BACTÉRIES GRAM+ ET GRAM- : LES BACTÉRIES À GRAM+ POSSÈDENT UNE PAROI CONSTITUÉE D'UNE ÉPAISSE COUCHE DE PEPTIDOGLYCANE, ALORS QUE LES BACTÉRIES À GRAM- PRÉSENTENT UNE FINE COUCHE DE PEPTIDOGLYCANE LOCALISÉE DANS LE PÉRIPLASME ENTRE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE ET LA MEMBRANE EXTERNE. D'APRÈS LEBLEU, 2007.

2. BIOFILMS

Dans la nature, les bactéries sont souvent organisées sous la forme de colonies, appelées biofilms. Grâce à la synthèse des EPS qui forment une matrice qui englobe leurs cellules, la communauté est adsorbée sur un substrat et se protège des conditions de stress extérieures. Les bactéries peuvent être 500 fois plus résistantes aux agents antibactériens sous forme de biofilms que les bactéries planctoniques [Costerton *et al.*, 1995]. Des communications sont échangées entre les cellules du biofilm afin de coordonner leur développement et d'assurer leur défense.

Pour qu'un biofilm se développe, il faut d'abord qu'un microorganisme se fixe sur le substrat (Figure II-2), grâce aux adhésines et à des appendices cellulaires, des pilis ou des flagelles [Monds and O'Toole, 2009; Ploux *et al.*, 2007]. Plusieurs bactéries adhèrent ainsi au substrat ou s'accrochent aux autres bactéries. Lorsqu'un nombre significatif d'organismes sont solidement fixés, la sécrétion du biofilm commence, c'est-à-dire la fabrication des EPS, dans lesquelles les bactéries fixées vont se reproduire et former des colonies imbriquées [Flemming *et al.*, 2007 ; Evans, 2003]. À mesure que le biofilm s'épaissit et vieillit, certaines parties sont dispersées dans le milieu liquide. Des bactéries redeviennent planctoniques avant de s'installer ailleurs ou de disparaître.

Les bactéries du biofilm sont capables de communiquer entre-elles. Le mécanisme de « *quorum sensing* » (QS) a été découvert dans les années 1960. Il ne nécessite pas de contact physique entre les bactéries et il repose sur la synthèse d'inducteurs chimiques [Javid and Derbyshire, 2011].

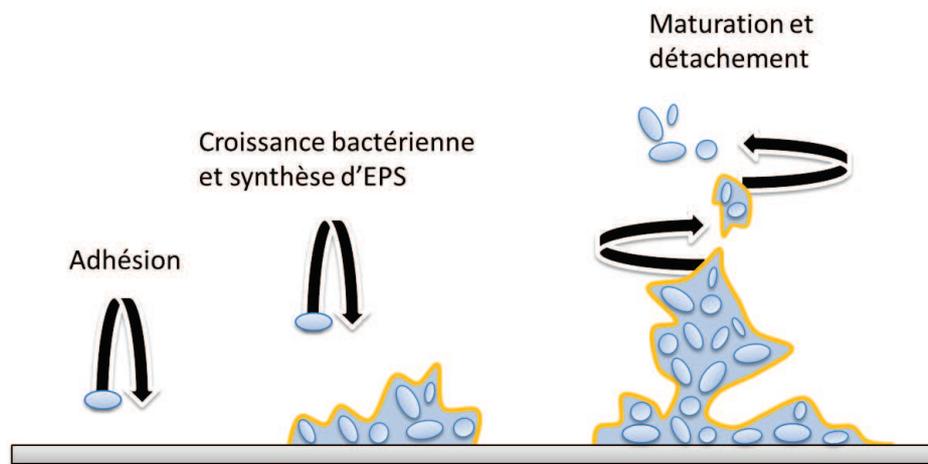


FIGURE II-2 : LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA FORMATION D'UN BIOFILM (D'APRÈS PLOUX *ET AL.*, 2007).

Une forme de communication par contact direct a été découverte en 2011 [Dubey and Ben-Yehuda, 2011]. C'est une forme de communication par transfert de cytoplasme via des nanotubes, qui sont des sortes de ponts microscopiques qui relient deux bactéries [Abounit and Zurzolo, 2012; Javid and Derbyshire, 2011].

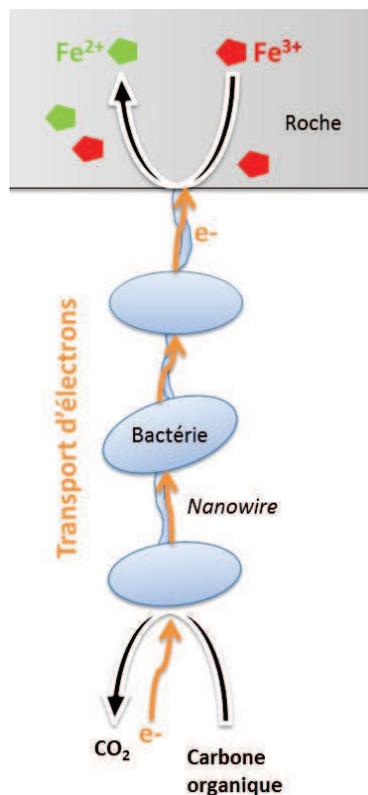


FIGURE II-3 : SCHÉMA SIMPLIFIÉ ILLUSTRANT LE MOUVEMENT DES ÉLECTRONS À TRAVERS UNE CHAÎNE DE BACTÉRIES RELIÉES PAR DES *NANOWIRES* (D'APRÈS REVIL *ET AL.*, 2012).

Des transferts d'électrons peuvent également avoir lieu dans d'autres « ponts » intercellulaires, les nano-filaments (*nanowires* en anglais) [Reguera *et al.*, 2005]. Ces nano-filaments peuvent s'accrocher à un accepteur d'électrons, du Fe(III) par exemple, et y décharger des électrons (Figure II-3). Le fer est alors réduit. Cela signifie qu'il y a une circulation d'électrons, donc création d'un courant électrique. De plus, les bactéries ne s'accrochent pas seulement aux roches, elles peuvent aussi se connecter électriquement entre-elles [Nielsen *et al.*, 2010 ; Nealson, 2010 ; Ball, 2007 ; Hill *et al.*, 2007 ; Ntarlagiannis *et al.*, 2007].

La fixation à la surface minérale des bactéries et la formation d'un réseau relié par des filaments a tendance à réduire la taille des pores et augmenter la cimentation des grains. Il a été montré que la croissance de biofilms réduisait significativement la porosité et la perméabilité du milieu poreux [Dunsmore *et al.*, 2004].

3. MÉTABOLISMES ET BIODÉGRADATION

Le métabolisme des bactéries est l'ensemble des réactions chimiques qui leur permettent de produire de l'énergie et de la biomasse. Les réactions du catabolisme (dégradation des molécules) s'accompagnent de la libération d'ATP (Adénosine Tri Phosphate), qui est la forme de stockage de l'énergie dans la cellule. Les réactions d'anabolisme (biosynthèse de molécules) consomment cet ATP et des nutriments externes (riches en N, P, K, ...) pour la production de polymères ou de macromolécules.

Pendant la biodégradation, les micro-organismes vont utiliser les polluants pour produire cette énergie. Les polluants sont catabolisés : il y a une oxydation d'un donneur d'électrons (les hydrocarbures) et une réduction d'un oxydant ou accepteur d'électrons (composés oxydants tels que l'oxygène, les nitrates, les sulfates...). En général, la quantité d'accepteurs d'électrons est le facteur limitant pour la biodégradation.

La disponibilité de l'azote (N) et du phosphore (P) est aussi un facteur limitant de la dégradation des hydrocarbures. La fuite d'hydrocarbures dans un milieu qui contient de faibles concentrations en nutriments inorganiques peut engendrer de forts rapports C/N ou C/P, qui ne sont pas favorables à la croissance bactérienne. Les nutriments peuvent être ajoutés sous forme de fertilisants (NH₄NO₃, KH₂PO₄...) pour stimuler la biodégradation [Leahy and Colwell, 1990].

Deux sortes de dégradations biologiques se distinguent suivant le type d'accepteur d'électrons :

- Les dégradations aérobies : l'accepteur final d'électrons est l'oxygène (respiration),
- Les dégradations anaérobies : l'accepteur final d'électrons est un composé autre que l'oxygène : nitrates (dénitrification), manganèse (réduction du manganèse), fer ferrique (réduction du fer), sulfate (réduction des sulfates ou sulfatoréduction), dioxyde de carbone (méthanogénèse).

La première phase de dégradation des hydrocarbures par des bactéries ou des champignons implique l'oxydation des molécules par des oxygénases, ce qui nécessite de l'oxygène comme accepteur d'électrons [Cao *et al.*, 2009; Leahy and Colwell, 1990]. Par exemple, la ring dioxygénase, la méthyl monooxygénase ou la ring monooxygénase responsables du clivage du toluène chez différentes bactéries [Morasch *et al.*, 2002]. Des conditions aérobies sont donc indispensables à l'oxydation des hydrocarbures dans l'environnement.

L'oxydation produit de l'acétyl-CoA [Sabirowa *et al.*, 2006]. Ce dernier est alors transformé en énergie et en carbone dans le cycle de Krebs (cycle permettant la transformation de l'acétyl-CoA en carbone et ATP).

La biodégradation complète d'un hydrocarbure en CO₂ et H₂O est possible, mais souvent une souche bactérienne possède les enzymes nécessaires à quelques étapes de dégradation du composé, mais pas toutes les enzymes requises. Il peut donc y avoir accumulation de métabolites. En revanche, au sein d'une communauté microbienne, il peut y avoir une succession de microorganismes qui vont intervenir pour dégrader la molécule de départ jusqu'en CO₂ et H₂O. La réaction peut se résumer comme suit : $2HC + 5O_2 \rightarrow 2CO_2 + H_2O + \text{énergie}$.

C. TECHNIQUES DE MONITORING

1. UTILISATION DE PUIITS DE SURVEILLANCE

Jusqu'à présent, les méthodes de surveillance de la biodégradation sont basées sur la mise en place de puits d'observation. A travers ces puits, plus ou moins nombreux et répartis sur tout le site, la lithologie du sous-sol au moment du forage peut être caractérisée, et la concentration des contaminants ou le taux d'oxygène dissous, par exemple, peuvent être mesurés directement à partir d'échantillons d'eau. Ces points de mesure sont discrets. Des cartes d'interpolation des données peuvent néanmoins être construites pour caractériser l'ensemble de l'aquifère : identifier la zone source de la pollution, délimiter le panache et les zones en cours de biodégradation. La résolution de ces interpolations dépend évidemment du nombre de forages, de leur distribution et du nombre d'échantillons analysés, ce qui multiplie d'autant les coûts.

La forte hétérogénéité des aquifères rend ce genre de monitoring inadéquat. Il y a souvent des effets pépites (singularités locales), ce qui augmente l'incertitude des interpolations. De plus, les échantillons souterrains sont mis en contact direct avec l'atmosphère, ce qui peut biaiser les résultats.

Certaines technologies essayent de pallier ces problèmes. Des capteurs comme les PID (détecteurs à photo ionisation) mesurent les composés organiques volatils (COV) et autres gaz directement sur le terrain. Les méthodes « passe-direct » ou *Direct-Push* en anglais [ITRC, 2006] peuvent aussi être mentionnées ici. Des barres en acier sont équipées avec les électrodes de surveillance et sont directement plantées dans le sol meuble, évitant ainsi le forage de puits traditionnel qu'on doit tuber avant d'y insérer les sondes. La qualité des données est comparable à celle obtenue dans des puits classiques. Cependant, ces méthodes ne sont pas applicables sur tous les sites et cela reste coûteux car le maillage doit couvrir une surface assez importante.

Des modèles hydrogéologiques de l'aquifère réalisés à partir des données de puits peuvent permettre d'améliorer le suivi de la dépollution. Mais, faute de disposer d'informations suffisantes sur l'hétérogénéité et pour éviter de manipuler des modèles 3D souvent lourds, les modèles 2D de la dispersion du polluant sont limités.

Ainsi, les procédés biologiques mis en œuvre actuellement s'appuient plus sur le retour d'expériences des industriels, qui reste difficilement transposable d'un site à l'autre, que sur des données mesurées.

2. UTILISATION DES MÉTHODES ÉLECTRIQUES EN GÉOPHYSIQUE ENVIRONNEMENTALE

Une autre approche de la surveillance de la biodégradation est basée sur les méthodes géophysiques. Elles permettent de mesurer des propriétés physiques du sol (mécanique, électrique, magnétique...) ; elles sont non destructrices et elles peuvent être appliquées à grande échelle, sur de larges surfaces. Les méthodes électriques (tomographie de la résistivité électrique ERT, mesure du potentiel spontané PS, polarisation provoquée PP) sont les plus souvent utilisées en géophysique environnementale et elles peuvent être combinées à d'autres techniques pour augmenter le nombre d'informations obtenues et leur fiabilité : sismique, radar (*Ground Penetrating Radar* GPR) par exemple. A partir de ces mesures, les propriétés hydrologiques de l'aquifère (porosité, perméabilité, saturation en eau, conductivité de l'eau...) peuvent être déterminées [Ogilvy et al., 2009 ; Garambois et al., 2002 ; Slater and Reeve, 2002] ; un panache de pollution aux hydrocarbures peut être localisé [Flores Orozco et al., 2012 ; Lago et al., 2009 ; Sogade et al., 2006 ; Vanhala, 1997 ; Olhoeft, 1986 ; Towle et al., 1985] ; une biodégradation d'hydrocarbures peut être suivie [Arato et al., 2013 ; Forté and Bentley, 2013 ; Chambers et al., 2010 ; Wilkinson et al., 2010 ; Che-Alota et al., 2009 ; Lane et al., 2006 ; Atekwana et al., 2004 ; Sauck, 2000] ou encore, la recirculation de lixiviats dans une décharge peut être surveillée [Hubé et al., 2010 ; Grellier et al., 2008 ; Arora et al., 2007 ; Bernstone et al., 2000 ; Carpenter et al., 1991] .

La méthode électrique de polarisation provoquée en particulier a été très étudiée en laboratoire et sur le terrain et elle a montré son efficacité pour le suivi de milieux affectés par une activité bactérienne. Le métabolisme des microorganismes induit des modifications des propriétés physico-chimiques du sol (chimie des eaux, potentiel redox, porosité et perméabilité,..), ce qui entraîne des changements des propriétés électriques du milieu (résistivité, polarisation aux interfaces...) [Abdel Aal and Atekwana, 2014 ; Mewafy et al., 2013 ; Atekwana and Atekwana, 2010 ; Abdel Aal et al., 2006, 2004].

3. POTENTIEL DU SUIVI DE L'ISOTOPIE DU CO₂ COMME OUTIL DE MONITORING

Aujourd'hui, la biodégradation est contrôlée par le suivi de la décroissance de la concentration en polluant. Cependant, la diminution de la concentration d'une espèce dans le sol peut être due à plusieurs causes : la dilution, la volatilisation, l'absorption ou la biodégradation. Il n'y a que cette dernière qui conduit à une réduction durable de la quantité de pollution [Richnow et al., 2002].

L'analyse de la composition isotopique de chaque polluant organique (*Compound-Specific Isotope Analysis* CSIA) représente une méthode novatrice pour obtenir des indications supplémentaires et tangibles sur des processus de dégradation *in situ*. Les composés organiques ont généralement des compositions isotopiques en carbone ($\delta^{13}\text{C}$) et hydrogène ($\delta^2\text{D}$) caractéristiques de leurs sources d'émission. Il a été montré que les BTEX [Dempster et al., 1997] et les solvants chlorés [Beneteau et al., 1999] de différentes origines pouvaient être discriminés sur la base de leurs $\delta^{13}\text{C}$. L'analyse isotopique s'avère être également un outil d'identification et de quantification des processus de la biodégradation. En effet, les microorganismes dégradent préférentiellement les molécules les plus légères d'un même composé au détriment des fractions lourdes. Les fractions résiduelles s'enrichissent donc progressivement en fractions lourdes, c'est-à-dire les molécules possédant les isotopes les plus lourds. Les études de fractionnement isotopique concernent essentiellement les couples $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau, des composés hydrocarbonés et des produits de dégradation (métabolites, CH₄, CO, CO₂, etc.). Ce fractionnement isotopique a été clairement démontré par de nombreux auteurs [Morasch et al., 2011 ; Elsner, 2010 ; Meckenstock et al., 2004 ; Numata et al., 2002 ; Hunkeler et al., 2001, 1999 ; Bloom et al., 2000 ; Sherwood Lollar et al., 1999]. Le fractionnement isotopique a été observé en conditions aérobies et anaérobies. Dans le cas des processus de dilution ou d'absorption, le fractionnement n'est pas significatif [Richnow et al., 2002].

La plupart des articles publiés à ce jour concernent l'étude des polluants résiduels dans les eaux. Cependant, certaines études traitent des analyses sur les gaz émis pendant la biodégradation, ce qui permettrait de s'affranchir de puits de prélèvement [Bugna et al., 2004 ; Hall et al., 1999 ; Jackson and Pardue, 1999 ; Aggarwal et al., 1997 ; Aggarwal and Hinchee, 1991].

III. POLARISATION PROVOQUÉE

La polarisation provoquée est une méthode géophysique qui s'intéresse aux mécanismes de polarisation basse-fréquence dans les matériaux terrestres associés au stockage réversible de charges électriques [Revil *et al.*, 2012]. Le terme de « Polarisation Provoquée » (PP) en français est la traduction de « *Induced Polarization* » (IP) utilisé en anglais. L'expression « Polarisation Induite » peut aussi être trouvée. Lorsque la méthode est utilisée dans le domaine fréquentiel, elle est appelée « Polarisation Induite Spectrale » ou « *Spectral Induced Polarization* » (SIP). Cela correspond à la méthode de « Résistivité Complexe » qui est retrouvée en électrochimie sous le nom de « Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (SIE) » [Barsoukov and Macdonald, 2005].

A. HISTORIQUE¹

Conrad Schlumberger a probablement été le premier à parler du phénomène de « polarisation provoquée » (PP) après des observations de terrain faites sur un site minier en France en 1913 [Seigel *et al.*, 2007]. Alors qu'il réalisait des mesures de résistivité électrique sur un gisement métallifère très conducteur, il a remarqué que la différence de potentiel, mesurée entre deux électrodes, ne revenait pas toujours instantanément à zéro lorsque le courant était coupé. Le potentiel décroissait progressivement vers zéro, en un certain laps de temps. Schlumberger a attribué ce phénomène à une polarisation du sous-sol : certaines couches dans le sol peuvent être polarisées, formant des condensateurs électriques énergisés par le passage d'un courant électrique. Une fois que le courant est coupé, le sol se décharge progressivement de toute l'énergie qui a été stockée.

Schlumberger a introduit cette technique en URSS en 1929, pour la recherche pétrolière en puits. Elle a ensuite intéressé les Américains pour détecter les mines enterrées sur les plages du Débarquement en 1942 [Reynolds, 1997]. Les connaissances ainsi développées dans le domaine militaire ont été utilisées après-guerre pour l'exploration minière aux Etats-Unis.

Bleil (1953) a fait des travaux de laboratoire qui expliquent l'origine physique des phénomènes observés sur les sites miniers. Un potentiel de polarisation peut être mesuré à la surface d'un objet métallique ou de particules métalliques disséminées plongés dans un électrolyte. En effet, au niveau de la frontière électrolyte/particule métallique, il y a un changement dans le mode de conduction du courant (ionique vers électronique). Les ions sont bloqués à la surface de la particule métallique ce qui provoque une accumulation de charges électriques à l'interface. Elle se relaxe lorsque le courant est arrêté. Il en a déduit que la meilleure application de la méthode était la prospection de minerais.

La polarisation induite a donc été utilisée très tôt pour la détection des gisements métallifères dans le sous-sol, mais aussi pour la prospection d'eau souterraine [Vacquier *et al.*, 1957]. Une deuxième origine du phénomène a ainsi été mise en évidence : une polarisation peut être mesurée en présence d'argiles. Les argiles sont comparées à des membranes utilisées en électrodialyse (transfert d'ions à travers une membrane qui leur est perméable sous l'effet d'un champ électrique). En effet, les argiles chargées négativement attirent les ions positifs, produisant un nuage de charges positives autour de la particule d'argile. Quand un courant est appliqué, les charges positives peuvent bouger entre ces nuages de charges positives mais les charges négatives sont bloquées, ce qui entraîne un gradient de concentration en ions.

Jusqu'en 1950, toutes les mesures PP concernent le domaine temporel. En 1950, Seigel montre que la résistivité d'un échantillon de roche contenant des sulfures diminue lorsque la fréquence augmente. La méthode en domaine fréquentiel a été étudiée théoriquement par Wait (1959), mais pas expérimentalement car l'équipement disponible à l'époque n'était pas encore adapté [Okay, 2011 ; Ghorbani, 2007].

¹ L'historique présenté dans cette section est largement inspiré de la thèse de Okay, G. (2011), Caractérisation des hétérogénéités texturales et hydriques des géomatériaux argileux par la méthode de Polarisation Provoquée : Application à l'EDZ de la station expérimentale de Tournemire, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6).

Marshall et Madden (1959) proposent les premiers modèles sur les deux origines de la polarisation provoquée : la polarisation d'électrode liée à la présence de minerais métalliques disséminés, et la polarisation de membrane liée à la présence d'argiles. La dépendance en fréquence de la conductivité électrique a aussi été décrite sous la forme de circuits équivalents de type RC [Keevil and Ward, 1962], avec l'introduction de notions électrochimiques comme l'impédance de Warburg [Angoran and Madden, 1977 ; Madden and Cantwell, 1967].

Dans les années 1970-80, il y a eu des avancées dans l'instrumentation [Zonge and Hughes, 1980 ; Van Voorhis et al., 1973 ; Zonge et al., 1972] et dans l'interprétation des données, en particulier sur la question du couplage électromagnétique dans le domaine fréquentiel [Pelton et al., 1978 ; Wynn and Zonge, 1975]. Wong (1979) propose un modèle électrochimique pour expliquer la polarisation des sulfures disséminés.

Les domaines d'application de la PP s'étendent à la prospection pétrolière et à des applications environnementales [Vinegar and Waxman, 1982]. La détection des hydrocarbures par résistivité complexe est abordée par Olhoeft (1986) et des études de sites contaminés apparaissent [Sauck, 2000 ; Vanhala, 1997 ; Vanhala et al., 1992]. D'autres domaines d'applications concernent l'hydrogéologie [Weller and Börner, 1996], la géothermie [Ward and Sill, 1982; Zohdy et al., 1973] et l'archéologie [Schleifer et al., 2002; Weller et al., 2000].

B. RAPPELS SUR LES MESURES DE RÉSISTIVITÉ ÉLECTRIQUE

Les mesures de résistivité complexe sont faites à partir des mêmes dispositifs que ceux utilisés pour les mesures de résistivité classique.

1. DÉFINITIONS

La résistance électrique R est définie par la loi d'Ohm en mesurant la différence de potentiel ΔV induite entre deux points d'un matériau par la circulation d'un courant électrique d'intensité I entre ces deux points :

$$R = \frac{\Delta V}{I} \quad \text{ÉQUATION III-1}$$

La résistance est exprimée en ohms [Ω], l'intensité du courant électrique en ampères [A] et la différence de potentiel en volts [V].

La résistivité électrique ρ [$\Omega \cdot m$] d'une roche est la propriété physique intrinsèque qui détermine la capacité de cette roche à s'opposer au passage d'un courant électrique. La résistivité d'un cylindre isotrope et homogène, de longueur et de section unitaire, est donné par :

$$\rho = \frac{RA}{L} \quad \text{ÉQUATION III-2}$$

A est l'aire de la section transversale [m^2] et L est la distance de séparation entre ces deux sections [m]. La résistivité électrique est une propriété intrinsèque du matériau et elle ne dépend donc pas de la dimension des sections et de leur distance de séparation.

La conductivité électrique σ [S/m] est l'inverse de la résistivité.

De toutes les propriétés physiques des roches, la résistivité électrique est celle qui présente les plus grandes variations. En effet, la résistivité varie entre $10^{-5} \Omega \cdot m$ pour des sulfures métalliques et $10^8 \Omega \cdot m$ pour certains marbres [Reynolds, 1997]. Pour des sédiments non consolidés comme les sables et graviers, la résistivité varie entre 20 et 500 $\Omega \cdot m$.

Les matériaux isotropes possèdent la même résistivité électrique dans toutes les directions. Mais en général le matériau est hétérogène et anisotrope, le terme de résistivité apparente ρ_a est alors employé. Il s'agit d'une pondération de toutes les valeurs de résistivité vraie pour chaque composante du milieu.

2. DÉPENDANCE DE LA RÉSISTIVITÉ ÉLECTRIQUE À CERTAINS PARAMÈTRES

Le sol est constitué de plusieurs phases : la phase minérale et l'espace poral où circule des fluides ou du gaz. La plupart des minéraux sont des isolants (excepté les minéraux métalliques) et ont une résistivité très élevée. La résistivité du sol est donc due en grande partie à la porosité, au degré de saturation de cette porosité et à la conductivité du fluide poral. Mais aussi, à la température, à la granulométrie et à la présence d'argiles.

a) CONDUCTIVITÉ DE L'EAU INTERSTITIELLE ET TRANSPORT DE CHARGES

L'eau interstitielle du milieu poreux est salée et capable de conduire le courant électrique. Les ions sont des porteurs de charge et permettent la conduction électrolytique. Ils se déplacent sous l'effet d'un champ électrique, ce qui crée un courant électrique. Plus il y a d'ions présents en solution dans les pores, plus grande sera la charge électrique.

La conductivité électrique d'un électrolyte dépend non seulement de la quantité d'ions présents dans l'eau, mais également de la viscosité de l'eau qui affecte la vitesse de déplacement des ions dans l'eau. La mobilité ionique μ_i représente la capacité de l'ion à se mettre en mouvement lorsque l'on applique un champ électrique E :

$$v_i = \mu_i E \quad \text{ÉQUATION III-3}$$

avec v_i la vitesse [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$], E [$\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$] et μ_i [$\text{m}^2\cdot\mu\text{i}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$].

La conductivité de l'eau interstitielle est la somme de la contribution de chaque ion (loi de Kohlrausch) :

$$\sigma_w = F \sum_i C_i |n_i| \mu_i \quad \text{ÉQUATION III-4}$$

avec C_i , la concentration de l'ion i [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$], n_i sa charge et μ_i sa mobilité. F est la constante de Faraday ($F = 9.65 \cdot 10^4 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$).

b) TEMPÉRATURE

La résistivité électrique du sol dépend aussi de la température qui contrôle la mobilité ionique :

$$\rho_t = \frac{\rho_{18}}{1 + 0.025(t - 18)} \quad \text{ÉQUATION III-5}$$

avec ρ_t la résistivité à une température t donnée [$^{\circ}\text{C}$], soit une diminution de 2,5 % par degré Celsius [*Grellier et al.*, 2006].

La dépendance de la résistivité électrique d'un matériau avec la température diffère selon que les températures se situent au-dessus ou en dessous du point de congélation. Pour les températures au-dessus du point de congélation, la résistivité électrique varie en fonction de la conductivité électrique de l'électrolyte qui dépend de la température et de la viscosité de l'eau. En général, sous le point de congélation, l'eau interstitielle passe à l'état solide et se transforme en glace. Cependant, en fonction du type de sédiment, ce n'est pas toute l'eau interstitielle qui devient de la glace sous 0°C . Un certain pourcentage plus ou moins important peut demeurer sous la forme liquide. La glace peut être considérée comme un isolant puisque sa résistivité électrique est très élevée. La formation de la glace dans les pores diminue leur volume, réduit la teneur en eau non gelée et la conductivité électrolytique.

Ainsi, le gel augmente la résistivité des roches : une roche gelée est infiniment résistante. Dans les pays de permafrost, il est donc impossible de mettre en œuvre les méthodes de résistivité. C'est pourquoi les méthodes électromagnétiques (EM) ont été développées comme alternative dans ces régions.

c) SATURATION EN EAU

Un aquifère est composé d'une zone saturée (ZS), c'est-à-dire où tous les pores sont remplis d'eau et, au-dessus, d'une zone non-saturée (ZNS) ou zone vadose. Dans la ZNS, les pores sont remplis par de l'eau ou de l'air. La quantité d'eau est mesurée par la saturation S_w , définie par le rapport entre le volume d'eau V_w et le volume des pores V_p :

$$S_w = \frac{V_w}{V_p} \quad \text{ÉQUATION III-6}$$

La circulation du courant s'effectue au travers de l'électrolyte plus ou moins conducteur qui est présent dans les pores. Il ne peut pas circuler dans les particules isolantes du matériau. Par conséquent, plus le contenu en eau est élevé, plus les ions peuvent circuler facilement dans le milieu et plus la résistivité électrique est faible.

d) POROSITÉ

La porosité, Φ , est définie comme le rapport du volume des vides V_p sur le volume total V_T :

$$\Phi = \frac{V_p}{V_T} \quad \text{ÉQUATION III-7}$$

Elle dépend de la forme, de l'agencement des grains, de leur degré de classement, de compaction, de cimentation et de la fracturation.

Dans les sédiments mal classés, l'espace entre les grains de grand diamètre est rempli de grains plus petits qui diminuent ainsi la porosité. Par exemple, la porosité des argiles (50-70 %) est plus élevée que la porosité du sable (20-40 %). De même, les sables (gros grains) qui contiennent une faible teneur en argile (petits grains) voient leur porosité diminuer.

La fracturation et l'altération par dissolution des niveaux rocheux peuvent être des facteurs favorables au développement de la porosité.

La résistivité électrique augmente avec la diminution de la porosité. En effet, lorsque la porosité diminue, la taille des grains du matériau ainsi que la taille des pores diminuent aussi et la longueur des capillaires qui relient les pores augmente. La longueur effective L du trajet parcouru par le courant électrique est ainsi augmentée et la section transversale effective A est diminuée, puisque les pores sont d'une taille plus petite. D'après l'Équation III-2, puisque la résistance électrique est directement proportionnelle à la longueur du trajet suivi par le courant et inversement proportionnelle à la section transversale à la circulation du courant, la diminution de la porosité augmente donc la résistance et la résistivité électriques.

e) LA LOI D'ARCHIE

Dans le cas d'une roche saturée en eau, Archie (1942) a établi une relation expérimentale liant la résistivité de la roche à la porosité et à la résistivité de l'eau d'imbibition et à son mode de distribution :

$$\rho_r = \rho_w a \Phi^{-m} \quad \text{ÉQUATION III-8}$$

avec ρ_w la résistivité de l'eau d'imbibition, Φ la porosité, a un facteur qui dépend de la lithologie et qui varie entre 0,6 et 2 ($a < 1$ pour les roches à porosité intergranulaire et $a > 1$ pour les roches à porosité de fracture) et m le facteur de cimentation (il dépend de la forme des pores, de la compaction et varie entre 1,3 pour les sables non consolidés et 2,2 pour les calcaires cimentés).

Les paramètres a et m peuvent être déterminés précisément en laboratoire.

On a l'habitude de regrouper les paramètres liés à la roche sous le terme de facteur de formation F :

$$F = a \Phi^{-m} \quad \text{ÉQUATION III-9}$$

La loi d'Archie est généralisée en milieu non saturé en eau. La saturation en eau S_w est ainsi introduite :

$$\rho = \rho_w \Phi^{-m} S_w^{-n} \quad \text{ÉQUATION III-10}$$

avec $m \in [1,3 ; 2,2]$ (exposant de cimentation) et $n \in [1,7 ; 2,2]$ (exposant de saturation).

f) PRÉSENCE D'ARGILES

Lorsque de l'argile est présente dans un matériau, la loi empirique d'Archie (Équation III-10) ne s'applique plus. En effet, en plus de la conduction électrolytique, il y a de la conductivité électrique dite colloïdale. L'argile possède une structure composée de feuillets microscopiques. Cette structure présente des imperfections et la surface des feuillets est ainsi chargée négativement. Des cations peuvent alors être adsorbés sur les faces des feuillets d'argile, bien qu'ils soient peu liés et libres de se déplacer. Lorsque l'argile se retrouve en présence d'eau, les ions qui sont contenus dans l'eau peuvent être échangés avec les cations peu liés à l'argile. Le courant électrique peut donc passer librement à la surface de l'argile et la résistivité électrique est alors très faible. Par ailleurs, une argile complètement sèche possède une faible conductivité électrique car les échanges ioniques sont presque impossibles en absence d'eau. Tous les matériaux qui contiennent une certaine quantité d'argile possèdent une conductivité électrique plus élevée qu'en son absence [Vinigar and Waxman, 1984 ; Waxman and Smits, 1968] (cf. Annexe 2).

3. DISPOSITIFS DE MESURE

Les méthodes de résistivité électrique consistent à faire circuler un courant électrique dans le sol entre deux électrodes de courant et de mesurer la différence de potentiel induite entre deux autres électrodes, appelées électrodes de potentiel (Figure III-1). Puisque l'intensité du courant est connue et que la différence de potentiel est mesurée, il est alors possible de déterminer quelle est la résistivité apparente du sol étudié. Cette résistivité électrique apparente dépend de la configuration des électrodes de courant et de potentiel. La résistivité apparente ρ_a peut être exprimée en fonction de la différence de potentiel et de l'intensité du courant :

$$\rho_a = k \frac{\Delta V}{I} \quad \text{ÉQUATION III-11}$$

où k est appelé le facteur géométrique qui dépend de la configuration des électrodes.

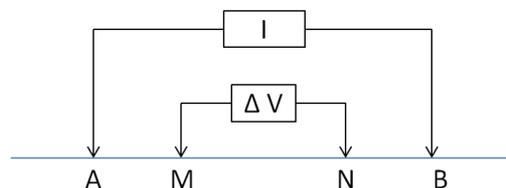


FIGURE III-1 : EXEMPLE DE CONFIGURATION D'UN DISPOSITIF ÉLECTRIQUE. A ET B SONT LES ÉLECTRODES D'INJECTION (DE COURANT) ET M ET N SONT LES ÉLECTRODES DE MESURE (DE POTENTIEL).

Si A et B sont les électrodes de courant et M et N les électrodes de potentiel, posées à la surface du sol, alors k peut être calculé en fonction des distances entre électrodes :

$$k = \frac{2\pi}{\frac{1}{AM} - \frac{1}{AN} - \frac{1}{BM} + \frac{1}{BN}} \quad \text{ÉQUATION III-12}$$

La tomographie de résistivité électrique consiste à déterminer les variations de résistivité verticales et horizontales d'un milieu. En maintenant constante la configuration des électrodes et en la déplaçant le long d'une ligne, il est possible de déterminer la résistivité apparente à une profondeur donnée en fonction de la distance parcourue le long de cette ligne.

La profondeur d'investigation du sondage dépend de l'écartement des électrodes : plus elles sont éloignées, plus les lignes de courant pénétreront profondément. Inversement, la résolution diminuera avec l'écartement des électrodes.

Les données sont représentées à l'aide d'un graphique des lignes d'iso-résistivité électrique apparente en fonction de la distance le long de la ligne et de la longueur totale de la configuration. Ce graphique est appelé pseudo-section de résistivité apparente. Les pseudo-sections conduisent à une représentation en coupe simplifiée des mesures directes de résistivité électrique du milieu étudié. Il est, par conséquent, nécessaire de procéder à l'inversion des pseudo-sections pour obtenir un modèle synthétique de résistivité électrique vraie ou inversée.

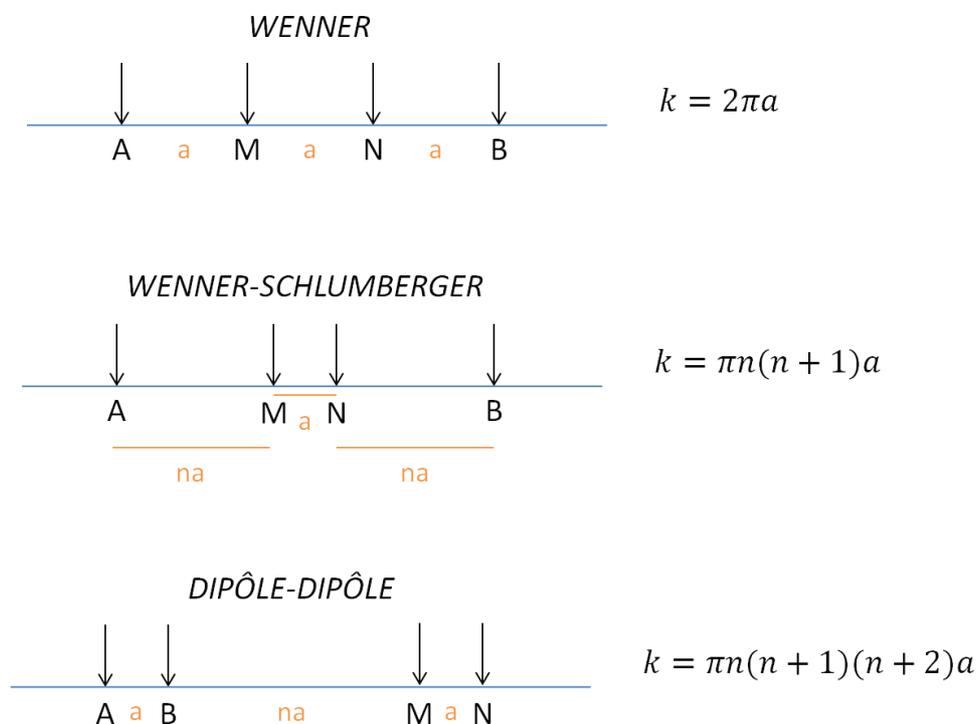


FIGURE III-2 : DISPOSITIFS D'ACQUISITION ÉLECTRIQUE LES PLUS RÉPANDUS.

Les dispositifs d'acquisition comptent un grand nombre d'électrodes qui sont tour à tour des électrodes d'injection ou de courant, selon les besoins de l'acquisition [Ward and Sill, 1982]. Les combinaisons Wenner-Schlumberger et Dipôle-Dipôle sont les plus populaires (Figure III-2).

4. CONCEPT D'INVERSION

Lorsque le milieu est homogène, la résistivité électrique mesurée est la résistivité vraie et elle peut être interprétée directement. Par contre, ce type de milieu est plutôt rare dans la nature. La pseudo-section ne peut donc pas être interprétée directement. De plus, elle dépend de la configuration des électrodes. À partir de la pseudo-section, seules des interprétations qualitatives peuvent être effectuées. Pour obtenir une mesure quantitative, il est nécessaire de procéder à une inversion.

Il est possible d'estimer d'avance quels résultats peuvent être attendus d'une tomographie électrique si la stratigraphie et les propriétés physiques du milieu sont connus. Cependant, lorsqu'un levé de résistivité est réalisé, le but consiste plutôt à obtenir le modèle synthétique de résistivité vraie étudié à partir de la pseudo-section de résistivité apparente. Ce processus s'appelle l'inversion.

L'inversion est une méthode itérative qui peut fournir un modèle de la résistivité vraie afin de placer les structures à une profondeur adéquate. Par contre, la solution mathématique de l'inversion n'est pas unique. Le modèle qui correspond le mieux n'est donc pas forcément le bon. Il est nécessaire de bien connaître le milieu étudié pour être en mesure d'optimiser le processus d'inversion en choisissant pertinemment les paramètres d'inversion. La présence de bruit dans le signal peut également influencer les résultats d'une inversion.

C. POLARISATION PROVOQUÉE

La polarisation provoquée (PP) est un phénomène qui se produit en présence de certains types de minéraux (principalement métalliques, mais aussi argileux) ou de contaminants organiques comme les hydrocarbures, et au cours de processus biochimiques. Elle est équivalente au comportement de charge et de décharge de condensateurs lorsqu'un courant est injecté puis interrompu. Lorsque les effets PP se manifestent, une décroissance du potentiel peut être observée au niveau des électrodes de réception MN (relaxation du potentiel), lorsque le courant est coupé (Figure III-3). Si on impose un courant sinusoïdal, un retard de phase est alors observé entre le potentiel en MN et le courant.

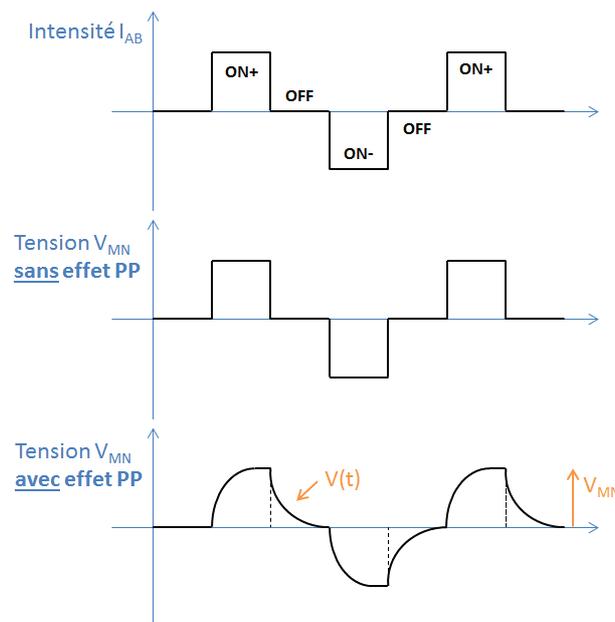


FIGURE III-3 : MANIFESTATION DE L'EFFET PP AU NIVEAU DE LA TENSION MESURÉE V_{MN} LORSQUE LE COURANT INJECTÉ I_{AB} EST INTÉRROMPU.

1. CONCEPT DE POLARISATION ET DE DÉPLACEMENT DIÉLECTRIQUE

a) MOUVEMENTS DE CHARGES : CONDUCTION ET POLARISATION

Les propriétés électriques et diélectriques décrivent la capacité des charges à se déplacer dans un milieu lorsqu'un champ électrique externe est appliqué. Deux types de mouvement sont distingués : celui des charges libres (conductivité électrique, électromigration) et celui des charges liées (permittivité diélectrique, mouvements de charges de petite amplitude) qui caractérise l'interaction d'isolants électriques avec un champ électrique.

Dans la plupart des roches, la conduction est essentiellement électrolytique comme cela a été présenté dans la partie III-B-2 de ce manuscrit. Elle dépend principalement de la quantité et de la salinité du fluide contenu dans le réseau poreux.

Un matériau se polarise sous l'effet d'un champ électrique externe si les charges liées (celles qui ne peuvent pas se déplacer librement dans la roche) se déplacent sur de courtes distances ou se réorientent [*Comparon, 2005*].

b) EQUATIONS GÉNÉRALES

Différentes propriétés électriques, souvent liées les unes aux autres, sont introduites ici [d'après *Ruffet, 1993*].

Tout milieu est à la fois conducteur et diélectrique. C'est ce que traduit l'équation de Maxwell, où la densité de courant \mathbf{J} [A/m²] parcourant le milieu est la somme des deux contributions :

$$\mathbf{J} = \mathbf{J}_c + \mathbf{J}_d \quad \text{ÉQUATION III-13}$$

Avec :

- \mathbf{J}_c la densité de courant de conduction, directement reliée par la loi d'Ohm au champ électrique \mathbf{E} [V/m] (en régime linéaire) :

$$\mathbf{J}_c = \sigma_c^* \mathbf{E} \quad \text{ÉQUATION III-14}$$

avec σ_c^* la conductivité électrique [S/m]. Elle est généralement complexe :

$$\sigma_c^* = \sigma_c' + i\sigma_c'' \quad \text{ÉQUATION III-15}$$

σ_c' représente la conductivité ohmique et σ_c'' la dissipation due à la vitesse finie de déplacement des porteurs de charges et aux différentes pertes par dispersion (réactions chimiques ou pertes thermiques).

- \mathbf{J}_d la densité de courant de déplacement, qui est la dérivée de l'induction électrique \mathbf{D} [C/m²] (équation de Maxwell). Dans le domaine temporel, elle s'écrit :

$$\mathbf{J}_d = \frac{d\mathbf{D}}{dt} \quad \text{ÉQUATION III-16}$$

Et dans le domaine fréquentiel,

$$\mathbf{J}_d = i\omega \mathbf{D} \quad \text{ÉQUATION III-17}$$

L'induction électrique est proportionnelle au champ électrique \mathbf{E} via la relation constitutive suivante :

$$\mathbf{D} = \varepsilon_d^* \mathbf{E} = \varepsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} \quad \text{ÉQUATION III-18}$$

avec ε_d^* la permittivité diélectrique [F/m], \mathbf{P} la polarisation du milieu (moment dipolaire par unité de volume [C/m²]) et ε_0 la permittivité diélectrique du vide. D'où,

$$\mathbf{J}_d = i\omega \varepsilon_d^* \mathbf{E} \quad \text{ÉQUATION III-19}$$

La permittivité diélectrique ε_d^* est également une grandeur complexe :

$$\varepsilon_d^* = \varepsilon_d' - i\varepsilon_d'' \quad \text{ÉQUATION III-20}$$

ε_d' représente le transfert d'énergie par les courants de déplacement et ε_d'' la perte d'énergie due au retard de la polarisation.

Finalement, comme la densité de courant totale \mathbf{J} est la somme de la densité de courant de conduction et de la densité de courant de déplacement :

$$\mathbf{J} = (\sigma_c^* + i\omega\varepsilon_d^*)\mathbf{E} = [(\sigma_c' + i\sigma_c'') + i\omega(\varepsilon_d' - i\varepsilon_d'')]\mathbf{E}$$

ÉQUATION III-21

$$\mathbf{J} = \left[(\sigma_c' + \omega\varepsilon_d'') + i\omega\left(\varepsilon_d' + \frac{\sigma_c''}{\omega}\right) \right] \mathbf{E}$$

En pratique, on mesure les parties réelles et imaginaires de la densité totale de courant. On introduit une conductivité électrique réelle effective et une permittivité diélectrique réelle effective qui permettent d'exprimer ces grandeurs :

$$\sigma_{eff}' = \sigma_c' + \omega\varepsilon_d'' \quad \text{ÉQUATION III-22}$$

$$\varepsilon_{eff}' = \varepsilon_d' + \frac{\sigma_c''}{\omega} \quad \text{ÉQUATION III-23}$$

La conductivité électrique réelle effective σ_{eff}' permet d'exprimer la partie de la densité de courant totale mesurée en phase avec le champ électrique \mathbf{E} , et la permittivité diélectrique réelle ε_{eff}' celle en quadrature avec le champ \mathbf{E} .

Dans le cas de la mesure de densité de courant complexe, on définit un coefficient complexe unique qui qualifie la relation de proportionnalité de \mathbf{J} et \mathbf{E} . Selon la convention adoptée, on peut parler en termes de conductivité effective complexe ou de permittivité diélectrique effective complexe :

$$\sigma_{eff}^* = \sigma_{eff}' + i\omega\varepsilon_{eff}'' = \left[(\sigma_c' + \omega\varepsilon_d'') + i\omega\left(\varepsilon_d' + \frac{\sigma_c''}{\omega}\right) \right] \quad \text{ÉQUATION III-24}$$

$$\varepsilon_{eff}^* = i\omega\sigma_{eff}^* = \varepsilon_{eff}' - i\frac{\sigma_{eff}''}{\omega} \quad \text{ÉQUATION III-25}$$

Remarque : En continu, la conductivité effective σ_{eff}^* se réduit à la conductivité vraie σ_c^* (*DC conductivity* en anglais).

La densité de courant total peut s'exprime alors par :

$$\mathbf{J} = \sigma_{eff}^*\mathbf{E} = i\omega\varepsilon_{eff}^*\mathbf{E} \quad \text{ÉQUATION III-26}$$

La conductivité électrique effective complexe et la permittivité diélectrique effective complexe dépendent de la fréquence. En fonction de la gamme de fréquences employée, l'un ou l'autre de ces paramètres sont utilisés : aux basses fréquences, on utilise souvent la conductivité électrique effective complexe (ou la résistivité électrique effective complexe), et aux hautes fréquences, on préfère la permittivité diélectrique effective complexe [Kessouri, 2012].

Finalement, on mesure les parties réelle et imaginaire de la densité totale de courant \mathbf{J} pour retrouver les quatre paramètres intrinsèques caractérisant le milieu étudié : σ_c' , σ_c'' , ε_d' et ε_d'' . En général, il n'est pas possible de séparer σ_c' et ε_d'' d'un côté et ε_c' et σ_d'' de l'autre.

Remarque : Par la suite, le terme « effectif » sera seulement sous-entendu. Comme l'étude développée dans ce manuscrit est consacrée aux phénomènes basses fréquences, on parlera de la conductivité (effective) électrique complexe ou la résistivité électrique (effective) complexe, notées plus simplement σ^* et ρ^* , respectivement.

c) DÉPENDANCE EN FRÉQUENCE

La polarisation totale est la contribution de plusieurs mécanismes distincts. Chaque phénomène physique ou chimique intervient dans une certaine gamme de fréquences et l'on peut faire des mesures de résistivité électrique sur un large spectre afin de retrouver ces phénomènes [Olhoef, 1985].

Les différents types de déplacement de charges et la gamme de fréquences associée ont été répertoriés par Gueguen et Palciauskas (1992), dans le domaine de fréquences 10^3 à 10^{15} Hz :

- Pour les fréquences supérieures à 4.10^{14} Hz, la polarisation est électronique. Elle correspond à la distorsion des couches électroniques d'un atome. Les électrons ont une masse très faible, ils peuvent donc osciller jusqu'à des fréquences très élevées.
- Entre 4.10^{11} et 4.10^{14} Hz, s'ajoute la polarisation atomique. Ce processus est lié au déplacement relatif des atomes d'une molécule les uns par rapport aux autres. La masse des atomes étant supérieure à celles des électrons, c'est un phénomène plus basse fréquence que la polarisation électronique.
- Entre 10^8 et 4.10^{11} Hz, intervient la polarisation dipolaire. Les molécules dipolaires, c'est-à-dire porteuses d'un moment électrique permanent (qui possèdent deux pôles, un positif, l'autre négatif, comme l'eau), vont s'orienter dans le sens du champ électrique appliqué. L'agitation thermique tendant à maintenir les molécules dans un état d'orientation aléatoire, ce processus est très dépendant de la température [Comparon, 2005].
- Aux fréquences inférieures à 10^5 , apparaît la polarisation d'interface (ou de Maxwell-Wagner), qui correspond à l'accumulation de charge aux interfaces. Elle a lieu lorsque des porteurs de charges migrent sous l'effet d'un champ électrique et se retrouvent piégés, ou limités dans leur mouvement. Si un milieu poreux est placé dans un champ électrique, les ions de charges contraires se déplacent dans des directions opposées et s'accumulent aux interfaces grains/fluide où ils restent bloqués.

Les processus de polarisation d'interface et de polarisation dipolaire sont des phénomènes de relaxation (existence d'un délai de réponse pour un système soumis à une excitation extérieure). Les processus de polarisation atomique et électronique sont plutôt des phénomènes de résonance [Comparon, 2005].

Remarque : D'autres types de polarisation existent qui ne sont pas liées à l'application d'un champ électrique extérieur dont :

- Les réactions d'oxydo-réduction provoquent un transfert de charges entre les ions d'une solution et un métal ;
- Le potentiel électrocinétique dû au mouvement des fluides dans les pores sous l'effet d'un gradient de pression ;
- Le potentiel thermoélectrique généré par la diffusion plus rapide des charges depuis une zone froide vers une zone plus chaude en présence d'un gradient thermique ;
- Le potentiel de diffusion entre deux zones de concentrations ioniques différentes.

2. LA DOUBLE COUCHE ÉLECTRIQUE

En plus de la matrice rocheuse et de l'eau contenue dans les pores, les interfaces entre la phase solide et la phase liquide peuvent contribuer fortement aux propriétés électriques du milieu poreux. Les effets d'interface dépendent des propriétés physiques et chimiques de surface et des caractéristiques de la double couche électrique à l'interface solide/liquide (voir Annexe 1).

Les surfaces minérales sont généralement chargées. A cause de défauts de surface de leur structure cristalline, il y a souvent des excès de charges négatives à la surface des grains. Quand il y a contact entre un électrolyte et une surface minérale, il y a création d'une zone proche de la surface où la concentration en ions compensateurs est supérieure à leur concentration dans l'électrolyte, loin de l'interface. Ainsi, des cations sont adsorbés sur la surface minérale pour assurer l'électroneutralité. Cette zone est appelée double couche électrique (DCE).

Différents modèles ont été développés pour décrire le gradient de concentration au voisinage de l'interface (Helmholtz, Gouy Chapman et triple couche de Stern, voir Annexe 1). Les paragraphes suivants se focaliseront sur le modèle le plus complet, celui de la triple couche de Stern.

La DCE est composée de deux couches séparées par un plan de cisaillement. La couche de Stern contient les ions compensateurs adsorbés et capables de se mouvoir tangentiellement le long de la surface minérale. Et la couche diffuse est un volume d'électrolyte contenant des ions positifs et négatifs, mobiles et attirés à la surface minérale par interaction électrostatique. Plus loin, il y a l'électrolyte dit « libre », non affecté par l'interface [Schmutz *et al.*, 2010 ; Ghorbani, 2007] (Figure III-4-a).

3. MÉCANISMES DE LA POLARISATION DANS UN MILIEU POREUX

Deux mécanismes distincts seraient responsables de la polarisation dans un milieu poreux (en l'absence de particules métalliques) [Revil *et al.*, 2012]. La polarisation à basse fréquence est liée à la présence de la DCE, alors qu'à plus haute fréquence (> 100 Hz), la polarisation est la polarisation de Maxwell-Wagner. Comme ce sont les phénomènes apparaissant à basse fréquence qui intéressent cette étude, la polarisation de la DCE sera plus développée. C'est la somme de trois contributions : la polarisation de la couche de Stern, la polarisation de la couche diffuse et la polarisation de membrane [Vaudelet *et al.*, 2011].

a) POLARISATION DE LA COUCHE DE STERN

Le mécanisme principal responsable de la polarisation est associé à la polarisation de la couche de Stern [Schmutz *et al.*, 2010]. S'ils sont mobiles, les cations de la couche de Stern bougent dans la direction du champ électrique. Parce qu'ils ne peuvent pas quitter la couche de Stern (le processus de sorption-désorption entre la couche de Stern et la couche diffuse est trop lent), ils migrent tangentiellement à la surface du grain dans la direction du champ électrique et ils s'accumulent sur un des côté de la particule [Vaudelet *et al.*, 2011 ; Leroy *et al.*, 2008] (Figure III-4-b).

b) POLARISATION DE LA COUCHE DIFFUSE

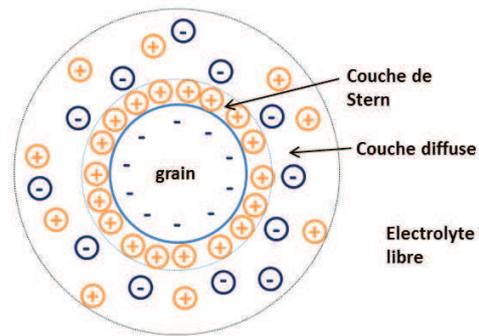
Cette polarisation est due à la relaxation de la couche diffuse autour des grains du milieu poreux. Sous l'influence d'un champ électrique externe, la couche diffuse entourant les grains se déforme, puis revient à sa position d'équilibre quand le champ est coupé [Lesmes and Morgan, 2001] (Figure III-4-c).

c) POLARISATION DE MEMBRANE

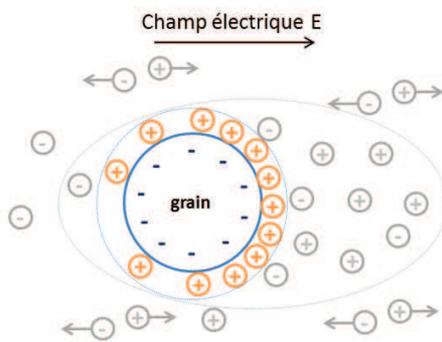
Lorsque les grains sont proches, les couches diffuses des grains contigus se chevauchent. Lorsqu'un courant électrique est appliqué, les cations migrent dans la couche diffuse, tandis que les anions, plus volumineux, ne peuvent pas traverser les zones de chevauchement de la couche diffuse et vont s'y accumuler [Vaudelet *et al.*, 2011]. Il se crée alors un champ électrique associé à cette accumulation de charges. Lorsque le courant est arrêté, ces charges se relaxent (Figure III-4-d).

Ce phénomène a tout d'abord été mis en évidence dans des milieux argileux [Vacquier *et al.*, 1957], car la porosité y est très faible.

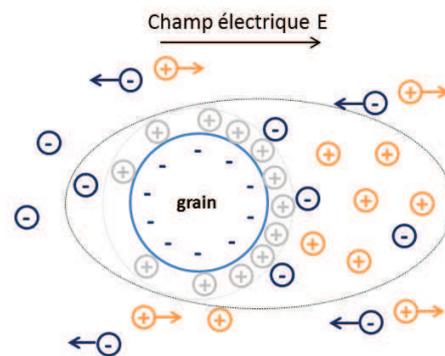
Remarque : Leroy *et al.* (2008), puis Revil et Florsh (2010), supposent que le chevauchement des couches diffuses au contact des grains empêcherait la polarisation de ces dernières. La déformation de la couche diffuse étant faible, ce serait les effets de la polarisation de la couche de Stern qui seraient prépondérants.



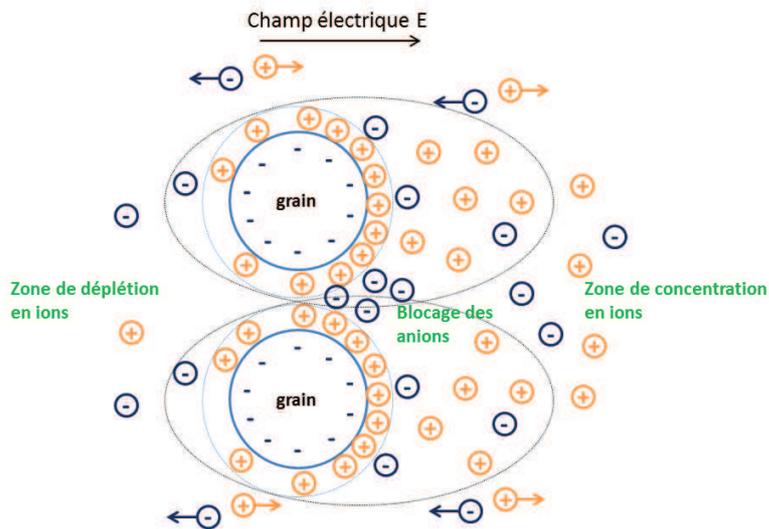
a) Modèle de la triple couche



b) Polarisation de la couche de Stern



c) Polarisation de la couche diffuse



d) Polarisation de membrane

FIGURE III-4 : a) MODÈLE DE LA TRIPLE COUCHE ÉLECTRIQUE ET MÉCANISMES DE LA POLARISATION b) DE LA COUCHE DE STERN, c) DE LA COUCHE DIFFUSE ET d) DE MEMBRANE. MODIFIÉ D'APRÈS SLATER *ET AL.*, 2005 ; TITOV *ET AL.*, 2004 ; VAUDELET *ET AL.*, 2011.

4. TECHNIQUES DE MESURE ET PARAMÈTRES DE LA POLARISATION PROVOQUÉE

La méthode de polarisation provoquée peut être appliquée aussi bien en domaine temporel qu'en domaine fréquentiel. L'étude de la courbe de décroissance du potentiel en fonction du temps correspond à la méthode de polarisation provoquée en domaine temporel (TDIP en anglais pour *Time Domain Induced Polarization*). Mais comme le temps de relaxation du potentiel est fini, il est évident que la résistivité apparente complexe doit varier avec la fréquence, diminuant lorsque la fréquence augmente. Ainsi, les mesures de la résistivité à plusieurs fréquences, généralement entre 1 mHz et 1 kHz, constituent une autre technique : c'est l'étude en domaine fréquentiel (SIP en anglais pour *Spectral Induced Polarization*).

La méthode PP met en œuvre deux électrodes pour la mesure de la différence de potentiel (ddp) et deux autres électrodes pour l'injection du courant : elle utilise donc les mêmes dispositifs d'électrodes utilisés pour la mesure de la résistivité électrique. Cependant, il y a des différences à prendre en compte, notamment concernant le rapport signal sur bruit, ainsi que les effets de couplages électromagnétiques [Pelton *et al.*, 1978] ou de polarisation d'électrodes [Dahlin, 2000].

a) EN DOMAINE TEMPOREL

Dans la méthode de PP dans le domaine temporel, un courant électrique d'intensité I_0 est injecté, puis coupé. La tension induite $V(t)$ est mesurée après la coupure de courant. Cette tension est normalisée à la tension mesurée lors de l'injection de courant V_0 pour déterminer la chargeabilité intégrée M_{int} [mV/V] (Figure III-5) :

$$M_{int} = \frac{1}{V_0(t_{i+1} - t_i)} \int_{t_i}^{t_{i+1}} V(t) dt \quad \text{ÉQUATION III-27}$$

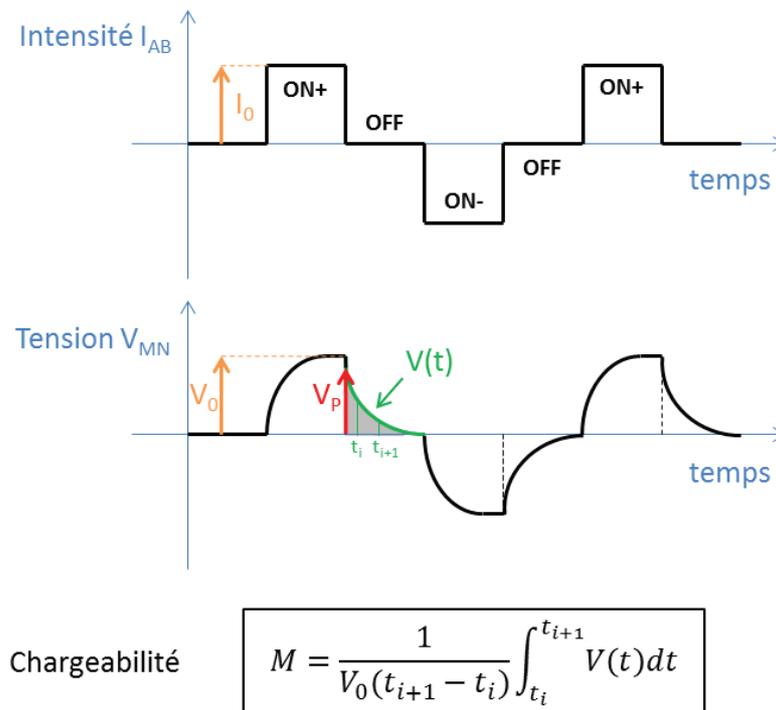


FIGURE III-5 : PRINCIPE DE MESURE DE LA POLARISATION PROVOQUÉE EN DOMAINE TEMPOREL. UN COURANT EN CRÉNEAUX D'INTENSITÉ I_0 EST INJECTÉ. LE MILIEU SE CHARGE JUSQU'À UNE DIFFÉRENCE DE POTENTIEL V_0 . LORSQUE LE COURANT EST COUPÉ, LE VOLTAGE OBSERVÉ IMMÉDIATEMENT APRÈS LA COUPURE EST NOTÉ V_p . LE POTENTIEL $V(t)$ DÉCROIT JUSQU'À PRENDRE UNE VALEUR NULLE. L'INTÉGRATION DE LA COURBE DE DÉCROISSANCE DE $V(t)$ ENTRE DEUX TEMPS DONNÉS t_i ET t_{i+1} PERMET DE CALCULER LA CHARGEABILITÉ M .

La mesure du voltage V_p observé immédiatement après que le courant soit coupé permet de calculer la chargeabilité apparente M_a [mV/V] définie par Seigel (1959) :

$$M_a = \frac{V_p}{V_0} \quad \text{ÉQUATION III-28}$$

Pelton *et al.* (1978) ont défini la chargeabilité comme étant la contribution de deux conductivités, la conductivité σ'_{surf} dite de surface, et la conductivité σ'_{el} de l'électrolyte, dite de volume. Dans le cas où la conductivité de volume est beaucoup plus grande que la conductivité de surface, la chargeabilité est proportionnelle au rapport de la conductivité de surface sur la conductivité de volume [Slater and Lesmes, 2002] :

$$M \propto \frac{\sigma'_{surf}}{\sigma'_{el} + \sigma'_{surf}} \cong \frac{\sigma'_{surf}}{\sigma'_{el}} \quad \text{ÉQUATION III-29}$$

Pour s'affranchir de la variation de résistivité électrique du milieu (pour rendre comparable les valeurs de chargeabilité de roches ayant des résistivités différentes), la chargeabilité normalisée définie par Slater et Lesmes (2002) est utilisée. Elle correspond à la chargeabilité divisée par la résistivité [Slater and Lesmes, 2002] :

$$M_n = \frac{M}{\rho} \propto \sigma'_{surf} \quad \text{ÉQUATION III-30}$$

La chargeabilité dépend de la résistivité de la roche et de sa conductivité de surface σ'_{surf} , alors que la chargeabilité normalisée ne dépend que de la conductivité de surface. Or la conductivité de surface permet de discriminer différents types de roches [Revil *et al.*, 1998].

b) EN DOMAINE FRÉQUENTIEL

La polarisation provoquée peut aussi être utilisée en domaine fréquentiel, en injectant un courant alternatif de fréquence variable. Les mesures de laboratoire se font en général dans une large bande de fréquences, allant de 1 mHz à 50 kHz. Sur le terrain, les mesures en domaine fréquentiel sont souvent limitées à 100 Hz. Au-delà de cette fréquence, des effets d'induction électromagnétique dominent la réponse PP [Revil *et al.*, 2012].

La technique consiste à injecter un courant alternatif de fréquence variable et de mesurer le potentiel induit dont l'amplitude et la phase ont pu varier par rapport au signal de départ. Le rapport du potentiel induit sur le courant entrant est la résistivité complexe du système (une fois corrigée par le facteur géométrique) (Figure III-6).

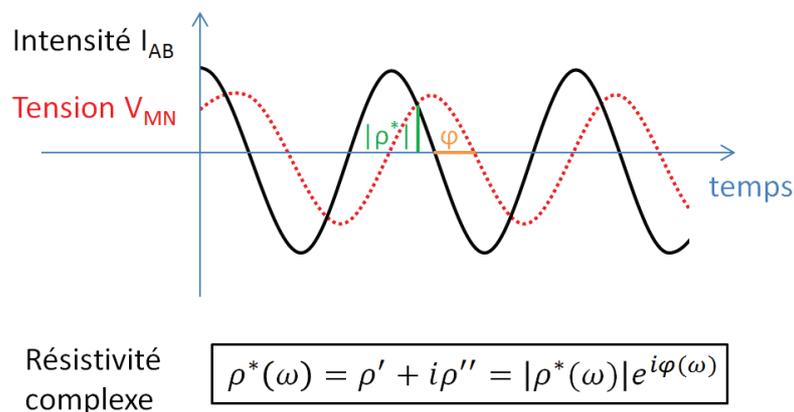


FIGURE III-6 : PRINCIPE DE MESURE DE LA POLARISATION PROVOQUÉE SPECTRALE. UN DÉPHASAGE φ EST MESURÉ ENTRE LA DIFFÉRENCE DE POTENTIEL (TRAIT POINTILLÉ ROUGE) QUI EST EN RETARD PAR RAPPORT AU COURANT INJECTÉ (TRAIT CONTINU NOIR) ET UNE DIFFÉRENCE D'AMPLITUDE $|\rho^*|$ ENTRE LES DEUX SIGNAUX.

Les notations suivantes seront utilisées :

$$\rho^*(\omega) = \rho' + i\rho'' = kZ^*(\omega) = k \frac{U}{I} = |\rho^*(\omega)|e^{i\varphi(\omega)} \quad \text{ÉQUATION III-31}$$

avec $i = \sqrt{-1}$, ρ' la partie réelle de la résistivité, ρ'' la partie imaginaire, $|\rho^*| = \sqrt{(\rho'^2 + \rho''^2)}$ l'amplitude de la résistivité [$\Omega.m$] et $\varphi = \tan^{-1}(\rho''/\rho')$ la phase [rad].

En pratique, l'impédance $|Z^*|$ et la phase φ sont mesurés. L'impédance est convertie en résistivité par la multiplication par un facteur géométrique k (voir partie III-B-3 p.41), alors que la phase ne dépend pas du facteur géométrique.

L'amplitude de la résistivité $|\rho^*(\omega)|$ représente la conduction ohmique (capacité à conduire le courant) et le déphasage φ décrit l'intensité de la polarisation (stockage de charges).

La conductivité complexe [$S.m^{-1}$] est l'inverse de la résistivité :

$$\sigma^*(\omega) = \frac{1}{\rho^*(\omega)} = i\omega\varepsilon^* = \sigma' + i\sigma'' \quad \text{ÉQUATION III-32}$$

avec ε^* la permittivité diélectrique complexe [$F.m^{-1}$] et $\omega = 2\pi f$ la pulsation [$rad.s^{-1}$].

La partie réelle σ' dépend principalement de la conductivité de l'électrolyte σ_{el} dite de volume, mais également de la conductivité de surface localisée à l'interface électrolyte/solide σ'_{surf} . La partie imaginaire σ'' dépend surtout de la conductivité de surface σ''_{surf} , donc de phénomènes de polarisation au niveau de l'interface [Slater and Lesmes, 2002]. La relation suivante peut alors être écrite :

$$\sigma^*(\omega) = (\sigma'_{el} + \sigma'_{surf}(\omega)) + i\sigma''_{surf}(\omega) \quad \text{ÉQUATION III-33}$$

La conductivité de surface σ_{surf} provient du déplacement des ions dans la double couche électrique et augmente avec la surface spécifique des grains, avec la densité de charges et avec la mobilité ionique de surface [Slater and Lesmes, 2002].

Afin de faire le parallèle avec la chargeabilité, on peut citer ici la formulation de la phase proposée dans l'article de Slater et Lesmes (2002) :

$$\varphi = \frac{\sigma''_{surf}}{\sigma'_{el} + \sigma'_{surf}} \cong \frac{\sigma''_{surf}}{\sigma'_{el}} \quad \text{ÉQUATION III-34}$$

Et la partie imaginaire de la conductivité peut être définie comme un paramètre normalisé, au même titre que la chargeabilité normalisée :

$$\sigma'' = \sigma' \tan(\varphi) \cong \sigma' \varphi \quad \text{ÉQUATION III-35}$$

Remarque : Signe de la phase. Par définition (Équation III-31), la phase de la résistivité complexe est négative (comme le voltage est en retard par rapport au courant). Si la phase est celle de la conductivité complexe (inverse de la résistivité), elle est positive. Cependant les deux ont la même valeur absolue [Revil et al., 2012].

Les différents paramètres PP peuvent être modélisés pour des milieux granulaires, avec ou sans argiles, saturés en eau ou partiellement saturés en huile. Des exemples de modèles sont présentés dans l'annexe 2.

5. DISTRIBUTION DES CHARGES ÉLECTRIQUES EN PRÉSENCE DE BACTÉRIES

Les hydrocarbures modifient la chimie de l'interface grain/fluide [Vanhala *et al.*, 1992 ; Olhoeft, 1985]. Par conséquent, les mesures PP sont sensibles à la pollution par des hydrocarbures, bien que cette signature dépende aussi du type de contaminant, de sa mouillabilité et de son degré de saturation [Schmutz *et al.*, 2012, 2010 ; Revil *et al.*, 2011 ; Cassiani *et al.*, 2009], ainsi que de la lithologie du milieu pollué [Cassiani *et al.*, 2014 ; Kemna *et al.*, 2004].

La présence de bactéries introduit de nouvelles interfaces (fluide/bactéries) et elles modifient aussi les propriétés électriques du milieu granulaire. De plus, l'activité bactérienne influence les propriétés physico-chimiques du milieu, et donc ses propriétés électriques [Atekwana and Atekwana, 2010].

a) SURFACE DES BACTÉRIES

Comme cela a été décrit précédemment, les bactéries sont classées en deux groupes en fonction de leur structure membranaire. Mais, Gram + ou bien Gram -, cela ne renseigne pas sur la polarisation de la membrane. En effet, dans les deux cas, la surface des bactéries, comme celle des minéraux, est chargée négativement [Revil *et al.*, 2012 ; Margo, 2009].

La paroi des bactéries Gram+ est chargée négativement parce que le peptidoglycane comprend beaucoup d'acides téichoïques (donc beaucoup d'ions phosphate PO_4^{3-}). La membrane externe des bactéries à Gram- comprend une importante quantité de phospholipides (donc beaucoup d'ions phosphate aussi). La dissociation de groupes acides au niveau de groupements carboxyle (R-COOH) et hydroxyle (R-OH) joue aussi en faveur d'une charge nette négative (cf. Annexe 1). Le degré de dissociation de ces groupes chargeables est fonction du pH et de l'activité de la solution électrolytique environnante.

Généralement, le point isoélectrique des bactéries est à pH 2 et leur surface est chargée négativement à pH 7. Mais, cela est très variable selon les bactéries et les conditions environnementales [Li and McLandsborough, 1999] (cf. Annexe 1).

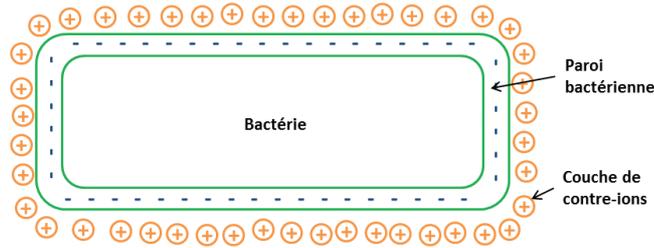
Cela entraîne que les ions positifs du milieu extracellulaire sont attirés à la surface des cellules, formant ainsi une double couche, comme à la surface des minéraux. Pour les mesures électriques basse fréquence, la relaxation liée à la diffusion des nuages de contre-ions présents à la périphérie des bactéries est dominante [Margo, 2009] (Figure III-7-a et b).

Récemment, Zhang *et al.* (2013) ont montré que la signature électrique d'une suspension bactérienne évoluait au cours de sa croissance. Les parties réelle et imaginaire de la conductivité complexe augmentent avec le nombre de bactéries à basse fréquence (< 10 Hz). Cependant, la conductivité finit par diminuer à mesure que les bactéries vieillissent. Les auteurs en concluent que la PP est un outil qui peut être utilisé pour surveiller la biomasse et ses différents stades évolutifs.

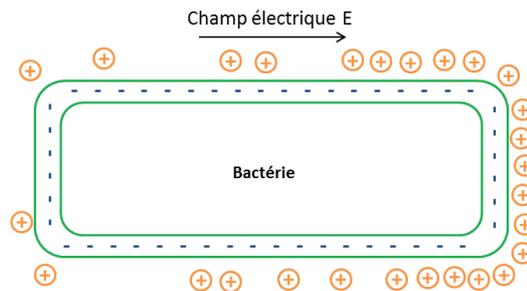
b) INFLUENCE SUR LES PROPRIÉTÉS ÉLECTRIQUES DU MILIEU GRANULAIRE

Les microorganismes ont une large surface spécifique [van der Wal *et al.*, 1997a, 1997b]. Ainsi, les microorganismes qui se développent en colonies peuvent augmenter la rugosité de la surface de sédiments lisses et donc augmenter leur surface spécifique et leur conductivité électrique.

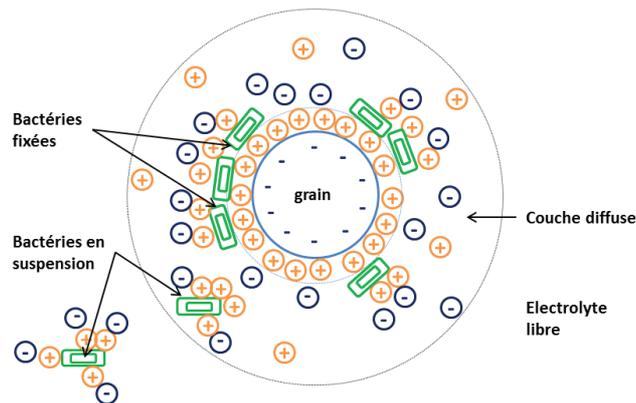
L'adhérence des bactéries chargées négativement sur des surfaces minérales chargées elles aussi négativement provoquent des mouvements de charges de l'électrolyte. Les bactéries sont éloignées par interaction électrostatique du minéral. La capacité d'échange cationique (CEC) est définie par la capacité d'échange de cations entre le minéral et l'électrolyte. Les bactéries exploitent cette propriété pour se fixer aux minéraux. En utilisant les cations fixés au minéral comme relais, les bactéries peuvent adhérer à la surface des minéraux et ainsi indirectement modifier les propriétés électriques de la DCE [Atekwana *et al.*, 2006] (Figure III-7-c).



a) Double couche électrique chez les bactéries



b) Polarisation de la couche de contre-ions



c) Modification de la surface spécifique des grains et de la structure de la DCE

FIGURE III-7: SCHÉMA ILLUSTRANT LA RÉPARTITION DES CHARGES AUTOUR D'UNE BACTÉRIE ET L'INFLUENCE DES BACTÉRIES DANS LE MILIEU GRANULAIRE : a) SURFACE BACTÉRIENNE CHARGÉE NÉGATIVEMENT ET ENTOURÉE D'UNE COUCHE DE CONTRE-IONS ; b) POLARISATION DE LA COUCHE DE CONTRE-IONS SOUS L'INFLUENCE D'UN CHAMP ÉLECTRIQUE EXTERNE, c) MODIFICATION DES PROPRIÉTÉS ÉLECTRIQUES DU MILIEU GRANULAIRE EN PRÉSENCE DE BACTÉRIES: CHANGEMENT DE LA SURFACE SPÉCIFIQUE DU GRAIN GRÂCE AUX BACTÉRIES ADSORBÉES À LA SURFACE MINÉRALE ET MODIFICATION DE LA STRUCTURE DE LA DOUBLE COUCHE ÉLECTRIQUE (DCE) DU GRAIN. INSPIRÉ DE ABDEL AAL *ET AL.*, (2006) ET REVIL *ET AL.* (2012).

c) RÉPONSE PP DE LA CROISSANCE BACTÉRIENNE DANS UN MILIEU POREUX : MODÈLE DE REVIL *ET AL.* (2012)

Revil *et al.* (2012) ont développé un modèle quantitatif représentant la réponse PP en domaine fréquentiel i) d'une suspension bactérienne et ii) de la croissance bactérienne dans un milieu poreux. Ils ont comparé les bactéries à des minéraux argileux qui possèdent une double couche électrique, une forte surface spécifique et une grande capacité d'échange cationique. En effet, les bactéries sont recouvertes d'un peigne de polymères chargés négativement et qui attirent des contre-ions formant ainsi une couche de Stern, entourée par une couche diffuse. Le phénomène de polarisation des bactéries est lié principalement à la mobilité des contre-ions de la couche de Stern qui est très faible, ce qui se traduit par des fréquences de relaxation relativement basses (entre 0,1 et 5 Hz).

i) Modélisation de la polarisation d'une suspension bactérienne

Les auteurs ont proposé un modèle simple, basé sur la modélisation de la réponse de la couche de Stern. Ils ont fait deux postulats : (1) la constante diélectrique des polymères entourant la bactérie est du même ordre de grandeur que celle de l'électrolyte, et (2) la conductivité de la membrane bactérienne est nulle. La conductivité d'une suspension bactérienne est alors contrôlée par la quantité de bactéries et la conductivité de surface du peigne de polymères. Revil *et al.* (2012) utilisent un modèle de type Cole-Cole (cf. Annexe 2) pour décrire la polarisation d'une suspension bactérienne :

$$\sigma^*(\omega) = \sigma_\infty \left[1 - \frac{M}{1 + (i\omega\tau)^c} \right] \quad \text{ÉQUATION III-36}$$

avec τ la constante de temps [s], σ_∞ la conductivité à haute fréquence de la suspension bactérienne, M la chargeabilité, c l'exposant de Cole-Cole.

La chargeabilité normalisée est définie par :

$$M_n = M\sigma_\infty = \sigma_\infty - \sigma_0 \quad \text{ÉQUATION III-37}$$

avec σ_0 la conductivité à basse fréquence de la suspension bactérienne. Les termes σ_0 et σ_∞ sont définis par :

$$\sigma_0 = \frac{1}{F_B} \sigma_w \quad \text{ÉQUATION III-38}$$

avec σ_w la conductivité de l'électrolyte et F_B le facteur de formation associé à la présence de bactéries ;

$$\sigma_\infty = \frac{1}{F_B} (\sigma_w + m_B \beta_{(+)} Q_V^B) \quad \text{ÉQUATION III-39}$$

avec $Q_V^B = \sum_{i=1}^N C_i^B CEC_i^B$ la charge par unité de volume d'une suspension colloïdale de bactéries [$C.m^{-3}$], CEC_i^B la capacité d'échange cationique de la bactérie de type i [$C.kg^{-1}$], N le nombre de types de bactéries présentes dans la suspension et C_i^B la concentration bactérienne [$kg.m^{-3}$].

Et avec m_B le facteur de cimentation et $\beta_{(+)}$ la mobilité des contre-ions dans la couche de Stern.

Ce qui conduit à l'expression de la chargeabilité normalisée suivante :

$$M_n = \frac{1}{F_B} m_B \beta_{(+)} C_B CEC_B \quad \text{ÉQUATION III-40}$$

La partie imaginaire de la conductivité électrique complexe peut être exprimée telle que :

$$\sigma_{eff}'' \equiv \omega \varepsilon_0 K_{eff} = \sigma'' + \omega \varepsilon' \quad \text{ÉQUATION III-41}$$

avec K_{eff} la permittivité relative effective de la suspension (permittivité électrique du milieu ε^* ramenée à celle du vide $K_{eff} = \varepsilon^* / \varepsilon_0$) :

$$K_{eff} = K' + \left(\frac{M_n}{2\omega\varepsilon_0} \right) \frac{\cos \left[\frac{\pi}{2} (1 - c) \right]}{\cosh[\text{cln}(\omega\tau)] + \sin \left[\frac{\pi}{2} (1 - c) \right]} \quad \text{ÉQUATION III-42}$$

D'après ce modèle (Équation III-41 et Équation III-42), la partie imaginaire de la conductivité électrique complexe dépend linéairement de la densité bactérienne. Ainsi, une variation de la partie imaginaire devrait correspondre à un changement de la concentration en bactéries.

ii) Modélisation de la polarisation de bactéries dans du sable

La modélisation a ensuite été étendue au cas de la croissance d'une population bactérienne dans un milieu poreux où les bactéries sont principalement en contact avec la phase solide (adhésion). La concentration en bactéries est maintenant définie par le nombre de bactéries par unité de volume \bar{C}_B [m^{-3}] :

$$\bar{C}_B = N_B / V_p \quad \text{ÉQUATION III-43}$$

avec N_B le nombre de bactéries et V_p le volume de pores. Et par C_B la densité bactérienne [$kg.m^{-3}$] :

$$C_B = \bar{C}_B \bar{V}_B \rho_B \quad \text{ÉQUATION III-44}$$

avec \bar{V}_B le volume d'une seule bactérie [m^3] et ρ_B la masse volumique d'une bactérie [$kg.m^{-3}$].

Revil *et al.* (2012) proposent alors les formulations suivantes pour la valeur maximale de la partie imaginaire de la conductivité et pour la chargeabilité normalisée :

$$\sigma_{B,max}'' \approx -\tan\left[\frac{C\pi}{2}\right] M_n \quad \text{ÉQUATION III-45}$$

$$M_n^B = \frac{2}{3} \left(\frac{\Phi}{1-\Phi}\right) m_B (\beta_{(+)} \bar{V}_B \rho_B C E C_B) \bar{C}_B \quad \text{ÉQUATION III-46}$$

avec Φ la porosité du milieu.

Le modèle relie donc directement la densité bactérienne du milieu poreux à la partie imaginaire de la conductivité électrique complexe (Équation III-45 et Équation III-46).

D. UTILISATION DE LA PP POUR L'ÉTUDE DE LA BIODÉGRADATION

La présence des bactéries dans un milieu poreux et l'augmentation de la biomasse entraînent des modifications des propriétés électriques du milieu poreux, surtout à basse fréquence. De plus, leur métabolisme modifie les propriétés physico-chimiques du milieu, notamment les conditions redox. La PP, sensible aux propriétés électriques dans le domaine fréquentiel, est un outil potentiellement intéressant pour l'étude de l'activité bactérienne dans le cadre d'une biodégradation. De nombreuses études, sur le terrain et en laboratoire, ont utilisé la PP dans ce but.

1. LA PP APPLIQUÉE À LA DÉTECTION DE CONTAMINANTS ORGANIQUES ET AU SUIVI DE L'ACTIVITÉ BACTÉRIENNE

Le potentiel des méthodes géophysiques, et particulièrement des méthodes géo-électriques, pour la détection de contaminants organiques a été montré dès les années 1990.

Par exemple, Schneider et Greenhouse (1992) ont suivi l'évolution de la résistivité électrique au cours d'un relargage contrôlé de perchloroéthylène (PCE) dans un aquifère sablonneux. La forte résistivité du PCE a permis de suivre le front du panache : des résistivités dix fois plus importantes que celles mesurées avant le relargage ont pu être observées. DeRyck *et al.* (1993), eux, ont suivi une fuite contrôlée de kérosène. Les mesures de

permittivité diélectrique, de GPR (*Ground Penetrating Radar*) et de résistivité électrique ont vu la diminution du contenu en eau, remplacé par le kérosène.

A travers la revue de différentes expériences, Monnier-Williams (1995) conclut que l'on peut détecter des fuites de LNAPL (*Light Non-Aqueous Phase Liquids*) avec des méthodes électromagnétiques (induction EM) et des mesures de résistivité et de GPR. La diminution de la conductivité électrique apparente ainsi que celle de la permittivité diélectrique seraient associées à la diminution du contenu en eau lors de son remplacement par les LNAPL en phase mouillante et au caractère isolant de ces polluants. Mais, dans cet article, des augmentations de conductivité et de permittivité sont aussi mentionnées. Elles seraient dues à la formation d'émulsions du polluant qui augmenteraient le contact entre la phase LNAPL et la phase aqueuse et/ou à l'augmentation de la conductance de surface à l'interface des deux phases. Le processus d'imbibition pourrait aussi faire augmenter la conductivité. L'auteur suggère de réaliser plus d'expérimentations pour quantifier les effets de tel ou tel phénomène sur l'évolution de la résistivité.

Gajdoš et Kral (1995) vont aussi rapporter une augmentation de la conductivité électrique en présence d'hydrocarbures. A travers leurs expériences en laboratoire et des observations sur le terrain, ils arrivent à la conclusion que de petites quantités d'hydrocarbures provoquent une augmentation de la conductivité, alors que de grandes quantités font diminuer la conductivité.

En 1998, Sauck et Atekwana réalisent une étude pionnière en biogéophysique qui va montrer une augmentation de la conductivité électrique à l'aplomb d'un panache de LNAPL en cours de dégradation. Des polluants dits « âgés » ou « matures » auraient une réponse contraire à celle des polluants dits « frais » à cause de l'activité bactérienne qui a eu le temps de se mettre en place et qui modifie les signaux électriques.

Par la suite, de nombreuses autres études vont aller dans ce sens et montrer la faisabilité d'un suivi de la biodégradation des polluants organiques par les méthodes géo-électriques.

Des études en laboratoire ont été entreprises afin de comprendre l'impact des interactions biologiques avec le milieu géologique sur les propriétés géophysiques et plus particulièrement sur les propriétés électriques. Ces mécanismes sont nombreux : (i) présence de forts gradients oxydo-réductifs liés à la présence de bactéries, engendrant un transfert d'électrons [Naudet and Revil, 2005] ; (ii) altération minérale par les produits du métabolisme microbien (production d'acides organiques) [Atekwana and Atekwana, 2010] ; (iii) formation de biofilms et colmatage des pores [Albrecht et al., 2011 ; Ntarlagiannis and Ferguson, 2009 ; Davis et al., 2006] ; (iv) biominéralisation induisant des précipitations de sels métalliques (sulfures, etc...) [Ntarlagiannis et al., 2005] ; (v) présence de filaments protéiques extracellulaires de taille nanométrique (« *nanowires* ») à grande conductivité électrique [Ntarlagiannis et al., 2007] .

Atekwana et Atekwana (2010) ont rédigé une revue très complète des principaux facteurs d'origine bactérienne qui avaient une influence sur les propriétés physico-chimiques du sous-sol, et donc sur les propriétés géophysiques (Figure III-8).

Les résultats de ces expériences sont caractérisés par une augmentation des parties réelles et imaginaires de la conductivité électrique lorsque le traitement bactérien des sols augmente. En effet, la conductivité électrolytique augmente, car il y a une augmentation de la concentration d'ions provenant de solides dissous (production d'acides organiques et de biosurfactants responsables de la dissolution des minéraux). Cependant, les effets sont plus visibles sur la partie imaginaire que sur la partie réelle. Les bactéries agrandissent les surfaces en contact avec l'électrolyte, ce qui se traduit par une augmentation de la polarisabilité du milieu poreux, et donc par une augmentation de la partie imaginaire de la conductivité complexe. Voir annexe 3 pour plus de détails.

