



HAL
open science

Etude expérimentale de la mobilité d'éléments traces (Cr, Cu, Pb, As) à l'échelle d'un système poral bimodal : importance et localisation de l'activité microbienne

Chloé Caurel

► **To cite this version:**

Chloé Caurel. Etude expérimentale de la mobilité d'éléments traces (Cr, Cu, Pb, As) à l'échelle d'un système poral bimodal : importance et localisation de l'activité microbienne. Autre. Université d'Orléans, 2019. Français. NNT : 2019ORLE2004 . tel-02968115

HAL Id: tel-02968115

<https://theses.hal.science/tel-02968115v1>

Submitted on 15 Oct 2020

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*

Institut des Sciences de la Terre d'Orléans

THÈSE présentée par : **Chloé CAUREL**

Soutenue le : **25 avril 2019**

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

Discipline/ Spécialité : Science de la Terre et de l'Univers

**Etude expérimentale de la mobilité d'éléments traces (Cr, Cu, Pb, As)
à l'échelle d'un système poral bimodal : importance et localisation de
l'activité microbienne**

THÈSE dirigée par :

**Ary BRUAND
Olivier ROZENBAUM**

Professeur, Université d'Orléans
Maître de conférences, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

**Naoise NUNAN
Michel MENCH**

Chargé de Recherche, UPMC, Paris
Directeur de recherches, INRA, Bordeaux

JURY :

**Mikael MOTELICA-HEINO
Naoise NUNAN
Michel MENCH
Christian MARLIERE
Alexandre GELABERT
Ary BRUAND
Olivier ROZENBAUM
Fabienne BATTAGLIA-BRUNET
Nathalie GASSAMA**

Professeur, Université d'Orléans, Président du jury
Chargé de Recherche, UPMC, Paris
Directeur de recherches, INRA, Bordeaux
Directeur de recherches, ISMO, Paris
Maître de conférences, IPGP, Paris
Professeur, Université d'Orléans
Maître de conférences, Université d'Orléans
Chercheur, BRGM Orléans
Maître de conférences, GÉHCO, Tours

*Chaque bonne réalisation,
grande ou petite,
connait des périodes de corvées et de triomphes,
un début, un combat
une victoire*

Mahatma Gandhi

Sommaire

Remerciements

Introduction générale

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Chapitre II : Structure et fonctionnement hydrique des systèmes poreux présents dans les colonnes du banc expérimental

Chapitre III : Développement de biofilms et analyse de leur localisation sur les milieux poreux des colonnes du banc expérimental

Chapitre IV : Composition chimique des percolats et géochimie du système

Chapitre V : Développement de biofilms au sein d'un dispositif de type « Geological Lab on Chip » : Apports de la micro fluidique

Synthèse

Conclusion générale

Liste des références bibliographiques

Tables des figures

Table des tableaux

Annexes

Table des matières

Remerciements

Après ces années riches en émotions, je souhaite remercier l'ensemble des personnes qui m'ont permis de réaliser ce projet, aussi bien professionnellement que personnellement. En espérant n'oublier personne.

Je remercie l'ISTO et le BRGM pour l'accueil au sein des laboratoires ainsi que le labex Voltaire qui a financé ce travail.

Je remercie tout d'abord Naoise Nunan et Michel Mench qui ont accepté de rapporter ce travail de thèse.

Je remercie Ary Bruand, Olivier Rozenbaum, Sébastien Dupraz et Francis Garrido pour m'avoir permis de débiter cette thèse.

Malgré un alignement des planètes hasardeux, les fonctions et devoirs de chacun ont fait de cette thèse un parcours pas toujours simple et je tiens à les remercier.

Merci Olivier pour ton accompagnement et pour m'avoir permis de découvrir la tomographie.

Merci Sébastien de m'avoir suivi tout au long des manip, sur ce long parcours de doutes et de craintes, mais on a réussi !

J'adresse également un grand merci à Fabienne Battaglia Brunet pour son implication grandissante au cours de la thèse. Merci pour ton soutien sans faille et permanent, tes nombreux conseils qui m'ont permis de sortir la tête de l'eau, en géochimie mais également plus personnellement. Notre collaboration m'a appris énormément et j'espère qu'elle pourra perdurer.

Merci Ary pour ta gentillesse et ta bienveillance, merci président pour ton temps, ta patience et les croissants ! Merci pour les derniers mois qui m'ont beaucoup appris. Nos réunions et discussions ont été un réel plaisir et source de motivation.

J'aimerais remercier les personnes qui ont contribué à ce travail, merci à Franck Marrot et Jérémy Muller de l'ADEME pour leur collaboration lors de la campagne d'échantillonnage, Pascal Auger du BRGM pour m'avoir accompagné sur le terrain, Samuel Marre pour sa collaboration et la fabrication des micro-modèles. Merci à Mikael Charon, Catherine Jouliau et Cindy Gassaud pour leur aide et leur accompagnement dans les laboratoires du BRGM, Laurent, Yohan et Julien les informaticiens, Philippe alias professeur X, pour les longues heures de tomographie, Marie Paul pour les manip ISTO, BRGM, et nos nombreuses discussions.

Je remercie particulièrement Jean Louis Rouet pour la fabrique de bérets ☺ et pour m'avoir aidé à concrétiser mes modèles expérimentaux, merci Manu pour ta collaboration, tes réponses à mes questions foireuses quasi quotidiennes et ton soutien, Aurélien et Aneta pour leur aide en tâtonnement Raman, Laurent pour la tomographie et ta bienveillance. Merci aux mécanos, Fred,

les Rémi² et Esteban. J'ai adoré travailler avec vous tous. Aneta, manuellement ! merci pour tous ces moments passés à travailler ensemble dans la bonne humeur et pour ton aide merci merci! Merci Sophie pour tes conseils au laboratoire et Cyprien pour m'avoir ouvert les portes du monde des modèles, pour les nombreuses discussions qui m'ont énormément appris! Merci à Claude pour ton aide au labo et les nombreux cafés, Jérémy pour les blagues et autre Bazar, Rachelle, Marielle « maman du labo » ton aide et ton soutien en toutes circonstances ont égayé ces quatre années faites de rires, de galères et bien sûr de chocolats!

Merci à tous pour ces moments au boulot, au café, autours d'une bière !

Qu'est-ce qu'une thèse sans les copains ! Alors merci à tous ceux qui ont ri, m'ont supporté et m'ont encouragé. Merci aux copains de toujours, loin des yeux mais pas loin du cœur, merci à ma grande Carcasse ☺, Jojo, Antoine, Lucie et Olo, Alice, Lamia, Camille, Baby, Cyrielle, Panda, Mike pour les virées parisiennes, corréziennes, toulousaines et j'en passe ! merci Marie, Marylou, martin et Nelly !

Merci à Romain qui m'a toujours soutenu malgré que nos chemins se soient séparés

Merci aux amis d'Orléans, Anaëlle pour ces soirées de danse, et les 400 coups avec JJ Christian et Olivia ! Olivia évidemment, comment l'oublier celle-là ! Merci madame d'avoir rendu ce bureau aussi drôle et fantasque ! Oui j'ai dit fantasque ! big up à Solange ! merci Léonard pour tes conseils avisés, ton humour et ta « to do list » qui m'a sauvé plus d'une fois le moral ! merci Viviane pour ces soirées enflammées au sens propre, merci Hugue, Flo, Thomas alias berocca qui nous a ouvert la voie vers une rédaction heureuse ahah, Maria, Alex, Clément, Laurianne. Tiago et Arnaud, tic et tac, Adoum la force tranquille merci pour tout ! Mouki pour tous ces moments, de labo, de fiesta, de voyage, Nico pour m'avoir permis de trouver ma fonction d'utilitay ! Eloise pour ces derniers mois intenses, drôles et déprimants partagé avec la Juju, toujours dans les bons coups, l'acolyte de l'aventure de Jeanine et bob! Merci Zimzim pour les pauses thé gourmandes ahah et les vélos volés !

Merci à Hugo toujours là, OSS118, Charlène pour tous nos petits moments, Madame vous-vous-êtes-vous géniale, merci pour les chips !:), Claudie et Arnaud, merci Michel et Clairette.

Merci à l'amicale des cyclistes de la rue de bourgogne, Cédric, Mon Associé évidemment ! #NOWé.

Merci à Chouchou, pour ton soutien, ton amour et tout ce qui nous reste à vivre.

Enfin je remercie ma famille qui m'a toujours soutenue et qui a toujours été là dans les bons moments comme les moins bons et qui m'a permis d'arriver là aujourd'hui.

Introduction générale

Les éléments traces sont naturellement présents dans le fond géochimique terrestre. Leur présence dans les sols est généralement étroitement liée à la composition chimique des matériaux parentaux à partir desquels ils se sont formés (Baize et Tercé 2002). Certains de ces éléments sont essentiels en faible quantité au développement d'espèces biologiques mais également toxiques à plus hautes concentrations. C'est par exemple le cas du chrome, du cuivre et de l'arsenic (Kumpiene *et al.*, 2008). Les activités anthropiques, qu'elles soient industrielles ou agricoles, constituent autant d'apports exogènes critiques potentiels en éléments contaminants dans le milieu naturel. C'est en effet par exemple le cas de traitements du bois (CCA), des traitements de surfaces métalliques, des peintures, des agents phytosanitaires, des herbicides. Les produits issus de ces traitements sont retrouvés dans les sols. Certains de ces contaminants (As, Cr) présentent une toxicité importante pour les organismes vivants, même en faible concentration, qui dépend de leur degré d'oxydation. L'augmentation des apports au milieu naturel, et en particulier au sol, fait de ces contaminants des enjeux majeurs pour la préservation des sols et de leurs fonctions à toutes les échelles. Le chrome, le cuivre, le plomb, le zinc et l'arsenic sont ainsi devenus des contaminants inorganiques communs les plus retrouvés dans les sols et les eaux.

Dans le milieu naturel, ces éléments peuvent subir différents processus géochimiques aux interfaces entre le vivant, les phases organiques et minérales. Ces réactions variées, dans ce milieu complexe qu'est le sol au contact de la biosphère, ou encore de l'hydrosphère, peuvent modifier leur spéciation, modifiant ainsi leur mobilité, leur disponibilité et leur toxicité. Ces contaminants se présentent souvent comme des cocktails d'éléments de fonctionnements peu connus. La spéciation, c'est-à-dire leurs degrés d'oxydation, de protonation, entraîne une réactivité géochimique variable vis-à-vis des constituants du sol. Les éléments peuvent ainsi être accumulés, immobilisés, transférés vers d'autres réservoirs. La toxicité des éléments pour le milieu est, elle, générée par la dose, le mode d'exposition, la sensibilité du récepteur biologique, sa physiologie et ses mécanismes cellulaires.