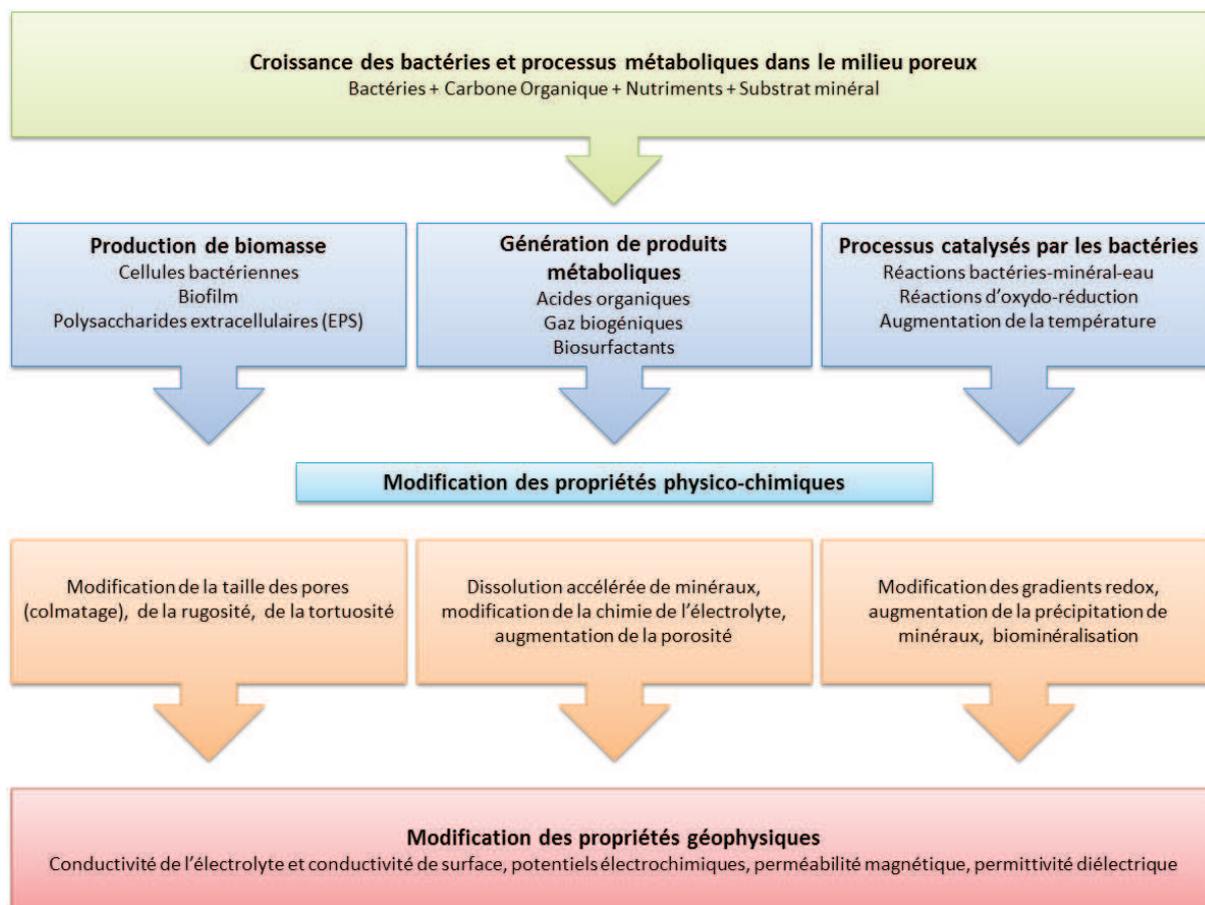


FIGURE III-8 : DIAGRAMME REPRÉSENTANT L'INFLUENCE DE LA CROISSANCE DES BACTÉRIES SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET GÉOPHYSIQUES DU MILIEU POREUX. D'APRÈS ATEKWANA ET ATEKWANA (2010).

2. DISPOSITIFS DE MESURE PP UTILISÉS SUR LE TERRAIN

Les mesures en domaine temporel sont classiquement privilégiées sur le terrain [Gazoty *et al.*, 2012 ; Slater and Lesmes, 2002 ; Slater and Reeve, 2002 ; Aristodemou and Thomas-Betts, 2000], bien que la méthode en domaine fréquentiel soit de plus en plus appliquée dans le contexte de la dépollution [Schwartz *et al.*, 2014 ; Flores Orozco *et al.*, 2012, 2011 ; Williams *et al.*, 2009]. En outre, sachant l'utilité et l'importance de coupler différentes méthodes, la méthode de résistivité est presque toujours associée aux mesures PP [Okay, 2011]. Cela permet d'approfondir les interprétations.

Plusieurs paramètres d'acquisition sont à prendre en compte afin d'obtenir des mesures de qualité :

- L'intensité de l'injection : elle joue sur le rapport signal/bruit. L'intensité du courant doit être assez importante car on mesure des effets PP très faibles.
- La durée d'injection : en domaine temporel, il faut choisir plusieurs temps d'injection pour étudier différents phénomènes de polarisation. Plus la durée d'injection est longue, plus le milieu est chargé et quand l'injection du courant est arrêtée, le signal associé aux phénomènes de polarisation est accentué (classiquement $t = 1$ s, 2 s, ou 4 s) [Okay, 2011].
- La réponse des électrodes : le signal électrique reçu est un couplage de la réponse du milieu et du système de mesure (électrodes + câbles), ainsi que du bruit aléatoire [Okay, 2011]. Pour pallier le problème, les électrodes pour l'injection du courant et celles pour la mesure doivent être séparées [Dahlin *et al.*, 2002], et les électrodes de mesure peuvent être des électrodes dites impolarisables (type Petiau).

- La configuration des électrodes : les différentes configurations mentionnées pour la méthode de résistivité électrique (cf. III-B-3) sont aussi utilisées. Cependant, certaines recommandations pour la méthode SIP peuvent être ajoutées : la configuration dipôle-dipôle minimiserait la polarisation d'électrode [Kemna *et al.*, 2012] car la mesure de potentiel n'est pas située entre les électrodes d'injection, ce qui contribue aussi à limiter la polarisation des électrodes de mesure. Ce n'est pas le cas d'un dispositif Wenner-Schlumberger par exemple.

En ce qui concerne le choix de la méthode PP, TDIP vs SIP, la théorie dit que les deux domaines (temporel et fréquentiel) mesurent le même phénomène et qu'ils doivent mener aux mêmes résultats. D'après les mathématiques, les résultats d'un domaine sont la transformée de Fourier de l'autre. Il faut cependant des mesures de bonne qualité pour pouvoir passer d'un domaine à l'autre, via une modélisation Cole-Cole par exemple [Fiandaca *et al.*, 2013]. Les données TDIP doivent être réalisées sur un nombre suffisant de fenêtres temporelles afin de pouvoir reconstituer les phénomènes de polarisation [Kemna *et al.*, 2012]. A l'inverse, il faut que les mesures SIP soient réalisées sur un large spectre pour passer au domaine temporel.

Remarque : le couplage capacitif se distingue du couplage électromagnétique (EM) [Pelton *et al.*, 1978]. Le couplage capacitif peut se produire entre les électrodes d'injection et les câbles de potentiel, par exemple à la suite d'une fuite de courant ou par déperdition entre les lignes de courant et de potentiel. Avec du matériel en bon état, ce phénomène peut être négligé. Le couplage EM est dû au fait que, dans le sous-sol, l'induction EM crée des différences de potentiel qui se superposent à celles dues aux effets de la polarisation provoquée. Il peut devenir problématique lorsque les lignes de courant sont très longues ou que le sol est très conducteur. Il doit être évalué afin de pouvoir estimer la réponse PP réelle. Ces effets sont sensibles à haute fréquence (ou pour des temps d'injection très courts). Pour les minimiser, davantage de poids est donné aux mesures faites aux basses fréquences (temps longs).

3. DISPOSITIFS DE MESURE EN LABORATOIRE

Les données de laboratoire sont indispensables pour améliorer la compréhension de l'influence des paramètres physico-chimiques et microbiologiques qui contrôlent les phénomènes PP. En laboratoire, ce sont les mesures SIP qui sont les plus répandues. Néanmoins, quelques exemples de mesures TDIP sont disponibles dans la littérature [Etienne, 2014; Titov *et al.*, 2004].

On retrouve les mêmes systèmes appliqués à plus petite échelle. Par conséquent, certains problèmes sont atténués comme le couplage (câbles plus courts), l'intensité du courant d'injection est plus faible (moins de milieu à sonder). Mais il faut faire face à d'autres difficultés : choix d'un porte-échantillon adapté, préparation des échantillons, niveau de compaction... [Kemna *et al.*, 2012].

Plusieurs expériences menées en laboratoire concernant le suivi de l'activité bactérienne ont été passées en revue. Les types de dispositifs les plus souvent utilisés pour réaliser des mesures PP de qualité ont également été analysés. Le paragraphe suivant en présente un résumé. Une analyse bibliographique plus complète des mesures PP en colonnes est proposée en annexe 3.

Les mesures PP se font le plus souvent en colonnes avec des dispositifs de mesures à quatre électrodes (deux électrodes d'injection et deux électrodes de mesure). Les diverses expériences que l'on peut trouver dans la littérature diffèrent surtout par la disposition et la nature de ces électrodes, le dimensionnement des expériences (taille et nombre de colonnes, durée des manipulations) et par les analyses complémentaires aux mesures géophysiques qui peuvent apporter des informations sur le déroulement des réactions physico-chimiques et des processus biologiques à l'intérieur des colonnes. Quelques idées importantes sont rapportées ici :

- Dimension : les dimensions des colonnes vont de 14x2,5 à 80x31 cm ;
- Nature de la matrice : le remplissage des colonnes est fait par du sable fin (environ 0,3 mm de diamètre, composé de silice à plus de 98 %, avec une porosité autour de 40 %) ;

- Nombre d'électrodes : les mesures sont réalisées sur des dispositifs à quatre électrodes. En effet, les mesures SIP faites avec un système à deux électrodes donnent des erreurs sur la polarisation trop importantes à basse fréquence (< 1 kHz) [Kemna *et al.*, 2012].
- Position des électrodes : les électrodes d'injection sont situées aux extrémités des colonnes, et les électrodes de mesure au milieu. Il y a parfois plusieurs couples d'électrodes de mesure. Les électrodes de mesure sont souvent mises en contact avec le milieu par l'intermédiaire d'un électrolyte, ou dans des chambres positionnées sur le côté des colonnes [Slater *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2005]. En effet, si les électrodes de potentiel se trouvent sur le chemin du passage du courant, cela peut induire des erreurs au niveau de la mesure.
- Nature des électrodes : les électrodes de mesure sont presque toujours des électrodes ponctuelles impolarisables Ag/AgCl et les électrodes d'injection sont soit des anneaux, soit des bobines de nature plus variable (argent, or, acier...).
- La densité de courant utilisée doit être suffisamment faible pour rester en régime linéaire (et pouvoir utiliser la loi d'Ohm). Cependant, des densités de courant assez fortes permettent d'améliorer le rapport signal / bruit [Zimmermann *et al.*, 2008]. Vanhala et Soininen (1995) puis Zimmermann *et al.* (2008) n'ont pas observé de phénomènes non-linéaires pour des densités de courant comprises entre 10^{-5} et $0,2$ A/m² et entre $0,01$ - 2 A/m² respectivement.
- Le conditionnement des échantillons non consolidés peut avoir un impact sur les mesures PP [Kemna *et al.*, 2012].
- Le travail avec les bactéries nécessite un protocole précis de stérilisation du matériel (autoclavage du sable, désinfection du matériel avec de l'éthanol...).

E. CONCLUSION

La méthode de polarisation provoquée (PP) peut être mise en œuvre par deux méthodologies différentes, avec des mesures qui s'effectuent dans le domaine temporel (chargeabilité) ou dans le domaine fréquentiel (résistivité complexe).

La méthode de PP dans le domaine temporel utilise le même équipement que celui de la mesure de la résistivité électrique classique. Les deux mesures peuvent donc être effectuées successivement. La mesure de la résistivité permet d'interpréter la chargeabilité (chargeabilité normalisée).

Dans le domaine fréquentiel (basses fréquences, < 100 Hz), la résistivité complexe, dont la partie réelle est sensible à la conduction électrolytique et la partie imaginaire plutôt à la conductivité de surface et aux phénomènes de polarisation aux interfaces, peut être déterminée.

La PP est sensible à ce qui se passe au niveau de la double couche électrique (DCE), présente à la surface des minéraux et des bactéries. Les propriétés de la DCE sont sensibles à l'adsorption de contaminants et à l'activité bactérienne [Abdel Aal *et al.*, 2006]. Par conséquent, la biodégradation des hydrocarbures dans le sous-sol doit pouvoir être suivie par cette méthode.

Il est cependant à noter que cette méthode doit souvent être combinée à d'autres mesures pour être pleinement effective : soit des mesures géophysiques de résistivité électrique qui permettent d'interpréter les mesures PP, soit un suivi géochimique ou microbiologique du milieu qui puisse confirmer les événements déduits des mesures PP et lever certaines incertitudes.

Si l'intérêt principal d'utiliser des méthodes géophysiques dans le cas du monitoring de la biodégradation est le fait qu'elles soient non intrusives, il faut que la méthode qui lui sera combinée le soit tout autant. C'est pourquoi, des mesures d'émissions de biogaz faites en surface, sans l'intermédiaire de piézaires, ont été envisagées.

IV. ANALYSE DU CO₂ : FLUX ET ISOTOPIE DU CARBONE

La minéralisation complète des molécules organiques, comme les BTEX, par le processus de la respiration bactérienne produit du CO₂ et de l'eau. L'augmentation de la concentration en CO₂ dans le milieu est donc un indicateur de la biodégradation aérobie. Ce CO₂ est émis par le sol et son flux peut être mesuré en surface.

De plus, pour chaque molécule organique, les isotopes stables du carbone se retrouvent dans une certaine proportion (rapport ¹³C/¹²C), proportion caractéristique de l'origine de cette matière organique. Elle peut évoluer au cours d'une modification physique et/ou chimique de la molécule. C'est ce que l'on appelle le fractionnement isotopique. Certains processus de dégradation biologique sont accompagnés d'un fractionnement isotopique significatif, qui en fait un marqueur de la biodégradation.

A. EMISSIONS DE CO₂ ET VARIATIONS DE L'ISOTOPIE DU CARBONE

L'élément carbone possède deux isotopes stables, le ¹³C et le ¹²C. Comme il est difficile de doser précisément les abondances absolues, les isotopes sont alors comparés entre eux. Le rapport isotopique R du carbone dans un échantillon est le rapport de l'isotope lourd et rare sur l'isotope léger et abondant : $R_{ech} = (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{ech}$. Les abondances relatives dans un échantillon sont généralement comparées à celles dosées dans un standard international, qui, pour le carbone, est la Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) avec $R_{ref} = (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{ref} = 0.011237$ [Craig, 1957]. Les compositions isotopiques sont généralement données en delta (noté δ), qui correspond aux déviations (en ‰) par rapport à une valeur standard (ou signatures isotopiques ou écarts isotopiques) :

$$\delta^{13}\text{C}_{ech} = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{ech}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{ref}} - 1 \right] * 1000 \quad \text{ÉQUATION IV-1}$$

Cette grandeur permet d'apprécier de faibles différences de teneurs isotopiques. La grande majorité des sources de carbone étant appauvries en ¹³C par rapport à la référence, des valeurs négatives de δ¹³C sont généralement obtenues. A titre d'exemple, quelques valeurs isotopiques caractéristiques pour le carbone du CO₂ sont présentées en Figure IV-1.

D'autres grandeurs permettent de quantifier la variation du δ au cours de processus réactifs, c'est-à-dire le fractionnement isotopique. Deux principaux types de fractionnement sont distingués : i) le fractionnement à l'équilibre, ou thermodynamique, lié à des réactions d'équilibres chimiques (A↔B) et ii) le fractionnement cinétique lié à des différences de vitesses de réaction (A→B) [Aelion et al., 2009]. Ces deux types de fractionnement sont explicités sommairement ci-dessous :

i) L'effet isotopique à l'équilibre entre deux phases A et B (par exemple, vapeur et liquide) est caractérisé par le facteur de fractionnement ou coefficient de fractionnement α :

$$\alpha_{B/A} = \frac{R_B}{R_A} \quad \text{ÉQUATION IV-2}$$

avec R_A et R_B les rapports isotopiques de la phase A et B respectivement ou du réactif A et du produit B respectivement.

ii) Le fractionnement isotopique cinétique est dû à la différence d'énergie entre les molécules impliquant des isotopes différents. Toutes réactions (bio)chimiques qui détruisent la molécule dans son ensemble mettent en jeu ce type de fractionnement : les isotopes les plus légers sont plus facilement mobilisés et donc les liaisons entre atomes légers seront plus rapidement dissociées [Blessing and Saada, 2013]. Le facteur de fractionnement est défini comme dans l'Équation IV-2. Cependant, R_B correspond alors au rapport isotopique du produit formé à un moment donné (produit instantané).

Remarque : Le fractionnement isotopique Δ entre de deux phases A et B s'écrit comme la différence de deux δ :

$$\Delta_{B-A} = \delta^{13}C_B - \delta^{13}C_A \quad \text{ÉQUATION IV-3}$$

Par exemple, entre la phase aqueuse et dissoute du CO_2 (attention à l'ordre des indices) :

$$\Delta_{CO_2\text{ aq}-HCO_3^-} = \delta^{13}C_{CO_2\text{ aq}} - \delta^{13}C_{HCO_3^-} \approx -10\text{ ‰}$$

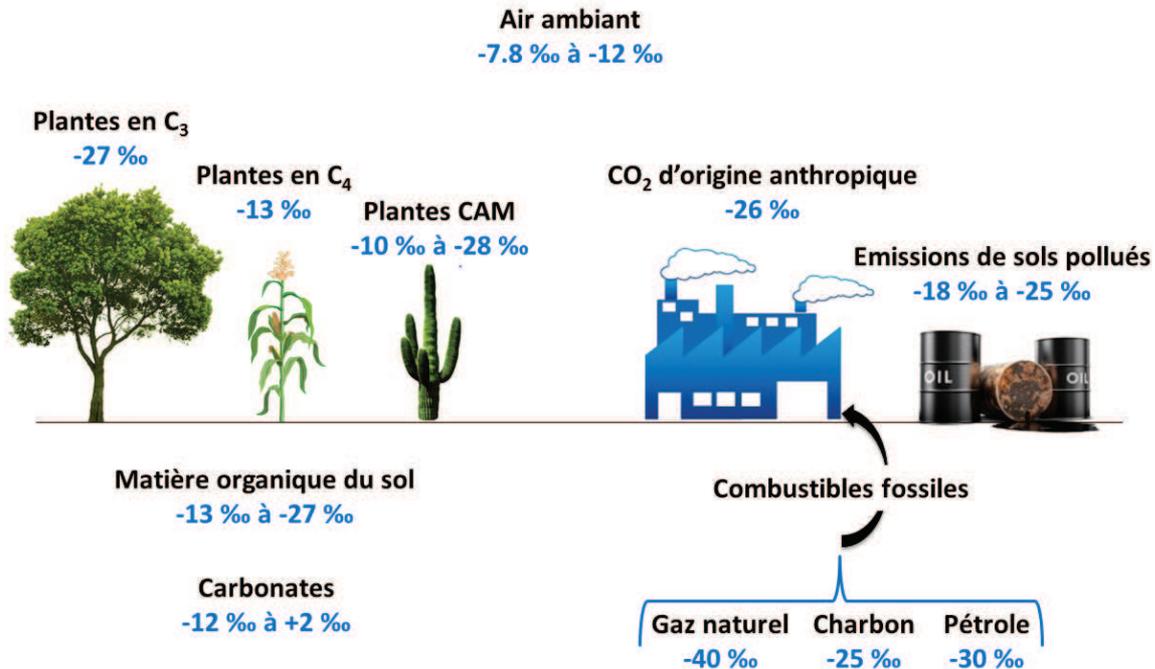


FIGURE IV-1 : EXEMPLES DE SIGNATURE ISOTOPIQUES DU C DU CO_2 POUR DIFFÉRENTES SOURCES DE CO_2 , D'APRÈS [AGGARWAL AND HINCHEE, 1991 ; BOUTTON, 1991].

Les définitions présentées ci-dessus sont valables pour des fractionnements entre deux phases. Dans les études de suivi de la biodégradation, les définitions ne sont pas tout à fait les mêmes. En effet, l'étude porte sur une seule phase (toluène par exemple), mais avec une notion de temps (toluène initial et toluène pendant la biodégradation).

L'enrichissement en isotopes lourds dans la fraction de composé de départ peut être exprimé à l'aide de l'équation de Rayleigh :

$$R_t/R_0 = (c_t/c_0)^{(\alpha-1)} \quad \text{ÉQUATION IV-4}$$

R_t désigne la composition isotopique ($^{13}C/^{12}C$) du substrat restant, R_0 désigne le rapport isotopique initial, c_t/c_0 désigne le ratio entre la concentration de substrat au début (c_0) et à la fin (c_t), et α représente le facteur de fractionnement isotopique, également exprimé comme facteur d'enrichissement ε :

$$\varepsilon = (\alpha - 1) * 1000 \quad \text{ÉQUATION IV-5}$$

En pratique, α (ou ε) est obtenu en déterminant la pente de la droite de régression de $\ln(f)$ vs $\ln(\delta^{13}C_t + 1000 + 1) / \ln(\delta^{13}C_0 + 1000 + 1)$, avec $f = c_t/c_0$ la fraction de substrat restant [Aelion et al., 2009; Fischer et al., 2008; Sherwood Lollar et al., 1999] :

$$(\alpha - 1)\ln f = \ln \frac{\delta^{13}C_t + 1000}{\delta^{13}C_0 + 1000} \quad \text{ÉQUATION IV-6}$$

Dans l'étude de la composition isotopique du carbone (en contact, présent, dissous) dans l'eau, une complication intervient du fait que le carbone inorganique total dissous se rapporte à plusieurs composés, avec de surcroît des interactions avec le CO₂ gaz et le carbonate de calcium solide. Ils peuvent être listés de la façon suivante :

- CO₂ gaz avec une pression partielle P_{CO2}
- CO₂ dissous, noté CO_{2aq}
- acide carbonique dissous, H₂CO₃
- bicarbonate dissous, HCO₃⁻
- carbonate dissous, CO₃²⁻
- carbone inorganique total dissous, DIC = [H₂CO₃] + [CO_{2aq}] + [HCO₃⁻] + [CO₃²⁻]
- carbonate solide, CaCO₃

Il existe un fractionnement isotopique thermo-dépendant au moment du dégazage du CO₂ aqueux vers le CO₂ gaz (ou inversement, de la dissolution du CO₂ gaz vers le CO₂ aqueux). Il y a aussi un fractionnement de l'isotopie du carbone au moment de la précipitation (ou dissolution) de la calcite (Figure IV-2). La présence des différentes espèces du CO₂ en milieu aqueux (H₂CO₃, HCO₃⁻, CO₃²⁻) dépend du pH (Figure IV-3) [IAEA, 2008].

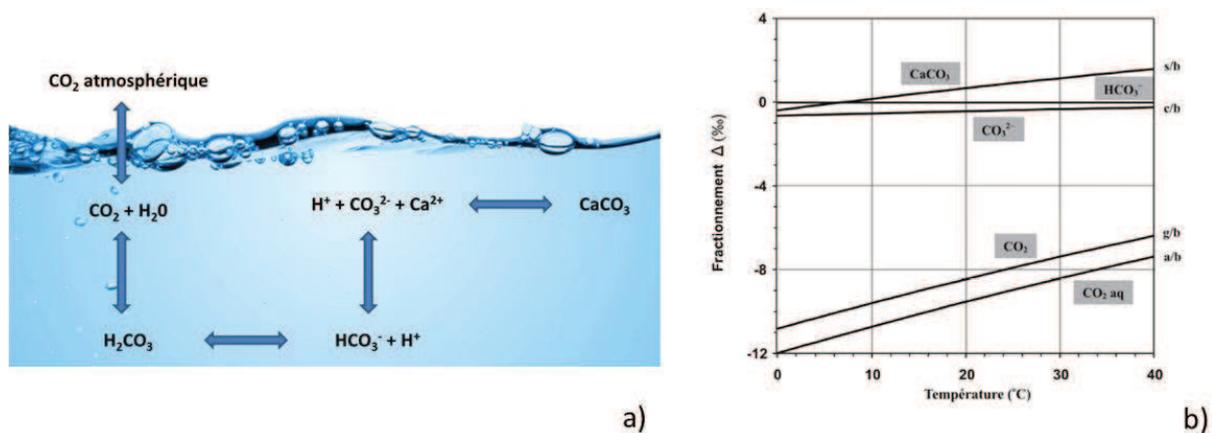


FIGURE IV-2 : A) EQUILIBRES CO₂ AQUEUX ET CO₂ GAZ ET PRÉCIPITATION/DISSOLUTION DES CARBONATES ; B) FRACTIONNEMENTS ISOTOPIQUES ASSOCIÉS AU PASSAGE DES DIFFÉRENTES PHASES (D'APRÈS MOOK AND TAN, 1991).

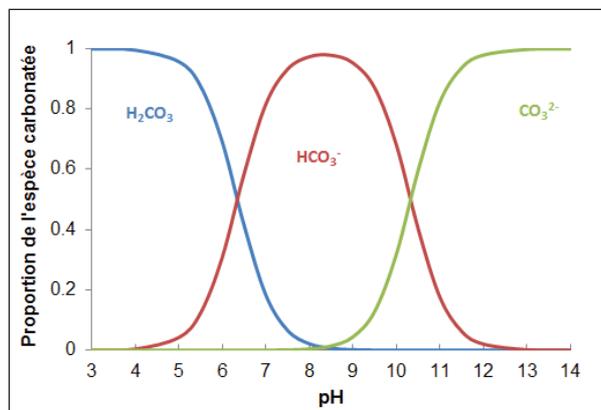


FIGURE IV-3 : RÉPARTITION DES ESPÈCES CARBONATÉES EN SOLUTION EN FONCTION DU PH À 25°C (D'APRÈS STUMM AND MORGAN, 2012).

B. MESURE DES ÉMISSIONS DE CO₂ ET DU RAPPORT ISOTOPIQUE DU CARBONE PAR SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE

Les instruments d'analyse des molécules gazeuses utilisent des techniques optiques de spectroscopie d'absorption (ultraviolet, visible, infrarouge).

1. PRINCIPE DE LA SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE (IR)

Les techniques spectroscopiques permettent de déterminer la structure de molécules. A part la spectrométrie de masse, elles reposent sur l'interaction entre la matière et un rayonnement électromagnétique. La spectroscopie infrarouge (IR) est basée sur l'interaction de la lumière IR avec le nuage électronique des liaisons chimiques.

La molécule, assemblage non rigide d'atomes, ressemble à un système de balles (les atomes), liées les unes aux autres par des ressorts de constante de raideur plus ou moins grande (les liaisons) dont les vibrations apparaissent à des fréquences déterminées.

Le rayonnement infrarouge (IR) est localisé entre la région du spectre visible et des ondes hertziennes (Figure IV-4). Le domaine infrarouge s'étend de 0,8 μm à 1000 μm . Il est arbitrairement divisé en 3 catégories, le proche infrarouge (0,8 à 2,5 μm , soit 12500-4000 cm^{-1}), le moyen infrarouge (2,5 à 25 μm , soit 4000-400 cm^{-1}) et le lointain infrarouge (25 à 1000 μm , soit 400-10 cm^{-1}).

Le domaine de l'infra-rouge moyen est préféré à celui du proche infra-rouge en raison du grand nombre d'espèces d'intérêt absorbant dans ce domaine, des intensités des raies d'absorption beaucoup plus fortes (d'un facteur 10^3) et de l'apparition récente de nouveaux lasers très performants (à cascades quantiques) dans l'infra-rouge moyen.

L'énergie du rayonnement IR est suffisante pour produire des changements dans l'énergie de vibration des molécules, mais elle ne peut pas provoquer des transitions électroniques (Figure IV-4). Plusieurs modes de vibrations sont possibles pour un groupe d'atomes donné. A chacun correspond une fréquence caractéristique. Quand un rayonnement infrarouge de l'une des fréquences de vibration de la molécule la frappe, il y a résonance : l'amplitude de la vibration s'accroît et une partie de l'énergie est absorbée. Le spectre d'absorption IR de la molécule comporte ainsi des bandes d'absorption, assez larges, qui correspondent aux transitions entre les niveaux d'énergie vibrationnelle (et rotationnelle).

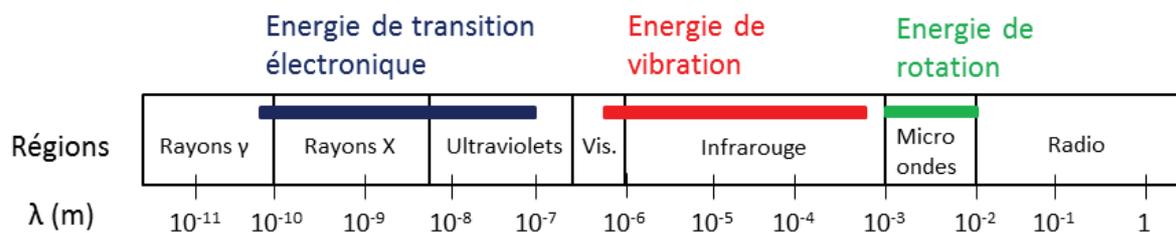


FIGURE IV-4 : REPRÉSENTATION DU SPECTRE DE LA LUMIÈRE. Y SONT IDENTIFIÉS LES RÉGIONS DU SPECTRE EN FONCTION DE LA LONGUEUR D'ONDE λ , AINSI QUE LES DIFFÉRENTS NIVEAUX D'ÉNERGIE FOURNIS PAR CHAQUE DOMAINE.

En pratique, un faisceau infrarouge passe à travers l'échantillon et l'énergie provenant de ce dernier est mesurée. La transmission T est définie comme la fraction d'énergie lumineuse traversant l'échantillon. A l'entrée de l'échantillon, l'intensité de la lumière est I_0 . Elle est égale à I de l'autre côté de ce même échantillon. On a donc $T = I/I_0$. Le pourcentage de transmission (transmittance) est défini par $\%T = 100(I/I_0)$. L'absorbance est alors $A = \log(I_0/I)$.

Suite à la mesure enregistrée par le détecteur et après conversion de l'intensité par transformée de Fourier inverse, le spectre est défini soit en transmittance % T, soit en absorbance A.

La loi de Beer-Lambert est vérifiée en infrarouge, ce qui en fait une méthode d'analyse quantitative :

$$T(\nu) = \frac{I(\nu)}{I_0(\nu)} = e^{-\sigma(\nu)LC} \quad \text{ÉQUATION IV-7}$$

avec T la transmission, I_0 l'intensité du rayon incident, I l'intensité du rayon transmis, ν le nombre d'onde (ou fréquence), σ [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$] coefficient d'absorbance ou section efficace d'absorption, L [cm] la distance que le rayon a traversé à travers l'échantillon, C [$\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$] la concentration en gaz.

2. ISOTOPIE DU CARBONE : IRIS (ISOTOPE RATIO INFRARED SPECTROMETRY) VS IRMS (ISOTOPE RATIO MASS SPECTROMETRY)

Les processus biogéochimiques et de transfert de matière entre les couches superficielles du système terrestre (géosphère, hydrosphère, cryosphère et biosphère) et l'atmosphère s'accompagnent d'une discrimination ou d'un fractionnement isotopique des isotopes stables de nombreux éléments (C, N, O, H, S, halogènes). Véritables traceurs, les signatures isotopiques des gaz atmosphériques permettent de retracer et de quantifier leurs sources en précisant aussi leurs origines biogéochimiques ou anthropiques.

Depuis l'apparition de la spectroscopie Laser IR haute résolution, l'IRIS, pour « *Isotope Ratio Infrared Spectrometry* » en anglais, est devenue une technique très courante pour la mesure des isotopes stables de molécules gazeuses atmosphériques. Les méthodes optiques permettent de disposer d'instruments relativement compacts, facilement maniables pour des conditions de mesures *in situ* contrairement à l'IRMS (« *Isotope Ratio Mass Spectrometry* ») dont la plupart des analyseurs restent peu adaptables à l'élaboration d'instruments de terrain pour des mesures en temps réel.

Les précisions obtenues par IRIS sur les rapports isotopiques $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du CO_2 sont proches de 0,1 %. Ces performances sont comparables à celles de l'IRMS.

C. UTILISATION DE L'ISOTOPIE DU CARBONE POUR LE SUIVI DE LA BIODÉGRADATION

Au cours de la biodégradation des polluants organiques, il y a production et émission de CO_2 [Kaufmann *et al.*, 2004] et fractionnement isotopique du carbone : les bactéries privilégient les molécules contenant du ^{12}C . En effet, les réactions chimiques et biologiques des molécules contenant du ^{13}C requièrent plus d'énergie, les molécules qui comprennent des isotopes légers (^{12}C) vont donc réagir préférentiellement [Meckenstock *et al.*, 2004]. Ainsi, les métabolites seront enrichis en ^{12}C et avec un rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ plus faible qu'initialement, tandis que la phase résiduelle de polluant sera appauvrie en ^{12}C , et par conséquent avec un rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ plus grand qu'initialement.

1. ANALYSE DES POLLUANTS RÉSIDUELS

Plusieurs auteurs ont étudié les processus de dégradation des hydrocarbures pétroliers (BTEX, n-alcanes, naphthalène, et/ou et les éthers-oxydes MTBE, TBA, ETBE, TAME) par l'étude du fractionnement isotopique associé [Elsner *et al.*, 2012 ; Morasch *et al.*, 2011 ; Elsner, 2010 ; Meckenstock *et al.*, 2004 ; Hunkeler *et al.*, 2001]. Quelques résultats de laboratoire et d'études terrain seront cités ici.

En laboratoire, Hunkeler *et al.* (2001) ont montré que la biodégradation du benzène est accompagnée d'un fractionnement isotopique de l'hydrogène et du carbone. Ils ont étudié deux souches de bactéries (*Acinetobacter* sp. et *Burkholderia* sp.) et ils ont obtenu des facteurs d'enrichissement ϵ en ^{13}C du benzène de $-1,46 \pm 0,06$ % et

-3,53 ± 0,26 ‰. Ces facteurs d'enrichissement du carbone sont similaires à ceux trouvés dans d'autres études concernant la biodégradation des BTEX. Par exemple, Meckenstock *et al.* (1999) ont trouvé un facteur d'enrichissement de -2,6 ± 0.0017 ‰ pour la dégradation aérobie du toluène avec une autre souche de bactérie (*Pseudomonas putida*). D'autres valeurs de ϵ tirées de la littérature pour la biodégradation du toluène et du benzène sont proposées dans le Tableau IV-1, pour différentes bactéries, dans des conditions aérobie et anaérobies. Ainsi, l'analyse isotopique du carbone semble être prometteuse pour détecter la biodégradation des BTEX, et l'on peut noter que le fractionnement dépend de la voie métabolique de la bactérie qui a dégradé le polluant.

TABLEAU IV-1 : DONNÉES DE LA LITTÉRATURE SUR LES VALEURS DE ϵ POUR LA BIODEGRADATION DES BTEX EN FONCTION DES CONDITIONS (AÉROBIES OU ANAÉROBIES) ET DES BACTÉRIES DÉGRADANTES.

BTEX dégradés	Conditions	Espèces bactériennes	Facteurs d'enrichissement du carbone ϵ (‰)	Références
Benzène	aérobies	<i>Rhodococcus opacus</i>	-1.3 ± 0.2	[Fischer <i>et al.</i> , 2008]
		<i>Pseudomonas putida</i> strain ML2	-0.7 ± 0.1	
		<i>Ralstonia pickettii</i>	-1.7 ± 0.2	
		<i>Cupriavidus necator</i>	-4.3 ± 0.4	
		<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	-2.6 ± 0.8	
Toluène	aérobies	<i>Ralstonia pickettii</i>	-1.1 ± 0.2	[Morash <i>et al.</i> , 2002]
		<i>Pseudomonas putida</i> strain F1	-0.4 ± 0.3	
		<i>Pseudomonas putida</i> strain mt-2	-3.3 ± 0.3	
	anaérobies	<i>Thauera aromatica</i>	-1.7 ± 0.2	[Meckenstock <i>et al.</i> , 1999]
		<i>Geobacter metallireducens</i>	-1.8 ± 0.3	

Sur le terrain, Morash *et al.* (2011) ont utilisé le rapport isotopique du carbone des BTEX pour quantifier la biodégradation des composés mono-aromatiques *in situ*. Le site d'étude était celui d'une ancienne usine à gaz montrant, entre autre, de fortes pollutions par des hydrocarbures mono et poly aromatiques. Deux campagnes de prélèvement d'eau de puits ont permis de mettre en évidence un enrichissement isotopique du carbone des composés mono-aromatique entre les échantillons contaminés et les échantillons non contaminés. Les BTEX résiduels deviennent enrichis en ^{13}C à mesure que les échantillons entrent dans la zone contaminée en cours de biodégradation (différence de $\delta^{13}\text{C}$ mesurés par *compound-specific stable isotope analysis* (CSIA) de 3.8 ‰ pour le benzène, 2,6 ‰ pour le toluène, 1,3 ‰ pour l'éthyle-benzène et 4,6 ‰ pour le m-xylène).

En comparaison, sur le site d'une autre usine à gaz, des différences de $\delta^{13}\text{C}$ de 3,3 et de 3,6 ‰ ont été mesurées dans le cas de la biodégradation du benzène et du naphthalène respectivement (Griebler *et al.*, 2004) [Griebler *et al.*, 2004].

2. ANALYSE DU CO₂

Le suivi de l'efficacité d'une dépollution des sols ou des eaux peut aussi se faire par la mesure de flux d'émissions en surface (avec variations spatiale et temporelle) de gaz traces tels que CO₂, CH₄, N₂O, et H₂S, issus des processus de dégradation dans les sols (rapport Brgm Stockinnov BRGM/RP-57407-FR). Cependant, très peu d'études concernant l'analyse du CO₂ au cours d'une biodégradation ont été recensées. Ce paragraphe détaille donc les trois études principales.

Aggarwal et Hinchee (1991) ont étudié l'isotopie du carbone du CO₂ pour le monitoring d'une biodégradation aérobie d'hydrocarbures. L'étude porte sur trois sites aux Etats-Unis contaminés par des fuites de fuel depuis plusieurs années. Les conditions climatiques y sont différentes :

- Hill : aride (précipitations 20 cm/an) ;
- Patuxent : tempéré ;
- Tyndall : subtropical (précipitations 100 cm/an).

Des mesures de $\delta^{13}\text{C}$ du CO_2 (Tableau IV-2) et de concentration du CO_2 (Tableau IV-3) ont été réalisées à partir d'échantillons d'air du sol pompés dans des sacs en plastique (Tedlar®).

TABLEAU IV-2 : RÉSULTATS D'AGGARWAL ET HINCHEE (1991) : COMPARAISON DES $\delta^{13}\text{C}$ DU CO_2 TROUVÉS POUR LES TROIS SITES EXPÉRIMENTAUX, EN ZONE CONTAMINÉE ET NON CONTAMINÉE

Sites	$\delta^{13}\text{C}$ du CO_2 (‰) Non contaminé	$\delta^{13}\text{C}$ du CO_2 (‰) Contaminé
Hill	-23,6	-28,4
Patuxent	-24,5	-28,4
Tyndall	-18,4	-23,3

TABLEAU IV-3 : RÉSULTATS D'AGGARWAL ET HINCHEE (1991) : COMPARAISON DES CONCENTRATIONS DE CO_2 TROUVÉES EN ZONE CONTAMINÉE ET NON CONTAMINÉE.

$[\text{CO}_2]$ (%) Non contaminé	$[\text{CO}_2]$ (%) Contaminé
0,2 à 2,2	0,6 à 13,6

On observe ici une augmentation de la concentration volumique en CO_2 ainsi qu'un appauvrissement de ce CO_2 en ^{13}C dans les zones polluées des différents sites expérimentaux. Les auteurs en ont conclu que ces variations étaient dues à la biodégradation aérobie des hydrocarbures et que la technique de l'analyse isotopique du carbone était efficace pour la détection de la biodégradation.

Pour le monitoring de la biodégradation (suivi dans le temps), des expériences en laboratoire ont été réalisées par Jackson et Pardue (1999). Ils ont suivi la minéralisation (conversion en CO_2 et H_2O) de l'héxadécane par la mesure de $\delta^{13}\text{C}$ et de la concentration du CO_2 . Ils ont comparés le CO_2 produit par les bactéries dans un milieu non pollué (matière organique « normale » consommée) et celui produit dans un milieu pollué (matière organique « normale » et polluant consommés). La production de CO_2 est plus importante en milieu pollué car il y a plus de source de carbone et la signature isotopique du CO_2 tend vers celle du polluant. Ils en ont conclu que cette méthode est un moyen approprié pour suivre la minéralisation des polluants dans des environnements où il existe des différences de rapport $\delta^{13}\text{C}$ entre les polluants et la matière organique disponible pour les bactéries.

Hall *et al.* (1999) ont obtenu le même genre de résultats en laboratoire pour la dégradation du phénol avec deux souches de bactéries aérobies. Ils ont montré un appauvrissement de 5,6 ‰ en ^{13}C du CO_2 produit pour la souche *Pseudomonas putida*.

3. CONCLUSION

Il a été montré que la détection de la biodégradation des hydrocarbures pouvait se faire par des mesures de concentration de CO₂ et du δ¹³C de ce CO₂. L'évolution de la signature isotopique du CO₂ au cours de la biodégradation a également été étudiée en laboratoire et s'est révélée efficace. Cependant, les articles étudiés ne sont pas récents (années 90) et ils ne développent pas l'aspect monitoring (suivi dans le temps) de la biodégradation sur le terrain.

Parallèlement, des articles portent sur le suivi d'une biodégradation des composés aromatiques par l'analyse isotopique des polluants résiduels (*Compound Specific Isotope Analysis*, CSIA), en laboratoire et sur le terrain. Ici, il a été montré que, dans l'hypothèse d'une bonne connaissance des paramètres de terrain, l'analyse isotopique s'avère être un outil efficace de surveillance.

Il semble donc que si le suivi est possible sur les polluants résiduels, il l'est aussi sur le CO₂ produit. Des études supplémentaires sont encore nécessaires à réaliser pour le prouver. De plus, il apparaît que les études portant sur le suivi du CO₂ datent des années 90 (remplacées ensuite par des études CSIA). Cela laisse à penser que le simple suivi du CO₂ et de son rapport isotopique peut servir comme un moyen de détection rapide pour obtenir une première information directement en surface mais, pour certifier le processus de dégradation, d'autres informations complémentaires seraient nécessaires.

PARTIE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

V. MATÉRIEL ET MÉTHODES – EXPÉRIENCES EN COLONNES

L'objectif principal de cette thèse était de développer des colonnes de percolation permettant de synthétiser une pollution dans un aquifère en cours de biodégradation, dans des conditions maîtrisées, afin de tester la faisabilité d'un suivi par la combinaison de deux méthodes non destructrices : la mesure de la résistivité complexe et l'analyse du CO₂ (sa concentration et la signature isotopique de son carbone). Cet objectif correspond à la tâche 4 du projet BIOPHY, monitoring géophysique et analyse de gaz sur colonne. L'objectif de cette tâche est de comparer, à l'échelle du laboratoire, les indicateurs indirects de biodégradation développés dans le projet (analyse de gaz, propriétés électriques) à des indicateurs directs de biodégradation (comptage bactérien, isotopie du carbone, analyse de la concentration en hydrocarbure).

Dans ce chapitre, sera présentée la conception de colonnes de sable sur lesquelles il a fallu installer à la fois un dispositif de mesure de la résistivité complexe et un système de prélèvement des gaz en tête de colonne pour une analyse du CO₂ (sa concentration et la signature isotopique de son carbone). Ces colonnes ont aussi été équipées de points de prélèvement de fluide et de sol afin de pouvoir faire des comptages bactériens et des analyses physico-chimiques et isotopiques, ainsi que d'un système de circulation du fluide et d'apport en oxygène afin d'alimenter les bactéries.

Les conditions d'expérimentation ont été simplifiées au maximum : le sable de Fontainebleau a été choisi comme matrice pour les colonnes. Principalement composé de silice (> 99%, cf. Annexe 4), il est inerte dans la gamme de pH utilisé. La molécule d'hydrocarbure à dégrader était le toluène, un composant aromatique volatile présent dans les essences sans plomb 95 et 98. La souche bactérienne utilisée était *Rhodococcus wratislaviensis* IFP 2016, connue pour ses capacités de dégradation des BTEX (Benzène, Toluène, Ethyle-benzène, Xylènes) en conditions aérobies [Auffret *et al.*, 2009].

A. VUE D'ENSEMBLE DU MONTAGE EXPÉRIMENTAL

1. STRUCTURE ET DIMENSIONNEMENT DES COLONNES

D'après notre étude bibliographique (cf. Annexe 3), le volume des colonnes utilisées pour réaliser des mesures de PP dans le cadre de l'étude de l'activité bactérienne est très variable d'une expérience à l'autre (de 0,1 à 60 L pour les articles étudiés). Cependant, le rapport diamètre / hauteur des colonnes est plus constant et il se situe autour de 0,2. Le dimensionnement des colonnes BIOPHY a tenu compte de plusieurs paramètres :

- Pour pouvoir installer plusieurs paires d'électrodes de potentiel le long de la colonne pour les mesures PP, ainsi que pour laisser un espace gazeux en tête de colonne pour les émissions de CO₂, la hauteur de la colonne devait être assez importante ;
- Un diamètre trop faible aurait entraîné des effets de paroi, susceptibles de modifier la configuration de l'écoulement ;
- Il fallait également des dimensions assez grandes qui permettent un échantillonnage quotidien de liquide assez conséquent (plusieurs mL à dizaines de mL).
- Cependant, le dimensionnement a été limité pour la facilité de mise en œuvre : plus la colonne est grande, plus les quantités de liquide et de matrice de remplissage sont importantes et multiplient d'autant la durée des différentes étapes de préparation. De plus, des dimensions très larges augmentent le risque d'anisotropie de la matrice non consolidée [Kemna *et al.*, 2012].

L'étude de la littérature rapporte que le matériau principalement utilisé dans les expériences est le PVC (Polychlorure de vinyle). Cependant, le toluène utilisé dans les expérimentations altère le PVC. C'est pourquoi, un matériau plus résistant a dû être choisi. Le choix s'est porté sur du PVDF (Polyfluorure de vinylidène ou en anglais PolyVinylidene Fluoride) de ARKEMA ou Kynar®. En effet, le PVDF est un polymère (du fluorure de vinylidène) souvent utilisé pour des applications nécessitant une certaine résistance aux solvants [Schweitzer, 2004].

Finalement, les colonnes ont été construites à partir de tubes de 15 cm de diamètre et de 50 cm de long en PVDF. Le rapport diamètre / hauteur est de 0,3 et le volume total d'une colonne est de 8,8 L.

Les colonnes sont remplies de sable jusqu'à 45 cm de hauteur, afin de laisser 5 cm libres pour le dégazage du CO₂ produit pendant la biodégradation. Le choix de la matrice de remplissage s'est porté sur le sable de Fontainebleau (cf. Annexe 4), car il est constitué à 99,83% de silice, il est pur et il a des caractéristiques granulométriques relativement homogènes. De plus, il constitue un matériau de base inaltérable jusqu'à pH 9,75 (dans le domaine 0 à 9,75 le quartz est très faiblement soluble) et, de ce fait, il est particulièrement intéressant pour l'interprétation des analyses chimiques.

Les colonnes ont été équipées d'orifices de prélèvement ou de fixation d'électrodes pour pouvoir effectuer différents types de mesure et ainsi réaliser un suivi complet de la biodégradation du toluène (Figure V-1). Les premières installations ont permis de mettre en place les deux méthodes de suivi dont il fallait tester l'efficacité.

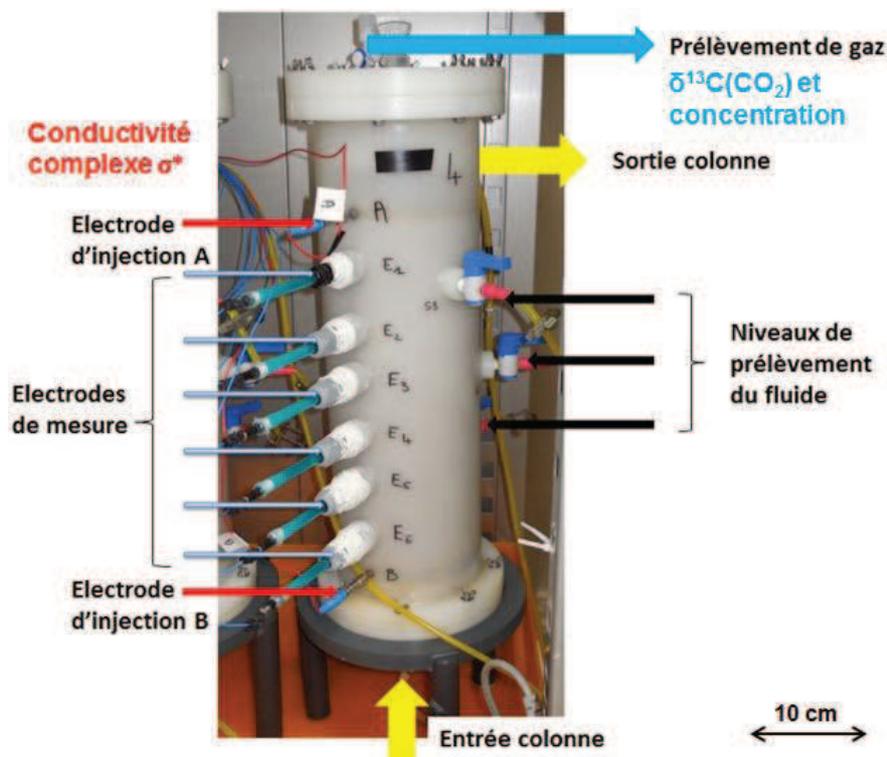


FIGURE V-1: PHOTO ANNOTÉE D'UNE COLONNE BIOPHY. À GAUCHE, ON RETROUVE L'ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRE AUX MESURES DE RÉSISTIVITÉ ÉLECTRIQUE COMPLEXE : DEUX ÉLECTRODES D'INJECTION (A ET B) SONT SITUÉES À CHAQUE EXTRÉMITÉ DE LA COLONNE ; SIX ÉLECTRODES DE POTENTIEL SONT RÉPARTIES SUR LA HAUTEUR DE LA COLONNE. EN HAUT DE LA COLONNE, UN ROBINET PERMET DE PRÉLEVER DU GAZ EN TÊTE DE COLONNE AFIN DE POUVOIR ANALYSER LA QUANTITÉ DE CO₂ AINSI QUE SA SIGNATURE ISOTOPIQUE. SUR LA DROITE, IL Y A TROIS ROBINETS (S1, S2 ET S3) POUR DES PRÉLÈVEMENTS DE FLUIDE EN VUE D'ANALYSES CHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES COMPLÉMENTAIRES.

Les mesures géophysiques sont rendues possibles par la présence de deux électrodes d'injection circulaires (A et B), situées en haut et en bas de la colonne. Elles sont constituées d'un alliage inoxydable à base de Nickel/Cobalt, référencé MP35N de Ropa Stahl GmbH (Schweigen, Allemagne). Les électrodes de potentiel sont au nombre de 6 (E1, E2, E3, E4, E5 et E6). Elles sont réparties tout le long de la colonne afin de mesurer la résistivité électrique DC ρ et la résistivité complexe ρ^* du milieu à différents niveaux de la colonne. Ces électrodes étaient initialement des électrodes Ag/AgCl du commerce (*electrode disc* 4.0 mm, Warner Instruments, Hamden, USA). Leur stabilité n'étant pas assurée dans le temps au-delà de 10 jours de fonctionnement, des électrodes Cu/CuSO₄ ont été fabriquées à partir du modèle développé par Mainault (2004) (cf. paragraphe B et Annexe 7 pour plus de détails).

Un robinet situé en tête de colonne permettait de prélever du gaz afin d'y mesurer la concentration en CO₂ au cours du temps, ainsi que l'évolution du rapport isotopique du carbone de ce CO₂ (cf. paragraphe C).

De plus, afin de suivre les paramètres physico-chimiques et microbiologiques de la colonne, d'autres analyses ont été rendues possibles grâce à trois orifices munis de robinets permettant le prélèvement de fluide en cours d'expériences à trois niveaux différents, repartis sur la longueur de la colonne : S1 (bas), S2 (milieu) et S3 (haut). En effet, il est recommandé de réaliser les analyses physico-chimiques et les mesures PP sur les mêmes colonnes afin d'éviter une incertitude liée à des différences entre colonnes [Kemna et al., 2012] (conditionnement, évolution de la croissance des bactéries différente...).

Un dispositif de porte-sondes en sortie de colonne a pour vocation de mesurer en ligne et en continu l'évolution des différents paramètres physico-chimiques (pH, Eh, température, conductivité et teneur en oxygène dissous) du fluide de sortie au cours de l'expérience. Un système d'acquisition, composé de six transmetteurs M300 (Mettler Toledo, Analyse industrielle, Paris) branchés sur une centrale d'acquisition multivoies (Modèle 2700 de Keithley Instruments, Inc. Cleveland, Ohio, USA), permet la mesure en temps réel et l'archivage des données physico-chimiques sur un ordinateur (qui gère *via* le logiciel Xlink de Keithley la centrale d'acquisition).

2. SYSTÈME DE CIRCULATION DES FLUIDES

La colonne fait partie d'un dispositif plus complet qui comprend aussi un flacon d'alimentation principal contenant le milieu de culture des bactéries et le toluène à dégrader, une alimentation séparée d'H₂O₂ diluée qui approvisionne le milieu en oxygène afin de stimuler les processus aérobies, le porte-sondes et une pompe péristaltique qui permet la circulation du fluide à un débit constant dans le système. Le dispositif est dédoublé pour permettre de travailler avec deux colonnes en même temps (Figure V-2). L'ensemble est placé dans une enceinte thermique aéro-régulée à 25°C (POL-ECO APARATURA, Wodzislaw Slaski, Pologne). En effet, il est important de garder le contrôle sur la température, car c'est un paramètre qui influence la résistivité électrique, ainsi que le métabolisme des bactéries.

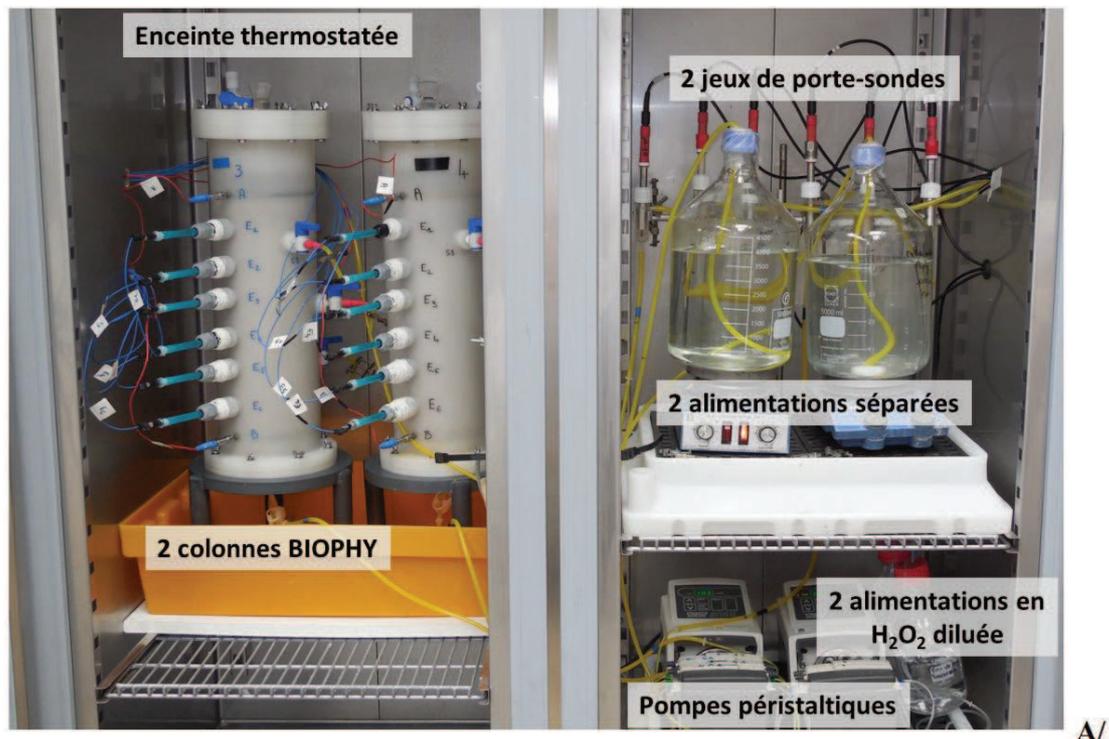
La saturation des colonnes est réalisée avec le contenu de la bonbonne d'alimentation de manière ascendante, afin d'éviter au maximum la formation de cheminements préférentiels. La montée du front de saturation est opérée à très faible débit et de manière progressive, afin d'assurer l'évacuation de l'air présent dans les pores sans création d'anisotropie (décollement de la matrice, poches de phase liquide), ainsi que pour ne pas déstructurer la matrice (entre 250 et 500 mL/h).

Deux types de circulation des fluides peuvent être utilisés (Figure V-2) :

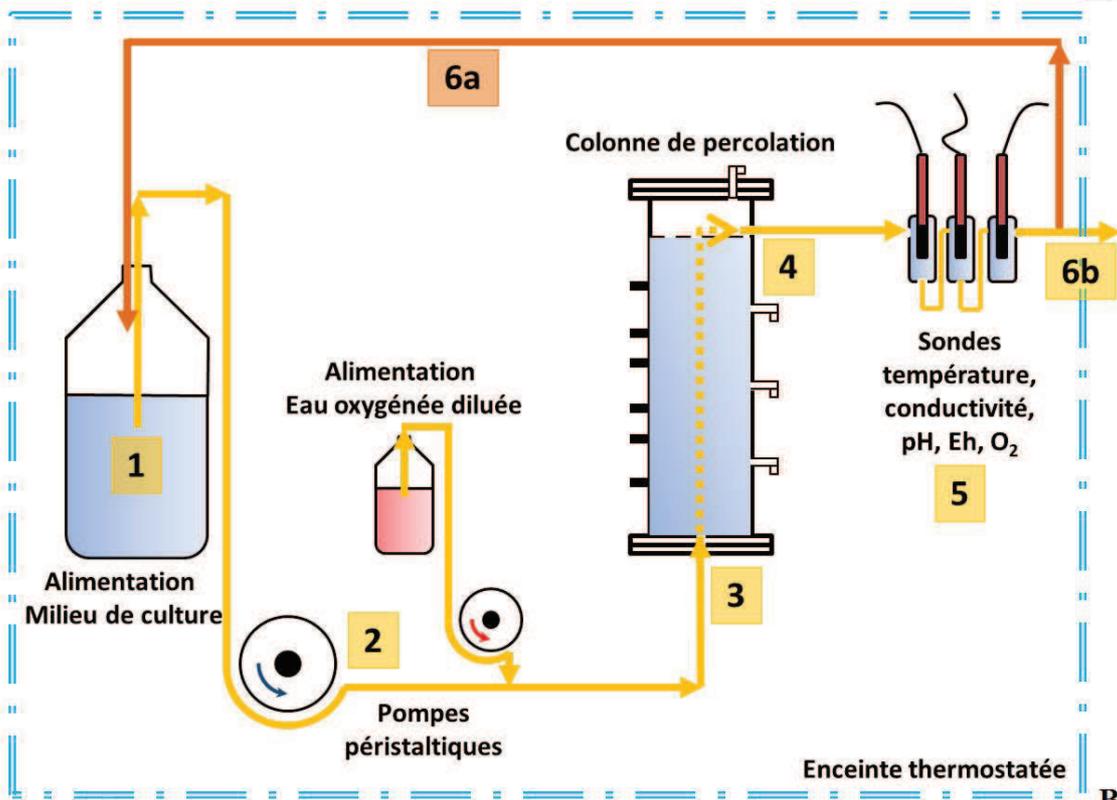
- Circuit en boucle fermée : le fluide qui sort de la colonne repart dans l'alimentation ;
- Circuit en boucle ouverte : le fluide qui sort de la colonne est jeté et l'alimentation est renouvelée régulièrement.

La première option a l'avantage de faciliter le maintien des conditions microbiologiques dans la colonne. En effet, le fluide circulant est moins en contact avec l'extérieur et les contaminations accidentelles peuvent être limitées.

Cependant, pour l'interprétation des analyses chimiques (bilans de masse), le premier système est plus compliqué à appréhender. En effet, il faut tenir compte de ce que l'on injecte directement dans l'alimentation, ainsi que tout ce qui est réinjecté à partir de la sortie de la colonne (toluène pas encore dégradé, bactéries planctoniques...). De plus, pour se rapprocher des conditions de l'aquifère, la deuxième option, en circuit ouvert, est plus correcte. En effet, il s'agit d'un système en flux continu dont les paramètres d'entrée sont contrôlés. Dans le cadre des expérimentations de ce travail, les deux cas ont été testés (cf. paragraphe E).



A/



B/

FIGURE V-2 : A/ PHOTOGRAPHIE DE DEUX COLONNES BIOPHY ET LEUR ALIMENTATION PLACÉES DANS UNE ENCEINTE THERMIQUE AERO-RÉGULÉE À 25°C. B/ SCHÉMA DU CIRCUIT HYDRAULIQUE : 1/ LE CIRCUIT COMMENCE À L'ALIMENTATION, COMPOSÉE DE MILIEU DE CULTURE AVEC OU SANS TOLUÈNE ; 2/ LE FLUIDE EST ENTRAINÉ PAR UNE POMPE PÉRISTALTIQUE VERS L'ENTRÉE DES COLONNES ; 3/ LE FLUIDE D'ALIMENTATION AINSI QUE DE L'H₂O₂ DILUÉE ENTRE EN BAS DE LA COLONNE ET MONTE PAR PERCOLATION ; 4/ LE FLUIDE SORT PAR DÉBORDEMENT, 5 CM AVANT LE SOMMET DE LA COLONNE ; 5/ LE FLUIDE DE SORTIE PASSE PAR UN PORTE-SONDES : LE PH, LE POTENTIEL REDOX, LA TEMPÉRATURE, LA CONDUCTIVITÉ ET L'OXYGÈNE DISSOUS SONT MESURÉS. ENFIN, 6a/ LE FLUIDE RETOURNE DANS L'ALIMENTATION ET REPART DANS LE CIRCUIT (CIRCUIT FERMÉ) OU 6b/ LE FLUIDE SORT DU CIRCUIT (BOUCLE OUVERTE).

3. DÉTERMINATION DE LA POROSITÉ

Avant d'entamer les séries d'expériences, la porosité du sable et l'écoulement dans la colonne ont été caractérisés. Cette caractérisation a été effectuée par un traçage conductimétrique : la progression d'une solution de KCl à 0,1 mol/L, injectée dans une colonne saturée en eau déminéralisée, est suivie par des mesures de résistivité électrique menées sur 5 hauteurs de la colonne (couples de mesure E1-E2, E2-E3, E3-E4, E4-E5 et E5-E6). De plus, l'arrivée en sortie de colonne de cette solution très conductrice est détectée par la sonde de conductivité en sortie (une mesure toutes les 30 secondes). Pendant l'essai, le débit de la pompe péristaltique est maintenu constant à 500 mL/h.

La courbe de l'évolution de la conductivité en fonction du temps permet alors d'identifier le régime hydrodynamique et de déterminer la porosité dans la colonne (Figure V-3). Les résultats de géophysique obtenus permettent de penser que la colonne est homogène. En effet, la progression du front de la solution de KCl est constante en fonction de la hauteur de la colonne. Le suivi de conductivité en sortie donne, par lecture graphique, un temps de rétention de l'eau dans la colonne de 8,50 heures, ce qui correspond à un volume d'eau de 4,25 L pour un débit de 500 mL/h. A cela, il faut soustraire 90 mL de volumes « morts » (tuyaux et porte-sondes), ce qui donne un **volume poral de 3,35 L**.

Par ailleurs, la valeur de la porosité a été évaluée par pesée : le poids de la colonne remplie de sable a été déterminé à sec, puis après saturation avec de l'eau distillée. Le poids d'eau contenu dans la colonne est ainsi obtenu. Connaissant le volume de la colonne ainsi que le volume de sable, **une porosité $\Phi = 39 \%$** en a été déduite.

Remarque : détail du calcul de la porosité

Poids sable sec = 12,7149 kg ; Volume de sable = 8,6102 L

Poids eau distillée = poids sable mouillé - poids sable sec = 16,087 – 12,7149 = 3,3721 kg

⇒ Volume d'eau = 3,3721 L (à comparer aux 3,35 L trouvés par suivi conductimétrique)

⇒ $\Phi = (\text{Volume d'eau distillée} / \text{Volume de sable}) * 100 = (3,3721 / 8,6102) * 100 = 39,164\%$

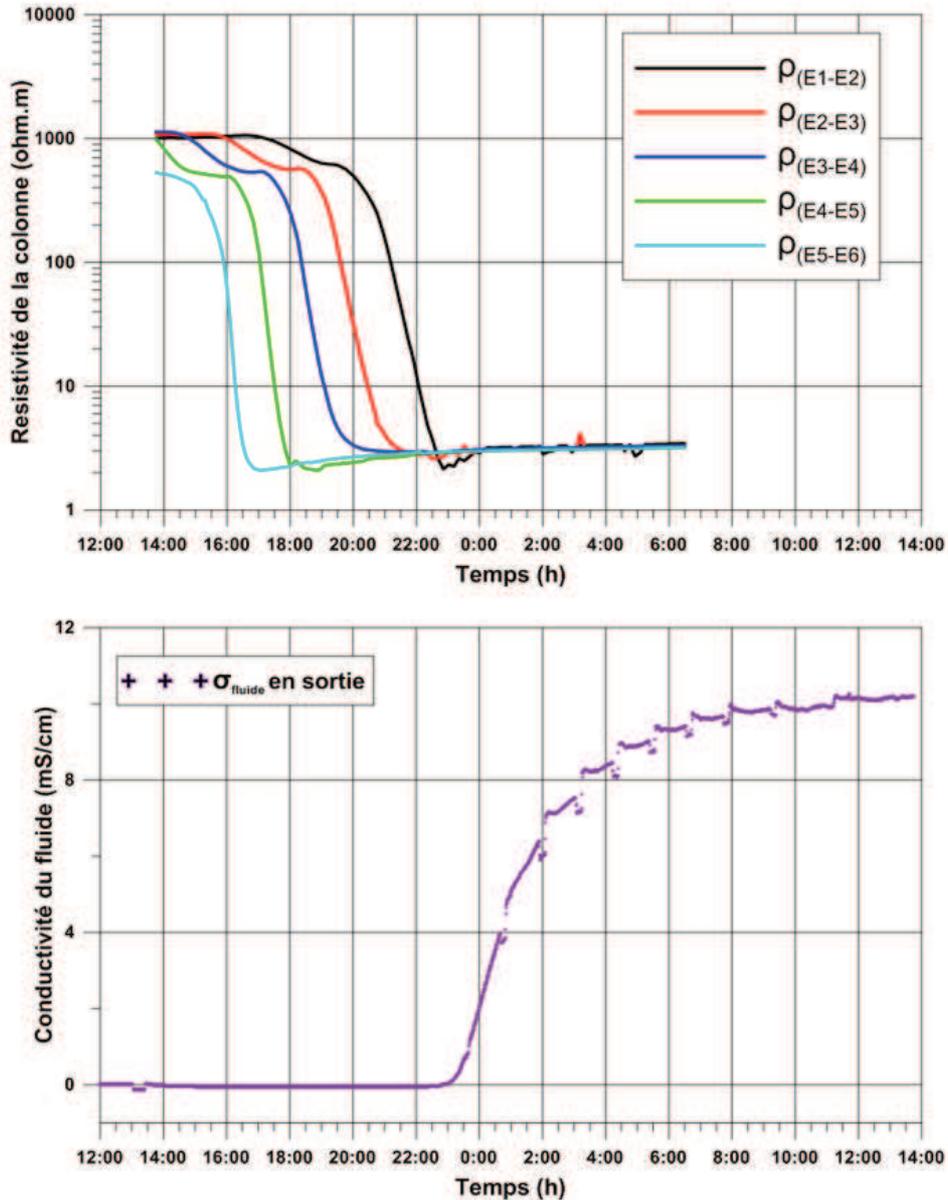


FIGURE V-3 : TRACÉ DU PASSAGE D'UNE SOLUTION DE KCl 0,1 M, À DÉBIT CONSTANT $Q = 500 \text{ mL/h}$, À TRAVERS UNE COLONNE DE SABLE SATURÉ EN EAU DISTILLÉE. EN HAUT : SUIVI GÉOPHYSIQUE : ÉVOLUTION DE LA RÉSISTIVITÉ ÉLECTRIQUE AU COURS DU TEMPS À 5 NIVEAUX DE LA COLONNE ; EN BAS : SUIVI PAR SONDE CONDUCTIMÉTRIQUE : ÉVOLUTION DE LA CONDUCTIVITÉ DU FLUIDE EN SORTIE DE COLONNE.

4. LES BACTÉRIES ET LEUR MILIEU DE CULTURE

La population bactérienne utilisée durant toutes les expérimentations est issue de la souche *Rhodococcus wratislavinesis* IFP 2016 (*R. w.*), brevetée par l'IFP-EN (Institut Français du Pétrole – Energies Nouvelles) pour son efficacité lors de la dégradation des BTEX (Benzène, Toluène, Ethyle-benzène, Xylènes) [Auffret *et al.*, 2009]. Les souches ont été gracieusement prêtées par l'IFP-EN pour des expérimentations dans le cadre du projet BIOPHY.

C'est une bactérie de type Gram+ aérobique qui présente plusieurs types de morphologie en fonction de ses étapes de croissance et du substrat sur lequel elle est cultivée. Sur du toluène, au bout de quelques jours de culture, des bâtonnets qui peuvent former des chainettes sont observés (Figure V-4-1). Cette souche est capable de constituer un biofilm (Figure V-4-2). Pendant sa thèse, Samia Dhahri (2013) a pu imager ces bactéries par microscopie à force atomique et elle a pu observer des liens entre les cellules (Figure V-4-3 et 4).

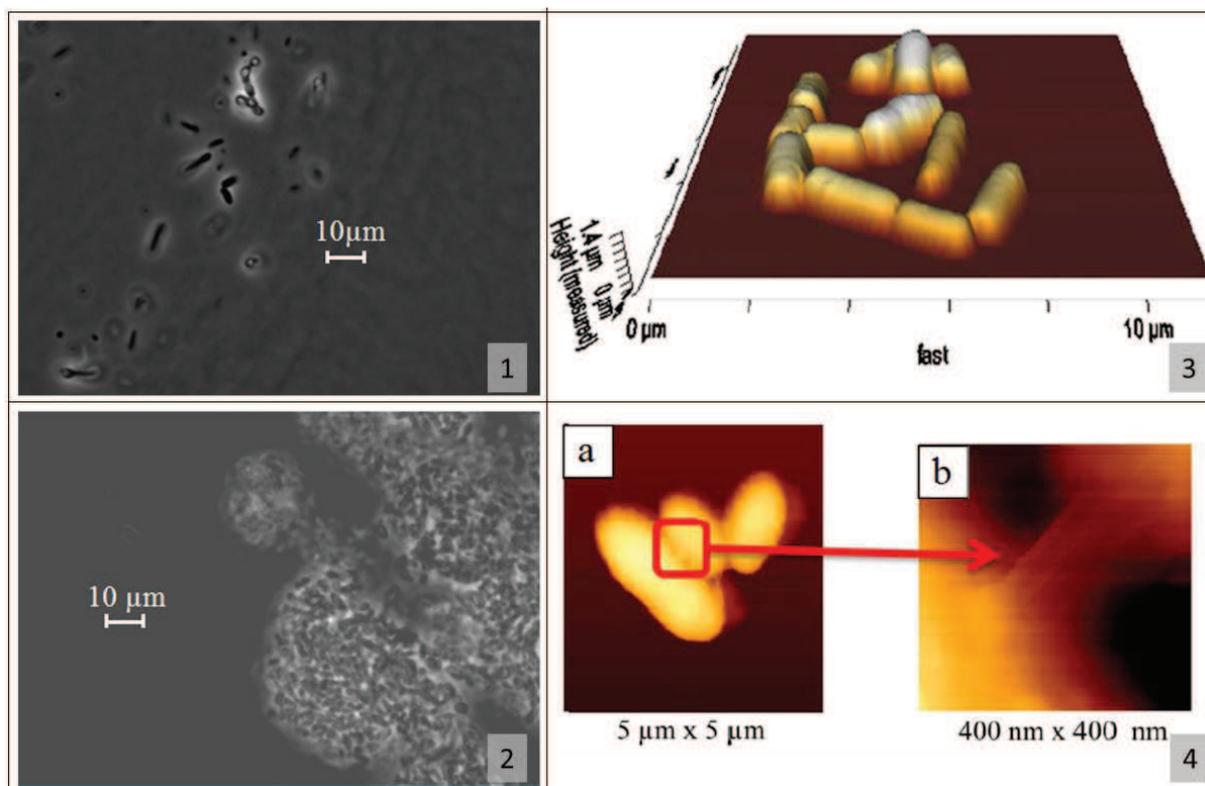


FIGURE V-4 : IMAGES DE *RHODOCOCCUS WRATISLAVIENSIS*. 1/ IMAGE AU MICROSCOPE OPTIQUE DE BACTÉRIES PLANCTONIQUES ; 2/ IMAGE AU MICROSCOPE OPTIQUE DE BACTÉRIES EN BIOFILM ; 3/ BACTÉRIES IMAGÉES PAR AFM (MICROSCOPIE À FORCE ATOMIQUE) [DHAHRI, 2013] ; 4/ LIENS ENTRE BACTÉRIES IMAGÉS PAR AFM [DHAHRI, 2013].

Le milieu minimum utilisé pour cultiver ces bactéries est riche en oligo-éléments, vitamines et sels minéraux (MgSO_4 : $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; NH_4NO_3 : $1,5 \text{ g.L}^{-1}$; CaCl_2 : $0,04 \text{ g.L}^{-1}$). Il est tamponné à pH 6,4 grâce à la solution tampon dihydrogène/monohydrogène-phosphates de potassium ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) (cf. Annexe 5).

La seule source de carbone disponible pour les bactéries est le toluène, ajouté à raison de $1036 \mu\text{L}$ pour 4L d'alimentation.

La source d'oxygène nécessaire au métabolisme aérobie de *R. w.* est assurée par l'ajout d' H_2O_2 diluée (10 mL d' H_2O_2 à 30 % dans 1 L d'eau déminéralisée) [Tarasov *et al.*, 2004], diffusée à faible débit *via* une bonbonne d'alimentation et une pompe péristaltique séparées du circuit principal (Figure V-2).

5. POTENTIEL ZÊTA DES BACTÉRIES

Lorsqu'une particule se déplace, elle déplace avec elle sa couche de Stern et une partie de sa couche diffuse. Il existe alors un plan de cisaillement situé entre la couche de Stern et la couche diffuse qui marque une différence en termes de vitesse du fluide [Ruiz, 2009] (Figure V-5-a). Le fluide compris entre la surface de la particule et ce plan de cisaillement possède une vitesse nulle (par rapport à la particule) tandis que le fluide situé au-delà de ce plan possède une vitesse non nulle. La valeur moyennée du potentiel électrostatique au niveau de la surface du plan de cisaillement est appelé potentiel zêta, noté ζ . Sa valeur est comprise entre le potentiel associé à la couche de Stern et le potentiel de la couche diffuse $\psi_d < \zeta < \psi_s$ [Ruiz, 2009] (Figure V-5-b).

La position du plan de cisaillement pour une sphère ayant une surface lisse est proche du plan définissant la couche de Stern, alors que pour une surface avec une structure polymérique, le plan de cisaillement se situe plus loin et $\zeta \ll \psi_s$ [Ruiz, 2009]. Le potentiel zêta des bactéries permet néanmoins de caractériser la charge portée par ces bactéries [Lebleu, 2007].

Le principe de la mesure repose sur l'évaluation de la mobilité électrophorétique m_E [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$] de la bactérie. Sous l'action d'un champ électrique E , elle se déplace à la vitesse v [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]. Sa mobilité correspond alors au rapport entre la vitesse et la valeur du champ électrique :

$$m_E = \frac{v}{|E|} \quad \text{ÉQUATION V-1}$$

avec $|E|$ le module du champ électrique E [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$].

Le potentiel zêta ζ [V] est défini comme le potentiel au plan de cisaillement :

$$\zeta = \frac{4\pi\eta m_E}{\varepsilon} \quad \text{ÉQUATION V-2}$$

avec m_E la mobilité électrophorétique [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$], η la viscosité du milieu et ε la constante diélectrique du milieu.

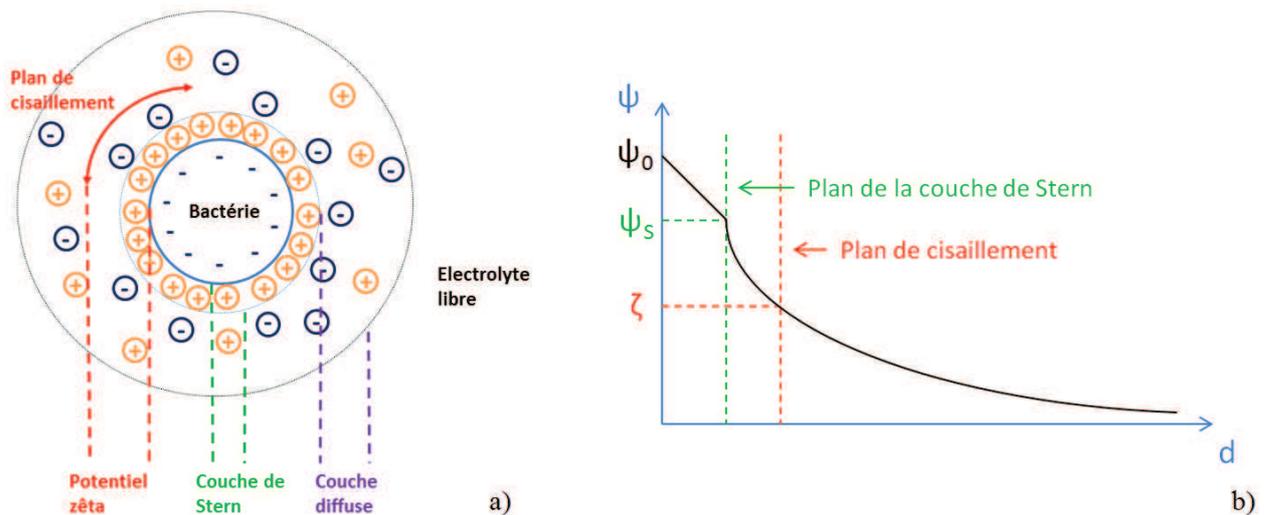


FIGURE V-5 : a) REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU POTENTIEL ZÊTA D'UNE BACTÉRIE ; b) EVOLUTION DU POTENTIEL ELECTROSTATIQUE EN FONCTION DE LA DISTANCE PAR RAPPORT A LA SURFACE CHARGÉE DE LA BACTÉRIE [RUIZ, 2009].

Dans le cas des mesures du potentiel zêta effectuées sur des suspensions bactériennes, les caractéristiques de l'électrolyte sont mesurées à part (mesure sur milieu de culture) puis, sur la suspension de bactéries dans le même milieu de culture.

Au cours d'une des expérimentations, il a été possible de mesurer le potentiel zêta de la suspension bactérienne d'une colonne BIOPHY inoculée par *R. w.* L'appareil utilisé est un NANO-ZS de chez Malvern Ltd (Worcestershire, UK).

B. MESURE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE

1. APPAREILS DE MESURE

Différents appareils ont pu être utilisés au cours des différentes expérimentations. Tout d'abord, les mesures de résistivités classiques réalisées pour la caractérisation du régime hydraulique de la colonne (cf. paragraphe A-1) ont été faites à l'aide d'un Syscal R1 de chez Iris Instruments (Orléans, France), avec le logiciel d'acquisition Comsys Sp.

Les mesures de résistivité complexe ont été réalisées principalement avec un GDP 32II de chez Zonge International (Tucson, Arizona, USA). C'est un récepteur multifonctions, généralement utilisé pour des acquisitions sur le terrain [Williams *et al.*, 2009], mais rarement dans son mode *Lab Roks* pour des mesures SIP de laboratoire. Un protocole d'utilisation a été adapté aux expérimentations de ce projet et est proposé en annexe 6.

Les mesures de résistivité avec le GDP ont pu être réalisées entre 125 mHz (voire 63 mHz) et 64 Hz (voire 128 Hz). Généralement, 9 fréquences fondamentales et leur deux premières harmoniques ont été prises en compte pour réaliser les spectres de résistivité. Ce choix est un compromis entre le temps d'acquisition qui ne pouvait être trop long (environ 1 heure par colonne) et la qualité du spectre.

Un potentiostat/galvanostat 273A (Princeton Applied Research, PAR), normalement utilisé en spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE ou en anglais EIS) en mode trois ou quatre électrodes, était également disponible. Des mesures en mode GEIS (*Galvanostatic Electrochemical Impedance Spectroscopy*), avec quatre électrodes, ont été testées. La gamme de fréquence utilisée était ici plus large, de 800 μ Hz à 100 kHz. Un autre potentiostat/galvanostat, le 2273 de PAR, plus récent a également été utilisé.

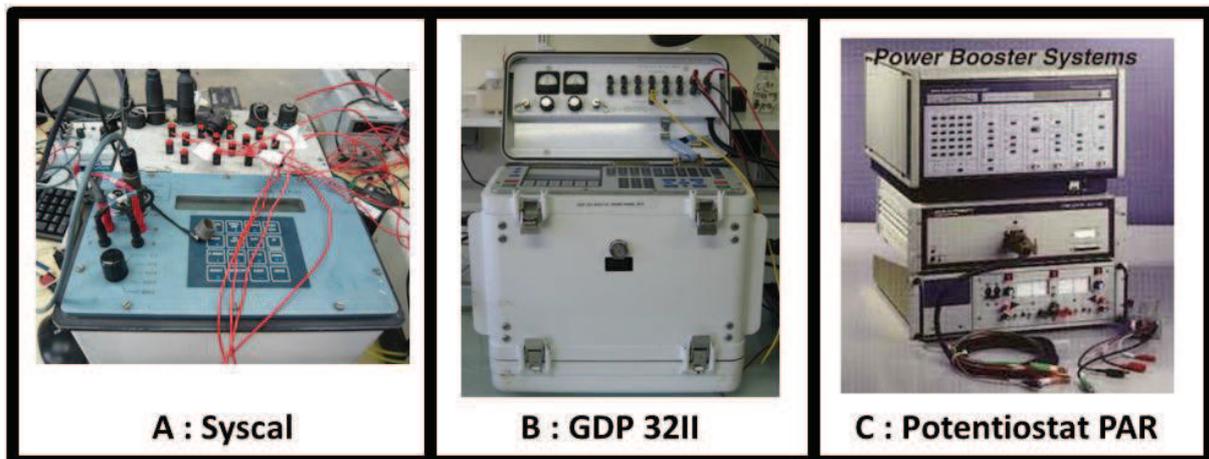


FIGURE V-6 : APERÇU DES APPAREILS UTILISÉS AU LABORATOIRE POUR LES MESURES ÉLECTRIQUES : A/ SYSCAL R1 POUR LA MESURE DE RÉSISTIVITÉ CLASSIQUE ; B/ GDP 32II POUR LES MESURES SIP ET C/ POTENTIOSTAT-GALVANOSTAT (MODÈLE 273A DE PAR) ET ANALYSEUR DE LA RÉPONSE EN FRÉQUENCE (5210 DE PAR) POUR LA SPECTROSCOPIE D'IMPÉDANCE.

2. ELECTRODES DE POTENTIEL

Un dispositif quatre électrodes comme présenté en A-1 a été utilisé. Le choix et la fabrication des électrodes de mesures Cu/CuSO₄ sur le modèle de Maineult (2004) seront développés ici.

Pour la mesure du potentiel, des électrodes dites non polarisables ont été choisies, c'est-à-dire que le courant passe librement entre l'électrode et l'électrolyte et, *a fortiori*, entre deux électrodes de mesure. Elle se comporte comme une résistance (une électrode polarisable se comporterait comme un condensateur). Cela se traduit par une phase de la résistivité complexe nulle pour des mesures réalisées en milieu non polarisable (eau par exemple). Ces électrodes ne sont pas strictement nécessaires, mais elles améliorent tout de même la précision sur la mesure de la phase [Kemna *et al.*, 2012].

La nature de l'électrode, ainsi que le contact avec le milieu d'étude est important [West *et al.*, 2009]. La majorité des études portant sur des mesures PP en laboratoire utilisent des électrodes de type Ag/AgCl. Cependant, leur composition n'est pas souvent détaillée (électrodes totalement solides ou fil d'argent plongé dans une solution saturée de KCl). Néanmoins, plusieurs articles parlent d'un contact assuré par un électrolyte ou par le biais de filtres faisant l'intermédiaire entre l'électrode et le milieu [Slater *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2005]. En effet, un contact direct entre l'électrode métal et le milieu pourrait générer des effets de phase de l'ordre de 10 mrad [Kemna *et al.*, 2012].

Les électrodes de mesures peuvent être ponctuelles ou circulaires. Dans le cas d'un milieu hétérogène, les électrodes ponctuelles peuvent introduire un biais dans la mesure. Les électrodes circulaires intègrent le champ électrique tout autour du milieu et gommeraient ce problème. Cependant, des erreurs de phase peuvent être générées s'il existe un gradient de potentiel au niveau de l'anneau. Les électrodes ponctuelles seraient à privilégier [discussion in Working Groups at the 3rd International Workshop on Induced Polarization, Oléron, April 2014].

Plusieurs électrodes ponctuelles, réparties sur la hauteur de la colonne, ont été utilisées. Ce sont des électrodes de type Cu/CuSO₄ construites à partir du modèle développé par Maineult (2004) (Figure V-7). Elles sont composées d'un fil de cuivre (non-vitrifié) qui est plongé dans une solution de sulfate de cuivre (CuSO₄). Le contact entre l'électrode et le milieu de mesure est assuré par un fritté poreux Vycor® (Princeton Applied Research (PAR), Princeton, USA), utilisé dans la réalisation d'électrodes en électrochimie. Ce filtre est suffisamment poreux pour assurer un contact électrique, mais ses pores sont petits pour éviter au maximum des fuites d'électrolyte. De plus, la solution de CuSO₄ est gélifiée pour limiter encore plus les fuites et permettre une tenue dans le temps plus longue. La durée de vie des électrodes Cu/CuSO₄ a été estimée à 60 jours environ (contre 10 jours pour les électrodes Ag/AgCl du commerce précédemment utilisées). Plus de détails sur la caractérisation de ces électrodes sont disponibles dans l'annexe 7.



FIGURE V-7 : PHOTO DES DEUX TYPES D'ÉLECTRODES DE POTENTIEL UTILISÉES PENDANT LES EXPÉRINECES BIOPHY. a) ELECTRODES Ag/AgCl DU COMMERCE (WARNER INSTRUMENTS, HAMDEN, USA) ; b) ELECTRODES Cu/CuSO₄ RÉALISÉES À PARTIR DU MODÈLE DE MAINEULT (2004).

Un autre point critique concerne le positionnement des électrodes de mesure les unes par rapport aux autres et par rapport aux électrodes d'injection [Kemna *et al.*, 2012; Zimmermann *et al.*, 2008]. Une discussion comparative avec l'article de Zimmermann *et al.* (2008) est proposée en annexe 8. La répartition des électrodes sur les colonnes BIOPHY se fait comme suit, à partir du bas de la colonne ($h = 0$ cm) (Figure V-8) :

- Electrodes d'injection B à $h = 3,5$ cm ;
- Electrode de mesure E6 ($h = 8,5$ cm), puis E5 ($h = 14,5$ cm), E4 ($h = 19,5$ cm), E3 ($h = 25,5$ cm), E2 ($h = 30,5$ cm) et E1 ($h = 36,5$ cm). Les électrodes E1 et E6, E2 et E5, E3 et E4 sont symétriques par rapport aux électrodes d'injection.
- Electrodes d'injection A à $h = 41,5$ cm

Remarque : Le niveau de débordement (le sommet de la zone saturée) est situé à $h = 45$ cm et le haut de la colonne est à $h = 50$ cm, ce qui laisse 5 cm d'espace gazeux en tête de colonne.

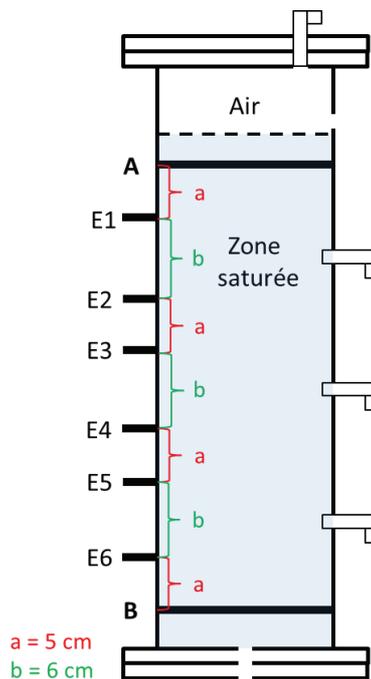


FIGURE V-8 : SCHÉMA D'UNE COLONNE BIOPHY OÙ FIGURENT LES DISTANCES ENTRE ÉLECTRODES.

3. DÉTERMINATION DES FACTEURS GÉOMÉTRIQUES

Avant de pouvoir réaliser des mesures de résistivité, il faut connaître les facteurs géométriques k des différents couples d'électrodes de mesure qui vont permettre de faire le lien entre la résistance mesurée et la résistivité apparente du milieu.

Pour cela, des mesures électriques avec un Syscal R1 (Iris Instruments, Orléans, France) ont été réalisées sur plusieurs combinaisons d'électrodes de mesure en remplissant la colonne d'une solution saline de conductivité connue. Trois solutions différentes ont été utilisées afin de pouvoir calculer une moyenne et un écart type pour chaque facteur géométrique : $\sigma = 401, 691$ et $1260 \mu\text{S/cm}$. Les résultats obtenus sont affichés dans le Tableau V-1.

TABLEAU V-1 : RÉSULTATS DU CALCUL DES FACTEURS GÉOMÉTRIQUES D'UNE COLONNE BIOPHY.

Couple de mesure	Moyenne du facteur géométrique sur 3 mesures (en m)	Ecart type relatif du facteur géométrique (%)
E1-E2	0,2767	0,57
E1-E3	0,1512	0,68
E1-E4	0,09869	0,81
E1-E5	0,07629	0,88
E1-E6	0,05977	0,86
E2-E3	0,3325	0,88
E2-E4	0,1534	0,97
E2-E5	0,1052	1,01
E2-E6	0,07623	1,02
E3-E4	0,2865	1,06
E3-E5	0,1544	1,10
E3-E6	0,09932	1,06
E4-E5	0,3331	1,18
E4-E6	0,1517	1,11
E5-E6	0,2802	1,10

4. DÉTERMINATION DU FACTEUR DE FORMATION

Ensuite, le facteur de formation F du sable de Fontainebleau des colonnes a été déterminé. Pour cela, le sable a été saturé avec des solutions salines de conductivité connue : $\sigma = 12, 735, 918$ et $1317 \mu\text{S/cm}$. La résistivité a été mesurée avec un Syscal R1 en utilisant les électrodes de mesure E2 et E5. En traçant la droite de la résistivité de la colonne en fonction de la résistivité de la solution saline, on obtient le facteur de formation F qui correspond à la pente de la droite (Figure V-9). Il a été trouvé égal à 3,9, ce qui est cohérent avec d'autres études de la littérature [Guichet *et al.*, 2003].

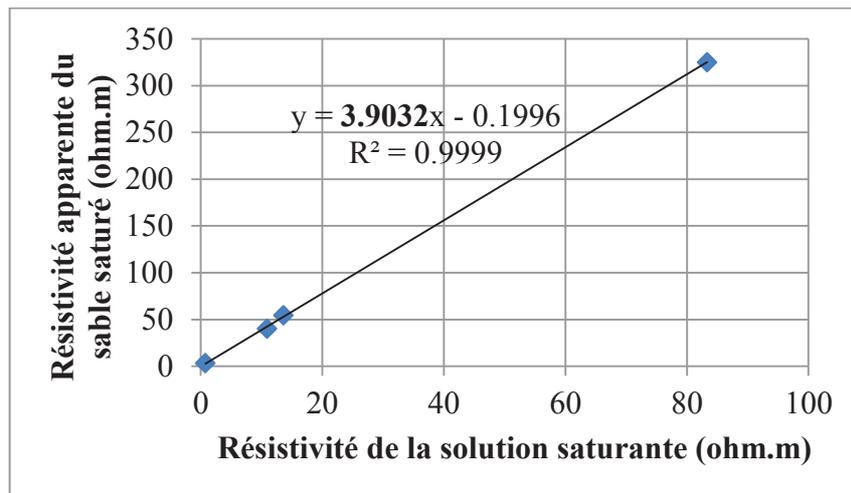


FIGURE V-9 : CALCUL DU FACTEUR DE FORMATION F DU SABLE DE FONTAINEBLEAU.

5. CALCULS D'ERREUR

Lors des expérimentations, les mesures de résistivités complexes ont été réalisées avec le GDP 32II (Zonge International). Pour chaque fréquence, six mesures ont été effectuées (trois fois deux répétitions) à partir desquelles une moyenne pour la phase et pour l'amplitude de la résistivité complexe ont pu être calculées. L'écart type sur ces six points a donné l'erreur sur la mesure.

C. ANALYSE DU CO₂ PAR SPECTROSCOPIE LASER INFRA ROUGE

Les processus de biodégradation en milieu aérobie rejettent du CO₂ dans l'atmosphère (respiration bactérienne). Une augmentation des flux de CO₂ est alors mesurable à l'interface sol-atmosphère. Afin de discriminer l'origine du CO₂ émis, l'étude de la proportion en isotopes stables du carbone, ¹²C et ¹³C, permet de différencier le CO₂ produit par la dégradation du CO₂ émis par d'autres processus géochimiques (précipitation de la calcite) ou biologiques (respiration des plantes).

1. LE SPECTROMÈTRE INFRA-ROUGE IN SITU TROPOSPHÉRIQUE (SPIRIT, DU LPC2E)

Le LPC2E (Laboratoire de Physique et de Chimie de l'Environnement et de l'Espace) développe depuis la fin des années 1980 des instruments dédiés à l'étude de la physico-chimie de l'atmosphère. Ces instruments de mesure sont soit embarqués (ballon stratosphérique et avions pour l'étude de la stratosphère et de la troposphère), soit portables pour l'étude des échanges gazeux aux interfaces géosphère-atmosphère.

Le laboratoire a développé une série de Spectromètres Infra-Rouge *In situ* Troposphérique (SPIRIT) à haute résolution spectrale dans l'infrarouge moyen, portables, pouvant être exploités dans différentes versions : au sol, sur avion et sous ballon.

a) DÉVELOPPEMENT DU SPIRIT PAR LE LPC2E ET PERFORMANCES

Trois instruments SPIRIT sont opérationnels pour la mesure des émissions de gaz : l'un pour la mesure de gaz traces dans la haute troposphère (embarqué sur avion) ; les deux autres pour la mesure des rapports de mélange (concentration) de gaz à effet de serre (CH₄, N₂O) à l'interface sol-atmosphère (SPIRIT-SOL). Le premier SPIRIT-SOL du LPC2E est disponible depuis 2009, et le second a été livré en 2011 à l'INRA.

Les deux appareils SPIRIT-SOL ont pour mission de caractériser les émissions de gaz à effet de serre (GES) des milieux humides (tourbières), de lacs volcaniques et de sols agricoles. L'objectif est d'étudier l'impact des activités anthropiques et des changements climatiques sur ces émissions. Ils sont équipés de lasers à cascades quantiques (QCL) émettant sur la fenêtre spectrale 1261,5-1262,5 cm⁻¹, pour la mesure simultanée des

concentrations de méthane (CH₄), de protoxyde d'azote (N₂O) et de l'eau (H₂O) (détails dans Guimbaud *et al.*, 2011).

Dans le cadre du projet BIOPHY, un nouvel instrument SPIRIT a été redéveloppé à partir du premier SPIRIT-SOL pour lui ajouter la mesure des flux de CO₂ ainsi que du rapport isotopique $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$. L'innovation principale est l'installation d'une cellule à parcours multiple régulée en température (stabilité : < 0,02 °C) et d'une électronique plus performante pour améliorer la précision sur le rapport de mélange mesuré du CO₂ à partir de deux raies d'absorption du ¹³C et du ¹²C du CO₂. Celle-ci doit être meilleure que 0,05 ‰ pour obtenir une précision de SPIRIT pour le $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ de 0,1 ‰. La mesure du $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ s'effectue par une mesure du rapport d'absorbance entre deux raies d'absorption, dont les forces de raies dépendent de la température.

Le SPIRIT peut mesurer les rapports isotopiques $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ et $\delta^{18}\text{O}(\text{CO}_2)$, bien qu'il ne soit actuellement calibré que pour la mesure du $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ à partir de bouteilles certifiées. Les déviations isotopiques du CO₂ émis par le sol vers l'atmosphère permettent de comprendre [Ghosh and Brand, 2003] :

- Les mécanismes qui régissent le cycle du carbone (qualification et quantification des sources et des puits) ;
- Les origines du CO₂ respiré (autotrophe/hétérotrophe) ;
- Les mécanismes bactériens de dépollution des sols.

Pour atteindre ces objectifs, une précision pour le $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ de l'ordre de 0,1 ‰ est souvent nécessaire. La performance du SPIRIT s'appuie sur :

- l'invention au LPC2E d'un nouveau type de cellule à réflexions multiples (Brevets France FR2889599 et international WO 2007/017570 A1 [Robert, 2007]). Elle est caractérisée par une faible taille, une grande stabilité optique et mécanique, une simplicité de réglage optique et une longueur du trajet optique aisément variable ;
- l'apparition sur le marché des lasers à cascades quantiques (QCL) disponibles sur la gamme de longueur d'onde de l'IR moyen. Par opposition aux diodes lasers classiques, les QCL fonctionnent à une température proche de l'ambiante (refroidissement par module à effet Peltier ou effet thermoélectrique), ils émettent une puissance lumineuse plus importante et ils sont utilisables sur une bande spectrale plus large.

La précision (ou sensibilité à la variation) sur la mesure du rapport isotopique $\delta^{13}\text{C}$ est limitée par la stabilité en température de chaque cellule (≈ 10 mK pour atteindre une précision sur $\delta^{13}\text{C}$ de 10^{-4}). Une cellule optique régulée en température permet de bien stabiliser les températures sur toute la partie optique à plus de 0,02°C près. La précision de SPIRIT pour le $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ est de 0,1 ‰, avec une exactitude de 0,3 ‰.

b) FONCTIONNEMENT DU SPIRIT

La détermination des concentrations s'effectue en superposant le spectre synthétique, obtenu à partir de la base de données HITRAN 2008 [Rothman *et al.*, 2009] et au moyen d'un logiciel développé par le LPC2E [Letenneur, 1998], avec le spectre de mesure normalisé. Pour chaque molécule, le spectre synthétique est reconstitué à partir de la loi de Beer Lambert (Équation IV-7).

Un laser QCL est piloté en température et en courant pour émettre un faisceau laser. Le contrôle de la température est réalisé grâce à un module à effet Peltier, ce qui permet à la diode de fonctionner sur la plage de nombres d'ondes souhaitée (2309,7 à 2310,6 cm⁻¹) en définissant une température (-16,7 °C) avec une stabilité de 10^{-3} °C. C'est la rampe de courant qui permet le balayage en nombre d'onde sur environ 1 cm⁻¹ (spectrophotomètre à balayage).

Le faisceau émis est séparé en deux, la voie de référence et la voie de mesure (Figure V-10) :

- La voie de référence permet la calibration en nombre d'onde qui se fait par interférométrie. La voie de référence est composée d'une cellule de référence contenant des gaz étalons pour calibrer de manière absolue l'échelle de longueur d'onde, et d'un interféromètre étalon Fabry-Pérot pour une calibration relative sur l'ensemble du domaine spectral.

- La voie de mesure contient la cellule d'absorption à parcours multiples pour la mesure du rapport de mélange de gaz étudiés. Une pompe maintient le gaz à une pression réduite (≈ 50 hPa) pour assurer une bonne résolution des spectres et un débit régulier pour assurer le renouvellement du gaz (en environ 4 s).

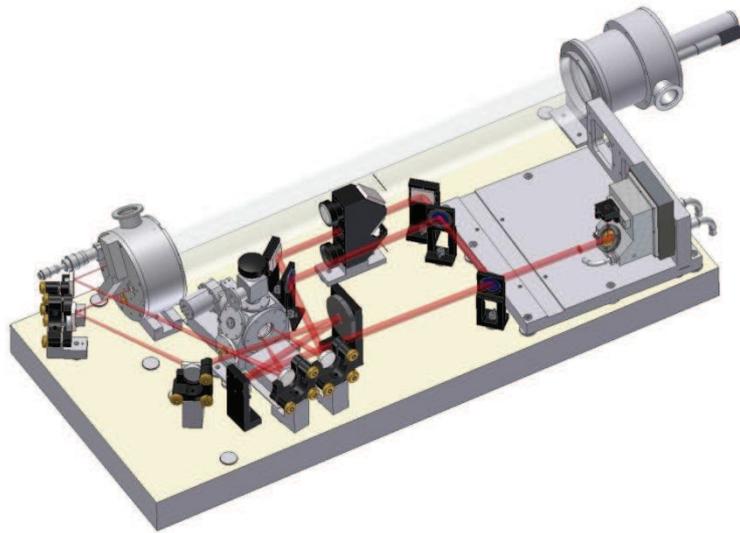


FIGURE V-10 : SCHÉMA DE LA STRUCTURE DU SPIRIT : LE CHEMIN PARCOURU PAR LE LASER EST REPRÉSENTÉ PAR LE TRAIT ROUGE. D'APRÈS [GUIMBAUD ET AL., 2011].

Une zone d'absorption en nombre d'onde (≈ 1 cm^{-1}) est choisie faisant apparaître les isotopes voulus du CO_2 (Figure V-11). Afin d'optimiser la précision de la mesure d'un rapport isotopique, il faut trouver une zone spectrale où il existe une raie d'absorption forte du ^{13}C et une raie d'absorption faible du ^{12}C pour avoir un rapport d'intensités entre les deux raies proche de 1, sachant qu'il faut prendre en compte les différences de concentrations entre les deux isotopes.

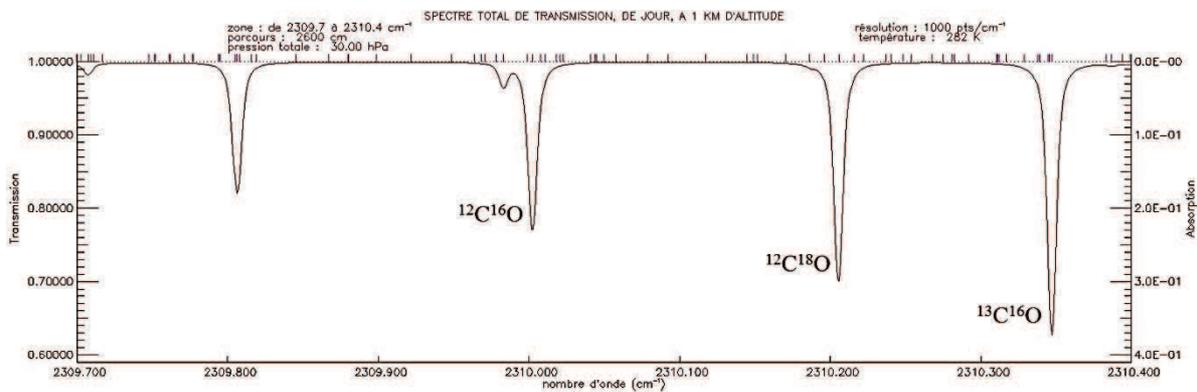


FIGURE V-11 : SPECTRE DE TRANSMISSION DU CO_2 AVEC LE LASER DE SPIRIT ($2310,4 \rightarrow 2309,7$ cm^{-1}) OBTENU D'APRÈS LA BASE DE DONNÉES HITRAN 2004 [ROTHMAN ET AL., 2005]. LES RAIES D'ABSORPTION DU CO_2 SONT VISIBLES À $2310,0025$ cm^{-1} , $2310,2056$ cm^{-1} ET $2310,3470$ cm^{-1} POUR $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$, $^{12}\text{C}^{18}\text{O}_2$ ET $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ RESPECTIVEMENT.

TABLEAU V-2 : POSITION ET INTENSITÉ DES RAIES D'ABSORPTION DU CO_2 POUR LE LASER DU SPIRIT (BASE HITRAN 2004)

Isotopologue	Centre de la bande d'absorption (cm^{-1})	Intensité de la raie (cm.molécule^{-1})
$^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$	2310,0025	$4,664.10^{-21}$
$^{12}\text{C}^{18}\text{O}_2$	2310,2056	$4,637.10^{-21}$
$^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$	2310,3470	$6,447.10^{-21}$

c) CALCUL DES CONCENTRATIONS

Dans le cas du SPIRIT, le calcul des concentrations est plus complexe qu'une simple application de la loi de Beer-Lambert à un nombre d'onde défini. Ce calcul relève de la superposition d'un spectre de référence avec un spectre de mesure, pour améliorer la précision de la valeur de la concentration calculée. Une amélioration supplémentaire est apportée en superposant la dérivée seconde des deux spectres afin d'éliminer les bruits fréquentiels présents dans le spectre de mesure [Guimbaud *et al.*, 2011].

d) CALCUL DU RAPPORT ISOTOPIQUE DE L'ÉCHANTILLON

La dérive en température de la partie optique de l'instrument est suffisamment faible, en mode opératoire nominal (c'est-à-dire en dehors d'une forte variation de flux de chaleur apporté par un changement rapide de vent ou d'ensoleillement) pour considérer que la température de mesure du gaz dans la cellule soit constante sur une durée de prélèvement de l'ordre d'une quinzaine de minutes.

La déviation isotopique du carbone dans le CO₂ est calculée à partir des concentrations des isotopes du carbone du CO₂ de l'échantillon et de la bouteille étalon. Les annotations suivantes sont utilisées :

- C₁₃ : concentration en ¹³CO₂ de l'échantillon
- C₁₂ : concentration en ¹²CO₂ de l'échantillon
- R : rapport isotopique ¹³C/¹²C du CO₂ de l'échantillon

- c₁₃ : concentration en ¹³CO₂ de la référence absolue (VPDB)
- c₁₂ : concentration en ¹²CO₂ de la référence absolue (VPDB)
- r : rapport isotopique ¹³C/¹²C du CO₂ de la référence absolue (VPDB)

- **δ : déviation isotopique en ¹³C du CO₂ de l'échantillon :**

$$\delta = \{(R - r) / r\} \cdot 1000 = \{R/r - 1\} \cdot 1000 = \{(C_{13}/C_{12}) / (c_{13}/c_{12}) - 1\} \cdot 1000$$

$$\delta = \{(C_{13}/C_{12}) \cdot (c_{12}/c_{13}) - 1\} \cdot 1000$$

ÉQUATION V-3

- C⁰₁₃ : concentration en ¹³CO₂ de la bouteille étalon
- C⁰₁₂ : concentration en ¹²CO₂ de la bouteille étalon
- R⁰ : rapport isotopique ¹³C/¹²C du CO₂ de la bouteille étalon

- **δ⁰ : déviation isotopique en ¹³C du CO₂ de la bouteille étalon**

$$\delta^0 = \{(R^0 - r) / r\} \cdot 1000 = \{R^0/r - 1\} \cdot 1000 = \{(C^0_{13}/C^0_{12}) / (c_{13}/c_{12}) - 1\} \cdot 1000$$

$$\delta^0 = \{(C^0_{13}/C^0_{12}) \cdot (c_{12}/c_{13}) - 1\} \cdot 1000$$

ÉQUATION V-4

En pratique, les concentrations c₁₃ et c₁₂ du CO₂ de la référence absolue ne sont pas connues. On ne dispose que des mesures des concentrations de la bouteille étalon dont on suppose connu l'écart isotopique (calibration par IRMS au BRGM). La déviation isotopique δ du carbone dans le CO₂ de l'échantillon est calculée comme suit :

$$\text{On a } \delta = \{(C_{13}/C_{12}) \cdot (c_{12}/c_{13}) - 1\} \cdot 1000 \quad (\text{Équation V-3})$$

$$\text{D'où } \delta = \{(C_{13}/C_{12}) \cdot (C^0_{12}/C^0_{13}) \cdot (C^0_{13}/C^0_{12}) \cdot (c_{12}/c_{13}) - 1\} \cdot 1000$$

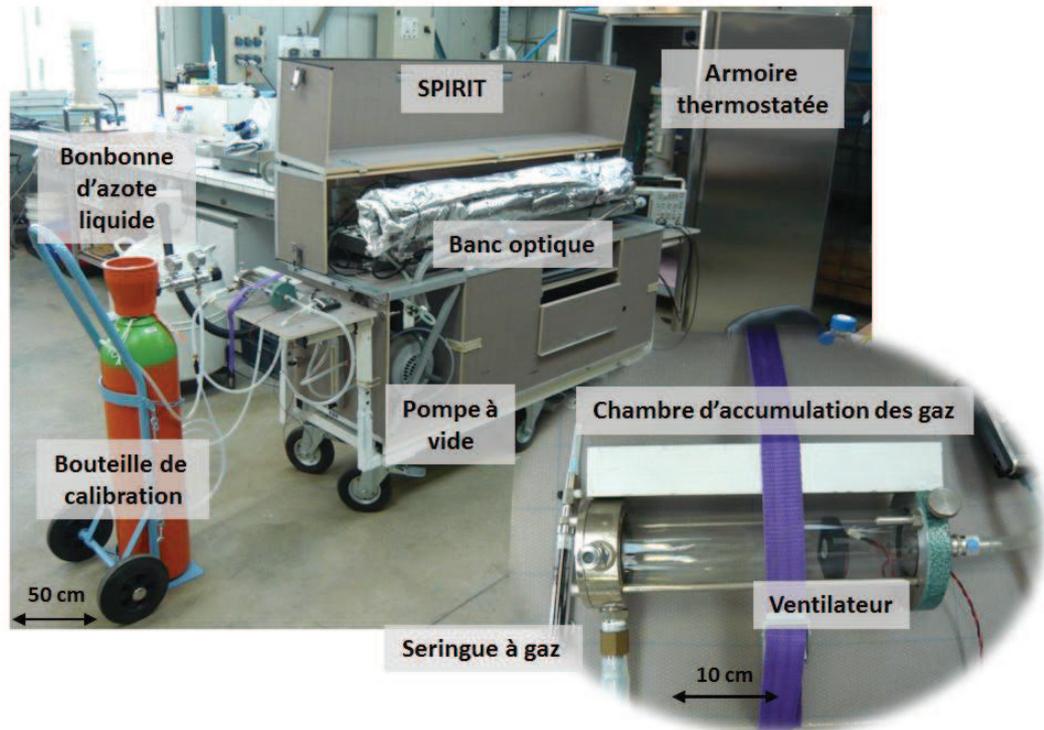
Puis, en exprimant (C⁰₁₃/C⁰₁₂) (c₁₂/c₁₃) à partir de l'Équation V-4, on obtient :

$$\delta = \{(C_{13}/C_{12}) \cdot (C^0_{12}/C^0_{13}) \cdot (1 + \delta^0/1000)\} \cdot 1000$$

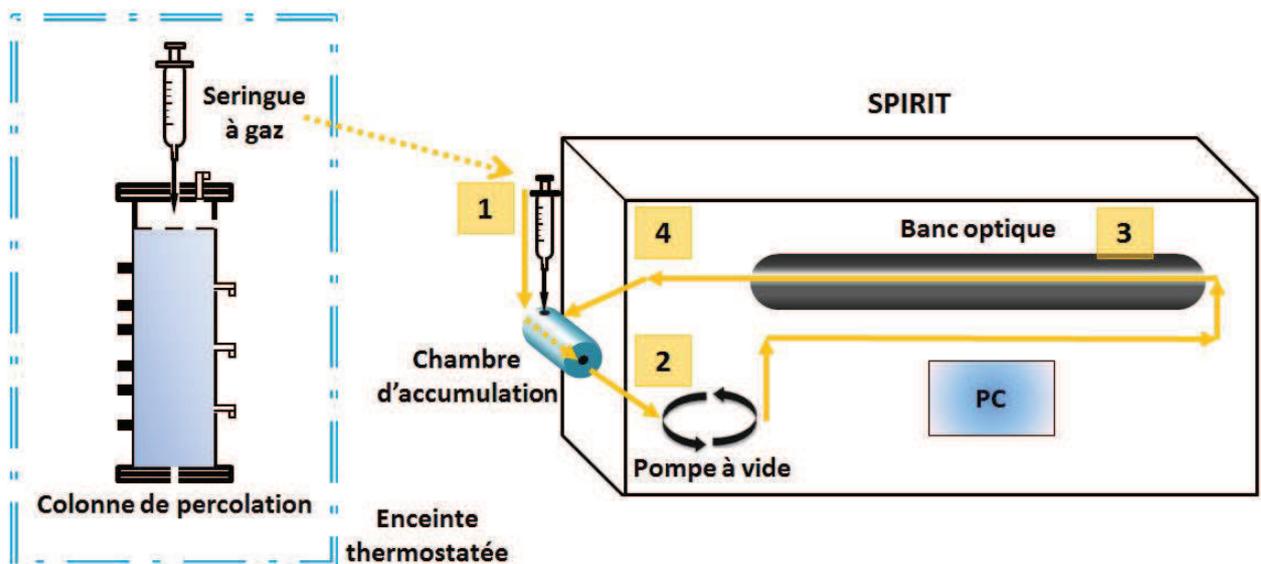
ÉQUATION V-5

2. MÉTHODE DES AJOUTS DOSÉS

Sur le terrain, le SPIRIT est relié à une chambre d'accumulation des gaz pour une mesure directe des flux de CO_2 émis par le sol (cette configuration sera plus développée dans la partie VI-B-2 de ce manuscrit, p. 106). En laboratoire, il a fallu adapter le protocole de mesure aux colonnes. En effet, celles-ci étant mises en place dans une armoire thermostatée exigüe et les quantités de gaz disponibles dans les colonnes étant faibles (V_{air} en tête de colonne $\approx 0,9$ L), la méthode des ajouts dosés a été utilisée dans une petite chambre d'accumulation (Figure V-12).



A/



B/

FIGURE V-12 : A/ PHOTOGRAPHIE DU SPIRIT AU LABORATOIRE. ON IDENTIFIE LE SPIRIT AVEC SON BANC OPTIQUE RELIÉ À LA CHAMBRE D'ACCUMULATION DES GAZ PAR UNE POMPE À VIDE. B/ SCHÉMA REPRÉSENTANT LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE L'ANALYSE DES GAZ. UNE FOIS INJECTÉ (1), L'ÉCHANTILLON DE GAZ EST EMMENÉ PAR UNE POMPE À VIDE VERS LE BANC OPTIQUE (2), OÙ IL EST ANALYSÉ (3). IL EST ENSUITE RÉINTRODUIT DANS LA CHAMBRE D'ACCUMULATION (BOUCLE FERMÉE) (4).

La méthode consiste à prélever une petite quantité de gaz (entre 2 et 5 mL suivant la concentration de CO₂ dans la colonne) et à l'injecter dans la chambre du SPIRIT (étape 1 de la Figure V-12). La même quantité de gaz est de nouveau prélevée puis injectée, et ainsi de suite toutes les trois minutes, cela entre 4 à 5 fois, afin d'atteindre une concentration de CO₂ de l'ordre de 800 ppmV (répétition de l'étape 1 de la Figure V-12).

Le gaz injecté s'accumule ainsi dans le circuit car il est en boucle fermée. Il circule grâce à une pompe à vide et il passe par un banc optique pour être analysé (étape 3 de la Figure V-12). Avant chaque mesure, l'appareil est calibré à l'aide d'une bouteille étalon (Air Liquide®) certifiée par IRMS (Isotope-Ratio Mass Spectroscopy). Au cours des expériences du projet sur deux ans, deux bouteilles de calibration ont été utilisées : [CO₂] = 380 ppmV, δ¹³C(CO₂) = -40,5 ‰ pour la première bouteille et [CO₂] = 390 ppmV, δ¹³C(CO₂) = -43,2 ‰ pour la deuxième. Et après chaque mesure, une dérive éventuelle de l'appareil est évaluée en faisant une mesure sur l'air de la bouteille.

On peut tracer l'évolution de la concentration en CO₂ au cours du temps et l'on observe des paliers qui correspondent aux différentes injections (Figure V-13). Les injections sont moins visibles sur le graphe du rapport isotopique du carbone en fonction du temps, mais elles sont tout de même identifiables.

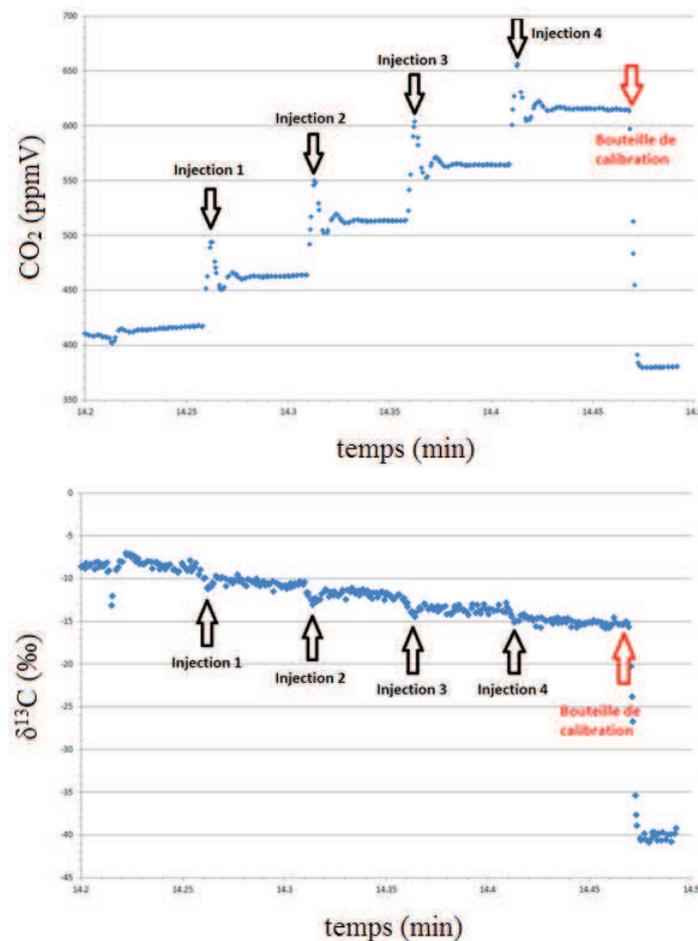


FIGURE V-13 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN CO₂ (HAUT) ET DU δ¹³C(CO₂) (BAS) EN FONCTION DU TEMPS, APRÈS 4 INJECTIONS DE GAZ PROVENANT D'UNE COLONNE BIOPHY, ET APRÈS CALIBRATION À L'AIDE D'UNE BOUTEILLE DE GAZ ÉTALON ([CO₂] = 380 ppmV, δ¹³C(CO₂) = -40,5 ‰) EN FIN DE MESURE.

3. CALCUL DE LA CONCENTRATION EN CO₂ DE LA COLONNE

La détermination de la concentration se fait à partir d'un bilan de matière. Soit n_x le nombre de moles de CO₂ dans la boucle du SPIRIT après l'injection numéro x . Elle est égale au nombre de moles de CO₂ présent avant les injections, n_0 , plus le nombre de moles qui a été injecté jusque-là :

$$n_x = n_0 + x \cdot n_i$$

avec n_i le nombre de moles contenu dans la seringue d'injection et x le nombre d'injections.

Comme la concentration est égale au nombre de moles multipliés par le volume, on obtient :

$$C_x \cdot (V_b + xV_i) = C_0 \cdot V_b + x \cdot C_i \cdot V_i$$

avec C_x la concentration en CO₂ dans la boucle après l'injection numéro x , V_b le volume de la boucle (cellule optique et chambre d'accumulation), V_i , C_i , le volume d'injection et la concentration en CO₂ contenu dans la seringue et C_0 la concentration en CO₂ initialement présente dans la boucle. C_i représente la concentration en CO₂ en tête de colonne, c'est ce que l'on cherche. On obtient alors :

$$C_x = C_0 \cdot V_b / (V_b + xV_i) + xV_i C_i / (V_b + xV_i)$$

$$C_x = C_0 / (1 + xV_i/V_b) + [1 / (1 + V_b / (xV_i))] \cdot C_i$$

Comme le volume dans la boucle de mesure V_b est largement supérieur au volume d'injection V_i , l'hypothèse suivante peut être émise :

$$V_b \gg xV_i : 1 / (1 + xV_i/V_b) \rightarrow 1 - xV_i/V_b$$

d'où :

$$C_x = C_0 \cdot (1 - xV_i/V_b) + x (V_i/V_b) \cdot C_i$$

$$C_x = C_0 - x (V_i/V_b) C_0 + x (V_i/V_b) \cdot C_i$$

$$C_x = C_0 + (V_i/V_b) (C_i - C_0) x$$

En traçant les concentrations C_x de CO₂ obtenues à chaque plateau en fonction du nombre d'injections x , il est possible de déterminer [CO₂] en tête de colonne C_i . En effet, la pente de la droite de régression $y = ax+b$ donne la concentration de CO₂ dans la colonne (Figure V-14-A) :

Pente $a = (V_i/V_b) (C_i - C_0)$ d'où $C_i = a \cdot V_b/V_i + C_0$, avec : C_0 l'ordonnée à l'origine de la droite ; $V_b = 634$ mL ; $V_i = 2$ à 5 mL. Comme $C_0 \ll C_i$, le calcul de C_i est approximé :

$$C_i = a \cdot V_b/V_i \quad \text{ÉQUATION V-6}$$

Pour calculer l'erreur sur la mesure de la concentration en CO₂, il faut calculer l'erreur sur la pente de la droite de régression, l'erreur sur la mesure de V_b et V_i et ajouter l'erreur systématique de l'appareil.

4. DÉTERMINATION DU RAPPORT ISOTOPIQUE - MÉTHODE DU KEELING PLOT

Pour déterminer le rapport isotopique $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$, la méthode du Keeling plot est utilisée [Pataki et al., 2003]. Le point de départ est encore le principe de conservation de la masse (pour les deux formes isotopiques, $^{13}\text{CO}_2$ et $^{12}\text{CO}_2$) :

$$C_x = C_0 + C_i$$

avec C_x la concentration de gaz dans le circuit du SPIRIT, C_0 la concentration initiale avant injection, C_i la concentration du CO_2 injecté. Chaque composante du CO_2 présente dans le circuit a sa signature isotopique $\delta^{13}\text{C}$:

$$(\delta^{13}\text{C}_x) \cdot C_x = (\delta^{13}\text{C}_0) \cdot C_0 + (\delta^{13}\text{C}_i) \cdot C_i$$

Si les deux équations sont combinées, on obtient :

$$(\delta^{13}\text{C}_x) \cdot C_x = (\delta^{13}\text{C}_0) \cdot C_0 + (\delta^{13}\text{C}_i) \cdot (C_x - C_0)$$

$$(\delta^{13}\text{C}_x) = 1/C_x \cdot [(\delta^{13}\text{C}_0) \cdot C_0 - (\delta^{13}\text{C}_i) \cdot C_0] + (\delta^{13}\text{C}_i) \quad \text{ÉQUATION V-7}$$

La signature isotopique de la source de CO_2 , $\delta^{13}\text{C}_i$, est donc obtenue en traçant le graphe $\delta^{13}\text{C}_x$ en fonction de $1/C_x$. La signature isotopique de la source est donnée directement par l'ordonnée à l'origine de la droite de régression (Figure V-14-B) et l'erreur sur la mesure correspond à l'erreur sur la détermination de l'ordonnée à l'origine (généralement, entre 0,1 ‰ et 0,3 ‰ pour le labo, et autour de 0,3 ‰ pour le terrain) plus l'erreur systématique de l'appareil ($\pm 0,3$ ‰).

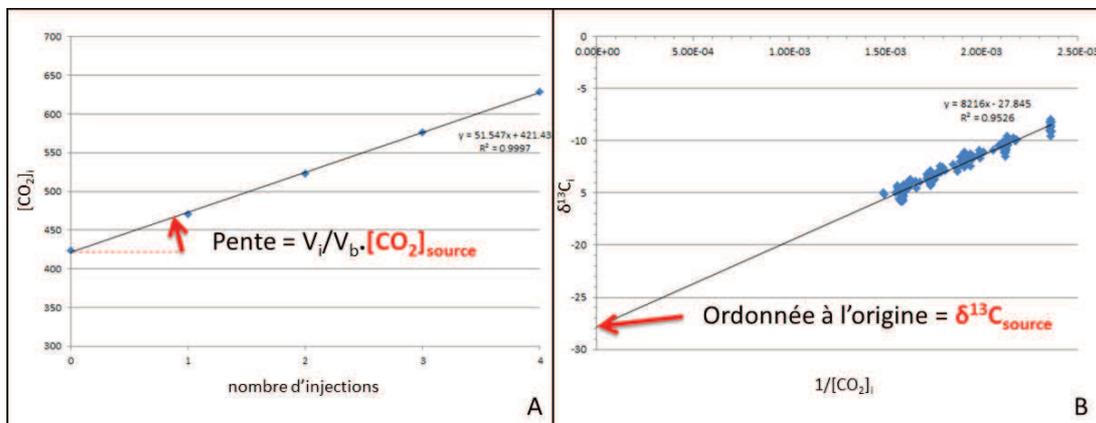


FIGURE V-14: PRINCIPE DU KEELING PLOT. A/ DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION EN CO_2 ; B/ DÉTERMINATION DU RAPPORT ISOTOPIQUE DE CE CO_2 .

5. ANALYSES ISOTOPIQUES COMPLÉMENTAIRES

Afin d'interpréter correctement les valeurs de $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)_{\text{gaz}}$ mesurées par SPIRIT, les $\delta^{13}\text{C}$ des autres composés carbonés de la colonne (exceptées les bactéries) étaient nécessaires, soit : le toluène et le CO_2 dissous dans l'eau (carbone inorganique total dissous, $\text{DIC} = [\text{H}_2\text{CO}_3] + [\text{CO}_{2\text{aq}}] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}]$). Pour cela, le $\delta^{13}\text{C}$ (toluène) et le $\delta^{13}\text{C}$ (DIC) ont pu être mesurés directement. Le $\delta^{13}\text{C}$ (DOC), rapport isotopique du carbone organique dissous, a permis de prendre en compte le carbone du toluène restant et des sécrétions organocarbonées bactériennes.

a) ISOTOPIE DU CARBONE DU TOLUÈNE

L'isotopie du carbone du toluène a été mesurée par un couplage GC-IRMS (Chromatographie en phase gazeuse et *Isotope-Ratio Mass Spectroscopy*).

Les constituants volatils sont d'abord séparés par chromatographie en phase gazeuse (GC). Chaque molécule est ensuite oxydée par une étape de combustion à 940°C située en sortie de colonne GC. Il en résulte la formation majoritaire de CO₂ et d'H₂O, chaque atome de carbone présent dans la molécule étant susceptible de produire une molécule de CO₂. Le CO₂ produit dispose d'un rapport isotopique ¹³C/¹²C identique à la molécule de départ. L'analyte passe ensuite par un four réducteur à 600 °C, appelé réacteur de réduction. Dans ce réacteur, les oxydes d'azote sont réduits en azote (N₂) et le surplus d'oxygène est éliminé. L'eau résiduelle est également chassée. Le CO₂ produit est alors introduit dans la source à impact électronique du spectromètre de masse afin d'ioniser les molécules en ions ¹²C¹⁶O₂⁺ et ¹³C¹⁶O₂⁺ selon le rapport isotopique initial de la molécule. L'étalonnage de l'appareil est effectué par l'introduction dans la source de quantités données de CO₂ de référence.

Les échantillons ont été prélevés à la seringue, *via* les robinets S1 et S3. Ils ont été conditionnés dans des flacons de 1,5 mL conservés au réfrigérateur avant d'être directement analysés.

Ces mesures ont été réalisées dans le laboratoire d'analyse isotopique du BRGM (LAB/ISO).

b) ISOTOPIE DU DIC ET DU DOC

L'isotopie du DIC est réalisée par IRMS, en injectant l'échantillon directement en phase liquide, poussé par de l'eau.

Les échantillons pour la mesure du DOC sont d'abord acidifiés (ajout d'acide phosphorique, pH=1-2) afin de dégazer le CO₂ présent. Il est aussi analysé par IRMS.

Les prélèvements ont été filtrés à 0,45 µm pour évacuer les bactéries. Une attention particulière a été apportée au prélèvement des échantillons pour la mesure du DIC. En effet, ceux-ci ne doivent pas être mis en contact avec le CO₂ de l'air, car cela modifie instantanément la signature isotopique de l'échantillon. Les flacons de prélèvement ont été remplis par débordement, en renouvelant le volume au moins trois fois, et en ne laissant aucune bulle d'air dans le flacon.

Ces analyses ont été faites à l'ISTO (Institut des Sciences de la Terre d'Orléans, CNRS).

D. ANALYSES GÉOCHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES

Afin de comprendre l'activité de biodégradation dans les colonnes, des mesures des paramètres physico-chimiques et microbiologiques de la colonne ont été réalisées. Cela a ensuite permis d'interpréter les résultats de géophysique et les analyses du CO₂.

Des prélèvements de fluides des colonnes ont été effectués régulièrement pendant les expérimentations afin de mesurer la quantité de toluène restant dans le milieu, l'alcalinité du fluide, et pour caractériser la population bactérienne qui a pu se développer (comptage et analyses génétiques). De plus, les paramètres physico-chimiques (pH, Eh, température, conductivité et O₂ dissous) du fluide sont mesurés en sortie de colonne.

1. DOSAGE DU TOLUÈNE

Pour suivre l'évolution de la concentration en toluène dans les colonnes BIOPHY, l'outil analytique utilisé est un micro chromatographe en phase gazeuse, le µGC Agilent 3000 (SRA Instruments, Marcy l'Etoile, France). C'est un chromatographe compact qui met en œuvre des principes chimiques de séparation et de détection parfaitement reconnus. Les principales étapes de l'analyse sont l'injection, la séparation, la détection, l'identification des pics et leur intégration individuelle et finalement, par comparaison avec une courbe d'étalonnage préalablement établie, la détermination de la teneur en toluène (Figure V-15).

L'échantillon gazeux pénètre dans le μ GC par une introduction chauffée. Une fois l'injecteur franchi, l'échantillon en phase gazeuse pénètre dans la colonne qui le sépare en ses constituants gazeux dans un temps-type inférieur à 200 secondes.

Le principe de fonctionnement de la chromatographie en phase gazeuse repose sur le fait qu'une molécule gazeuse donnée possède une affinité spécifique envers le support de la colonne chromatographique (présent sur la paroi interne de la colonne) et le gaz vecteur. Les différences d'affinité permettent de séparer les différents composés individuels (temps de rétention différents) et éventuellement de les détecter. Pour l'obtention d'une bonne reproductibilité des temps de rétention des composés, la colonne utilise un dispositif de chauffage très précis et parfaitement régulé. La colonne utilisée est une colonne capillaire Stabilwax[®], de 10 m de longueur et de 0,5 mm de diamètre interne, avec comme support une phase stationnaire de type polaire.

Après séparation dans la colonne, les constituants de l'échantillon gazeux traversent un détecteur à thermoconductivité TCD ou catharomètre. Ce détecteur, sensible à l'élévation de la température, est constitué d'un pont de Wheatstone. Une de ses branches est traversée en continu par le gaz vecteur, dit de référence. L'autre branche est traversée par le gaz vecteur, dit d'analyse, et provenant de la colonne analytique. Le gaz vecteur d'analyse peut être pur ou contenir des constituants de l'échantillon qui a été injecté dans l'analyseur.

Pour l'analyse de toluène, l'injecteur est chauffé à 90°C, la colonne en isotherme à 70°C. Avant chaque série de mesure, des étalons de concentration connue sont passés dans l'appareil pour vérifier que la droite d'étalonnage est toujours valable.

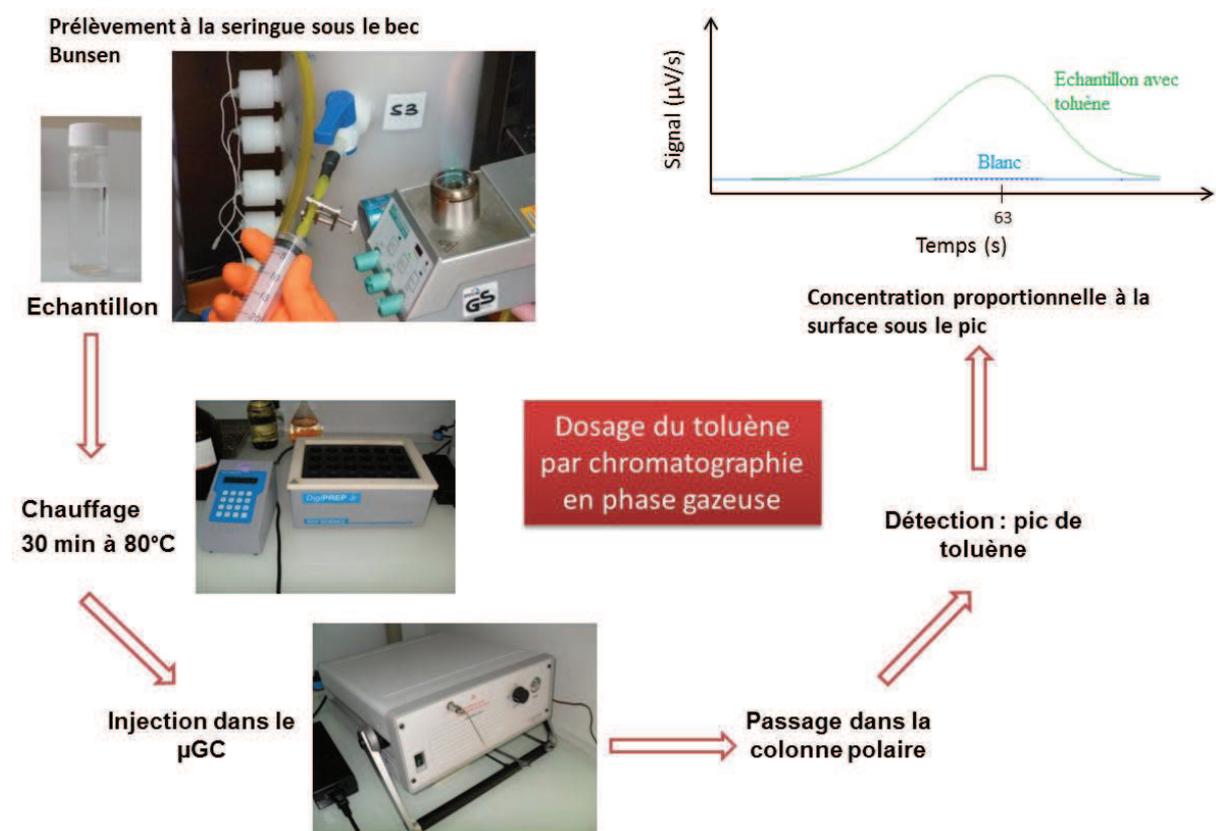


FIGURE V-15 : DIFFÉRENTES ÉTAPES RÉALISÉES POUR LE DOSAGE DU TOLUÈNE PAR μ GC.

Chaque échantillon est placé dans des flacons en verre de 40 mL, remplis seulement à 30 mL pour laisser un espace de tête gazeux. L'échantillon est ensuite chauffé à 80°C pendant 30 min pour faire passer les composés d'intérêt en phase gazeuse. Le flacon est muni d'un septum au niveau du bouchon. Ce septum est piqué par l'aiguille de l'injecteur (en prenant soin de rester dans la phase gazeuse) et le gaz est pompé. Le pompage dure environ 10 secondes et l'analyse 200 secondes. Reste ensuite à multiplier la surface de pic par le coefficient de dilution et à placer la surface trouvée sur la droite d'étalonnage pour obtenir la concentration finale (ici, en toluène).

2. DOSAGE DE L'ALCALINITÉ

D'autres prélèvements en S1 et S3, mais aussi dans la bonbonne d'alimentation, ont été utilisés pour doser l'alcalinité. Par définition, l'alcalinité d'une eau caractérise sa capacité à résorber les acides forts, du fait de la présence d'espèces basiques susceptibles de réagir avec les protons [Garnier, 2012]. L'alcalinité des eaux naturelles est principalement due à la présence des carbonates :

$$\text{Alcalinité} = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+]$$

Cependant, les phosphates contribuent aussi à l'alcalinité et ils sont très présents dans le fluide circulant dans les colonnes (tampon mono- et di-hydrogéo-phosphates de potassium). Cela a rendu difficile l'interprétation des données d'alcalinité.

L'alcalinité du fluide a été dosée par potentiométrie, c'est-à-dire que l'alcalinité est quantifiée par une titration à l'acide chlorhydrique, jusqu'à atteindre un pH voisin de 4.

3. COMPTAGES BACTÉRIENS

La population bactérienne a aussi été suivie au cours du temps à partir d'échantillons de fluide (bactéries planctoniques) et de quelques échantillons de sable (bactéries sessiles). Plusieurs méthodes de quantification ont été testées sur les expériences, mais c'est la méthode de comptage sur cellule de Thoma qui est restée la plus utilisée.

a) MESURE DE DENSITÉ OPTIQUE DO 600

La mesure de la densité optique (DO) permet de mesurer indirectement la densité bactérienne. En effet, à l'aide d'un spectromètre, l'absorbance à 600 nm (DO 600) est mesurée : le trouble de la solution augmente avec le nombre de bactéries. Avant une mesure, il faut régler le zéro de l'appareil avec du milieu de culture sans bactéries. Etant donné qu'il s'agit de matière en suspension, il faut homogénéiser l'échantillon et réaliser la mesure rapidement sinon le résultat n'est pas représentatif.

De plus, il faut tenir compte du fait que la mesure de DO 600 est une mesure qui englobe les bactéries actives et inactives, ainsi que tout autre matériel en suspension dans le fluide (particules de sable, bouts de membranes de cellules lysées...).

A cause de ces inconvénients, il a été décidé d'abandonner cette technique de mesure au profit du comptage de bactéries sur cellule de Thoma.

b) NUMÉRATION SUR CELLULE DE THOMA

Le comptage bactérien est la détermination directe du nombre de cellules contenues dans un volume précis de liquide. Un nombre de cellules par litre est obtenu.

La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (ou cellule de numération). Des cellules de Thoma ont été utilisées au cours des expérimentations (Figure V-16). Elles sont composées de seize grands carrés (4x4), chacun composé de seize petits carrés.

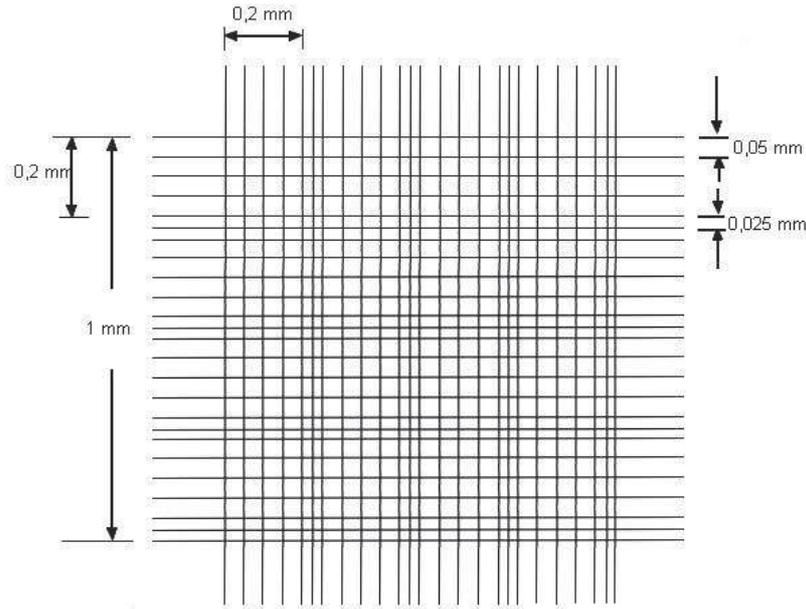


FIGURE V-16 : SCHÉMA D'UNE CELLULE DE THOMA

Pour réaliser un comptage, l'échantillon est déposé sur la lame de Thoma qui est observée ensuite au microscope optique avec un grossissement x400. Dix cases où sont comptées le nombre de bactéries présentes, $n_{10\text{carrés}}$, sont choisies arbitrairement et à l'avance. Le volume de liquide contenu dans un total de 10 carrés représentant $2,5 \cdot 10^{-6}$ mL, il suffit ensuite de ramener au volume total pour connaître le nombre de bactéries dans le milieu, $N_{\text{bac/mL}}$. Si l'on détecte plus de 40 bactéries (pour dix carrés), il est plus judicieux de d'abord diluer son échantillon. La formule mathématique qui permet de remonter du nombre de bactéries compté $n_{10\text{carrés}}$ à celui présent dans le milieu $N_{\text{bac/mL}}$ est :

$$N_{\text{bact/mL}} = \frac{n_{10\text{ carrés}}}{2,5 \cdot 10^{-6}} * \text{facteur de dilution} \quad \text{ÉQUATION V-8}$$

Cette technique, contrairement à la DO 600, permet de distinguer les bactéries d'autres particules présentes dans le milieu. On peut aussi, en se basant sur la morphologie des cellules, essayer de séparer les cellules étudiées (ici *R. w.*) d'autres types de bactéries. Cependant, ce type de comptage ne permet pas de différencier les cellules actives des cellules inactives.

c) COLORATION LIVE AND DEAD

Afin de distinguer les bactéries mortes des bactéries vivantes au sein du biofilm, un kit LIVE/DEAD® peut être utilisé. Ce kit contient deux marqueurs fluorescents SYTO 9 (vert) et iodure de propidium (PI) (violet).

Le SYTO 9 possède la capacité de diffuser dans les cellules, intègres ou non, et d'émettre de la fluorescence de couleur verte une fois lié à l'ADN. Il permet donc de marquer la totalité les cellules d'un échantillon. Le PI ne peut pénétrer dans les cellules que si les membranes sont altérées, donc seules les cellules mortes fluorescent en rouge (vert + violet) (Figure V-17).

Ce protocole est très utile mais long à mettre en place à cause des différentes étapes de préparation. Il n'a donc pas été retenu pour faire un suivi journalier de la population bactérienne à l'intérieur des colonnes BIOPHY.

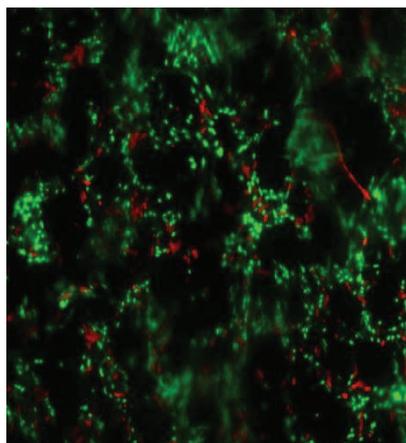


FIGURE V-17 : PHOTOGRAPHIE PRISE AU MICROSCOPE OPTIQUE, GROSSISSEMENT X 1000, APRÈS COLORATION LIVE/DEAD D'UN ÉCHANTILLON D'UNE COLONNE BIOPHY (JUILLET 2012). LES BACTÉRIES VIVANTES SONT COLORÉES EN VERT, ALORS QUE LES BACTÉRIES MORTES SONT COLORÉES EN ROUGE.

4. MESURE DES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES

Les paramètres physico-chimiques non conservatifs (pH, Eh, conductivité, température, oxygène dissous) ont été suivis en continu, en sortie de colonne, à l'aide d'un porte-sondes inséré en ligne dans le circuit. Trois sondes de chez METTLER TOLEDO® ont été utilisées pour chacune des colonnes. La première est une électrode combinée qui mesure le pH, le potentiel redox (avec comme électrode de référence commune, une Ag/AgCl, $E_{Ag/AgCl} = 197 \text{ mV} / \text{ENH}$) et la température ; une deuxième est une sonde électrochimique basée sur la méthode de Clark (réduction de l'oxygène sur une électrode d'argent polarisée à -400 mV/ENH), qui mesure la quantité d' O_2 dissous ; et la dernière sonde mesure la conductivité et la température.

Les mesures sont récupérées sur un ordinateur *via* des transmetteurs (M300 de chez METTLER TOLEDO®) et une centrale d'acquisition multivoies Keithley Instruments, 2700 (Figure V-18). Les mesures ont été effectuées toutes les demi-heures au cours des expériences BIOPHY.

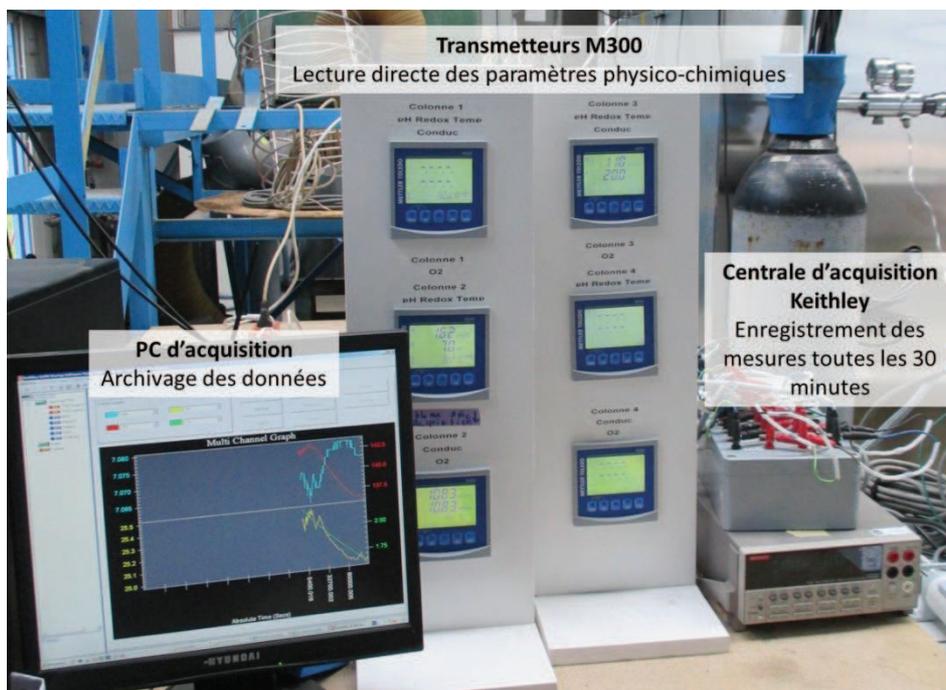


FIGURE V-18 : ACQUISITION DES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES.

E. EXPÉRIENCES

1. STÉRILISATION ET REMPLISSAGE DES COLONNES

Afin de limiter au mieux la contamination des colonnes par d'autres souches bactériennes que *R. w.*, un protocole de stérilisation du matériel utilisé a été établi. Le sable de Fontainebleau a d'abord été tamisé puis lavé à l'eau déminéralisée pour évacuer les petites particules et des éventuelles traces de matière organique. Juste avant chaque expérimentation, le sable a été autoclavé 3 fois 1h à 120 °C à 24 heures d'intervalle afin de le stériliser.

Les colonnes ont été désinfectées avant chaque essai. Un premier lavage a été effectué avec de l'eau de javel. Puis, juste au moment du montage, les colonnes sont désinfectées avec de l'éthanol 90°C, puis rincées à l'eau stérile, sous l'atmosphère de deux becs Bunsen.

Les colonnes ont pu alors être remplies avec le sable. Afin d'assurer la reproductibilité des essais, un protocole de préparation des colonnes a été défini. En effet, le conditionnement est important pour obtenir des mesures PP comparables [Kemna *et al.*, 2012].

Une procédure de remplissage a été mise au point : le sable est introduit dans la colonne jusqu'à un premier palier correspondant à la hauteur du robinet S1. Cette première strate est compactée à l'aide d'une dameuse cylindrique de 500 g, mobile autour d'un axe (Figure V-19). Le compactage consiste à laisser tomber 3 fois de suite la masse d'une hauteur fixe de 20 cm sur le sable. Ensuite, deux autres strates de sables sont ajoutées et compactées successivement, aux hauteurs S2 et S3. Des colonnes remplies de 12,5 kg de sable sec sont ainsi obtenues. Le remplissage s'effectue lui aussi sous deux becs Bunsen.

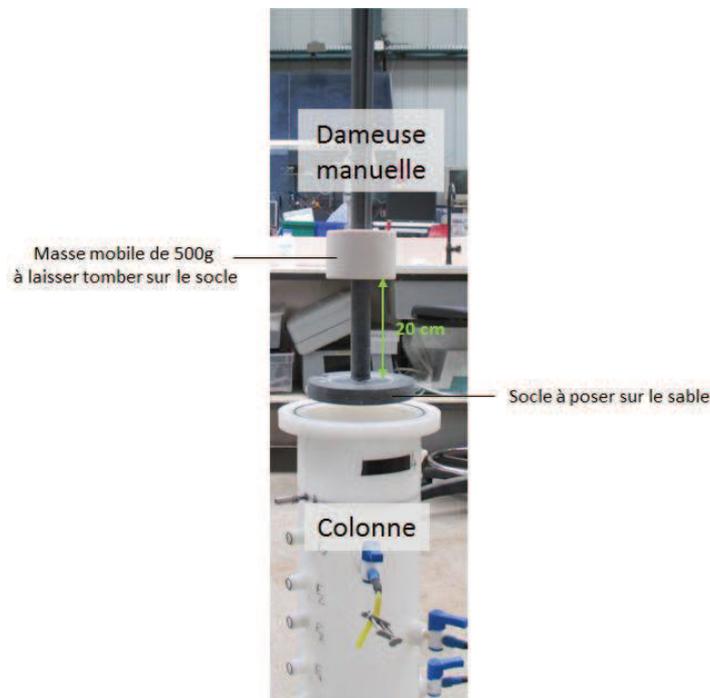


FIGURE V-19 : PHOTOGRAPHIE DE LA DAMEUSE MANUELLE : UNE MASSE MOBILE DE 500 g EST ÉCARTÉE DE 20 cm DU SOCLE POSÉ SUR LE SABLE, PUIS LÂCHÉE. L'OPÉRATION EST RÉPÉTÉE TROIS FOIS À TROIS HAUTEURS DE LA COLONNE POUR TASSER LE SABLE.

2. ENSEMENCEMENT DES BACTÉRIES

Après le montage des colonnes, chacune est installée dans la chambre thermostatée et raccordée à son circuit hydraulique (Figure V-2). Elles sont mises en eau avec du milieu de culture stérile (précédemment autoclavé à 110°C pendant 1h). Une fois la colonne saturée, la bonbonne d'alimentation qui ne contenait que du milieu de culture est remplacée par l'inoculum bactérien. Il s'agit de 4 L de milieu où l'on a rajouté 400 mL d'inoculum incubé pendant quelques jours à 35 °C.

L'ensemencement de la colonne se fait pendant 48 à 72h, en circuit fermé, le temps que des bactéries puissent se fixer sur le sable et que le milieu s'homogénéise et se stabilise.

3. CALENDRIER DES EXPÉRIENCES

Plusieurs essais ont été réalisés pendant deux ans. Dans un premier temps, il s'est agi de maîtriser tous les aspects des expériences : adapter tous les types de mesure sur une même colonne et assurer un suivi régulier. Puis, le but a été de mettre en place une expérience complète qui mette en évidence la faisabilité du suivi de la biodégradation du toluène par *R. w.* à l'aide d'un couplage de mesures géophysiques et d'analyses de gaz.

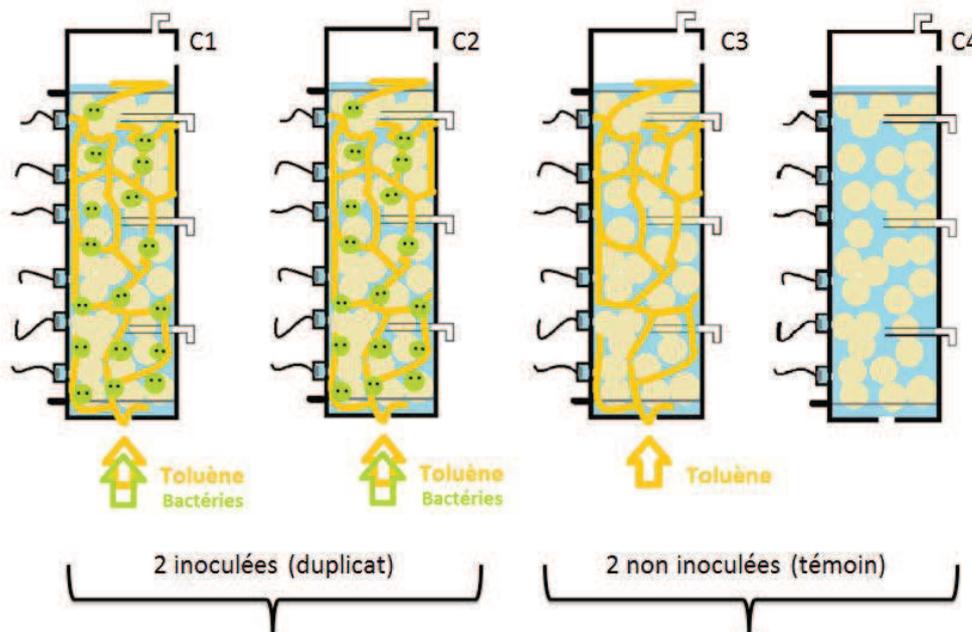


FIGURE V-20 : PRÉSENTATION D'UNE EXPÉRIENCE BIOPHY COMPLÈTE À QUATRE COLONNES : DEUX INOCULÉES IDENTIQUES (C1 ET C2) POUR UN DUPLICAT DES MESURES. ET DEUX NON-INOCULÉES, UNE AVEC (C3) ET UNE SANS (C4) TOLUÈNE, COMME TÉMOINS.

Pour cela, des essais sur quatre colonnes ont été réalisés, deux inoculées identiques pour un duplicat des mesures ; et deux non-inoculées témoins, une avec et une sans toluène (Figure V-20). De nouveau, plusieurs essais ont dû être réalisés, en circuit ouvert et en circuit fermé, afin d'obtenir des résultats de tous les types d'analyses sur un même essai. Le Tableau V-3 et la Figure V-21 présentent le calendrier des différents essais menés au cours de cette thèse.

Les résultats de deux essais principaux seront exploités : les colonnes non-inoculées témoins réalisées en novembre 2013, ainsi que les colonnes inoculées réalisées entre janvier et mars 2014. Ce jeu complet de quatre colonnes a donné des résultats exploitables pour tous les types de mesures. Cependant, les autres essais seront analysés partiellement, car ils ont donné des résultats intéressants pour un ou plusieurs types d'analyses.

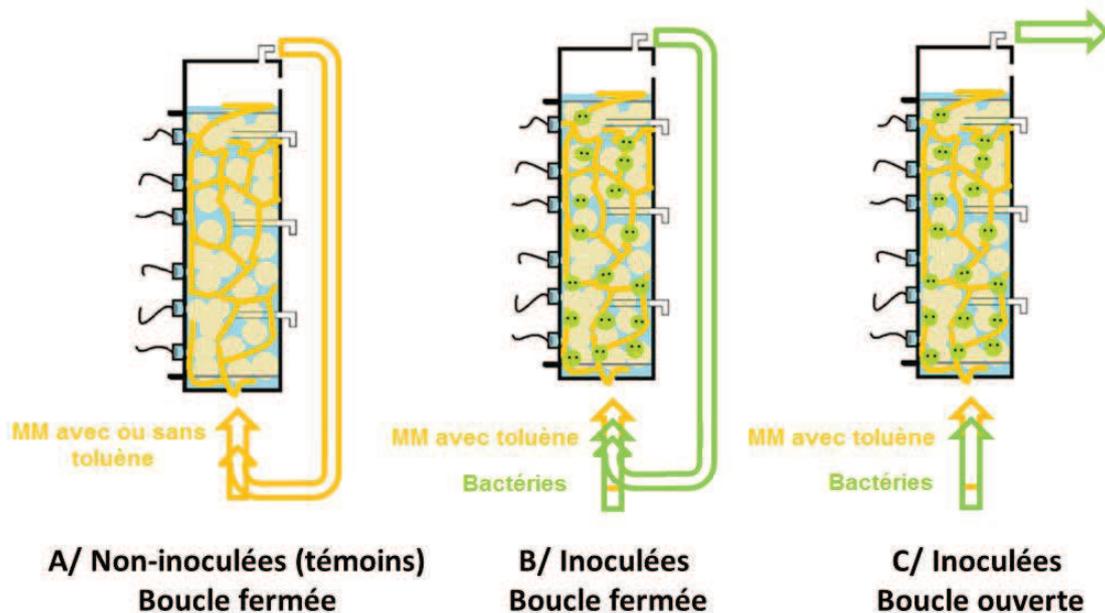


FIGURE V-21 : DIFFÉRENTS TYPES D'ESSAIS MENÉS PENDANT LA THÈSE : A/ COLONNES NON-INOCULÉES EN BOUCLE FERMÉE ; B/ COLONNES INOCULÉES EN BOUCLE FERMÉE ET C/ COLONNES INOCULÉES EN BOUCLE OUVERTE.

TABLEAU V-3 : CALENDRIER DES DIFFÉRENTS ESSAIS BIOPHY.

Type d'expérience	Dates	Nombre de colonnes	Durée (j)	Remarques
A/ Non-inoculées Boucle fermée	Février-Mars 2013	C3 et C4	45	Contamination des deux colonnes : résultats non exploitables en géophysique et en analyse de gaz
	Novembre 2013	C3 et C4	15	Ajouts de formaldéhyde : pas de contamination des colonnes. Résultats exploitables en géophysique et en analyse de gaz
B/ Inoculées Boucle fermée	Juillet 2012	C1	22	Alimentation trop forte en H ₂ O ₂ : disparition de la population bactérienne en quelques jours. Pas de mesures exploitables.
	Octobre 2012	C1	21	Mesures géophysiques exploitables
	Décembre 2012	C1	15	Problème d'électrodes de mesure Ag/AgCl : pas de mesures géophysiques exploitables
	Mars-Juin 2013	C1 et C2	109	Premières mesures avec le SPIRIT exploitables mais problème d'électrodes de mesure Ag/AgCl
C/ Inoculées Boucle ouverte	Mai-Juillet 2013	C1 et C2	46	Problème d'électrodes de mesure Ag/AgCl mais mesures avec SPIRIT exploitables
	Janvier-Mars 2014	C1 et C2	58	Résultats exploitables en géophysique et en analyse de gaz

VI. MATÉRIEL ET MÉTHODES – APPLICATION SUR SITE PILOTE

La méthode de surveillance d'un biotraitement par mesures géophysiques et analyse de CO₂ a été mise en place sur le terrain pollué d'une station-service (dont la localisation ne sera pas précisée pour des raisons de confidentialité). Ce chapitre présente l'historique du site pollué, un diagnostic géochimique, géophysique et microbiologique préliminaire, la stratégie de dépollution choisie pour ce site, et enfin, la méthodologie globale appliquée pour surveiller la dépollution et démontrer sa faisabilité à l'échelle du terrain.

A. PRÉSENTATION DU SITE PILOTE

1. HISTORIQUE CONNU DU SITE (ÉTABLI PAR SERPOL EN MAI 2012)

La station-service étudiée a été créée en juillet 1967. Les produits pétroliers sont stockés en cuves semi-enterrées et enterrées. Ils comprennent : du supercarburant (SC), du carburant auto (CA), du gazole (GO), de l'essence (SP98) et du fioul domestique (FOD).

Entre juillet 1992 et décembre 1997, ont été recensés quatre déversements accidentels de GO provenant de défauts sur des infrastructures : poste de distribution, collecteurs, canalisations. L'incident le plus important est survenu en novembre 1996 suite au percement (probablement corrosion) de la canalisation GO d'alimentation des postes de distribution. Les pertes ont été estimées entre 25 et 30 m³. Du fait de la faible perméabilité des terrains encaissants, le produit a migré le long des réseaux enterrés. Le diagnostic réalisé en février 1997 montre une accumulation des hydrocarbures en poches dû à la forte hétérogénéité des terrains rencontrés. Le produit a ensuite été remobilisé par la nappe présente à environ 3 m de profondeur sur le site.

Afin de récupérer un maximum de produit, plusieurs opérations de pompage ont été réalisées de décembre 1996 à février 1997. Les quantités de produit récupérées par ces opérations sont de 10 m³.

En décembre 1997, le déversement d'hydrocarbures dans le ru rejoignant une rivière proche est constaté, corrélé avec un écart de 9 m³ dans les stocks de GO de la station. Le curage du ru et un barrage flottant sur la rivière ont immédiatement été mis en place. Puis, afin d'éviter tout épanchement futur, des travaux de modernisation de l'ensemble des infrastructures pétrolières ont été engagés sur la station : l'ancien parc à cuves a été entièrement démantelé, et un nouveau parc a été installé.

Les données historiques de déversements accidentels ne font état que de fuites de gazole. Cependant, les impacts en hydrocarbures, mais surtout en BTEX, observés dans les sols et les eaux souterraines témoignent de pollutions par des essences ou supercarburants non recensées. Par ailleurs, les différents diagnostics des sols et des eaux souterraines réalisés montrent un impact important en hydrocarbures totaux et BTEX dans les sols et les eaux au droit et en aval hydraulique de l'ancien parc à cuves démantelé en 1997.

L'évaluation simplifiée des risques réalisée en 2004, montre différentes voies de transfert potentiel au droit du site : la nappe présente entre 2,5 et 4,5 m de profondeur est en relation hydraulique avec la nappe alluviale de la rivière et avec la rivière. L'évaluation indique un site de classe 2 : site à surveiller pour les milieux « eaux souterraines » (usage AEI) et « eaux superficielles » (usage récréatif).

2. CARACTÉRISATION HYDROGÉOLOGIQUE DU SITE (D'APRÈS LES DONNÉES DU PROJET ATTENA, BRGM ET ADEME, 2012)

Plusieurs puits ont été forés pour caractériser le site. Les analyses ont montré que :

- Le sol est principalement composé de limons et d'argiles (Figure VI-1). De la surface vers les profondeurs, on trouve :
 - les limons des plateaux, qui renferment de nombreux débris de meulière. Leur épaisseur est inférieure à 3 m ;
 - les calcaires et argiles à meulières de Brie (Sannoisien), sur une épaisseur moyenne de 10 à 15 m. Le calcaire de Brie est jaunâtre, vacuolaire ou compact, granuleux ou bréchiq, avec des veines de calcite recristallisée. Au voisinage de la surface, il fait place à une argile ferrugineuse à meulière caverneuse ou compacte, parfois épaisse de plusieurs mètres ;
 - l'argile verte de Romainville (Sannoisien) d'une épaisseur de 3 à 5 m. Il s'agit d'une argile verte à minces intercalations de calcaire gris vert ;
 - les formations hétérogènes de l'Eocène supérieur, moyen et inférieur.
- Le sol a une faible perméabilité (entre 10^{-6} et 10^{-7} m/s) ;
- La direction du flux est Nord-Ouest ;
- Le sommet de la nappe phréatique se situe entre 2,5 et 4,5 m de profondeur ;
- La vitesse de la nappe est d'environ 17 m/an.

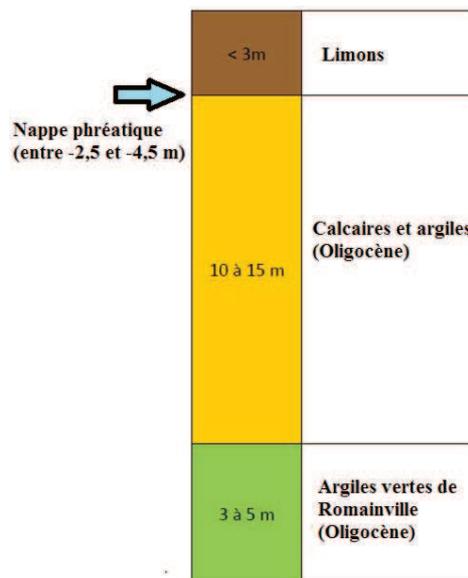


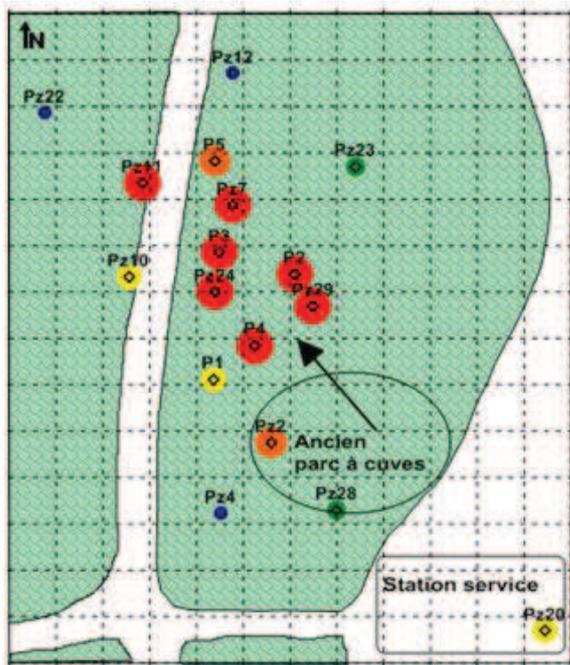
FIGURE VI-1 : DIAGRAMME DONNANT LA SECTION GÉOLOGIQUE DU TERRAIN D'ÉTUDE.

3. DIAGNOSTIC CHIMIQUE PRÉLIMINAIRE

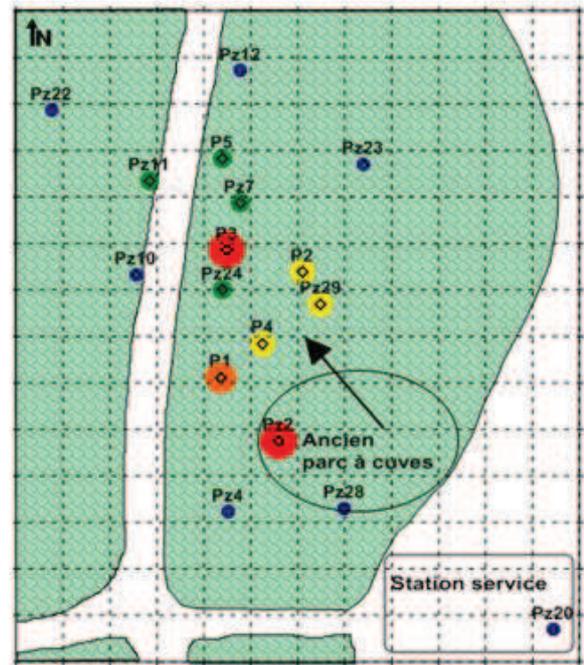
Le site est contaminé par des hydrocarbures. La présence de BTEX (Benzène, Toluène, Ethyle-benzène, Xylènes) a notamment été montrée dans la zone de l'ancien parc à cuves (entre 2 et 5 m de profondeur, Figure VI-2), ainsi que l'existence d'un panache dissous partant de l'ancien parc à cuves et s'étendant jusqu'à 70 m en aval du site.

Les résultats obtenus montrent que la zone la plus contaminée se situe au niveau de PZ2 avec une concentration en BTEX de l'ordre de 10 mg/L.

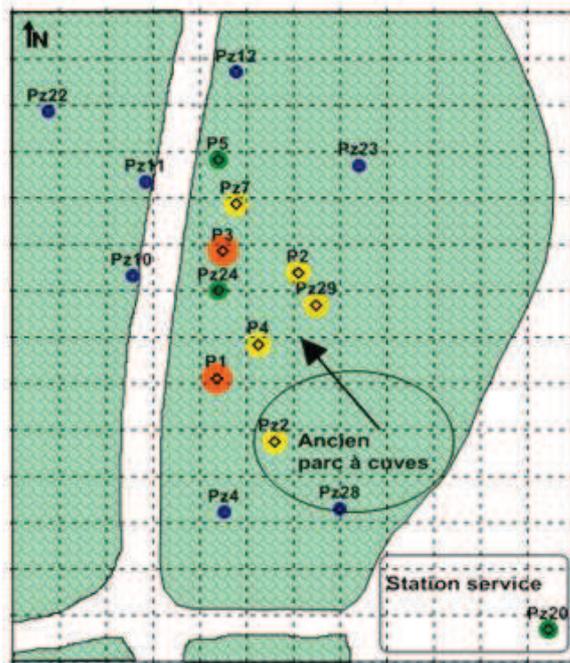
Un processus de biodégradation des hydrocarbures et BTEX dissous dans les eaux est également mis en évidence par la présence d'un appauvrissement en oxygène dissous, en nitrates et en sulfates (Figure VI-3), et à contrario d'un enrichissement en ammonium, en fer et en manganèse au droit des zones impactées.



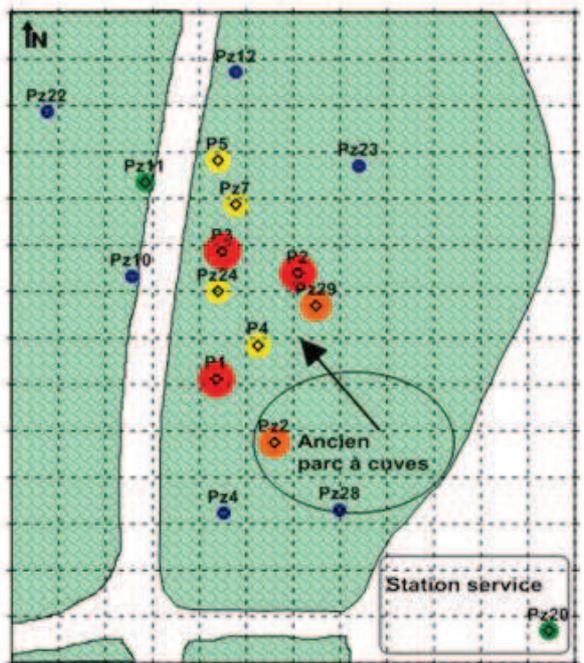
A/ Benzène



B/ Toluène



C/ Ethylbenzène



D/ Xylènes



FIGURE VI-2 : CARTES DES CONCENTRATIONS EN BTEX MESURÉES DANS LES PUIITS DE SURVEILLANCE (SEPTEMBRE 2013) : A/ BENZÈNE, B/ TOLUÈNE, C/ ETHYLE-BENZÈNE ET D/ XYLÈNES. L'ANCIEN PARC À CUVES CORRESPOND À LA ZONE SOURCE DE LA POLLUTION, ET LA FLÈCHE INDIQUE LE FLUX DE DIRECTION NORD-OUEST DE LA NAPPE.

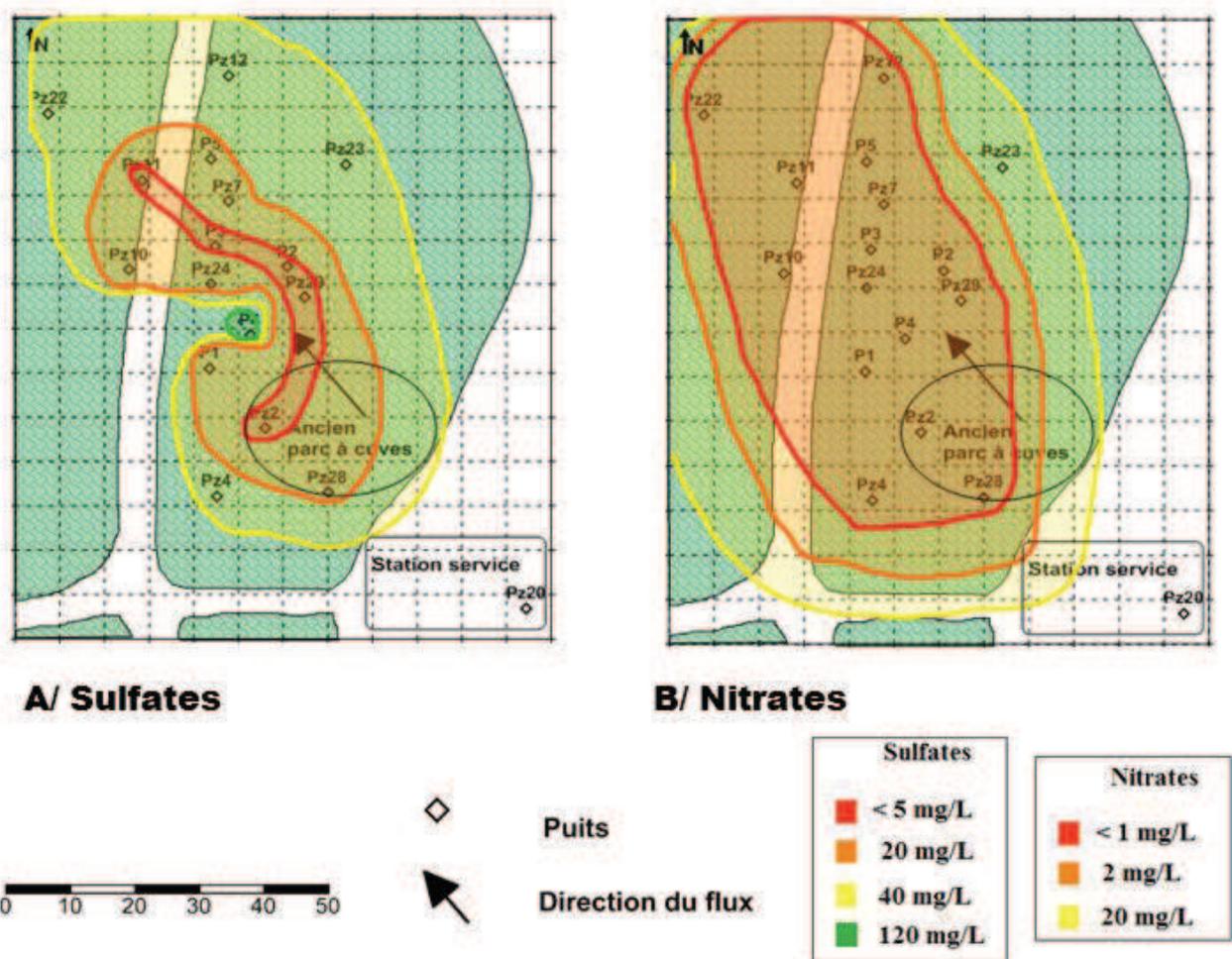


FIGURE VI-3 : CARTES DES CONCENTRATIONS EN ACCEPTEURS D'ÉLECTRONS DANS LES PUIITS DE SURVEILLANCE (SEPTEMBRE 2013) : A/ SULFATES ET B/ NITRATES. L'ANCIEN PARC À CUVES CORRESPOND À LA ZONE SOURCE DE LA POLLUTION, ET LA FLÈCHE INDIQUE LE FLUX DE DIRECTION NORD-OUEST DE LA NAPPE .

4. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

Afin de réaliser une étude microbiologique sur le site pilote et de mettre en évidence un potentiel de biodégradation des BTEX sur le site, des essais en laboratoire ont été réalisés en aérobie à partir des eaux des piézomètres, avec dopage en toluène et suivi de la concentration en toluène au cours du temps. Un ajout d'H₂O₂, traitement potentiellement utilisable sur site pour stimuler l'activité microbienne de dégradation des BTEX, a également été réalisé.

Les résultats obtenus montrent une légère dégradation du toluène avant ajout d'H₂O₂. D'autres mesures suggèrent que l'ajout d'H₂O₂ stimule de manière très significative l'activité de dégradation du toluène. Ces travaux en laboratoire montrent donc qu'il y a bien une activité potentielle de biodégradation du toluène sur le site pilote, et suggèrent qu'un traitement basé sur l'utilisation de l'H₂O₂ peut potentiellement conduire à une stimulation de l'activité de dégradation des BTEX par la microflore endogène du site.

5. CAMPAGNE GÉOPHYSIQUE PRÉLIMINAIRE

Des mesures de résistivité électrique (ER) et de polarisation induite en domaine temporel (TDIP) ont été réalisées en injectant dans le sol un courant électrique (I) entre deux électrodes émettrices et en mesurant le potentiel induit (V) entre deux électrodes de réception. En comparant le signal envoyé et le signal reçu, la réponse électrique du sol a été obtenue.

Pour les mesures ER, il s'agit de la résistivité (la capacité du sol à conduire le courant électrique), obtenue en multipliant la résistance (V/I) par un facteur géométrique qui dépend du dispositif de mesure. Pour les mesures TDIP, on mesure la courbe de décroissance du potentiel pendant son retour à zéro, après que l'injection de courant I ai été coupée. Cela permet de calculer la chargeabilité (aire sous la courbe de décroissance du potentiel) qui représente la capacité du milieu à stocker des charges (cf. Partie 1, chapitre III pour plus de détails).

Quatre tomographies ER et de TDIP ont été menées en mai 2012 (Figure VI-4-A). L'espacement entre électrodes était de 1 m, la longueur des profils de 95 m (96 électrodes) ou 71 m (72 électrodes), sur une configuration en dipôle-dipôle.