L'interaction de ces éléments avec les systèmes naturels comme le sol peuvent modifier les cycles géochimiques et biogéochimiques par l'excès dans les voies d'exposition qui peut modifier les processus biotiques (dont ceux piloter par la mésofaune, les communautés microbiennes du sol,

etc.) et abiotiques qui régulent les cycles biogéochimiques, notamment de la matière organique et des macronutriments. Le compartiment biologique très important des sols peut être fortement impacté par des concentrations même faibles en éléments contaminants et peut également jouer un rôle-clef dans la spéciation et la mobilité des éléments traces. Ces processus sont particulièrement critiques dans les zones d'interface (transfert de l'eau du sol vers les nappes souterraines ou les cours d'eau) comme la zone non saturée (ZNS).

Depuis plusieurs décennies, le couplage de la microbiologie, de l'écologie, de la géochimie mais également de la physique du sol tendent à montrer l'importance fonctionnelle des microorganismes à très petite échelle (au sein de la porosité du sol) dont peuvent fortement dépendre les processus à beaucoup plus grande échelle, par exemple à l'échelle d'un bassin versant. L'importance du maintien et de la connaissance du fonctionnement à très petite échelle, celle de mécanismes biogéochimiques qui peuvent modifier la mobilité des métaux et métalloïdes, est donc primordiale pour comprendre l'ensemble des processus en jeu dans les sols (Tecon et Or, 2017). La grande diversité de microorganismes dans les sols, de leur fonctionnement métabolique et de leur distribution spatiale complexifie la nature de leur interaction avec chaque élément chimique. Certaines bactéries peuvent interagir directement avec les éléments traces, ou impacter leur spéciation par une modification des conditions chimiques à leur contact. Il est donc difficile d'identifier les paramètres et les variables clefs qui régulent les systèmes. Afin de mieux comprendre et gérer les contaminations par les éléments traces, il est important de considérer les populations microbiennes en présence (Totsche et al. 2010a). Ces processus restent difficiles à appréhender dans le sol, car ce dernier est un matériau disposant d'une interface complexe (surfaces développées par les minéraux dans un système de réseaux de pores) qui met en jeu des réactions à différentes échelles spatiales et temporelles. Les interactions au sein du sol sont très nombreuses, comme par exemple entre état structural et activité biologique, état structural et teneur en eau, teneur en eau et activité biologique.

La formation du sol et de sa structure est régie par une variété de processus mécaniques, chimiques et biologiques. Le milieu résultant de cet assemblage est par conséquent organisé à différentes échelles. Cet environnement complexe rend difficile l'échantillonnage, l'analyse et l'interprétation des activités biogéochimiques.

Le développement d'approches intégrant plusieurs échelles et approches combinées permet d'observer et analyser le fonctionnement de ces microenvironnements depuis la plus petite échelle fonctionnelle (celle de la bactérie) à la communauté microbienne jusqu'à l'unité d'horizon de sol.

L'objectif de ce travail de thèse est d'apporter des éléments de compréhension sur le fonctionnement d'un système poreux contaminé en métaux et métalloïdes soumis à un degré de saturation en eau variable, et ceci afin de mieux comprendre les liens entre les propriétés physiques, biologiques et chimiques du milieu. Les modifications géochimiques observées sont-elles uniquement liées aux fluctuations de saturation en eau des sols, comme fréquemment mentionné dans la littérature (conditions climatiques, zone non saturée), ou résultent-elles de l'activité du biofilm ? La hiérarchisation des processus reste un défi. Le niveau de développement et d'activité des biofilms peut être considéré comme une conséquence des variations de conditions géochimiques ou comme un acteur de ces modifications. Ceci peut traduire une capacité directe ou indirecte du biofilm à transformer des métaux et métalloïdes, à l'échelle du pore ou à plus grande échelle. La présente thèse a pour objectif de contribuer à répondre à ces questions scientifiques, à travers le développement de dispositifs expérimentaux originaux permettant d'accéder à la fois à une maîtrise de la structure d'un modèle de sol, au contrôle des conditions hydriques et à l'observation des réactions biogéochimiques.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Chapitre I.....	7
Synthèse bibliographique	7
I. Teneurs, spéciations et mobilité des éléments traces	11
I.A. Contamination des sols par les apports anthropiques en éléments traces.....	12
I.A.1 Enjeux de la contamination des sols par des éléments traces	12
I.A.2. Spéciation des éléments traces et paramètres physico chimiques du sol	14
I.A.3. Interaction avec les constituants du sol	16
I.A.4. Les éléments traces en solution.....	18
I.B. Spéciation et mobilité des éléments traces dans les sols.....	18
I.B.1. Le cuivre et le plomb.....	18
I.B.2. Le chrome.....	20
I.B.3. L'arsenic.....	23
I.B.4. Interaction des cycles géochimiques des métaux et métalloïdes : impact du fer et du manganèse en contexte contaminé	26
II. - Distribution de l'activité microbienne dans les sols	27
II.A. La fonction biologique des sols : importance de la distribution spatiale des micros- habitats	27
II.A.1. Définition et fonctionnement d'un biofilm.....	27
II.A.2. Observation et localisation des biofilms dans les sols ; fonctionnement des micro-habitats.....	29
II.B. - Interactions des microorganismes et leur microenvironnement.....	31
II.C. Interactions biophysiques	34
II. D. Interactions biogéochimiques.....	40
II.D.1. Microorganismes et conditions géochimiques.....	41
II.D.2. Localisation microorganismes et matière organique	42
II.D.3. Interfaces biofilms-cycle géochimiques des éléments traces	44
II.D.4. Adaptation des biofilms à leur micro-habitat	44

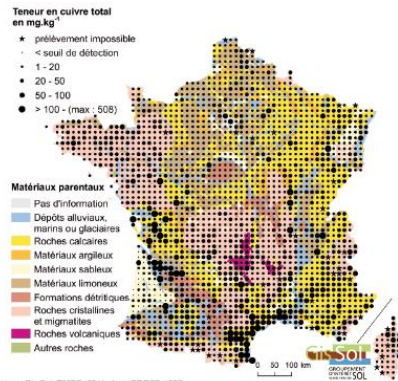
Introduction

La dénomination d'éléments traces regroupe les éléments métalliques (éléments traces métalliques, ETM) comme le chrome (Cr), le plomb (Pb), le cuivre (Cu), ou encore le cadmium (Cd), le zinc (Zn) et les métalloïdes comme l'arsenic (As), qui sont présents naturellement dans le fond géochimique en faibles concentrations, c'est-à-dire que leurs concentrations respectives sont inférieures à 0,1% (Alloway, 1995). Ces concentrations d'origine naturelle sont issues de l'altération naturelle des roches (sédimentaires, métamorphiques, magmatiques).

Les éléments traces sont ensuite fréquemment mobilisés par les processus verticaux au cours de la pédogenèse (Kabata-Pendias *et al.*, 1986). L'évolution des sols sous les contraintes climatiques et biologiques a pour effet des remaniements du fond pédogéochimique, conduisant ainsi soit à des appauvrissements, soit à des enrichissements en éléments traces selon les éléments et les processus pédogéochimiques à l'œuvre verticalement, au sein des profils de sol et horizontalement (effets topographiques, hydrologie de sub-surface). Ces éléments sont donc présents sur toute la surface terrestre et l'on retrouve des éléments traces dans des sols de composition et d'origine très variées (Baize, 1997 ; Wenzel *et al.*, 2003)(Figure I.1).

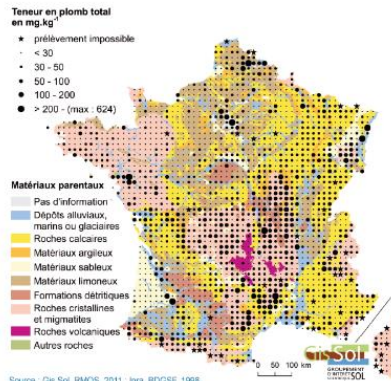
cuivre total

Les teneurs en cuivre total des horizons de surface (0-30 cm) des sols de France



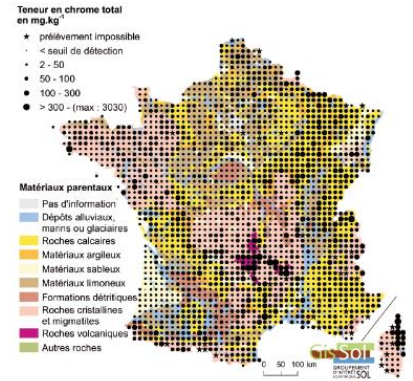
plomb total

Les teneurs en plomb total des horizons de surface (0-30 cm) des sols de France



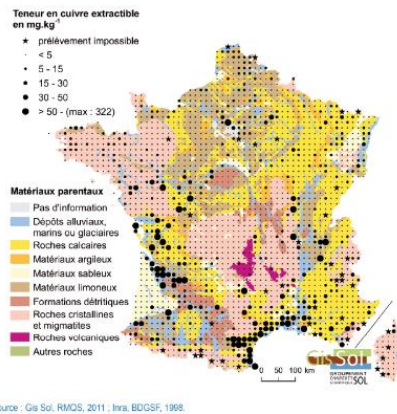
chrome total

Les teneurs en chrome total des horizons de surface (0-30 cm) des sols de France



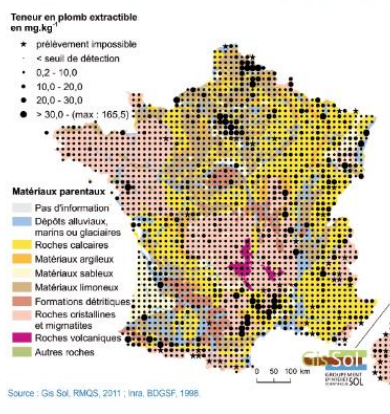
cuivre extractible

Les teneurs en cuivre extractible à l'EDTA des horizons de surface (0-30 cm) des sols de France



plomb extractible

Les teneurs en plomb extractible à l'EDTA des horizons de surface (0-30 cm) des sols de France



chrome extractible

Les teneurs en chrome extractible à l'EDTA des horizons de surface (0-30 cm) des sols de France

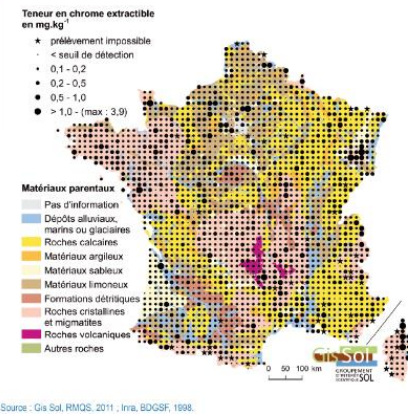


Figure I.1 : répartition des ETM dans les sols de surface sur le territoire français. Sont présentées les teneurs totales et les teneurs extractibles à l'EDTA (teneurs disponibles pour les organismes végétaux) ; source Gis Sol, RMQS, 2011 ; Inra BDGSF, 1998.