6. ANALYSES DE GAZ PRÉLIMINAIRES

La concentration de CO₂ et le rapport isotopique δ¹³C(CO₂) sont mesurés par spectroscopie laser infrarouge. Le spectromètre utilisé, le SPIRIT (SPectromètre Infra-Rouge *In Situ* Troposphérique), est directement relié à une chambre d'accumulation des gaz posée sur une embase fixée au sol. Le flux d'émissions de CO₂ provenant de la subsurface est mesuré en quelques minutes par la méthode de la chambre fermée (en mode dynamique par recirculation de l'air après analyse). Par cette méthode, la mesure du rapport isotopique du carbone de la source d'émission prend entre 5 min et 1h suivant l'intensité du flux : en laissant le CO₂ s'accumuler de 400 ppm jusqu'à 800 ppm au moins, la mesure obtenue par « Keeling plot » est suffisamment précise (à plus de 0,3 ‰ près).

Une campagne d'analyse de gaz a été menée en septembre 2013, sur 21 embases placées en aval de l'ancien parc à cuves (Figure VI-4-B).

Il existe plusieurs méthodes de mesure de flux sur le terrain :

- Les méthodes de chambre au sol, appropriées pour les mesures à l'échelle locale et pour l'étude de la diversité spatiale et
- Les méthodes micro météorologiques qui nécessitent l'emploi de tours à flux (≈1 m 50 de hauteur pour couvrir un rayon de 200 m de parcelle) équipées d'une station météorologique associée à un traitement lourd de données (anémomètre sonique 3D pour le calcul du vecteur vitesse du vent, capteurs de chaleur du sol, capteurs de température et d'humidité du sol et de l'air pour le calcul des flux de chaleur...) [Hendriks *et al.*, 2010 ; Heinesch, 2007].

Les mesures par chambre au sol (échelle locale de 0,1 à 1 m²) permettent une étude détaillée des mécanismes d'émissions (microbiologie, végétation, pédologie). Elles sont adaptées pour des terrains à forte variabilité spatiale et temporelle des flux. Cependant, il faut faire attention à un changement de pression au moment de la pose de la chambre sur son embase (observable et corrigéable lorsque la concentration est suivie en temps réel comme dans le cas de SPIRIT).

Lorsque le circuit est ouvert (flux constant d'entrée d'air), le calcul de flux F [mol.m⁻².s⁻¹] est calculé à partir de l'enrichissement en gaz i dans la chambre :

$$\Delta C_i = C_{i \text{ chambre}} - C_{i \text{ air}} \quad \text{ÉQUATION VI-1}$$

$$F = \frac{D}{S} \cdot \Delta C_i \quad \text{ÉQUATION VI-2}$$

avec D le débit volumique d'air circulant dans la chambre, S la surface d'émission.

Lorsque le circuit est fermé (chambre d'accumulation), le flux s'obtient avec la formule suivante :

$$F = h \cdot \frac{dC_{i \text{ chambre}}}{dt} \quad \text{ÉQUATION VI-3}$$

avec $\frac{dC_{i \text{ chambre}}}{dt}$ le taux d'accumulation du gaz i dans la chambre et h la hauteur effective ou volume du circuit fermé sur la surface d'émission.

La première méthode est moins précise pour la mesure des petits flux quand $\Delta C_i \rightarrow 0$, contrairement à la seconde méthode dont la mesure de flux ne dépend pas de la concentration du gaz i de référence dans l'air $C_{i \text{ air}}$. La deuxième méthode est donc généralement préférée.

Remarque : les calculs du rapport isotopique $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ se font avec la méthode du Keeling plot [Pataki et al., 2003] (plus de détails dans le chapitre V-C-4).

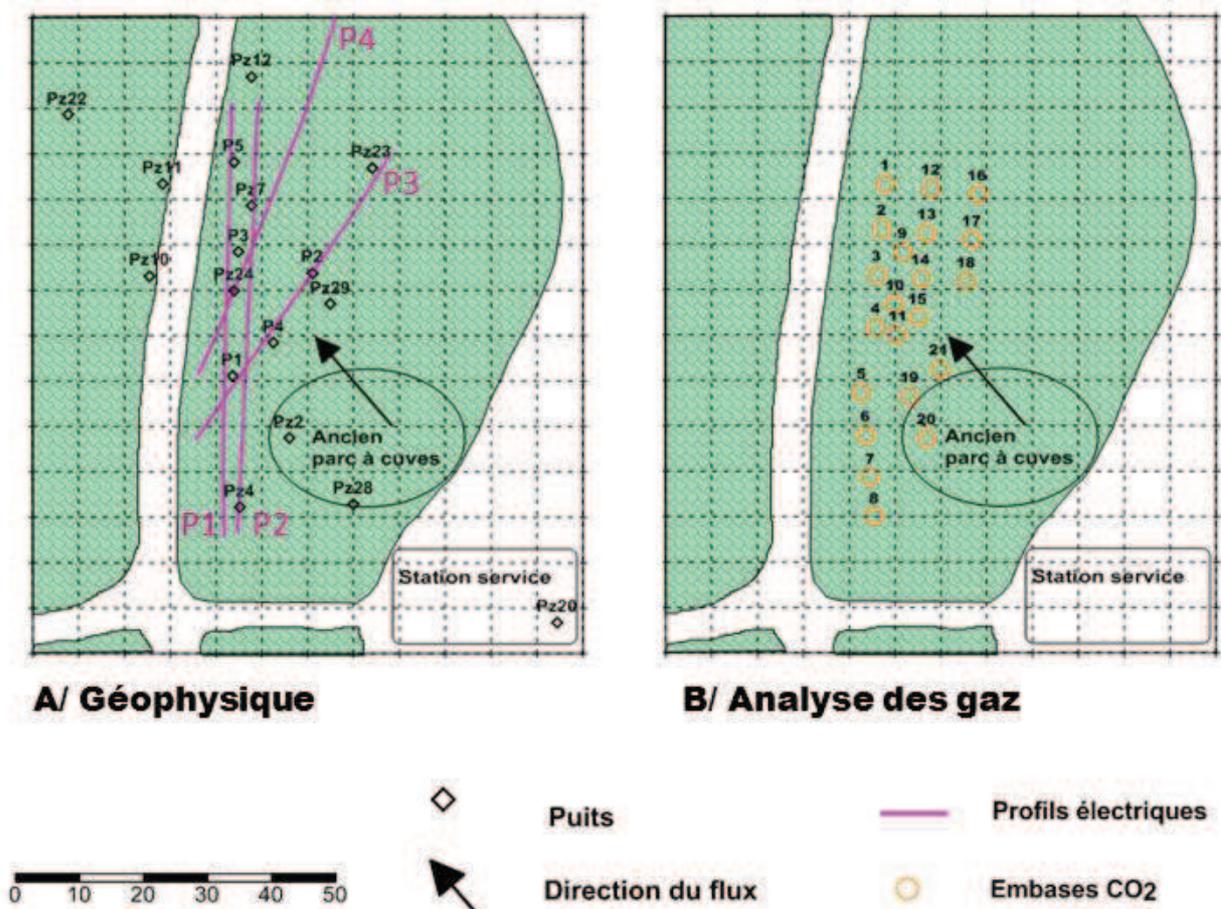


FIGURE VI-4 : CARTES DE L'EMPLACEMENT A/ DES 4 PROFILS ÉLECTRIQUES ET B/ DES 21 EMBASES UTILISÉES POUR POSER LA CHAMBRE DU SPIRIT, POUR LA CAMPAGNE DE MESURES PRÉLIMINAIRES (GÉOPHYSIQUE : MAI 2012, GAZ : SEPTEMBRE 2013).

7. STRATÉGIE DE TRAITEMENT

Une atténuation naturelle est déjà en cours sur le site, mais elle est limitée par le manque d'oxygène (accepteur d'électron nécessaire au métabolisme aérobie). C'est pourquoi un biotraitement par apport d'oxygène a été décidé pour ce site.

Une barrière réactive de 4 m de profondeur a été creusée perpendiculairement à la progression de la pollution pour réduire le panache en aval (Figure VI-6). Elle est équipée de deux puits de pompage et de trois puits de réinjection. De l' H_2O_2 diluée est ajoutée à l'eau pompée dans la barrière, puis elle est réinjectée sous le niveau de la nappe afin d'y apporter de l'oxygène et ainsi stimuler l'activité bactérienne.

B. MONITORING DE LA BIODÉPOLLUTION

La mise en place du dispositif de surveillance (profils électriques, embases pour les mesures de CO_2 en surface, sondes physico-chimiques dans les forages, station météo) a été réalisée en septembre 2013. Après un retard de plus d'un an par rapport au calendrier escompté initialement (difficultés administratives...), la barrière réactive a été activée en avril 2014. La surveillance du biotraitement a commencé à partir de cette date.

1. SUIVI ÉLECTRIQUE

Le suivi géophysique est assuré suivant 2 profils (Figure VI-6-B) :

- Un profil P1 transverse au panache et perpendiculaire à la barrière.
 - Une surveillance continue et automatique tous les 2 jours est assurée en ER et PP (4 fenêtres temporelles) avec un Syscal R1plus, durée de créneau de 2s, en configuration dipôle-dipôle et Wenner-Schlumberger.
 - De plus, tous les mois, des mesures sont réalisées :
 - en mode TDIP avec un Elrec pro (mode fullwave²) et un VIP4000 comme émetteur, en configuration dipôle-dipôle, afin de modéliser la courbe de décroissance avec un modèle de type Cole-Cole [Fiandaca et al., 2013],
 - en mode SIP avec le GDP 32 II et un système de multiplexeurs (Zonge International, Tucson, Arizona, USA).

La configuration utilisée pour les mesures de PP est un dipôle-dipôle, car c'est celui qui induit le moins d'effets de couplage EM (la mesure du potentiel se fait en dehors du segment formé par les électrodes d'injection).

- Un profil P2 transverse au panache mais situé à 3 m de la barrière et parallèle à celle-ci. Des mesures sont réalisées chaque mois avec un Syscal pro en ER et PP (20 fenêtres), durée de créneau de 2s, en configuration dipôle-dipôle et Wenner-Schlumberger. Les 48 électrodes du profil, espacées d'1 m, sont réinstallées à chaque campagne, et repositionnées aux mêmes points avec une erreur de 5 cm environ. Deux bornes topographiques permanentes servent de repère aux deux extrémités.

Le profil P1 est installé définitivement au fond d'une tranchée de 50 cm de profondeur qui a été remblayée après installation des électrodes et des flûtes multibrins. Le dispositif est composé de 60 électrodes (30 d'injection et 30 de mesure), espacées de 2 m (Figure VI-5). Toutes les électrodes sont en inox, positionnées chacune dans un trou rempli de bentonite afin d'assurer un bon contact électrique avec le sol. En accord avec les remarques faites dans la partie 1, chapitre III-C-4, les tomographies ER et PP ont été réalisées à l'aide de câbles séparés pour l'injection et la mesure pour le profil P1.

² Enregistrement en continu du courant et des potentiels avec une fréquence d'échantillonnage de 100 Hz.

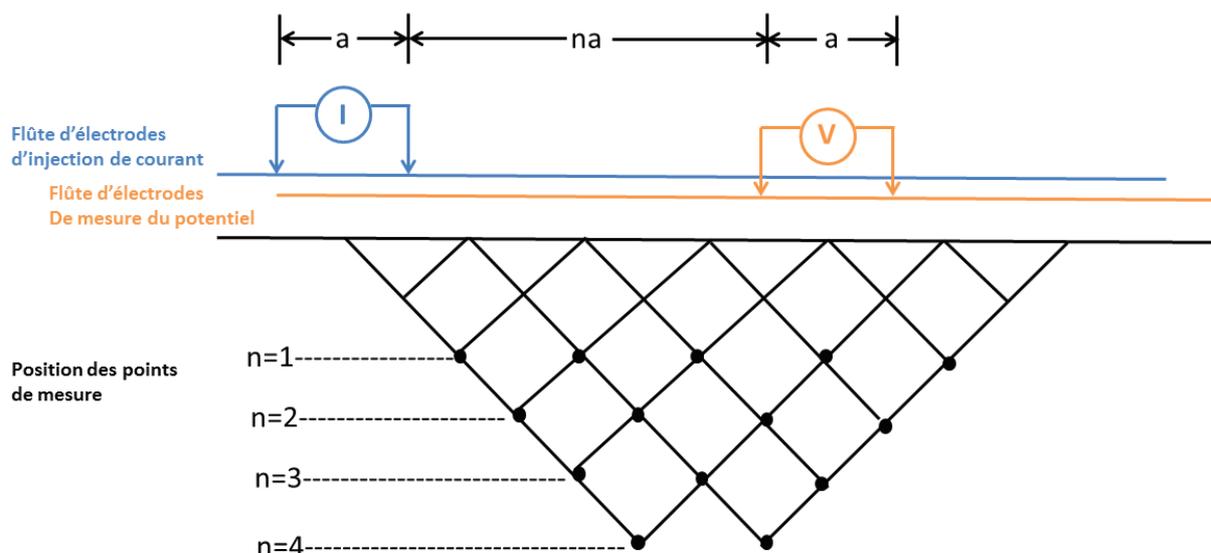


FIGURE VI-5 : CONFIGURATION DIPÔLE-DIPÔLE DU PROFIL PERMANENT : UNE FLÛTE D'ÉLECTRODES EST UTILISÉE POUR L'INJECTION DE COURANT, ET UNE AUTRE FLÛTE POUR LA MESURE DU POTENTIEL.

2. SPIRIT

Une surveillance par analyse de gaz est réalisée chaque mois à chaque 2 mois sur les 21 embases de la première campagne de mesures (Figure VI-6-C). Quatre embases se trouvent sur la barrière. Il s'agit de la 4, la 11, la 15 et la 18.

Le temps dédié aux mesures étant très court (2 jours par mois), la priorité est mise sur la mesure des flux de gaz d'un grand nombre d'embases, puis à celle des rapports isotopiques du carbone sur les embases les plus émettrices (donc plus fiables).

3. SUIVI PHYSICO-CHIMIQUE EN FORAGES

a) TYPE DE SONDÉS EN FORAGES

Les paramètres physico-chimiques dans la nappe sont également suivis en continu via certains forages. Les sondes utilisées sont des sondes de conductivité, température, oxygène dissous et piézométrie de chez Campbell. Elles sont placées dans les piézomètres suivants (Tableau VI-1) :

TABLEAU VI-1 : RÉPARTITION DES SONDÉS DE MESURE DES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES DANS DIFFÉRENTS PUIITS DE SURVEILLANCE DU SITE.

Forages	Paramètres suivis
Pz28	Conductivité, O ₂ dissous, piézométrie
Pz2	Piézométrie, température
P4	Conductivité, température, O ₂ dissous, piézométrie
Pz24	Conductivité, température, O ₂ dissous
PP2	Piézométrie, température
P2	Température
Pz7	Conductivité, température, O ₂ dissous

b) PRÉLÈVEMENTS ET ANALYSES CHIMIQUES

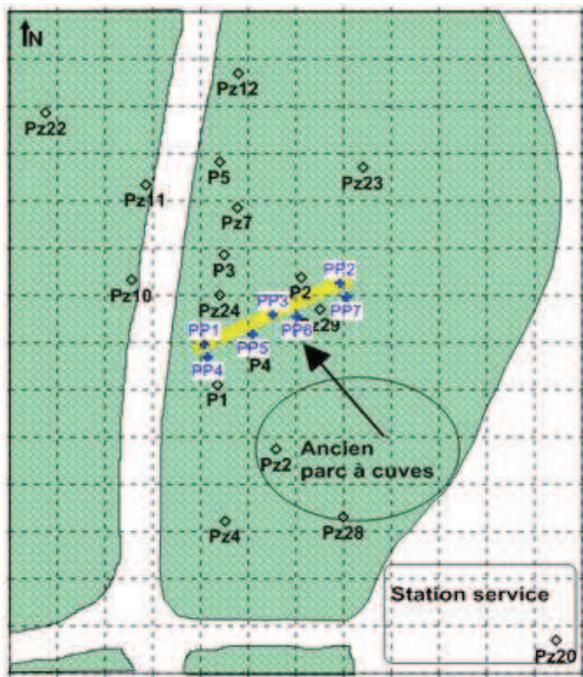
Afin de confirmer les mesures de $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ réalisées avec le SPIRIT en surface, quelques campagnes de mesures de l'isotopie du carbone dans les eaux ont été programmées, notamment la mesure des $\delta^{13}\text{C}(\text{BTEX})$.

Les échantillons seront prélevés sur différents piézomètres afin d'observer des variations spatiales des $\delta^{13}\text{C}(\text{BTEX})$. En effet, plus on se situe en aval de la source de pollution, plus la biodégradation a été importante et plus les $\delta^{13}\text{C}(\text{BTEX})$ ont pu évoluer par rapport à la zone source de pollution. Les échantillons seront aussi prélevés à des périodes différentes (3 campagnes) : avril 2014 (état zéro), octobre 2014 et mars 2015, afin de suivre l'évolution temporelle.

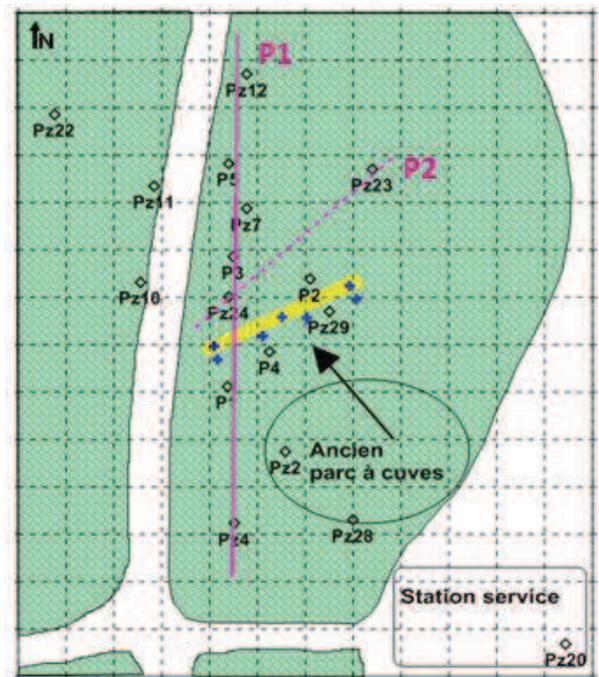
De plus, tous les mois, une campagne de prélèvements d'eau dans les forages permet de quantifier la concentration en hydrocarbures (Hydrocarbures totaux HCT C5-C10 et C10-C4, BTEX), ainsi qu'en accepteurs et donneurs d'électrons (nitrates, nitrites, ammonium, sulfates, manganèse, fer II, sulfures), et de mesurer l'alcalinité des eaux.

4. SUIVI MICROBIOLOGIQUE

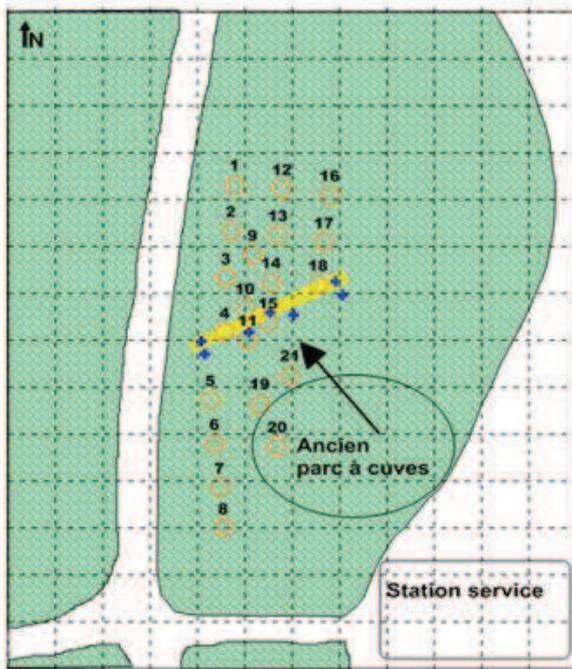
Un certain nombre de forages fera aussi l'objet de campagnes de prélèvements et d'analyses microbiologiques (comptage et profils de diversité). Un état zéro a été réalisé en mars 2014, et une deuxième campagne est prévue en 2015.



A/ Barrière et puits



B/ Géophysique



C/ Gaz

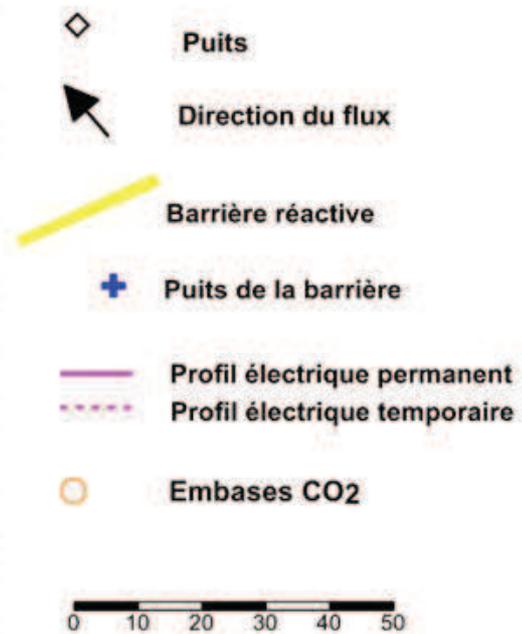


FIGURE VI-6 : CARTES DE L'EMPLACEMENT A/ DES PUIXS DE SURVEILLANCE, DE LA BARRIÈRE RÉACTIVE, ET DES PUIXS DE POMPAGE ET INJECTION DE LA BARRIÈRE ; B/ DES PROFILS ÉLECTRIQUES : UN PERMANENT PERPENDICULAIRE À LA BARRIÈRE P1 (UNE MESURE TOUS LES DEUX JOURS), UN TEMPORAIRE PARRALLÈLE À LA BARRIÈRE P2 (1 MESURE PAR MOIS) ; ET C/ DES 21 EMBASES UTILISÉES POUR POSER LA CHAMBRE DU SPIRIT.

PARTIE 3 : RÉSULTATS

VII. RÉSULTATS – EXPÉRIENCES EN COLONNES

Comme justifié dans la partie précédente, les résultats de quatre colonnes BIOPHY seront principalement traités ici : deux colonnes inoculées, C1 et C2, réalisées entre janvier et mars 2014, et deux colonnes témoins non inoculées, C3 et C4, réalisées en novembre 2013.

Tout d’abord, la qualité des mesures faites par les différents appareils à disposition sera abordée, avant d’exposer puis d’interpréter les résultats obtenus pour ces quatre colonnes, ainsi que quelques résultats complémentaires obtenus sur des précédents essais.

A. VALIDATION DU DISPOSITIF DE MESURES ÉLECTRIQUES

Avant de réaliser toutes les mesures géophysiques sur les colonnes BIOPHY, la validité des systèmes de mesure PP a été vérifiée. Dans un premier temps, les trois appareils à disposition, le GDP 32II (Zonge) et deux potentiostats/galvanostats (PAR nouveau et PAR ancien), ont été testés sur un circuit électrique dont la réponse en phase et en amplitude était connue. Puis, le montage colonne + électrodes a été vérifié en réalisant des mesures avec de l’eau salée et avec un sable saturé avec de l’eau. Ces deux derniers tests devaient donner une phase sinon nulle, du moins constante.

C’est en réalisant ces tests qu’un problème de calibration sur le GDP 32II a pu être identifié. Il a tout d’abord été pallié en réalisant une correction manuelle à chaque fréquence à partir des résultats obtenus sur circuit Randless R(RC). Il s’est ensuite avéré qu’il y avait un problème de software et que la calibration automatique proposée par le constructeur n’était pas effective.

C’est aussi grâce à ce genre de tests qu’il a été remarqué que les électrodes Ag/AgCl utilisées au début des expérimentations avaient une durée de vie limitée. En effet, au-delà de 10 jours de fonctionnement, les mesures en amplitude restaient correctes, tandis que celles en phase dérivait dans de l’eau, qui est un milieu impolarisable (à basse fréquence). C’est l’une des raisons qui a retardé les expériences sur colonnes.

Les mesures présentées ci-dessous concernent les électrodes Cu/CuSO₄ fabriquées et validées au laboratoire (cf. Annexe 7), sur un GDP 32II possédant une calibration automatique opérationnelle...

1. MESURES SUR UN CIRCUIT R(RC)

Un circuit R₁(R₂C) ayant une réponse électrique complexe connue a été choisi. Pour pouvoir être le plus précis possible, tous les éléments du circuit ont été caractérisés séparément : R₁ = 10,1 Ω, R₂ = 100,9 Ω et C = 105,8 μF.

Des mesures avec le GDP 32II (Zonge) ont ensuite été réalisées, ainsi que des mesures avec deux potentiostats/galvanostats de chez Princeton Applied Research (PAR). Les réponses en phase et en amplitude comparées à la réponse théorique sont présentées en Figure VII-1. La précision sur la mesure a été calculée à chaque fois. Pour le GDP, un point de mesure correspond à la moyenne sur six mesures (trois fois deux répétitions), et la barre d’erreur correspond à l’écart type sur ces six mesures. Pour les PAR, dans le cas de ces mesures sur circuit R₁(R₂C), dix mesures répétitives ont pu être réalisées. Les résultats présentés correspondent aussi aux moyennes et écarts types calculés sur ces dix mesures.

Les mesures du GDP sont en adéquation avec la réponse théorique, surtout pour les basses fréquences (< 1000 Hz). En phase, les barres d’erreur sont inférieures à 0,5 mrad, et en amplitude, elles sont autour de 0,01 Ω. Le PAR récent donne aussi des résultats satisfaisants, mais le PAR ancien semble moins performant pour les hautes fréquences (> 10 kHz), où les mesures divergent par rapport au modèle. Cependant, les barres d’erreurs du PAR récent sont importantes pour les fréquences autour de 100 Hz. Le problème serait dû à l’appareil et n’a pas pu être résolu. En ce qui concerne les autres points, il y a jusqu’à 5 mrad d’erreur en phase et 0,5 Ω en amplitude pour les deux PAR.

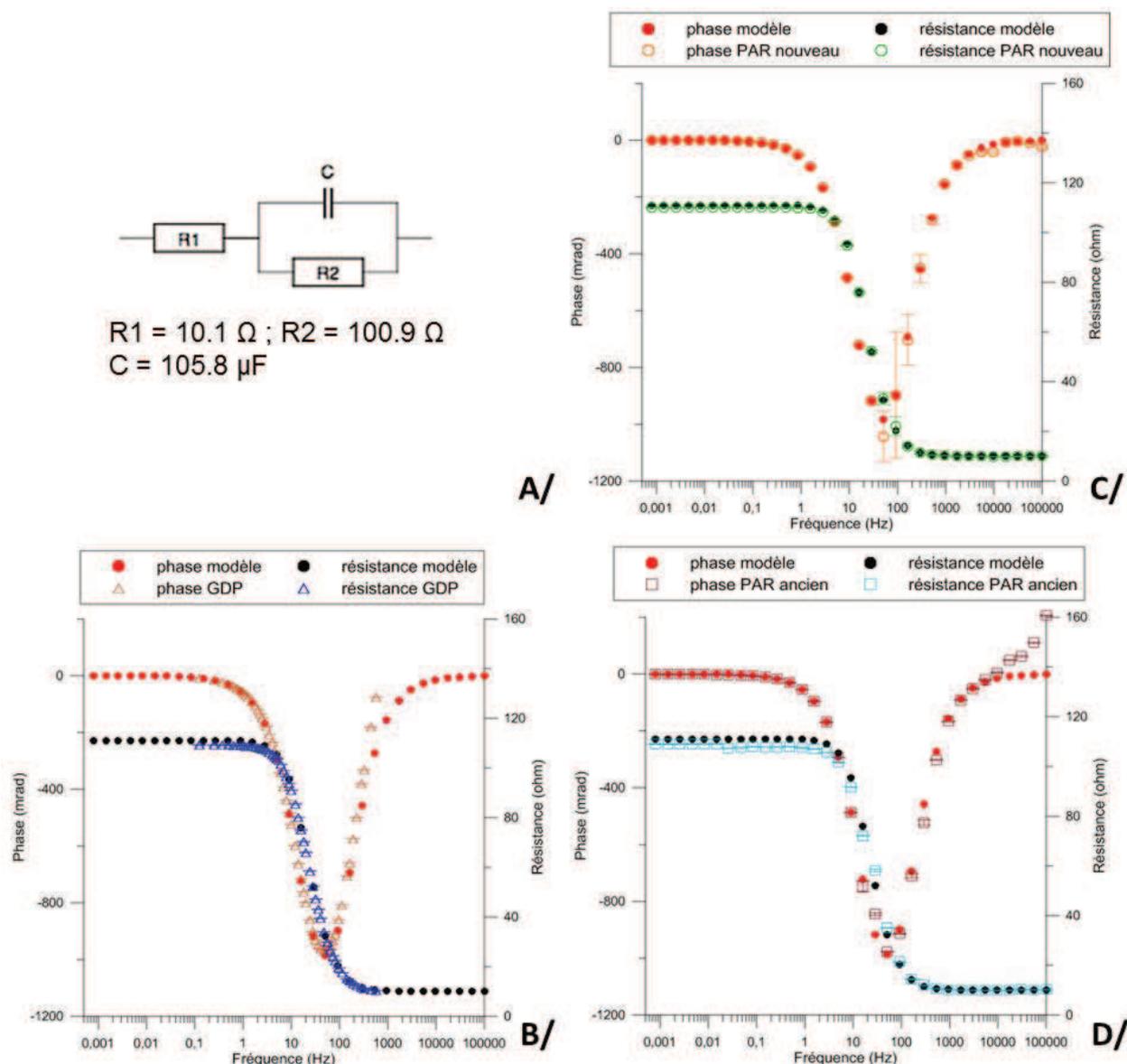
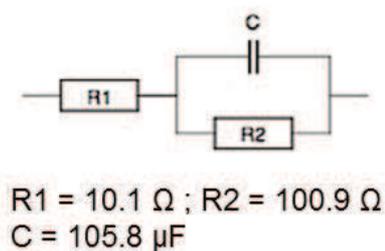


FIGURE VII-1 : A/ CIRCUIT R(RC) CONNU ET MESURES DE LA RÉPONSE ÉLECTRIQUE COMPLEXE DU CIRCUIT OBTENUES SUR B/ LE GDP 32II (ZONGE), SUR C/ UN POTENTIOSTAT/GALVANOSTAT RÉCENT (PAR NOUVEAU) ET SUR D/ UN POTENTIOSTAT/GALVANOSTAT ANCIEN (PAR ANCIEN), COMPARÉES AU MODÈLE THÉORIQUE.

2. MESURES SUR DE L'EAU SALÉE

Afin de tester le système expérimental, appareil branché sur une colonne, des mesures sur un milieu impolarisable, de l'eau salée ($\sigma = 2050 \mu S/cm$), ont été réalisées.

La colonne équipée des électrodes $Cu/CuSO_4$ a été remplie d'eau et les mesures ont été faites avec les trois appareils de mesure, le GDP et les deux PAR, sur trois couples d'électrodes de mesure : E1E4, E2E5 et E3E6 (Figure VII-2). Le GDP donne bien une phase stable, proche de zéro, entre 0,25 et 128 Hz. De faibles fluctuations de la phase peuvent être observées lorsqu'une ou les deux électrodes de mesure sont trop proches des électrodes d'injection (cf. Annexe 8). Les barres d'erreurs (écart type sur 6 mesures) restent faibles, inférieures à 0,2 mrad, excepté pour la fréquence 0,125 Hz (et ses deux premières harmoniques).

Par contre, les mesures de phase avec le PAR récent (sur la même colonne, avec les mêmes électrodes de mesure) sont moins stables. Elles restent cependant proches de zéro entre 0,1 et 50 Hz. Avec l'ancien PAR, les mesures sont stables et proches de zéro entre 1 et 10 kHz.

La réponse en amplitude est présentée en Figure VII-3. De même que pour la phase, les mesures réalisées avec le GDP sont plus stables, autour de $5,6 \Omega.m$, avec une erreur inférieure à $0,09 \Omega.m$. Le spectre en amplitude obtenu avec le PAR récent présente un pic autour de 100 Hz, et les mesures du couple E3E6 montrent une différence de résistivité de $3 \Omega.m$ par rapport aux deux autres couples. Pour l'ancien PAR, le spectre présente un saut à 10 Hz, défaut vraisemblablement dû à l'appareil, et le spectre dérive dans les basses fréquences ($< 0,5$ Hz).

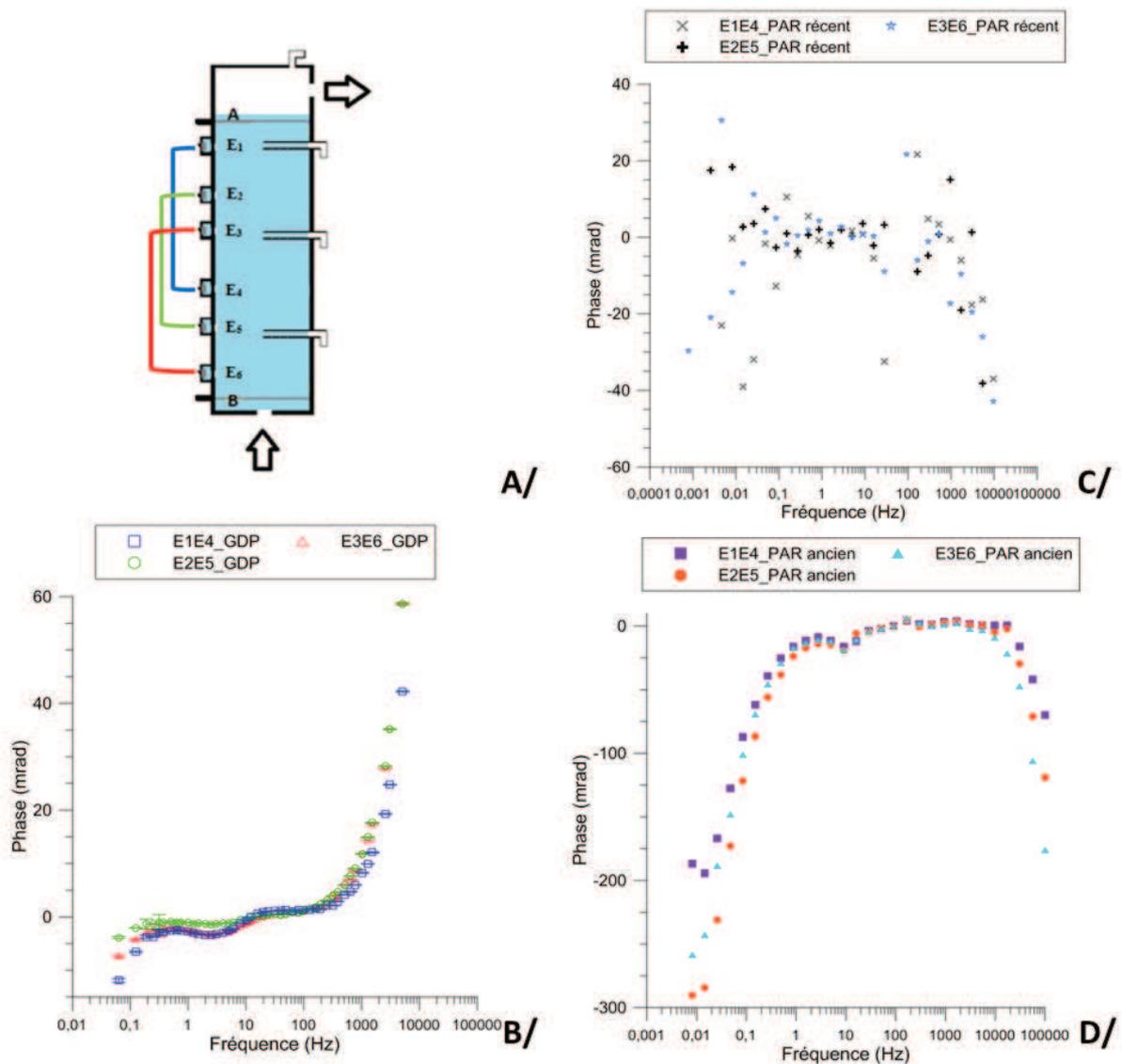


FIGURE VII-2 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE D'UNE COLONNE D'EAU SALÉE ($\sigma = 2050 \mu S/cm$), MESURÉE SUR TROIS COUPLES D'ÉLECTRODES $Cu/CuSO_4$, B/ AVEC LE GDP 32II, C/ AVEC LE PAR RÉCENT ET D/ AVEC LE PAR ANCIEN.

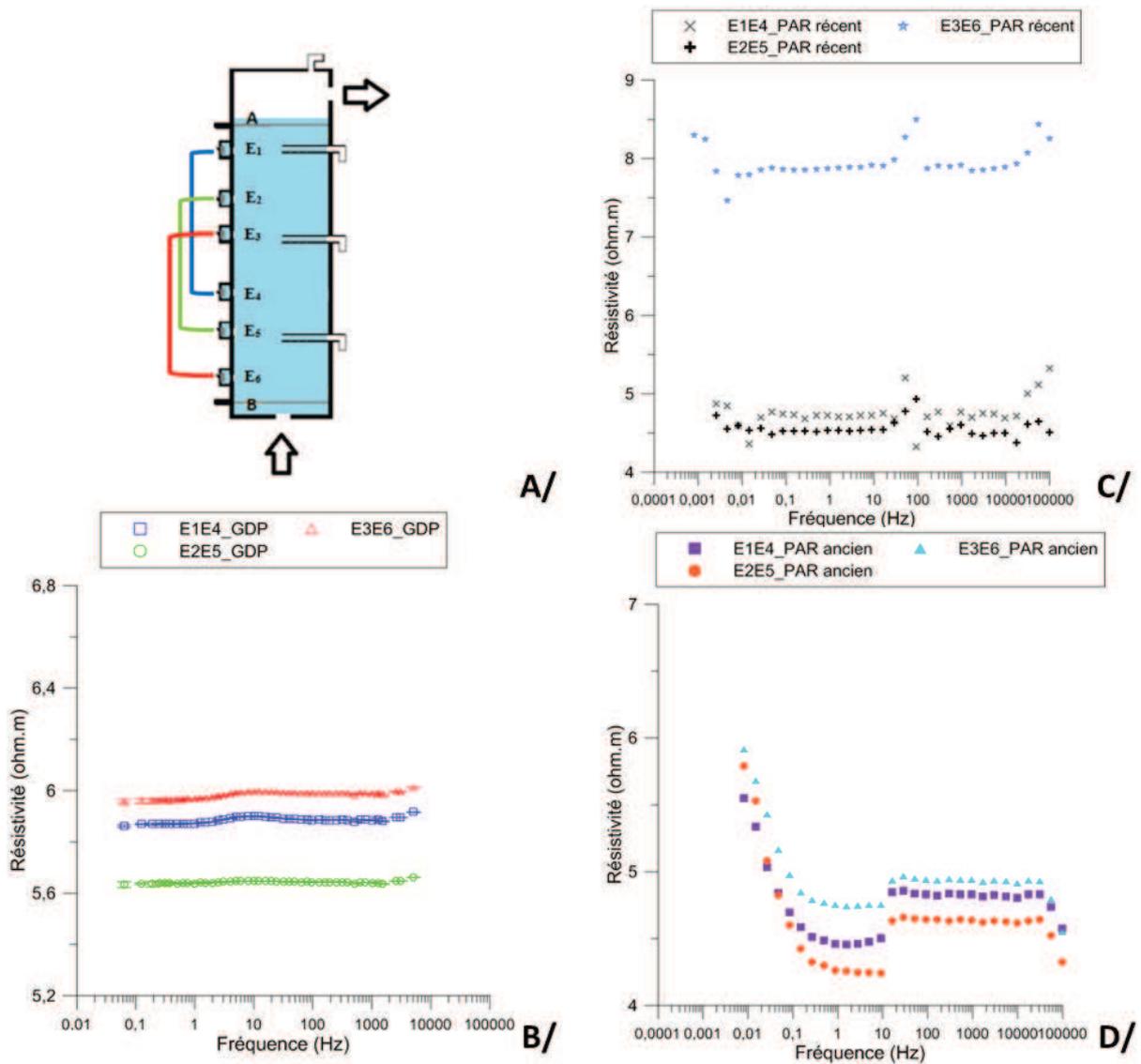


FIGURE VII-3 : AMPLITUDE DE LA RÉSTIVITÉ COMPLEXE D'UNE COLONNE D'EAU SALÉE ($\sigma = 2050 \mu\text{S/cm}$), MESURÉE SUR TROIS COUPLES D'ÉLECTRODES Cu/CuSO₄, B/ AVEC LE GDP 32II, C/ AVEC LE PAR RÉCENT ET D/ AVEC LE PAR ANCIEN.

3. MESURES SUR DU SABLE SATURÉ

Le test du dispositif expérimental a été affiné, pour se rapprocher des conditions de mesure des essais BIOPHY. Le GDP et le PAR récent ont été testés pour des mesures sur du sable de Fontainebleau saturé avec de l'eau salée ($\sigma=1858 \mu\text{S/cm}$) (Figure VII-4).

Ici, une moindre précision avec le PAR récent est de nouveau observée. Les mesures réalisées avec le GDP montrent une phase quasi-nulle, très stable pour le couple de mesure E2E5. Les faibles fluctuations de la phase sont de nouveau retrouvées pour les couples de mesure E1E4 et E3E6.

Le système de mesure a donc été validé, avec une préférence pour les mesures faites avec le GDP. Par la suite, les fréquences utilisées seront comprises entre 0,25 Hz (voire 0,125 Hz) et 64 Hz (voire 128 Hz).

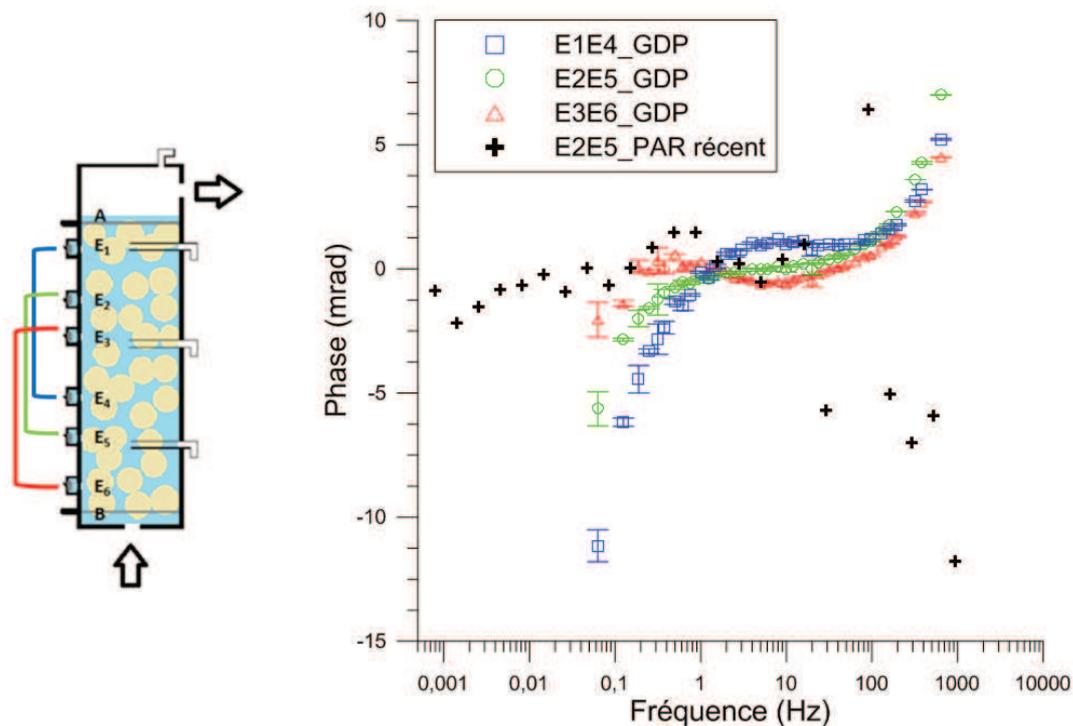


FIGURE VII-4 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE D'UNE COLONNE DE SABLE SATURÉ D'EAU SALÉE ($\sigma = 1858 \mu\text{S/cm}$), MESURÉE SUR TROIS COUPLES D'ÉLECTRODES Cu/CuSO₄, AVEC LE GDP 32II, ET SUR UN COUPLE AVEC LE PAR RÉCENT.

B. VALIDATION DES MESURES DU SPIRIT

De même que pour les mesures géophysiques, l'appareil d'analyse du CO₂, le SPIRIT, a été validé avant d'entamer les expériences.

1. MESURES SUR BOUTEILLES D'AIR STANDARD

Au Brgm, deux bouteilles d'air de chez Air Liquide® ont été certifiées. Elles contiennent du CO₂ à 380 ppmV et 390 ppmV respectivement, avec des signatures isotopiques à $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2) = -40,5 \text{ ‰}$ et $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2) = -43,2 \text{ ‰}$.

Une bouteille est utilisée avant chaque mesure pour calibrer l'appareil. De plus, avant et après chaque mesure, une vérification est faite sur la bouteille d'air standard.

2. COMPARAISON SPIRIT ET GC-IRMS (GAS BENCH)

Des mesures comparatives ont été effectuées avec le SPIRIT et par *Gas Bench* (GC-IRMS, au Brgm, unité LAB) sur une bouteille d'Air Liquide® à $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2) = -43,2 \text{ ‰}$, et sur une bouteille d'air extérieur comprimé autour de $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2) = -10 \text{ ‰}$. Les résultats obtenus avec les deux méthodes sont présentés dans le tableau suivant :

TABLEAU VII-1 : COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS PAR SPIRIT ET GAS BENCH SUR DEUX BOUTEILLES D'AIR STANDARD.

	SPIRIT IRIS				GAS BENCH GC-IRMS	
	$\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ (‰)	[CO ₂] (ppmV)	Incertitude $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ (‰)	Incertitude [CO ₂] (ppmV)	$\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ (‰)	Incertitude $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ (‰)
Air Liquide®	-43,319	389,861	0,530	0,634	-43,238	0,284
Air comprimé	-10,185	378,020	0,550	0,236	-10,250	0,071

Ces résultats montrent que le SPIRIT donne des valeurs avec une incertitude autour de 0,5 %, très proches de celles obtenues par GC-IRMS : il y a 0,081 % de différence pour la bouteille d'Air Liquide® et 0,065 % pour l'air extérieur comprimé.

Cela a permis de valider le dispositif d'analyse du CO₂. Plus de détails seront présentés dans l'article Guimbaud *et al.* (in prep.).

C. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les résultats de quatre colonnes BIOPHY sont présentés ici : deux colonnes inoculées, C1 et C2, (janvier-mars 2014) ; et deux colonnes non inoculées, C3 (avec toluène) et C4 (sans toluène), témoins.

Les colonnes C1 et C2 étaient en boucle ouverte, pour se rapprocher au mieux des conditions de l'aquifère. L'essai a duré 58 jours durant lesquels un biofilm bactérien a pu se mettre en place et la dégradation du toluène a eu lieu. Les colonnes C3 et C4 ont dû être laissées en boucle fermée afin de préserver le plus longtemps possible les conditions stériles des colonnes. Un inhibiteur, le formaldéhyde (sans incidence sur les mesures géophysiques), a aussi été rajouté régulièrement pour limiter une contamination extérieure. Malgré toutes ces précautions, l'essai n'a pu durer que 15 jours. C'est toutefois suffisant pour les comparer aux colonnes inoculées C1 et C2.

1. ÉVOLUTION DE LA POPULATION BACTÉRIENNE

Au cours des expériences, la population bactérienne a été suivie, principalement dans le fluide prélevé à différentes hauteurs de colonnes (alimentation, S1, S2, S3 et sortie) (Figure VII-5). Une fois par semaine, du sable était aussi prélevé en tête des colonnes C1 et C2. Les échantillons ont été centrifugés pendant 5 minutes dans une solution de NaCl à 9 g.L⁻¹ pour détacher le biofilm. Les bactéries ont alors été comptées dans le surnageant.

La concentration bactérienne est restée faible dans les colonnes non-inoculées (<10⁶ bact/mL, limite de détection du comptage sur cellule de Thoma), alors que, dans les colonnes inoculées, la concentration en cellules était forte (jusqu'à 3.10⁸ bact/mL) et une augmentation de la population des bactéries fixées sur le sable a été observée tout au long de l'essai. Il est intéressant de noter ici une diminution de la population bactérienne planctonique au moment de l'ouverture du circuit (jour 5) pour la colonne C1. Cependant, la population a crû régulièrement à partir du jour 15 et il y a eu une formation de biofilm sur le sable (Figure VII-6).

Il est important de savoir que la population bactérienne présente dans les colonnes ne comprend pas uniquement *R. wratislaviensis*, mais aussi d'autres espèces. Une monoculture n'était pas réalisable étant donné que les colonnes étaient juste désinfectées, et non pas stérilisées. Cependant, les biofilms naturels sont composés de communautés bactériennes complexes, et les essais C1 et C2 se rapprochent donc plus des systèmes d'aquifères en cours de dépollution réels qu'un réacteur contenant une souche pure.

Il y a aussi une faible contamination bactérienne des colonnes C3 et C4. La plus forte concentration bactérienne dans la colonne C4 par rapport à la colonne C3 est à noter ici.

A la fin des expériences, le sable des quatre colonnes a été prélevé aux trois niveaux (S1, S2, S3) pour réaliser des comptages (Tableau VII-2) et des analyses ADN (profils de diversité, Annexe 9).

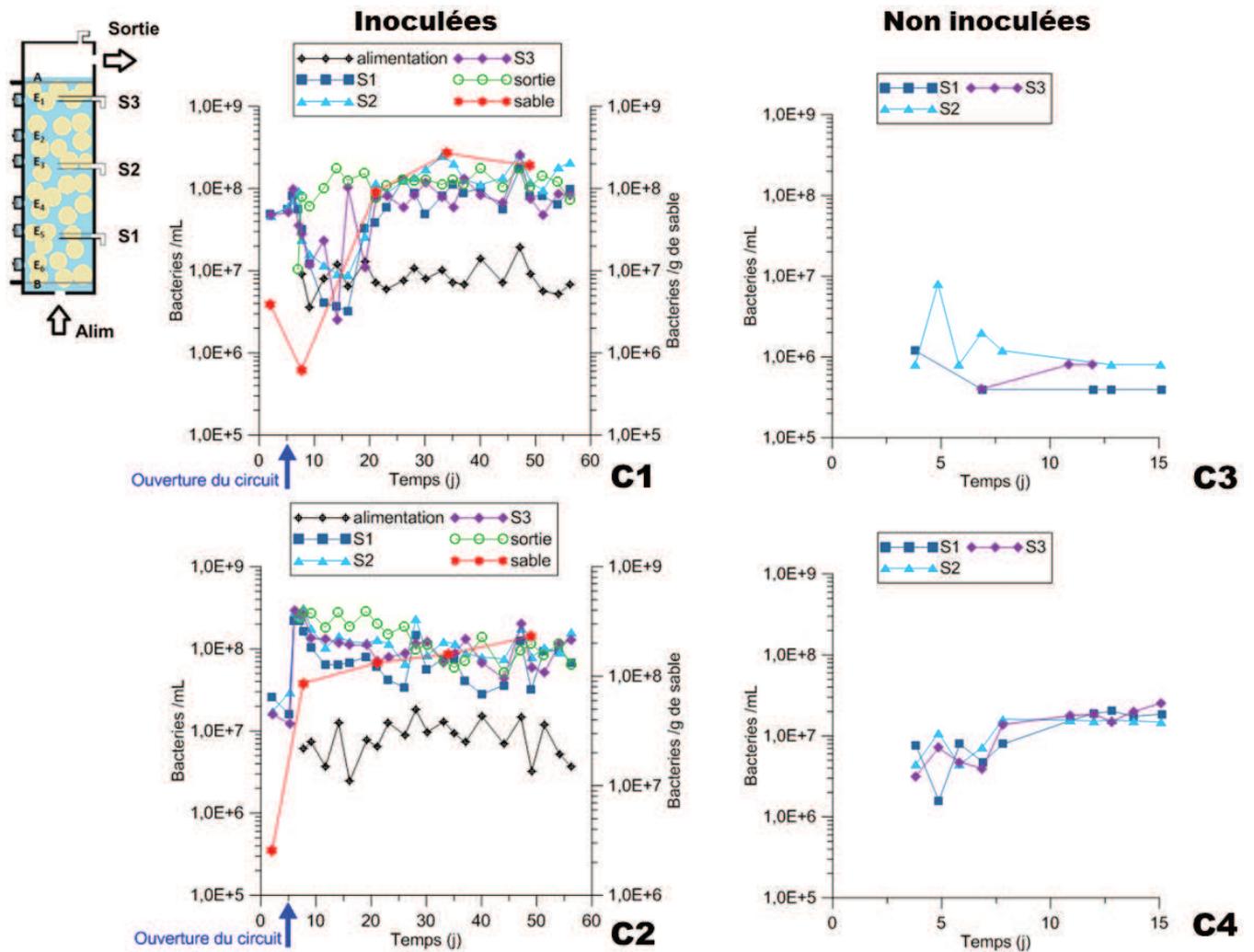


FIGURE VII-5 : EVOLUTION DE LA POPULATION BACTÉRIENNE DANS LES COLONNES INOCULÉES C1 ET C2, À GAUCHE, ET POUR LES COLONNES NON INOCULÉES C3 ET C4, À DROITE. POUR LES COLONNES C1 ET C2, EN CIRCUIT OUVERT, LA FLÈCHE BLEUE INDIQUE L'OUVERTURE DU CIRCUIT APRÈS UNE PÉRIODE D'INOCULATION EN CIRCUIT FERMÉ.

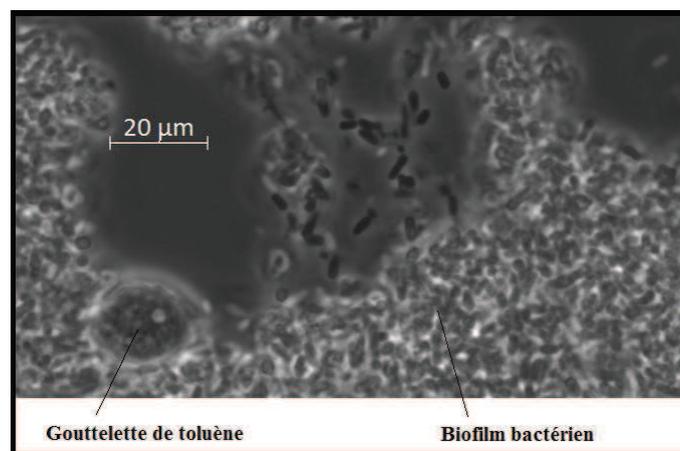
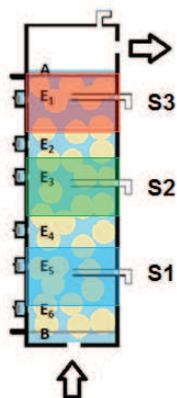


FIGURE VII-6 : PHOTOGRAPHIE PRISE AU MICROSCOPE OPTIQUE DU BIOFILM BACTÉRIEN DÉTACHÉ D'UN ÉCHANTILLON DE SABLE, PRÉLEVÉ EN TÊTE DE COLONNE C1 (JOUR 22). LE BIOFILM SEMBLE INCLURE UNE GOUTTELETTE DE TOLUÈNE.

TABLEAU VII-2 : COMPTAGES BACTÉRIENS EFFECTUÉS SUR LE SABLE DES COLONNES C1 À C4, À TROIS HAUTEURS DIFFÉRENTES (S1, S2 ET S3), AU MOMENT DU DÉMONTAGE DES COLONNES.



		Niveau de prélèvement pour chaque colonne	Bactéries /g de sable
Inoculées	C1	C1-S1	5.79E+08
		C1-S2	2.61E+08
		C1-S3	1.54E+08
	C2	C2-S1	4.30E+08
		C2-S2	3.09E+08
		C2-S3	2.20E+08
Non inoculées	C3	C3-S1	3.58E+05
		C3-S2	8.63E+05
		C3-S3	1.80E+06
	C4	C4-S1	1.61E+06
		C4-S2	2.90E+06
		C4-S3	2.58E+06

La population de bactéries fixées sur le sable sous forme de biofilm est là encore significativement plus importante dans les colonnes C1 et C2 que dans les colonnes C3 et C4 (il y a au moins un facteur 10^2 de différence).

Dans les colonnes inoculées, il semble y avoir une gradation dans la concentration en bactéries : il y a plus de bactéries en bas de colonnes (C1-S1 et C2-S1), qu'au milieu (C1-S2 et C2-S2), puis qu'en haut (C1-S3 et C2-S3). Cela peut être expliqué par le fait que le flux dans la colonne est ascendant, et que la partie inférieure de la colonne a été la première à être colonisée, ces bactéries sont celles qui reçoivent en premier des nutriments, la source de carbone organique (toluène) et l'oxygène. Cependant, concernant l'oxygène, le débit d' H_2O_2 diluée a été réglé de telle sorte que l'on retrouve un taux d'oxygène non nul en sortie, autours de 3 à 5 ppm.

Enfin, en comparant les colonnes C3 et C4, une concentration bactérienne sensiblement plus importante est de nouveau à noter pour la colonne C4 (moins de 10^1 de différence).

2. POTENTIEL ZÊTA DES BACTÉRIES

Cinq mesures du potentiel Zêta ont été réalisées sur une suspension de *R. wratislaviensis*, prélevée dans une colonne inoculée, à 25 °C. Le résultat obtenu correspond à la moyenne sur ces cinq mesures et il est de $-9,3 \text{ mV} \pm 0,9 \text{ mV}$.

Cette valeur indique que les bactéries sont faiblement chargées. Cependant, et en toute rigueur, cette valeur est biaisée par l'équipement utilisé pour sa mesure. En effet, le modèle utilisé ne convient pas aux particules molles. Le résultat est toutefois conforme aux données de la littérature [Gyurova *et al.*, 2013; Lebleu, 2007].

3. EVOLUTION DE LA TENEUR EN TOLUÈNE

Les colonnes C1, C2 et C3 contenaient du toluène. Dans la colonne C3 témoin, il n'y a pas eu d'inoculation de *R. wratislaviensis*, et donc, normalement, pas de dégradation du toluène. Dans les colonnes C1 et C2, le toluène étant dégradé rapidement, il a fallu faire des injections régulièrement pour alimenter les bactéries (Tableau VII-3).

TABLEAU VII-3 : DATES DES AJOUTS DE TOLUÈNE DANS LES COLONNES INOCULÉES C1 ET C2

Jour d'injection [toluène] mg/L	5	7	9	13	14	16	21	23	28	30	33	35	37	40	41	42	44	47	50	54
	270																	540		

La quantité de toluène injectée dans les colonnes C1 et C2 a été multipliée par deux à partir du jour 47. En effet, le biofilm, de plus en plus développé, permettait une dégradation plus rapide et il a donc été décidé d'augmenter la dose de toluène.

Au cours des essais, la concentration du toluène dans le fluide circulant dans les colonnes a été mesurée quotidiennement, aux différents niveaux du circuit (alimentation, S1, S2, S3 et sortie). Ici, les quantités perdues cumulées au cours du temps sont présentées, c'est-à-dire la somme des quantités mesurées en entrée moins les quantités mesurées en sortie.

Le graphique présenté en Figure VII-7 montre l'évolution des quantités dégradées cumulées de toluène au cours du temps, pour les trois colonnes. Une petite quantité de toluène a été perdue au cours de l'essai C3, probablement à cause de dégazages car le toluène est un élément très volatil. Cependant, cela reste négligeable comparé à tout le toluène dégradé dans les colonnes C1 et C2.

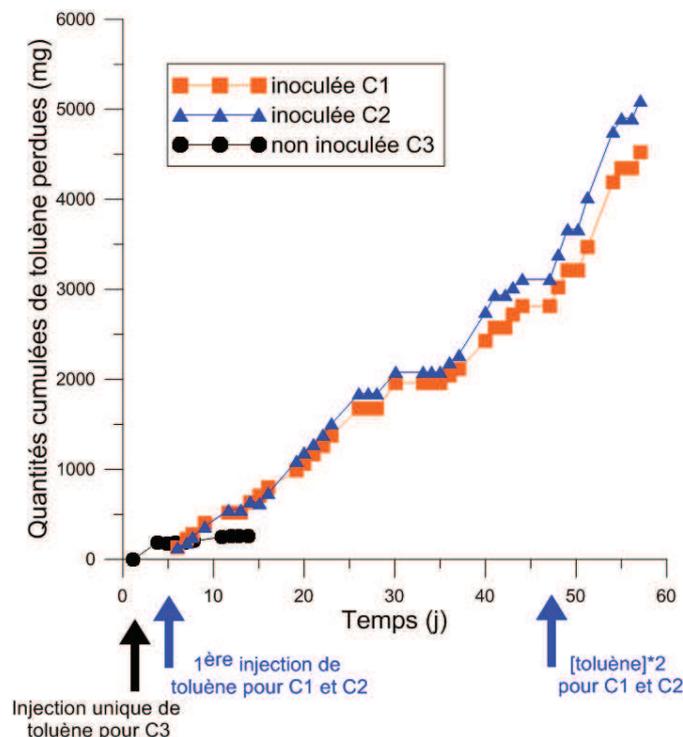


FIGURE VII-7 : GRAPHIQUE DES QUANTITÉS CUMULÉES DE TOLUÈNE PERDUES DANS LA COLONNE NON-INOCULÉE C3 (ROND NOIR) ET DANS LES COLONNES INOCULÉES C1 ET C2 (CARRÉS ORANGES ET TRIANGLES BLEUS RESPECTIVEMENT). LA FLÈCHE NOIRE INDIQUE L'INJECTION DE TOLUÈNE DANS LA COLONNE C3 ; LES FLÈCHES BLEUES INDICENT LA PREMIÈRE INJECTION DE TOLUÈNE DANS LES COLONNES C1 ET C2, ET LE MOMENT OÙ LA CONCENTRATION DE TOLUÈNE A ÉTÉ MULTIPLIÉE PAR DEUX.

4. ANALYSE DU CARBONE

Les données présentées dans ce paragraphe correspondent aux quatre colonnes C1 et C2 (inoculées, réalisées en circuit ouvert en janvier-mars 2014) et C3 et C4 (non inoculées, réalisées en circuit fermé en novembre 2013), ainsi qu'à deux autres colonnes inoculées montées en Mai 2013, réalisées en circuit fermé, notées ici C1_bis et C2_bis.

a) ANALYSE DU CO₂

Les résultats des quatre colonnes C1 à C4 sont présentés sur la Figure VII-8. Ces résultats montrent que le toluène a été biodégradé uniquement dans les colonnes inoculées. En effet, dans la colonne non inoculée contenant du toluène (C3), les concentrations en CO₂ restent proches de 500 ppmV, ce qui est la concentration moyenne trouvée dans l'air ambiant. En ce qui concerne la colonne C4 (non inoculée, sans toluène), les concentrations en CO₂ sont un peu plus importantes, bien qu'il n'y ait pas de source de carbone organique ajoutée dans le milieu de culture. Il est toutefois rappelé ici que la colonne C4 était plus contaminée que la colonne C3, et que ces bactéries auraient pu dégrader le formaldéhyde utilisé pour inhiber la croissance bactérienne, ou bien pratiquer l'autophagie, ce qui expliquerait cette faible production de CO₂.

En revanche, pour les colonnes inoculées C1 et C2, la concentration en CO₂ suit une évolution en trois paliers. Une première augmentation de la concentration, de 500 ppmV à 18000 ppmV pour C1 et à 24000 ppmV pour C2, peut être observée sur les cinq premiers jours (période d'inoculation). Ensuite, après l'ouverture du circuit, les concentrations en CO₂ diminuent au moment où une forte quantité de bactéries planctoniques est perdue. Puis, les concentrations remontent progressivement, jusqu'à 30000 ppmV, pendant la croissance du biofilm.

De plus, le rapport isotopique du carbone du CO₂, $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$, diminue de la valeur -9 ‰, ce qui est la signature du CO₂ de l'air ambiant, vers -31 ‰, qui est celle du toluène pur ($\delta^{13}\text{C}(\text{toluène source}) = -30,9 \pm 0,4 \text{ ‰}$, déterminé par GC-C-IRMS: *Gas Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry*). Cela confirme que le CO₂ produit provient bien de la dégradation du toluène.

Si les résultats en isotopie sont analysés plus finement, un fractionnement isotopique du carbone peut être détecté pendant le processus de biodégradation, entre les jours 0 et 40. En effet, le $\delta^{13}\text{C}(\text{toluène})$ (prélevé en S3) a augmenté de $-30,5 \pm 0,4 \text{ ‰}$ (jour 1) à $-28,6 \pm 0,4 \text{ ‰}$ (jour 34), alors que $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ a diminué de $-13,6 \pm 0,6 \text{ ‰}$ (jour 1) à $-33,3 \pm 0,4 \text{ ‰}$ (jour 28).

A partir du 20^e jour, les $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ continuent de diminuer vers des valeurs plus négatives que -31 ‰, alors que celles du $\delta^{13}\text{C}(\text{toluène})$ n'augmentent plus. Les faibles signatures ne seraient donc pas dues à un fractionnement isotopique du carbone. Lorsque la concentration en toluène est multipliée par deux, le $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ revient à des valeurs autour de -31 ‰, et ce pour les deux colonnes C1 et C2. Ceci laisse à penser que les basses valeurs de $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ aux jours 40 à 45 sont dues à un manque de toluène dans les colonnes et la mise en place d'un nouveau métabolisme qui influence le $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ (autophagie, dénitrification...). L'interprétation sera poursuivie dans le paragraphe suivant, avec les résultats des analyses isotopiques complémentaires (DIC et DOC).

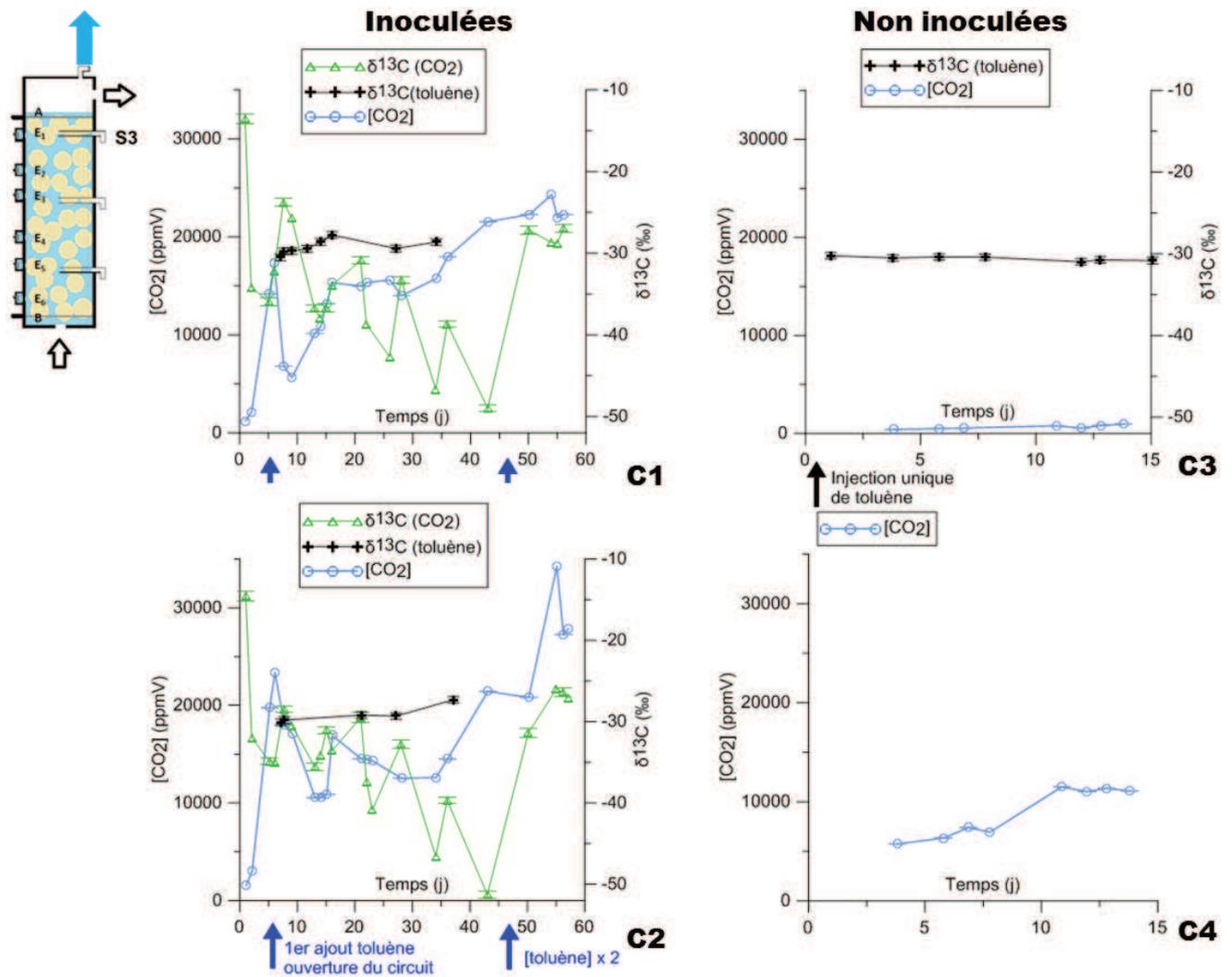


FIGURE VII-8 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN CO₂, DU δ¹³C(CO₂) ET δ¹³C(TOLUÈNE) EN S3 DANS LES COLONNES INOCULÉES C1 ET C2, À GAUCHE, ET EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN CO₂ ET δ¹³C(TOLUÈNE) EN S3 POUR LES COLONNES NON INOCULÉES C3 ET C4, À DROITE. POUR LES COLONNES C1 ET C2, EN CIRCUIT OUVERT, LA PREMIÈRE FLÈCHE BLEUE INDIQUE L'OUVERTURE DU CIRCUIT APRÈS UNE PÉRIODE D'INOCULATION EN CIRCUIT FERMÉ ET LE PREMIER AJOUT DE TOLUÈNE, LA DEUXIÈME FLÈCHE INDIQUE LE MOMENT OÙ LA CONCENTRATION EN TOLUÈNE A ÉTÉ MULTIPLIÉE PAR DEUX.

Remarque : Tout au long de l'essai, des oscillations du δ¹³C(CO₂) peuvent être observées pour les deux colonnes C1 et C2. La période serait de 3 à 4 jours, ce qui correspond aux changements d'alimentation du circuit, et donc à l'apport de toluène « frais ». La Figure VII-9 présente les ajouts de toluène dans la bonbonne d'alimentation et l'évolution de la concentration en toluène dans l'alimentation, en S1 et S3 en fonction du volume d'eau déplacé dans la colonne (en tenant compte du débit utilisé et des différences de hauteurs entre les différents points de prélèvement). L'évolution du δ¹³C(CO₂) est présentée sur le même graphique. Il y a bien une évolution cyclique de la concentration en toluène dans la bonbonne d'alimentation due aux différents ajouts. Bien que ces cycles semblent plus ou moins lissés au niveau des points de prélèvement S1 et S3, ils se retrouvent sur les mesures de δ¹³C(CO₂) (faites en sortie de colonne).

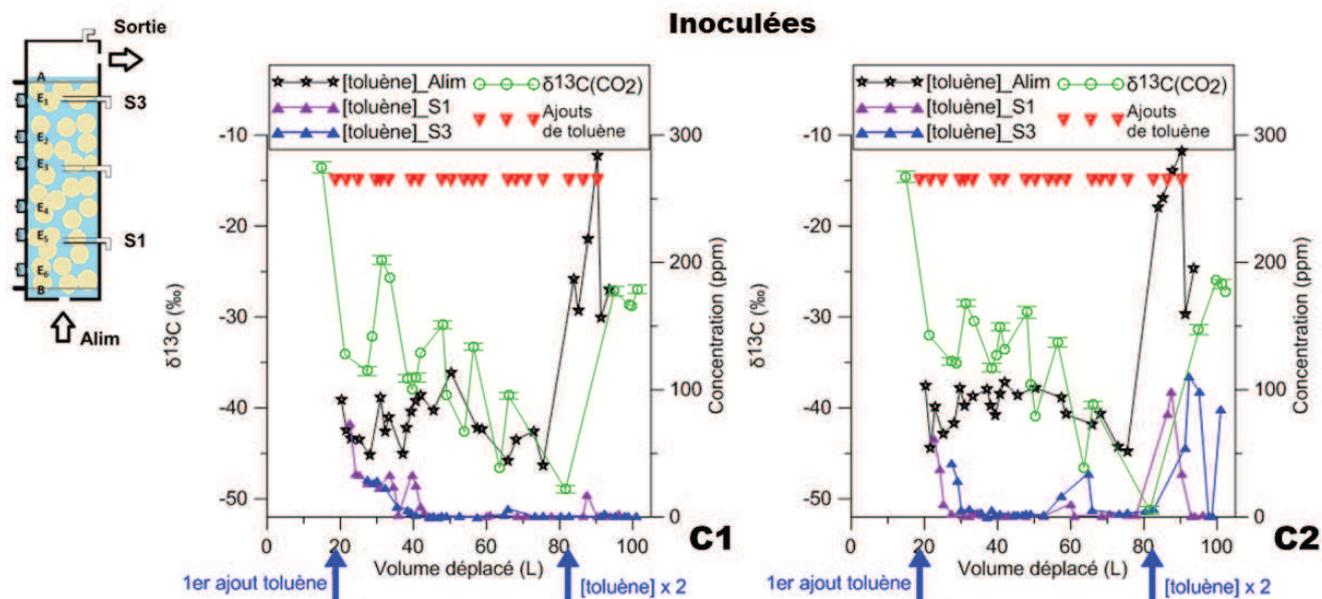


FIGURE VII-9 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN TOLUÈNE DANS L'ALIMENTATION, EN S1 ET S3, ET EVOLUTION DU $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ EN FONCTION DU VOLUME D'EAU DÉPLACÉ DANS LA COLONNE POUR LES COLONNES INOCULÉES C1 ET C2. LES TRIANGLES ROUGES FIGURENT LES AJOUTS DE TOLUÈNE DANS LA BONBONNE D'ALIMENTATION.

Des résultats d'un essai précédent (mai-juillet 2013), constitué de deux colonnes inoculées en circuit fermé C1_bis et C2_bis, sont présentés pour comparaison en Figure VII-10. Le nombre de bactéries dans les colonnes est comparable (10^8 bact/mL), des quantités de toluène ont été rajoutées régulièrement comme précédemment.

De même que pour les colonnes C1 et C2, de fortes concentrations en CO_2 sont observables (jusqu'à 40000 ppmV dans C1_bis et 65000 pour C2_bis), avec une signature isotopique qui tend vers celle du toluène. Les concentrations mesurées sont plus importantes que pour les colonnes C1 et C2, probablement parce que ce sont des essais en circuit fermé et qu'il y a eu accumulation du gaz en tête de colonnes. Cependant, ici il n'y a pas d'évolution de la concentration par paliers car le circuit reste fermé tout au long des 25 jours de l'essai, ni de cycles visibles sur l'évolution du $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$, car vraisemblablement lissés à cause de la recirculation, et il y a moins de fractionnement isotopique du carbone (de -31 ‰ à -29,5 ‰, et donc seulement peu significatif). Cette dernière observation peut aussi se justifier par le fait que les colonnes étaient en boucle fermée. En effet, la cinétique de dégradation du toluène étant très rapide (1 à 2 jours) et les analyses de CO_2 étant quotidiennes, voire semi-quotidiennes, il est possible que le circuit fermé permette un équilibre à la surface du fluide (et l'effet de fractionnement cinétique est caché ou superposé dans ce cas par l'ajout régulier de toluène « frais »).

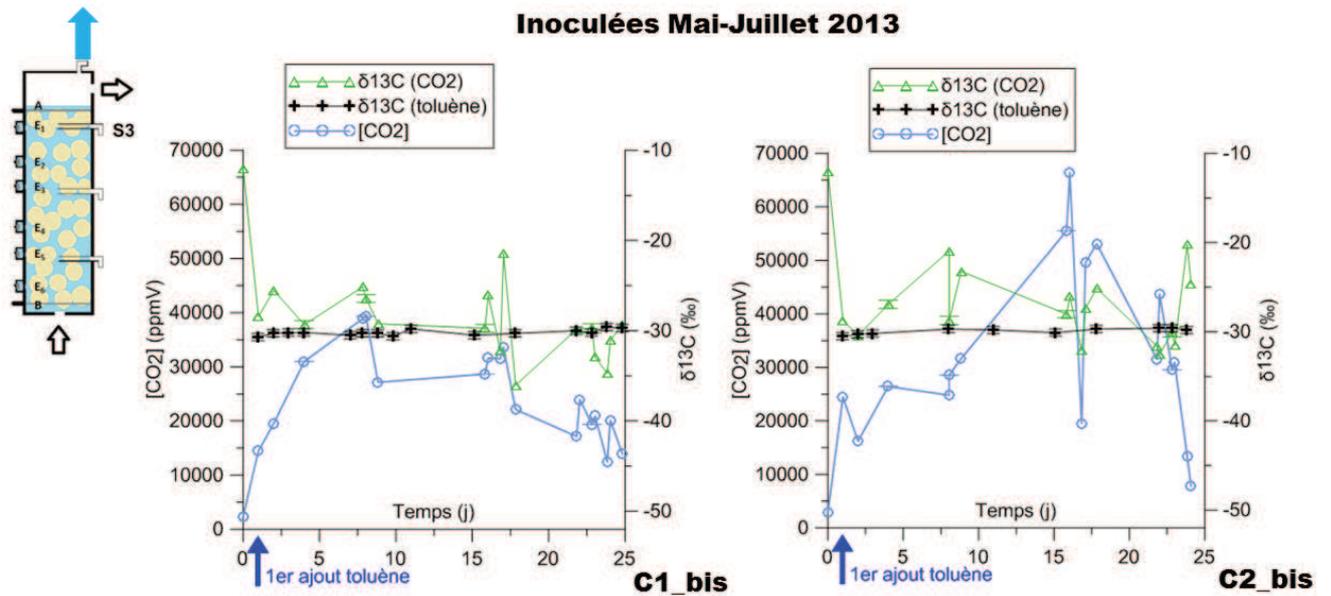


FIGURE VII-10 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN CO₂, DU δ¹³C(CO₂) ET δ¹³C(TOLUÈNE) EN S3 DANS LES COLONNES INOCULÉES C1_BIS ET C2_BIS.

b) ANALYSES ISOTOPIQUES COMPLÉMENTAIRES

Des analyses isotopiques du carbone supplémentaires ont été faites au cours des essais C1 et C2 : analyses du carbone du toluène, du DIC et du DOC. De plus, un suivi quotidien de l'alcalinité a aussi été fait sur l'eau des colonnes.

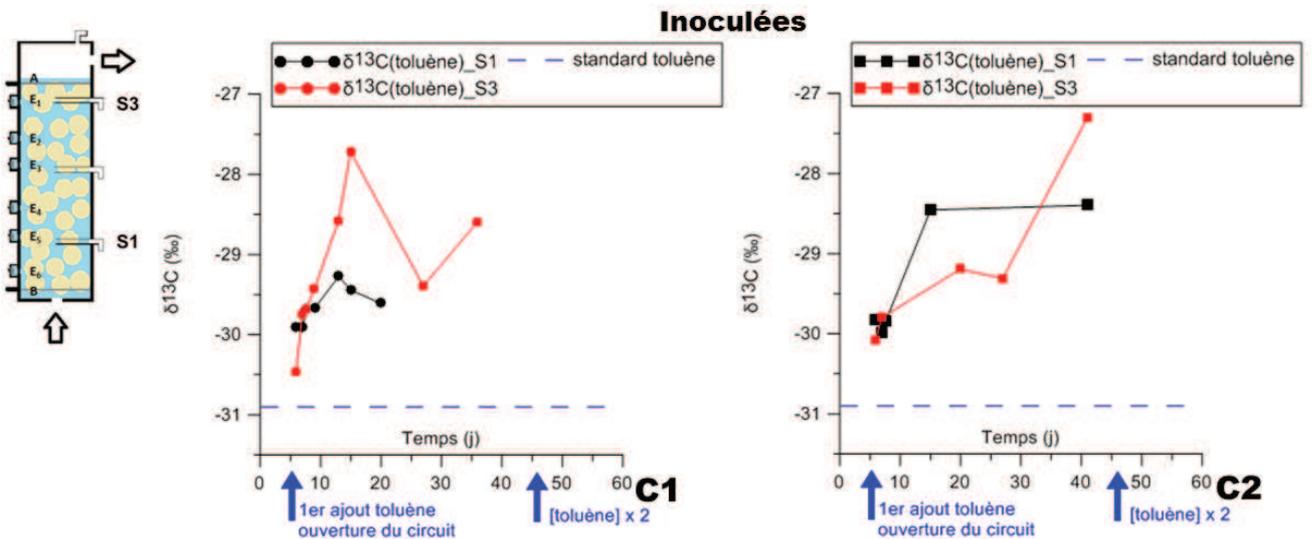


FIGURE VII-11 : EVOLUTION DE δ¹³C(TOLUÈNE) EN S1 ET S3 EN FONCTION DU TEMPS POUR LES DEUX COLONNES INOCULÉES C1 ET C2.

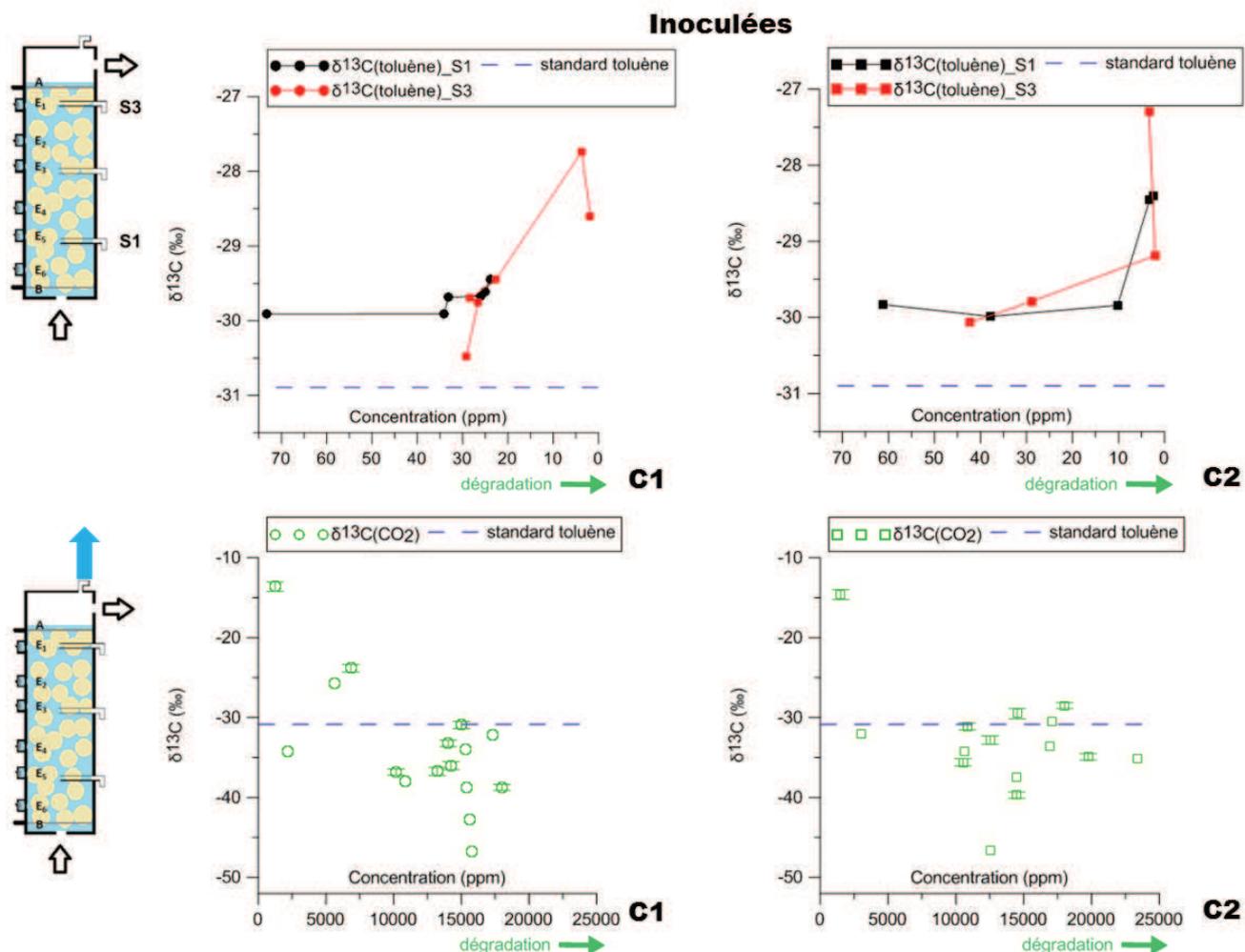


FIGURE VII-12 : EVOLUTION DE $\delta^{13}\text{C}(\text{TOULÈNE})$ EN S1 ET S3 (EN HAUT) ET DE $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ (EN BAS), EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN TOULÈNE ET EN CO_2 RESPECTIVEMENT, POUR LES DEUX COLONNES INOCULÉES C1 ET C2.

Un fractionnement isotopique de -30,5 ‰ à -27,5 ‰ est observé pour le toluène (Figure VII-11 et Figure VII-12-A). C'est un enrichissement faible (concordant avec les observations faites pour une ring di- ou une mono-oxygénase [Morasch *et al.*, 2002], mais qui met en évidence le fait que les microorganismes préfèrent le ^{12}C pour leur métabolisme (et donc le toluène restant devient plus enrichi en ^{13}C). Il faut cependant faire attention au fait que ce genre de raisonnement est réservé aux essais en batch (système fermé). Dans le cas des essais BIOPHY C1 et C2 en circuit ouvert, il y aurait un facteur de dilution à prendre en compte.

Côté CO_2 , une évolution du rapport isotopique de -30,5 ‰ à -50 ‰ est observé avec l'augmentation de la concentration en CO_2 (Figure VII-12-B/). Le fractionnement observé pour le toluène ne peut pas expliquer les très basses valeurs mesurées (-45-50 ‰) pour le CO_2 .

Le phénomène de diffusion/dilution qui a lieu dans les colonnes (circuit ouvert) va dans le sens d'un appauvrissement en ^{13}C (les molécules les plus légères montent plus vite). De plus, le phénomène cinétique (ajouts de toluène + système ouvert) peut amplifier cet appauvrissement.

Remarque : Si l'on applique l'équation de Rayleigh (cf. Partie 1, chapitre IV-A), le facteur d'enrichissement ϵ du toluène (toluène pur en forte concentration vers toluène dégradé en faible concentration) obtenu est de : -0,9 ‰ (avec un $R^2 = 0,89$ pour la droite de régression) pour la colonne C1 ; et -0,4 ‰ (avec un $R^2 = 0,14$) pour la colonne C2.

Pour le CO₂ (CO₂ en début de biodégradation, en faible concentration, vers CO₂ en fin de biodégradation, en forte concentration) on obtient $\epsilon = -7,3 \text{ ‰}$ (avec un $R^2 = 0,5$) pour la colonne C1 ; et $-8,5 \text{ ‰}$ (avec un $R^2 = 0,68$) pour la colonne C2.

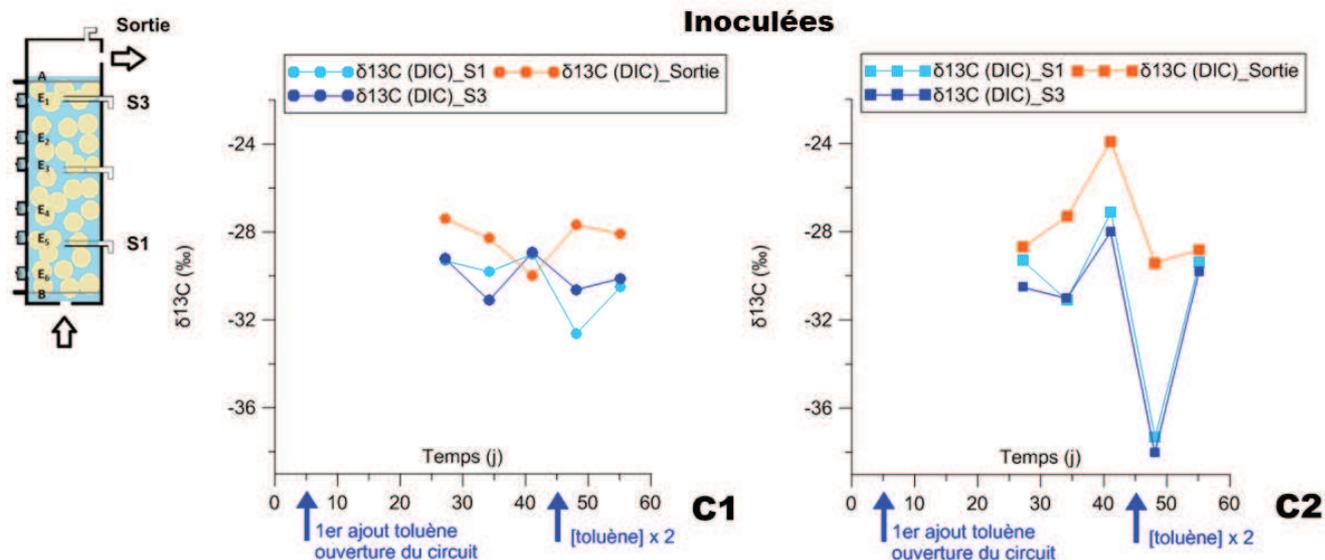


FIGURE VII-13 : EVOLUTION DE $\delta^{13}\text{C}(\text{DIC})$ EN S1, S3 ET EN SORTIE EN FONCTION DU TEMPS POUR LES DEUX COLONNES INOCULÉES C1 ET C2.