I. Teneurs, spéciations et mobilité des éléments traces dans les sols

Aux origines naturelles peuvent s'ajouter des apports d'éléments traces d'origine anthropique, qui souvent varient spatialement (Figure I.2) et temporellement (Figure I.3) (Alloway, 2013). Les éléments traces entrent dans la composition de nombreux produits agricoles et industriels. Ces éléments sont utilisés dans la composition d'agents de traitement de surface, de produits phytosanitaires (herbicides, pesticides), d'adjuvants, de peintures ou encore entrent dans la composition de composants électroniques.

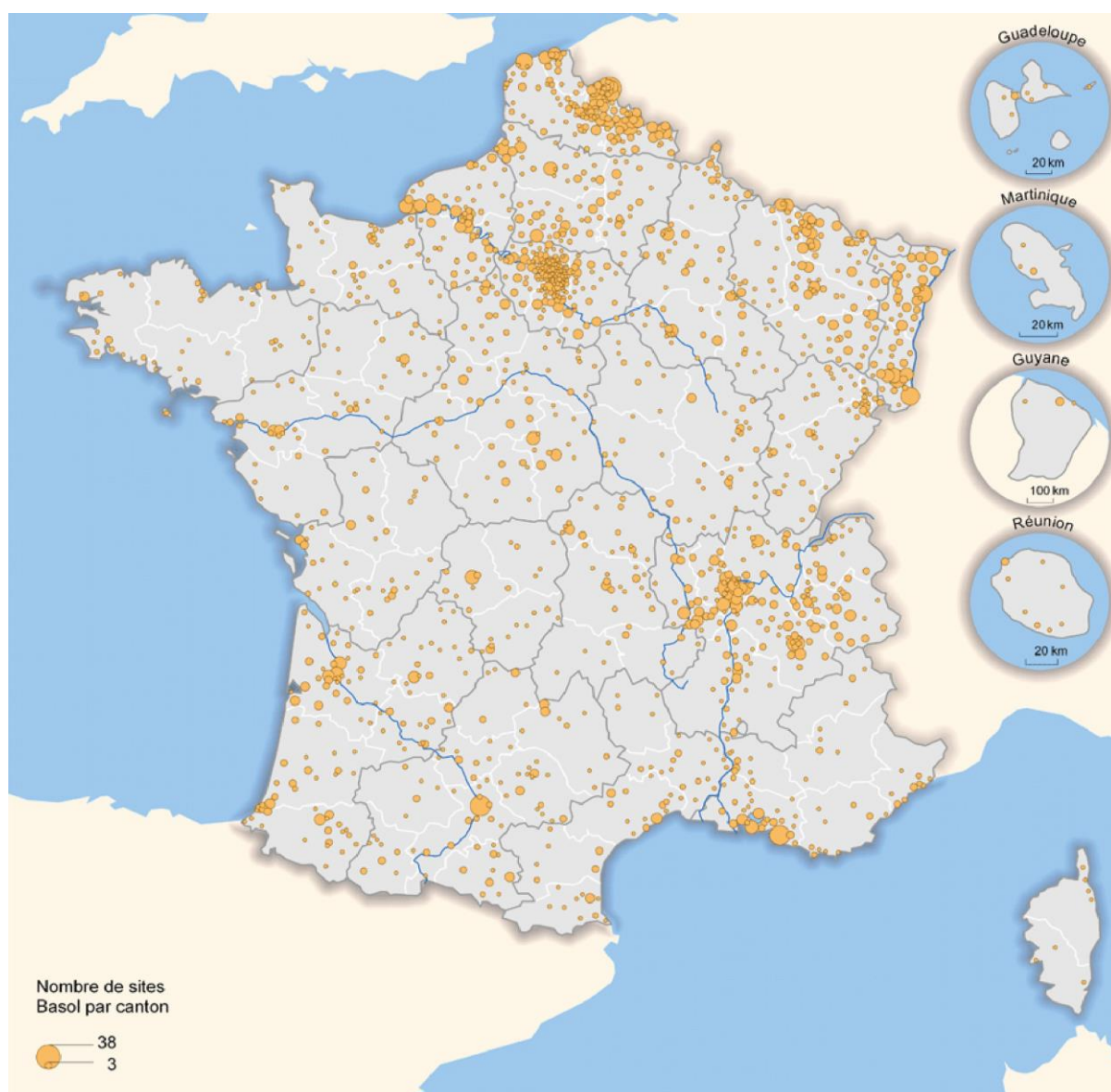


Figure I.2 : Localisation des sites et sols pollués répertoriés et identifiés pour la surveillance ou la remédiation sur tout le territoire français. Source : Medde, DGPR (Basol au 16 janvier 2012), 2012.

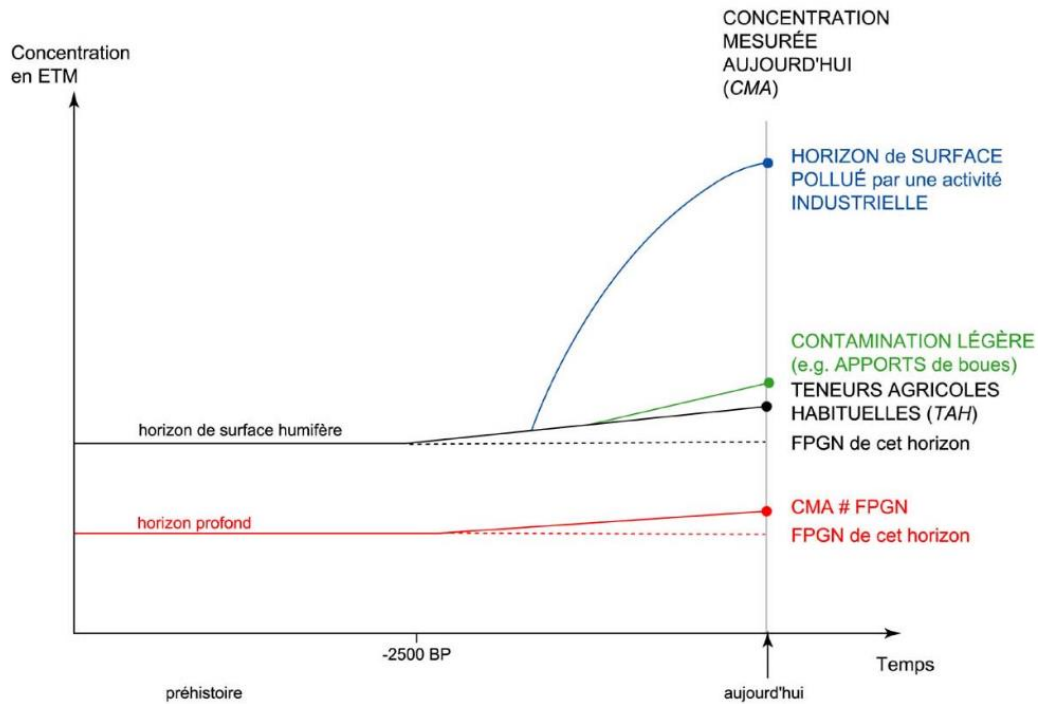


Figure I.3 : Evolution de l'occurrence des ETM dans les horizons de sol. Evolution du fond pédogéochimique naturel (FPGN) par la dégradation des matériaux parentaux pendant la pédogénèse, et apport anthropiques exogènes d'ETM au milieu naturel par les différents usages (agricoles et industriels). Denis Baize, Université de Poitiers.

I.A. Contamination des sols par les apports anthropiques en éléments traces

I.A.1 Enjeux de la contamination des sols par des éléments traces

les pollutions par les éléments traces représentent 22 % des cas de pollution dans les eaux souterraines et 25% des contaminations de sols, parmi les 7 familles de polluants identifiés sur sites et sols pollués (source Basol, 2012) (Figure I.4). Les éléments traces interagissent avec les cycles géochimiques naturels à très court terme, entraînant un changement de spéciation et donc de disponibilité et toxicité de ces éléments. Leur présence à des teneurs élevées en raison des apports anthropiques a pour effet potentiel une profonde modification d'un certain nombre de fonctions du sol, en particulier son pouvoir épurateur. Leur association avec certaines phases minérales ou organiques modifie fortement les équilibres ioniques, et modifie donc également les disponibilités et mobilités des phases organiques.

Ces polluants inorganiques sont persistants dans les sols. Les formes mobiles des éléments

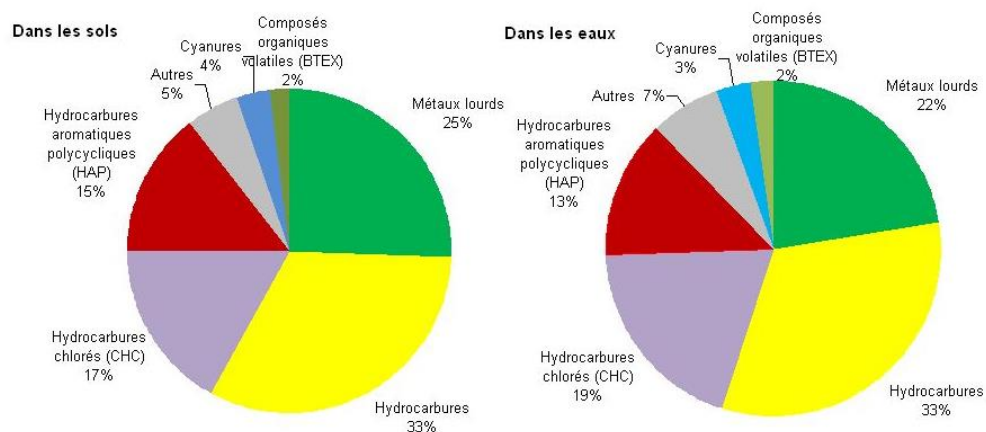


Figure I.4 : Poids global des 7 familles de polluants identifiés dans les sols ou nappes des sites et sols pollués en 2012. Source : Medde, DGPR (Basol au 16 janvier 2012), 2012.

traces sont lixiviées ou lessivées et les formes persistantes sont fortement liées à des phases stables des sols ou sont intégrées aux cycles biogéochimiques (Baize et Tercé, 2002). Leur accumulation et les contaminations multiples (effet cocktail) accroissent leur toxicité pour le milieu et pour de très nombreuses espèces végétales et animales (Kelley *et al.*, 2002). C'est donc tout le continuum sol-plante-faune qui est affecté. Cette toxicité dépend plus de la forme chimique de l'élément que de sa teneur totale. Si l'on considère l'exemple de l'arsenic sous sa forme la plus fréquente et peu mobile d'arséniate, As (V), cette forme est moins toxique que la forme As (III), plus mobile plus disponible (Hingstone *et al.*, 2001). La spéciation, c'est-à-dire les différentes espèces chimiques de l'élément, est par conséquent un point clé dans la compréhension du comportement des éléments traces. Elle permet de déterminer les types d'interactions entre l'élément considéré et les différents constituants du sol, leur mobilité et donc leur disponibilité et leur toxicité.

La compréhension du comportement des éléments traces est par conséquent cruciale pour comprendre (i) leurs interactions avec les constituants du sol dans des conditions physico-chimiques particulières à chaque sol, (ii) comment ces interactions vont conditionner leur mobilité, et (iii) leur impact à terme sur le maintien des fonctions des sols.

La gestion de pollutions multiples, courantes dans le cas des sites pollués, est rendue délicate par le comportement et les équilibres variés de ces contaminants en fonction des conditions physico-chimiques de leur environnement et des interactions entre leurs cycles géochimiques

(Zheng *et al.*, 2015). Ces conditions sont très variables d'un sol à l'autre et fréquemment modifiées par les contraintes climatiques comme les cycles d'humectation-dessiccation entraînant des phases successives état saturé / état désaturé des sols. Ces variations sont également retrouvées dans les zones de battement des nappes souterraines.

I.A.2. Spéciation des éléments traces et paramètres physico chimiques du sol

La mobilité des éléments traces se définit comme les possibilités de transfert depuis les différentes phases minérales et organo-minérales du sol vers la solution du sol. De très nombreuses interactions existent entre les éléments traces et les différents constituants du sol. Il peut s'agir de réactions d'adsorption / désorption, de précipitation / dissolution, ou encore de complexation (Figure I.5) :

- L'adsorption non spécifique est permise par des liaisons réversibles à la surface des particules de charge négative du sol. C'est le cas avec les particules de type argile et oxyde (Majone *et al.*, 1996 ; Martinez et McBride, 1998). La réversibilité permet une compétition des cations en solution sur les sites de sorption des particules (Srivastava *et al.*, 2005). Les cations se répartissent autour de la particule, formant une sphère dite externe de cations hydratés. Un changement physico-chimique permet la remobilisation des cations métalliques adsorbés. Certaines adsorptions non spécifiques conduisent à la formation de complexes.
- L'adsorption peut également être spécifique. On parle alors de chimisorption (Yong *et al.*, 1992). Ce type d'adsorption est principalement observé avec les acides humiques, les polysaccharides, les oxydes et hydroxydes d'aluminium, de fer et de manganèse permettant les liaisons sur des sites -OOH (Kumpiene *et al.*, 2008). Une liaison ionique ou covalente se crée entre la phase solide et le cation métallique, après la perte d'une partie de sa sphère hydratée. Une sphère interne se constitue en surface de la particule. La remobilisation de ces cations est alors plus difficile. Le pH est le principal paramètre de stabilisation de ces liaisons en régulant la protonation des surfaces solides.
- La complexation est permise sur les matières organiques du sol (MOS) via les groupements fonctionnels des molécules humiques. Les cations métalliques s'associent avec les ligands organiques.
- La précipitation représente un mécanisme clé pour l'immobilisation des éléments traces dans les sols (Sposito, 1993). Ce processus réversible est contrôlé par le pH du sol, la concentration disponible en éléments dans le milieu, le potentiel redox et la température.

Des éléments peuvent co-précipiter. Les cations métalliques s'associent alors avec une espèce chimique par substitution d'un élément de valence équivalente.

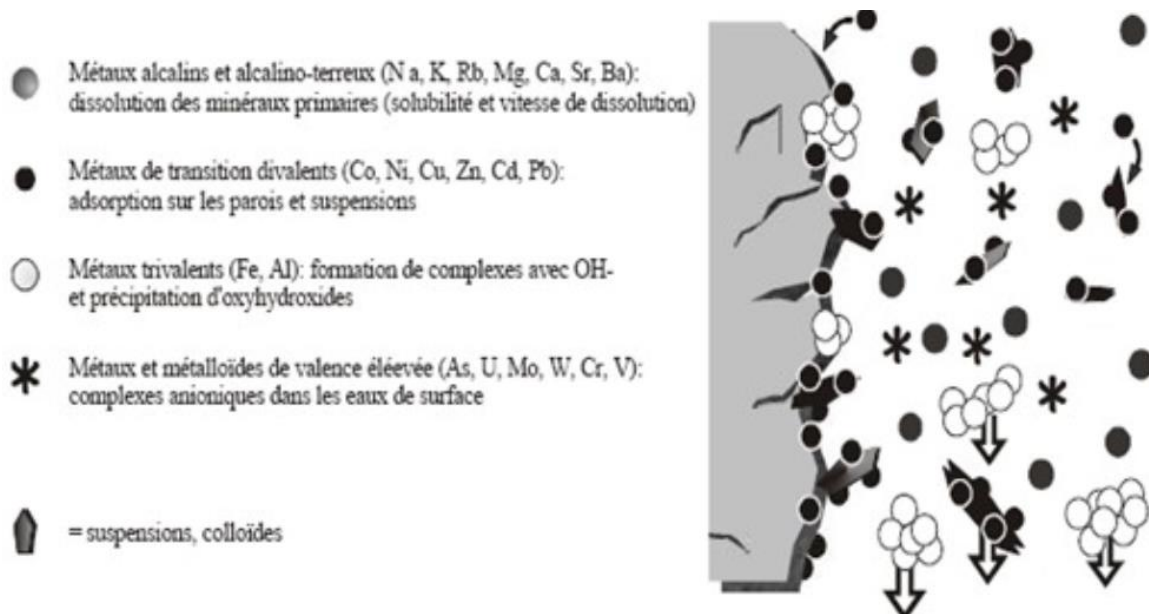


Figure I.5 : Réactivité des métaux dans le sol, cours Patrick Sharrock.

Le comportement des éléments traces décrit par les diagrammes Eh-pH dépend de facteurs de contrôle du milieu comme (i) le pH, (ii) le potentiel redox et (iii) la température. Selon les conditions chimiques du milieu, les éléments traces seront présents sous des formes différentes et réagiront, selon les cas, avec les différents composés du sol. Leur mobilité, leur disponibilité et ainsi leur toxicité vont varier selon (Li et Thornton, 2001) :

- Le pH du sol, qui est défini par la solution du sol, et qui est fréquemment compris entre 4 et 8. Ses variations impactent directement les processus de précipitation / dissolution, sorption / désorption, la complexation et l'oxydoréduction ainsi que la mobilité des ions (Mc Lean et Bledsoe, 1992 ; Mc Laughlin *et al.*, 2000). En règle générale, la variabilité du pH agit sur l'état de protonation des complexes aqueux et des surfaces des constituants du sol.
- Le potentiel redox (Eh), exprimé en mV, régit la réactivité des espèces chimiques entre elles via leur capacité d'échange d'électrons. Dans le sol, il est régulé par le potentiel redox de la solution de sol. L'augmentation du potentiel redox déplace l'équilibre redox vers les formes oxydées tandis qu'une diminution favorisera la réduction. Le potentiel redox, bien que peu utilisé en science du sol comparé aux mesures de pH, est fortement et communément utilisé au travers de nombreuses disciplines et mesuré à plusieurs

échelles notamment en biologie et microbiologie (Husson 2013). Les potentiels redox retrouvés dans les sols balayent une large gamme de degrés d'oxydation. Il faut toutefois interpréter ce potentiel avec précaution, en raison des nombreux couples redox existant dans le sol et des cinétiques de réaction, notamment avec les catalyses biologiques de processus géochimiques qui doivent être prises en compte pour comprendre l'intégralité de l'environnement géochimique (DeAngelis *et al.*, 2010).

- La température du sol influence directement les équilibres des réactions de dissolution / précipitation. Elle agit également indirectement en modifiant la teneur en eau du sol et par conséquent le pH et le potentiel redox (Remon, 2006). En zone non saturée, les interactions entre solution du sol et les différents constituants du sol sont en partie conditionnées par la variation du potentiel redox en fonction de la perméabilité du sol aux gaz, elle-même directement liée à sa teneur en eau.

Les micro-organismes du sol participent également activement à la dynamique des éléments traces, directement par la production d'exo-molécules complexantes, ou indirectement par modification de l'environnement chimique (pH, redox) (De Angelis *et al.*, 2010 ; Miot *et al.*, 2014).

I.A.3. Interaction avec les constituants du sol

Les surfaces fortement réactives vis-à-vis des éléments traces sont celles des fractions les plus fines des constituants du sol. Les affinités des éléments traces pour les différentes phases du sol sont cependant variables (Schneider, 2016) (Figure I.6).

La phase minérale des sols comporte de nombreux constituants. On retrouve les argiles, les oxyhydroxydes de fer, de manganèse et d'aluminium, mais également les minéraux phosphatés, sulfurés ou carbonatés (Duchaufour, 1995). Leur réactivité est due à leur charge globalement négative de surface. Cette charge est due aux substitutions isomorphes de cations au sein de la structure et aux groupements hydroxyles de surface. Les cations présents à proximité sont attirés par des forces électrostatiques de Coulomb. L'intensité de ces forces électrostatiques est influencée par le pH qui agit sur la protonation des surfaces.

Les oxyhydroxydes présentent un assemblage complexe entre des éléments métalliques et des atomes d'oxygène (O) et groupements hydroxyles (OH). Leur réactivité est également fortement dépendante du pH du milieu (degré de dissociation des groupements hydroxyles).

Les phases carbonatées s'associent via leur groupement CO_3^{2-} aux cations bivalents présents en solution. Sur les surfaces des particules de carbonates, on observe des mécanismes d'adsorption et co-précipitation avec des substitutions possibles de cations métalliques comme avec Cu^{2+} par exemple.