Les mesures du $\delta^{13}\text{C}(\text{DIC})$ (Figure VII-13) et du $\delta^{13}\text{C}(\text{DIC})$ (Figure VII-13) sont cohérentes avec les mesures de $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ et $\delta^{13}\text{C}(\text{toluène})$. En effet, le DIC (= CO₂ dissous) est légèrement enrichi en ¹³C en sortie : le ¹²C serait consommé pour la production d'énergie le long de la colonne : $\delta^{13}\text{C}(\text{DIC})$ en S1 < $\delta^{13}\text{C}(\text{DIC})$ en S3 < $\delta^{13}\text{C}(\text{DIC})$ en sortie. De plus, des valeurs plus faibles en C2, j45 confirmeraient les faibles valeurs de $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ à la même période.

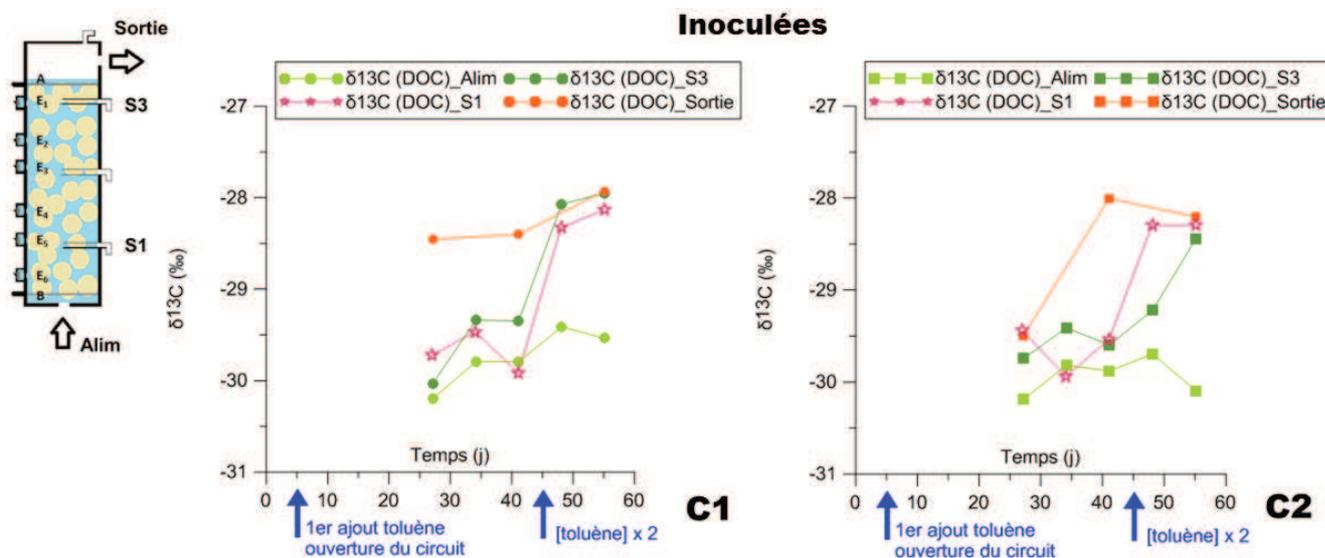


FIGURE VII-14 : EVOLUTION DE $\delta^{13}\text{C}(\text{DOC})$ DANS L'ALIMENTATION, EN S1, S3 ET EN SORTIE EN FONCTION DU TEMPS POUR LES DEUX COLONNES INOCULÉES C1 ET C2.

Les mesures de $\delta^{13}\text{C}(\text{DOC})$ diffèrent de celles de $\delta^{13}\text{C}(\text{toluène})$. En effet, le *stripping* à l'hélium (dégazage de 3 min) pratiqué sur les échantillons avant l'analyse du DOC provoque l'évacuation d'environ 80 % de toluène (composé très volatil). Dans les échantillons provenant des bonbonnes d'alimentation, il reste un peu de toluène (environ 80 % de la concentration initiale est perdue), mais il ne reste plus de toluène pour les échantillons

prélevés en S1, S3 et sortie. Ce sont donc des exsudats bactériens qui sont analysés, et le DOC correspond ici au NPOC (*Non Purgeable Organic Carbon*).

Le $\delta^{13}\text{C}(\text{DOC})$ mesuré dans l'alimentation se situe donc près de $-30,9\text{‰}$ qui est la signature du toluène injecté. Le toluène restant dans l'échantillon est cependant un peu enrichi en ^{13}C à cause du *stripping* (effet forcé).

Le $\delta^{13}\text{C}(\text{DOC})$ mesuré en S1, S3 et sortie représente la signature isotopique des exsudats bactériens. Le $\delta^{13}\text{C}(\text{DOC})$ est enrichi en sortie comme le $\delta^{13}\text{C}(\text{DOC})$ (la différence de 2 ‰ entre l'alimentation et la sortie est significative). L'hypothèse qu'il ne reste plus que du ^{13}C (^{12}C consommé pour la production d'énergie) pour fabriquer « ce qui constitue les bactéries » peut être envisagée.

c) ALCALINITÉ ET PH

L'alcalinité de l'eau a été mesurée tous les jours, en alimentation, S1 et S3, pour les quatre colonnes C1 à C4. Les résultats présentés dans la Figure VII-15 ne concernent que les colonnes C1 et C2. En effet, les mesures réalisées sur C3 et C4 étaient inférieures au seuil de détection de la méthode de dosage.

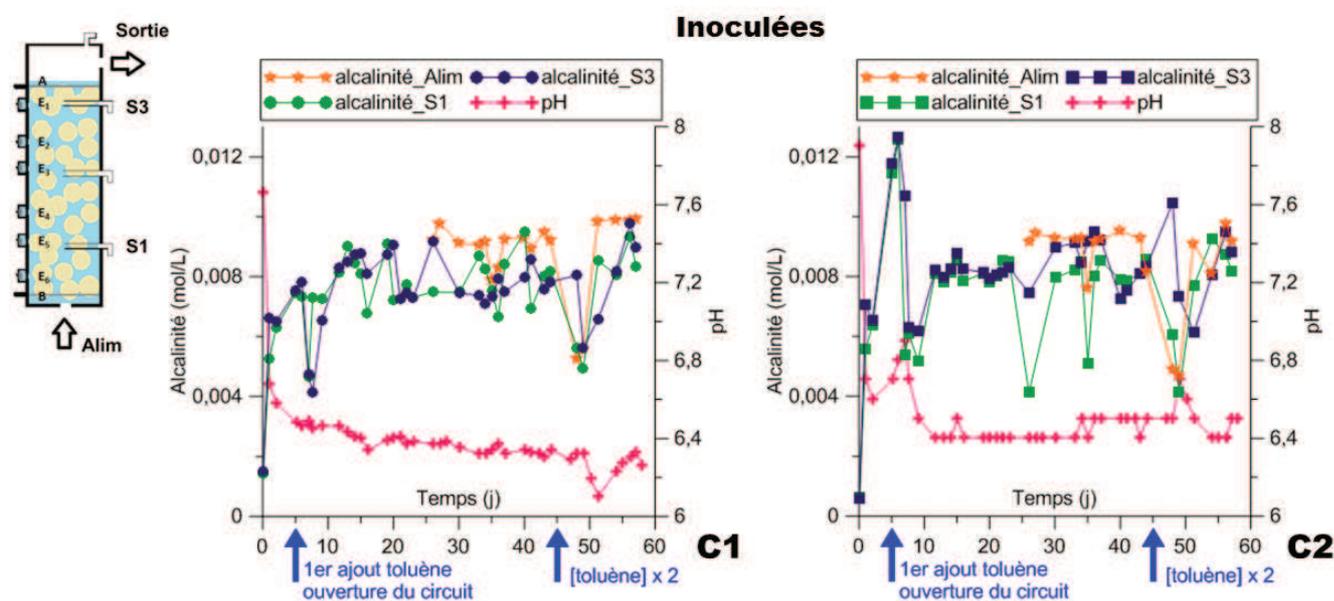


FIGURE VII-15 : EVOLUTION DE L'ALCALINITÉ DU FLUIDE À DIFFÉRENTS NIVEAUX DES COLONNES C1 ET C2 (ALIMENTATION, S1 ET S3), ET ÉVOLUTION DU PH AU COURS DU TEMPS.

Malheureusement, l'alcalinité mesurée correspond à l'alcalinité du tampon phosphates, et non pas à l'alcalinité carbonatée ($[\text{HCO}_3^-]$). Cependant, une diminution de l'alcalinité dans la colonne (S1 et S3) peut être observée par rapport à l'alimentation.

Une réaction du système est aussi visible au moment des changements d'alimentation : une variation de l'alcalinité de l'alimentation est répercutée sur S1 et S3. Puis, un phénomène de diffusion/stabilisation atténue ces variations.

Le pH est tamponné à 6,4. Une chute dans la colonne C1 au jour 51 pourrait être due à la production CO_2 , mais une augmentation du pH est observée au même moment dans la colonne C2. Ces variations inexplicables de pH ont apparemment lieu au moment d'un changement d'alimentation (chute de l'alcalinité dans les deux colonnes).

d) DISCUSSION

Au cours de la biodégradation, le toluène est consommé par les bactéries comme :

- Source d'énergie : le ^{12}C est consommé pour la production d'énergie, ce qui conduit à la production de CO_2 avec un $\delta^{13}\text{C}$ qui diminue ;
- Source de carbone : le ^{13}C restant est consommé pour la fabrication de la biomasse : le DOC a un $\delta^{13}\text{C}$ qui augmente.

Le $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ correspond à la synthèse de plusieurs fractionnements isotopiques ayant lieu au cours de la dégradation du toluène en colonnes. Les faibles signatures de $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ mesurées entre les jours 40 et 50 (Figure VII-8) (exemple $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2 \text{ gaz}) = -51 \text{ ‰}$ j43, C2) ne sont pas expliquées par le seul fractionnement isotopique du carbone du toluène, mais aussi par ceux dus aux phénomènes de diffusion et d'évaporation en phase gazeuse.

La Figure VII-16 permet de faire le lien entre les valeurs de $\delta^{13}\text{C}(\text{DIC})$ et de $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$.

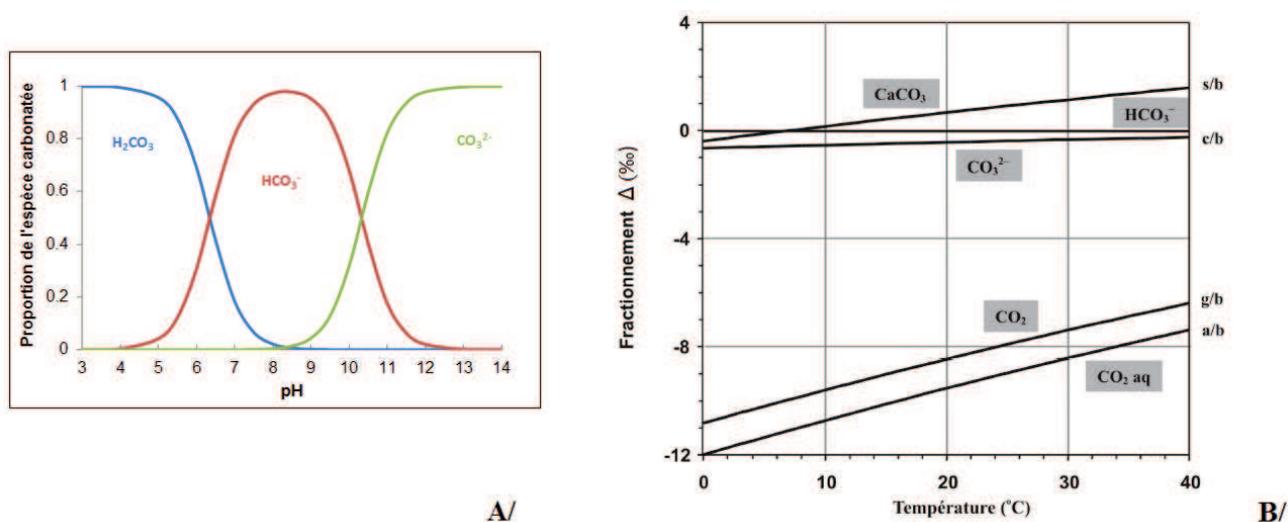


FIGURE VII-16 : A/ RÉPARTITION DES ESPÈCES CARBONATÉES EN SOLUTION EN FONCTION DU pH À 25°C (D'APRÈS STUMM ET MORGAN, 2012). B/ FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE AU MOMENT DES CHANGEMENTS DE PHASE ENTRE LES DIFFÉRENTES ESPÈCES CARBONATÉES [MOOK AND TAN, 1991].

A un pH égal à 6,4, le DIC correspond à la présence de H_2CO_3 et HCO_3^- dans le fluide, dans une même proportion ($\approx 50/50$) (Figure VII-16-A). Il y a donc une contribution égale de $\delta^{13}\text{C}(\text{H}_2\text{CO}_3)$ et de $\delta^{13}\text{C}(\text{HCO}_3^-)$ pour le $\delta^{13}\text{C}(\text{DIC})$.

Il y a un fractionnement isotopique au passage de HCO_3^- en H_2CO_3 (Figure VII-16-B/). A 25°C, $\Delta_{\text{CO}_2 \text{ aq} - \text{HCO}_3^-} = -9 \text{ ‰} - (+1 \text{ ‰}) = -10 \text{ ‰}$.

On peut donc en déduire qu'un $\delta^{13}\text{C}(\text{DIC}) = -38 \text{ ‰}$ (j48, C2S3) correspond à un $\delta^{13}\text{C}(\text{H}_2\text{CO}_3) = -43 \text{ ‰}$ et un $\delta^{13}\text{C}(\text{HCO}_3^-) = -33 \text{ ‰}$.

De plus, il y a un fractionnement isotopique au moment des changements de phase $\text{CO}_2 \text{ gaz} \rightarrow \text{CO}_2 \text{ aqueux}$ (Figure VII-16-B/). A 25°C, $\Delta_{\text{CO}_2 \text{ aq} - \text{CO}_2 \text{ gaz}} = -10 \text{ ‰} - (-8 \text{ ‰}) = +2 \text{ ‰}$.

Ce qui amène à calculer un $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2 \text{ gaz})$ à -41 ‰ .

A cela, il faut rajouter l'effet cinétique pour expliquer une mesure de $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2 \text{ gaz}) = -51 \text{ ‰}$ j43, C2.

5. MESURES ÉLECTRIQUES

a) OCTOBRE 2012 (CIRCUIT FERMÉ)

Dans ce paragraphe, les résultats d'un essai précédent, réalisé sur une colonne inoculée notée ici C1_ter, en octobre 2012 et en boucle fermée, sont présentés (Figure VII-17). Les conditions microbiologiques sont comparables : même milieu de culture, même souche bactérienne, population bactérienne comparable (Figure VII-17-B/). Cet essai a aussi été réalisé à température constante, à 25°C. Néanmoins, les électrodes utilisées étaient des électrodes commerciales Ag/AgCl et les mesures ont été réalisées uniquement sur le couple E2E5. L'essai est ici plus court (14 jours au lieu de 58).

Remarque : Le GDP 32II n'était pas calibré (défaut du software), mais il n'y avait pas d'ISO 1B (qui provoque un fort déphasage) dans le montage (cf. Annexe 6). Il s'agit ici de regarder l'évolution des mesures par rapport à un état initial plutôt que de tenir compte des valeurs absolues.

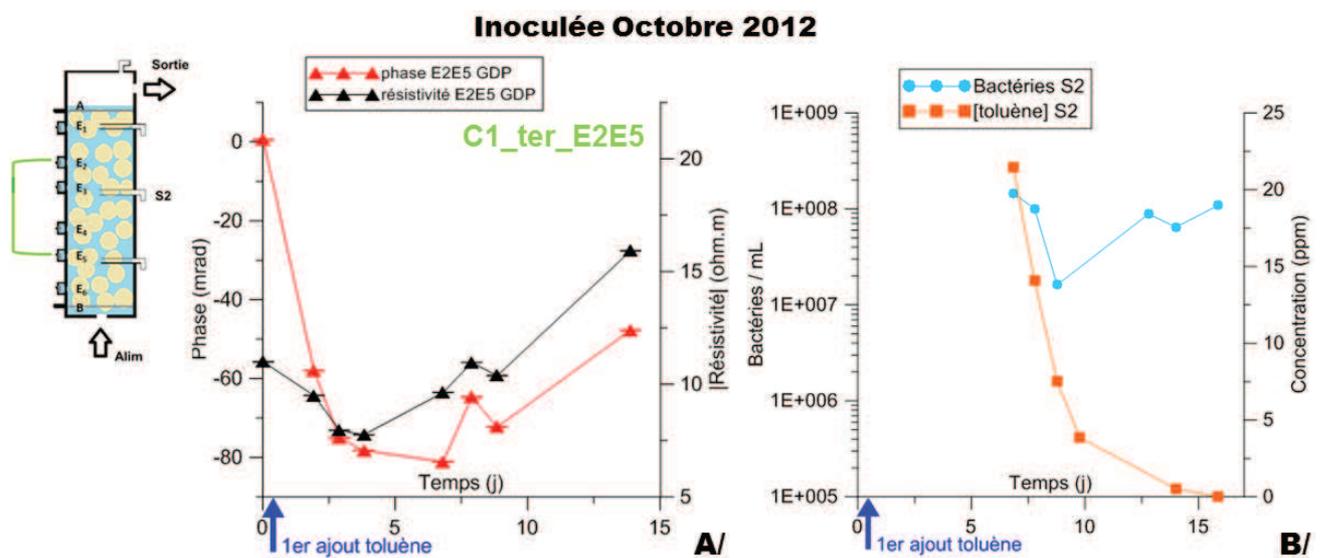


FIGURE VII-17 : RÉSULTATS DE L'ESSAI INOCULÉ C1_TER : A/ EVOLUTION DE LA PHASE ET DE L'AMPLITUDE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE À 0.5 Hz MESURÉE EN E2E5 (MILIEU DE COLONNE) PAR LE GDP 32II. B/ EVOLUTION DE LA POPULATION BACTÉRIENNE EN S2 (MILIEU DE COLONNE) ET DE LA CONCENTRATION EN TOLUÈNE EN S2.

Un déphase à 0,5 Hz est observé, de 0 à -80 mrad. Le déphase a tendance à diminuer sur les derniers jours de l'essai (augmentation de la phase vers -30 mrad).

L'amplitude de la résistance commence par diminuer, de 11 à 8 ohm.m, puis elle augmente jusqu'à 16 ohm.m sans atteindre de plateau.

Parallèlement, une diminution de la concentration en toluène dans la colonne est observée, ainsi qu'une population bactérienne de l'ordre de 10^8 bact/mL. Cela confirme le fait que le déphasage de la résistance complexe a lieu pendant la biodégradation du toluène.

b) JANVIER-MARS 2014 (CIRCUIT OUVERT)

Les résultats des mesures PP sont présentés sous la forme de graphiques de l'évolution de la phase et de l'amplitude de la résistivité complexe en fonction du temps, pour la fréquence 0,5 Hz, pour les deux colonnes inoculées (Figure VII-18 et Figure VII-19) et pour les deux colonnes témoins (Figure VII-20). La fréquence 0,5 Hz a été choisie, car les résultats à cette fréquence sont significatifs des phénomènes de polarisation et que l'erreur sur la mesure est faible. Les autres fréquences suivent la même tendance.

Le déphasage est quasi nul pour la colonne témoin C3, avec toluène, et il reste faible pour la colonne C4 (qui a subi une contamination bactérienne plus importante que la colonne C3 et montre une faible production de CO₂).

A l'inverse, dans les colonnes inoculées C1 et C2, un déphasage est observé pour les couples de mesure E1-E4, E2-E5 et E3-E6. Pour ces trois couples, la valeur initiale de la phase est proche de 0 mrad. Durant la période d'inoculation (jours 0 à 5), le déphasage atteint 15 à 17 mrad (sauf pour le couple C2_E3E6). Il s'atténue au moment de l'ouverture du circuit (jour 5) et de la perte de bactéries planctoniques. L'évolution du déphasage diffère ensuite en fonction des couples de mesure.

Comme il s'agit de phénomènes de polarisation, la phase doit être négative et devrait devenir de plus en plus négative au cours de la biodégradation (augmentation du retard de phase). C'est le cas durant la période d'inoculation (sauf pour le couple C2_E3E6) mais, pas pour le reste de l'essai. En effet, seuls les couples C2_E1E4, C1_E2E5 et C1_E3E6 présentent une phase négative au cours des jours 5 à 58, sur la Figure VII-18. Les autres couples présentent des phases positives (voire très positives pour C2_E2E5). Bien que les erreurs de mesure soient faibles et que l'évolution des valeurs au cours du temps soit régulière, un défaut des électrodes a été suspecté. C'est pourquoi, des mesures supplémentaires ont été réalisées à partir du jour 32 sur les couples E1-E2, E3-E4 et E5-E6 (Figure VII-19).

Pour ces derniers couples, des phases négatives sont mesurées pour C2_E1E2, C1_E5E6 et C2_E5E6. Cela suggère que les électrodes de mesures C1_E2, C1_E5 et C1_E6 et C2_E1, C2_E2, C2_E4 et C2_E6 sont valides. La position des électrodes n'ayant pas évolué entre la période d'inoculation (jours 0 à 5 où une phase négative est mesurée) et les jours suivants, cette défaillance serait due à des fuites de gel CuSO₄, un colmatage du fritté par les bactéries... Mais cela n'a pu être démontré et ces valeurs positives de phases restent inexplicables.

La réponse en amplitude de la résistivité est quasi stable pour les colonnes abiotiques C3 et C4 (moins cependant pour la colonne C4 qui est la plus contaminée par des bactéries extérieures). Pour les colonnes C1 et C2, la résistivité suit une évolution absolument identique pour les 2 colonnes et pour l'ensemble des couples d'électrodes. La résistivité initiale des colonnes se situe autour de 12 ohm.m. Une augmentation brutale est observée dès l'introduction du toluène au jour 5. Le pic de résistivité est atteint aux jours 8/9, puis une décroissance rapide, puis progressive vers un plateau est observée jusqu'à la fin de l'expérience (Figure VII-18). Entre les jours 20 à 58, elle varie autour de 10 ohm.m.

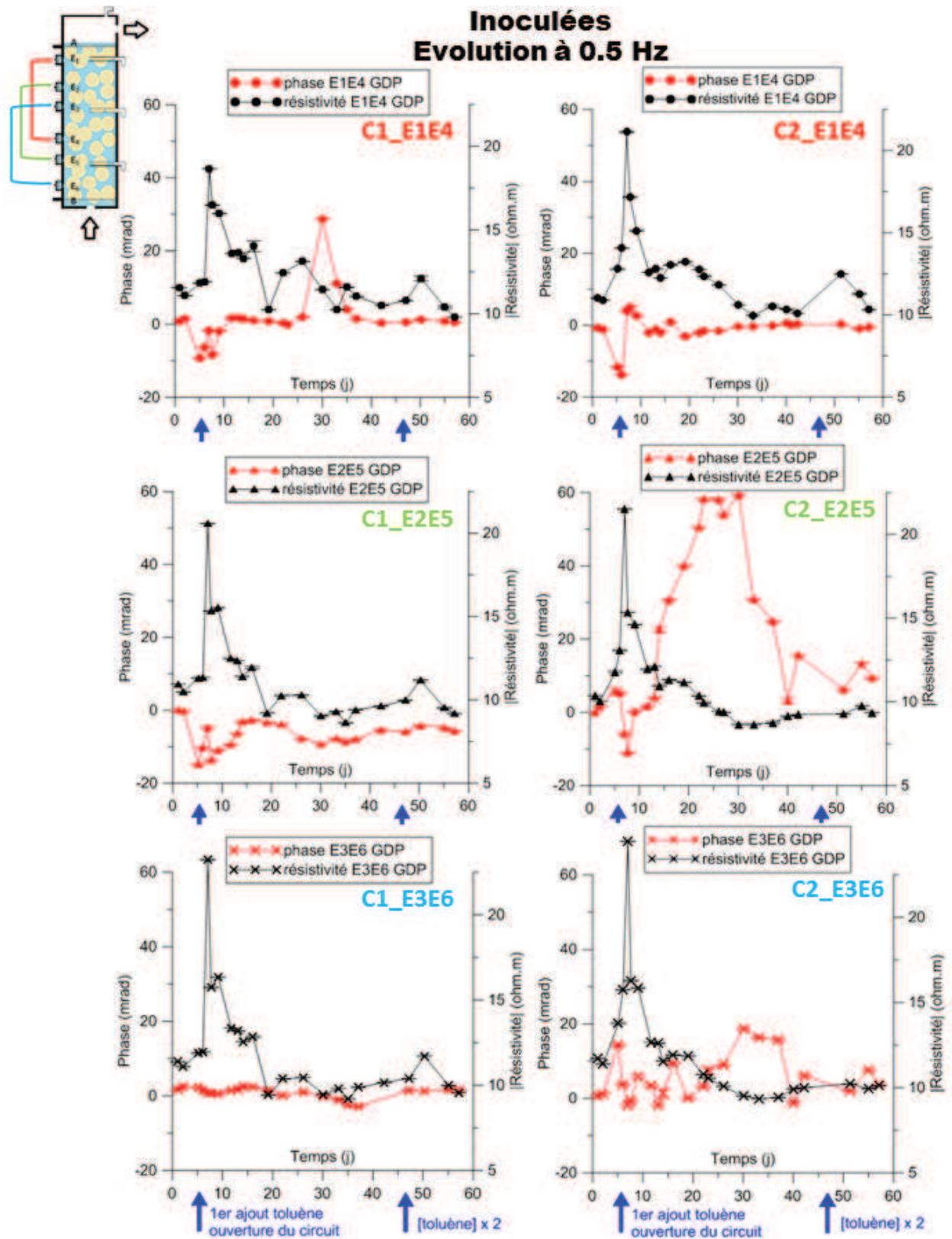


FIGURE VII-18 : EVOLUTION DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE (PHASE ET AMPLITUDE) A 0.5 Hz, MESURÉE AVEC LE GDP 32II, POUR TROIS COUPLES DE MESURE DES DEUX COLONNES INOCULÉES : E1E4, E2E5 ET E3E6.

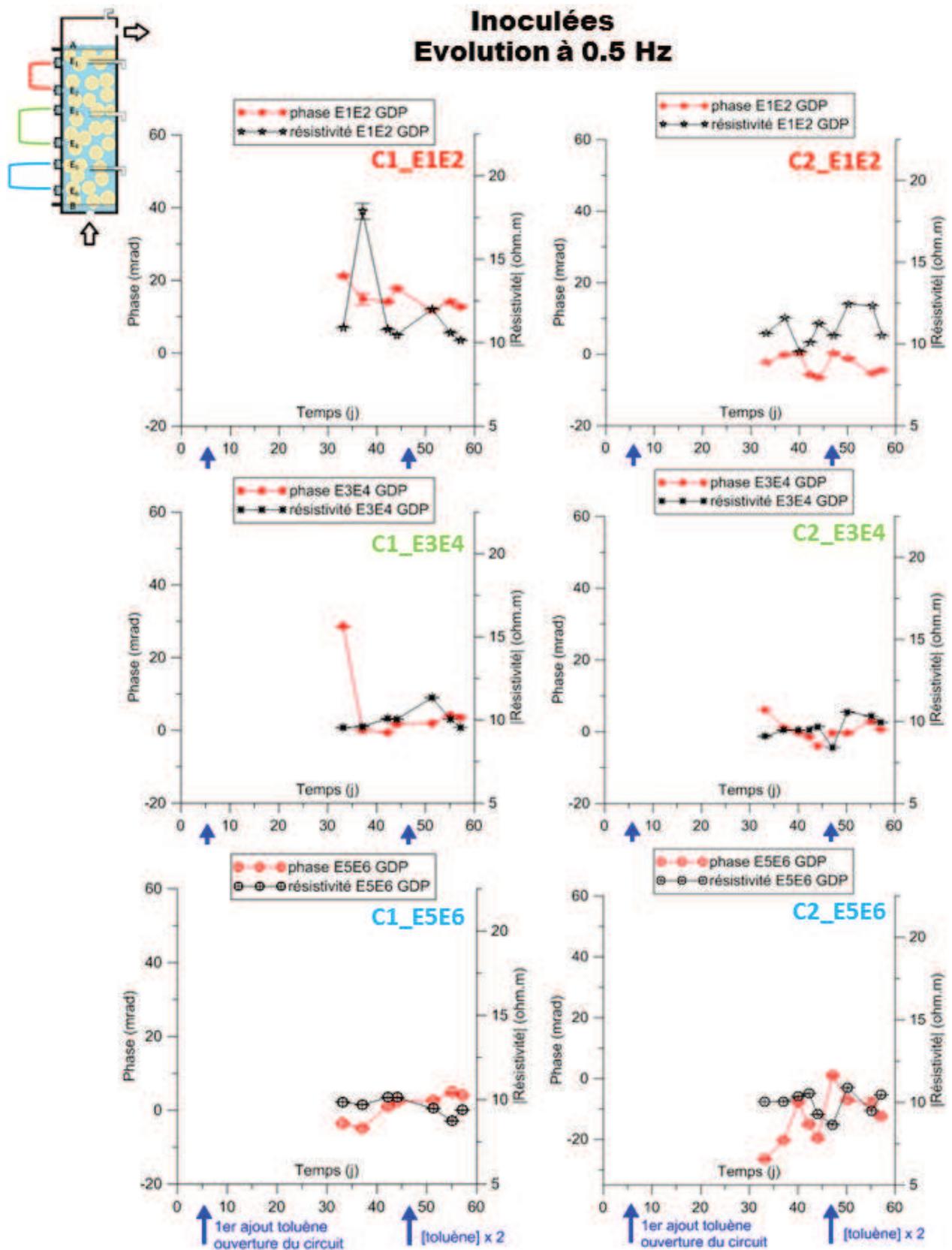


FIGURE VII-19 : EVOLUTION DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE (PHASE ET AMPLITUDE) A 0.5 Hz, MESURÉE AVEC LE GDP 32II, POUR TROIS AUTRES COUPLES DE MESURE DES DEUX COLONNES INOCULÉES : E1E2, E3E4 ET E5E6.

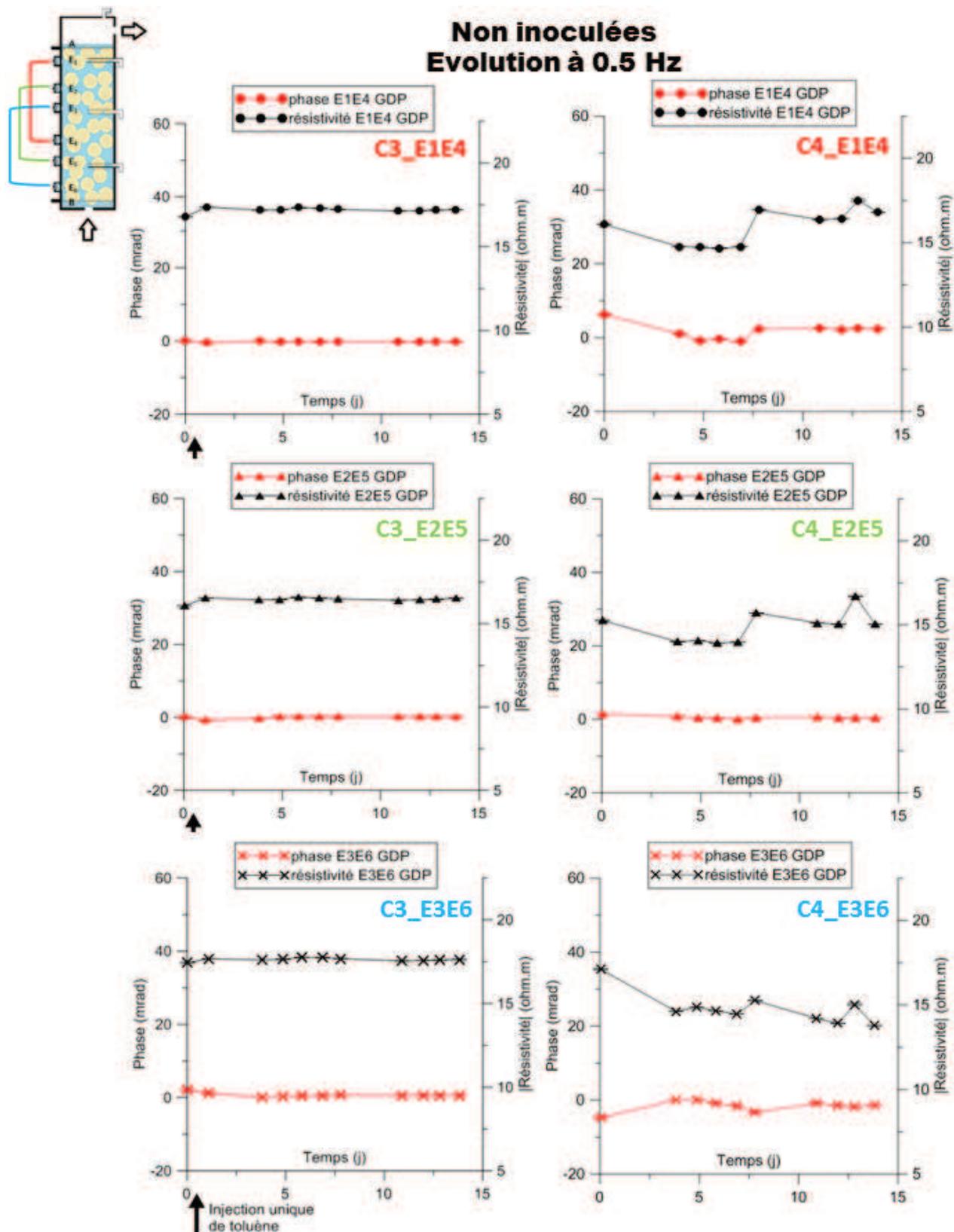


FIGURE VII-20 : EVOLUTION DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE (PHASE ET AMPLITUDE) A 0.5 Hz, MESURÉE AVEC LE GDP 32II, POUR TROIS COUPLES DE MESURE DES DEUX COLONNES TÉMOINS : E1E4, E2E5 ET E3E6.

c) ZOOM SUR LES PREMIERS JOURS

Dans ce paragraphe seront présentées les données du couple C1_E2E5, pour les 15 premiers jours de l'essai (Figure VII-21).

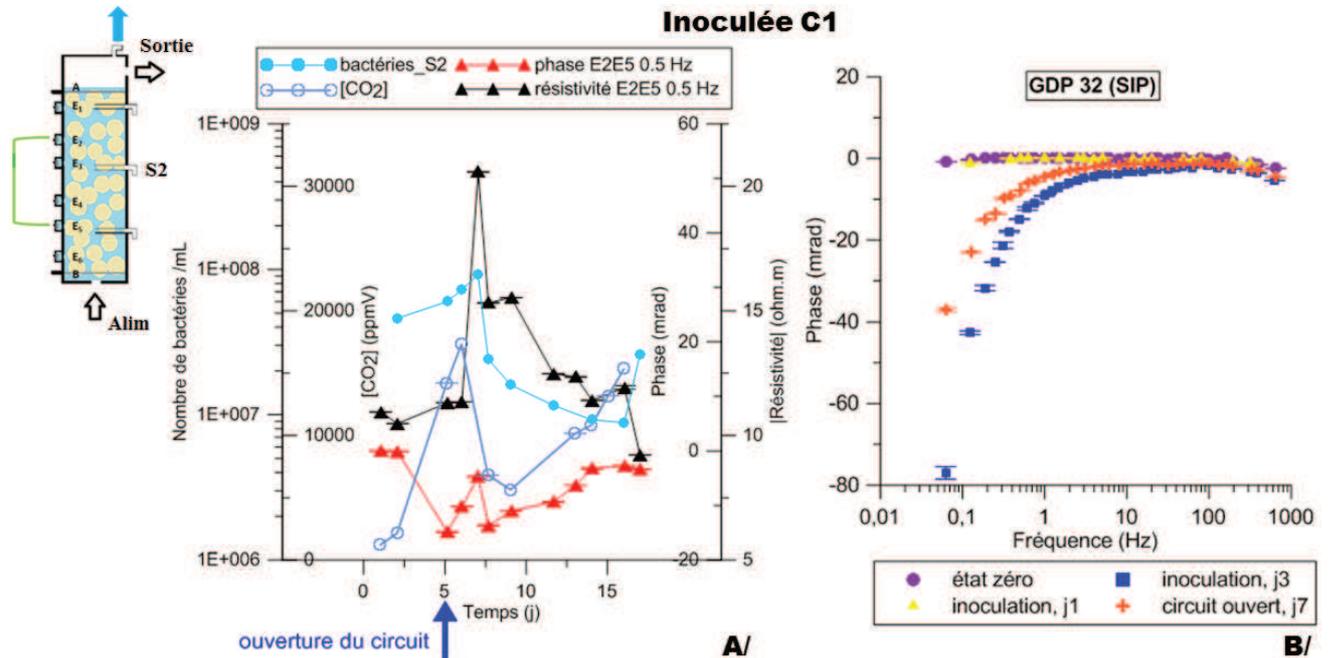


FIGURE VII-21 : A/ EVOLUTION DE LA PHASE ET DE L'AMPLITUDE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE À 0,5 Hz MESURÉE EN E2E5 (MILIEU DE COLONNE) PAR LE GDP 32II, DE LA CONCENTRATION EN CO₂ ET DE LA POPULATION BACTÉRIENNE EN S2 (MILIEU DE COLONNE) SUR LES 15 PREMIERS JOURS DE L'ESSAI C1. B/ SPECTRES DE LA PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE EN E2E5 (MILIEU DE COLONNE) PAR LE GDP 32II.

Le déphasage à 0,5 Hz (Figure VII-21-A/) varie de 0 à -15 mrad pendant la période d'inoculation (jours 0 à 5). Après l'ouverture du circuit, la perte de bactéries planctoniques et la diminution de la production en CO₂, la phase remonte jusqu'à -2 mrad. Cette évolution est visible sur les spectres de phase, aux basses fréquences (< 10 Hz) (Figure VII-21-B/). En effet, le spectre de l'état zéro est quasiment plat (ronds violets), avec une phase à 0 mrad pour toutes les fréquences. Le spectre du premier jour de la période d'inoculation (triangles jaunes) est identique. Il s'infléchit fortement à partir du 3^e jour d'inoculation (carrés bleus). Les valeurs de phase atteignent -76,9 mrad à 0,063 Hz. Deux jours après ouverture du circuit (jour 7, croix oranges), le spectre remonte vers des valeurs moins négatives (-37,1 mrad à 0,063 Hz).

Remarque : Comparaison avec les mesures GEIS sur PAR ancien (Figure VII-22).

Les mesures de résistivité complexe réalisées avec le PAR ancien sur C1_E2E5 sont présentées sur la Figure VII-22. Tout d'abord, il faut rappeler ici que les mesures du PAR ancien, bien que satisfaisantes sur circuit R(RC) (Figure VII-1-D/), montraient un spectre de phase aux valeurs très négatives dans un milieu impolarisable comme l'eau salée (Figure VII-2-D/). Cependant, il semble y avoir une même évolution des spectres entre ceux du GDP 32II et du PAR pour les 7 premiers jours (Figure VII-21-A/ et Figure VII-22-A/). Le spectre de l'état zéro ressemble à celui fait dans de l'eau salée. Ensuite, plus la période d'inoculation avance, plus les spectres vont dans les valeurs négatives. Et après l'ouverture du circuit, le spectre remonte. Il est intéressant de noter ici que les mesures du PAR permettent de faire des mesures à plus basses fréquences qu'avec le GDP 32II (jusqu'à 800 μHz). Un pic du spectre est observable à très basse fréquence : pic à 0,005 Hz pour l'état zéro, 0,004 Hz pour j1, 0,002 Hz pour j3 et 0,01 pour j7.

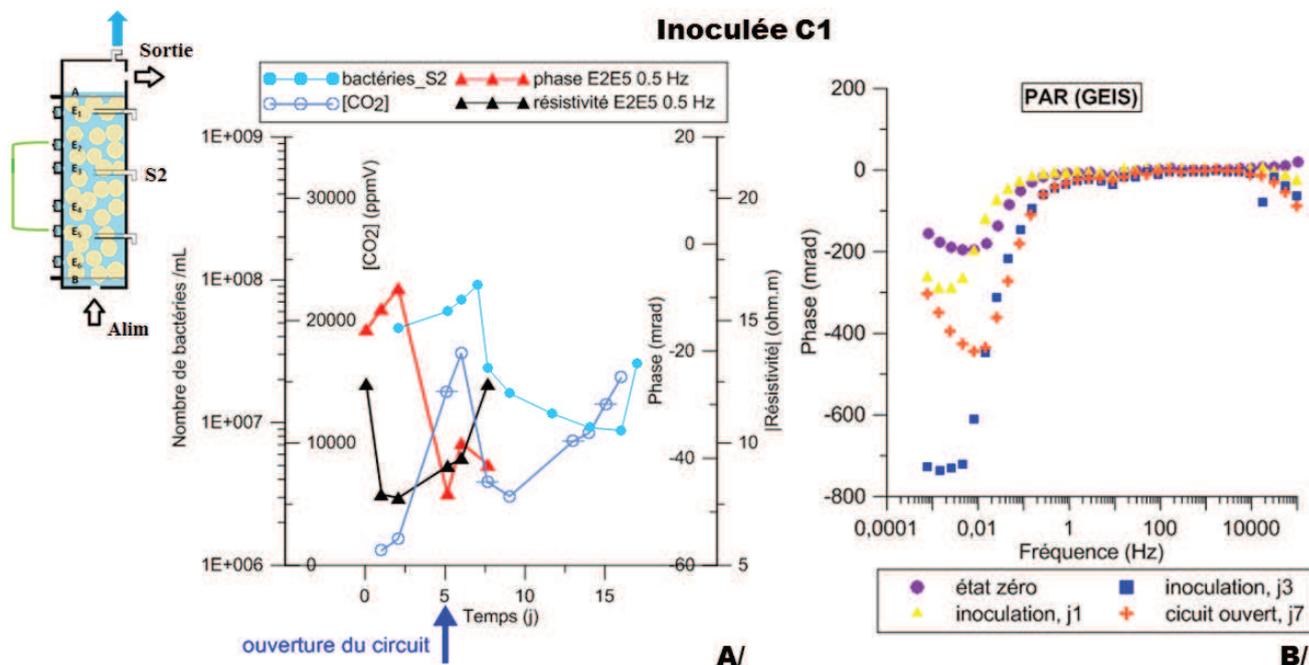


FIGURE VII-22 : A/ EVOLUTION DE LA PHASE ET DE L'AMPLITUDE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE À 0.5 Hz MESURÉE EN E2E5 (MILIEU DE COLONNE) PAR LE PAR ANCIEN, DE LA CONCENTRATION EN CO₂ ET DE LA POPULATION BACTÉRIENNE EN S2 (MILIEU DE COLONNE) SUR LES 15 PREMIERS JOURS DE L'ESSAI C1. B/ SPECTRES DE LA PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE EN E2E5 (MILIEU DE COLONNE) PAR LE PAR ANCIEN.

d) CONTRÔLE DU FACTEUR FORMATION EN FIN D'EXPÉRIENCE

Après les expériences de biodégradation et avant démontage des colonnes, le facteur de formation a été mesuré sur la colonne C1 (voir chapitre V-B-4 décrivant la mesure du facteur de formation). Le facteur de formation calculé à 4,6 a augmenté de manière significative par rapport à l'état initial (3,9).

e) VÉRIFICATION DES ÉLECTRODES DE MESURE APRÈS DÉMONTAGE DE LA COLONNE

A la fin des essais inoculés (C1 et C2, durée de 58 jours), les électrodes Cu/CuSO₄ ont été vérifiées. Des mesures de déphasage de la résistivité complexe ont été réalisées sur les colonnes remplies de sable propre, saturé d'eau du robinet. Ces mesures ont été comparées à l'état zéro des essais (sable propre saturé par le milieu de culture des bactéries) (Figure VII-23). Une faible différence (< 3 mrad) est observée à 0,5 Hz pour tous les couples de mesure.

Cela reste faible comparé au déphasage de 15 à 17 mrad observé pendant la période d'inoculation, et les déphasages autour de 5 mrad pour les couples C2_E1E4, C1_E2E5 et C1_E3E6. Et cela ne va pas dans le sens d'un défaut des électrodes des autres couples qui montraient des mesures de phases positives.

Ce test permet de mettre en évidence la durée de vie importante des électrodes Cu/CuSO₄ fabriquées en laboratoire et laisse penser que si certaines mesures n'ont pas été satisfaisantes, cela serait dû à l'évolution de la structure de la colonne (biofilms au niveau des électrodes, bulles d'air...), et non pas à une détérioration des électrodes de mesure.

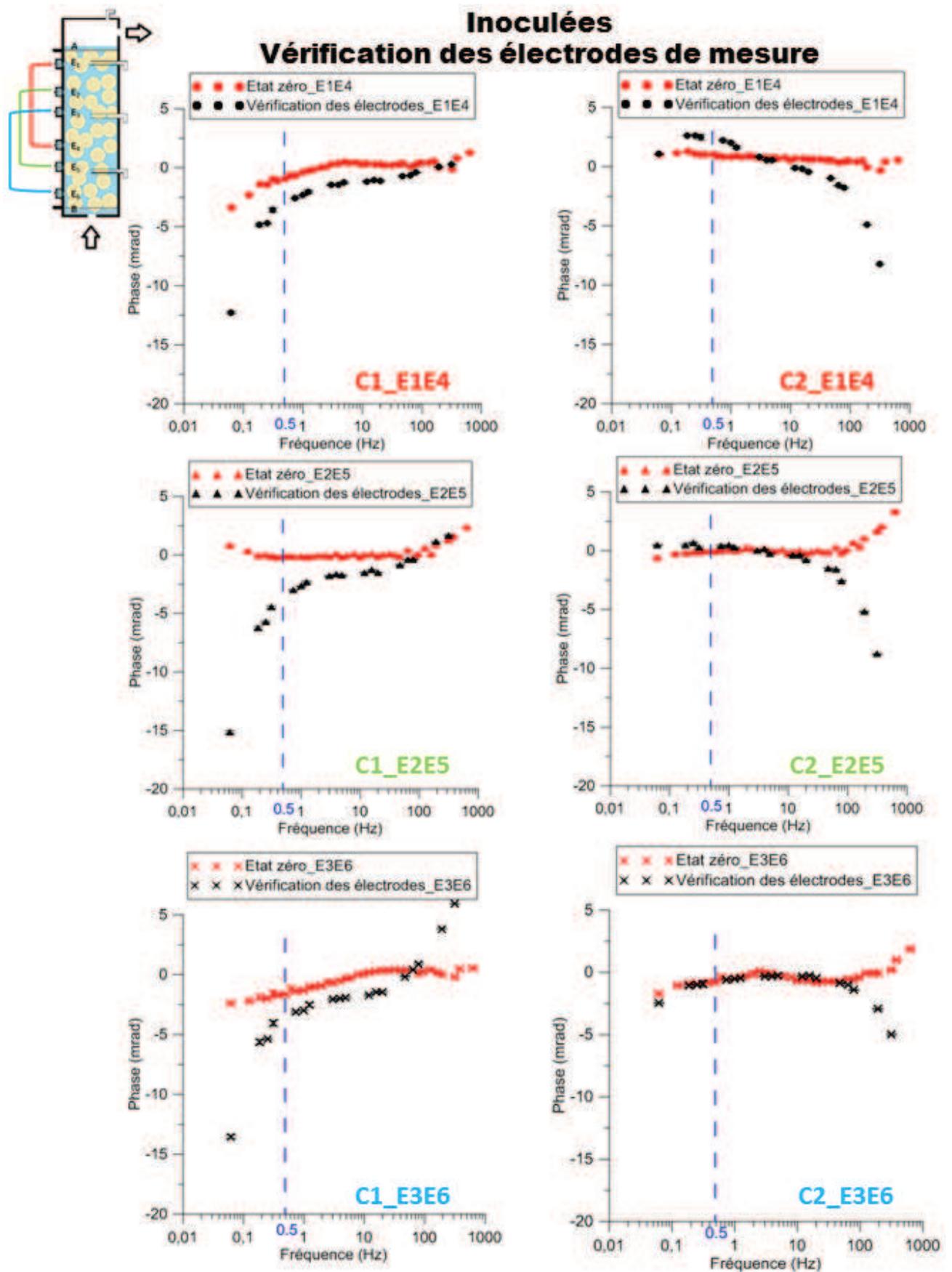


FIGURE VII-23 : SPECTRES DE LA PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉS AVEC LE GDP 32II SUR TROIS COUPLES D'ÉLECTRODES, POUR L'ÉTAT ZÉRO DES COLONNES C1 ET C2, ET POUR LES MÊMES COLONNES REMPLIES DE SABLE SATURÉ D'EAU DU ROBINET À LA FIN DE L'ESSAI DE 58 JOURS.

f) DISCUSSION

La discussion porte sur les résultats obtenus en circuit ouvert. Le suivi géochimique des colonnes C1 à C4, principalement celui de la production de CO₂ et du rapport isotopique $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$, a montré que l'activité bactérienne était significative dans les colonnes inoculées. Les analyses microbiologiques ont pu confirmer qu'un biofilm s'était formé dans ces colonnes, et pas dans les colonnes témoins.

Un pic de l'amplitude de la résistivité a été observé sur tous les couples de mesure des deux colonnes C1 et C2 au début de l'essai (jours 7-8). Ustra *et al.* (2012) ont montré que l'effet du toluène sur la réponse PP était faible, sauf au début de la pollution. Selon leur étude, l'amplitude de la résistivité serait sensible à la concentration en toluène, car il est électriquement résistant et réduit la conduction électrolytique dans les pores. Cependant, il ne modifierait pas significativement la chimie de l'interface minéral-fluide. Cette hypothèse est reprise dans Schmutz *et al.* (2010), dans le cas où l'huile est la phase non mouillante. Ici, comme dans Ustra *et al.* (2012), le toluène est supposé être la phase non-mouillante. De plus, aucune réponse significative de $|\rho^*(\omega)|$ n'a été observée pour les colonnes non inoculées.

Autre hypothèse : l'augmentation de résistivité peut être attribuée à une diminution de la concentration en ions et au colmatage des pores par les bactéries [Abdel Aal *et al.*, 2010]. En effet, une augmentation du facteur de formation F a été mesurée entre l'état zéro de la colonne C1 ($F = 3,9$) et la fin de l'expérience où F était égal à 4,6. En supposant que le facteur de cimentation m reste constant, cette variation représente une diminution de la porosité de l'ordre de 5 %. Cela est en accord avec l'hypothèse d'un colmatage des pores par le biofilm et une augmentation de la résistivité électrique. Mais cela n'explique pas entièrement l'augmentation d'un facteur 2 de la résistivité.

Par ailleurs, pendant le développement du biofilm, aucun sulfure métallique n'a pu être formé car les conditions aérobies étaient maintenues.

Une autre hypothèse capable d'expliquer l'augmentation de résistivité serait la présence de CO₂ à l'état gazeux, hautement résistant, dans les pores. Mais c'est précisément au moment où la concentration en CO₂ en tête de colonne était au plus bas que le pic de résistivité a été mesuré (Figure VII-24).

Une dernière hypothèse : les variations de résistivité seraient liées à la simple présence des bactéries. En effet, le pic de résistivité est synchrone de l'ouverture du circuit où le nombre de bactéries planctoniques diminue d'un facteur 10. Puis, la diminution de la résistivité coïncide avec la ré-installation des bactéries dans le milieu et à la production de métabolites électrolytiques (ions). De même que pour la phase, les bactéries auraient le même effet que des argiles :

- forte conductivité de surface qui fait chuter la résistivité globale du milieu quand le nombre de bactéries augmente,
- effet de phase ou de chargeabilité lié à la polarisation de la couche diffuse.

La réponse PP des colonnes inoculées est principalement visible sur les graphes de phase, pour les couples de mesure C1_E2E5 et C2_E1E4.

L'évolution du déphasage du couple C1_E2E5 (Figure VII-24) montre une variation temporelle : il atteint un pic à -15 mrad à 0,5 Hz, juste à la fin de la période d'inoculation. Ensuite, le déphasage diminue puis il augmente de nouveau pendant la croissance du biofilm bactérien jusqu'à -10 mrad. Ces résultats sont en accord avec ceux de Personna *et al.* (2013) qui ont étudié la biodégradation de l'éthanol en colonnes et qui ont observé une variation temporelle du déphasage similaire. Ils ont observé un faible déphasage (de l'ordre de 1,5 mrad) après l'inoculation des bactéries, puis une diminution du déphasage et enfin une forte augmentation atteignant un pic de 9 mrad à 0,2 Hz. Selon les auteurs, l'évolution du déphasage reflète les changements qui ont lieu dans le système, conséquences des processus de biodégradation. L'augmentation du déphasage après l'inoculation des bactéries serait causée par la diminution de la concentration ionique pendant une période de respiration bactérienne intense, ou par la modification de la porosité et de la tortuosité associée à une croissance bactérienne rapide et à la formation d'un biofilm.

Dans les essais C1 et C2, le premier pic du déphasage serait aussi dû à la forte activité bactérienne pendant la période d'inoculation, mis en évidence par une croissance de la population bactérienne et une forte production de CO₂. Il est suivi par une diminution du déphasage.

La croissance de la population bactérienne [Revil *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2013], la formation du biofilm [Davis *et al.*, 2006] et son activité (production d'ions et d'acides organiques) ont pu induire ce déphasage [Atekwana and Atekwana, 2010]. De plus, un potentiel zêta négatif ($\zeta = -9,3 \text{ mV} \pm 0,9 \text{ mV}$) a pu être mesuré sur une suspension de *R. wratislaviensis* à 25 °C. Cela confirme le fait que la croissance de la population bactérienne augmente la surface de la double couche électrique dans la colonne, comme le ferait la présence d'argiles, et induit un déphasage de la résistivité complexe [Revil *et al.*, 2012].

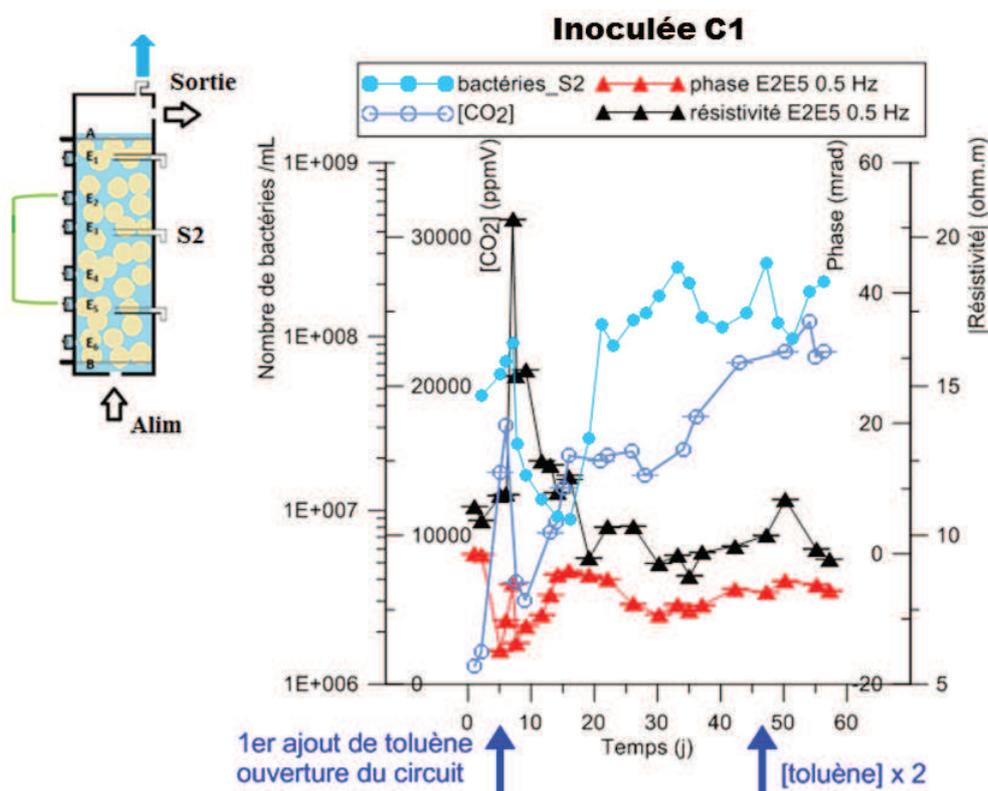


FIGURE VII-24 : EVOLUTION DE LA PHASE ET DE L'AMPLITUDE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE À 0,5 Hz, MESURÉE EN E2E5 (MILIEU DE COLONNE) PAR LE GDP 32II, DE LA CONCENTRATION EN CO₂ ET DE LA POPULATION BACTÉRIENNE EN S2 (MILIEU DE COLONNE), POUR L'ESSAI C1.

D. CONCLUSION

L'objectif de l'étude en laboratoire était de montrer la faisabilité d'une nouvelle méthodologie de suivi de la biodégradation aérobie des hydrocarbures par la combinaison de deux méthodes non intrusives : le suivi de la résistivité électrique complexe (méthode PP) et l'analyse du CO₂ émis (sa concentration et la signature isotopique de son carbone).

Le système choisi pour cet objectif était un ensemble de quatre colonnes, C1 à C4, comprenant un duplicat de colonnes expérimentales (C1 et C2) et deux colonnes témoins (C3 et C4). Elles ont été remplies de sable de Fontainebleau (matrice de silice sous forme de quartz quasi pure), puis ce sable a été saturé d'un milieu de culture (eau salée contenant des vitamines et des minéraux essentiels à la croissance bactérienne). Un inoculum de la souche *R. wratislaviensis*, bactérie connue pour dégrader les BTEX, a été introduit dans les deux colonnes C1 et C2. Le fluide de percolation contenait du toluène (polluant modèle) pour les deux colonnes inoculées (C1

et C2) et pour une des deux colonnes témoin (C3). Ces colonnes étaient équipées d'électrodes pour le suivi électrique et d'un espace gazeux en tête de colonne permettant l'analyse des gaz. Le système permettait aussi de réaliser des analyses microbiologiques et géochimiques complémentaires qui permettaient de confirmer que la biodégradation du toluène avait bien lieu dans les colonnes.

Il a fallu plusieurs essais pour mettre au point le protocole expérimental (design du circuit) et le protocole de mesure, qui ont permis d'aboutir à la dernière expérience présentée dans ce chapitre. En effet, plusieurs obstacles ont dû être surmontés afin de i) valider/calibrer les différents appareils de mesure pas forcément adaptés à l'étude en laboratoire, ii) trouver un système d'électrodes de mesure électrique capable de faire un suivi sur deux mois sans dérriver, iii) établir une procédure de suivi complet des conditions géophysiques, géochimiques et microbiologiques réalisable au quotidien, iv) obtenir un jeu de deux colonnes non-inoculées qui restent stériles assez longtemps pour être comparables aux colonnes inoculées, v) maintenir des conditions favorables à la biodégradation aérobie dans les colonnes (quantité d'oxygène, de toluène...), vi) obtenir des résultats en géophysique et géochimie exploitables sur une même colonne...

L'essai final, même s'il reste perfectible, est le fruit de 2 ans de travail. Il a pu mettre en évidence le lien entre mesures géophysiques et l'activité de biodégradation des colonnes. En effet, la résistivité complexe et, en particulier, le déphasage, suit l'évolution de la population bactérienne (perte de bactéries planctoniques, puis croissance du biofilm) et l'activité de biodégradation du toluène associée, mise en évidence par une production de CO₂ ayant la signature isotopique du carbone du toluène source.

Dans le chapitre VIII suivant, cette méthodologie non invasive prometteuse a été adaptée à l'échelle du terrain, sur un vrai site en cours de remédiation d'un panache de pollution par biostimulation aérobie.

VIII. RÉSULTATS– APPLICATION SUR SITE PILOTE

Une barrière réactive a été installée sur le site expérimental afin d'apporter de l'oxygène à la nappe phréatique et ainsi stimuler la biodégradation des hydrocarbures. La méthode de suivi non destructrice a été mise en place et des mesures vont être réalisées régulièrement pour suivre l'évolution de la dépollution.

A. RÉSULTATS DE LA CAMPAGNE PRÉLIMINAIRE

1. GÉOPHYSIQUE

Les données ER et IP de la campagne préliminaire ont été inversées avec le logiciel Res2DInv. Des coupes de résistivité électrique et de chargeabilité normalisée (rapport de la chargeabilité brute sur la résistivité) ont été obtenues. Celles correspondant au profil P3 (profil transverse au panache de pollution) sont montrées sur la Figure VIII-1. Sur cette coupe, une résistivité constante de 0 à 6 m de profondeur peut être observée, avec un horizon conducteur de moins d'un mètre d'épaisseur, à 2,5 m de profondeur. Ce même horizon apparaît fortement chargeable entre 35 et 60 m. Cette zone correspond au sommet de la nappe, là où l'atténuation naturelle par biodégradation produirait des métabolites conducteurs et où la concentration en bactéries (chargeables) serait plus élevée.

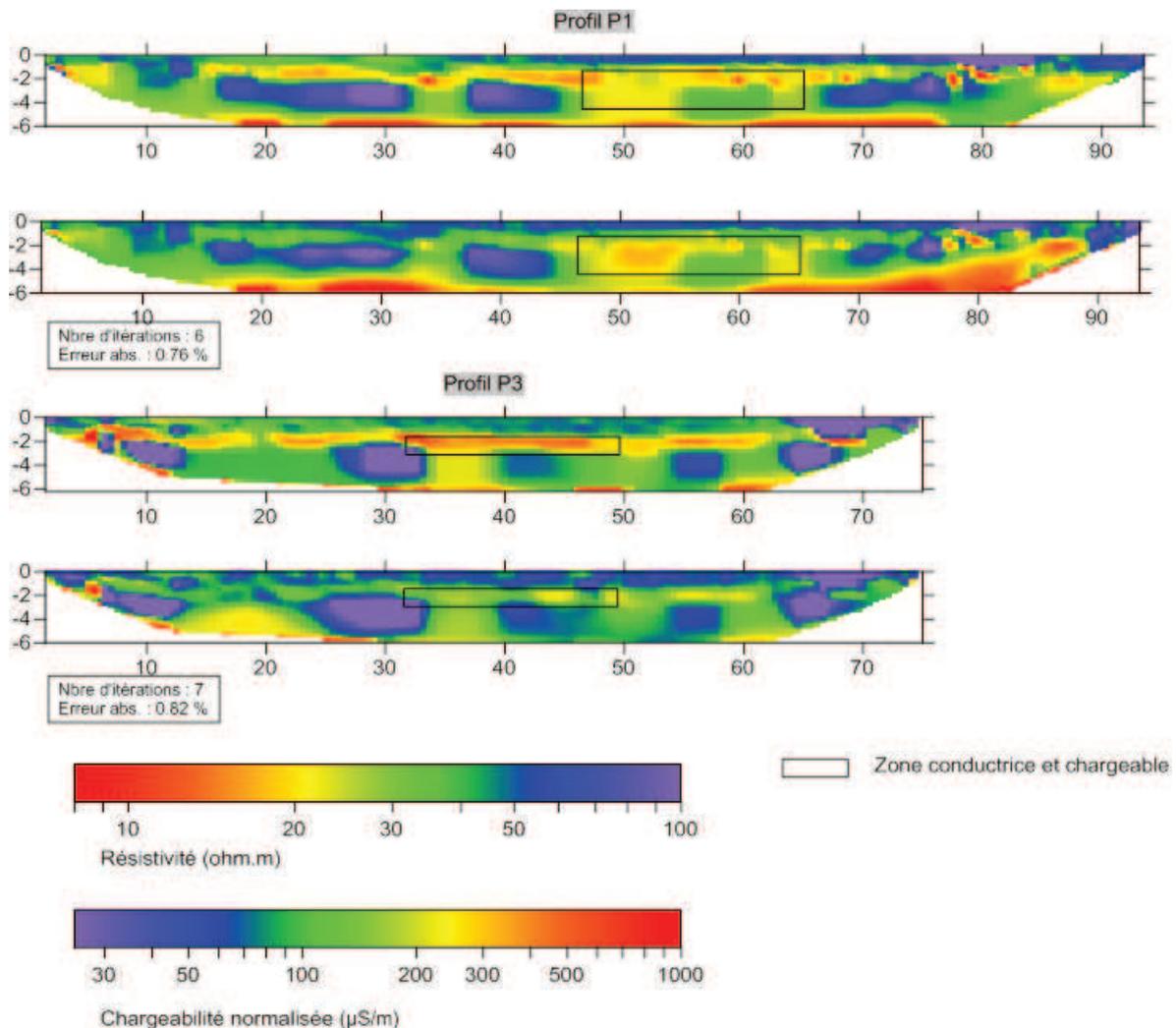


FIGURE VIII-1 : COUPES DE RÉSISTIVITÉ ÉLECTRIQUE (EN HAUT) ET DE LA CHARGEABILITÉ NORMALISÉE (EN BAS) DES PROFILS P1 ET P3, TRANSVERSES AU PANACHE DE POLLUTION.

Après interpolation des résultats en 3D et extraction de l'horizon situé à 2,5 m de profondeur, les données ont été représentées sur une carte (Figure VIII-2). Il apparaît que la zone de forte chargeabilité correspond à la zone polluée définie par les analyses chimiques de forages, en aval de l'ancien parc à cuves.

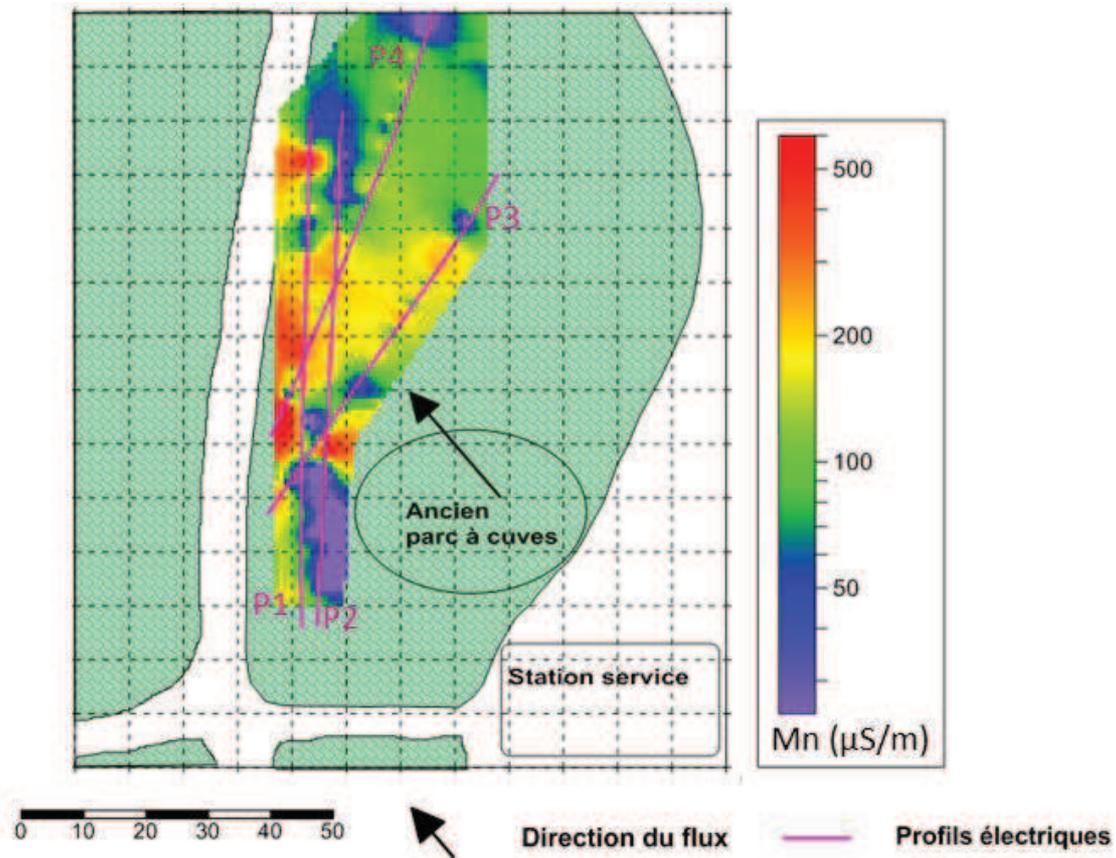


FIGURE VIII-2 : CARTE DE LA CHARGEABILITÉ NORMALISÉE À 2,5 M DE PROFONDEUR POUR LA CAMPAGNE DE GÉOPHYSIQUE PRÉLIMINAIRE (MAI 2012).

2. ANALYSES DU CO₂

Les mesures réalisées avec le SPIRIT sur 21 embases réparties sur le site sont présentées sur les cartes de la Figure VIII-3. Ces cartes montrent de forts flux de CO₂ émis au-dessus de la zone polluée, accompagnés d'un faible rapport $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ caractéristique d'une biodégradation des BTEX (autours de -29 ‰).

Remarque : Pour comparaison, les signatures isotopiques de sols non contaminés sont comprises entre -18 ‰ et -25 ‰ [Aggarwal and Hinchee, 1991] ; -31 ‰ correspond à la signature isotopique du toluène.

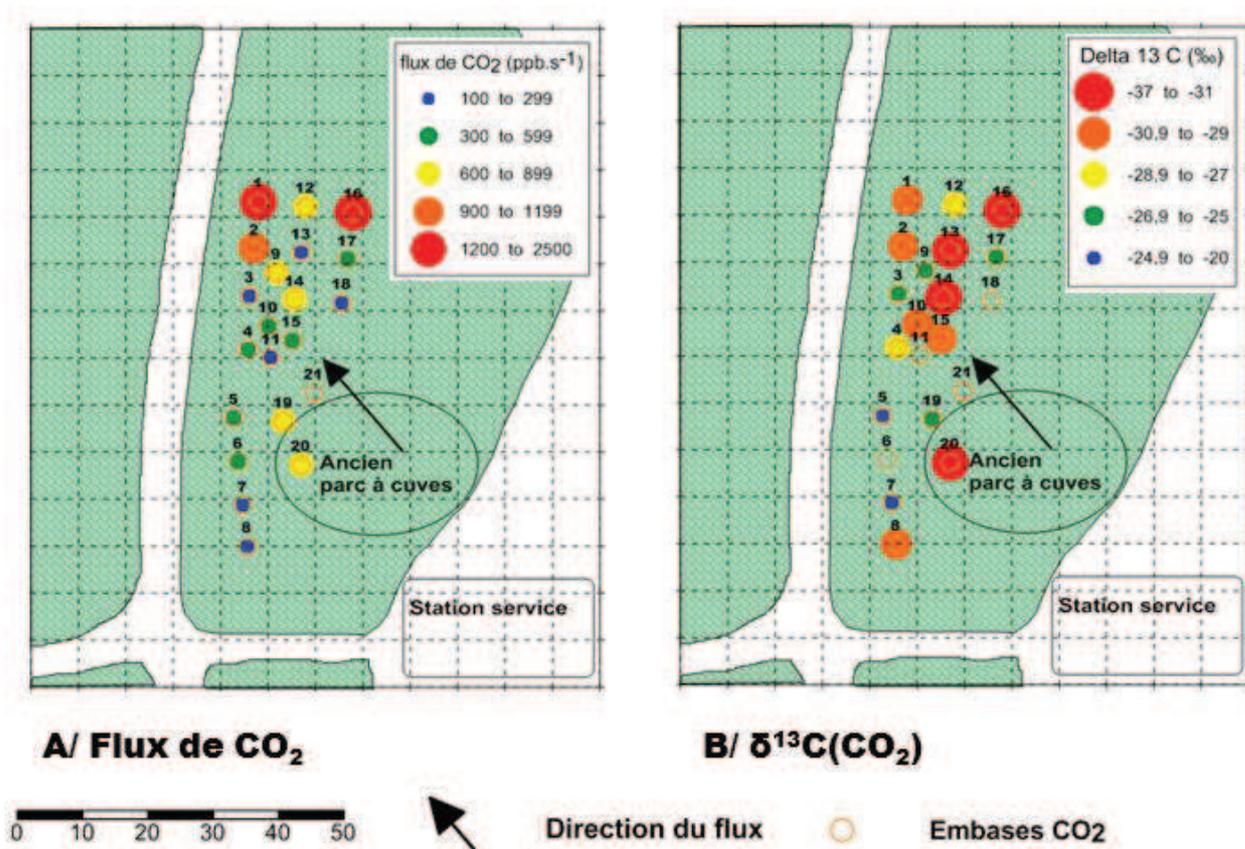


FIGURE VIII-3 : CARTES A/ DES FLUX DE CO₂ EN SURFACE ET B/ DES RAPPORTS ISOTOPIQUES DU CARBONE DU CO₂ POUR LA CAMPAGNE D'ANALYSE DES GAZ PRÉLIMINAIRE (SEPTEMBRE 2013).

3. CONCLUSION

Les résultats de cette campagne préliminaire ont identifié une zone chargeable et conductrice à 2,5 m de profondeur (au toit de la nappe), au niveau du panache de BTEX identifié par les analyses de puits. De plus, cette zone émet du CO₂ avec $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ proche de celui des hydrocarbures et caractéristique d'une biodégradation.

B. DÉBUT DU SUIVI DE LA BIODÉGRADATION

La biostimulation par injection d'eau oxygénée dans la barrière a démarré fin mars 2014, c'est-à-dire 7 mois avant la finalisation de ce mémoire. La mise en route d'un processus de biodégradation par stimulation aérobie est lent et la perméabilité hydraulique du milieu est faible (de l'ordre de 10^{-6} m/s), et les premiers résultats des analyses chimiques sur les piézomètres proches de la barrière montrent une augmentation de la concentration en toluène et benzène. Cette augmentation semble être due à la remobilisation de la pollution après la mise en place de la barrière. Depuis juillet 2014, la concentration en toluène et benzène a tendance à diminuer. Les résultats qui suivent sont le fruit d'observation avec peu de recul par rapport à la lenteur des processus de biodégradation. Les modèles bio-hydro-géochimiques prédisent qu'un rabattement significatif de la pollution ne sera effectif que début 2015 [communication personnelle Elicia VERARDO].

1. GÉOPHYSIQUE

Le suivi de géophysique est réalisé sur deux profils :

- un profil permanent perpendiculaire à la barrière, qui se superpose au profil P1 de Mai 2012,
- un profil ponctuel, parallèle à la barrière, qui est proche du profil P3 de Mai 2012.

Les abscisses des profils de Mai 2012 et ceux de la surveillance en cours ont été recalées afin de les comparer facilement.

Quelques mesures faites entre février et août 2014 ont pu être traitées. Ces premiers résultats sont présentés sur les Figure VIII-4 et Figure VIII-5.

L'inversion des données a été réalisée à l'aide de Res2DInv [Loke, 1994]. Les données ont été préalablement filtrées (erreur RMS de répétitivité > 3 %, potentiel mesuré < 10 mV afin d'avoir un bon rapport signal/bruit pour les mesures de chargeabilité), puis les pseudo-sections ont été inversées individuellement sans tenir compte du suivi temporel (*time-lapse*).

La qualité des mesures du suivi continu est excellente. Il y a peu de mesures bruitées : 3 à 4 dépassent les critères ci-dessus sur un ensemble de 750 mesures, pour chaque séquence de mesure. La convergence de l'inversion est également excellente (inférieure à 1 %) et est comparable au niveau de bruit du résistivimètre (1 %, d'après le constructeur Iris Instruments).

Sur le profil dit « perpendiculaire » ou permanent P1 (Figure VIII-4), la chargeabilité est très importante au-delà de 6 m de profondeur. Cela confirme la présence d'argiles, très chargeables, à ces profondeurs.

Sur les premières images, les résultats confirment les mesures du diagnostic géophysique préliminaire réalisé en mai 2012. En effet, une couche chargeable et conductrice est présente au niveau du panache de pollution, entre 2 et 3 m de profondeur :

- entre les points métriques 50 et 70 m, pour le profil perpendiculaire P1 (Figure VIII-4),
- entre les points métriques 15 et 25 m, pour le profil parallèle P2 (Figure VIII-5).

Les analyses chimiques en forages laissent à penser que la situation commence juste à se stabiliser après la phase de travaux, et qu'un relargage de BTEX au niveau de la barrière empêcherait la diffusion de l'oxygène en aval (il aurait été consommé très rapidement et les quantités d'H₂O₂ ne peuvent pas être augmentées pour ne pas stresser les bactéries). De plus, la perméabilité du milieu étant très faible, la diffusion (et l'effet) de l'oxygène ne devrait pas être visible avant quelques mois.

Depuis février 2014, la résistivité diminue et la chargeabilité normalisée augmente au cours du temps sur l'ensemble des coupes tomographiques. La variation est surtout marquée en surface et plus particulièrement sur le profil perpendiculaire. La chute de résistivité en proche surface (1 m de profondeur environ) est de 30% en moyenne sur le profil perpendiculaire. La principale contribution à cette évolution est l'augmentation de la température du sol qui passe de 5 °C en février à 17°C en août, à 50 cm de profondeur. Or, la résistivité et la chargeabilité normalisée respectivement diminue et augmente de 2 % environ par degré Celsius. Donc, une augmentation de 12 °C fera varier de 24 % environ la résistivité et la chargeabilité normalisée. Mais, il est nécessaire de calibrer au mieux le paramètre de variation de la résistivité en fonction de la température.

Or, dans la nappe phréatique, la variation de température n'est plus que de 1°C, alors que les variations de résistivité et de chargeabilité normalisée sont supérieures à 10 %. C'est donc que la conductivité du fluide a augmenté et qu'un effet de polarisation du milieu a augmenté dans la nappe au cours du temps. Cet effet de polarisation pourrait être dû au démarrage ou à l'accélération d'un processus de biodégradation et l'augmentation de la concentration en bactéries dans la nappe. Le prochain comptage des bactéries aura lieu en décembre prochain. Néanmoins, comme expliqué plus haut, les analyses chimiques laissent entrevoir un début de biodégradation et les analyses de CO₂ montrent une augmentation du flux de CO₂ en surface (voir paragraphe suivant).

L'étude sera poursuivie en 2015, en intégrant l'ensemble des analyses microbiologiques et géochimiques, qui sont trop partielles actuellement pour conclure sur une réussite du monitoring géophysique.

Profil perpendiculaire

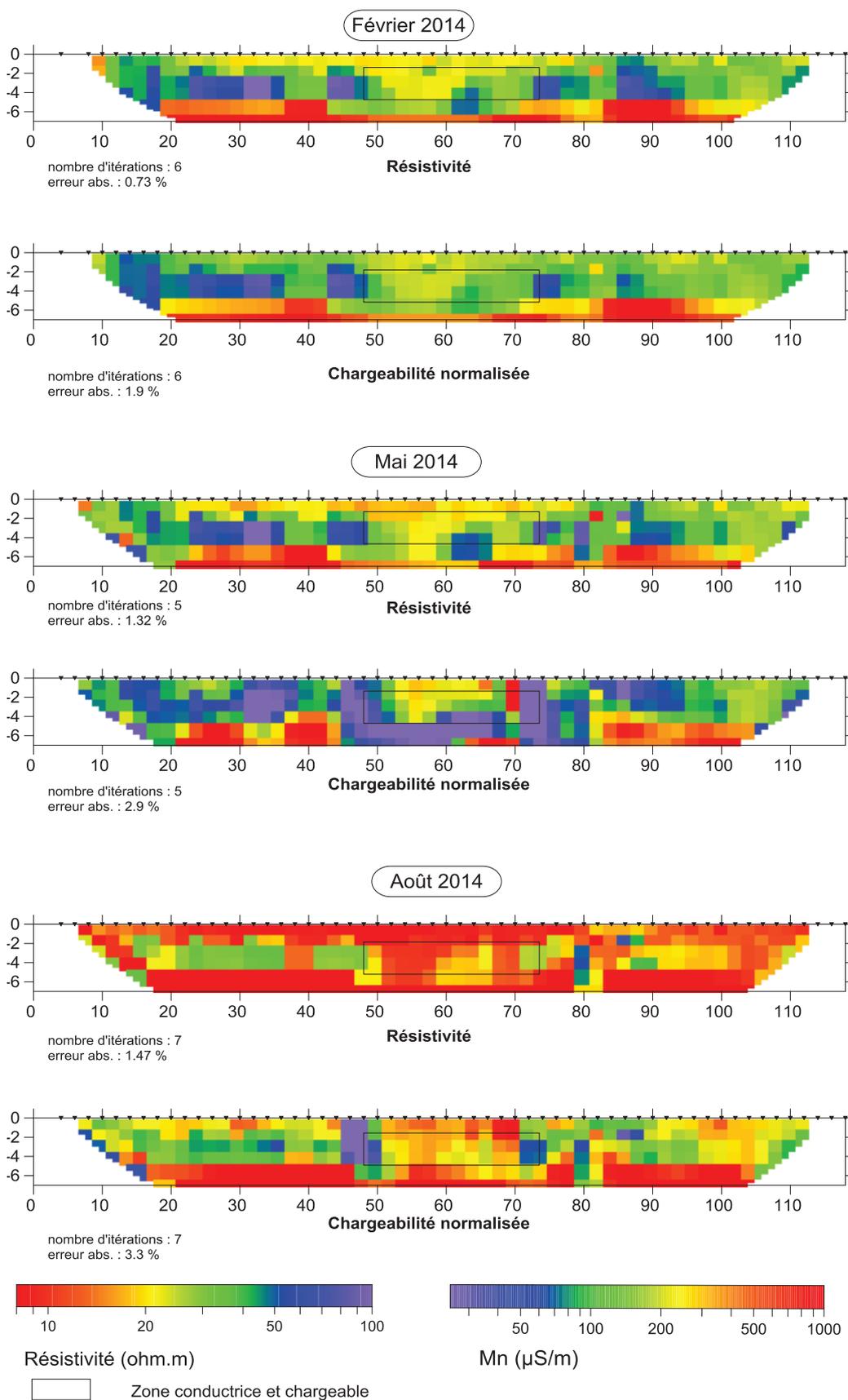


FIGURE VIII-4 : COUPES DE RÉSISTIVITÉ ÉLECTRIQUE (EN HAUT) ET DE CHARGEABILITÉ NORMALISÉE (EN BAS) DU PROFIL PERMANENT P1, MESURÉS EN FÉVRIER (ETAT ZÉRO), MAI ET AOÛT 2014.

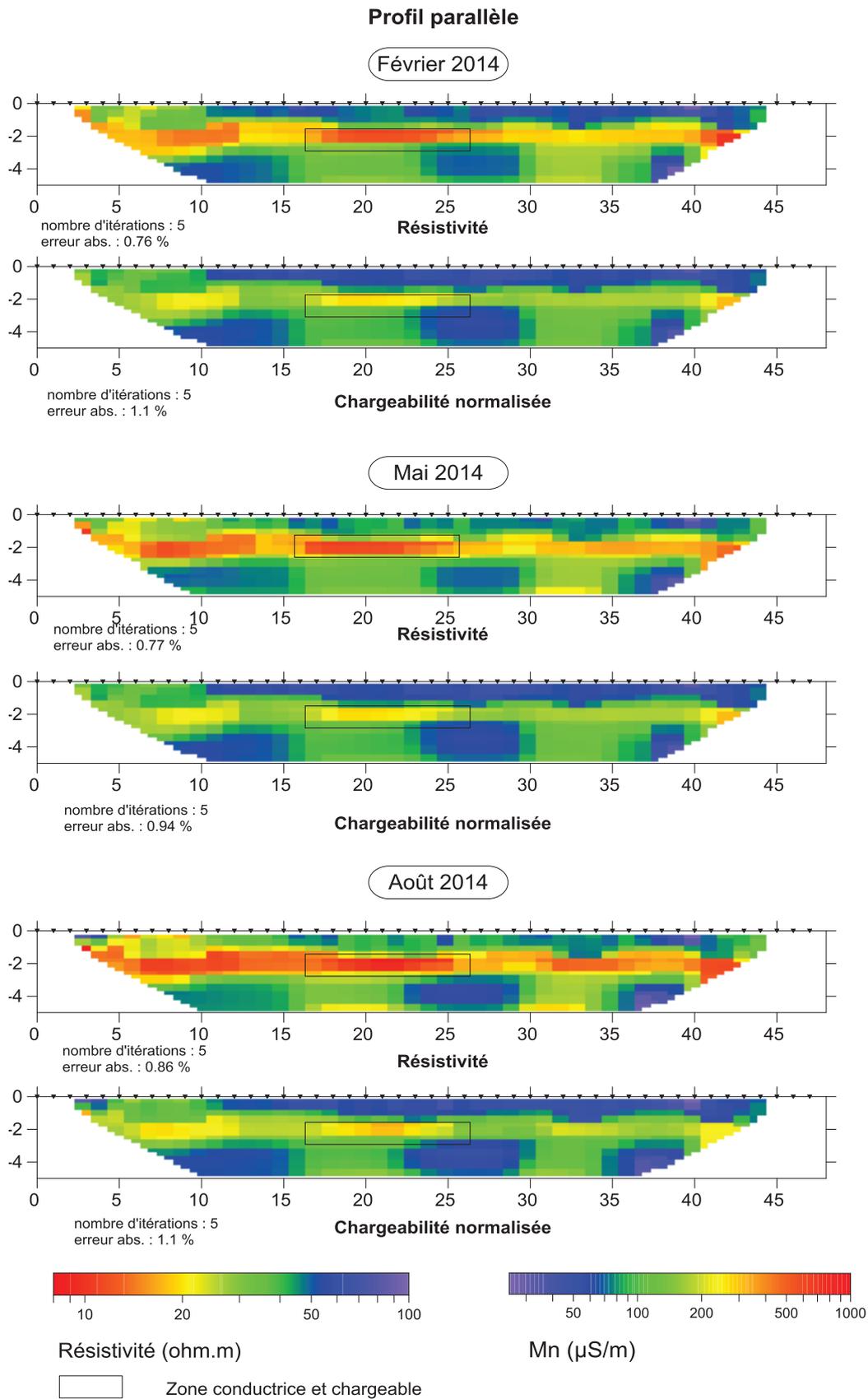


FIGURE VIII-5 : COUPES DE RÉSISTIVITÉ ÉLECTRIQUE (EN HAUT) ET DE LA CHARGEABILITÉ NORMALISÉE (EN BAS) DU PROFIL PONCTUEL P2, MESURÉS EN FÉVRIER (ETAT ZÉRO), MAI ET AOÛT 2014.

2. ANALYSES DU CO₂

Les cartes de résultats entre février 2014 (état zéro) et août 2014 sont présentées sur les Figure VIII-6 (cartes des flux de CO₂) et Figure VIII-7 (cartes des $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$).

a) EVOLUTION DES FLUX

Globalement, tous les flux sont situés entre 0,1 ppm.s⁻¹ pour les embases les moins émettrices et 3,5 ppm.s⁻¹ pour les plus émettrices. Les émissions les plus faibles sont enregistrées en février 2014. Les émissions augmentent ensuite progressivement jusqu'au mois d'août 2014. Cela pourrait être dû à l'augmentation de l'activité bactérienne, mais celle-ci serait vraisemblablement stimulée par l'augmentation de la température plutôt que par l'apport d'oxygène qui ne s'est pas encore beaucoup diffusé dans la nappe. En effet, les résultats préliminaires obtenus en septembre 2013 (été) montraient déjà de fortes émissions de CO₂.

De plus, les conditions climatiques (humidité et température) influencent aussi les quantités de gaz émises par le sol : plus le sol est humide et froid, moins les émissions sont rapides. Pour essayer de s'affranchir de ce phénomène dans l'interprétation des résultats, une solution consisterait à choisir une embase de référence, dont l'évolution de la quantité de flux serait due uniquement aux changements climatiques (et pas aux processus de biodégradation) et de quantifier ainsi l'augmentation de la quantité de flux due à la chaleur. En considérant que la nature du sous-sol est la même sur toute la surface d'étude, cette déviation serait ensuite retirée aux autres embases.

Un début d'interprétation est proposé en ayant choisi l'embase n°7 comme référence (mesurée lors de toutes les campagnes, et située en amont de la barrière réactive) (Figure VIII-8). Le Tableau VIII-1 récapitule les corrections appliquées aux données d'avril à août 2014. La valeur du flux mesurée en février 2014 pour l'embase 7 a été retirée aux valeurs mesurées pour cette embase les mois suivants. On remarque que plus les mois sont chauds, plus la correction apportée est importante.

TABLEAU VIII-1 : CORRECTIONS APPLIQUÉES AUX DONNÉES D'AVRIL À AOÛT 2014 (FÉVRIER 2014 ÉTANT L'ÉTAT ZÉRO, NON CORRIGÉ) PAR RAPPORT À L'EMBASE N°7.

	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août
Corrections (ppb/s)	-24	-56	-122	-315	-396

Après correction, les très fortes émissions semblent rester localisées au niveau de la barrière, et pour les embases n°1, 12 et 16 situées en aval (Figure VIII-8).

b) EVOLUTION DE L'ISOTOPIE DU CARBONE

Les résultats montrent une signature isotopique du CO₂ émis comprise en moyenne entre -27 ‰ et -30 ‰ depuis le début des mesures, en accord avec la signature isotopique des hydrocarbures présents dans la nappe (environ -25 ‰ -26 ‰, rapport ATTENA) et présentant un faible fractionnement isotopique (de l'ordre de 1 à 3 ‰). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus en colonnes.

Les émissions de CO₂ émanant directement d'un piézomètre (PS2) ont également été mesurées. Quatre répliques ont été réalisés (-30,0 ‰ ; -28,5 ‰ ; -28,8 ‰ ; -29,2 ‰ ; moyenne : -29,0 ‰) et montrent une moyenne des émissions similaire au CO₂ ayant traversé les couches de sol. Il n'y aurait donc pas ou peu de discrimination isotopique au cours de la diffusion. Ceci confirme donc qu'un suivi du CO₂ émis en surface se justifie pour suivre la biodégradation aérobie du site pollué.

Néanmoins, il est important de remarquer ici que l'évolution d'un fractionnement isotopique du carbone au cours de la biodégradation n'est pas seulement temporelle, mais aussi spatiale. En effet, plus on se dirige en aval de la barrière réactive (dans le sens de l'écoulement de la nappe), plus les hydrocarbures sont biodégradés, et plus il y existe une discrimination isotopique du carbone de ces polluants : leur carbone est enrichi en ¹³C, car le ¹²C est

consommé préférentiellement par les bactéries. Le CO₂ émis en surface correspond aux polluants dégradés à l'aplomb des embases. Par exemple, le CO₂ émis à l'embase n°16 provient d'un polluant déjà plus enrichi en ¹³C que celui émis au niveau de l'embase n°20. Il est donc ici plus pertinent de comparer les embases une à une dans le temps, plutôt que de regarder l'évolution spatiale qui est biaisée par ce phénomène.

Les mesures faites avec le SPIRIT seront bien sûr à comparer avec les analyses des rapports isotopiques des hydrocarbures dans les eaux réalisées en mars 2014, puis en 2015.

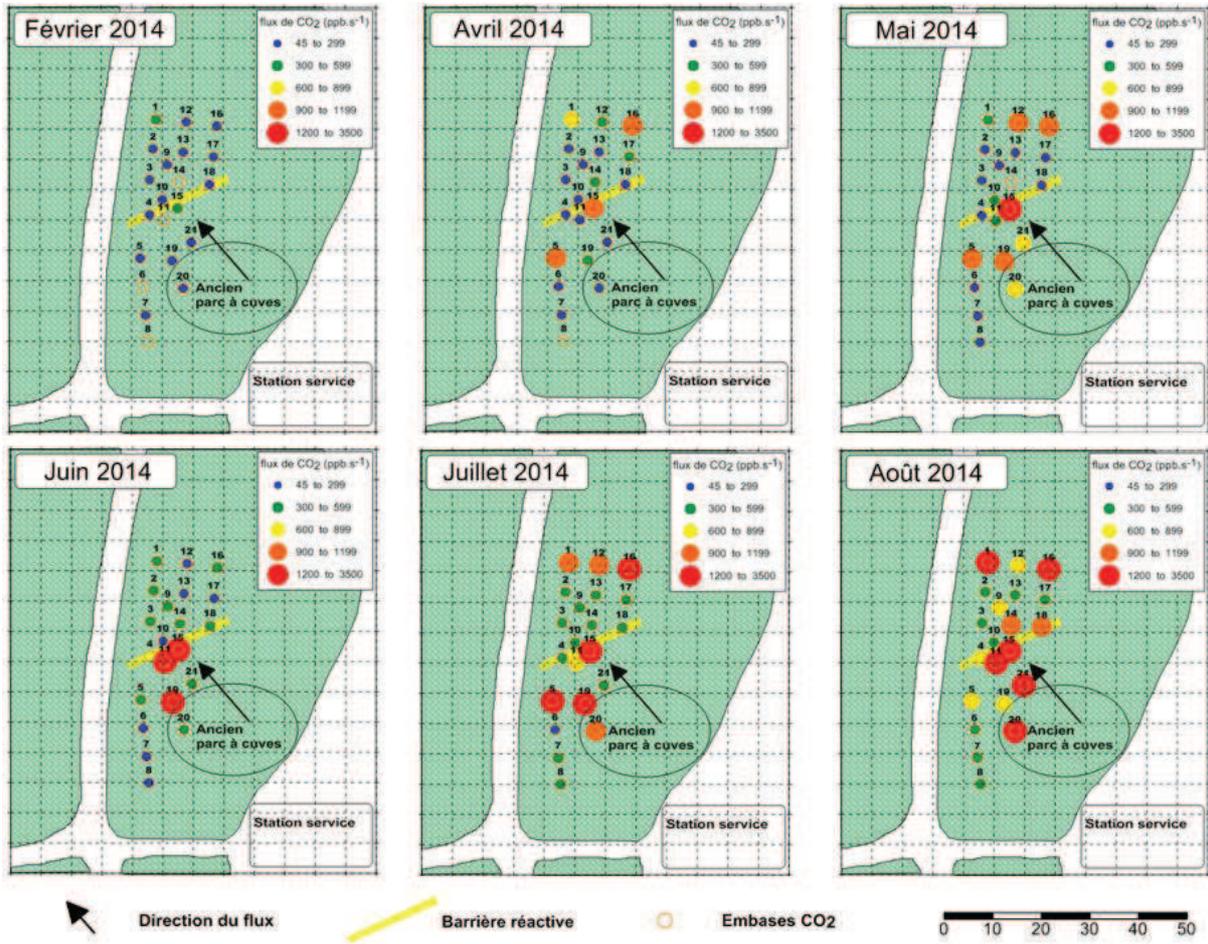


FIGURE VIII-6 : CARTES DES FLUX DE CO₂ MESURÉS EN FÉVRIER 2014 (ÉTAT ZÉRO), ET APRÈS L'ACTIVATION DE LA BARRIÈRE RÉACTIVE EN AVRIL 2014 (AVRIL À AOUT 2014).

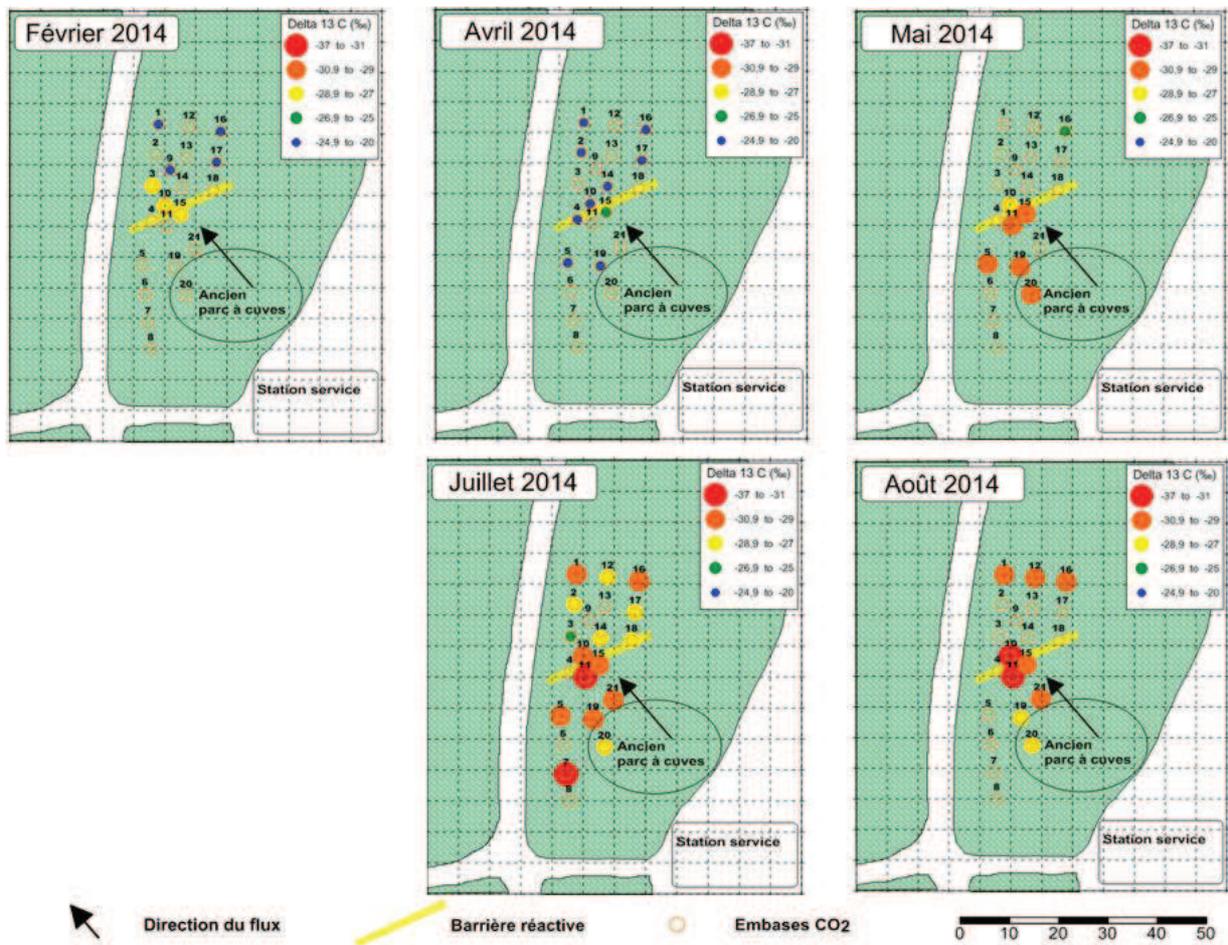


FIGURE VIII-7 : CARTES DES $\delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$ MESURÉS EN FÉVRIER 2014 (ÉTAT ZÉRO), ET APRÈS L'ACTIVATION DE LA BARRIÈRE RÉACTIVE EN AVRIL 2014 (AVRIL À AOUT 2014).

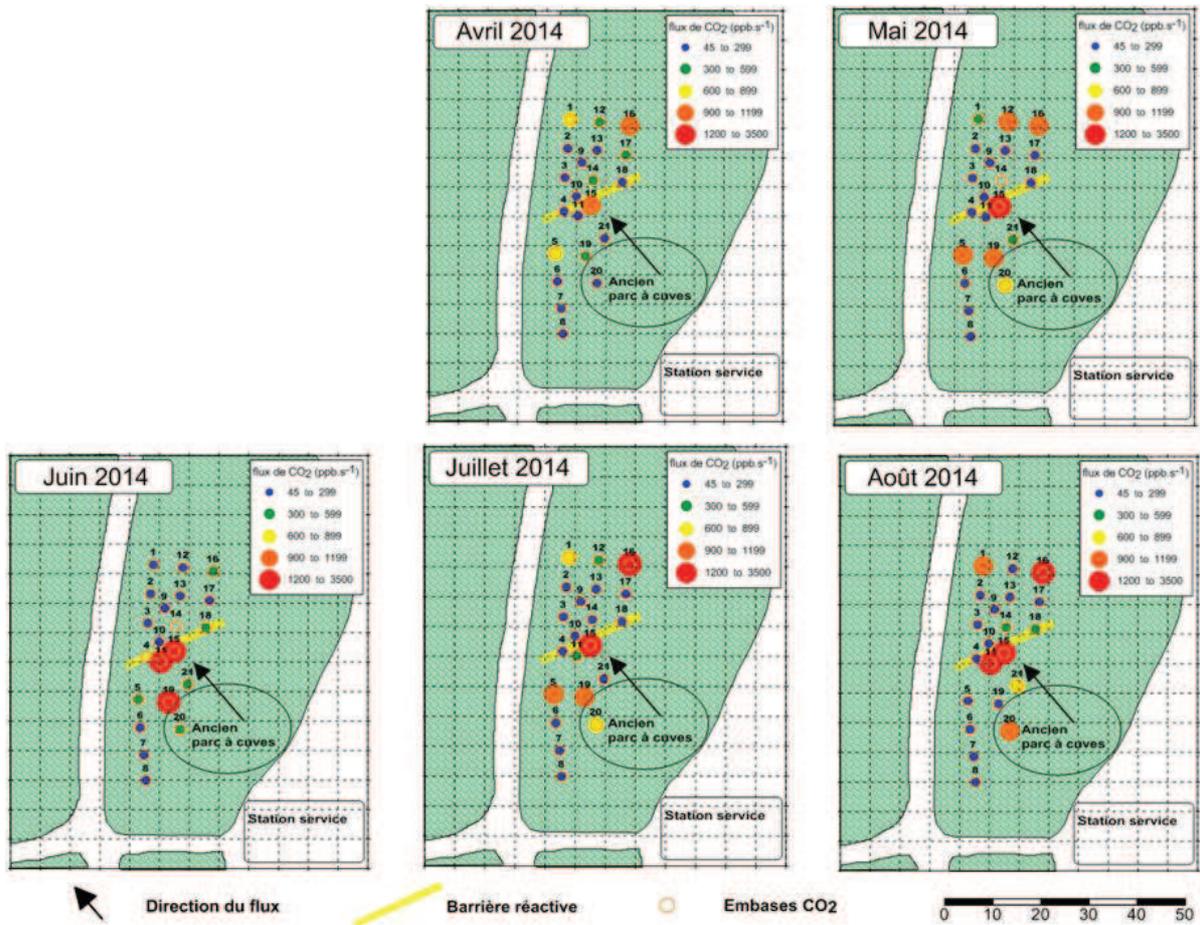


FIGURE VIII-8 : CARTES DES FLUX DE CO₂ CORRIGÉS DU BIAIS INDUIT PAR LA MÉTÉO, PAR RAPPORT À L'EMBASE DE RÉFÉRENCE N°7, POUR AVRIL 2014 À AOUT 2014.

D. CONCLUSION

Le suivi de la biostimulation des polluants de type BTEX sur le site pilote est assez récent et ce travail ne peut présenter que des résultats préliminaires. Néanmoins, ceux-ci sont encourageants. En effet, la zone polluée identifiée par les forages est une zone électriquement plus conductrice que la zone non polluée, et plus chargeable (production de métabolites conducteurs et augmentation du nombre de bactéries chargeables au cours de la biodégradation des hydrocarbures). Cette même zone émet beaucoup de CO₂ en surface, lequel a une signature isotopique proche de celle des polluants, voire plus appauvrie en ¹³C (de l'ordre de 1 à 3 ‰).

Cette mise en évidence de la biodégradation naturelle (non stimulée) montre déjà l'intérêt de coupler les deux méthodes qui donnent des résultats cohérents, en accord avec les analyses géochimiques de puits.

L'évolution due à la biostimulation par l'apport d'oxygène dans la barrière n'est pas encore visible sur les profils géophysiques. Néanmoins, les émissions de CO₂ semblent déjà augmenter au niveau de la barrière réactive, une fois que les données ont été corrigées du biais induit par les conditions climatiques.

La surveillance va se poursuivre fin 2014 et en 2015 pour pouvoir confirmer cette tendance. D'ores et déjà, il est important de noter que les analyses de gaz en surface et les mesures géophysiques sont des mesures indirectes de ce qui se passe dans le sous-sol pollué par des hydrocarbures en biodégradation naturelle ou stimulée. Cela peut donc induire certains biais (influence de la météo par exemple). Ainsi, il est indispensable de combiner les deux techniques pour confirmer les hypothèses déduites à partir d'une des méthodes, mais il est aussi préférable de disposer de quelques mesures sur les eaux pour certifier ces données indirectes. La nouvelle méthodologie de suivi proposée par ce travail de thèse constituera cependant une amélioration des méthodes de suivi actuelles, car elle permet l'obtention d'un suivi plus large dans le temps et dans l'espace, et de plus, en réduisant les coûts puisqu'elle en réduit le nombre de puits d'observation à réaliser (coûteux, et jamais suffisants pour un suivi géochimique/analytique significatif et réaliste).

IX. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La biodégradation est une méthode de dépollution *in situ* qui peut être envisagée pour dégrader un panache de contaminants organiques. C'est une décontamination par voie biologique efficace, mais le suivi de ce type de dépollution se fait actuellement en ayant recours à des forages coûteux, trop peu nombreux par rapport au nombre nécessaire pour réaliser un suivi géochimique/analytique significatif et réaliste. L'objectif de ce travail était de valider une nouvelle méthodologie couplant des méthodes géo-électriques (polarisation provoquée) et des analyses de gaz en surface (flux de CO₂ et isotopie de son carbone) afin d'améliorer le suivi des panaches de pollution d'hydrocarbures en cours de biodégradation. Le travail de thèse a consisté à tester ces nouveaux outils de monitoring à l'échelle du laboratoire, en colonnes, puis à les mettre en œuvre sur un véritable site pollué pilote en cours de dépollution.

Le premier point important de cette thèse est d'être parvenu à la mise en place d'un dispositif de laboratoire permettant de tester le couplage mesures électriques / analyses de gaz, tout en gardant le contrôle sur les conditions physico-chimiques et microbiologiques du milieu d'étude. Ainsi, les mesures de polarisation provoquée et les analyses de gaz ont été validées par un suivi microbiologique et géochimique complet dans le milieu aqueux des colonnes : comptages bactériens, mesure de concentration en toluène résiduel, du pH, du potentiel redox, de la conductivité, du taux d'oxygène dissous, de la température, du $\delta^{13}\text{C}$ (toluène), du $\delta^{13}\text{C}$ (DIC) (*Dissolved Inorganic Carbon*), du $\delta^{13}\text{C}$ (DOC) (*Dissolved Organic Carbon*) et de l'alcalinité.

Cette élaboration du dispositif expérimental a eu lieu en plusieurs étapes, en résolvant progressivement différents problèmes d'ordre expérimental. Travailler avec du vivant impose d'appliquer un protocole complexe de désinfection du matériel utilisé. Le sable a facilement pu être lavé et autoclavé à partir de protocoles existants, ainsi que le milieu de culture des bactéries. Cependant, la stérilisation n'étant pas possible pour tous les matériels utilisés (colonnes et tuyaux en plastique), certaines pièces ont juste été désinfectées et il a fallu réfléchir à d'autres artifices pour limiter la contamination extérieure des colonnes, notamment des colonnes témoins. Après plusieurs essais, la meilleure solution trouvée a été l'utilisation de formaldéhyde (inhibiteur bactérien) dans les colonnes non inoculées gardées en circuit fermé, et une désinfection très poussée des colonnes inoculées.

Concernant les mesures de polarisation provoquée spectrale (PPS), cette étude a permis d'adapter le protocole d'utilisation de l'appareillage de terrain GDP 32II (Zonge) aux expérimentations en laboratoire. De plus, les différentes étapes de validation du système de mesure ont mis en évidence une défaillance du système de calibration de l'appareil. Un perfectionnement a dû être apporté aux électrodes de mesure du potentiel. Des électrodes de laboratoire impolarisables Cu/CuSO₄ ont été mises au point à partir du modèle proposé par Mainault (2004). La solution électrolytique était stabilisée sous forme de gel et le contact avec le milieu d'étude était assuré par un fritté poreux Vycor® utilisé en électrochimie. Ces améliorations ont permis de limiter la diffusion de l'électrolyte dans le milieu, ce qui a rendu possible l'acquisition sur de longues durées. Malgré toutes ces améliorations, les derniers essais sur colonnes n'ont pas été parfaits. En effet, certains couples d'électrodes de mesure ont enregistré des réponses PPS avec une phase positive, inattendue et inexplicée dans le contexte de cette étude. Néanmoins, des résultats exploitables et concluants ont pu être obtenus sur quelques couples de mesure.

Au cours de ce travail, il y a également eu une tentative de comparaison entre la méthode géophysique de polarisation provoquée spectrale et la méthode électrochimique de spectroscopie d'impédance. Les appareils d'électrochimie, conçus pour des travaux sur cellule électrochimique à trois électrodes (référence, auxiliaire et travail), ont difficilement pu être adaptés à l'échelle de la colonne en travaillant à quatre électrodes (référence, *sensing*, auxiliaire et travail). Bien que ces appareils permettent une investigation sur un spectre plus large, des problèmes de calibration du système ont limité leur utilisation optimale.

Du côté des analyses de gaz, d'autres analyses d'isotopie du carbone sur les eaux (toluène, puis DIC et DOC) ont dû être rajoutées dans la liste des analyses à faire afin de valider les mesures sur le CO₂. Les mesures acquises et présentées ici ont également contribué à la validation du spectromètre prototype SPIRIT (article en cours de rédaction).

Le travail en colonnes a montré que l'activité bactérienne est caractérisée par une production de CO₂ ayant une signature isotopique proche de celle du toluène (-31 ‰), voire plus négative (plus appauvri en ¹³C), et par une évolution de la résistivité complexe en corrélation avec les analyses microbiologiques et géochimiques. En effet, sur certains couples de mesure, le déphasage du potentiel par rapport au courant suit les variations temporelles de l'activité bactérienne et atteint -15 mrad. En d'autres termes, quand le nombre de bactéries augmente dans la colonne, la valeur absolue du déphasage croît également.

Ces études ont servi de support pour la mise en place de la démonstration sur site pilote. Sur ce site, où des fuites de gasoil et d'essence ont eu lieu il y a une quinzaine d'années, des diagnostics géophysiques et géochimiques ont permis de montrer une atténuation naturelle par biodégradation. En effet, les premiers résultats montrent une zone plus conductrice et plus chargeable autour de 3 m de profondeur, ce qui correspond à la zone polluée, définie par les analyses géochimiques en forages. De plus, au niveau de cette zone, de fortes émissions de CO₂ ont été mesurées avec une signature isotopique caractéristique d'une biodégradation d'hydrocarbures. La tendance reste à confirmer en 2015.

Ces résultats montrent l'intérêt de combiner des méthodes géophysiques avec des analyses de gaz pour surveiller des zones de biodégradation et vont permettre de valider une méthodologie originale de monitoring de la dépollution *in situ*.

A l'avenir, des études nouvelles doivent approfondir les connaissances à l'échelle du laboratoire pour appréhender l'effet de différents facteurs sur la réponse électrique du milieu. Ainsi, il serait intéressant de réaliser des expérimentations avec d'autres polluants organiques que le toluène, à des concentrations de départ plus variées. Il serait également utile de travailler avec le même polluant sur différentes matrices, plus ou moins carbonatées ou plus ou moins argileuses. Les recherches peuvent aussi porter sur les bactéries. Ici, une seule souche a pu être testée. Mais d'autres souches méritent d'être étudiées, seules ou en consortium.

Du côté terrain, les méthodes non intrusives comme la géophysique et les analyses de gaz en surface pourraient être davantage utilisées à l'avenir pour l'étude des sites et sols pollués afin d'améliorer le suivi et de diminuer ses coûts. Ces techniques efficaces doivent être testées sur un plus grand nombre de sites afin de gagner en maturité et en crédibilité auprès des opérateurs de la dépollution.

RÉFÉRENCES

Abdel Aal, G., and E. A. Atekwana (2014), Spectral induced polarization (SIP) response of biodegraded oil in porous media, *Geophysical Journal International*, 196(2), 804-817.

Abdel Aal, G. Z., E. A. Atekwana, and E. A. Atekwana (2010), Effect of bioclogging in porous media on complex conductivity signatures, *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 115(G3), G00G07.

Abdel Aal, G., L. Slater, and E. A. Atekwana (2006), Induced-polarization measurements on unconsolidated sediments from a site of active hydrocarbon biodegradation, *Geophysics*, 71(2), H13-H24.

Abdel Aal, G., E. A. Atekwana, L. D. Slater, and E. A. Atekwana (2004), Effects of microbial processes on electrolytic and interfacial electrical properties of unconsolidated sediments, *Geophysical Research Letters*, 31(12), L12505.

Abounit, S., and C. Zurzolo (2012), Wiring through tunneling nanotubes—from electrical signals to organelle transfer, *Journal of cell science*, 125(5), 1089-1098.

ADEME, (2012), Taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines polluées en France, Ernst & Young.

Aelion, C. M., P. Höhener, D. Hunkeler, and R. Aravena (2009), *Environmental isotopes in biodegradation and bioremediation*, CRC Press.

Aggarwal, P. K., and R. E. Hinchee (1991), Monitoring in situ biodegradation of hydrocarbons by using stable carbon isotopes, *Environmental Science & Technology*, 25(6), 1178-1180.

Aggarwal, P. K., M. E. Fuller, M. M. Gurgas, J. F. Manning, and M. A. Dillon (1997), Use of Stable Oxygen and Carbon Isotope Analyses for Monitoring the Pathways and Rates of Intrinsic and Enhanced in Situ Biodegradation, *Environmental Science & Technology*, 31(2), 590-596.

Albrecht, R., J.-C. Gourry, M.-O. Simonnot, and C. Leyval (2011), Complex conductivity response to microbial growth and biofilm formation on phenanthrene spiked medium, *Journal of Applied Geophysics*, 75(3), 558-564.

Angoran, Y., and T. Madden (1977), Induced Polarization: a preliminary study of its chemical basis, *Geophysics*, 42(4), 788-803.

Arato, A., M. Wehrer, B. Biró, and A. Godio (2013), Integration of geophysical, geochemical and microbiological data for a comprehensive small-scale characterization of an aged LNAPL-contaminated site, *Environmental Science and Pollution Research*, 1-16.

Archie, G. E. (1942), The electrical resistivity log as an aid in determining some reservoir characteristics, *Petroleum Transactions of AIME*, 146(1), 54-62.

Aristodemou, E., and A. Thomas-Betts (2000), DC resistivity and induced polarization investigations at a waste disposal site and its environments, *Journal of Applied Geophysics*, 44(2-3), 275-302.

Arora, T., N. Linde, A. Revil, and J. Castermant (2007), Non-intrusive characterization of the redox potential of landfill leachate plumes from self-potential data, *Journal of Contaminant Hydrology*, 92(3-4), 274-292.

Atekwana, E., and E. Atekwana (2010), Geophysical Signatures of Microbial Activity at Hydrocarbon Contaminated Sites: A Review, *Surveys in Geophysics*, 31(2), 247-283.

Atekwana, E. A., D. D. Werkema, and E. Atekwana (2006), Biogeophysics : the effects of microbial processes on geophysical properties of the shallow subsurface, in *Applied Hydrogeophysics*, edited by H. Vereecken, A. Binley, G. Cassiani, A. Revil and K. Titov, pp. 161-193, Springer Netherlands.

Atekwana, E. A., D. Werkema, J. Duris, S. Rossbach, W. Sauck, D. Cassidy, J. Means, and F. Legall (2004), In situ apparent conductivity measurements and microbial population distribution at a hydrocarbon contaminated site, *Geophysics*, 69(1), 56-63.

Auffret, M., D. Labbé, G. Thouand, C. W. Greer, and F. Fayolle-Guichard (2009), Degradation of a Mixture of Hydrocarbons, Gasoline, and Diesel Oil Additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24), 7774-7782.

B

Ball, P. (2007), Bacteria may be wiring up the soil, *Nature*, 449(7161), 388-388.

Barsoukov, E., and J. R. Macdonald (2005), *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications*, John Wiley & Sons.

BASOL - Ministère de l'Écologie, (2014), *Nature des polluants*, edited.

Beneteau, K. M., R. Aravena, and S. K. Frape (1999), Isotopic characterization of chlorinated solvents—laboratory and field results, *Organic Geochemistry*, 30(8, Part 1), 739-753.

Bernstone, C., T. Dahlin, T. Ohlsson, and H. Hogland (2000), DC-resistivity mapping of internal landfill structures: two pre-excavation surveys, *Environmental Geology*, 39(3-4), 360-371.

Bleil, D. (1953), Induced polarization : a method of geophysical prospecting, *Geophysics*, 18(3), 636-661.

Blessing, M., and A. Saada (2013), *Guide méthodologique pour l'utilisation des approches isotopiques dans le cadre de la démonstration d'atténuation naturelle*, BRGM.

Bloom, Y., R. Aravena, D. Hunkeler, E. Edwards, and S. K. Frape (2000), Carbon Isotope Fractionation during Microbial Dechlorination of Trichloroethene, cis-1,2-Dichloroethene, and Vinyl Chloride: Implications for Assessment of Natural Attenuation, *Environmental Science & Technology*, 34(13), 2768-2772.

Boutton, T. W. (1991), Stable carbon isotope ratios of natural materials: II. Atmospheric, terrestrial, marine, and freshwater environments, *Carbon isotope techniques*, 1, 173.

Bugna, G. C., J. P. Chanton, C. A. Kelley, T. B. Stauffer, W. G. MacIntyre, and E. L. Libelo (2004), A field test of $\delta^{13}\text{C}$ as a tracer of aerobic hydrocarbon degradation, *Organic Geochemistry*, 35(2), 123-135.

Bussian, A. (1983), Electrical conductance in a porous medium, *Geophysics*, 48(9), 1258-1268.

C

Cao, B., K. Nagarajan, and K.-C. Loh (2009), Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 207-228.

Carey, G. R., E. A. McBean, and S. Feenstra (2014), DNAPL Source Depletion: 1. Predicting Rates and Timeframes, *Remediation Journal*, 24(3), 21-47.

Carlsson, S. (2012), *Surface Characterization of Gram-Negative Bacteria and their Vesicles: Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Dynamic Light Scattering*.

Carpenter, P., S. Calkin, and R. Kaufmann (1991), Assessing a fractured landfill cover using electrical resistivity and seismic refraction techniques, *Geophysics*, 56(11), 1896-1904.

Cassiani, G., A. Kemna, A. Villa, and E. Zimmermann (2009), Spectral induced polarization for the characterization of free-phase hydrocarbon contamination of sediments with low clay content, *Near Surface Geophysics*, 7(5-6), 547-562.

Cassiani, G., et al. (2014), Noninvasive characterization of the Trecate (Italy) crude-oil contaminated site: links between contamination and geophysical signals, *Environmental Science and Pollution Research*, 1-18.

Chaîneau, C.-H., J.-L. Morel, and J. Oudot (1995), Microbial Degradation in Soil Microcosms of Fuel Oil Hydrocarbons from Drilling Cuttings, *Environmental Science & Technology*, 29(6), 1615-1621.

Chambers, J. E., P. B. Wilkinson, G. P. Wealthall, M. H. Loke, R. Dearden, R. Wilson, D. Allen, and R. D. Ogilvy (2010), Hydrogeophysical imaging of deposit heterogeneity and groundwater chemistry changes during DNAPL source zone bioremediation, *Journal of Contaminant Hydrology*, 118(1-2), 43-61.

Che-Alota, V., E. Atekwana, W. Sauck, and D. Werkema (2009), Temporal geophysical signatures from contaminant-mass remediation, *Geophysics*, 74(4), B113-B123.

Clavier, C., G. Coates, and J. Dumanoir (1977), Theoretical and Experimental Bases for the Dual-Water Model for Interpretation of Shaly Sands. SPE 52nd Annual Fall Technical Conference.

Cole, K. S., and R. H. Cole (1941), Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics, *The Journal of Chemical Physics*, 9(4), 341-351.

Comparon, L. (2005), Etude expérimentale des propriétés électriques et diélectriques des matériaux argileux consolidés, Institut de physique du globe de Paris-IPGP.

Costerton, J. W., and K.-J. Cheng (1975), The role of the bacterial cell envelope in antibiotic resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1(4), 363-377.

Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott (1995), Microbial Biofilms, *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711-745.

Craig, H. (1957), Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12(1-2), 133-149.

D

Dahlin, T. (2000), Short note on electrode charge-up effects in DC resistivity data acquisition using multi-electrode arrays, *Geophysical Prospecting*, 48(1), 181-187.

Dahlin, T., V. Leroux, and J. Nissen (2002), Measuring techniques in induced polarization imaging, *Journal of Applied Geophysics*, 50(3), 279-298.

Davis, C. A., E. Atekwana, E. Atekwana, L. D. Slater, S. Rossbach, and M. R. Mormile (2006), Microbial growth and biofilm formation in geologic media is detected with complex conductivity measurements, *Geophysical Research Letters*, 33(18), L18403.

de Lima, O., and M. Sharma (1990), A grain conductivity approach to shaly sandstones, *Geophysics*, 55(10), 1347-1356.

Debye, P. (1929), *Polar molecules Rep.*, Dover.

Dempster, H. S., B. Sherwood Lollar, and S. Feenstra (1997), Tracing Organic Contaminants in Groundwater: A New Methodology Using Compound-Specific Isotopic Analysis, *Environmental Science & Technology*, 31(11), 3193-3197.

DeRyck, S., J. Redman, and A. Annan (1993), Geophysical monitoring of a controlled kerosene spill, paper presented at Proceedings of the Symposium on the Application of Geophysics to Engineering and Environmental Problems (SAGEEP'93), San Diego, CA.

Dhahri, S. (2013), Analyse topographique, mécanique et électrochimique à l'échelle sub-micrométrique de processus pilotés par les bactéries, Université de Montpellier II, Montpellier.

Dubey, G. P., and S. Ben-Yehuda (2011), Intercellular Nanotubes Mediate Bacterial Communication, *Cell*, 144(4), 590-600.

Dunsmore, B. C., C. J. Bass, and H. M. Lappin-Scott (2004), A novel approach to investigate biofilm accumulation and bacterial transport in porous matrices, *Environmental Microbiology*, 6(2), 183-187.

E

Elsner, M. (2010), Stable isotope fractionation to investigate natural transformation mechanisms of organic contaminants: principles, prospects and limitations, *Journal of Environmental Monitoring*, 12, 2005-2031.

Elsner, M., M. Jochmann, T. Hofstetter, D. Hunkeler, A. Bernstein, T. Schmidt, and A. Schimmelmann (2012), Current challenges in compound-specific stable isotope analysis of environmental organic contaminants, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(9), 2471-2491.

Etienne, A. (2014), Amélioration du suivi de la contamination des sols et des eaux souterraines dans le cadre de la gestion des risques environnementaux, Université de Mons.

Evans, L. V. (2003), *Biofilms: recent advances in their study and control*, CRC press.

F

Fiandaca, G., E. Auken, A. Christiansen, and A. Gazoty (2012), Time-domain-induced polarization: Full-decay forward modeling and 1D laterally constrained inversion of Cole-Cole parameters, *Geophysics*, 77(3), E213-E225.

Fiandaca, G., J. Ramm, A. Binley, A. Gazoty, A. V. Christiansen, and E. Auken (2013), Resolving spectral information from time domain induced polarization data through 2-D inversion, *Geophysical Journal International*, 192(2), 631-646.

Fischer, A., I. Herklotz, S. Herrmann, M. Thullner, S. A. B. Weelink, A. J. M. Stams, M. Schlömann, H.-H. Richnow, and C. Vogt (2008), Combined Carbon and Hydrogen Isotope Fractionation Investigations for Elucidating Benzene Biodegradation Pathways, *Environmental Science & Technology*, 42(12), 4356-4363.

Flemming, H.-C., T. R. Neu, and D. J. Wozniak (2007), The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells", *Journal of bacteriology*, 189(22), 7945-7947.

Flores Orozco, A., K. H. Williams, P. E. Long, S. S. Hubbard, and A. Kemna (2011), Using complex resistivity imaging to infer biogeochemical processes associated with bioremediation of an uranium-contaminated aquifer, *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 116(G3), G03001.

Flores Orozco, A., A. Kemna, C. Oberdörster, L. Zschornack, C. Leven, P. Dietrich, and H. Weiss (2012), Delineation of subsurface hydrocarbon contamination at a former hydrogenation plant using spectral induced polarization imaging, *Journal of Contaminant Hydrology*, 136-137(0), 131-144.

Forté, S., and L. Bentley (2013), Mapping Degrading Hydrocarbon Plumes with Self Potentials: Investigation on Causative Mechanisms using Field and Modeling Data, *Journal of Environmental and Engineering Geophysics*, 18(1), 27-42.

G

Gajdoš, V., and V. Král (1995), Influence of hydrocarbon pollution to soil conductivity, paper presented at 8th EEGS Symposium on the Application of Geophysics to Engineering and Environmental Problems.

Garambois, S., P. Sénéchal, and H. Perroud (2002), On the use of combined geophysical methods to assess water content and water conductivity of near-surface formations, *Journal of Hydrology*, 259(1-4), 32-48.

Garnier, F. (2012), Contribution à l'évaluation biogéochimique des impacts liés à l'exploitation géothermique des aquifères superficiels: Expérimentations et simulations à l'échelle d'un pilote et d'installations réelles, Université d'Orléans.

Gazoty, A., G. Fiandaca, J. Pedersen, E. Auken, A. Christiansen, and J. Pedersen (2012), Application of time domain induced polarization to the mapping of lithotypes in a landfill site, *Hydrology and Earth System Sciences*, 16(6), 1793-1804.

Ghorbani, A. (2007), Contribution au développement de la résistivité complexe et à ses applications en environnement, Thèse de doctorat de l'Université de Paris VI.

Ghorbani, A., C. Camerlynck, N. Florsch, P. Cosenza, and A. Revil (2007), Bayesian inference of the Cole–Cole parameters from time- and frequency-domain induced polarization, *Geophysical Prospecting*, 55(4), 589-605.

Ghosh, P., and W. A. Brand (2003), Stable isotope ratio mass spectrometry in global climate change research, *International Journal of Mass Spectrometry*, 228(1), 1-33.

Grellier, S., R. Guérin, H. Robain, A. Bobachev, F. Vermeersch, and A. Tabbagh (2008), Monitoring of Leachate Recirculation in a Bioreactor Landfill by 2-D Electrical Resistivity Imaging, *Journal of Environmental and Engineering Geophysics*, 13(4), 351-359.

Grellier, S., H. Robain, G. Bellier and N. Skhiri (2006), Influence of temperature on the electrical conductivity of leachate from municipal solid waste, *Journal of Hazardous Materials*, 137(1), 612-617.

Griebler, C., M. Safinowski, A. Vieth, H. H. Richnow, and R. U. Meckenstock (2004), Combined Application of Stable Carbon Isotope Analysis and Specific Metabolites Determination for Assessing In Situ Degradation of Aromatic Hydrocarbons in a Tar Oil-Contaminated Aquifer, *Environmental Science & Technology*, 38(2), 617-631.

Guéguen, Y., and V. Palciauskas (1992), *Introduction à la physique des roches*, Hermann.

Guichet, X., L. Jouniaux, and J.-P. Pozzi (2003), Streaming potential of a sand column in partial saturation conditions, *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 108(B3), 2141.

Guimbaud, C., et al. (2011), A portable infrared laser spectrometer for flux measurements of trace gases at the geosphere–atmosphere interface, *Measurement Science and Technology*, 22(7), 075601.

Gyurova, A., V. Doltchinkova, R. Georgieva, S. Danova, and S. Stoylov (2013), Low frequency electric polarizability and zeta-potential of *Escherichia coli* HB101 (K-12) cells during inactivation with ethanol, *cent.eur.j.chem.*, 11(5), 801-810.

H

Hall, J. A., R. M. Kalin, M. J. Larkin, C. C. R. Allen, and D. B. Harper (1999), Variation in stable carbon isotope fractionation during aerobic degradation of phenol and benzoate by contaminant degrading bacteria, *Organic Geochemistry*, 30(8, Part 1), 801-811.

Heinesch, B. (2007), Mesure et analyse du transport advectif de CO₂ dans une forêt sur versant.

Hendriks, D. M. D., J. van Huissteden, and A. J. Dolman (2010), Multi-technique assessment of spatial and temporal variability of methane fluxes in a peat meadow, *Agricultural and Forest Meteorology*, 150(6), 757-774.

Hill, E., D. Ntarlagiannis, E. Atekwana, and Y. Gorby (2007), The role of bacterial nanowires on naturally-occurring electrical fields, paper presented at AGU Spring Meeting Abstracts.

Hubé, D., L. Gourcy, J.-C. Gourry, and D. Guyonnet (2010), Investigations of natural attenuation in groundwater near a landfill and implications for landfill post-closure, *Waste Management & Research*.

Hunkeler, D., R. Aravena, and B. J. Butler (1999), Monitoring Microbial Dechlorination of Tetrachloroethene (PCE) in Groundwater Using Compound-Specific Stable Carbon Isotope Ratios: Microcosm and Field Studies, *Environmental Science & Technology*, 33(16), 2733-2738.

Hunkeler, D., N. Andersen, R. Aravena, S. M. Bernasconi, and B. J. Butler (2001), Hydrogen and Carbon Isotope Fractionation during Aerobic Biodegradation of Benzene, *Environmental Science & Technology*, 35(17), 3462-3467.

I

IAEA (2008), *Isotopes de l'environnement dans le cycle hydrologique Rep.*, Vienne.

ITRC (2006), *The Use of Direct Push Well Technology for Long-term Environmental Monitoring in Groundwater Investigations Rep.*, Interstate Technology & Regulatory Council.

J

Jackson, A., and J. Pardue (1999), Quantifying the mineralization of contaminants using stable carbon isotope ratios, *Organic Geochemistry*, 30(8, Part 1), 787-792.

Javid, B., and K. M. Derbyshire (2011), Frontiers: Nanotubes: Shaking Hands, Talking, or Sharing?, *Frontiers in Cellular And Infection Microbiology*, 2.

K

Kaufmann, K., M. Christophersen, A. Buttler, H. Harms, and P. Höhener (2004), Microbial community response to petroleum hydrocarbon contamination in the unsaturated zone at the experimental field site Værløse, Denmark, *FEMS Microbiology Ecology*, 48(3), 387-399.

Keevil, N., and S. Ward (1962), Electrolyte Activity: its effects on Induced Polarization, *Geophysics*, 27(5), 677-690.

Kemna, A., A. Binley, and L. Slater (2004), Crosshole IP imaging for engineering and environmental applications, *Geophysics*, 69(1), 97-107.

Kemna, A., et al. (2012), An overview of the spectral induced polarization method for near-surface applications, *Near Surface Geophysics*, 10, 453-468.

Kessouri, P. (2012). Mesures simultanées aux fréquences moyennes et cartographie de la permittivité diélectrique et de la conductivité électrique du sol. Université Pierre et Marie Curie (Paris 6).

L

Lago, A., V. Elis, W. Borges, and G. Penner (2009), Geophysical investigation using resistivity and GPR methods: a case study of a lubricant oil waste disposal area in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, *Environmental Geology*, 58(2), 407-417.

Lambert, P. A. (2002), Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 92, 46S-54S.

Lane, J. W., F. D. Day-Lewis, and C. C. Casey (2006), Geophysical Monitoring of a Field-Scale Biostimulation Pilot Project, *Ground Water*, 44(3), 430-443.

Leahy, J. G., and R. R. Colwell (1990), Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiological Reviews*, 54(3), 305-315.

Lebleu, N. (2007), Désinfection des eaux par procédés membranaires: étude des mécanismes de transfert des bactéries, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

Lecomte, P. (Ed.) (1998), Les sites pollués. Traitement des sols et des eaux souterraines Technique & documentation (2e édition).

Leroy, P., and A. Revil (2009), A mechanistic model for the spectral induced polarization of clay materials, *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 114(B10), B10202.

Leroy, P., A. Revil, A. Kemna, P. Cosenza, and A. Ghorbani (2008), Complex conductivity of water-saturated packs of glass beads, *Journal of Colloid and Interface Science*, 321(1), 103-117.

Lesmes, D. P., and F. D. Morgan (2001), Dielectric spectroscopy of sedimentary rocks, *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 106(B7), 13329-13346.

Letenneur, B. (1998), Spectroscopie d'absorption infrarouge par diodes laser avec l'instrument sous ballon spirale développement de méthodes de traitement pour la détermination des concentrations de composés minoritaires de l'atmosphère terrestre. Université d'Orléans.

Li, J., and L. A. McLandsborough (1999), The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle, *International Journal of Food Microbiology*, 53(2-3), 185-193.

Loke, M. H., J. E. Chambers, and R. D. Ogilvy (2006), Inversion of 2D spectral induced polarization imaging data, *Geophysical Prospecting*, 54(3), 287-301.

Lugtenberg, B., and L. Van Alphen (1983), Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 737(1), 51-115.

M

Madden, T., and T. Cantwell (1967), Part D. Induced Polarization, a review, *Mining geophysics*, 2, 373-400.

Maineult, A., Y. Bernabé, and P. Ackerer (2004), Electrical Response of Flow, Diffusion, and Advection in a Laboratory Sand Box, *Vadose Zone J.*, 3(4), 1180-1192.

Majone, M., R. Verdini, F. Aulenta, S. Rossetti, V. Tandoi, N. Kalogerakis, S. Agathos, S. Puig, G. Zanaroli, and F. Fava (2014), In situ groundwater and sediment bioremediation: barriers and perspectives at European contaminated sites, *New Biotechnology*(available online).

Margo, C. (2009), *Microspectrometrie d'impédance basses fréquences: application la mesure de milieux biologiques*, Nancy 1.

Marshall, D., and T. Madden (1959), Induced polarization, a study of its causes, *Geophysics*, 24(4), 790-816.

Meckenstock, R. U., B. Morasch, C. Griebler, and H. H. Richnow (2004), Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers, *Journal of Contaminant Hydrology*, 75(3-4), 215-255.

Meckenstock, R. U., B. Morasch, R. Warthmann, B. Schink, E. Annweiler, W. Michaelis, and H. H. Richnow (1999), $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation, *Environmental Microbiology*, 1(5), 409-414.

Mewafy, F. M., D. D. Werkema Jr, E. A. Atekwana, L. D. Slater, G. Abdel Aal, A. Revil, and D. Ntarlagiannis (2013), Evidence that bio-metallic mineral precipitation enhances the complex conductivity response at a hydrocarbon contaminated site, *Journal of Applied Geophysics*, 98(0), 113-123.

Ministère de l'Ecologie, Prévention des risque et lutte contre les pollutions - Inspection des installations classées, edited.

Monds, R. D., and G. A. O'Toole (2009), The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review, *TRENDS in Microbiology*, 17(2), 73-87.

Monier-Williams, M. (1995), Properties of light non-aqueous phase liquids and detection using commonly applied shallow sensing geophysical techniques, paper presented at Proceedings of the Symposium on the Application of Geophysics to Engineering and Environmental Problems (SAGEEP'95), Orlando, FL.

Mook, W., and F. Tan (1991), Stable carbon isotopes in rivers and estuaries, *Biogeochemistry of major world rivers*, 42, 245-264.

Morasch, B., H. H. Richnow, B. Schink, A. Vieth, and R. U. Meckenstock (2002), Carbon and Hydrogen Stable Isotope Fractionation during Aerobic Bacterial Degradation of Aromatic Hydrocarbons, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5191-5194.

Morasch, B., D. Hunkeler, J. Zopfi, B. Temime, and P. Höhener (2011), Intrinsic biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in an alluvial aquifer – Potentials and limits of signature metabolite analysis and two stable isotope-based techniques, *Water research*, 45(15), 4459-4469.

N

Naudet, V., and A. Revil (2005), A sandbox experiment to investigate bacteria-mediated redox processes on self-potential signals, *Geophysical Research Letters*, 32(11), L11405.

Nealson, K. H. (2010), Geomicrobiology: Sediment reactions defy dogma, *Nature*, 463(7284), 1033-1034.

Nielsen, L. P., N. Risgaard-Petersen, H. Fossing, P. B. Christensen, and M. Sayama (2010), Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment, *Nature*, 463(7284), 1071-1074.

Nordsiek, S., and A. Weller (2008), A new approach to fitting induced-polarization spectra, *Geophysics*, 73(6), F235-F245.

Ntarlagiannis, D., and A. Ferguson (2009), SIP response of artificial biofilms, *Geophysics*, 74(1), A1-A5.

Ntarlagiannis, D., K. H. Williams, L. Slater, and S. Hubbard (2005), Low-frequency electrical response to microbial induced sulfide precipitation, *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 110(G2), G02009.

Ntarlagiannis, D., E. A. Atekwana, E. A. Hill, and Y. Gorby (2007), Microbial nanowires: Is the subsurface “hardwired”?, *Geophysical Research Letters*, 34(17), L17305.

Numata, M., N. Nakamura, H. Koshikawa, and Y. Terashima (2002), Chlorine Isotope Fractionation during Reductive Dechlorination of Chlorinated Ethenes by Anaerobic Bacteria, *Environmental Science & Technology*, 36(20), 4389-4394.

O

Ogilvy, R., P. Meldrum, O. Kuras, P. Wilkinson, J. Chambers, M. Sen, A. Pulido-Bosch, J. Gisbert, S. Jorreto, and I. Frances (2009), Automated monitoring of coastal aquifers with electrical resistivity tomography, *Near Surface Geophysics*, 7(5-6), 367-375.

Okay, G. (2011), Caractérisation des hétérogénéités texturales et hydriques des géomatériaux argileux par la méthode de Polarisation Provoquée: Application à l'EDZ de la station expérimentale de Tournemire, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6).

Olhoeft, G. (1985), Low-frequency electrical properties, *Geophysics*, 50(12), 2492-2503.

Olhoeft, G. R. (1986), Direct detection of hydrocarbon and organic chemicals with ground penetrating radar and complex resistivity, *Proc. NWWA/API Conf. Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Ground Water-Prevention, Detection and Restoration*, 1986.

P

Pataki, D. E., J. R. Ehleringer, L. B. Flanagan, D. Yakir, D. R. Bowling, C. J. Still, N. Buchmann, J. O. Kaplan, and J. A. Berry (2003), The application and interpretation of Keeling plots in terrestrial carbon cycle research, *Global Biogeochemical Cycles*, 17(1), 1022.

Pelton, W., W. Sill, and B. Smith (1983), Interpretation of complex resistivity and dielectric data, Part I, *Geophysical transactions*, 29(4), 297-330.

Pelton, W., S. Ward, P. Hallof, W. Sill, and P. Nelson (1978), Mineral Discrimination and Removal of Inductive Coupling with Multifrequency IP, *Geophysics*, 43(3), 588-609.

Personna, Y. R., L. Slater, D. Ntarlagiannis, D. Werkema, and Z. Szabo (2013), Complex resistivity signatures of ethanol biodegradation in porous media, *Journal of Contaminant Hydrology*, 153(0), 37-50.

Ploux, L., S. Beckendorff, M. Nardin, and S. Neunlist (2007), Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 57(2), 174-181.

R

Reguera, G., K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, and D. R. Lovley (2005), Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature*, 435(7045), 1098-1101.

Revil, A., and N. Florsch (2010), Determination of permeability from spectral induced polarization in granular media, *Geophysical Journal International*, 181(3), 1480-1498.

Revil, A., M. Schmutz, and M. Batzle (2011), Influence of oil wettability upon spectral induced polarization of oil-bearing sands, *Geophysics*, 76(5), A31-A36.

Revil, A., L. M. Cathles, S. Losh, and J. A. Nunn (1998), Electrical conductivity in shaly sands with geophysical applications, *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 103(B10), 23925-23936.

Revil, A., M. Karaoulis, T. Johnson, and A. Kemna (2012), Review: Some low-frequency electrical methods for subsurface characterization and monitoring in hydrogeology, *Hydrogeol J*, 20(4), 617-658.

Revil, A., E. Atekwana, C. Zhang, A. Jardani, and S. Smith (2012), A new model for the spectral induced polarization signature of bacterial growth in porous media, *Water Resources Research*, 48(9).

Revil, A., J. D. Eppehimer, M. Skold, M. Karaoulis, L. Godinez, and M. Prasad (2013), Low-frequency complex conductivity of sandy and clayey materials, *Journal of Colloid and Interface Science*, 398(0), 193-209.

Reynolds, J. M. (1997), *An introduction to applied and environmental geophysics*, 796 pp., Wiley, New York.

Richnow, H. H., A. Vieth, M. Kastner, M. Gehre, and R. U. Meckenstock (2002), Isotope Fractionation of Toluene: A Perspective to Characterise Microbial in situ Degradation, *The Scientific World Journal*, 2, 1227-1234.

Robert, C. (2007), Simple, stable, and compact multiple-reflection optical cell for very long optical paths, *Appl. Opt.*, 46(22), 5408-5418.

Rothman, L. S., et al. (2005), The HITRAN 2004 molecular spectroscopic database, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 96(2), 139-204.

Rothman, L. S., et al. (2009), The HITRAN 2008 molecular spectroscopic database, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 110(9-10), 533-572.

Ruiz, V. C. (2009), *Transport de colloïdes en milieu poreux : étude expérimentale*, Université de Bordeaux 1.

Ruffet, C. (1993), *La conductivité électrique complexe dans quelques roches crustales*, Université Louis Pasteur (Strasbourg 1).

S

Sabirova, J. S., M. Ferrer, D. Regenhardt, K. N. Timmis, and P. N. Golyshin (2006), Proteomic Insights into Metabolic Adaptations in *Alcanivorax borkumensis* Induced by Alkane Utilization, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 188(11), 3763-3773.

Sauck, W. A. (2000), A model for the resistivity structure of LNAPL plumes and their environs in sandy sediments, *Journal of Applied Geophysics*, 44(2-3), 151-165.

Sauck, W. A., E. A. Atekwana, and M. S. Nash (1998), High conductivities associated with an LNAPL plume imaged by integrated geophysical techniques, *Journal of Environmental and Engineering Geophysics*, 2, 203-212.

Schleifer, N., A. Weller, S. Schneider, and A. Junge (2002), Investigation of a Bronze Age plankway by spectral induced polarization, *Archaeological Prospection*, 9(4), 243-253.

Schmutz, M., A. Blondel, and A. Revil (2012), Saturation dependence of the quadrature conductivity of oil-bearing sands, *Geophysical Research Letters*, 39(3), L03402.

Schmutz, M., A. Revil, P. Vaudelet, M. Batzle, P. F. Viñao, and D. D. Werkema (2010), Influence of oil saturation upon spectral induced polarization of oil-bearing sands, *Geophysical Journal International*, 183(1), 211-224.

Schneider, G. W., and J. P. Greenhouse (1992), Geophysical detection of perchloroethylene in a sandy aquifer using resistivity and nuclear logging techniques, paper presented at Proceedings of the Symposium on the Application of Geophysics to Engineering and Environmental Problems, The Society.

Schwartz, N., T. Shalem, and A. Furman (2014), The effect of organic acid on the spectral-induced polarization response of soil, *Geophysical Journal International*.

Schweitzer, P. A. (2004), *Corrosion Resistance Tables: ISO-POT*, Crc Press.

Seigel, H., M. Nabighian, D. Parasnis, and K. Vozoff (2007), The early history of the induced polarization method, *The Leading Edge*, 26(3), 312-321.

Sherwood Lollar, B., G. F. Slater, J. Ahad, B. Sleep, J. Spivack, M. Brennan, and P. MacKenzie (1999), Contrasting carbon isotope fractionation during biodegradation of trichloroethylene and toluene: Implications for intrinsic bioremediation, *Organic Geochemistry*, 30(8, Part 1), 813-820.

Slater, D. L., D. Ntarlagiannis, Y. R. Personna, and S. S. Hubbard (2007), Pore-scale spectral induced polarization (SIP) signatures associated with FeS biomineral transformations, Lawrence Berkeley National Laboratory.

Slater, L., and A. Reeve (2002), Investigating peatland stratigraphy and hydrogeology using integrated electrical geophysics, *Geophysics*, 67(2), 365-378.

Slater, L., and D. Lesmes (2002), IP interpretation in environmental investigations, *Geophysics*, 67(1), 77-88.

Slater, L., J. Choi, and Y. Wu (2005), Electrical properties of iron-sand columns: Implications for induced polarization investigation and performance monitoring of iron-wall barriers, *Geophysics*, 70(4), G87-G94.

Sogade, J., F. Scira-Scappuzzo, Y. Vichabian, W. Shi, W. Rodi, D. Lesmes, and F. Morgan (2006), Induced-polarization detection and mapping of contaminant plumes, *Geophysics*, 71(3), B75-B84.

Solano-Serena, F., R. Marchal, and J. Vandecasteele, P. (2001), Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement : de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants, *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP*, 56(5), 479-498.

Stumm, W., and J. J. Morgan (2012), *Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters*, John Wiley & Sons.

T

Tarasov, A. L., I. A. Borzenkov, E. I. Milekhina, I. S. Mysyakina, and S. S. Belyaev (2004), Utilization of H₂O₂ as the Oxygen Source by Bacteria of the Genera *Pseudomonas* and *Rhodococcus*, *Microbiology*, 73(4), 392-397.

Titov, K., A. Kemna, A. Tarasov, and H. Vereecken (2004), Induced Polarization of Unsaturated Sands Determined through Time Domain Measurements, *Vadose Zone J.*, 3(4), 1160-1168.

Towle, J., R. Anderson, W. Pelton, G. Olhoeft, and D. LaBrecque (1985), Direct detection of hydrocarbon contaminants using the induced polarization method, in *SEG Technical Program Expanded Abstracts*, edited, pp. 145-147.

U

UMVF, U. M. V. F. (2014), *Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie - Structure*, edited, Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène.

UPMC Anatomie fonctionnelle des bactéries, edited, Faculté de médecine Pierre et Marie Curie.

Ustra, A., L. Slater, D. Ntarlagiannis, and V. Elis (2012), Spectral Induced Polarization (SIP) signatures of clayey soils containing toluene, *Near Surface Geophysics*, 10(6), 503-515.

V

Vacquier, V., C. Holmes, P. Kintzinger, and M. Lavergne (1957), Prospecting for ground water by induced polarization, *Geophysics*, 22(3), 660-687.

van der Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama, and A. J. Zehnder (1992), Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds, *Microbiological Reviews*, 56(4), 677-694.

van der Wal, A., W. Norde, A. J. B. Zehnder, and J. Lyklema (1997a), Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 9(1-2), 81-100.

van der Wal, A., M. Minor, W. Norde, A. J. B. Zehnder, and J. Lyklema (1997b), Electrokinetic Potential of Bacterial Cells, *Langmuir*, 13(2), 165-171.

van Voorhis, G., P. Nelson, and T. Drake (1973), Complex resistivity spectra of porphyry copper mineralization, *Geophysics*, 38(1), 49-60.

Vanhala, H. (1997), Mapping oil-contaminated sand and till with the spectral induced polarization (SIP) method, *Geophysical Prospecting*, 45(2), 303-326.

Vanhala, H., and H. Soininen (1995), Laboratory technique for measurement of spectral induced polarization response of soil samples, *Geophysical Prospecting*, 43(5), 655-676.

Vanhala, H., H. Soininen, and I. Kukkonen (1992), Detecting organic chemical contaminants by spectral-induced polarization method in glacial till environment, *Geophysics*, 57(8), 1014-1017.

Vaudelet, P., A. Revil, M. Schmutz, M. Franceschi, and P. Bégassat (2011), Induced polarization signatures of cations exhibiting differential sorption behaviors in saturated sands, *WATER RESOURCES RESEARCH*, 47(2).

Vinegar, H., and M. Waxman (1984), Induced polarization of shaly sands, *Geophysics*, 49(8), 1267-1287.

Vinegar, H. J., and M. H. Waxman (1982), Method and apparatus for determining shaliness and oil saturations in earth formations using induced polarization in the frequency domain, edited, Google Patents.

W

Wait, J. R. (1959), *Overvoltage Research and Geophysical Applications*. Edited by JR Wait, Pergamon press.

Ward, S. H., and W. R. Sill (1982), Resistivity, induced polarization, and self-potential methods in geothermal exploration, DOE/ID/12079-90; ESL-108, Utah Univ., Salt Lake City (USA), 105 pp.

Waxman, H. H., and L. J. M. Smits (1968). Electrical conductivities in oil bearing shaly sands, *SPE Journal*. June 1968, 107-122.

Weller, A., and F. D. Börner (1996), Measurements of spectral induced polarization for environmental purposes, *Environmental Geology*, 27(4), 329-334.

Weller, A., S. Brune, T. Hennig, and A. Kansy (2000), Spectral induced polarisation at a medieval smelting site, paper presented at 6th EAGE/EEGS Meeting.

West, L., C. Hubbard, K. Morris, and S. Shaw (2009), Comparison of non-polarising electrode designs for measuring electrical properties in biogeophysics experiments, paper presented at AGU Fall Meeting Abstracts.

Wilkinson, P. B., P. I. Meldrum, O. Kuras, J. E. Chambers, S. J. Holyoake, and R. D. Ogilvy (2010), High-resolution Electrical Resistivity Tomography monitoring of a tracer test in a confined aquifer, *Journal of Applied Geophysics*, 70(4), 268-276.

Williams, K. H., D. Ntarlagiannis, L. D. Slater, A. Dohnalkova, S. S. Hubbard, and J. F. Banfield (2005), Geophysical Imaging of Stimulated Microbial Biomineralization, *Environmental Science & Technology*, 39(19), 7592-7600.

Williams, K. H., A. Kemna, M. J. Wilkins, J. Druhan, E. Arntzen, A. L. N'Guessan, P. E. Long, S. S. Hubbard, and J. F. Banfield (2009), Geophysical Monitoring of Coupled Microbial and Geochemical Processes During Stimulated Subsurface Bioremediation, *Environmental Science & Technology*, 43(17), 6717-6723.

Wong, J. (1979), An electrochemical model of the induced-polarization phenomenon in disseminated sulfide ores, *Geophysics*, 44(7), 1245-1265.

Wynn, J., and K. Zonge (1975), EM coupling, its intrinsic value, its removal and the cultural coupling problem, *Geophysics*, 40(5), 831-850.

Z

Zhang, C., L. Slater, and C. Prodan (2013), Complex Dielectric Properties of Sulfate-Reducing Bacteria Suspensions, *Geomicrobiology Journal*, 30(6), 490-496.

Zimmermann, E., A. Kemna, J. Berwix, W. Glaas, H. Münch, and J. Huisman (2008), A high-accuracy impedance spectrometer for measuring sediments with low polarizability, *Measurement Science and Technology*, 19(10), 105603.

Zohdy, A., L. Anderson, and L. Muffler (1973), Resistivity, self-potential, and induced polarization surveys of a vapor-dominated geothermal system, *Geophysics*, 38(6), 1130-1144.

Zonge, K. L., and L. J. Hughes (1980), The complex resistivity method Rep., Zonge Engineering & Research Organization, Inc.

Zonge, K. L., W. A. Sauck, and J. S. Sumner (1972), Comparison of time, frequency, and phase measurements in induced polarization, *Geophysical Prospecting*, 20(3), 626-648.

ANNEXES

ANNEXE 1 : CHIMIE DE SURFACE, ÉCHANGE IONIQUE ET DOUBLE COUCHE ÉLECTRIQUE

A. IMPORTANCE DES PROCESSUS DE SURFACE

La chimie de surface est une composante importante de la géochimie car beaucoup de processus chimiques ont lieu au niveau des interfaces électrolyte/minéral :

- Dissolution et précipitation
- Adsorption
- Echange ionique
- Echange isotopique
- Dissolution oxydative et réductive des minéraux (réactions redox)

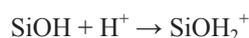
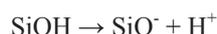
Il y a plusieurs types de surfaces qui réagissent avec l'électrolyte, notamment :

- Colloïdes inorganiques
- Colloïdes organiques
- Microorganismes
- Surfaces minérales

B. NATURE DE LA SURFACE DES OXYDES

Les oxydes regroupent les minéraux dont le groupe anionique est constitué d'oxygène ou d'hydroxyle (groupement -OH). Il comprend, par exemple, les minéraux silicatés.

La surface des oxydes peut être considérée comme une surface de groupes hydroxyles qui participent à des réactions acido-basiques et à des échanges d'ions. Elle présente des « liaisons pendantes » si la surface coupe une liaison chimique dans la structure cristalline du minéral. L'eau réagit avec cette surface, ajoutant des atomes d'hydrogène aux atomes d'oxygène et des hydroxyles aux ions métalliques, créant ainsi une surface d'hydroxydes métalliques et d'oxygènes pontés. Chacun de ces hydroxydes peut accepter ou donner un proton. Par exemple, pour le quartz :



Chacune de ces réaction est caractérisée par un équilibre :

$$K_0 = \frac{[\text{SiO}^-]}{[\text{SiOH}][\text{H}^+]}$$

où K_0 est la constante de dissociation (analogue du K_a utilisé pour les réactions acido-basiques).

C. POINT DE CHARGE NULLE

Le point de charge nulle (ou *Zero Point of Charge*, ZPC en anglais) est le point où la concentrations des sites anioniques et égale à la concentration des sites cationiques :

$$\text{ZPC} = \langle [\text{SiOH}_2^+] = [\text{SiO}^-] \rangle$$

Pour des valeurs de pH située au-dessus du ZPC, la surface a une charge nette négative (ou anionique), et la surface va attirer des cations. Au contraire, pour des pH en-dessous du ZPC, la surface a une charge nette positive et elle va attirer des anions.

Voici quelques exemples de ZPC pour différents minéraux :

Minéral	pH _{ZPC}
Silice (SiO ₂)	2.0
Feldspath	2-2.4
Kaolinite	4.6
Calcite	9.5

D. DOUBLE COUCHE ÉLECTRIQUE

La double couche électrique décrit la nature de la surface chargée des minéraux. Elle reflète la répartition inégale des charges à l'interface fluide/minéral. Il existe trois modèles pour décrire cette couche, de plus en plus complexe :

- Modèle de Helmholtz : il y a une simple interaction électrostatique à la surface : une couche unique d'ions est adsorbée à la surface minérale ;
- Modèle de la couche diffuse de Gouy Chapman : la charge de la surface minérale est compensée par une zone diffuse de contre-ions ;
- Le modèle de la triple couche de Stern (ou modèle de Gouy-Chapman-Stern) : il combine les deux premiers. La charge négative de la surface minérale est compensée par une couche de contre-ions adsorbés à la surface (couche de Stern). Et cette couche de contre-ions est ensuite compensée par une couche diffuse (couche de Gouy). Le potentiel ζ (zêta) est la différence de potentiel entre la couche dense de Stern et le liquide. Il caractérise donc la répartition des charges électriques sur la surface.

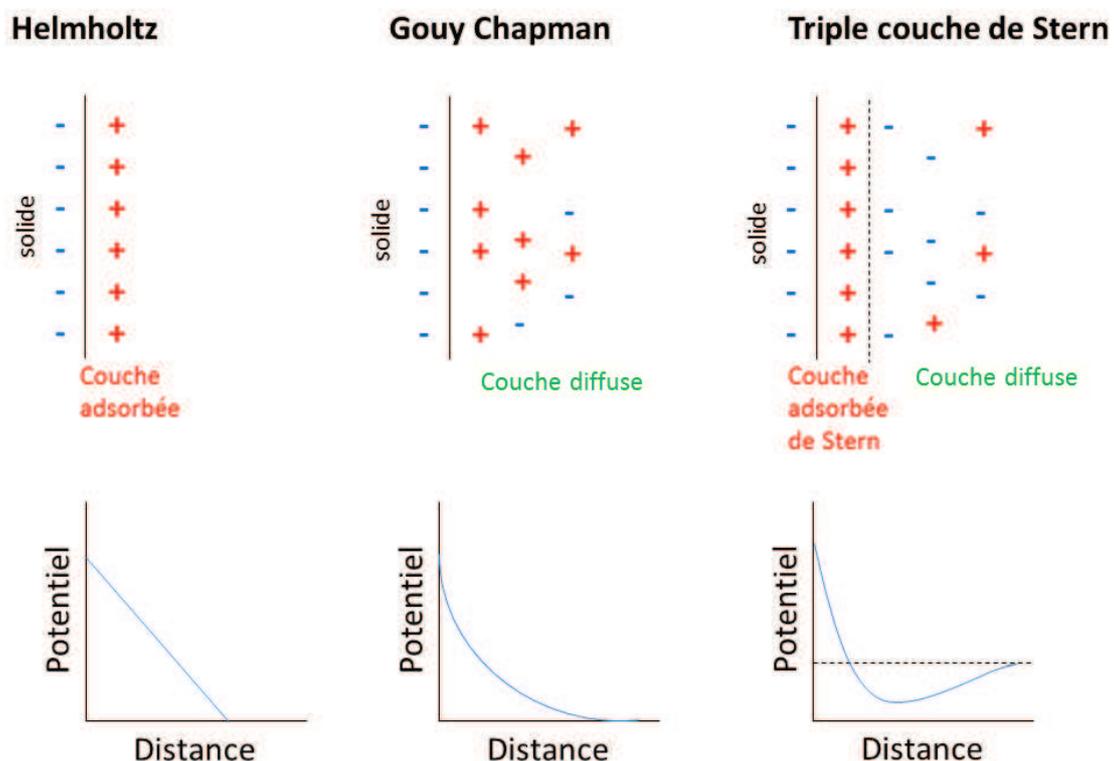


FIGURE 0-1 : TROIS MODÈLE DE LA DOUBLE COUCHE ÉLECTRIQUE. DE GAUCHE À DROITE : MODÈLE DE HELMHOLTZ, MODÈLE DE GOUY CHAPMAN ET MODÈLE DE LA TRIPLE COUCHE DE STERN.

E. ECHANGE D'IONS

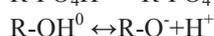
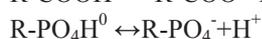
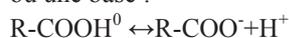
Dans la double couche électrique, un type de contre-ion peut être échangé par un autre type du même signe.

La capacité d'échange cationique (CEC) peut être définie comme l'excès de contre-ions qui peuvent être échangés avec d'autres cations. Les contre-ions de la couche diffuse de Gouy peuvent être échangés très vite. Les ions de la couche de Stern sont adsorbés, donc ils bougent plus lentement.

F. LE CAS DES BACTÉRIES

Les bactéries possèdent une surface très réactive car elles possèdent des groupements fonctionnels actifs sur la paroi cellulaire. A pH neutre, les bactéries ont une charge nette négative. Les composants de la paroi cellulaire : le peptidoglycane (Gram +) et la membrane extérieure (Gram-) sont riches en groupements carboxyle (R-COOH), hydroxyle (R-OH), phosphates (R-PO₄) et amines.

Les groupements fonctionnels présents sur la paroi peuvent gagner ou perdre des protons, tout comme un acide ou une base :



Les bactéries présentent à leur surface des charges négatives dues à la présence à leur surface des molécules COO⁻ provenant notamment des groupes carboxyle à leur surface. Ces charges négatives repoussent bactéries entre elles mais conduisent également à l'accumulation de cations autour des bactéries. Ce nuage de cations devient solidaire de la bactérie. Le potentiel Zêta est la différence entre les charges électriques situées à la surface des bactéries et celles du nuage externe.

Une particule chargée en solution va être entourée d'une couche d'ions du signe opposé, liée à la particule, la couche de Stern [Carlsson, 2012]. De plus, une seconde couche d'ions entourent la particule, appelée couche diffuse. Le potentiel zêta est une propriété physique d'une particule en suspension, et il est créé dans le plan de cisaillement entre la couche de Stern et la couche diffuse. Le potentiel zêta peut indiquer le degré d'interaction entre les particules dans une suspension et ainsi la stabilité de cette suspension. Une valeur de zêta plutôt neutre (-10 à 10 mV) ou un zêta nul (point isoélectrique) indique une suspension instable, c'est-à-dire que les particules vont flocculer. Au contraire, un potentiel très négatif (< -30 mV) ou très positif (> 30 mV) indiquent une suspension stable : les particules vont se repousser entre-elles et rester en solution. Cela permet aussi d'étudier la charge de surface de la particule car le potentiel zêta dépend de la charge de surface. Cependant, la valeur absolue du potentiel zêta sera plus faible que la charge surfacique, à cause des ions de la double couche.

G. POTENTIEL ZÊTA DES BACTÉRIES

Toutes les souches d'*E. coli* testées par Li et McLandsborough (1999) étaient chargées négativement dans un tampon pH à 7.4. Les potentiels zêta mesurés allaient de -24.9 à -233.9 mV.

ANNEXE 2 : MODÉLISATION DE LA RÉPONSE PP D'UN MILIEU GRANULAIRE

Le but de la modélisation est de calculer une réponse théorique la plus représentative possible de la réponse expérimentale. Les différents paramètres utilisés pour la modélisation caractérisent donc le milieu étudié (distribution de la taille des grains et des pores, conductivité hydraulique, polarisation du milieu...). Cependant, il faut savoir que plusieurs modèles différents peuvent correspondre aux mêmes données expérimentales.

On distingue les modèles mécanistiques, qui permettent de caractériser un phénomène physique connu à travers de mesures par une formulation théorique, des modèles phénoménologiques qui donnent une description quantitative des mesures, basée sur des observations macroscopiques

A. MODÉLISATION PHÉNOMÉNOLOGIQUE DE LA RÉPONSE PP D'UN MILIEU GRANULAIRE : LE MODÈLE DE TYPE COLE-COLE GÉNÉRALISÉ

Comparon (2005) a réalisé un inventaire des différents modèles de type Cole-Cole existant. Ce paragraphe est très inspiré de son travail.

Le modèle de type Cole-Cole est un modèle empirique. On considère ici que la réponse PP du milieu poreux correspond à celle d'un circuit électrique. La formule généralisée s'écrit de la manière suivante :

$$\rho^*(\omega) = \rho_0 \left[1 - m \left(1 - \frac{1}{(1 + (i\omega\tau)^c)^a} \right) \right] \quad \text{ÉQUATION 0-1}$$

L'expression du modèle de Cole-Cole généralisé englobe plusieurs autres modèles plus simples [Okay, 2011 ; Nordsiek and Weller, 2008].

Lorsque les paramètres a et c valent 1 dans l'ÉQUATION 0-1, on retrouve le modèle de Debye [Debye, 1929]. C'est le modèle mathématique le plus simple pour décrire la relaxation d'un milieu [Revil et al., 2012]. Ce modèle est caractérisé par un seul temps de relaxation τ [s], la résistivité électrique en courant continu ρ_0 [$\Omega.m$] et la chargeabilité m (sans dimension).

La constante de temps τ donne une information sur la taille des grains et des pores du milieu étudié [Nordsiek and Weller, 2008]. Il est aussi lié à la conductivité hydraulique [Slater and Lesmes, 2002]. Les valeurs de τ varient entre 0.01 s à 1000 s [Loke et al., 2006] et des valeurs élevées de τ indiquent une forte polarisation du milieu.

La chargeabilité m décrit l'amplitude de l'effet PP. Il varie entre 0 et 0.1 pour un milieu non métallique [Ghorbani et al., 2007].

Dans un milieu réel, la polarisation est en fait la somme de plusieurs processus de relaxations caractérisés par différents temps de relaxation (associés à différentes tailles de grain, à la rugosité de la surface des grains, à des dimensions caractéristiques de l'espace poral...). Par conséquent, le modèle de Cole-Cole traditionnel a été développé en ajoutant l'exposant c (sans dimension) ($a=1$) [Cole and Cole, 1941]. L'augmentation de c joue sur la concavité du spectre de phase et sur la pente du spectre d'amplitude [Ghorbani et al., 2007]. Il est lié à la rugosité des grains et à la tortuosité du milieu poreux [Lesmes and Morgan, 2001].

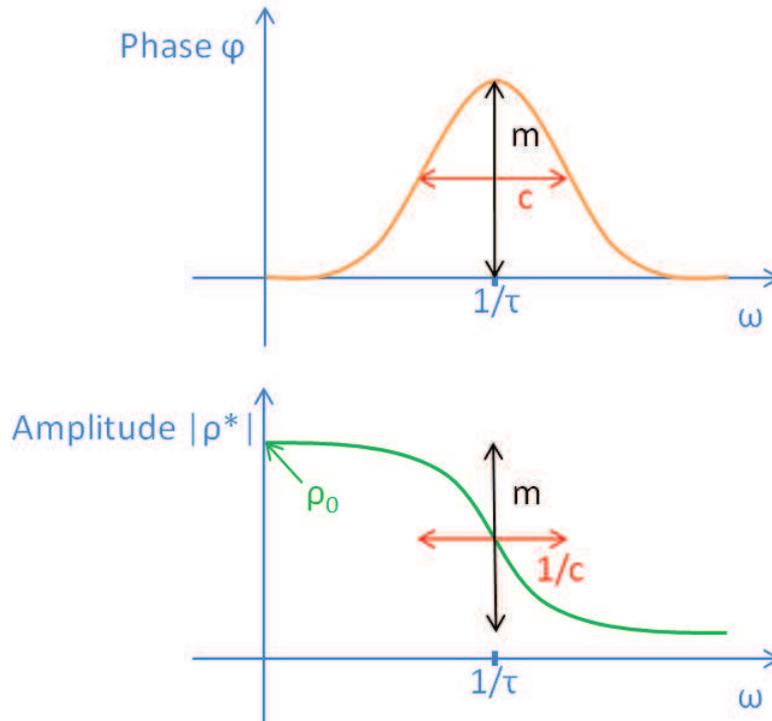


FIGURE 0-1 : INFLUENCE DES PARAMÈTRES COLE-COLE SUR LES SPECTRES DE LA PHASE (EN HAUT) ET DE L'AMPLITUDE (EN BAS) DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE.

Le paramètre a (sans dimension) est l'exposant du modèle Cole-Cole généralisé (ou constante de relaxation) [Okay, 2011; Pelton *et al.*, 1983].

Les modèles Cole-Cole sont déterminés par inversion, dans les domaines temporels et fréquentiels, à la fois par méthode des moindres carrés et par l'approche bayésienne. Ces méthodes ont été adaptées à des applications 1D et 2D [Fiandaca *et al.*, 2013, 2012].

B. MODÈLES MÉCANISTIQUES DE LA RÉPONSE PP D'UN MÉLANGE SABLE ET ARGILES : DE WAXMAN ET SMITS (1968) À RÉVIL *ET AL.* (2013)

Le modèle de Waxman et Smits (1968) concerne la conductivité réelle de sables argileux. Il est fondé sur trois hypothèses :

- La conductivité totale est la somme de deux contributions : une conductivité associée au fluide σ_{el} et une conductivité associée aux argiles σ_s ayant une surface conductrice. La conductivité totale s'écrit alors :

$$\sigma = X\sigma_s + Y\sigma_{el} \quad \text{ÉQUATION 0-2}$$

- Le courant dû aux argiles et celui créé par les ions de l'électrolyte suivent la même chemin :

$$X = Y = \frac{1}{F} = \phi^m \quad \text{ÉQUATION 0-3}$$

On retrouve ici la loi d'Archie, avec F le facteur de formation, ϕ la porosité et m le facteur de cimentation.

- σ_s dépend de σ_{el} . σ_s est due à l'échange de cations à la surface des argiles, elle est donc proportionnelle à la concentration en cations :

$$\sigma_s = B Q_v \quad \text{ÉQUATION 0-4}$$

où B est un paramètre empirique qui représente la mobilité des cations échangeables et Q_v est la capacité d'échange cationique.

Le modèle de Waxman et Smits ne s'applique qu'à la partie réelle de la conductivité. D'autres modèles tiennent compte de la variation fréquentielle. C'est le cas du modèle d'eau double [Clavier *et al.*, 1977], qui prend en compte deux types d'eaux : une eau libre dans les pores et une eau liée aux argiles ; du modèle de Bussian (1983) puis de De Lima et Sharma (1990) qui prennent en compte la distribution et la nature des argiles dans la roche. Ensuite, le modèle de Revil *et al.* (1998) explicite séparément le comportement des cations de celui des anions. Ces modèles ne seront pas davantage développés ici. Une description complète est proposée dans la thèse de Comparon (2005).

Leroy et Revil (2009) et Revil et Florsh (2010) introduisent le nombre complexe de Dukhin Du^* :

$$Du^* = \frac{\sigma_s^*}{\sigma_{el}} \quad \text{ÉQUATION 0-5}$$

avec σ_s^* la conductivité de la phase solide et σ_{el} la conductivité de l'électrolyte.

La polarisation de membrane intervient lorsque le nombre de Dukhin est élevé, c'est-à-dire en présence d'argiles car la conductivité de la phase solide σ_s est grande ; ou lorsque la salinité de l'électrolyte σ_{el} est faible [Revil et Florsh, 2010]. La DCE étant principalement constituée de contre-ions, la mobilité des ions y est différente de celle de l'électrolyte : le transport des contre-ions est facilité, tandis que celui des co-ions est limité. Des accumulations locales de charges se produisent et augmentent la concentration ionique.

La polarisation de la couche de Stern peut être décrite par l'équation suivante [Revil *et al.*, 2013] :

$$\sigma^* = \sigma_{el} \left(\frac{1}{F} + Du^* \right) \quad \text{ÉQUATION 0-6}$$

avec σ^* la conductivité complexe du milieu granulaire, σ_{el} la conductivité de l'électrolyte et F le facteur de formation.

Le modèle de Leroy est Revil (2009) résulte de la combinaison de la modélisation des propriétés de surface de minéraux argileux (kaolinite, illite, et smectite), de la modélisation de la polarisation de la couche de Stern et de la contribution de la polarisation de Maxwell-Wagner.

La conductivité de surface de la formation argileuse σ_{arg}^* est donnée par Leroy et Revil (2009) :

$$\sigma_{arg}^* = \frac{1}{F_{arg}} [\sigma_{el}^* + (F_{arg} - 1)\sigma_s^*] \quad \text{ÉQUATION 0-7}$$

avec F_{arg} le facteur de formation de la formation argileuse, σ_{el}^* la conductivité de l'électrolyte et σ_s^* la conductivité de surface du solide.

Et la conductivité complexe totale du milieu peut être exprimée par Leroy et Revil (2009) :

$$\sigma^* = \sigma_{arg}^* \varphi_{arg}^2 \left[\varphi_{arg}^{-2} D_u^* + \frac{1}{2} (1 - Du^*) \cdot (1 - Du^* + \sqrt{(1 - Du^*)^2 + 4\varphi_{arg}^{-2} D_u^*}) \right] \quad \text{ÉQUATION 0-8}$$

avec φ_{arg} le contenu en argiles.

C. MODÈLES MÉCANISTIQUES DE LA RÉPONSE PP D'UN MILIEU GRANULAIRE PARTIELLEMENT SATURÉ EN HUILE : DE VINEGAR ET WAXMAN (1984) À SCHMUTZ *ET AL.* (2010)

Le modèle de Vinegar et Waxman (1984, 1982) a été développé pour modéliser la conductivité complexe de sables partiellement saturés en huile [Schmutz *et al.*, 2010]. Il tient compte de deux mécanismes :

- Le déplacement des contre-ions le long de la couche de Stern ;
- Le blocage de ces ions au niveau des rétrécissements de la taille de spores (membranes).

Pour les sables saturés par un mélange huile plus eau, la conductivité complexe (partie réelle et partie imaginaire) dépend de la saturation en eau via les relations suivantes :

$$\sigma' = \frac{S_w^n}{F} (\sigma_w + C_{th}'' \frac{Q_v}{S_w}) \quad \text{ÉQUATION 0-9}$$

$$\sigma'' = \frac{S_w^p}{F\phi} Q_v \lambda_a \quad \text{ÉQUATION 0-10}$$

avec S_w la saturation en eau, Q_v la capacité d'échange cationique, F le facteur de formation, ϕ la porosité, n et p les facteurs de saturation qui dépendent du type d'huile et tels que $p = n - 1$.

Le modèle de Vinegar et Waxman (1984) a été étendu par Revil et Florsh 2010, puis complété par Schmutz *et al.* 2010.

Dans le modèle de Vinegar et Waxman, la distribution des temps de relaxation est très large. Donc, pour une large gamme de fréquences, les parties réelle et imaginaire de la conductivité complexe sont indépendantes de la fréquence. Au contraire, dans le modèle de Schmutz *et al.*, la distribution des temps de relaxation est prise en compte via l'intégration de la probabilité de distribution du diamètre des grains.

A la fréquence de relaxation, la phase φ_0 et les parties réelles et imaginaire de la conductivité complexe, σ'_0 et σ''_0 , peuvent être exprimées suivant les relations suivantes :

$$\varphi_0 \approx -2 \frac{\Sigma_s (F - 1)}{\sigma_w D_{50}} e^{\hat{\sigma}^2 / 2} S_w^{-1} \quad \text{ÉQUATION 0-11}$$

$$\sigma'_0 \approx \frac{S_w^n}{F} \sigma_w \quad \text{ÉQUATION 0-12}$$

$$\sigma_0'' = -\frac{\Sigma_s(F-1)}{FD_{50}} e^{\hat{\sigma}^2/2} S_w^p$$

ÉQUATION 0-13

avec Σ_s la conductivité spécifique de surface, F le facteur de formation, S_w la saturation en eau, D_{50} la distribution moyenne de la taille des grains, n et p les facteurs de saturation de Vinegar et Waxman et $\hat{\sigma}$ l'écart type de la distribution des temps de relaxation.

ANNEXE 3 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DES MESURES ÉLECTRIQUES SUR COLONNES POUR L'ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ BACTÉRIENNE

A. RÉSUMÉS ET PRINCIPAUX RÉSULTATS

Abdel Aal <i>et al.</i>, 2004 Effects of microbial processes on electrolytic and interfacial electrical properties of unconsolidated sediments	<p>Colonnes biotiques et abiotiques pour étudier l'effet des processus microbiens sur les propriétés électriques de sédiments non consolidés.</p> <ul style="list-style-type: none">• La colonne biotique (nutriments + diesel + bactéries) montre :<ol style="list-style-type: none">a) Augmentation de la partie réelle, imaginaire de la conductivité complexe et augmentation de la conductivité de surfaceb) Diminution du facteur de formation• Les colonnes abiotiques (nutriments ; nutriments + diesel) ne montrent pas de changements significatifs. <p>L'augmentation de la population microbienne, la diminution de la source de carbone, de nitrate et de sulfate, l'augmentation de carbone inorganique dissous et de la conductivité du fluide sont les preuves de l'activité microbienne dans les colonnes biotiques.</p>
Abdel Aal <i>et al.</i>, 2009 Effect of bacterial adsorption on low frequency electrical properties of clean quartz sands and iron-oxide coated sands	<p>Mesures électriques BF (0.1-1000 Hz) réalisées pour étudier l'effet de l'adsorption de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur du quartz pur et des grains de sable recouverts d'oxyde de fer .</p> <p>Résultats :</p> <ul style="list-style-type: none">• Quartz pur : augmentation graduelle de l'adsorption des bactéries sur les grains ⇔ augmentation de 13% de la partie imaginaire de la conductivité ;• Grains couverts d'oxyde de fer : augmentation rapide de l'adsorption ⇔ augmentation de 37% de la partie imaginaire ;• Pas de changements significatifs de la partie réelle dans les deux cas. <p>Les auteurs retrouvent une loi puissance entre le nombre de cellules adsorbées et la partie imaginaire de la conductivité.</p>

Hypothèse : la polarisation est due à l'augmentation de la rugosité des grains et de la surface spécifique due à la sorption des bactéries.

Les bactéries chargées négativement aiment les surfaces couvertes d'oxydes de fer chargés positivement (plus de charges négatives sur les grains de quartz pur, donc plus de répulsion et moins d'adsorption).

Abdel Aal *et al.*, 2010a

Effect of bioclogging in porous media on complex conductivity signatures

Des colonnes de sable inoculées par les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* ont été utilisées pour étudier l'effet du *bioclogging* sur la résistivité complexe et les propriétés de transport.

Le *bioclogging* est dû à l'augmentation de la concentration des cellules et à la production de substances exopolymériques (EPS). Cela a un impact sur la conductivité imaginaire σ'' , la conductivité hydraulique K, le débit Q, la dispersivité D et la porosité Φ .

Les auteurs observent 3 stades de changements des propriétés électriques et de transport :

- Pas de changement significatif (jours 1-8) : fixation réversible et irréversible des cellules au sable ;
- *Bioclogging* dû à l'augmentation de la biomasse : diminution maximum de Q et K et augmentation modérée de σ'' (jour 9-16) ; production significative d'EPS et augmentation de l'épaisseur du biofilm => augmentation plus importante de σ'' (jour 17-24)
- Etat quasi stationnaire de la croissance du biofilm => pas de changement significatif (jour 25-32)

Donc σ'' peut fournir des informations complémentaires dans la caractérisation du *bioclogging* dans un environnement poreux.

Abdel Aal *et al.*, 2010b

Sensitivity of geoelectrical measurements to the presence of bacteria in porous media

Etude de la sensibilité des mesures électriques BF (0.1-1000 Hz) à :

- La densité de cellules microbiennes
- La proportion des cellules vivantes et mortes
- La fixation des cellules à la surface des grains de quartz pur et des grains recouverts d'oxydes de fer.

Trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* avec des propriétés de mobilité et de fixation différentes ont été utilisées.

Résultats :

- Variations de la concentration en cellules vivantes et mortes : pas d'effets sur la partie réelle de la conductivité.
- La partie imaginaire de la conductivité augmente linéairement avec l'augmentation de concentration de cellules vivantes dans les colonnes
- Loi puissance entre la partie imaginaire de la conductivité et le nombre de cellules adsorbées sur les grains de sable (exposants de la loi plus importants pour une souche mutante de la bactérie par rapport à la souche sauvage et exposants plus importants pour les grains de sable recouverts de fer que pour les grains de quartz pur).
- Peu de changement de la partie réelle de la conductivité avec la fixation des bactéries aux grains.