La matière organique des sols (MOS) joue un rôle primordial vis-à-vis des éléments traces. Les nombreux groupements fonctionnels présents permettent l'adsorption ou la complexation des éléments traces. Ils sont ainsi immobilisés dans des structures organo-minérales. Ces structures ou complexes argilo humiques, composés d'argiles et de molécules humiques possèdent des charges négatives de surface. Ces charges négatives leur confèrent une capacité d'échange cationique (CEC) permettant ainsi l'adsorption ou la complexation de cations comme les éléments traces. La CEC est variable d'un type de sol à un autre selon les concentrations en MO. Les éléments traces adsorbés ou complexés à cette MO peuvent alors migrer, ainsi associés aux molécules organiques, plus en profondeur au sein du profil de sol. Leur mobilité est ainsi augmentée grâce à une telle association à la matière organique du sol.

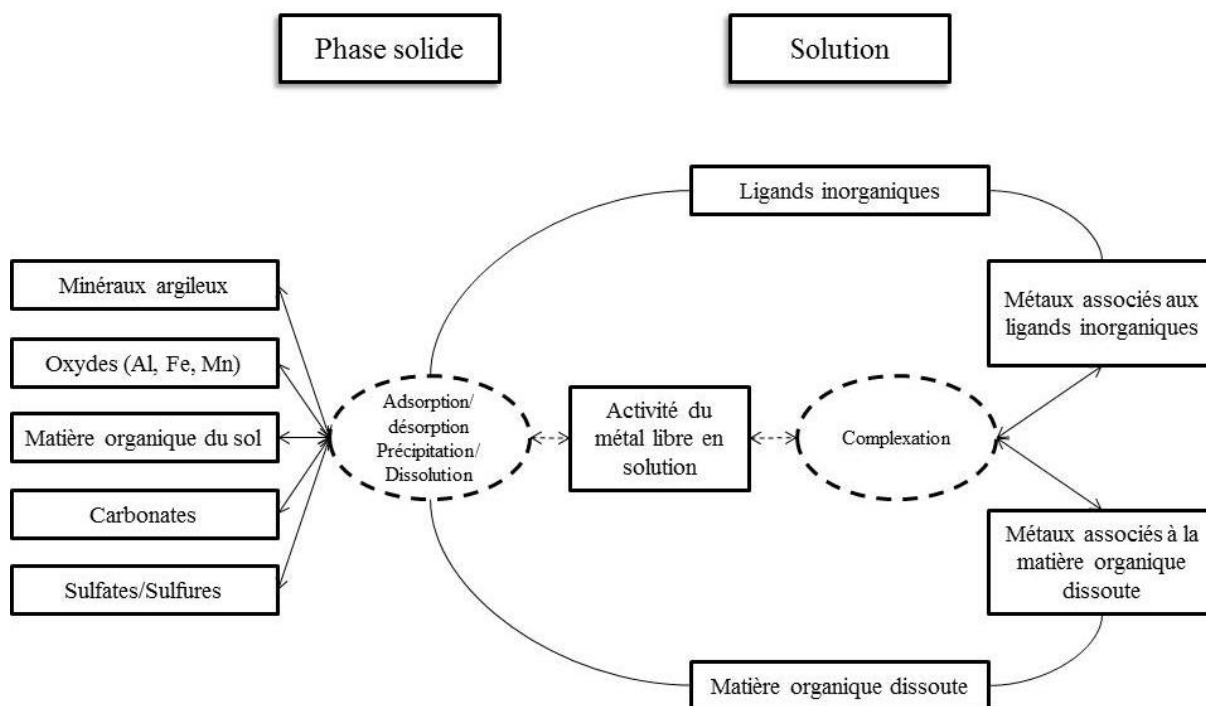


Figure I.6 : Schéma de fractionnement des ETM entre les différentes phases et constituants réactifs du sol et leur spéciation dans la solution de sol, d'après Schneider, 2016.

I.A.4. Les éléments traces en solution

Il résulte de ce qui précède que les métaux peuvent être présents en solution sous quatre formes. On trouve ainsi des métaux sous la forme d'ions libres qui sont les plus assimilables par les organismes, des métaux sous forme hydroxylée (dépendant du pH), des métaux complexés aux ligands inorganiques (liés aux anions en solution et oxydes), et des métaux complexés aux ligands organiques (molécules simples ou macromolécules comme les acides humiques et fulviques difficilement dégradables) (Schneider, 2016) (Figure I.6). En solution, tout comme dans les sols, les concentrations et la nature de la matière organique peuvent représenter le facteur de contrôle de la spéciation le plus important. Les complexations à cette matière organique peuvent permettre aux éléments traces de migrer le long du profil de sol.

I.B. Spéciation et mobilité des éléments traces dans les sols

Parmi les éléments traces majoritairement retrouvés dans les sols on retrouve les métaux comme le cuivre, le plomb, le chrome et des métalloïdes comme l'arsenic. Chacun de ces éléments traces présente un cycle géochimique propre mais les effets cocktails complexifient la compréhension des comportements de ces éléments traces dans les sols. C'est en particulier le cas des sites contaminés qui très généralement présentent des contaminations multiples. Les nombreuses études de remédiation sur sites contaminés ont permis de mieux comprendre le comportement géochimique des éléments traces vis-à-vis de nombreux composés chlorés, phosphatés ainsi que des oxydes comme les oxydes et oxyhydroxydes de fer et de manganèse.

I.B.1. Le cuivre et le plomb

Le cuivre et le plomb sont régulés par les variations de pH des sols, la texture (composition en argiles, oxydes de Fe et Mn), la matière organique, les phosphates carbonates et sulfates. Leur stabilisation par précipitation est principalement induite par une diminution du pH et la présence de phosphates ou carbonates. Ces processus sont les plus efficaces en terme de stabilisation comparés aux interactions entre le cuivre et les oxydes de fer et manganèse (Kumpiene *et al.*, 2008b). Le fer et manganèse ayant été utilisé et étudiés pour la remédiation sans résultats pour la stabilisation du Cu. Le Cu présente trois degrés d'oxydation possibles : 0, I et II. En

conditions oxydantes, pour des $\text{pH} < 7$, Cu(II) est retrouvé sous forme de cation Cu^{2+} . L'augmentation du pH diminue sa solubilité jusqu'à la précipitation de CuO (Figure I.7). Les formes de Cu(I) complexées aux nitrates, chlorures, phosphates ou sulfates sont quasiment inexistantes en solution. La forte affinité du Cu pour la matière organique dissoute permet de le complexer aux acides humiques ou fulviques augmentant sa mobilité le long du profil de sol alors que la matière organique non soluble, avec une diminution du pH , permet de complexer le cuivre et de l'immobiliser comme par exemple dans le cas des contaminations après utilisation des produits de traitement du bois comme les Arséniate de Cuivre Chromé (CCA) (Balasoiu, 2002).

Le plomb peut être retrouvé sous trois degrés d'oxydation : 0, II et IV. La forme majoritairement retrouvée en solution est le Pb^{2+} . La précipitation du plomb nécessite une augmentation importante du potentiel redox Eh du milieu (Figure I.8). Le plomb peut être stabilisé par complexation avec les phosphates (Mahar *et al.*, 2015) et les carbonates mais des contradictions subsistent vis-à-vis de la stabilité des phases formées en raison de compétitions possibles avec d'autres métaux comme le zinc et le cuivre (Kumpiene *et al.*, 2008b). De plus, les variabilités de pH peuvent entraîner des phénomènes de dissolution et un relargage du plomb. Les systèmes Ca-Pb ne sont donc pas fiables pour une immobilisation de longue durée. Les oxydes de fer et manganèse ont également été étudiés mais les résultats restent mitigés quant à l'efficacité de ces traitements. Des études montrent une efficacité relative du fer et une meilleure réactivité entre le plomb et les oxydes de manganèse. Bien que celle-ci reste peu étudiée (Schneider *et al.*, 2016), plusieurs auteurs constatent l'adsorption du plomb sur les oxydes de manganèse (Hettiarachchi et Pierzynski, 2004 ; Micháľková *et al.*, 2014). Comme le chrome, l'oxydation du plomb et sa stabilisation peut être réalisée par l'oxydation du Mn(II) en Mn(IV) , oxyde de manganèse biogénique, par l'action des bactéries (Mahar *et al.*, 2015).

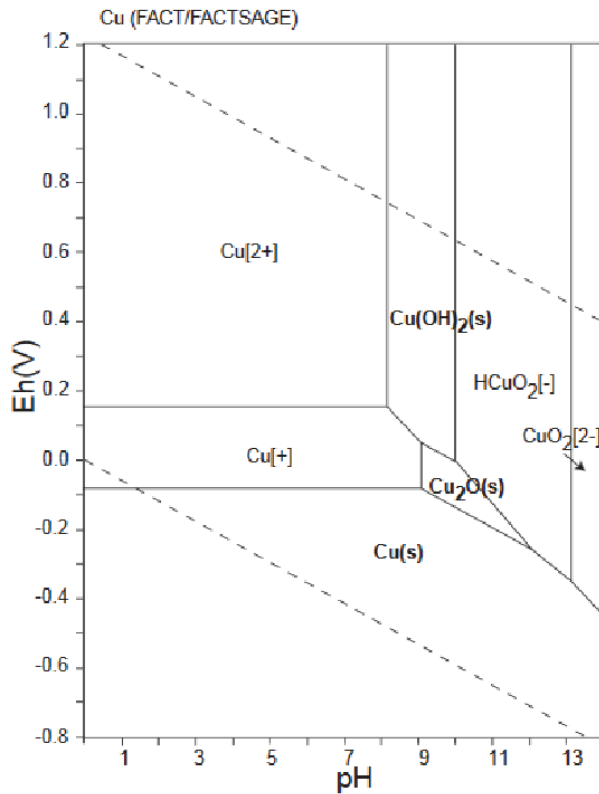


Figure I.7 : Diagramme Eh-pH de stabilité du cuivre.