Atekwana et al., 2004

Evidence for microbial enhanced electrical conductivity in hydrocarbon contaminated sediments

Mesures de conductivité de sédiments pendant une minéralisation de diésel à l'échelle méso, dans des colonnes biotiques contaminées et non contaminées.

Résultats :

- La population de microorganismes augmente en suivant un schéma dépendant de la hauteur dans les colonnes contaminées et pas dans celles qui ne le sont pas. Plus de variation de la conductivité dans les sédiments au-dessus de la nappe d'eau saturée de diesel.
- Une communauté microbienne spécialisée est observée dans la zone contaminée.
- Augmentation de la conductivité de volume dans les colonnes contaminées : la présence de carbone inorganique dissous et de calcium suggèrent que la forte conductivité est due à une augmentation de la dissolution du minéral (*weathering*) due à l'activité bactérienne.

Davis et al., 2006

Microbial growth and biofilm formation in geologic media is detected with complex conductivity measurements

Mesures de résistivité complexe (0.1-1000 Hz) obtenues à partir de colonnes remplies de sable et bio-stimulées pour étudier l'effet de la croissance microbienne et la formation d'un biofilm sur les propriétés électriques du milieu poreux.

Résultats :

- Des pics de la partie imaginaire de la conductivité dans les colonnes bio-stimulées coïncident avec des pics de concentration de cellules extraites des sables.

- La partie réelle ne montre de pas de relation avec la concentration de cellules.

Hypothèse : les changements dynamiques observés pour la partie imaginaire sont dus à la croissance et à la fixation des bactéries et des biofilms à la surface des grains de sable.

Ntarlagiannis *et al.*, 2004

Induced polarization response of microbial induced sulfide precipitation

Expériences en laboratoire pour étudier l'utilisation de l'IP et de la conductivité électrique pour surveiller la précipitation des sulfures en conditions anaérobies dans des colonnes remplies de sable.

Résultats :

- Le front de précipitation commence par se développer à côté du point d'injection, puis migre avec le flux des nutriments
- Changement dans la réponse IP (déphasage de 14 mrad) qui coïncide avec le front de précipitation des sulfures (respiration des cellules actives).
- Réponse IP en corrélation avec le gradient de concentration de lactate (mesure indirecte du métabolisme des bactéries).

Ntarlagiannis *et al.*, 2005a

On the low-frequency electrical polarization of bacterial cells in sands

Mesures électriques sur sable et bactéries (différentes concentrations) :

- Exp 1 : *Shewanella putrefaciens* (biomasse 0-0.5 mg/L)
- Exp 2 : *Escherichia coli* (biomasse 0-42 mg/L)

Résultats :

- Mesures d'une polarisation BF (10Hz) dépendante de la biomasse.
- Densité de cellules < 12 mg/L : la polarisation diminue par rapport à la situation avant l'injection de bactéries (diminution encore plus importante si l'affinité cellule-surface est améliorée par l'ajout de Fe). On a donc une altération de l'interface minéral-fluide à cause des interactions minéral-cellules.
- Densité de cellules > 12 mg/L : la polarisation augmente à cause de la diminution de la mobilité ionique et/ou du transfert d'électrons dû à l'accumulation des cellules dans les pores.

Ntarlagiannis *et al.*, 2005b

Sensibilité des mesures électrique BF à la précipitation des sulfures induite par des bactéries.

Résultats :

Low-frequency electrical response to microbial induced sulfide precipitation	<ul style="list-style-type: none"> • Anomalies de polarisation (déphasage de 14 mrad) qui se développent à l'injection des bactéries et dans les zones d'accumulation. • Augmentation de la polarisation en corrélation avec la consommation de lactate. • Variations temporelles de la polarisation et de la conduction en corrélation avec le réarrangement géométrique des cellules recouvertes de minéraux métalliques.
Ntarlagiannis et al., 2007 Microbial nanowires : Is the subsurface "hardwires"?	<p>Colonnes de sable saturées et inoculées par des bactéries réductrices de métal <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 pour montrer que les appendices électriquement conducteurs (<i>nanowires</i>) sont directement associés aux potentiels électriques.</p> <p>Résultats :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pas de potentiel électrique détectable dans les colonnes inoculées par des bactéries mutantes qui produisent des appendices non conducteurs, réponse électrique pour les bactéries non mutantes • La SEM montre un réseau de <i>nanowires</i> qui relie les cellules entre-elles et les cellules aux surfaces minérales, tout le long de la colonne. <p>Hypothèse : les <i>nanowires</i> servent de conduits pour le transfert d'électrons depuis les bactéries qui se trouvent dans la partie anaérobie jusqu'aux bactéries de la surface qui ont accès à l'oxygène.</p>
Ntarlagiannis et Ferguson, 2009 SIP response of artificial biofilms	<p>Montrer et quantifier l'effet de l'accumulation d'un biofilm sur les signaux IP.</p> <p>Création d'un biofilm artificiel introduit en différentes quantités dans plusieurs colonnes.</p> <p>Résultats : La méthode IP est sensible à l'accumulation de biofilm à partir d'une certaine quantité.</p>
Personna et al., 2008 Spectral induced polarization and electrodic potential monitoring of microbially mediated iron	<p>Expériences en laboratoire sur des colonnes pour étudier la réponse géo-électrique (SIP, potentiel d'électrode) pendant la réduction de sulfates.</p> <p>Résultats :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les analyses géochimiques (dosage de sulfate, lactate, sulfure, acétate), l'observation des précipités et les

sulfide transformations	<p>potentiels d'électrode donnent un diagnostic des transitions induites entre la formation de sulfure de fer en anaérobie et les conditions aérobies qui favorisent la dissolution des sulfures de fer.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Données SIP : anomalies d'environ 10 mrad pendant la minéralisation des sulfures de fer (qui accompagne l'activité microbienne en anaérobie). • Les anomalies disparaissent pendant la dissolution des sulfures de fer (transition en aérobie).
--------------------------------	---

Slater *et al.*, 2005

Electrical properties of iron-sand columns: Implications for induced polarization investigation and performance monitoring of iron-wall barriers

Etude de la réponse électrique BF de barrières de fer réactives en faisant des mesures sur des colonnes de fer zéro-valent sous différentes conditions :

- (1) Variation de la surface spécifique de Fe⁰ (0.1-100 %) ;
- (2) Variation de l'activité électrolytique (0.01-1 mol/L) (solution monovalente et trivalente) ;
- (3) Précipitation forcée d'hydroxydes de fer et de carbonates de fer sur les surfaces de Fe⁰.

Résultats :

- L'amplitude de polarisation montre une relation linéaire avec la surface spécifique de Fe⁰, alors que l'amplitude de la conduction n'est que faiblement dépendante de la concentration en Fe⁰.
- L'amplitude de polarisation est reliée à l'activité électrolytique par une loi puissance (qui varie avec la valence de la solution).
- Les paramètres de temps de relaxation dépendent de l'activité électrolytique et de la valence : ils dépendent de la variation d'épaisseur de la double couche.
- Le pH a peu d'effet sur les paramètres électriques.
- L'amplitude de polarisation et le temps de relaxation augmentent à cause de la précipitation sur la surface de Fe⁰.

Slater *et al.*, 2007

Pore-scale spectral induced polarization (SIP) signatures associated with FeS biomineral transformations

Mesures SIP dans des colonnes de sable pendant :

- (1) La bio-minéralisation du FeS produite par la bactérie sulfato-réductrice (*D. vulgaris*) en conditions anaérobies ;
- (2) Dissolution des bio-minéraux au moment du retour à la situation aérobie.

Résultats :

- Les relaxations BF peuvent être modélisées par une formulation Cole-Cole. L'évolution des paramètres du modèle est en accord avec l'augmentation de la surface spécifique recouverte de FeS et la réduction de

la taille des pores avec la croissance des biominéraux.

- La modélisation est aussi en accord avec la diminution de surface recouverte de FeS et l'augmentation de la taille des pores pendant la dissolution (aérobie).

La méthode SIP donne un diagnostic de l'évolution de la taille des pores.

Slater *et al.*, 2009

Geoelectrical measurement and modeling of biogeochemical breakthrough behavior during microbial activity

Conductivité de volume mesurée sur des colonnes de sol pendant la réduction de sélénite par des bactéries. Modélisation.

Williams *et al.*, 2005

Geophysical Imaging of Stimulated Microbial Biomineralization

Utilisation de méthodes géophysiques non-invasives pour surveiller la bio-minéralisation à l'échelle du laboratoire pendant une réduction stimulée des sulfates.

Résultats :

- Altérations des sédiments (précipitations de minéraux catalysées par les bactéries) concomitantes avec des changements de conductivité complexe et de propagation d'ondes sismiques.
- La séquestration de zinc et de fer dans des sulfures insolubles conduit à des variations dans la capacité de la solution porale à conduire les charges électriques et celle des sédiments à dissiper l'énergie acoustique.
- La SEM et le TEM confirment que les sulfures sont associés à la surface des cellules.
- Les anomalies des données géophysiques reflètent la distribution des précipitations minérales et de la biomasse en fonction du temps et de l'espace. Les variations temporelles correspondent à des changements dans l'état d'agrégation des nano cristaux de sulfures.

Wu *et al.*, 2005

Effect of Precipitation on Low Frequency Electrical Properties of Zero valent Iron Columns

Expériences sur colonnes pour étudier l'application de méthodes électriques pour surveiller la précipitation dans des colonnes de Fe⁰ en utilisant des solutions de Na₂SO₄ et Na₂CO₃.

Résultats :

- Augmentation de la conductivité complexe.

- SEM : altération de la surface minérale.
- Augmentation de la surface spécifique des minéraux de fer.

Changements électriques attribués à : (1) conductivité complexe plus importante à cause de l'augmentation de la surface spécifique et à l'altération minérale et (2) augmentation de la conduction électronique due à l'augmentation des transferts d'électrons entre l'interface fer-fluide.

Wu *et al.*, 2008

A comparison of the low frequency electrical signatures of iron oxide versus calcite precipitation in granular zero valent iron columns

Expériences sur colonnes pour étudier l'effet de la minéralogie sur la réponse électrique résultant de la corrosion du fer et de la précipitation minérale dans des colonnes de Fe⁰ en utilisant des solutions de (a) Na₂SO₄ et (b) NaHCO₃ + CaCl₂.

Résultats :

- Contraste des réponses dû aux différences de propriétés électriques des phases minérales formées.
- La précipitation d'oxydes de fer augmente la polarisation et la conductivité dans la colonne de sulfates.
- La précipitation de calcite non-polarisable et non-conductrice diminue ces deux paramètres dans la colonne de bicarbonates.

Wu *et al.*, 2009

Calcite precipitation dominates the electrical signatures of zero valent iron columns under simulated field conditions

Expériences en colonnes pour étudier la signature électrique résultant des précipitations compétitives de CaCO₃ et des oxydes de fer sous des conditions géochimiques stimulées.

Résultats :

- CaCO₃ est une des espèces minérales majoritaires dans les colonnes.
- Diminution de la conductivité et de la polarisation : le caractère isolant de CaCO₃ domine la réponse électrique malgré la présence des oxydes de fer conducteurs.
- Images SEM/EDX : le signal électrique reflète la géométrie des phases minérales. CaCO₃ forme des films isolants sur les surfaces de fer et de magnétite, limitant les transferts d'électrons entre l'électrolyte et les particules de fer.

B. MATÉRIEL

	Colonnes	Electrodes	Schéma du dispositif
Abdel Aal <i>et al.</i> , 2004	<p>dimensions : L=50 cm ; d=7.6 cm</p> <p>matériau : PVC</p> <p>nombre : 3 colonnes :</p> <p>1 biotique (nutriments + diesel + bactéries) 1 abiotique (nutriments)</p> <p>nombre de ports pour les mesures : 1 pour prélèvement de fluides</p> <p>circulation des fluides : pompe péristaltique</p>	<p>nombre : 2+2</p> <p>type : injection : Ag mesure : Ag/AgCl</p> <p>espacement / localisation: injection : 20 cm d'espacement mesure : à 6 cm des électrodes d'injection, espacées de 8cm</p>	
Abdel Aal <i>et al.</i> , 2009	<p>dimensions : L=10 cm ; d=3.8 cm</p> <p>matériau : PVC</p> <p>nombre : 6 colonnes remplies avec différents pourcentages de sable recouvert de fer (0, 20, 40, 60, 80 et 100%)</p> <p>circulation des fluides : pompe péristaltique</p>	<p>nombre : 2+2</p> <p>type : Ag/AgCl</p> <p>espacement/localisation : injection : 10 cm mesure : 3 cm</p>	

Abdel Aal *et al.*, 2010a

dimensions :

L=40 cm ; d=3.8cm

matériau :

PVC

nombre :

2+2

2 expérimentales (sable + milieu de culture + bactéries)

2 témoins (sable + milieu de culture)

circulation des fluides :

pompe péristaltique

nombre :

2+2

type :

Injection : bobines d'Ag/AgCl

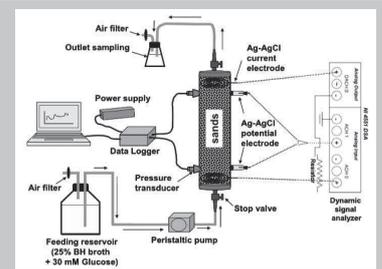
Mesure : Ag/AgCl,

espacement / localisation:

dans chambres, en contact avec le sable

Injection : 36 cm d'espacement

Mesure : 33cm d'espacement



Abdel Aal *et al.*, 2010b

dimensions :

L=12 cm ; d=3.17 cm

matériau :

PVC

nombre :

26 colonnes

circulation des fluides :

pompe péristaltique

nombre :

2+2

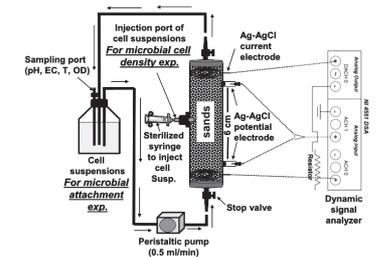
type :

Ag/AgCl

espacement / localisation:

dans des chambres remplies d'électrolyte, 6cm d'espacement

injection aux extrémités des colonnes



Atekwana *et al.*, 2004

dimensions :

L=80 cm ; d=31 cm

matériau :

PVC

nombre :

2 : polluée et non-polluée, toutes biotiques

zone saturée + zone de transition

+ zone vadose

niveau d'eau à 45-80 cm

type :

mesure : électrodes d'acier

espacement / localisation:

Wenner, 2 cm d'espacement

phase résiduelle de diesel : 0-32 cm
 phase libre : 32-45 cm
 phase dissoute : sous 45 cm,
 dans la zone saturée

Davis *et al.*, 2006

dimensions :

L=30 cm ; d=3.2 cm

matériau :

PVC

nombre :

(2x2) + 1 colonnes :

1 duplicat nutriments + fuel

1 duplicat nutriments + fuel + bactéries

1 pour l'analyse en phase solide

nombres de ports pour les mesures :

un réservoir de fluides construit avec un tube PVC de 7.6cm, installé au-dessus de chaque colonne pour les prélèvements de fluides

circulation des fluides :

Circulation de fluides pendant 30min avant le début de l'expérience avec une pompe péristaltique

injection périodique de solution BH (jours 18 et 31) dans le réservoir pour maintenir le volume de fluides

nombre :

2 + 2

type :

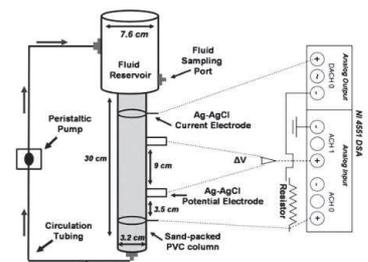
injection : Ag/AgCl

mesure : Ag/AgCl

espacement / localisation:

injection : 16 cm d'écart

mesure : 9 cm



Ntarlagiannis *et al.*,
2004

dimensions :

L=30.5 cm ; d=5.08cm

nombre :

3

1 : mesures électriques

1 : mesures géochimiques

1 : contrôle (pas de bactéries)

nombre de ports pour les mesures :

colonne géochimie : 7 ports à 3.8 cm d'écart à partir de la base de la colonne ; la position des ports coïncide avec la position des électrodes de la colonne des mesures électriques

nombre :

8+2

type :

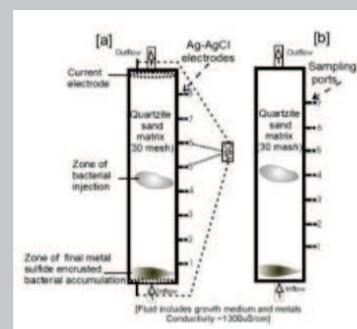
mesure : Ag-AgCl

injection : or

espacement / localisation:

mesure : 3.5 cm d'écart, dans des chambres

injection aux extrémités



Ntarlagiannis *et al.*,
2005a

dimensions :

L=11 cm ; d=5 cm

matériau :

PVC

nombre :

2x2 (2 par bactérie)

S.putrefaciens :

1 avec sable d'Ottawa (100% silice)

1 avec sable d'Ottawa recouvert de Fe

E. coli :

1 avec sable d'Ottawa (100% silice)

1 témoin

circulation des fluides :

pompe péristaltique

nombre :

2 + 2

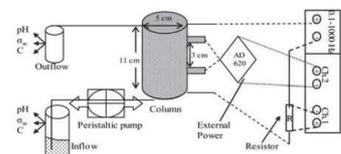
type :

injection : acier

mesure : Ag/AgCl

espacement / localisation:

injection à chaque extrémité
électrodes de mesure placées au bord de la colonne ; 3 cm d'espacement



Ntarlagiannis *et al.*,
2005b

dimensions :
L=30.5 cm ; d=5.08 cm

nombre :
3

1 : mesures électriques
1 : mesures géochimiques
1 : contrôle (pas de bactéries)

nombres de ports pour les mesures :
colonne géochimie : 7 ports à 3.8 cm d'écart à partir de la base de la colonne ; la position des ports coïncide avec la position des électrodes de la colonne de mesures électriques

circulation des fluides :

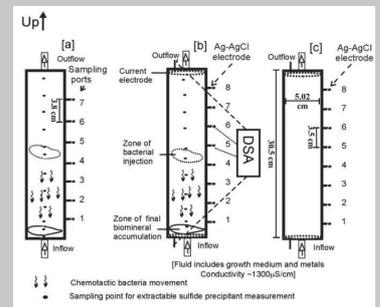
pompe péristaltique

nombre :
8+2

type :
mesure : Ag-AgCl

injection : or

espacement / localisation:
mesure : 3.5 cm d'écart, dans des chambres
injection aux extrémités



Ntarlagiannis *et al.*,
2007

dimensions :
d=5.08 cm

matériau :
PVC

nombre :
4

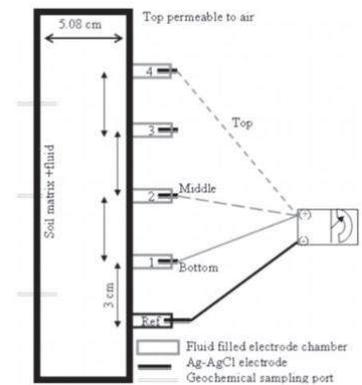
nombres de ports pour les mesures :
3

circulation des fluides :
pompe péristaltique

nombre :
4 + 1 de référence

type :
Ag/AgCl

espacement / localisation:
à l'extérieur des colonnes, dans des chambres
remplies de fluide
3 cm d'espacement



Ntarlagiannis
Ferguson, 2009

et

dimensions :

Cf. Personna *et al.*, 2008

nombre :

exp A : biofilm (alginate mix) + paire A
exp B : biofilm (microbes mix) + paire A
exp C : biofilm (microbes mix) + paire B

nombre :

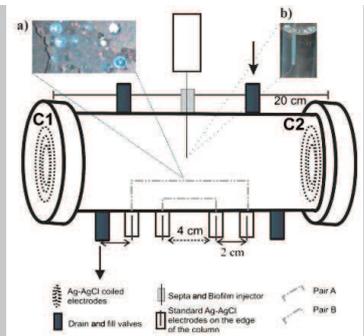
4+2

type :

injection : Ag/AgCl
mesure : Ag/AgCl

espacement / localisation:

injection aux extrémités
espacement paire A : 4 cm
espacement paire B : 8 cm



Personna *et al.*, 2008

dimensions :

d=3.17 cm ; L=20.3 cm

matériau :

PVC

nombre :

2 expérimentales

nombre de ports pour les mesures :

3 pour prélèvement de liquides
1 pour injection de bactéries (au milieu)
et 2 pour sortie des bactéries (aux extrémités)

nombre :

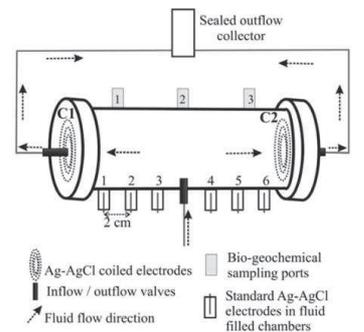
6+2

type :

Ag/AgCl

espacement / localisation:

Mesure dans des ports remplis d'électrolyte,
2 cm d'espacement
Injection aux extrémités de la colonne



Slater <i>et al.</i> , 2005	<p>dimensions : L=14 cm, d=2.5 cm</p> <p>matériau : PVC</p> <p>nombre : activité de l'électrolyte : 5 colonnes identiques avec des électrolytes différents : NaNO₃, NaCl, Cd(NO₃)₂, CaCl₂ et AlCl₃ pH : 5 valeurs de pH (3.0, 5.5, 7.0, 8.5 et 10.5) variation [Fe⁰]</p>	<p>nombre : 2+2</p> <p>type : Ag/AgCl</p> <p>espacement / localisation: injection aux extrémités mesure : chambres, 4cm</p>
Slater <i>et al.</i> , 2007	<p>dimensions : L=20.3 cm, d=3.17 cm</p> <p>nombre : 1, horizontale</p> <p>nombres de ports pour les mesures : 3</p> <p>circulation des fluides : pompe péristaltique</p>	<p>nombre : 6+2</p> <p>type : Ag/AgCl</p> <p>espacement / localisation: Mesure : dans des chambres Injection : aux extrémités</p>

Slater *et al.*, 2009

dimensions :

L=30 cm ; d=5 cm

matériau :

PVC

nombre :

2 colonnes :

1 active (bactéries)

1 contrôle

nombre :

6 + 2

type :

Mesure : Ag/AgCl

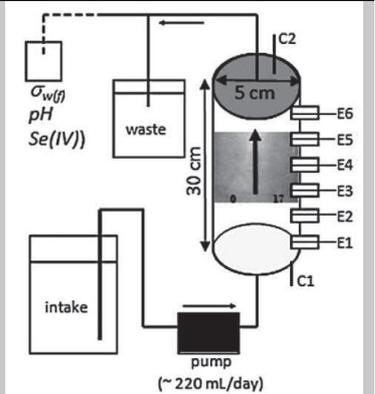
Injection : Bobines Ag/AgCl

espacement / localisation:

3 cm

injection aux extrémités

mesures E1-E2, E2-E3, E3-E4, E4-E5 et E5-E6



Williams *et al.*, 2005

dimensions :

L=30.5 cm ; d=5.0 cm

matériau :

polycarbonate

nombre :

5 (1=échantillonnage du fluide ; 1=mesure de résistivité complexe ; 1=mesure de la propagation des ondes acoustiques ; 2=contrôles abiotiques)

nombres de ports pour les mesures :

plusieurs, situés à 3.8 cm d'intervalle ; analyses à l'entrée et à la sortie

circulation des fluides :

pompe péristaltique

nombre :

8

type :

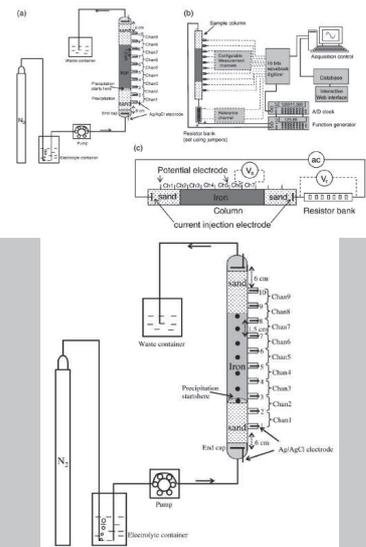
Mesure : Ag/AgCl

Injection : or

espacement / localisation:

3.5 cm, tout le long de la colonne et électrodes d'injection à chaque extrémité
limiter les effets de polarisation : électrodes couplées électriquement aux parois de la colonne par un gel électrolytique

<p>Wu et al., 2005</p>	<p>dimensions : L=16 cm ; d=3 cm</p> <p>matériau : PVC</p> <p>nombre : 2 colonnes + 1</p> <p>(1) 0.01M Na₂CO₃</p> <p>(2) 0.01M Na₂SO₄</p> <p>(3) contrôle</p>	<p>type : injection : acier</p> <p>mesure : Ag/AgCl</p>
<p>Wu et al., 2008</p>	<p>dimensions : L=25.5 cm ; d=4.8 cm</p> <p>matériau :</p> <p>nombre : 2 colonnes</p>	<p>nombre : 10+2</p> <p>type : Ag/AgCl</p> <p>espacement / localisation: 1.5 cm d'intervalle, avec la première et la dernière à 6 cm des extrémités, dans des chambres remplies d'électrolyte</p>
<p>Wu et al., 2009</p>	<p>dimensions : L=25.5 cm ; d=4.8 cm</p> <p>matériau : PVC transparent</p> <p>nombre : 2 colonnes :</p> <p>(1) simulation site de Helena</p> <p>(2) simulation site de KC</p>	<p>nombre : 10+2</p> <p>type : Ag/AgCl</p> <p>espacement / localisation: 1.5 cm d'intervalle, avec la première et la dernière à 6 cm des extrémités, dans des chambres remplies d'électrolyte</p>



C. CONDITIONS GÉOCHIMIQUES ET BIOLOGIQUES

	Bactéries	Milieu
Abdel Aal <i>et al.</i> , 2004	<p>réveil des bactéries/croissance préalable : Bactéries cultivées à partir de sédiments pollués au diesel (même site que celui des sables)</p>	<p>composition et granulométrie du sable : grains fins (0.45-0.65 mm) (Michigan)</p> <p>traitement du sable / stérilisation : stérilisé par autoclavage (3 fois à 120°C pendant 30 min)</p> <p>polluants / nutriments diesel dissous (40mL de diesel + 1L d'eau déminéralisée, mélangé à 23°C pendant 72h, le diesel non dissous a été retiré) total BTEX dissous = 0.29 mg/L Solution Bushnell Haas (BH) à 25%</p> <p>température 22-25 °C</p>
Abdel Aal <i>et al.</i> , 2009	<p>espèce : <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>réveil des bactéries/croissance préalable : croissance dans une solution Bushnell Haas à 30%, (0.41 mM magnesium sulfate, 0.05 mM calcium chloride, 1.84 mM monopotassium phosphate, 1.89 mM diammonium hydrogen phosphate, 2.47 mM potassium nitrate, 0.08 mM ferric chloride) + 30 mM glucose 50 ml de cellules incubées pendant 24 – 48 h à 37° C culture centrifugée à 2000 rpm pdt 50 min, suspension retirée et cellules lavées avec de l'eau de nappe artificielle, remises en solution dans l'eau de nappe artificielle</p>	<p>composition et granulométrie du sable : quartz ± recouvert de fer</p> <p>traitement du sable / stérilisation : une fraction du sable a été mélangée à 2M de nitrate ferrique, mélange placé dans un four à 110°C pendant 14h, puis lavé plusieurs fois avec de l'eau déminéralisée, séchage au four à 105°C colonnes, tubing et accessoires stérilisés avec de l'éthanol plusieurs V_p d'eau de nappe artificielle passés dans les colonnes pour que le pH et la conductance de la solution en entrée et en sortie soient les mêmes</p> <p>débit d'alimentation : 0.5 ml/min</p> <p>conductivité de la solution : 1000 µS/cm</p>

		<p>polluants / nutriments</p> <p>Eau de nappe artificielle (Mills <i>et al.</i> [1994])</p> <p>KNO₃, 0.75 mM;</p> <p>MgSO₄, 7.00 mM;</p> <p>CaSO₄, 5.10 mM;</p> <p>NaCl, 1.70 mM;</p> <p>NaHCO₃, 7.00 mM.</p>
<p>Abdel Aal <i>et al.</i>, 2010a</p>	<p>espèce :</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> wild type (PAO1 Gfp)</p> <p>révé l des bactéries/croissance préalable :</p> <p>culture aérobie à 37°C dans une "batch shake flask" contenant 25% de solution Bushnell Haas (50 mg/L de sulfate de magnésium, 5 mg/L chlorure de calcium, 250 mg/L phosphate de monopotassium, 250 mg/L phosphate d'H diammonium, 250 mg/L de nitrates de potassium, 12.5% de chlorure ferrique) + 30 mM de glucose</p> <p>cellules incubées pendant 24-48h, centrifugées, rincées et remises en sol dans le milieu de croissance (solution BH 25% + 30 mM glucose)</p> <p>concentration cellules : 0.61 .10⁹ CFU/mL</p> <p>temps nécessaire pour s'attacher :</p> <p>2 jours</p>	<p>composition et granulométrie du sable :</p> <p>Ottawa sands : 500-710 µm</p> <p>99.8% silicon dioxide</p> <p>0.02% iron oxide</p> <p>0.06% aluminium oxide</p> <p>0.01% titanium oxide</p> <p><0.01% calcium, magnesium, sodium, potassium oxides</p> <p>porosité : 40.11 ±0.04</p> <p>conductivité : 0.058 ± 0.001 cm/s</p> <p>traitement du sable / stérilisation :</p> <p>colonnes + accessoires stérilisés à l'éthanol</p> <p>sable lavé avec de l'acétate de sodium (pH5) pour enlever les carbonates, puis peroxyde d'hydrogène (6%) pour enlever la MO, et mélange de citrate de sodium, bicarbonate de sodium et hydrogénosulfure de sodium pour enlever les oxydes de fer</p> <p>sable traité lavé plusieurs fois avec de l'eau déionisée, séché au four à 105°C, autoclavé 3 fois à 120°C pendant 30min</p> <p>débit d'alimentation :</p> <p>0.25 mL/min</p>

	<p>polluants / nutriments Milieu de croissance = solution BH 25% + 30 mM glucose pH : 7.01 ± 0.01 conductivité de la solution 0.098 ± 0.003 S/m</p>
<p>Abdel Aal et al., 2010b</p> <p>espèce : <i>P. aeruginosa</i> wild type (PAO1), PAO1-derived <i>rhlA</i> et <i>pilA</i> mutants.</p> <p>réveil des bactéries/croissance préalable : croissance à 37°C dans une solution BH à 30% (Bushnell Hass) (50 mg/L magnesium sulfate, 5 mg/L calcium chloride, 250 mg/L monopotassium phosphate, 250 mg/L diammonium hydrogen phosphate, 250 mg/L potassium nitrate, and 12.5 mg/L ferric chloride) + 30 mmol de glucose Cellules centrifugées (4000 rpm, 50 min) et rincées 2 fois avec de l'eau de nappe artificielle stérilisée (similaire à celle de Abdel Aal et al. [2009]) pour enlever toute trace de la solution BH.</p> <p>Densité de cellules (vivantes/mortes) 2 jeux de 10 flasques contenant les suspensions de cellules préparées avec 10 densités de cellules différentes : de 0.31 10⁹ à 5.0.10⁹ CFU (colony forming units)/ml. 1 des jeu de 10 flasques contient des suspensions de cellules vivantes et le 2e jeu contient des cellules mortes</p> <p>Fixation microbienne utilisation de la souche sauvage de <i>P. Aeruginosa</i> et des 2 souches mutantes Expériences avec les flasques avant injection dans les colonnes pour déterminer la capacité de fixation de chaque souche 180g de sable (quartz propre) + 100mL de bactéries en suspension dans des flasques de 250mL</p> <p>quantité injectée dans la colonne :</p>	<p>composition et granulométrie du sable : 99.8% de silice, 0.02% d'oxyde de fer, 0.06% d'oxyde d'aluminium, 0.01% d'oxyde de titanium, <0.01% d'oxyde de calcium, <0.01% d'oxyde de magnesium, <0.01% d'oxyde de sodium, <0.01% d'oxyde de potassium. diamètre des particules = 500 - 710 µm porosité = 0.42 ± 0.01 utilisation de grains recouverts d'oxyde de fer</p> <p>traitement du sable / stérilisation : colonnes + tubing + accessoires stérilisés avec de l'éthanol Sable préparé avec du peroxyde d'hydrogène (6%) pour enlever la MO, avec de l'acétate de sodium (pH 5) pour enlever les carbonates et avec un mélange de citrate de sodium, de bicarbonate de sodium et d'hydrogénosulfure de sodium pour enlever les oxydes de fer ; rincé plusieurs fois avec de l'eau déminéralisée, séché à 105°C, autoclavé 3 fois à 121°C pendant 30 min Une partie du sable a été couvert d'oxyde de fer (Joshi and Chaudhuri [1996] et Abdel Aal et al. [2009])</p> <p>débit d'alimentation : Fixation microbienne : 0.5 ml/min</p> <p>polluants / nutriments 30 mmol de glucose</p>

port d'injection au milieu de la colonne
En utilisant une seringue stérilisée, 1 V_p a été extrait de
chaque flasque et injecté dans les colonnes via une valve

Atekwana et al., 2004	espèce : Principalement <i>Rhodococcus sp.</i> réveil des bactéries/croissance préalable : bactéries obtenues à partir de sables contaminés à Carson city mis dans un milieu à 25% de BH (Bushnell-Hass)	composition et granulométrie du sable : sable (Carson city, Michigan), grains fins à moyens majorité de quartz + feldspaths + carbonates échantillons de sédiments de 2.5cm de diamètre (= sable compacté), aux extrémités de la colonne, à 17cm des électrodes traitement du sable / stérilisation : sable autoclavé polluants / nutriments nutriments = 25% BH polluants = 4L de diesel température 23-25°C
Davis et al., 2006	espèce : souches de <i>Variovorax</i> et <i>Stenotrophomonas</i> réveil des bactéries/croissance préalable : culture d'un mélange de bactéries à partir de sédiments collectés sur un site contaminé par des HC, Carson City, MI, USA. temps pour attachement 30 min?	composition et granulométrie du sable : sable siliceux (99.8% SiO ₂ , 0.020% oxyde de fer, 0.06% oxyde d'aluminium, 0.01% oxyde de titane, <0.01% oxyde de calcium, <0.01% oxyde de magnésium, <0.01% oxyde de sodium, <0.01% oxyde de potassium traitement du sable / stérilisation : sable lavé avec de l'eau déionisée et désinfecté par autoclavage colonnes + tubing + accessoires désinfectés par un rinçage à l'éthanol 70% polluants / nutriments colonnes saturées avec une solution BH stérile à 25% : 50 mg/l sulfate de Mg, 5 mg/l chlorure de Ca, 250 mg/l phosphate monopotassium, 250 mg/l phosphate diammoniumhydrogen, 250 mg/l nitrate de potassium, 12.5 mg/l chlorure ferrique

Ntarlagiannis <i>et al.</i> , 2004	<p>espèce : <i>Desulfovibrio vulgaris</i></p> <p>quantité injectée dans la colonne : injection des bactéries avec une seringue, au point d'injection au milieu de la colonne : entre les électrodes 4 et 5 pour la colonne mesures électriques et proche du port de prélèvement 3 pour la colonne géochimie</p>	<p>diesel</p> <p>composition et granulométrie du sable : silica sand (Ottawa, IL)</p> <p>99.8% quartz 0.2% magnetite taille des grains : 600µm - 800µm</p> <p>aérobie/anaérobie anaérobie</p> <p>débit d'alimentation : 50 cm/jour</p> <p>conductivité 1300µS/cm ±75 µS/cm</p> <p>polluants / nutriments 2.8mM lactate 4.0mM sulfate 0.31mM soluble zinc 0.36mM soluble iron</p>
Ntarlagiannis <i>et al.</i> , 2005a	<p>espèces : <i>Shewanella putrefaciens</i> 200 réduction du métal (anaérobie) <i>Escherichia coli</i></p> <p>réveil des bactéries/croissance préalable : cellules maintenues dans du Tryptic Soy Agar croissance dans du Tryptic Soy Broth pendant 18h à 32°C avant l'expérience, enlevées du milieu nutritionnel par centrifugation (8000 rpm, 30min) et rincées 5x avec une sol à 0.001 M NaNO₃</p> <p>quantité injectée dans la colonne : reste des cellules en suspension dans la sol de 0.001 M NaNO₃ sans ajout de nutriments, cellules ajoutées à la solution au moins toutes les 48h pour être sûr d'avoir des cellules vivantes</p>	<p>composition et granulométrie du sable : 1 avec sable d'Ottawa (100% silice) 1 avec sable d'Ottawa recouvert de Fe (Fe utilisé pour altérer la chimie de surface des grains et améliorer les interactions cellule-minéral (affinité de la bactérie oxyde de Fe))</p> <p>traitement du sable / stérilisation : Fe-coating : ajout 10.36 g de Fe(NO₃)₃ pour tous les 101.16 g de sable dans 1L d'eau pure solution titrée avec NaOH (6.0 M) à pH 6 sable rincé 5x avec de l'eau pure et séché à 60°C colonnes et accessoires stérilisés par un bain acide (10% HNO₃ pdt au moins 24h) colonnes saturées par une sol à 0.001 M de NaNO₃ (10 V_F), puis</p>

Ntarlagiannis *et al.*, 2005b

espèce :

Desulfovibrio vulgaris

réveil des bactéries/croissance préalable :

croissance anaérobie dans un milieu Widdel-Pfennig (WP)
centrifugation (5000 g, 10 min, 5°C), lavées 2x dans une sol
tampon stérile 50mM de phosphate (5.62g K₂HPO₄/L et
2.13g KH₂PO₄/L, pH 7.0), remises en sol dans une version
sans lactate du milieu minimum

quantité injectée dans la colonne :

injection des bactéries avec une seringue, au point d'injection
au milieu de la colonne : entre les électrodes 4 et 5 pour la
colonne mesures électriques et proche du port de prélèvement
3 pour la colonne géochimie

injection des bactéries

composition et granulométrie du sable :

silica sand (Ottawa, IL)

99.8% quartz

0.2% magnetite

taille des grains : 600µm - 800µm

traitement du sable / stérilisation :

sable traité avec une sol de H₂O₂ pour enlever la MO, mélange
de citrate de sodium, de bicarbonate de sodium, et
d'hydrogénosulfure de sodium utilisé pour enlever les oxydes de
fer, lavé avec de l'eau désionnisée, autoclavé et séché à 105°C
Colonnes stérilisées avec de l'oxyde d'éthylène dans un stériliser
à gaz

aérobie/anaérobie

anaérobie

débit d'alimentation :

0.53 m/j.

conductivité

0.1300 S/m (±0.004 S/m).

polluants / nutriments

2.8mM lactate

3.93mM sulfates

0.306mM soluble zinc

0.36mM soluble iron

milieu nutritif de-airé en faisant bouillir puis refroidir dans une
atm de N₂

Ntarlagiannis <i>et al.</i> , 2007	<p>espèce : <i>S. Oneidensis</i> MR-1 (souche sauvage) et souche mutante</p> <p>réveil des bactéries/croissance préalable : cultivées en continu en utilisant un <i>New Brunswick Scientific BioFlo 110 fermentor</i> jusqu'à atteindre un plateau</p>	<p>composition et granulométrie du sable : sable quartzitique (SiO₂ > 99.8%, porosité 37% ± 1%)</p> <p>aérobic/anaérobic haut de la colonne perméable à l'air</p> <p>débit d'alimentation : saturation homogène : pompe au moins 10 V_p du milieu inoculé à travers les colonnes</p> <p>après inoculation, aucun ajout ou retrait de sol des colonnes</p> <p>tx de dilution : 0.05/h</p> <p>pH maintenu à 7</p> <p>DO à 2% de la saturation en air</p> <p>polluants / nutriments injection du milieu nutritif (sans bactéries) pdt 24h pour permettre aux colonnes d'atteindre un état d'équilibre [lactate] initiale = 10mM</p> <p>température contrôlée, 25°C</p>
Ntarlagiannis et Ferguson, 2009	<p>espèce : <i>Pseudomonas putida</i> 9816/11</p> <p>réveil des bactéries/croissance préalable : culture, croissance dans 100 mL de sol nutritive (Oxoid) à 37°C pdt 24h cellules concentrées par centrifugation (10 000 rpm pdt 15min), lavées dans ddH₂O, recentrifugées, mises en suspension dans 20 mL d'eau du robinet biofilm artificiel = matrice de gel alginate</p> <p>quantité injectée dans la colonne : 10mL de solution d'alginate avec seringue couverte d'un tubing en PVC (minimiser les interférences avec les mesures SIP)</p>	<p>composition et granulométrie du sable : 3-mm diameter silica beads (SiLibeads-Type M), porosité 0.38 ± 0.02, densité 2.5 Kg/m³ SiO₂ (66.7%), Na₂O (14%), CaO (7.59%), Al₂O₃ (3.46%), B₂O₃ (2.9%)</p> <p>biofilm artificiel : après chaque injection d'alginate, la colonne est rincée 10x avec de l'eau du robinet</p> <p>polluants / nutriments fluide saturant = eau du robinet 50 mmolL⁻¹ CaCl₂</p>
Personna <i>et al.</i> , 2008	<p>espèce :</p>	<p>composition et granulométrie du sable :</p>

D. Vulgaris (réduction des sulfates)

réveil des bactéries/croissance préalable :

capacité de *D. Vulgaris* à réduire les sulfates et produire précipitation de sulfures de fer testée en injectant 1 à 2 mL d'une solution microbienne dans différents tubes contenant différentes dilutions (10-100%) d'une version enrichie d'un milieu de croissance

injection des bactéries au jour 5

temps nécessaire pour s'attacher :

flux de solution stoppé pdt 24h pour laisser le tps aux bactéries de coloniser le milieu

sable siliceux (99.8% SiO₂, d₅₀=0.3 mm, porosité moy = 37.2 ± 1 %)

légères tapes pour limiter le tri des grains

traitement du sable / stérilisation :

traité pour enlever traces organiques et impuretés de fer en utilisant un mélange de citrate de sodium (44 g), de bicarbonate de sodium (42 g), de dithionite de sodium (20 g), 500 mL d'eau déionisée et du chlorure de sodium (ajouté jusqu'à saturation), rincé plusieurs fois avec eau déionisée, séché à 90°C, et autoclavé injection de N₂ stérile dans les colonnes pour enlever les bulles d'air

tous le matériel est stérilisé, et parties PVC des colonnes (pas autoclavables) stérilisées dans de l'éthanol (>95%)

aérobie/anaérobie

1) anaérobie (atmosphère de 95% de N₂ et 5% H₂) minéralisation des sulfures de fer

solution rendue anoxique et stérile :

portée à ébullition puis refroidie avec gaz de N₂, et autoclavée

2) aérobie, dissolution des sulfures de fer, ouverture de la chambre anaérobie à l'air libre (à travers un filtre de 0.45 µm)

débit d'alimentation :

2 V_p par jour (40 cm par jour), choisi pour imiter des flux réalistes dans des aquifères non consolidés

polluants / nutriments

lactate : 4mM

sulfate : 4 mM (80% Na₂SO₄, 20% MgSO₄)

FeSO₄ : 125 µM (source de Fe(II))

anaérobie :

lactate = donneur d'e-

sulfate = accepteur d'e-

Slater <i>et al.</i> , 2005		<p>composition et granulométrie du sable : sable Ottawa et volumes de Fe⁰ qui varient entre 0.1% et 100% porosité : varie entre 0.35 et 0.38, augmente avec la concentration en Fe⁰</p> <p>polluants / nutriments 1L (≈38 V_p) de 0.01 M de nitrate de sodium (NaNO₃) passé à travers chaque colonne</p>
Slater <i>et al.</i> , 2007	<p>espèce : <i>Desulfovibrio vulgaris</i></p> <p>quantité injectée dans la colonne : injection au milieu de la colonne avec une seringue, jour 5</p>	<p>composition et granulométrie du sable : d₅₀=0.3mm porosité = 37 ± 1 % sable quartzitique</p> <p>traitement du sable / stérilisation : sable traité pour retirer MO et oxydes de fer</p> <p>aérobie/anaérobie anaérobie : purge avec N₂ pour éliminer les bulles d'air + chambre anaérobie retour à l'aérobie pour étudier la dissolution des précipités (ouverture de la chambre anaérobie) : exposition à l'air à travers un filtre de 0.45µm</p> <p>débit d'alimentation : 2 V_p par jour = 0.4 m/jour</p> <p>polluants / nutriments lactate sulfate fer minéraux vitamines</p>
Slater <i>et al.</i> , 2009	<p>espèce : selenium-reducing bacteria <i>Enterobacter cloacae</i></p> <p>réveil des bactéries/croissance préalable :</p>	<p>composition et granulométrie du sable : échantillons de sol site pollué par "selenium-laden wastewater" (Belews Lake, North Carolina), mélangé avec sable Ottawa</p>

	<p>culture dans solution minimale (sels minéraux)</p>	<p>20% sol + 80% sable (99.8% qtz, 600-800µm) porosité = 0.38</p> <p>débit d'alimentation : 219 mL/jour = 1 V_p/jour de solution minimale</p> <p>polluants / nutriments 1mM selenite ou selenate incubé dans un shaker à 150 rpm à 30°C pdt 72h</p> <p>température 22 ± 2°C</p>
<p>Williams et al., 2005</p>	<p>espèce : <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (sulfate-reducing)</p> <p>réveil des bactéries/croissance préalable : élevées dans une version enrichie (x10) de la solution nutritive, centrifugées, rincées 3x, réimplantées dans une solution plus pauvre en lactate</p> <p>quantité injectée dans la colonne : 20mL dans chaque colonne avec une seringue, 13-16 cm sous le sommet</p> <p>temps nécessaire pour s'attacher : 4 jours avant de commencer la circulation de la solution</p>	<p>composition et granulométrie du sable : 99.8% quartz + 0.2% magnetite ; diamètre des particules entre 600 et 800 µm</p> <p>volume poral : porosité du sable : 0.37 ± 0.01 volume poral = 229mL ± 6mL</p> <p>traitement du sable / stérilisation : préparé avec H₂O₂ et un mélange de citrate de sodium, NaHCO₃ et Na₂S₂O₄, pour enlever la MO et les oxydes de fer ; rincé, autoclavé et séché à 105° colonnes stérilisées avec oxyde d'éthylène et sable ajouté en limitant le triage des grains</p> <p>aérobie/anaérobie chambre anaérobie maintenue dans une atmosphère de N₂/H₂ (95:5) fluide rendu anoxique : porté à ébullition, refroidi par vapeur de N₂, chauffé et stérilisé à 121° pendant 15min</p> <p>débit d'alimentation : flux continu advectif 1.75 volumes de pore par jour</p>

vitesse = 0.53 m/jour

conductivité de la solution :

1300±40 µS/cm, stable pendant la durée de l'exp

Eh :

diminué jusqu'à valeur caractéristique de la réduction des sulfates (-100mV) en ajoutant un mélange de sodium thioglycollate et d'acide ascorbique

polluants / nutriments

élimination des bulles d'air : injection N₂ stérile dans chaque colonne, saturées avec 1Ox le V_p avec une solution pauvre en lactate. Concentrations :

lactate : 2.8 mM, SO₄²⁻ : 3.93 mM, Zn²⁺ : 306 µM, Fe²⁺ : 360 µM.

température

contrôlée

Wu *et al.*, 2005

composition et granulométrie du sable :

mélanges sable-Fe⁰ = 75% Fisher filings (environ 0.4 mm de diamètre, densité 3.29 g/cm³, surface spécifique 2.84 m²/g)

25% de sable Ottawa (0.6-0.7mm de diamètre, densité 1.75 g/cm³, surface spécifique 0.05m²/g)

aérobie/anaérobie

(1) anaérobie (atm de N₂)

(2) aérobie (exposition à l'air)

débit d'alimentation :

0.3 mL/min, équivalent à une vitesse de 0.61 m/jour, 20 V_p/jour et tps de résidence d'environ 180 min

polluants / nutriments

(1) 0.01M Na₂CO₃ spargé avec N₂ (1 h par L de solution)

	<p>(2) 0.01 M Na₂SO₄ exposé à l'air</p> <p>température</p> <p>21 ± 0.5°C</p>
<p>Wu et al., 2008</p>	<p>composition et granulométrie du sable : Pristine Peerless iron grains : 2.38–0.30 mm surface spécifique : 1.5–2.5 m²/g >90% Fe, 2.5% C, 2.0% Si et traces de Mn et Cr 8.25 premiers et derniers cm de la colonne remplis de sable Ottawa (0.84–0.60 mm), fer dans les 9cm du milieu porosité : 42% (1% d'incertitude)</p> <p>aérobic/anaérobic sulfate : exposition à l'air</p> <p>débit d'alimentation : sulfate : 5 mL/min (37 VP/jour), tps de résidence de 23min dans la portion fer colonne bicarbonate : 2 ml/min (15 VP/ jour) tps de résidence 57 min</p> <p>polluants / nutriments électrolytes très concentrés (0.05 M) pour forts taux de réaction et précipitation. Solution nutritive : (a) 0.05M Na₂SO₄ (b) 0.049M NaHCO₃ plus 0.001 M CaCl₂ pH 7.3</p>
<p>Wu et al., 2009</p>	<p>composition et granulométrie du sable : Fer : Peerless (Detroit, MI) 90% F</p> <p>composition et granulométrie du sable : Fer : Peerless (Detroit, MI) 90% Fe, 2.5% C, 2.0% Si avec traces de Mn et Cr</p> <p>Les 8.25 premiers et derniers cm de chaque colonne ont</p>

été remplis avec du sable Ottawa (pas de carbonates)
9 cm au milieu de la colonne= section Fe⁰
porosité = 45%

aérobie/anaérobie
anaérobie (injection N₂)

débit d'alimentation :

5.3 L/jour (6.5 m/jour) pour Helena

3 L/jour (3.6 m/jour) pour KC

augmentation par rapport aux conditions
réelles pour expérience rapide

polluants / nutriments

eau de nappe d'Helena

en mM :

K₂SO₄(0.07), Na₂SO₄ (9),

NaHCO₃ (4.4),

CaCl₂·2H₂O (1.6)

MgCl₂·6H₂O (0.6)

eau de nappe de KC :

NaHCO₃ (5.7), CaCl₂ (6.3),

MgCl₂·6H₂O (0.75),

MnCl₂·4H₂O (0.12)

Na₂SO₄ (0.52)

température

25±0.5 °C

pH

Helena : 7.25±0.2

KC : 6.7±0.2

D. MESURES RÉALISÉES

	Géophysiques	Chimiques et Microbiologiques
Abdel Aal <i>et al.</i>, 2004	<p>type : IP : phase et amplitude facteur de formation au début et à la fin de l'exp</p> <p>pas : 2x par semaine pdt les 20 premières semaines 1x par mois jusqu'à la fin de l'exp</p> <p>fréquences utilisées : 40 freq entre 0.1 et 1000 Hz</p> <p>fréquences montrées : 1Hz</p> <p>durée de l'exp : 36 semaines ?</p>	<p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand : 45mL de fluides prélevés périodiquement + réinjection de solution dans les colonnes pour maintenir la saturation</p> <p>croissance de la pop microbienne : MPN (most probable number)</p> <p>conductivité du fluide et pH : microélectrodes</p> <p>BTEX : chromato gaz</p> <p>nitrate, sulfate, calcium : chromato ionique</p> <p>DIC : technique de Atekwana et Krishnamurthy, 1998</p>
Abdel Aal <i>et al.</i>, 2009	<p>type : IP : σ et φ</p> <p>pas : toutes les 30min</p> <p>fréquences utilisées : 0.1–1000 Hz</p> <p>fréquences montrées : 10 Hz (erreur de mesure plus faible)</p> <p>durée de l'exp :</p>	<p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand : Mesures OD (optical density) : approximation du nombre de cellules en sol avec un Dilutions + comptage pour déterminer les CFU (colony forming unit)</p> <p>prélèvement de fluides à l'entrée et à la sortie de chaque colonne toutes les 30 min</p> <p>nb de cellules adsorbées sur le minéral = nb de cellules initiales - nb de cellules en solution au tps t</p>

210 min?

conductivité du fluide, pH, température mesurés immédiatement après prélèvement avec des microélectrodes

Abdel Aal *et al.*, 2010a

type :
conductivité complexe : $|\sigma|$ et Φ
fréquences utilisées :
0.1-1000 Hz
durée de l'exp :
32 j?

paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand :

pression (2 capteurs à 33cm d'écart)
température
microbial cell counts
fluid conductivity
pH
OD (optical density) pour estimer le nb de cellules en sol ac un spectrophotomètre (Aquamate, Thermo Scientific)
flow rate (Q) tous les jours
conductivité hydraulique K, calculée par la loi de Darcy
pore velocity et coeff de dispersion estimés par tracer tests (phenol red)

prélèvement de fluides tous les jours pdt les 14 premiers jours et tous les 2-3 jours après

à la fin, triplicat d'échantillon (entrée, milieu, sortie) pour ESEM (FEI Quanta 600 FEG)

Abdel Aal *et al.*, 2010b

type :
 ϕ et $|\sigma|$
fréquences utilisées :
entre 0.1 et 1000 Hz sur 40 intervalles égaux
précision des mesures (comment est-elle calculée?) :
Avant le début des exp, les 2 jeux de colonnes ont été

paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand :

microbial cell density :
OD (optical density) : densité de cellules avec un spectrophotomètre à 600nm
EC, pH, T et densité pour les 2 jeux de flasques

calibrées pour étudier l'effet du tassement du sable sur les mesures élec.
mesures reproductibles à moins de 2%

durée de l'exp :
microbial attachment : 140 min

microbial attachment :
Prélèvement de fluide et de sable tte les 10min pdt la 1ere heure et tte les 20 min pour les 80 min restantes.
comptage de cellules
Echantillons fixés avec du 2.5% glutaraldehyde pour observation au SEM (FEI Quanta 600 field emission gun integrated with electron backscattering diffraction system)
EC, pH, T et comptage de cellules

Atekwana et al., 2004

type :
conductivité de volume σ_b
durée de l'exp :
janv 2002-mai 2003

paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand :
nombre + structure de la population microbienne sur les échantillons de sable compacté
prélèvement de sable tous les 5cm
nombre de bactéries déterminé par MPN (most probable number)
structure de la population microbienne déterminée par RISA (ribosomal DNA intergenic space analysis)

75 mL de fluides extraits pour analyses chimiques avec une seringue avec filtre 0.45 μ m aux profondeurs 45, 50, 60 et 65 cm (rubber septum)
diminution du niveau d'eau jusqu'à 55cm => colonnes rechargées avec la sol 25% BH (niveau à 45cm)
fluctuations d'eau (45-55cm) créent une smear zone

minéralisation du diesel estimée en mesurant le carbone inorganique dissous (DIC)

mesure du Ca²⁺ dissous pour déterminer le weathering

<p>Davis et al., 2006</p>	<p>type : résistivité complexe : σ et ϕ</p> <p>pas : 2x par semaine</p> <p>fréquences utilisées : 0.1–1000 Hz</p> <p>fréquences montrées : 2 Hz (freq du terrain)</p> <p>précision des mesures (comment est-elle calculée?) : erreur calculée en moyennant les données électriques pour le duplicat de colonnes et calcul de la déviation standard de la moyenne</p> <p>durée de l'exp : 60 jours</p>	<p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand : Conductivité du fluide (σ_w) et pH avec des microélectrodes immédiatement après le prélèvement de fluides depuis le réservoir</p> <p>prélèvement de sable dans la colonne prévue à cet effet 1er prélèvement au jour 13, juste après le prélèvement des fluides extraction des bactéries pour comptage direct ESEM pour imager la surface des grains rapport cellules mortes / vivantes avec un microscope épifluorescent</p>
<p>Ntarlagiannis et al., 2004</p>	<p>type : IP : σ et ϕ</p> <p>pas : 2 à 3 fois par semaine au début, moins après</p> <p>fréquences montrées : 35 Hz</p> <p>durée de l'exp : 48 jours?</p>	<p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand : concentrations de sulfate, lactate et acetate par chromatographie ionique Fe et Zn avec ICP-AES les échantillons ont été prélevés sur la colonne géochimie (port + sortie) ainsi que sur les colonnes mesure élec et contrôle à la sortie prélèvements 2 à 3 fois par semaine au début de l'exp, moins souvent après prélèvements / mesures élec sur les 2 colonnes le même jour ou le jour d'après à la fin de l'exp, prélèvement de solide pour SEM : densité de cellules fixées au sédiment et étude de la relation spatiale entre les précipités de sulfures et les microbes</p>

Ntarlagiannis <i>et al.</i> , 2005a	<p>type : amplitude de l'impédance σ et phase Φ calcul de σ' et σ''</p> <p>pas : triplicat tous les 1-2 jours</p> <p>fréquences utilisées : 40 intervalles entre 0.1 et 1000 Hz</p> <p>précision des mesures (comment est-elle calculée?) : $\Phi = 0.2\text{mrad}$ sous 100 Hz (Slater et Lesmes, 2002) reduit à 0.06 mrad à 10 Hz (mesures sur des solutions électrolytiques de σ^* connue) en limitant la longueur des fils, en étudiant les dimensions de la colonne, l'espace et le placement des électrodes</p> <p>durée de l'exp : 21 jours ? (durée max sur graphes)</p>	<p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand : pH, conductivité du fluide σ_w et la densité de cellules C mesurés à l'entrée et à la sortie Day 0 : mesures réalisées 3 jours avant l'injection des bactéries</p> <p>biomasse déterminée en filtrant une quantité de cellules en suspension à travers des mb de 0.2μm, puis en séchant l'échantillon à 60°C et en déterminant le poids sec densité de cellules déterminée par spectrophotométrie UV-VIS (ultraviolet-visible)</p>
Ntarlagiannis <i>et al.</i> , 2005b	<p>type : IP : σ et ϕ</p> <p>pas : 2 à 3 fois par semaine au début, moins après</p> <p>fréquences utilisées : 40 intervalles entre 0.1 and 1000 Hz</p> <p>fréquences montrées : 35 Hz (zone où la polarisation est la plus prononcée et montre l'erreur en phase shift la plus faible)</p> <p>précision des mesures (comment est-elle calculée?) : Entre 0.5 and 100 Hz, l'erreur de la mesure est de moins de 0.5 mrad pour la phase et 0.5% pour l'amplitude de la conductivité [Slater and Lesmes, 2002a] Tests de mesure sur de l'eau comparés à des valeurs</p>	<p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand : concentrations de sulfate, lactate et acetate par chromatographie ionique Fe et Zn avec ICP-AES les échantillons ont été prélevés sur la colonne géochimie (port + sortie) ainsi que sur les colonnes mesure élec et contrôle à la sortie prélèvements 2 à 3 fois par semaine au début de l'exp, moins souvent après prélèvements / mesures élec sur les 2 colonnes le même jour ou le jour d'après à la fin de l'exp, prélèvement de solide pour SEM (au centre de la colonne, à 4cm d'intervalle, à 2cm de zones de fortes réponse élec) : densité de cellules fixées au</p>

	<p>théoriques</p> <p>Tests supplémentaires pour vérifier que les mesures ne sont pas affectées par la circulation des fluides dans les colonnes</p> <p>durée de l'exp : 70 jours</p>	<p>sediment et étude de la relation spatiale entre les précipités de sulfide et les microbes</p>
Ntarlagiannis <i>et al.</i> , 2007	<p>type : mesures SP (plusieurs endroits de la colonne)</p> <p>pas : ttes les 15min</p> <p>durée de l'exp : 400h</p>	<p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand : DO, pH, agitation, température, sol acide (2M HCl) et sol de base (2M NaOH), "antifoam addition" et mélange de gaz (nitrogène vs air) monitorés en continu par AFS-BioCommand Bioprocessing Software en plus du contrôleur BioFlo 110</p> <p>SEM grains de sable et bactéries accrochées enlevés des colonnes et transférées dans une solution fixative contenant du glutaraldehyde à 2.5%. Les échantillons fixés sont déshydratés (éthanol) et séchés, recouverts de carbone évaporé</p>
Ntarlagiannis et Ferguson, 2009	<p>type : SIP : σ et Φ mesurés, σ' et σ'' calculés</p> <p>pas : en duplicat</p> <p>fréquences utilisées : 0.01-100 Hz</p> <p>fréquences montrées : ttes</p> <p>précision des mesures (comment est-elle calculée?) : <0.1mrad (Ntarlagiannis et al., 2005b)</p>	

<p>Personna <i>et al.</i>, 2008</p>	<p>type : mesures SIP (Φ et ρ), configuration à 4 électrodes mesures pour 3 paires d'électrodes de mesure : 1-2, 3-4, 5-6 mesures de potentiel électrodiode avec un multimètre digital à haute impédance</p> <p>fréquences utilisées : 0.1-1000 Hz (40 intervalles, échelle log)</p> <p>précision des mesures (comment est-elle calculée?) : ± 3 mV pour electrodic potential (variations max obsvée sur 5 jours</p> <p>durée de l'exp : 1) transition anaérobie t=1-24 jours 2) phase anaérobie t=25-36 jours 3) transition aérobie t=37-55 jours</p>	<p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand : extraction par seringues stériles tous les 1-2 jours après l'inoculation Eh, pH, conductivité du fluide, [lactate, sulfate, acetate, sulfide] bench top conductivity (Orion 135A, 1μS/cm à 200 mS/cm avec une précision de $\pm 0.5\%$) pH (Hamilton Slimtrode, 3points de calibration > 99%) Eh (MI-800_413, Eh de la solution standard quinhydrone : ± 20 mV) échantillons filtrés et congelés avant analyses IC (ion chromato) pour [lactate, acetate, sulfate], erreur max de ± 3.5 ppm, déviation standard de mesures en triplicat) hydrogen sulfide test kit (HACH model HS-WR), précision de \pm 10%,</p> <p>SEM sur EC2 (jour 21, fin de la transition anaérobie) SEM sur EC1 à la fin de l'exp (jour 55) (energy dispersive X-ray spectroscopy = EDX) échantillons immergés tte la nuit dans du glutaraldehyde à 2.5% et dans une sol tampon de phosphates, rincés 4h avec la sol tampon, déshydratés (éthanol), séchés à l'air ambiant</p>
<p>Slater <i>et al.</i>, 2005</p>	<p>type : amplitude de l'impédance et phase</p> <p>pas : fait une fois que l'équilibre dans la colonne est atteint : même conductivité à l'entrée et à la sortie</p> <p>fréquences utilisées : 40 intervalles, 0.1-1000 Hz</p> <p>fréquences montrées :</p>	

	<p>1 Hz</p> <p>précision des mesures (comment est-elle calculée?) : tests de reproductibilité des résultats : moins de 0.5 mrad pour la phase et 0.5 % pour l'impédance (Slater et Lesmes, 2002)</p>	
Slater et al., 2007	<p>type : σ et φ</p> <p>pas : aux paires 1-2, 3-4 et 5-6, tous les 1-3 jours</p> <p>fréquences utilisées : 40 intervalles, 0.1-1000 Hz</p> <p>fréquences montrées : 0.1-100 Hz</p> <p>précision des mesures (comment est-elle calculée?) : σ = moins de 1% et φ = 0.1 mrad sous 100Hz (Slater et Lesmes, 2002)</p> <p>durée de l'exp : 55 jours</p>	<p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand : prélèvements à la seringue à trois endroits le long de la colonne, tous les 1-2 jours Eh, pH et conductivité (bench-top probes) lactate acétate sulfate : chromatographie ionique H2S estimé avec un kit (HACH HS-WR) (produit de réaction)</p> <p>phase solide analysée à la fin de l'exp : SEM</p>
Slater et al., 2009	<p>type : conductivité de volume</p> <p>pas : 3-7 fois par jour</p> <p>durée de l'exp : 17j pour colonne active 10j pour colonne contrôle</p>	<p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand : pH et conductivité du fluide avec "benchtop probes" 2x par jour</p> <p>tous les jours, prélèvement de fluide à l'entrée et à la sortie de la colonne active pour mesure de la quantité de sélénium dissous avec ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy)</p>
Williams et al., 2005	<p>type : conductivité : phase et amplitude ondes sismiques : vitesse +amplitude</p> <p>pas :</p>	<p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand : [Zn et Fe] dissous par ICP-AES (<i>inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy</i>)</p>

Mesures entre paire d'électrodes, pour toutes les configurations possibles environ une fois par semaine

fréquences utilisées :

0.1-1000 Hz

fréquences montrées :

phase en fonction du spectre (0.1-1000 Hz)

durée de l'exp :

78j

[Lactate + acétate + sulfate]par IC (*gradient elution ion chromatography*)

pH avec des *sulfide-tolerant electrode*

Concentration planctonique : coloration quantitative vivantes/mortes pour chaque lieu de prélèvement

à 6 moments pendant l'exp (jours 2, 12, 19, 29, 53, 64)

Ks(*saturated hydraulic conductivity*) pour une colonne inoculée et une colonne témoin, 4 fois (jours 0,

17, 20 et 53), constant head gradient method

Après les 78 jours d'exp :

concentration de phase solide de Zn et Fe par l'extraction d'1g d'échantillon dans 5M d'HCl (collectés à 2

cm d'intervalle de chacune des trois colonne inoculées)

biomasse fixée aux grains par *phospholipid fatty acid analysis* sur 5g d'échantillon (collectés à 3.5 cm

d'intervalle des trois colonnes inoculées)

échantillons pour SEM collectés à 4 cm d'intervalle le long de chaque colonne, immergés pendant une

nuit dans une solution de glutaraldehyde à 2.5%, rincés 3 fois dans une sol tampon de phosphates,

déshydratés (éthanol), et séchés

phases solides pour analyse au TEM : immersion de 0.5g de sédiments dans du glutaraldehyde à 2.5% et

légèrement secoués pour séparer les cellules et les précipités des grains de sable. Le surnageant est

rincé dans une sol tampon de phosphates, déshydratation (éthanol), mis sur une résine, échantillons

sectionnés au mirotome (70 nm d'épaisseur)

échantillons SEM et TEM préservés en anaérobie jusqu'à analyses

paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand :

Wu *et al.*, 2005

type :

	<p>φ et σ</p> <p>pas : tous les jours pendant les 5 premiers jours tous les 2-3 jours après</p> <p>fréquences utilisées : 40 fréquences entre 0.1 et 1000 Hz</p> <p>précision des mesures (comment est-elle calculée?) : Slater et Lesmes 2002 : moins de 0.5 mrad pour la phase et 0.5% pour l'amplitude de la conductivité</p> <p>durée de l'exp : 25 jours ?</p> <p>remarque : valves d'entrée et sortie fermées pour arrêter la circulation des fluides pour atténuer la différence de pression entre l'entrée et la sortie juste avant les mesures</p>	<p>pH, Eh, et conductivité, DO et concentration de fer dissous : pH et Eh : Corning 313 pH/temperature meter conductivité : conductivimètre Orion 135A DO : méthode Carmin Indigo</p> <p>mesures tous les 2-3 jours</p> <p>SEM : LEO 1530 VP field emission scanning electron microscope with an energy dispersive X-ray (EDX) detector 5 g d'échantillon provenant de l'entrée de chaque colonne</p> <p>XRD : 10 g d'échantillon proches de l'entrée prélevés dans une chambre anaérobie Philips PW3040 powder X-ray diffractometer</p>
Wu et al., 2008	<p>fréquences utilisées : 0.016–1000 Hz.</p> <p>fréquences montrées : ttes</p> <p>précision des mesures (comment est-elle calculée?) : 1% pour l'amplitude et 0.2mrad pour la phase</p>	<p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand : Conductivité, pH, Eh, alcalinité (pour colonne bicarbonate), DO</p> <p>pH (± 0.1) et Eh (± 0.2 mV) : Oakton ion 510 series meter (Vernon Hills, IL)</p> <p>conductivité : Oakton pH/CON 300 Meter ($\pm 1\%$)</p> <p>DO : méthode indigo carmin (0.4 ppm)</p> <p>Alcalinité mesurée par titration (MDL=10 ppm)</p> <p>Mesures tous les jours</p>

		<p>Prélèvement d'échantillons solides en chambre anaérobie en fin d'expérience</p> <p>SEM et mesures de surface spécifique la surface spécifique de chaque échantillon a été mesurée en triplicat avec un "five point Brunauer, Emmett and Teller (BET)" incertitude sur les mesures : moins de 3%</p> <p>XRD (X-ray diffraction) pour identifier la phase minérale : Philips PW3040 powder X-ray diffractometer</p> <p>paramètres mesurés / volume des échantillons prélevés / quand :</p> <p>Conductivité du fluide (σ_w), pH, Eh et fer dissous DO mesuré périodiquement : méthode Carmin Indigo ac tests commerciaux (CHEMetrics, Calverton, VA) pH (± 0.1) et Eh (± 0.2 mV) : Oakton ion 510 series meter (Vernon Hills, IL) conductivité : Oakton pH/CON 300 Meter ($\pm 1\%$) fer dissous : méthode de titration 1, 10-phenanthroline</p> <p>Extraction d'échantillons en chambre anaérobie pour SEM et XRD</p>
<p>Wu <i>et al.</i>, 2009</p>	<p>fréquences utilisées : 0.01–1000 Hz</p> <p>fréquences montrées :</p> <p>fréquences utilisées : 0.01–1000 Hz</p> <p>précision des mesures (comment est-elle calculée?) : misfit fitting procedure (Versteeg et al., 2006) : 1% pour σ, 0.2 mrad pour ϕ.</p> <p>durée de l'exp : 88 jours pour Helena 80 jours pour KC</p> <p>précision des mesures (comment est-elle calculée?) : misfit fitting procedure (Versteeg et al., 2006) : 1% pour σ, 0.2 mrad pour ϕ.</p> <p>durée de l'exp : 88 jours pour Helena 80 jours pour KC</p>	

ANNEXE 4 : SABLE DE FONTAINEBLEAU (SIBELCO, FRANCE)

NE 34

Fiche Technique Type

Composition chimique type

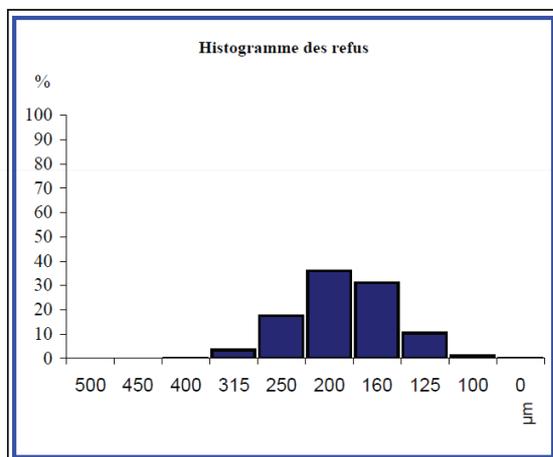
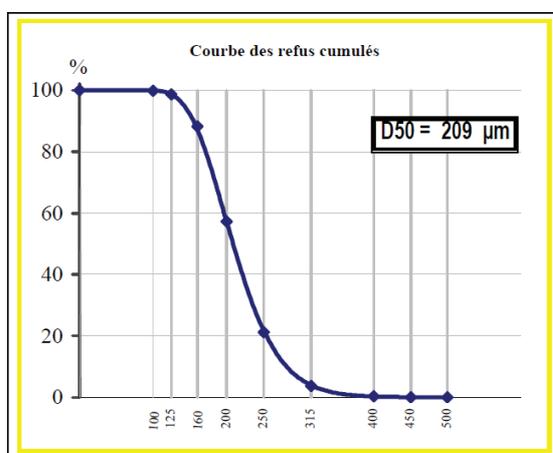
SiO ₂	sup. à	99,83 %
Fe ₂ O ₃	moy. à	0,017 %
Al ₂ O ₃	moy. à	0,050 %
TiO ₂	moy. à	0,017 %
CaO	moy. à	0,007 %
K ₂ O	moy. à	0,005 %

Caractéristiques physiques types

densité réelle (Pycnomètre)	2,65
dureté (Mohs)	7
pH	# 7
densité apparente sable sec ("Prolabo")	1,5
surface spécifique ("G F")	NC
coefficient d'angulosité ("G F")	1,1
perte au feu (à 1000°C)	maxi 0,07%
résistance pyroscopique (SFC ISO R528) ..	1750 °C

GRANULOMETRIE MOYENNE STATISTIQUE

(% en masse - Valeurs indicatives)



TAMISAGE AFNOR X.11-507

ouverture des mailles µm	refus cumulés %
> 500 µm	0,0
> 450 µm	0,1
> 400 µm	0,4
> 315 µm	3,8
> 250 µm	21,2
> 200 µm	57,2
> 160 µm	88,3
> 125 µm	98,6
> 100 µm	99,8
> 0 µm	100,0

CORRESPONDANCE Série R20 ISO 565

ouverture des mailles µm	refus cumulés %
> 2000 µm	0,0
> 1400 µm	0,0
> 1000 µm	0,0
> 630 µm	0,0
> 500 µm	0,0
> 315 µm	3,8
> 250 µm	21,2
> 180 µm	73,7
> 125 µm	98,7
> 63 µm	100,0
passee	0,0

Classe µm	refus par tamis %
> 500 µm	0,0
500-450 µm	0,1
450-400 µm	0,3
400-315 µm	3,4
315-250 µm	17,4
250-200 µm	36,0
200-160 µm	31,1
160-125 µm	10,3
125-100 µm	1,2
Passant	0,2

Classe µm	refus par tamis %
> 2000 µm	0,0
2000-1400µm	0,0
1400-1000µm	0,0
1000 - 630µm	0,0
630 - 500 µm	0,0
500-315 µm	3,8
315 - 250 µm	17,4
250 - 180 µm	52,5
180 - 125 µm	25,0
125 - 63 µm	1,3
< 63 µm	0,0

particules < 20 µm : maxi 0,10 % sur sable lavé



LABORATOIRE DE NEMOURS
2, Rue de Foljuif
77140 Saint-Pierre-Lès-Nemours
Tel : +33 (0)1 64 28 72 74 Fax : +33 (0)1 64 29 22 22

SIEGE SOCIAL ET DIRECTION COMMERCIALE
141 Avenue de CLICHY 75848 PARIS Cedex 17
Tel : +33 (0)1 53 76 82 00 Fax : +33 (0)1 42 25 32 23
site web : www.Sibelco.fr

Ref : 2011-1

ANNEXE 5 : MILIEU DE CULTURE DES BACTÉRIES

Pour effectuer les cultures des différents consortia, un milieu minimum a été utilisé. Ce milieu minimum (MM) a la composition suivante :

$\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; NH_4NO_3 à $1,5 \text{ g.L}^{-1}$; $\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$ à $0,04 \text{ g.L}^{-1}$, deux solutions d'oligo-éléments* à 1 mL.L^{-1}

* Solution oligo-éléments 1 (conservation à 4°C à l'abri de la lumière) :

$\text{CoCl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$ à 1 g.L^{-1} , $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ à 1 g.L^{-1} , $\text{ZnSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ à 1 g.L^{-1} , $\text{AlCl}_3, 6 \text{H}_2$ à $0,4 \text{ g/L}^{-1}$, $\text{NiCl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$ à $0,25 \text{ g.L}^{-1}$, H_3BO_3 à $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, $\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$ à $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ et eau déminéralisée, qsp 1L.

* Solution oligo-éléments 2 (conservation à 4°C et à l'abri de la lumière) :

$\text{NaMoO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$ à 1 g.L^{-1} , $\text{NaWO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$ à 1 g.L^{-1} et eau déminéralisée qsp 1 L.

Ces solutions sont stérilisées par autoclavage à 121°C pendant 20 min. Après refroidissement, les solutions suivantes, stérilisées par filtration (0,22 μm), sont ajoutées : une solution de vitamines** (1 mL.L^{-1}) et une solution de phosphates*** (10 mL.L^{-1}) (tampon pH).

** Solution de vitamines (conservation à -20°C et à l'abri de la lumière) :

Biotine à 200 mg.L^{-1} , Riboflavine à 50 mg.L^{-1} , Acide nicotinamique à 50 mg.L^{-1} , Panthoténate de calcium à 50 mg.L^{-1} , Acide p-aminobenzoïque à 50 mg.L^{-1} , Acide folique à 20 mg.L^{-1} , Thiamine à 15 mg.L^{-1} , Cyanocobalamine (vitamine B12) à $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$, eau déminéralisée.

*** Solution de phosphates : KH_2PO_4 à 140 g.L^{-1} , K_2HPO_4 à 170 g.L^{-1} et eau déminéralisée.

ANNEXE 6 : PROTOCOLE D'UTILISATION DU GDP 32II (24 BITS) POUR LES MESURES DE LABORATOIRE BIOPHY

A. DESCRIPTION DU GDP-32II ET DE SES ACCESSOIRES

1. GDP 32II

Les Figure 0-1 à Figure 0-3 présentent les différentes parties du GDP 32II :

- L'intérieur du couvercle où l'on peut brancher les canaux 1 à 8,
- Le tableau de bord avec son écran de contrôle,
- Les deux panneaux de côté du GDP : à gauche, le panneau de contrôle (bouton ON/OFF, prise de connexion Ethernet pour relier l'appareil à un PC, prise du chargeur...); à droite, le panneau des connexions (branchement du câble connexion du couvercle, ...)

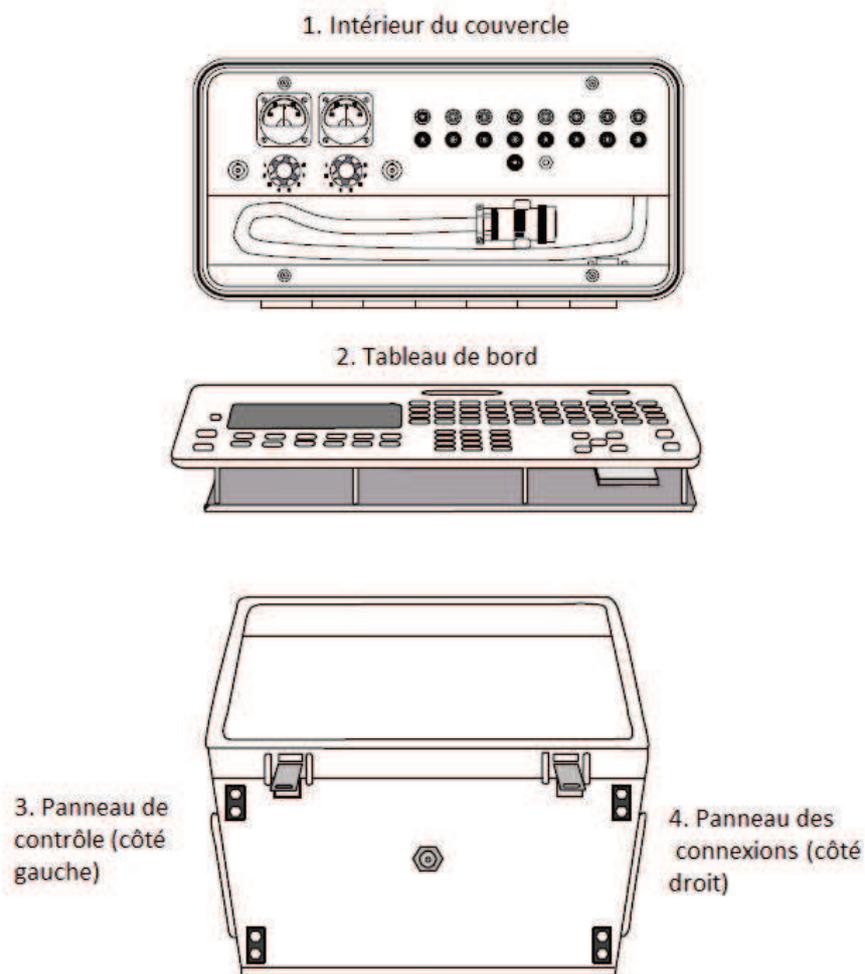


FIGURE 0-1 : SCHÉMA DESCRIPTIF DES DIFFÉRENTES PARTIES DU GDP 32II.

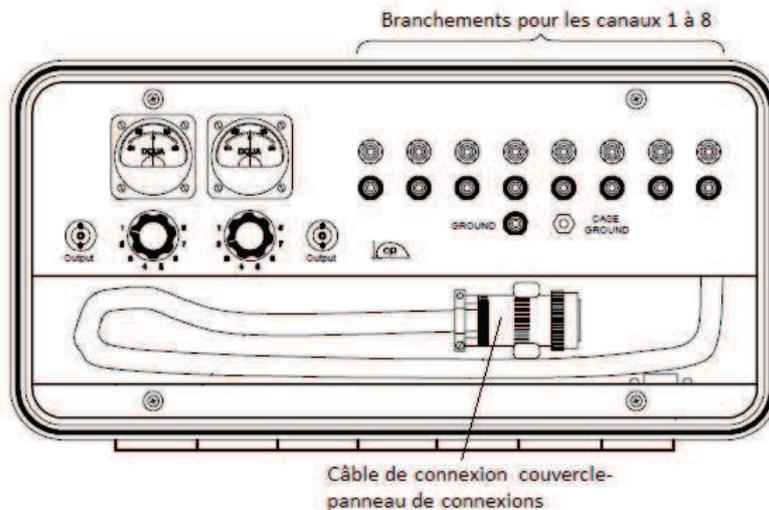


FIGURE 0-2 : SCHÉMA DESCRIPTIF DU COUVERCLE DU GDP 32II.



FIGURE 0-3 : SCHÉMA DESCRIPTIF DU TABLEAU DE BORD DU GDP 32II.

Le GDP 32II du BRGM est un hybride qui contient à la fois des cartes d'acquisition 16 bits (6) et 24 bits (2). Les cartes d'acquisitions 24 bits permettent l'enregistrement des *Time series* complètes. Cependant, seulement 2 voies de mesure sont disponibles (voies 7 et 8) et les 6 cartes 16 bits ont été également utilisées (voies 1 à 6) car elles ont permis de multiplier les mesures simultanées sur les différents couples de mesure disponibles sur les colonnes BIOPHY.

2. LDT-10

Le LDT-10 est l'appareil qui transmet le courant au GDP-32. L'intensité du courant peut être réglée grâce aux deux curseurs RANGE et FINE ADJUSTMENT. Pour avoir la valeur du courant, l'ordre de grandeur donné par RANGE en mA est multiplié par le chiffre donné par le curseur FINE ADJUSTMENT (chiffre avant la virgule sur le cercle et chiffre après la virgule dans la petite fenêtre).

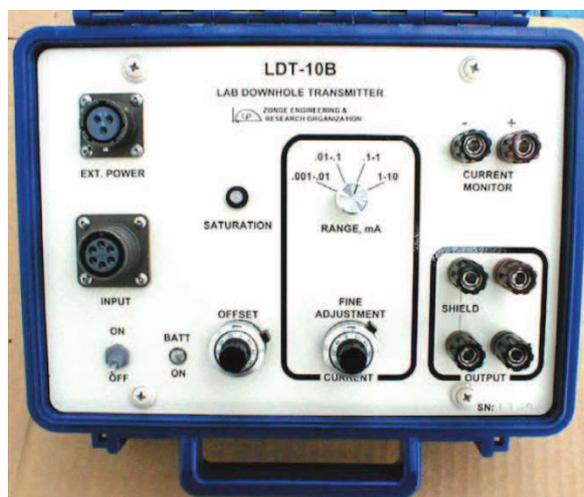


FIGURE 0-4 : PHOTO DU LDT-10.

3. ISO-1B

L'ISO 1B est un amplificateur utilisé pour protéger la voie de courant.

Remarque : l'ISO induit un déphasage : il est nécessaire de l'intégrer dans le circuit de calibration.

B. DÉMARRER L'APPAREIL

- Appuyer sur le bouton « POWER ON/OFF » sur le panneau de contrôle, sur le côté gauche du GDP-32 (Figure 0-2)
- Appuyer sur le bouton vert « POWER ON/OFF » sur le tableau de bord, sur le dessus de l'appareil (Figure 0-3)
- Lorsque l'écran d'accueil est affiché, choisir le mode CR (bouton F3)
- L'écran du mode CR s'affiche alors (Figure 0-5). En utilisant les touches de sélection (« Select Up » et « Select Down »), on peut faire défiler les différentes options pour chaque paramètre :
 - o GAIN : AUTO ; OFF ; MAN ; DONE
 - o NOTCH : OUT ; 50-3 ; 50-359 ; 50-59
 - o ARRAY : lab ; amt ; cont ; d-d ; p-d ; p-p ; sch ; grd ; d-h
- En utilisant les touches de fonction F1 à F6, on peut atteindre d'autres fonctions :
 - o ARCHIVE (F1) : permet d'archiver les données acquises dans un fichier .CAC
 - o CRES (F2) : si on appuie dessus, on atteint le menu RESULT
 - o RESULT (F2) : affiche les résultats de la dernière mesure et on atteint le menu CHAN
 - o OPERATION (F3) : menu pour définir les paramètres de l'expérience (TRANSMITTER SETUP, GDP OPERATOR, SURVEY BY ...)

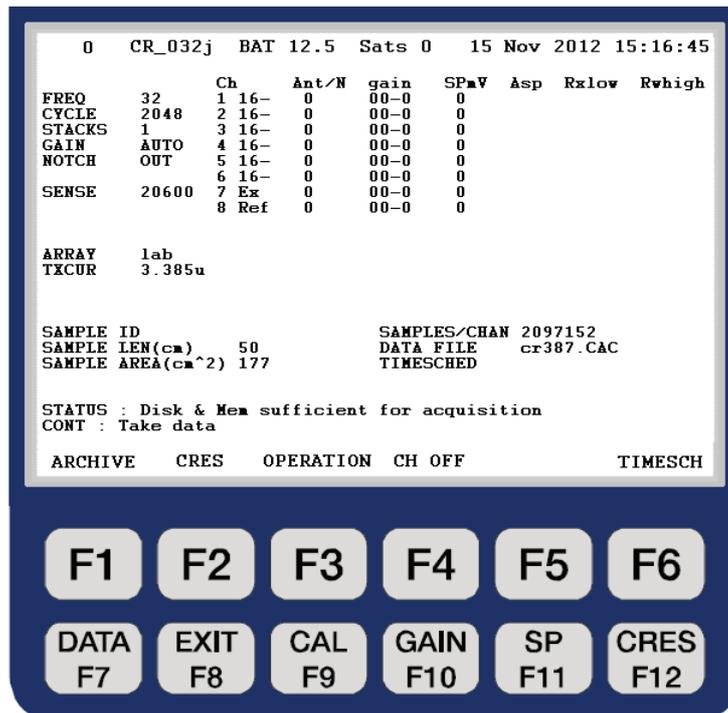


FIGURE 0-5 : ECRAN DU MODE CR.

C. CALIBRATION

Il est conseillé de calibrer l'appareil une fois par jour avant de faire des mesures.

- Brancher le GDP-32 comme présenté sur le schéma suivant (Figure 0-6) :

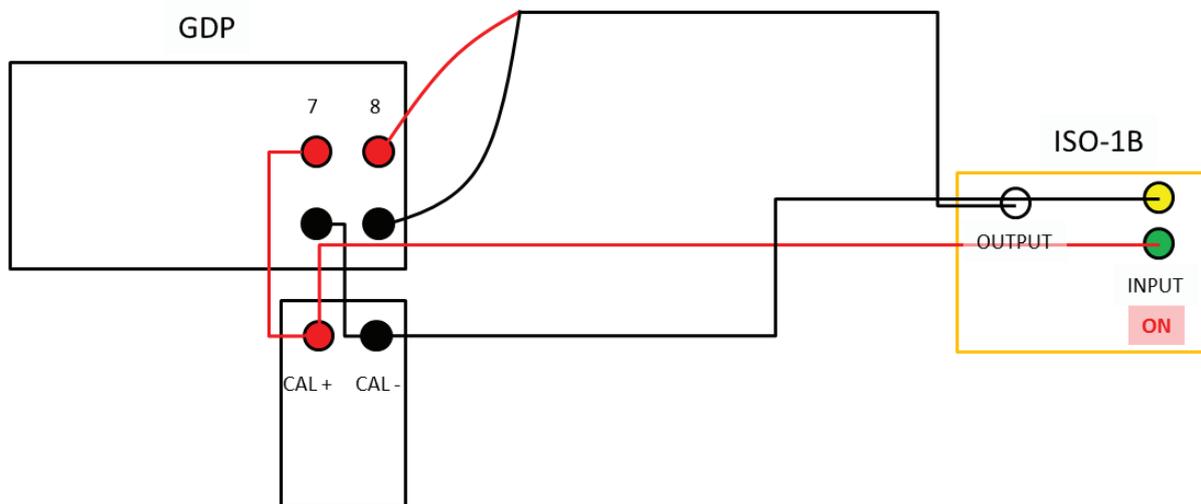


FIGURE 0-6 : SCHÉMA DU DISPOSITIF DE CALIBRATION DU GDP-32.