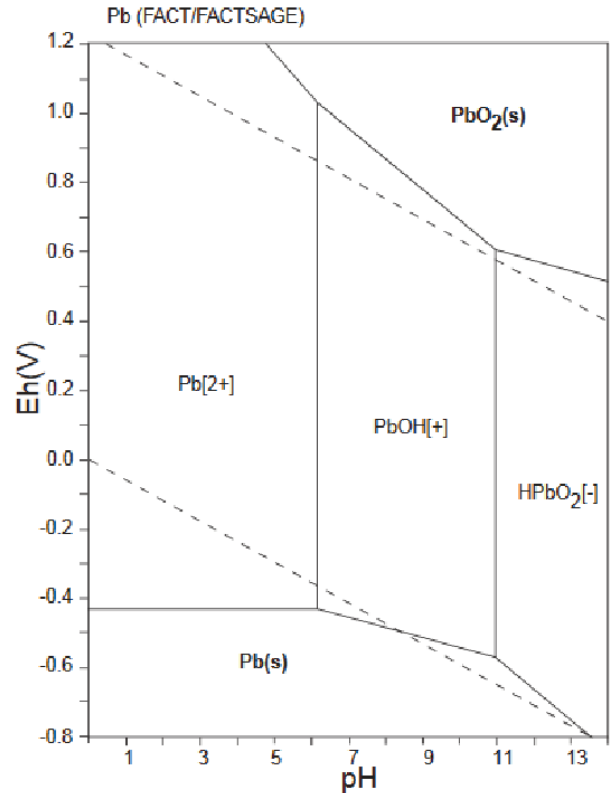


Figure I.8 : Diagramme Eh-pH de stabilité du plomb.

I.B.2. Le chrome

Le chrome (Cr) fait partie des éléments traces métalliques (ETM). Il possède six états d'oxydation, du Cr(0) au Cr(VI). Dans le milieu naturel, il est principalement présent sous les formes trivalentes Cr(III) et hexavalentes Cr(VI). Le Cr(VI) d'origine exogène est rapidement réduit en Cr(III) dans le milieu naturel (Kumpiene *et al.*, 2009) (Figure I.9). Contrairement aux autres métaux, le Cr peut être présent sous forme cationique ou anionique. Le Cr(III) est plus stable dans l'environnement que sa forme oxydée Cr(VI), cette différence de réactivité entraîne une disponibilité plus importante du Cr(VI) en solution et augmente la toxicité de celui-ci chez les organismes vivants.)

Dans l'eau, les espèces du Cr(VI) sont très solubles. Le Cr(III), quant à lui, est très peu soluble pour des pH > 4-5. Le Cr(III) possède des capacités de complexation forte avec des ligands

organiques et inorganiques. Ces liaisons lui permettent de rester soluble en solution jusqu'à un pH de 7 à 7,5 (Figure I.9 et Figure I.11).

Si l'on considère la fraction solide, les formes les plus stables du Cr(III) sont la chromite FeCr_2O_4 et l'oxyde chromique Cr_2O_3 . Si le Cr_2O_3 est une forme minérale retrouvée dans l'environnement (Tecon et Or, 2017 ; Sass et Rai, 1987), la chromite, en revanche, est peu observée dans des milieux naturels (Hem, 1977).

Les phases solides les plus représentées mais peu stables sont le $\text{Cr}(\text{OH})_3$ qui présente une forte capacité de dissolution / précipitation, ainsi que les co-précipités de Fe(III) et Cr(III). Ces co-précipités sont dépendants des pH de solubilité du Fe(III). En conditions acides, les co-précipités sont formés. En conditions neutres ou alcalines, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ est très peu soluble et $\text{Cr}_2(\text{OH})_3$ se forme.

Le Cr(III) est également retrouvé sous forme adsorbée. Cette réaction est rapide et forte entre les espèces du Cr(III) et les oxydes ainsi que les minéraux argileux. Plus le pH et les teneurs en matière organiques augmentent, plus l'adsorption du Cr augmente. L'adsorption diminue en présence de cations métalliques compétiteurs en solution.

Le Cr(VI) est retrouvé dans les sols sous forme de co-précipités d'aluminium pour des pH acides (de 4 à 5).

Des phases adsorbées sont également retrouvées. L'adsorption du Cr(VI) est similaire à celle des phosphates mais moins bien comprise (James et Bartlett, 1983). Le Cr(VI) s'adsorbe sur les oxydes de manganèse, aluminium, et fer (Mac Naughton, 1975). Cette adsorption diminue avec une augmentation du pH. Le Cr(VI) est donc très peu retenu à pH basique (Amacher *et al.*, 1988).

La réduction du Cr(VI) en Cr(III) peut être réalisée par divers types de bactéries (Turick *et al.*, 1997 ; Schmieman *et al.*, 1998 ; Shakoory *et al.*, 1999). L'oxydation du Cr(III) en Cr(VI) n'est pas catalysée directement par les microorganismes, mais ces derniers pourraient contribuer indirectement à son oxydation par des oxydes de manganèse biogéniques (Eary and Rai, 1987 ; Manceau et Charlet, 1992 ; Kumpiene *et al.*, 2008a), relarguant du Cr(VI) en solution.

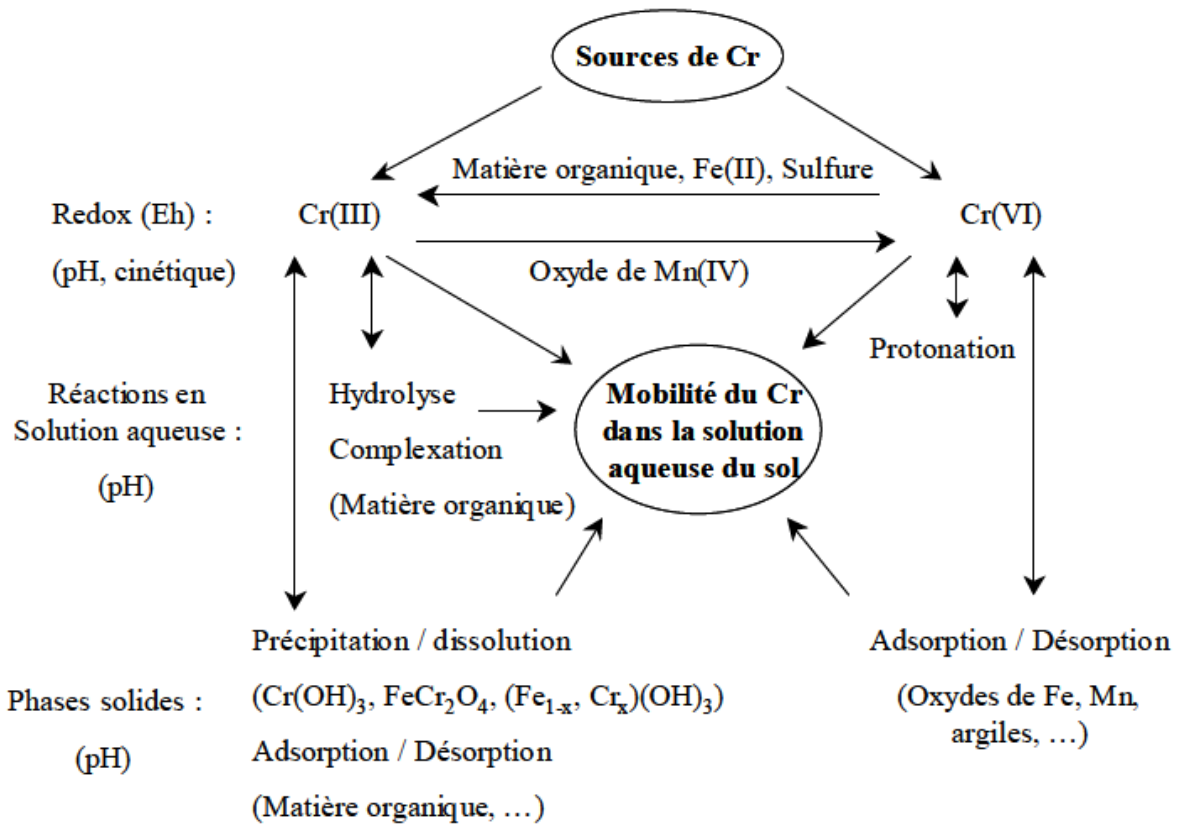


Figure I.9 : Cycle biogéochimique du chrome. D'après Lespagnol, 2003.

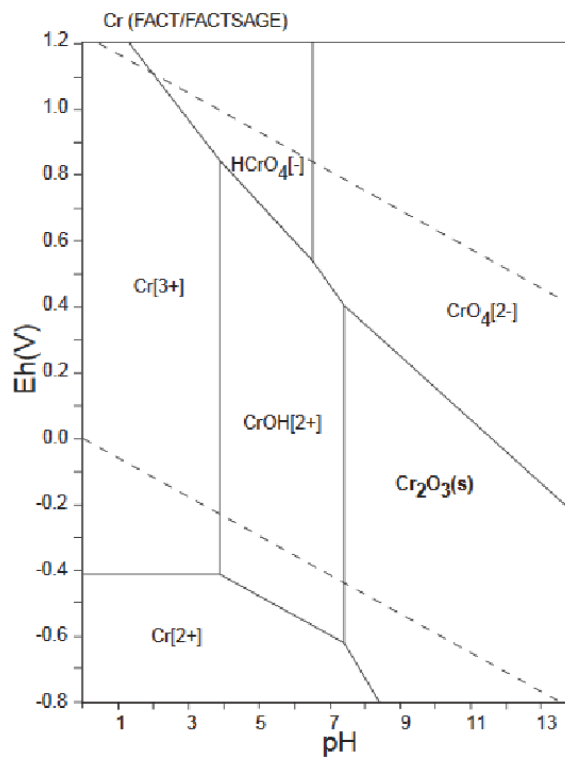


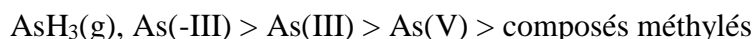
Figure I.10 : Diagramme Eh-pH de stabilité du chrome.

I.B.3. L'arsenic

L'arsenic (As) est un élément trace appartenant au groupe des métalloïdes. En faible quantité, il est indispensable à la vie végétale et animale (Neuzil, 1990). L'arsenic présent dans les sols provient de processus d'altérations pédogéochimiques des roches qui en contiennent mais également des apports exogènes précédemment cités (effluents industriels liquide ou gazeux, exhaustes miniers). Sa présence, très souvent associée à de nombreux éléments métalliques dans les minéraux des roches, en ont fait un indicateur de prospection minière, notamment pour l'or.

L'arsenic est ubiquiste. On le retrouve donc dans de nombreux milieux (Roy *et al.*, 2015) (Figure I.). Les teneurs retrouvées vont de quelques ppb dans les eaux de surface à plusieurs milliers de ppm dans les sols de sites pollués ou des zones de forte anomalie géochimique.