- Lancer une calibration :
 - o Allumer le ISO-1B
 - o Appuyer sur le bouton « CAL/F9 » du GDP-32

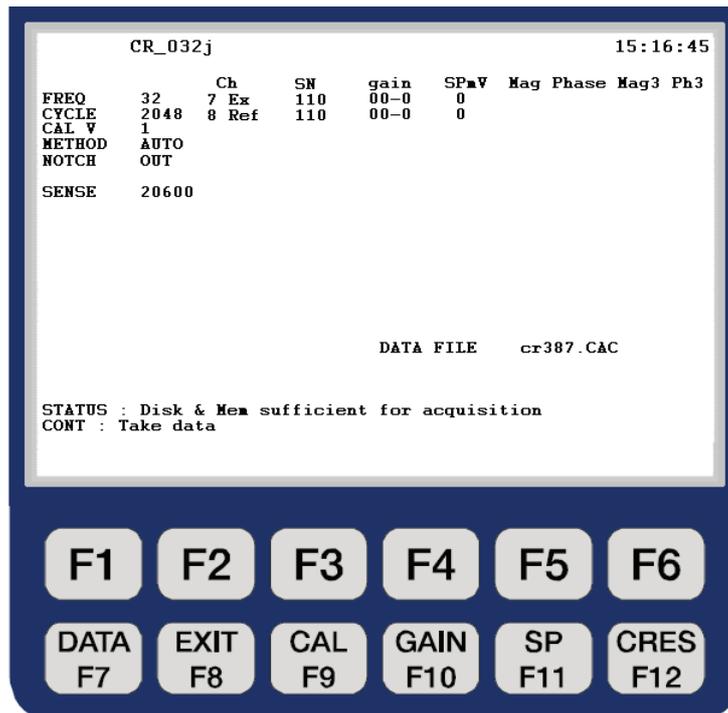


FIGURE 0-7 : ECRAN DU MODE CALIBRATION

- Choisir la fréquence de début (ex : 1/8Hz), le nombre de cycles pour cette fréquence (8 cycles)
- choisir METH AUTO si l'on veut calibrer l'appareil pour toutes les fréquences depuis la première choisie jusqu'à 64 Hz, ou 1SHOT pour calibrer pour une seule fréquence

D. MESURES

- Brancher le GDP-32 comme présenté sur le schéma suivant :
- Choisir la fréquence, le nombre de cycles (ex : 8 pour 0.125 Hz), le nombre de stacks (ex : 6)
- Notch OUT
- Gain AUTO
- ARRAY : Lab
- Appuyer sur « Continue » pour lancer la mesure. En bas de l'écran s'affiche « Taking data ... ». Quand c'est affiché « Take data », la mesure est terminée et on peut lancer la suivante.
- En haut à gauche de l'écran, il y a un chiffre qui indique à quelle mesure on est rendu dans la mémoire du GDP (une fois les données sauvegardées dans un fichier .CAC, le compteur revient à zéro)

Remarque : Réglage de la résistance de shunt

Faire une mesure avec une résistance de shunt (ex : 200 Ω). Regarder si les résistances de la voie de courant et de la voie de mesure sont du même ordre de grandeur. Sinon, changer la valeur de la résistance de shunt.

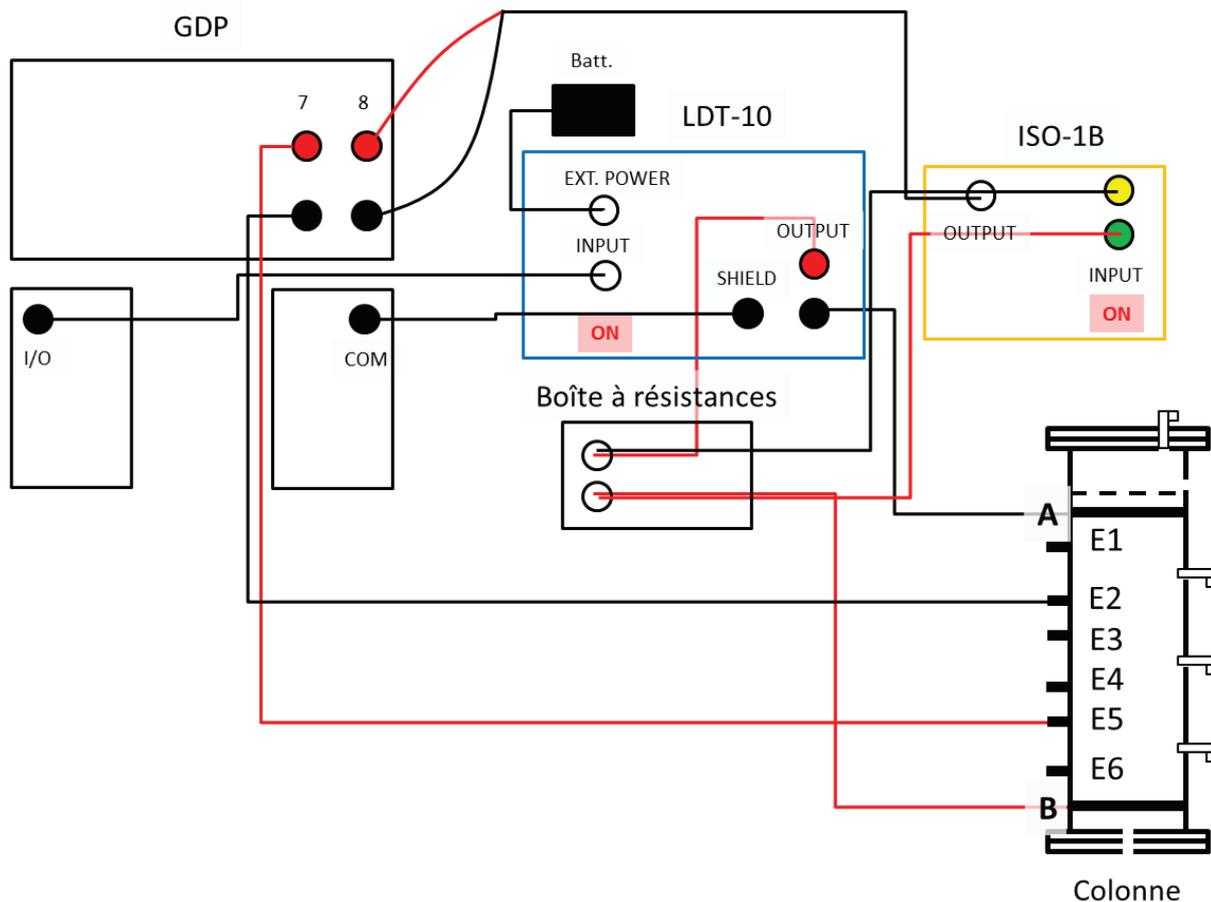


FIGURE 0-8 : SCHÉMA DE MONTAGE DU GDP POUR EFFECTUER UNE MESURE.

E. SAUVEGARDE DES DONNÉES

- Une fois les données acquises, appuyer sur « ARCHIVE » (F1)
- Le GDP propose un nom de fichier .CAC par défaut que l'on peut modifier en utilisant les flèches et le clavier à droite de l'écran
- Pour sauvegarder les données dans le fichier, appuyer sur « Continue »
- Sortir du mode archive en appuyant sur « Escape »

F. TRANSFERT DES DONNÉES SUR LE PC

- Quitter le mode CR pour retourner sur l'écran d'accueil en appuyant sur « Exit » (F8)
- Choisir le mode «Net » (F9)
- Relier le PC et le GDP via un câble Ethernet branché sur la prise « PARALLEL » du côté gauche du GDP
- Appuyer sur « Continue » pour connecter le GDP-32 au PC
- Sur le PC : Démarrer\Ordinateur\Connecter un lecteur réseau : (Z :) \GDP32SN290
- Aller dans le fichier DATA du GDP et récupérer le ou les fichiers .CAC préalablement sauvegardés.

ANNEXE 7 : ELECTRODES DE POTENTIEL Cu/CuSO_4

A. FABRICATION DE DEUX TYPES D'ÉLECTRODES Cu/CuSO_4

1. ELECTRODE TYPE TUBE

Elle est fabriquée sur le modèle de Mainault (2004) (Figure 0-1). Elle est constituée :

- d'un tube en plastique (10 cm de long, diamètre intérieur de 5 mm, extérieur de 8 mm),
- d'une solution sursaturée en CuSO_4 gélifiée (26 g pour 100 mL) et de gélatine alimentaire (2 feuilles pour 100 mL). Le gel sert d'électrolyte,
- d'un fil de cuivre (câble coaxial dénudé, fil de cuivre poli au papier de verre pour enlever une vitrification éventuelle et lavé à l'éthanol + eau),
- d'un filtre (acétate de cellulose ?) entouré d'une pièce cylindrique en plastique noir.

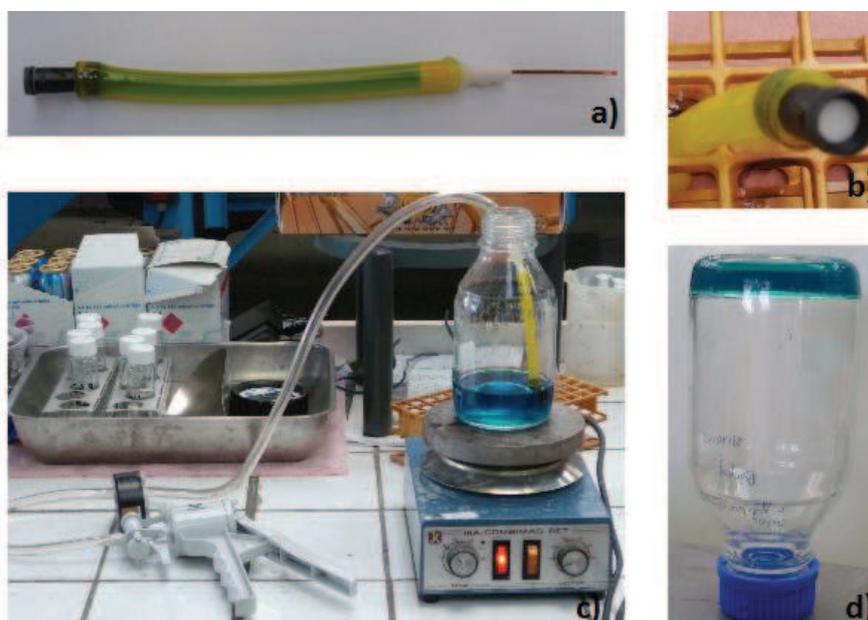


FIGURE 0-1 : A) ELECTRODE Cu/CuSO_4 DE TYPE TUBE SUR LE MODÈLE DE L'IPGP ; B) ZOOM SUR LE FILTRE EN BOUT D'ÉLECTRODE ; C) REMPLISSAGE DU FILTRE PAR UNE POMPE À VIDE : L'EXTRÉMITÉ DE L'ÉLECTRODE EST PLONGÉE DANS LA SOLUTION DE CuSO_4 ET LE GEL EST ASPIRÉ À L'INTÉRIEUR DU TUBE ; D) GEL DE CuSO_4 .

Le filtre ferme une des extrémités de l'électrode. Il est imbibé par la solution de CuSO_4 grâce à une pompe à vide : l'extrémité de l'électrode avec le filtre est plongée dans la solution de CuSO_4 et le gel est aspiré à l'intérieur du tube. Le filtre est poreux et assure le contact électrique entre l'électrode et le milieu.

Le tube en plastique est rempli du gel de CuSO_4 . Il est introduit chaud (50-60°C environ) dans le tube et l'électrode est laissée à refroidir 12h.

L'autre extrémité est refermée une fois que la solution de CuSO_4 est refroidie et qu'il n'y a plus de bulle d'air (niveau complété si besoin). Le bouchon est constitué de la gaine plastique du câble et de colle (appliquée avec un pistolet à colle).

2. ELECTRODE TYPE CÔNE

Elle est fabriquée sur le même principe que l'électrode de type tube (Figure 0-2) :

- Le tube en plastique est remplacé par un cône de pipette (14 cm de long, diamètre maximum de 11.5 mm, minimum de 1.8 mm).
- On garde le même fil de cuivre.
- Le filtre de nature inconnue est remplacé par un fritté Vycor (céramique), maintenu sur le cône par un tube plastique thermo-rétractable.

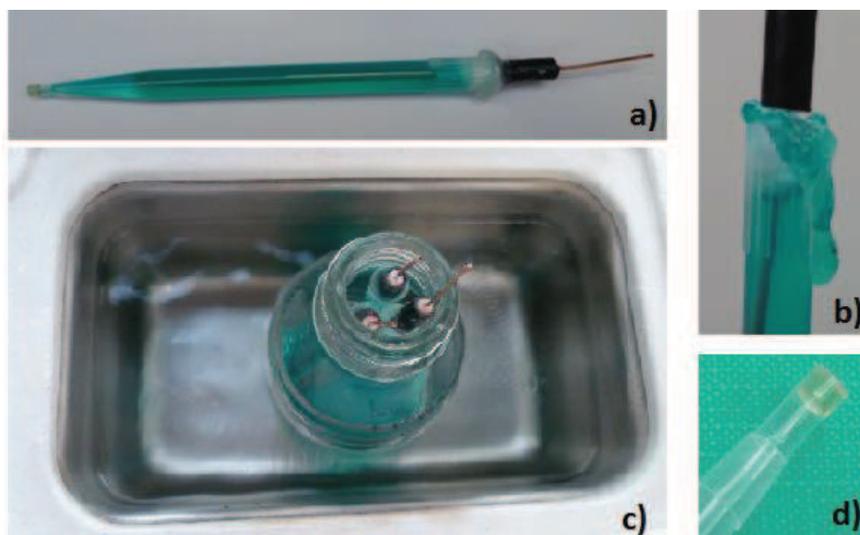


FIGURE 0-2 : A) ELECTRODE Cu/CuSO_4 DE TYPE CÔNE ; B) MISE EN PLACE DU BOUCHON DE L'ÉLECTRODE ; C) TROIS ÉLECTRODES DANS LE BAIN À ULTRASONS ; D) ZOOM SUR LE FRITÉ VYCOR EN BOUT D'ÉLECTRODE.

Le cône est aussi rempli d'un gel de CuSO_4 chaud que l'on laisse refroidir. Il faut faire particulièrement attention à l'extrémité de l'électrode avec le fritté Vycor® : le diamètre étant petit, il y a facilement apparition de bulles d'air.

L'autre extrémité est refermée par le même type de bouchon (gaine plastique du câble, ruban téflon et colle).

L'électrode est laissée à refroidir, la tête en bas. Le fritté n'est pas laissé à l'air libre : l'extrémité de l'électrode trempe dans une solution de CuSO_4 .

Après refroidissement, s'il y a des bulles d'air au niveau du fritté, les électrodes sont placées dans un bain à ultrasons, plongées dans une solution de CuSO_4 . Elles sont chauffées (60°C) et agitées aux ultrasons une quinzaine de minutes (les bulles d'air remontent sur le haut de l'électrode).

B. TEST DE STABILITÉ DES ÉLECTRODES : MESURE DE DIFFÉRENCE DE POTENTIEL (DDP)

Une fois les électrodes fabriquées, leur stabilité pour la mesure d'un potentiel électrique a été testée. Pour cela, la différence de potentiel (ddp) a été mesurée entre les électrodes Cu/CuSO_4 et une électrode de référence.

Les électrodes de référence utilisées ici sont des électrodes au calomel saturé (ECS, $\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}$). Le potentiel de ces électrodes par rapport à ENH est de 241 mV.

L'expérience a été menée dans deux cellules d'électrochimie remplies d'une solution de KCl et contenant chacune 4 électrodes Cu/CuSO_4 du même type et une électrode de référence (Figure 0-3).

Les électrodes sont reliées à une centrale d'acquisition Keithley et des mesures de ddp sont réalisées toutes les minutes. L'acquisition a eu lieu pendant 30h.

Au bout de 24h de mesure, les deux électrodes de référence ECS ont été régénérées. Elles ont été re-remplies d'une solution de KCl (3M) pour chasser l'air qui était présent.

En fin d'expérience, il a été observé que l'eau de la cellule électrochimique des électrodes tube était troublée par l'apport de CuSO_4 . Les électrodes de type tube auraient plus tendance à fuir que les électrodes de types cône. Cependant, l'apparition de bulles d'air dans les électrodes n'est pas observée, ce qui laisse à penser que les fuites sont faibles.

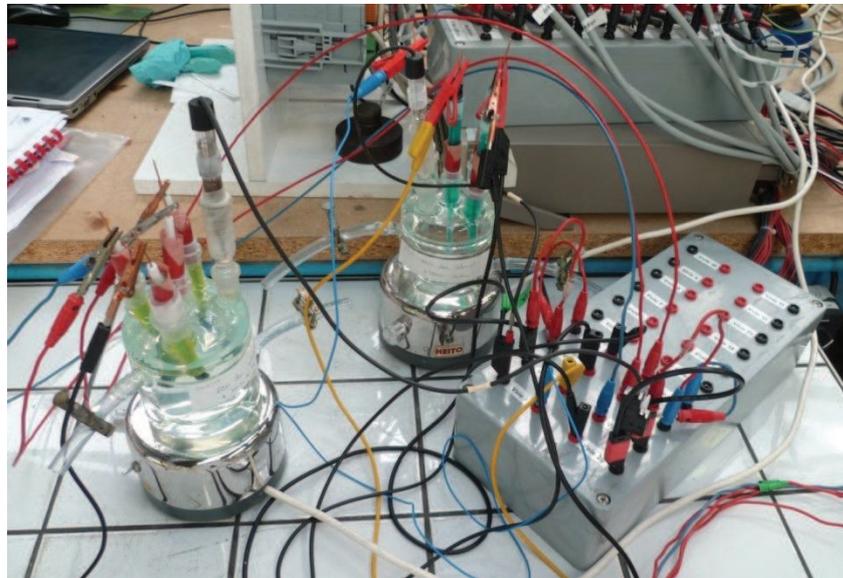


FIGURE 0-3 : TEST DE LA STABILITÉ DE DEUX TYPES D'ÉLECTRODES Cu/CuSO_4 : 4 ÉLECTRODES SONT PLONGÉES DANS UNE CELLULE ÉLECTROCHIMIQUE REMPLIE D'UNE SOLUTION DE KCl. LA DDP (MV) DE CHACUNE DES ÉLECTRODE EST MESURÉE PAR RAPPORT À UNE ÉLECTRODES DE RÉFÉRENCE ECS.

La Figure 0-4 montre l'évolution de la ddp en fonction du temps des électrodes de type cône. Les premières mesures sont très bruitées pour les quatre électrodes testées. Cependant, les électrodes donnent des mesures très stables une fois que l'électrode de référence a été régénérée au bout de 24h.

Pour les électrodes de type tubes (Figure 0-5), des sauts de la ddp sont observés. Cependant, ces variations sont les mêmes pour les quatre électrodes, ce qui laisse à penser que le problème vient de l'électrode de référence. En effet, une fois que l'électrode de référence été a régénérée au bout de 24h, les mesures de ddp sont stables également.

Conclusion :

Les deux types d'électrodes Cu/CuSO_4 mesurent un potentiel de façon stable.

Remarque :

On observe que les électrodes de type tube ont plus tendance à fuir que les électrodes de types cône (l'eau des cellules d'électrochimie est troublée et légèrement colorée par l'apport de CuSO_4).

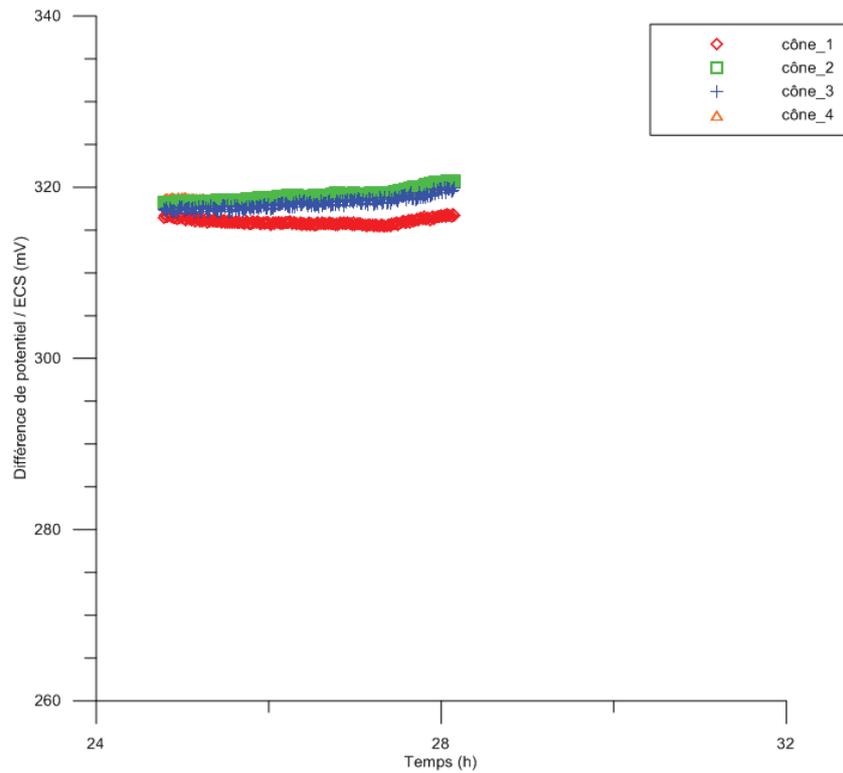


FIGURE 0-4 : EVOLUTION DE LA DIFFÉRENCE DE POTENTIEL DE QUATRE ÉLECTRODES CU/CUSO₄ DE TYPE CÔNE PAR RAPPORT À UNE ÉLECTRODE DE RÉFÉRENCE ECS, DANS UNE SOLUTION DE KCL, AU COURS DU TEMPS. UNE FOIS L'ÉLECTRODE DE RÉFÉRENCE RÉGÉNÉRÉE (T=24H), LA DDP DES QUATRE ÉLECTRODES CU/CUSO₄ EST STABLE.

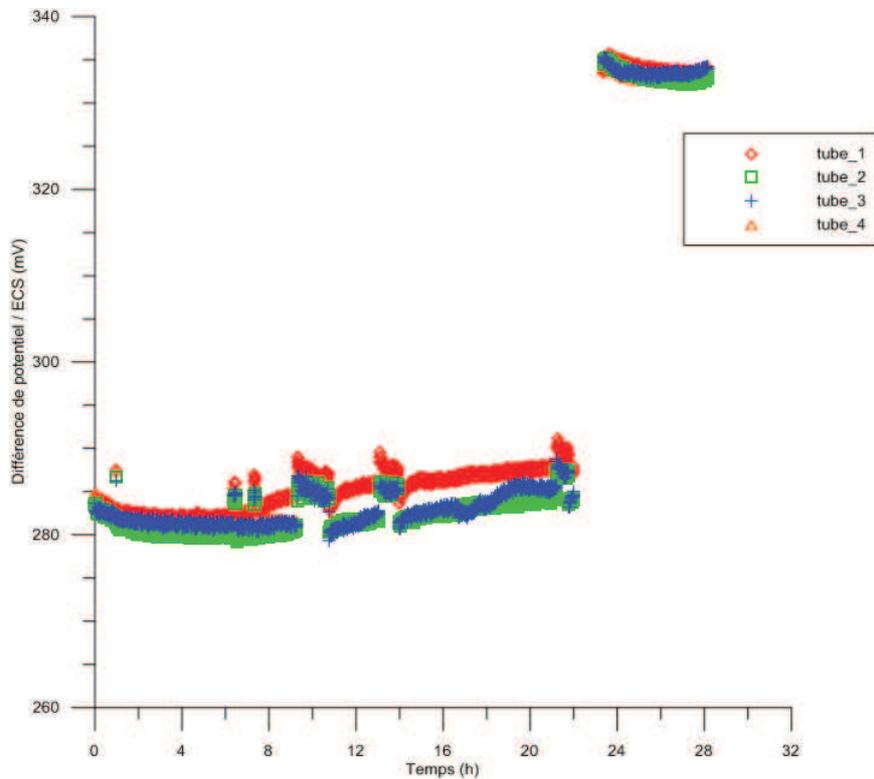


FIGURE 0-5 : EVOLUTION DE LA DIFFÉRENCE DE POTENTIEL DE QUATRE ÉLECTRODES CU/CUSO₄ DE TYPE TUBE PAR RAPPORT À UNE ÉLECTRODE DE RÉFÉRENCE ECS, DANS UNE SOLUTION DE KCL, AU COURS DU TEMPS. A 24H, L'ÉLECTRODE DE RÉFÉRENCE A ÉTÉ RÉGÉNÉRÉE CE QUI EXPLIQUE LE « SAUT » DES DDP.

C. TEST DES ÉLECTRODES SUR COLONNES D'EAU : MESURES PP

Les électrodes fabriquées doivent être impolarisables, c'est-à-dire que la phase de la résistivité complexe mesurée doit être nulle dans un milieu non polarisable comme l'eau salée.

Sur les électrodes Cu/CuSO₄, la partie métallique de l'électrode (le fil de cuivre), n'est pas en contact direct avec le milieu, elle est protégée par l'électrolyte (le gel de CuSO₄) qui assure le contact électrique entre le milieu et le métal.

Des mesures de polarisation provoquée (PP) ont été faites sur 6 électrodes de chaque type mises en place sur 2 colonnes (Figure 0-6). Les colonnes ont été remplies d'une solution de KCl. Elles ont été placées dans une étuve thermostatée à 25°C.

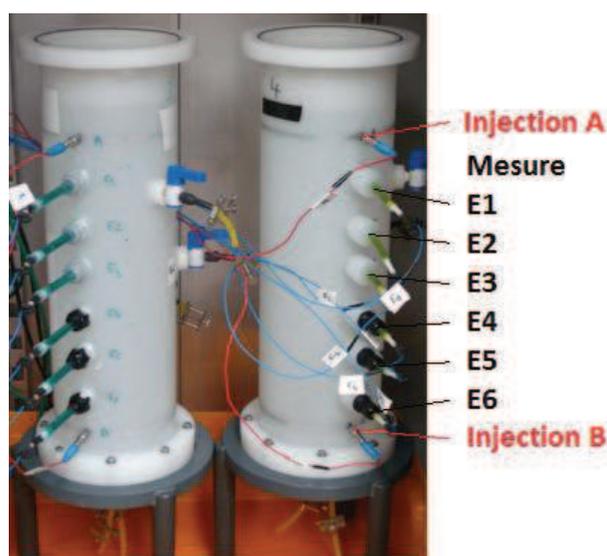


FIGURE 0-6 : ELECTRODES CU/CUSO₄, PLACÉES SUR LES COLONNES REMPLIES D'UNE SOLUTION DE KCl : TYPE CÔNE À GAUCHE, TYPE TUBE À DROITE. INJECTION DE COURANT EN HAUT ET EN BAS DE LA COLONNE (ÉLECTRODES A ET B) ET MESURE DE POTENTIEL LE LONG DE LA COLONNE (ÉLECTRODES CU/CUSO₄, E1 À E6).

Les conductivités de l'eau salée (KCl à 1g/L) mesurées au début de l'expérience sont :

- Pour la colonne des électrodes tubes : $\sigma_{\text{tubes}}=1666 \mu\text{S/cm}$,
- Pour la colonne des électrodes cônes : $\sigma_{\text{cones}}=2050 \mu\text{S/cm}$.

Les mesures ont été réalisées sur plusieurs appareils :

- Le GDP 32 en mode 16 bits et 24 bits (entre 63 mHz et 1.024 kHz) ;
- Les deux Princeton (appareils d'électrochimie) (entre 0,8 mHz et 100kHz).

Les tests sur eau salée ont duré 8 jours (du 28/10/13 au 4/11/13), avec des mesures réalisées les 28/10, 30/10 et 4/11 pour le GDP (couples E1E4, E2E5 et E3E6) et quasiment en continu pour les Princeton 273A (couple E2E5, un appareil par colonne).

1. COMPARAISON DES DEUX TYPES D'ÉLECTRODES

Sur la Figure 0-7, la phase de la résistivité complexe est présentée en fonction de la fréquence, pour le couple de mesure E2E5, pour les deux types d'électrodes. Les mesures ont été faites par le GDP 32, en mode 16bits, le 30/10/13 (deux jours après le début de l'immersion des électrodes dans les colonnes).

On peut voir que la phase est proche de 0 mrad pour les fréquences comprises entre 0,3 et 100 Hz. Avant et après, la phase diverge.

L'amplitude de la résistivité complexe est présentée en annexe 2.

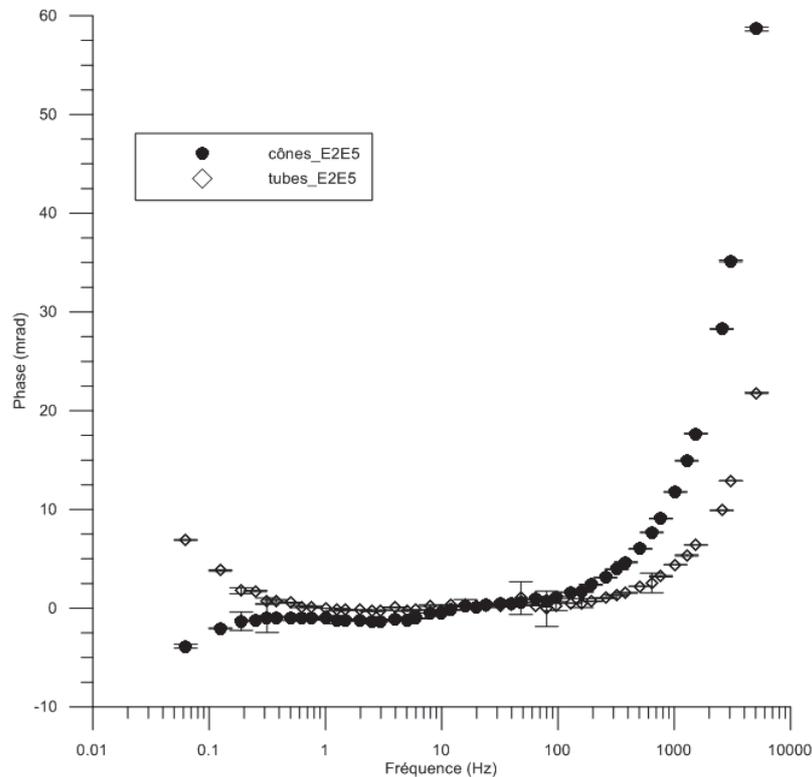


FIGURE 0-7 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE D'UNE COLONNE D'EAU SALÉE, MESURÉE PAR LE GDP 32 EN MODE 16 BITS, POUR LE COUPLE E2E5, SUR LES ÉLECTRODES DE TYPE CÔNE (ROND PLEIN) ET DE TYPE TUBE (LOSANGE VIDÉ). LES BARRES D'ERREUR CORRESPONDENT À UN ÉCART TYPE CALCULÉ SUR 6 MESURES PAR FRÉQUENCE.

2. INFLUENCE DE LA POSITION DES ÉLECTRODES SUR LA COLONNE

La Figure 0-8 est réalisée à partir des mesures faites sur différents couples de mesure d'électrodes de type cône (E1E4, E2E5, E3E6, E1E6 et E3E4), le 30/10/13, avec le GDP 32 (16 bits).

On remarque que la position des électrodes de mesure par rapport aux électrodes d'injection a une influence sur la phase de la résistivité complexe. En effet, lorsque l'une ou les deux électrodes du couple de mesure sont à proximité des électrodes d'injections (E1E6, E1E4 et E3E6), des fluctuations de la phase sont observées. Elles ne sont plus présentes lorsque les électrodes de mesures sont assez éloignées des électrodes d'injection (E2E5 et E3E4).

Ces problèmes ont été identifiés par Zimmermann *et al.* (2010). L'erreur sur la phase serait causée par une anisotropie de la distribution du courant dans la colonne. Pour minimiser cette erreur, les auteurs préconisent un ratio de la distance entre les électrodes de courant et les électrodes de mesure et la largeur de la colonne de 2:1 ou plus (Annexe 8).

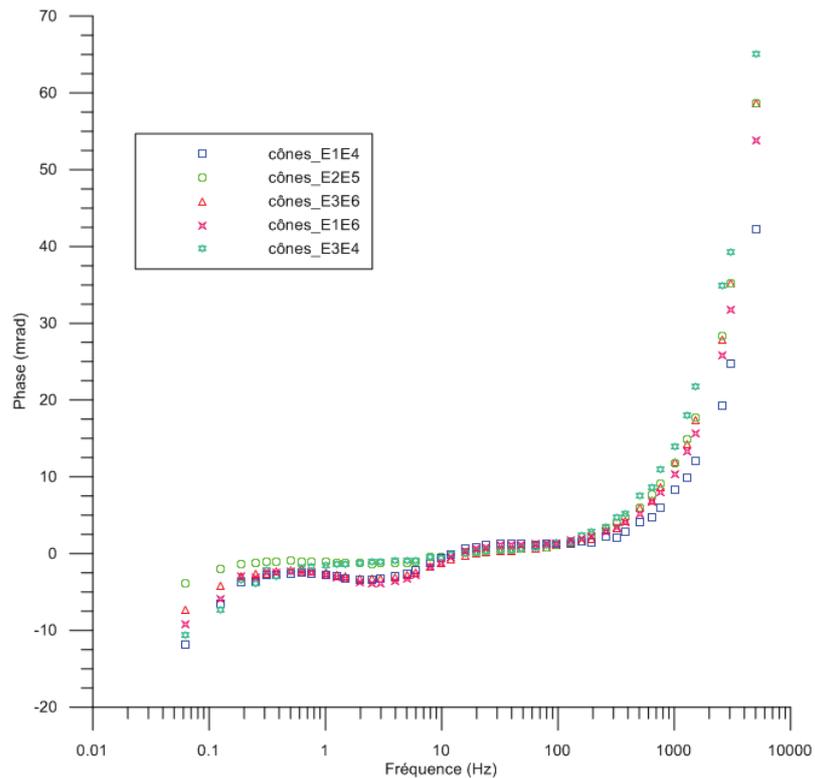


FIGURE 0-8: PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE SUR DIFFÉRENTS COUPLES D'ÉLECTRODES DE MESURES, AVEC LE GDP 32 EN MODE 16 BITS, POUR LES ÉLECTRODES DE TYPE CÔNE. DES FLUCTUATIONS DE LA PHASE SONT OBSERVÉES LORSQU'UNE OU LES DEUX ÉLECTRODES DE MESURE SONT TROP PROCHES DES ÉLECTRODES D'INJECTION.

3. COMPARAISON DES APPAREILS DE MESURE

Si l'on compare les mesures obtenues avec les différents appareils (Figure 0-9Figure 0-10), on remarque que les mesures effectuées avec le GDP, que ce soit en mode 16 ou 24 bits, sont les plus stables. La phase est proche de 0 mrad entre 0,1 et 100 Hz.

L'appareil PAR 2273 le plus récent (Princeton_new) donne des mesures très correctes également, excepté autour de 100 Hz où deux pics à +100 et -100 mrad apparaissent pour les électrodes cônes Figure 0-9 et un pic à -100 mrad pour les tubes (Figure 0-10).

Pour l'ancien Princeton (Princeton_old), il y a un saut des mesures à 10 Hz (problème de l'appareil ?). Mais la phase reste autour de 0 mrad entre 2 et 100 Hz.

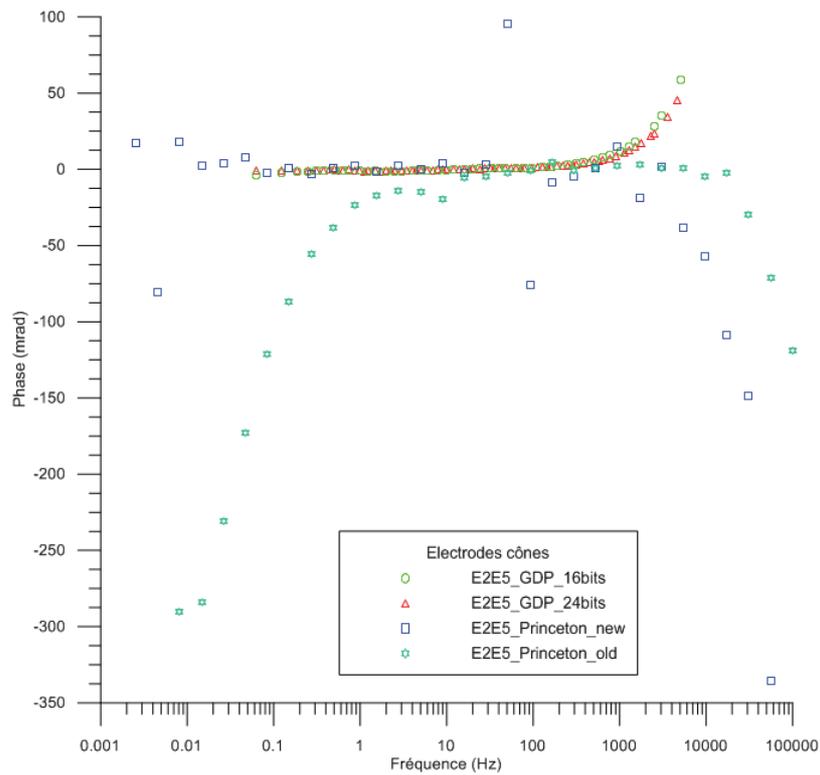


FIGURE 0-9 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE AVEC DIFFÉRENTS APPAREILS (GDP 32 EN MODES 16 ET 24 BITS, ET LES DEUX PRINCETON, L'ANCIEN ET LE NOUVEAU) POUR LES ÉLECTRODES DE TYPE CÔNE, POUR LE COUPLE E2E5.

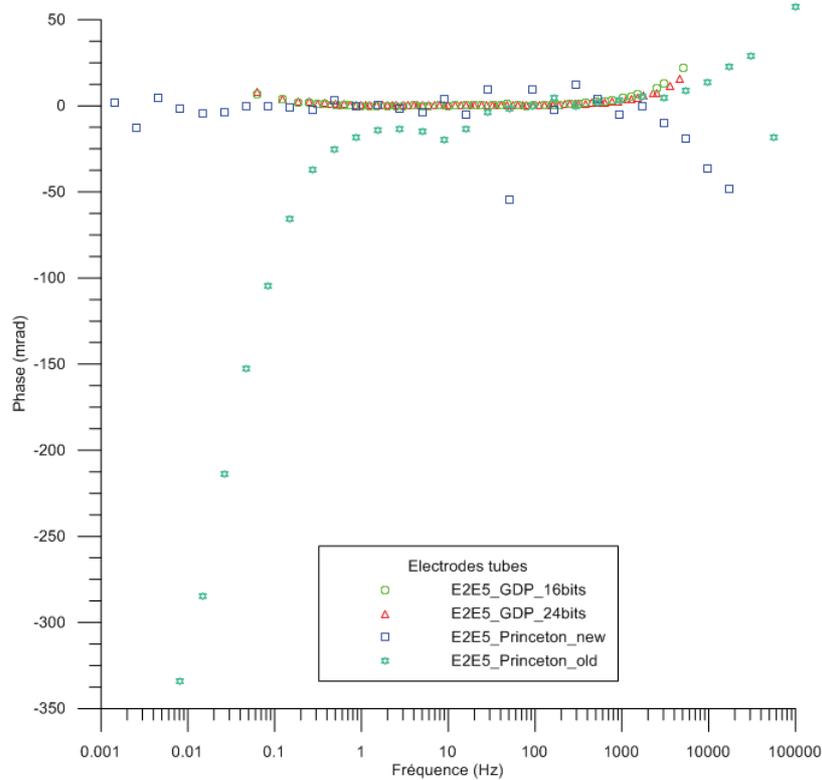


FIGURE 0-10 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE AVEC DIFFÉRENTS APPAREILS (GDP 32 EN MODES 16 ET 24 BITS, ET LES DEUX APPAREILS PAR, L'ANCIEN ET LE NOUVEAU) POUR LES ÉLECTRODES DE TYPE TUBE, POUR LE COUPLE E2E5.

4. ÉVOLUTION DANS LE TEMPS

Les mesures dans l'eau salée ont été réalisées sur 8 jours, entre le 28/10/13 et le 04/11/13.

a) CONDUCTIVITÉ DU FLUIDE

Des mesures de la conductivité de l'eau ont été réalisées 4 fois au cours de l'expérience pour les deux colonnes (Tableau 0-1) :

TABLEAU 0-1 : EVOLUTION DE LA CONDUCTIVITÉ DE LA SOLUTION DE KCL DANS LES DEUX COLONNES AU COURS DU TEMPS.

Date	Colonne électrodes tubes		Colonne électrodes cônes	
	Conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Evolution (%)	Conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Evolution (%)
28/10	1666	-	2050	-
30/10	1694	1.65	2100	2.38
31/10	1711	2.63	2130	3.75
04/11	1771	5.93	2210	7.24

On remarque que la conductivité a tendance à augmenter au cours du temps. On peut penser à des fuites de CuSO_4 au niveau des électrodes ; et peut être aussi à une évaporation de l'eau (le niveau d'eau dans les colonnes a diminué de 2 cm environ en 8 jours, sans fuites apparentes). Cela peut être aussi un effet combiné des deux phénomènes.

b) MESURES PP

En ce qui concerne les mesures de la résistivité complexe, trois mesures ont été faites avec le GDP sur les trois couples E1E4, E2E5 et E3E6. Et un suivi toutes les heures a été mis en place sur le couple E2E5 avec les deux appareils PAR (un appareil par colonne).

Sur les Figure 0-11Figure 0-12 qui présentent les mesures de phase faites avec le GDP sur le couple E2E5, on peut voir que les mesures effectuées le premier jour sont plus bruitées et moins stables que les deux autres mesures, 3 et 8 jours après immersion des électrodes dans la colonne.

Les deux dernières séries de mesures effectuées avec le GDP sont stables et la phase est proche de 0 mrad entre 0,3 et 100 Hz pour les deux types d'électrodes.

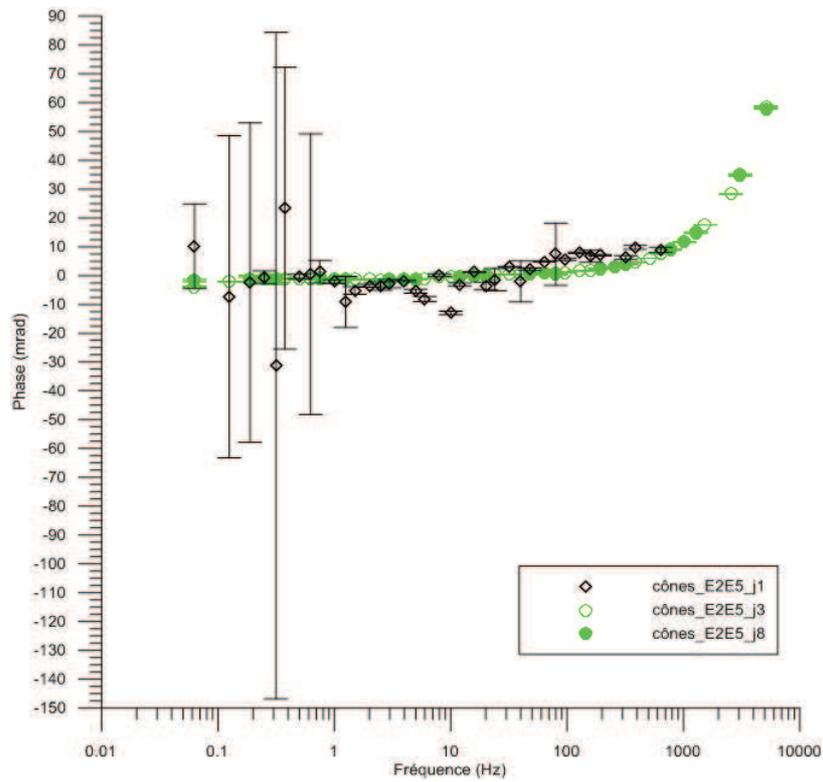


FIGURE 0-11 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE LE 28/10 (JOUR 1 APRÈS IMMERSION), LE 30/10 (JOUR 3) ET LE 4/11 (JOUR 8) AVEC LE GDP EN MODE 16 BITS, POUR LES ÉLECTRODES DE TYPE CÔNE, POUR LE COUPLE E2E5.

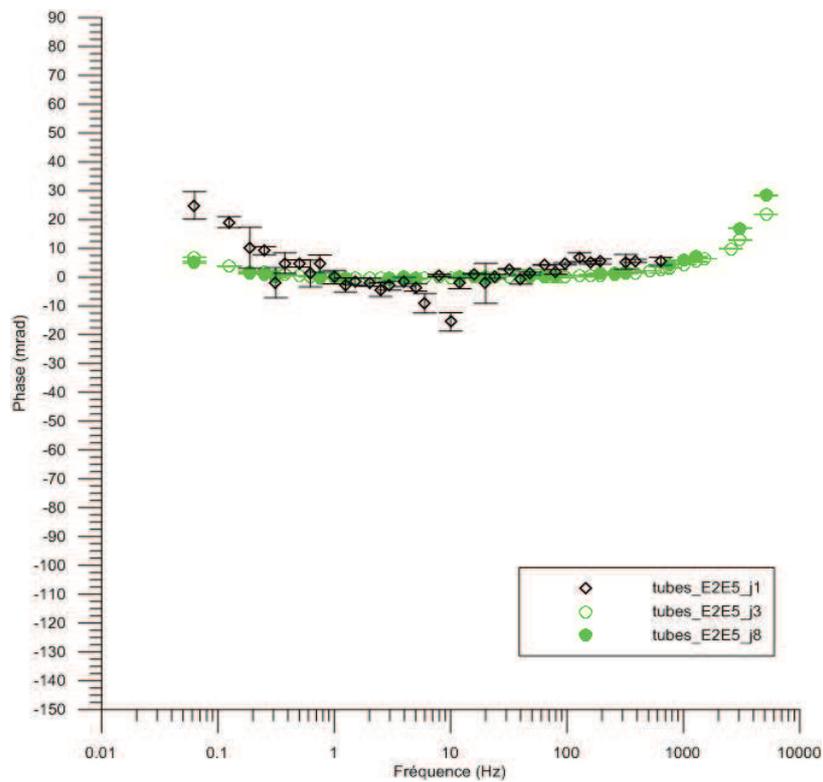


FIGURE 0-12 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE LE 28/10 (JOUR 1 APRÈS IMMERSION), LE 30/10 (JOUR 3) ET LE 4/11 (JOUR 8) AVEC LE GDP EN MODE 16 BITS, POUR LES ÉLECTRODES DE TYPE TUBE, POUR LE COUPLE E2E5.

Pour les mesures effectuées avec les appareils PAR (Figure 0-13Figure 0-14), on observe de nouveau le problème à 100 Hz avec le nouveau Princeton 2273 (pics de la phase entre +100 et -100 mrad). Et un saut à 10 Hz avec l'ancien Princeton 273A.

Sinon, les mesures sont stables au cours du temps et proches de 0 mrad entre 0,1 et 1000 Hz pour le nouveau Princeton, et entre 2 et 1000 Hz pour l'ancien.

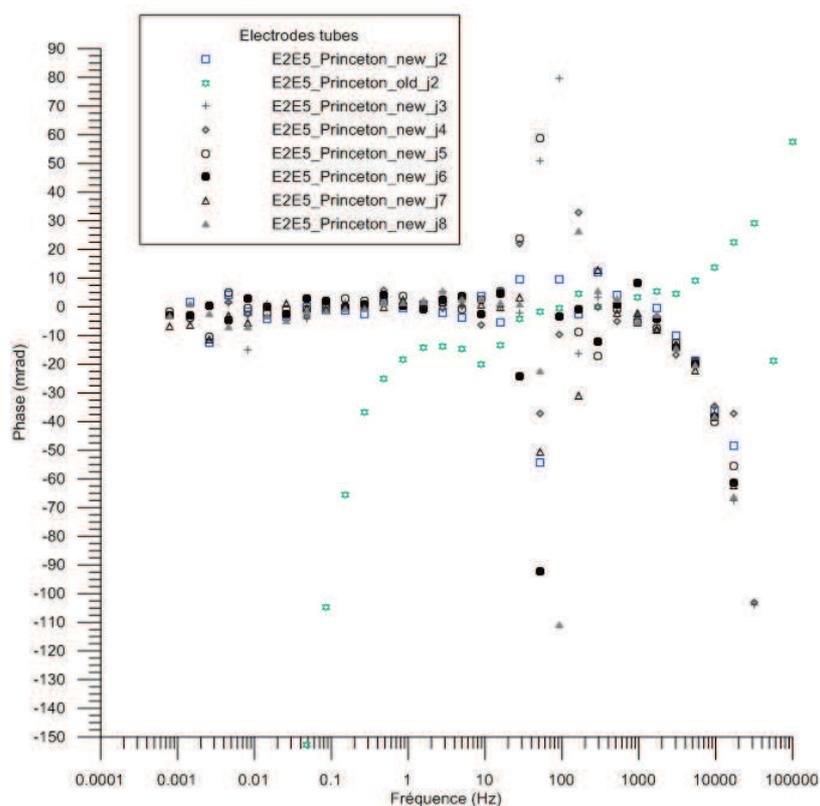


FIGURE 0-13 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE UNE FOIS PAR JOUR AVEC LES APPAREILS PAR, POUR LES ÉLECTRODES DE TYPE TUBE, POUR LE COUPLE E2E5.

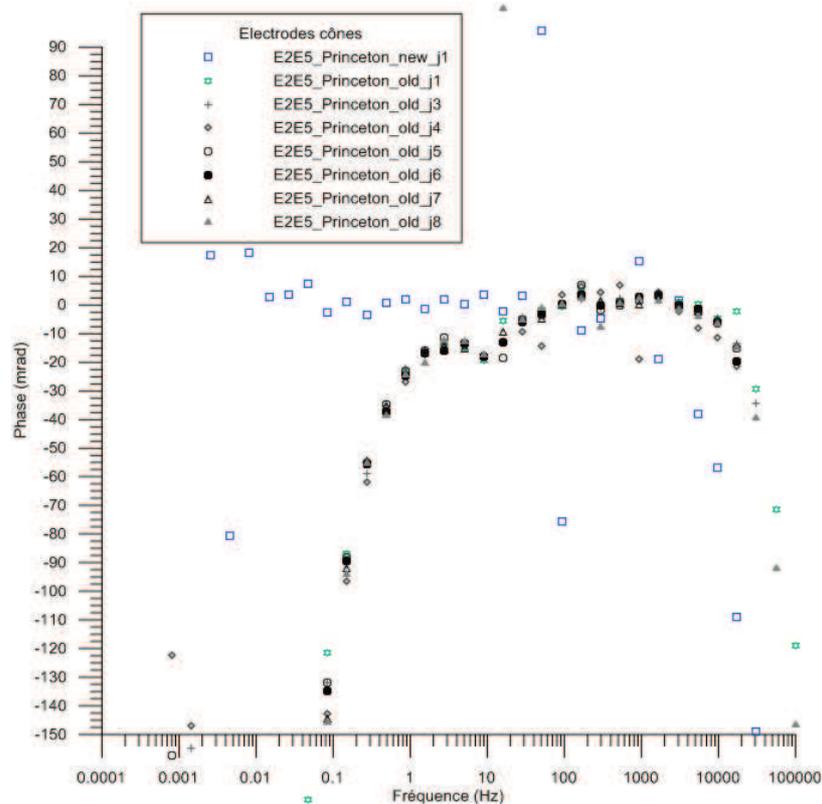


FIGURE 0-14 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE UNE FOIS PAR JOUR AVEC LES APPAREILS PAR, POUR LES ÉLECTRODES DE TYPE CÔNE, POUR LE COUPLE E2E5.

Conclusion :

On peut supposer que les électrodes nécessitent un temps de stabilisation.

Elles restent stables sur une semaine de mesure au moins dans l'eau.

Remarque :

On observe quelques variations de phase dues aux appareils de mesures avec les appareils PAR (à 100 Hz avec le nouveau et à 10 Hz avec l'ancien).

D. TEST DES ÉLECTRODES SUR COLONNES DE SABLE SATURÉ : MESURES PP

Après les tests dans l'eau salée, les colonnes ont été remplies de sable de Fontainebleau qui a été saturé une solution de KCl (1g/L). L'expérience a duré 8 jours, du 05/11/13 au 12/11/13.

1. COMPARAISON DES TYPES D'ÉLECTRODES

Si l'on compare les deux types d'électrodes (Figure 0-15), on observe que la phase est nulle entre 0,3 et 70 Hz pour les électrodes de type cône et entre 0,3 et 100 Hz pour les électrodes de type tubes.

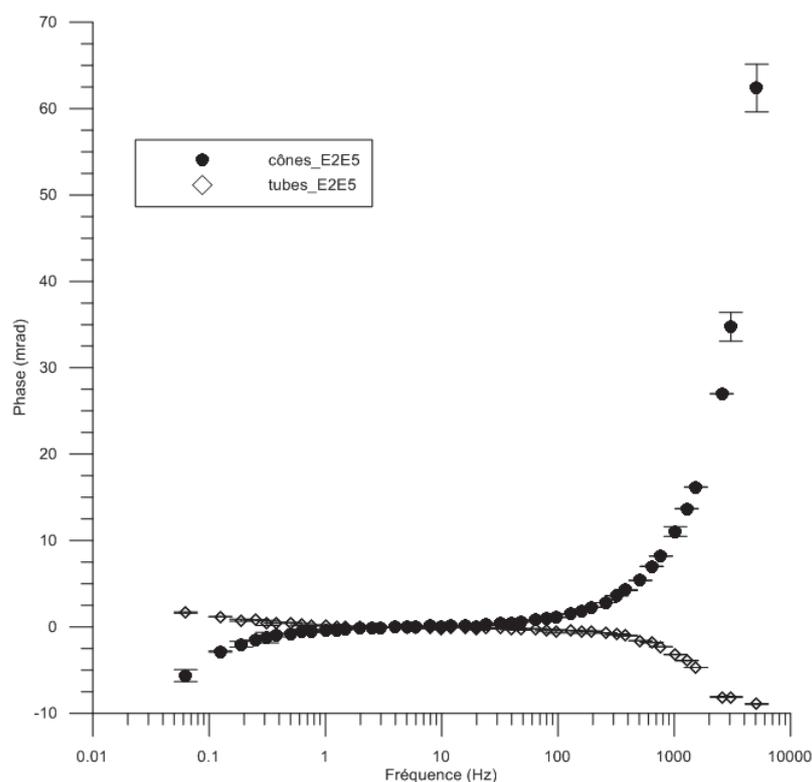


FIGURE 0-15 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE D'UNE COLONNE DE SABLE SATURÉ, MESURÉE PAR LE GDP 32 EN MODE 16 BITS, POUR LE COUPLE E2E5, SUR LES ÉLECTRODES DE TYPE CÔNE (ROND PLEIN) ET DE TYPE TUBE (LOSANGES VIDES). LES BARRES D'ERREUR CORRESPONDENT UN ÉCART TYPE CALCULÉ SUR 6 MESURES PAR FRÉQUENCE.

Conclusion :

Les deux types d'électrodes sont impolarisables en basse fréquence. La phase est nulle sur la gamme de fréquences entre 0,6 et 70 Hz.

2. INFLUENCE DE LA POSITION DES ÉLECTRODES SUR LA COLONNE

Les fluctuations de la phase de la résistivité complexe observées sur les couples E1E4 et E3E6 sur la colonne d'eau (Figure 0-8) sont moins prononcées sur la colonne de sable saturé (Figure 0-16).

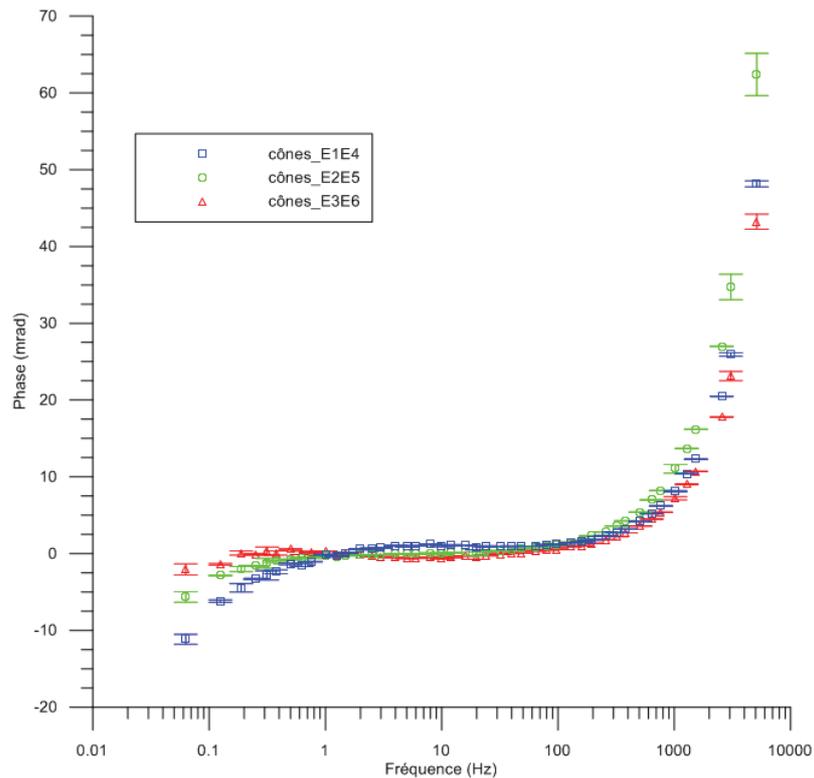


FIGURE 0-16 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE SUR UNE COLONNE DE SABLE SATURÉ, SUR DIFFÉRENTS COUPLES D'ÉLECTRODES DE MESURES, AVEC LE GDP 32 EN MODE 16 BITS, POUR LES ÉLECTRODES DE TYPE CÔNE.

3. EVOLUTION DANS LE TEMPS

Les mesures sur sable saturé ont été réalisées sur 8 jours, entre le 05/11/13 et le 12/11/13.

a) CONDUCTIVITÉ DU FLUIDE

TABLEAU 0-2 : EVOLUTION DE LA CONDUCTIVITÉ DE LA SOLUTION DE KCL DANS LES DEUX COLONNES AU COURS DU TEMPS.

Date	Colonne électrodes tubes		Colonne électrodes cônes	
	Conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Evolution (%)	Conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Evolution (%)
05/11	1947	-	1858	-
12/11	1880	-3.5	1931	3.78

Dans le Tableau 0-2, qui présente l'évolution de la conductivité de la solution de KCl dans les deux colonnes au cours du temps, on observe une légère augmentation de la conductivité du fluide en 8 jours pour la colonne munie d'électrodes de type « cônes » et une légère diminution pour la colonne munie d'électrodes de type « tubes ».

b) MESURES PP

En ce qui concerne les mesures de la résistivité complexe, deux mesures ont été faites avec le GDP sur les trois couples E1E4, E2E5 et E3E6. Et un suivi toutes les heures a été mis en place sur le couple E2E5 avec les deux appareils PAR (un appareil par colonne).

Sur les Figure 0-17Figure 0-18, on observe les mesures de phase faites avec le GDP sur le couple E2E5. On peut voir que les mesures sont stables dès le premier jour. La phase est proche de 0 mrad entre 0,3 et 100 Hz pour les deux types d'électrodes.

Pour les mesures effectuées avec les appareils PAR (Figure 0-19Figure 0-20), on observe de nouveau le problème à 100 Hz avec le nouvel appareil PAR et un saut à 10 Hz avec l'ancien appareil PAR.

Sinon, les mesures sont assez proches de 0 mrad entre 0.01 et 10 Hz pour le nouvel appareil PAR, et entre 10 et 1000 Hz pour l'ancien.

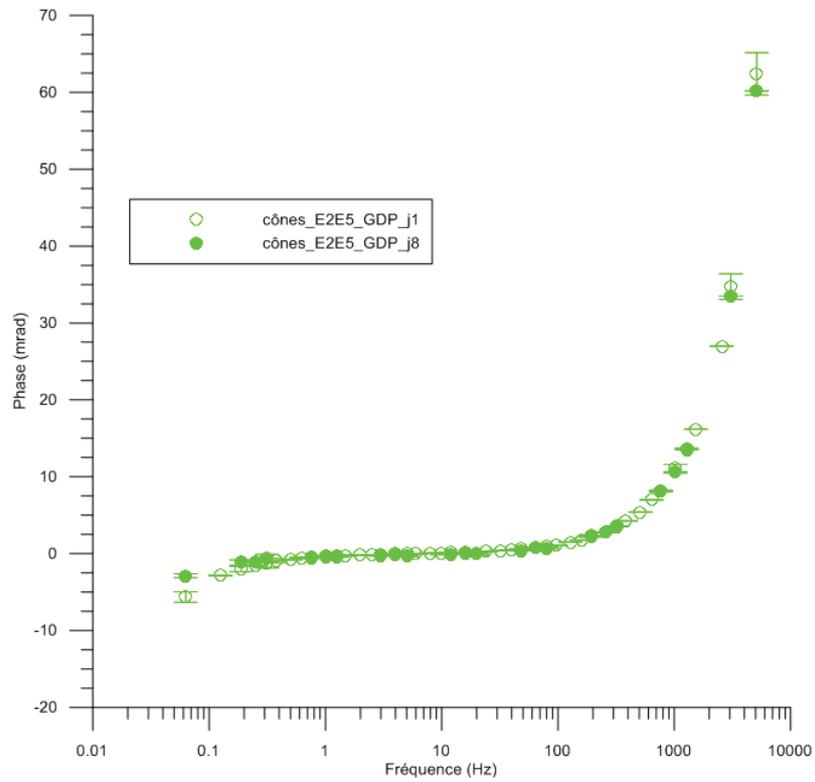


FIGURE 0-17 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE LE 05/11 (JOUR 1 APRÈS IMMERSION) ET LE 12/11 (JOUR 8) AVEC LE GDP EN MODE 16 BITS, POUR LES ÉLECTRODES DE TYPE CÔNE, POUR LE COUPLE E2E5, SUR UNE COLONNE DE SABLE SATURÉ.

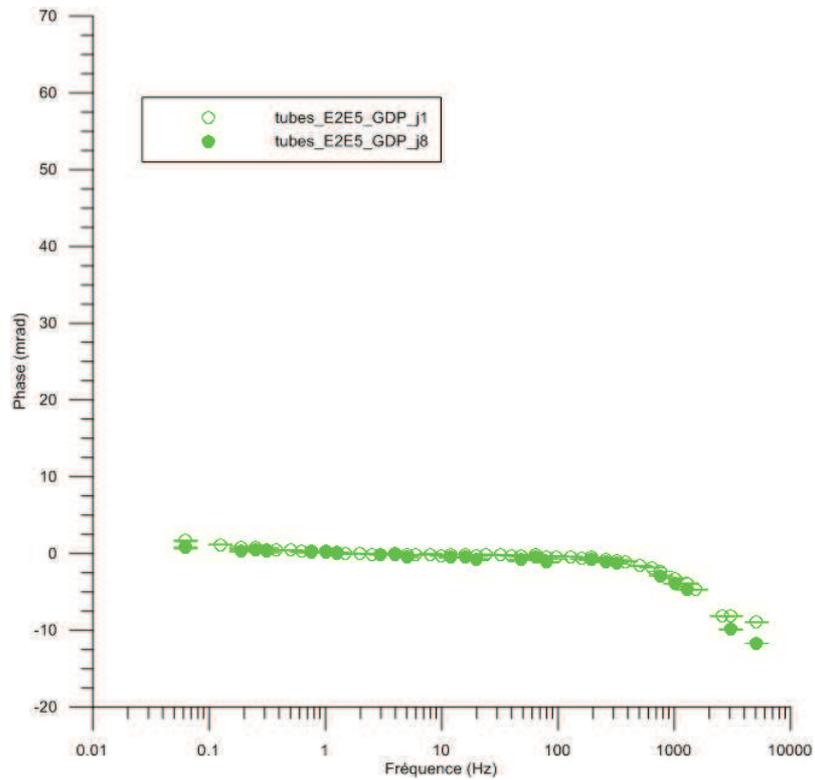


FIGURE 0-18 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE LE 05/11 (JOUR 1 APRÈS IMMERSION) ET LE 12/11 (JOUR 8) AVEC LE GDP EN MODE 16 BITS, POUR LES ÉLECTRODES DE TYPE TUBE, POUR LE COUPLE E2E5, SUR UNE COLONNE DE SABLE SATURÉ.

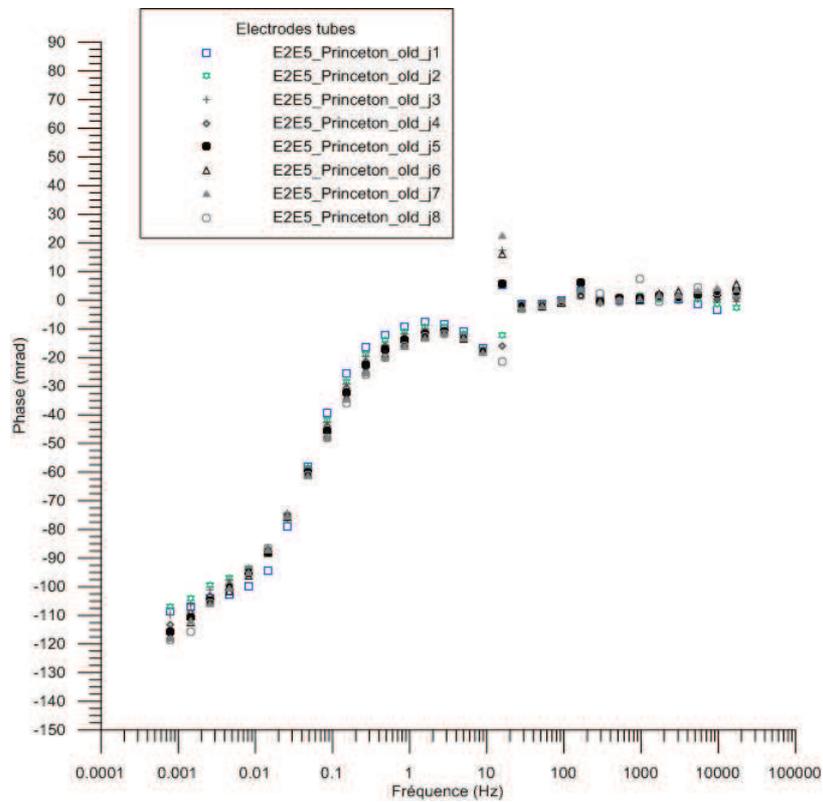


FIGURE 0-19 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE UNE FOIS PAR JOUR AVEC LES APPAREILS PAR, POUR LES ÉLECTRODES DE TYPE TUBE, POUR LE COUPLE E2E5, POUR UNE COLONNE DE SABLE SATURÉ.

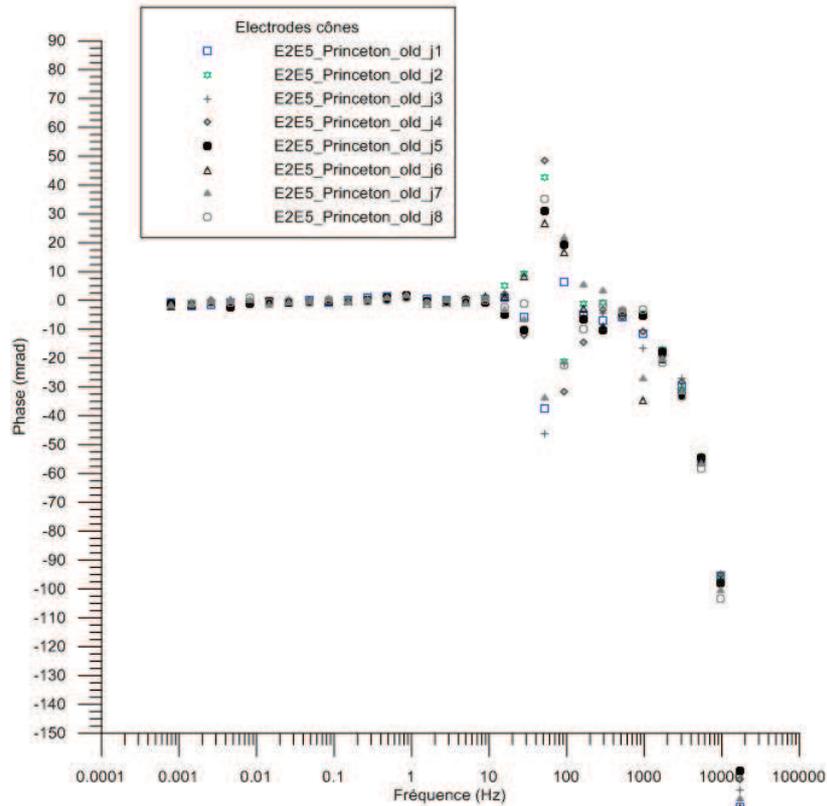


FIGURE 0-20 : PHASE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE MESURÉE UNE FOIS PAR JOUR AVEC LES APPAREILS PAR, POUR LES ÉLECTRODES DE TYPE CÔNE, POUR LE COUPLE E2E5, POUR UNE COLONNE DE SABLE SATURÉ.

Conclusion :

Le GDP donne les mesures les plus stables, entre 0.3 et 70 Hz.

Cependant, les appareils PAR permettent un suivi plus régulier et ils peuvent être utilisés pour voir l'évolution de la phase au cours du temps (variation relative).

Les deux types d'électrodes sont tout autant impolarisables à basse fréquence.

E. AMPLITUDE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE

La différence d'amplitude est due à la différence de conductivité du fluide.

Pour les colonnes d'eau (Figure 0-21), on a :

- $\sigma_{\text{cônes}} = 2100 \mu\text{S/cm}$ (moins résistant)
- $\sigma_{\text{tubes}} = 1694 \mu\text{S/cm}$ (plus résistant)

De même pour les colonnes de sable saturé (Figure 0-22) :

- $\sigma_{\text{cônes}} = 1858 \mu\text{S/cm}$ (plus résistant)
- $\sigma_{\text{tubes}} = 1947 \mu\text{S/cm}$ (moins résistant)

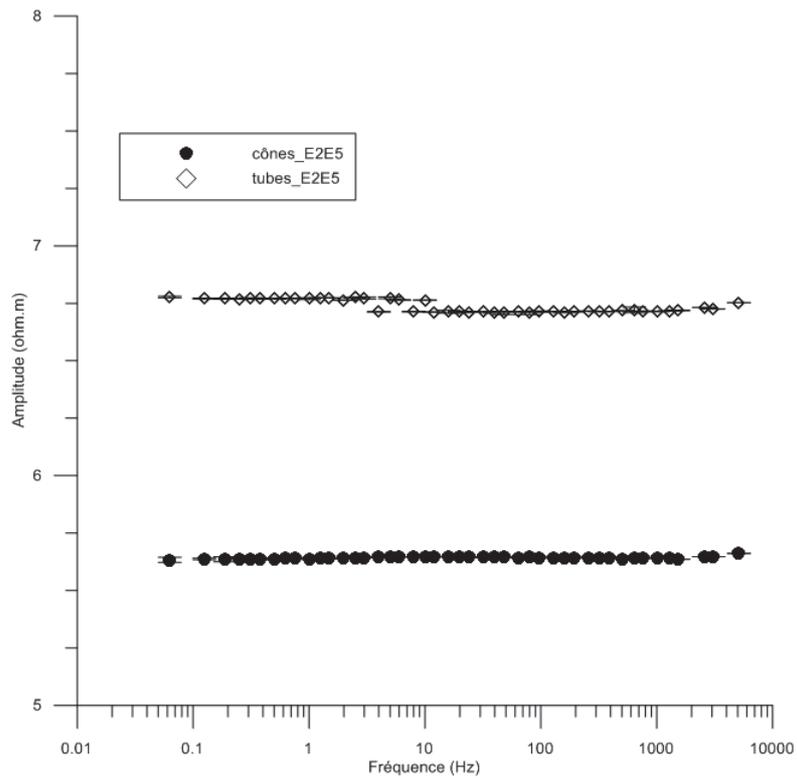


FIGURE 0-21 : AMPLITUDE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE D'UNE COLONNE D'EAU SALÉE, MESURÉE PAR LE GDP 32 EN MODE 16 BITS, POUR LE COUPLE E2E5, SUR LES ÉLECTRODES DE TYPE CÔNE (RONDS PLEINS) ET DE TYPE TUBE (LOSANGES VIDES). LES BARRES D'ERREUR CORRESPONDENT UN ÉCART TYPE CALCULÉ SUR 6 MESURES PAR FRÉQUENCE.

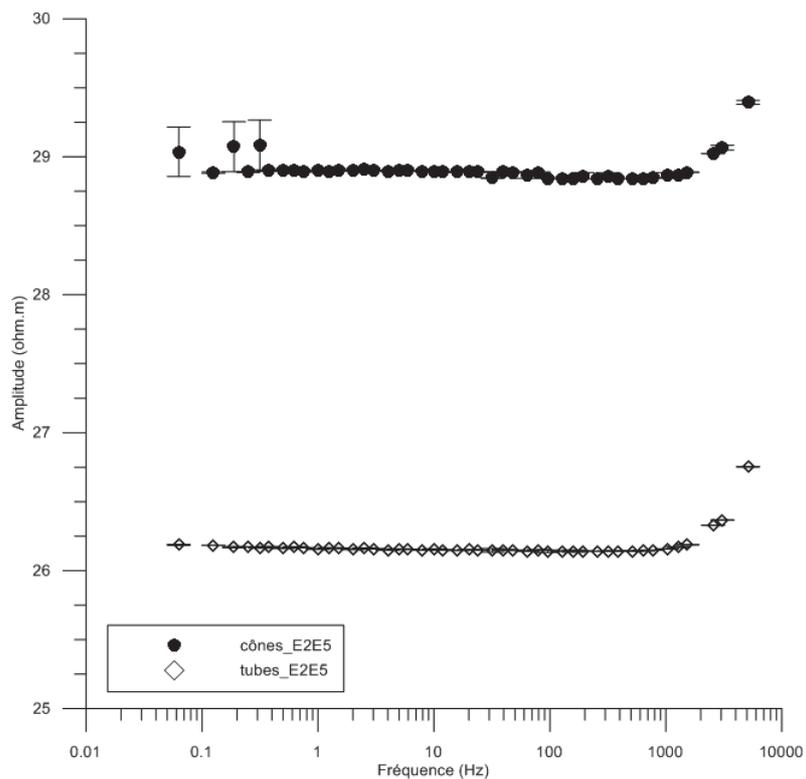


FIGURE 0-22 : AMPLITUDE DE LA RÉSISTIVITÉ COMPLEXE D'UNE COLONNE DE SABLE SATURÉ, MESURÉE PAR LE GDP 32 EN MODE 16 BITS, POUR LE COUPLE E2E5, SUR LES ÉLECTRODES DE TYPE CÔNE (RONDS PLEINS) ET DE TYPE TUBE (LOSANGES VIDES). LES BARRES D'ERREUR CORRESPONDENT UN ÉCART TYPE CALCULÉ SUR 6 MESURES PAR FRÉQUENCE.

F. CONCLUSION

Plage de fréquences : de 0,3 Hz à 70Hz

⇒ Mesures avec le GDP entre 0,125 Hz (harmoniques : 0,125 ; 0,375 ; 0,625) et 64 Hz (harmoniques : 64 ; 192 ; 320).

Couples de mesure : E2E5 et E3E4 ou E1E4, E2E5 et E3E6

Durée de vie des électrodes : au moins 15 jours.

Variante d'électrode : cônes (moins de fuite et filtre connu). Mais les deux variantes d'électrodes Cu/CuSO₄ sont stables.

ANNEXE 8 : DIMENSIONS DES COLONNES BIOPHY COMPARÉES AU PORTE ÉCHANTILLON DÉFINI PAR ZIMMERMANN ET AL. (2010).

Des sources d'erreur sur la mesure de la phase de la résistivité complexe ont été identifiées par Zimmermann et al. (2010).

Une erreur sur la phase serait causée par une inhomogénéité de la distribution du courant dans la colonne. Pour minimiser cette erreur, les auteurs préconisent un ratio de la distance entre les électrodes de courant et les électrodes de mesure et la largeur de la colonne de 2:1 ou plus.

Sur les colonnes, la distance entre A et E1 et entre B et E6 sont les mêmes : $d_{AE1}=d_{BE6}=5\text{cm}$ et le diamètre de la colonne est $d_{\text{colonne}}=15\text{cm}$. D'où le ratio : $d_{AE1}/d_{\text{colonne}}=5/15=0.3 < 2$.

Pour $d_{AE2}=d_{AE5}=11\text{cm}$ et $d_{AE3}=d_{BE4}=16\text{cm}$, on a des ratios : $d_{AE2}/d_{\text{colonne}}=11/15=0.73 < 2$ et $d_{AE3}/d_{\text{colonne}}=16/15=1.07 < 2$.

Si aucun des cas de figure ne correspond aux distances idéales, les couples d'électrodes E2E5 et E3E4 sont moins soumis aux problèmes de répartition de courant, car plus éloignés des électrodes A et B.

Idéalement, le diamètre de la colonne est de $1/6^{\circ}$ de la distance entre les électrodes de courant pour minimiser les effets de polarisation.

$d_{\text{colonne}}=15\text{ cm}$ et $d_{AB}=38\text{ cm}$, d'où $d_{\text{colonne}}/d_{AB}=0.39 > 1/6$ (0.17). On n'est pas non plus dans les meilleures conditions.

Les électrodes de mesure doivent être positionnées symétriquement, à 33% et 66% de la longueur de la colonne.

$$L_{\text{colonne}}=50\text{ cm}$$

Les électrodes de mesures E2E5 et E3E4 sont positionnées symétriquement.

$$d_{E2E5}=16, d_{E2E5}/L_{\text{colonne}}=32\%$$

$$d_{E3E4}=6, d_{E3E4}/L_{\text{colonne}}=10\%$$

Seule la position du couple E2E5 serait correcte pour minimiser les effets de polarisation.

De plus, pour augmenter le rapport signal sur bruit, il faut utiliser de fortes densités de courant (entre 10^{-5} A/m^2 et 0.2 A/m^2).

$$S_{\text{colonne}}=\pi 7.5^2=177\text{ cm}^2\text{ avec un courant de }70\text{ }\mu\text{A}, 70*10^{-6}/177*10^{-4}=0.004=4*10^{-3}\text{ A/m}^2$$

La densité de courant utilisée est correcte pour un bon rapport signal sur bruit.

E. Zimmermann, A. Kemna, J. Berwix, W. Glaas, H. M. Münch, J. A. Huisman, 2010. High accuracy impedance spectrometer for measuring sediments with low polarizability.

ANNEXE 9 : PROFILS DE DIVERSITÉ DES COLONNES INOCULÉES PAR MÉTHODE CE-SSCP

A. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

La méthode CE-SSCP (*Capillary Electrophoresis – Single Strand Conformation Polymorphism* ou Electrophorèse Capillaire - Polymorphisme de conformation des simples brins d'ADN) est une technique utilisée en microbiologie pour établir la diversité des communautés de bactéries dans un milieu. Elle est basée sur le comportement électrophorétique d'un fragment d'ADN simple brin dans un gel et elle se divise en plusieurs étapes :

- Extraction de l'ADN à partir d'échantillons ;
- Amplification génétique (*Polymerase chain reaction*, PCR) : amplification spécifique d'un segment particulier d'ADN ;
- Migration des produits PCR par électrophorèse : séparation de fragments d'ADN sous l'effet d'un champ électrique

Les profils obtenus permettent de suivre la répartition spatiale de communautés bactériennes : une position de migration (pic sur le profil) correspond à une certaine conformation de l'ADN, et donc à une souche de bactéries.

B. APPLICATION AUX COLONNES INOCULÉES BIOPHY C1 ET C2 (MARS 2014)

Les figures Figure 0-1 à Figure 0-3 montrent les profils de biodiversité des colonnes biotiques C1 et C2 démontées fin mars 2014.

Les profils de diversité sont faits ici sur une partie du gène qui code l'ARNr 16S, universel aux bactéries, donc la communauté totale présente dans les colonnes est ciblée. L'axe des abscisses représente une position de migration.

Malgré l'inoculation d'une culture de *Rhodococcus wratislaviensis*, la communauté bactérienne se diversifie rapidement, dès le mois de janvier, comme le montre la Figure 0-3 pour la colonne C2 (les profils ne sont pas disponibles à tous les temps de prélèvement pour la colonne C1).

La biodiversité est assez homogène sur la hauteur des colonnes (Figure 0-1), ainsi qu'entre les deux colonnes (Figure 0-2). Il y a donc des bactéries qui colonisent spontanément le sable stérile introduit dans les colonnes, et qui sont capables au moins de résister à la pression imposée par la présence de toluène, voire de dégrader ce composé. Ces bactéries peuvent provenir des colonnes elles-mêmes, qui ne sont pas stérilisées au sens strict entre deux expériences mais seulement désinfectées. Elles ont pu également s'introduire dans les colonnes au moment de leur remplissage.

Il y avait également des échantillons des colonnes non inoculées C3 et C4, de novembre 2013. Aucun profil n'a pu être obtenu pour ces échantillons car la PCR était négative, bien que des bactéries aient été observées en faible concentration dans ces colonnes. Pour rappel, le développement des bactéries avait été inhibé par des ajouts de formaldéhyde dans ces colonnes témoins.

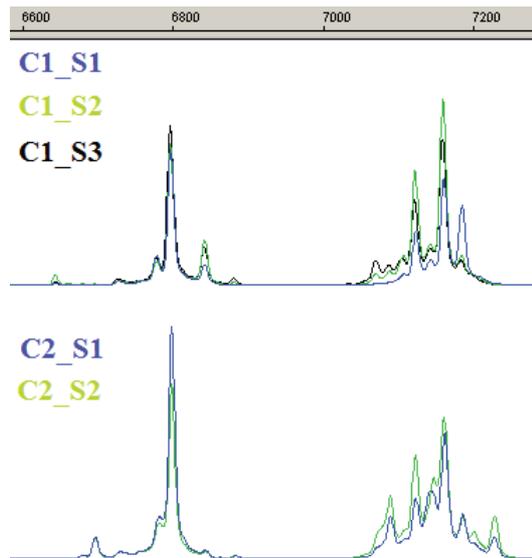


FIGURE 0-1 : PROFILS CE-SSCP ÉTABLIS POUR LES COLONNES C1 (EN HAUT) ET C2 (EN BAS), À DIFFÉRENTES HAUTEURS (S1, S2 ET S3), À T FINAL.

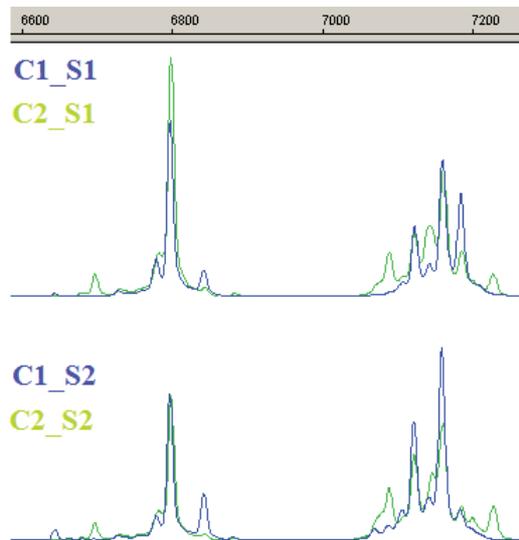


FIGURE 0-2 : COMPARAISON DES PROFILS CE-SSCP C1_S1 ET C2_S1 (EN HAUT) ET C1_S2 ET C2_S2 (EN BAS), À T FINAL.

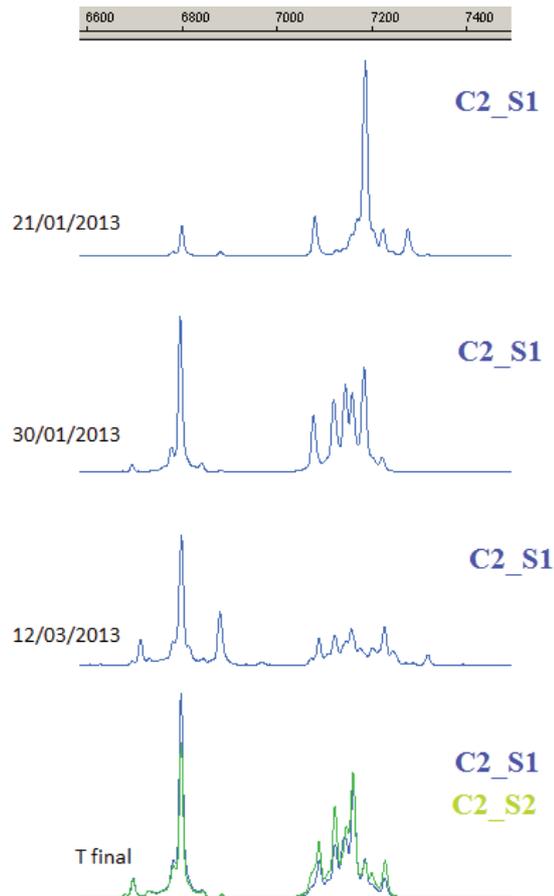


FIGURE 0-3 : EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DES PROFILS CE-SSCP DE LA COLONNE C2.

Remarques :

Le profil de *R. w.* n'est pas connu (pas de données dans la littérature à ce jour). Des analyses SSCP supplémentaires sur la souche pure de *R. w.* sont indispensables pour identifier le pic correspondant à l'inoculum BIOPHY de départ.

La hauteur des pics n'est pas proportionnelle à la souche bactérienne correspondante. Cette méthode ne permet donc pas de quantifier la proportion de *R. w.* par rapport aux autres souches de bactéries présentes dans les colonnes. Elle est proportionnelle à une quantité de gène amplifié.

Cécile NOEL

Suivi de la biodégradation des hydrocarbures par le couplage des mesures géophysiques électriques du sol (polarisation provoquée) et des analyses des gaz (concentration du CO₂ et isotopie du carbone)

La biodégradation stimulée est une méthode de dépollution *in situ* utilisée pour dégrader des hydrocarbures. Son suivi se fait actuellement *via* des forages coûteux et trop peu nombreux. Ce travail de thèse propose d'améliorer le suivi d'une biodégradation en combinant des méthodes géophysiques électriques (polarisation provoquée) et des analyses de CO₂ (flux en surface et isotopie du carbone). Ces outils ont été testés à l'échelle du laboratoire, puis mis en œuvre sur un site pilote en cours de dépollution. La dégradation aérobie du toluène en colonnes par une souche bactérienne connue (*Rhodococcus wratislaviensis*) a été caractérisée par une production de CO₂, un fractionnement isotopique du carbone, et par une évolution de la résistivité électrique complexe du milieu poreux, en corrélation avec les analyses microbiologiques et géochimiques. Ces résultats ont permis de mettre en place un suivi à l'échelle du terrain. Le site est une station-service où des fuites d'essences et de gasoil ont eu lieu il y a une quinzaine d'années. Une tranchée apporte de l'oxygène à la nappe pour stimuler les processus bactériens aérobie. Des campagnes géophysiques ainsi que des analyses de CO₂ ont été réalisées à partir de février 2014. Les premiers résultats montrent une zone plus conductrice et plus chargeable qui correspond à la zone polluée définie par les analyses géochimiques en forages. De plus, au niveau de cette zone, de fortes émissions de CO₂ ont été mesurées avec une signature isotopique caractéristique d'une biodégradation d'hydrocarbures. Ces résultats montrent l'intérêt de combiner des méthodes géophysiques avec des analyses de gaz pour surveiller des zones de biodégradation et, d'ores-et-déjà, permettent de fournir une méthodologie non destructrice et originale de monitoring *in situ*.

Mots clés : biodégradation, hydrocarbures, surveillance, polarisation provoquée, fractionnement isotopique du carbone

Hydrocarbon bioremediation monitoring by combining electrical geophysical measurements (induced polarization) and gas analyses (CO₂ concentration and carbon isotopic ratio)

Stimulated biodegradation is a depollution technique used to degrade hydrocarbons. Its monitoring is currently done thanks to very few expensive wells. This PhD research work proposes to improve bioremediation monitoring by combining geophysical electrical methods (induced polarization) and CO₂ analyses (surface emissions and carbon isotopic ratio). These tools were tested at laboratory scale and then implemented on a pilot site under decontamination. Aerobic degradation of toluene in columns by a known bacterial strain (*Rhodococcus wratislaviensis*) was characterized by CO₂ production, carbon isotopic fractionation and by an evolution of electrical complex resistivity of porous media, in correlation with microbiological and geochemical analyses. These results allowed to implement a monitoring at the site scale. The site is a gas station where gasoline and diesel leaked fifteen years ago. A trench supply oxygen to the water table in order to stimulate aerobic bacterial processes. Geophysical campaigns and CO₂ analyses have been carried out since February 2014. The first results show a more conductive and chargeable area which corresponds to the contaminated zone defined by geochemical analyses in wells. Moreover in this area CO₂ emissions have been measured with an isotopic signature typical of hydrocarbon biodegradation. These results show the interest of combining geophysical methods with gas analyses to monitor biodegradation and they have already allowed to provide a non-destructive and new methodology for *in situ* monitoring.

Keywords: biodegradation, hydrocarbons, monitoring, induced polarization, carbon isotopic fractionation

BRGM, 3 avenue Claude Guillemin, BP 36009, 45060 Orléans Cedex 2

LPC2E, 3 avenue de la recherche scientifique, 45071 Orléans Cedex 2