Sa toxicité est étroitement liée à la forme de l'élément dans le milieu. La toxicité de l'élément dépend de la réactivité de la forme chimique ainsi que de la disponibilité de l'élément. Les espèces de l'arsenic peuvent être classées selon leur toxicité comme suit :



Quatre degrés d'oxydation sont possibles pour l'arsenic : -3, 0, +3 et +5. Les principaux composés retrouvés dans l'environnement de forme solide, liquide ou gazeuse sont l'arsénite As(III) et l'arséniate As(V), tous deux inorganiques.

La spéciation de l'arsenic s'exprime sous différentes formes selon les phases du sol. Ainsi, dans les eaux, on retrouve majoritairement As(V) et As(III), ce dernier, plus mobile, est aussi le plus toxique.

Peu de précipités de As(V) sont retrouvés dans les sols (Lespagnol, 2003). Le piégeage de l'arsenic est principalement effectué par les mécanismes d'adsorption spécifique (Lespagnol, 2003) et complexation sur les oxyhydroxydes, de fer, aluminium et manganèse (Kumpiene *et al.*, 2008a). Les compétitions sur les sites de surface des particules sont accrues ou diminuées via les variations de pH (Hattab, 2013).

En conditions oxydantes, dans les sols bien aérés (zone non saturée), As(V) prédomine et se retrouve fortement lié aux oxyhydroxydes de fer et d'aluminium. Il devient mobile dans les sols pauvres en matières organiques (Figure I.).

En conditions réductrices, As(III) prédomine (Figure I.) et il est capable de migrer en profondeur. La dissolution des oxyhydroxydes de fer entraîne la libération d'arsenic en solution. Les bactéries jouent un rôle majeur dans la spéciation de l'arsenic, à travers divers mécanismes : oxydation de l'As(III) en As(V) (Battaglia-Brunet *et al.*, 2002), réduction respiratoire de l'As(V) en conditions anoxiques, réduction de l'As(V) dans toutes les conditions redox via le système de résistance ARS. Certains microorganismes bactériens sont capables de méthyler des composés arséniés (Maeda, 1994). Cette forme organique présente une toxicité moindre que les formes inorganiques. Ces formes restent cependant minoritaires dans la solution de sol.

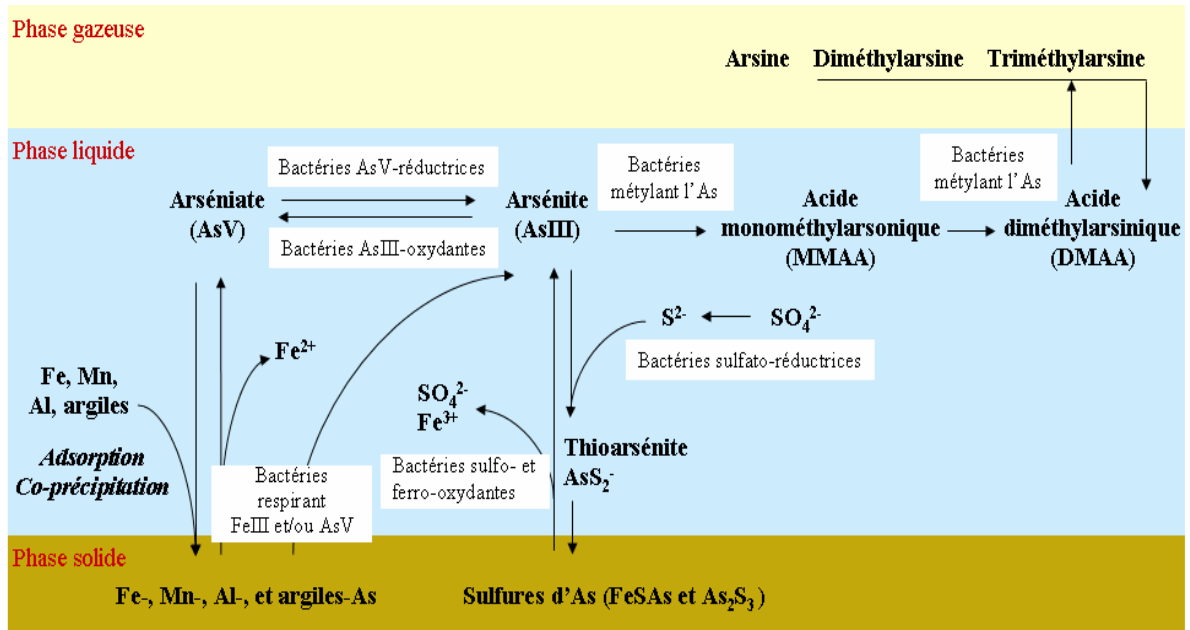


Figure I.11 : Cycle biogéochimique de l'arsenic.

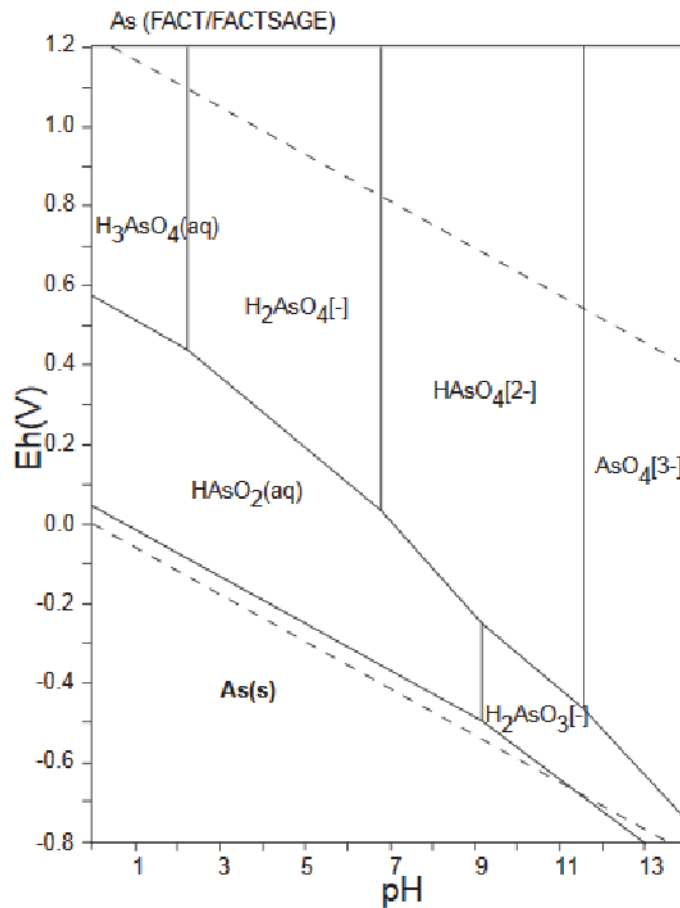


Figure I.12 : Diagramme Eh-pH de stabilité de l'arsenic.

I.B.4. Interaction des cycles géochimiques des métaux et métalloïdes : impact du fer et du manganèse en contexte contaminé

La spéciation des métaux et métalloïdes peut être modifiée par l'oxydation de fer ou de manganèse. Ces interactions ont été très étudiées notamment pour la remédiation sur site et sol pollués (Kabata-Pendias et Pendias 1986 ; Eary, Rai, et Society 1987; Kumpiene *et al.*, 2008a ; Kumpiene *et al.*, 2009; Emerson *et al.*, 2010; Seyfferth *et al.*, 2010). Dans le cadre de travaux sur sites contaminés, le fer et le manganèse peuvent être retrouvés en forte concentration. Ces fortes concentrations pourraient être à l'origine d'oxydation de métaux et métalloïdes permettant leur stabilisation comme nous l'avons décrit précédemment pour le Cr et l'As notamment. La combinaison du fer et du manganèse pour réduire la mobilité et la toxicité des métaux et métalloïdes est peu étudiée mais a montré ses effets (Eary *et al.*, 1987 ; Terry et Banuelos 1999).

En fortes concentrations, ces métaux peuvent également devenir des accepteurs d'électrons puissants et participer aux variations de potentiel redox des sols. La catalyse biologique peut permettre dans certains cas de modifier le potentiel redox et le pH et influencer sur les spéciations du fer et du manganèse (Katsoyiannis and Zouboulis, 2004). Ces variations sont susceptibles de modifier les équilibres Eh/pH et ainsi influencer sur la spéciation des métaux et métalloïdes comme le Cu, le Pb, le Cr et l'As.

II. - Distribution de l'activité microbienne dans les sols

II.A. La fonction biologique des sols : importance de la distribution spatiale des micros-habitats

La densité bactérienne d'un sol est estimée à 10^7 à 10^{12} bactéries par gramme de sol sec (Watt *et al.*, 2006). Cette densité fait du sol un des plus vaste habitat microbien comparé à d'autres compartiments terrestres (Vos *et al.*, 2013). Une faible partie de cette biomasse est connue et cultivable en laboratoire (0,1 à 10%). Cette biomasse constitue un compartiment à part entière du sol, impliqué dans de nombreux processus, de la pédogénèse au fonctionnement plus global des sols. Les microorganismes participent à la régulation de grands cycles géochimiques comme ceux du carbone, de l'azote, du phosphore. Ils sont également impliqués dans la formation du sol. Leur rôle primordial dans le maintien des fonctions du sol est largement décrit dans la littérature (Tecon et Or, 2017). De nombreuses hypothèses restent en suspens quant au développement des communautés microbiennes des sols et leur fonctionnement *in situ* : l'identification des paramètres régissant leur installation, la résolution des processus, c'est-à-dire l'échelle d'observation des paramètres clés (de l'échelle fonctionnelle d'une bactérie à celle de la communauté), et le découplage des effets structuraux, chimiques et biologiques au sein du matériau du sol très hétérogène.

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études visent à améliorer l'observation des communautés microbiennes dans l'environnement complexe qu'est le sol et convergent vers l'observation à l'échelle des pores et des bactéries comme échelle de processus clés qu'il est indispensable de mieux comprendre pour apprécier l'implication de la diversité biologique dans les fonctions de l'écosystème sol (Crawford *et al.*, 2005) et dans la formation d'interfaces biogéochimiques (Totsche *et al.*, 2010a), en adaptant les techniques analytiques.

II.A.1. Définition et fonctionnement d'un biofilm

Les biofilms se définissent par un ensemble de bactéries adhérentes les unes aux autres et/ou à une surface ou interface, sous forme d'agrégat, de flocs présents sur une surface ou répartis dans un milieu poreux (Costerton *et al.*, 1995). L'observation des biofilms a été optimisée grâce à la microscopie confocale permettant d'observer la structure des biofilms et d'observer leur

dimension horizontale et verticale. Les premières observations ont également permis de constater, pour une souche bactérienne, la répartition des constituants du biofilm en fonction des conditions d'hydratation et de disponibilité de nutriments (Costerton *et al.*, 1995).

Les biofilms subissent des cycles de « renouvellement » de l'installation des bactéries à leur croissance et leur dispersion (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). L'adhérence des bactéries entre elles est permise par la sécrétion d'exo-polysaccharides ou de protéines d'adhérence. Toutes les bactéries peuvent contribuer à la formation d'un biofilm, qu'elles secrètent ou non des exo polysaccharides ou des systèmes d'adhérence. Un biofilm se compose donc de plusieurs types de bactéries. Un biofilm possède une structure plus ou moins poreuse et un fonctionnement propre, régi par des phénomènes de compétition et d'adaptations (cf. II.D.4). Si la structure des biofilms a pu être étudiée en microscopie, l'étude des biofilms dans un milieu hétérogène et complexe comme le sol reste un défi.

Les apports d'énergie et de molécules organiques disponibles permettent le fonctionnement de leur métabolisme de production énergétique et structurale, dans des conditions physico chimiques adéquates régulant les compétitions et les activités des bactéries (DeAngelis *et al.*, 2010). Ceci permet aux bactéries de s'installer et se développer jusqu'à s'agréger entre elles pour former une structure qui tapisse les parois solides, appelée biofilm.

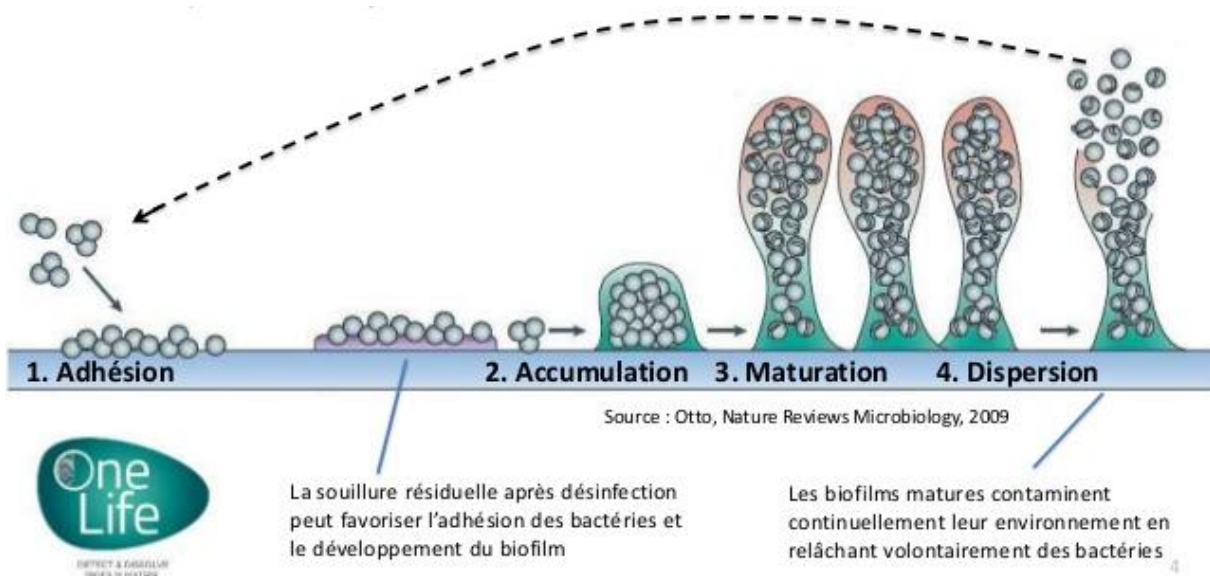


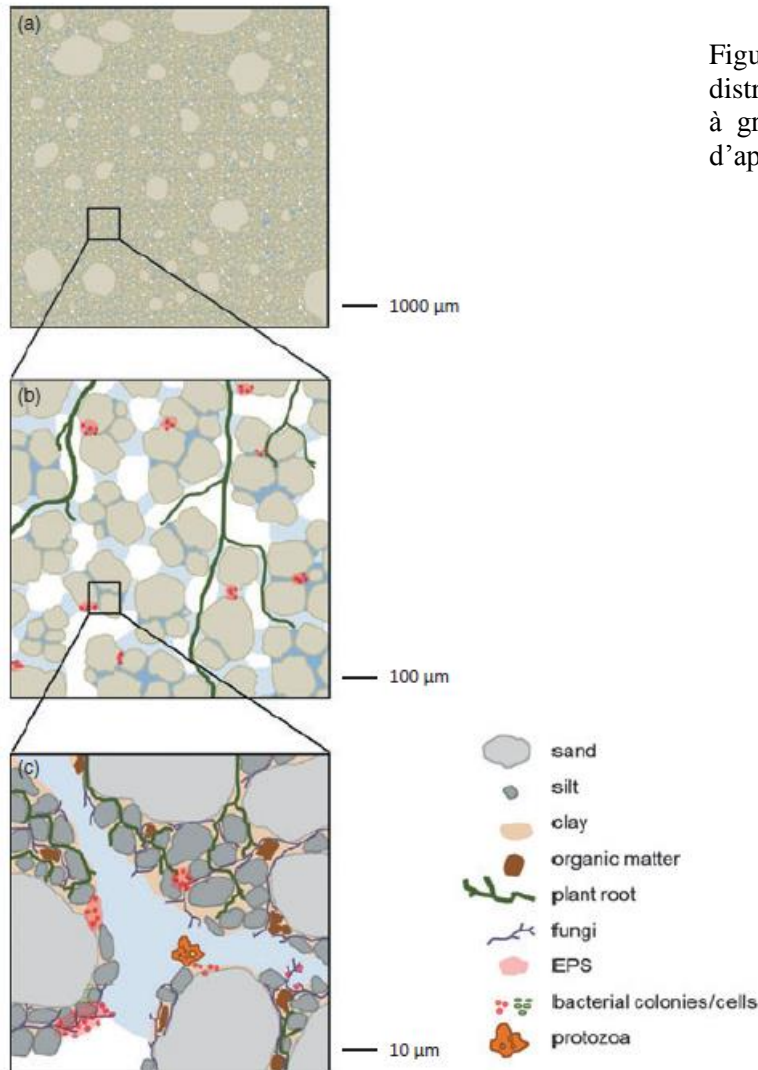
Figure I.12 : Schéma de développement d'un biofilm, d'après Otto, 2009.

II.A.2. Observation et localisation des biofilms dans les sols ; fonctionnement des micro-habitats

Les méthodes d'observations, jusque-là cloisonnées par discipline, nécessitaient très généralement la dégradation des échantillons et donc la perte d'informations sur la distribution de l'activité microbienne (Vos *et al.*, 2013). Depuis, des avancées ont permis d'étudier la biomasse à petite échelle (μm) aussi bien en termes de fonctionnement par l'étude de la diversité microbienne, que de la distribution spatiale des processus. Ces nouvelles approches à petite échelle confirment la dispersion des micro habitats au sein de la structure (Ritz et Young, 2011 ; Vos *et al.*, 2013a ; Raynaud et Nunan, 2014 ; Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015 ; Gutiérrez Castorena *et al.*, 2016) (Figure I.13) observés à des échelles plus grandes (Clark et al., 2011; Crawford et al., 2005; Nunan et al., 2003). Kuzyakov et Blagodatskaya (2015) proposent une nouvelle définition adaptée à l'échelle d'observation et de fonctionnement des bactéries (du μm au m) au-delà des définitions proposées jusqu'alors à l'échelle du champ ou du paysage, basées sur des analyses statistiques avec comme paramètres clé les paramètres abiotiques. La localisation est alors définie par le terme « hotspot » (Gutiérrez Castorena *et al.*, 2016), micro habitats (Ritz et Young, 2011; Krause *et al.*, 2014) et le terme de « hot moment » (Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015), faisant appel à la notion d'accélération des processus locaux permettant la mise en place de ces biofilms, de façon très localisée. Ces « hot spots » microbiens, ou micro habitats/niches sont régis par l'hétérogénéité de la structure du sol et sa porosité. Ils se caractérisent par des zones de forte activité biologique concentrée dans un faible volume. Ces zones correspondent à des lieux d'apports importants en ressources énergétiques. Plusieurs auteurs caractérisent ces « hotspots » de façon différente selon l'échelle étudiée. Ceci pose la question de l'identification des paramètres de contrôle pertinents aux différentes échelles d'observation pour la répartition de ces hotspots, leur diversité et leur maintien (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) (Crawford *et al.*, 2005 ; Holden *et al.*, 2011).

La notion de « hot moment » renvoie à la notion de « réaction » du biofilm à son environnement. Il faut alors découpler les effets biotiques propres au biofilm (son développement et son maintien) et abiotiques. En 2015, Kuzyakov et Blagodatskaya distinguent alors deux types de hotspots formés par une activité biotique (très actifs en termes de dégradation, de mise à disposition des nutriments et de catalyse biologique) et les hotspots formés par des processus abiotiques (peu actifs). Cette notion est également étudiée vis-à-vis de la dégradation du carbone à l'échelle du pore (Ruamps *et al.*, 2013). Ceci soulève la question

de l'importance des activités microbiennes dans la régulation de leur micro environnement proche. L'installation des microorganismes est gérée par la contrainte physico-chimique (DeAngelis *et al.*, 2010), mais les microorganismes et plus particulièrement les biofilms semblent capables de réguler leur environnement géochimique proche. Selon l'échelle fonctionnelle, de la bactérie à la communauté, on peut donc s'interroger sur le poids de ces processus dans la régulation d'un environnement biogéochimique, d'autant plus que les microorganismes sont capables de développer des structures particulières, formant des biofilms capables d'adaptations (cf.II.D.4). Cette hiérarchisation des processus de régulation du milieu pourrait alors être bouleversée en contexte de sols contaminés. Il est donc intéressant d'essayer de comprendre le poids des processus biologiques à petite échelle et d'observer leurs effets en contexte contaminé, leur survie ou adaptation et leur influence sur les éléments traces.



II.B. - Interactions des microorganismes et leur microenvironnement

Un grand nombre d'approches existent dans la littérature quant à l'étude des micro-habitats et de leur importance dans la formation des sols mais également leur activité et leur maintien (Crawford *et al.*, 2005 ; Ritz et Young, 2011 ; Or *et al.*, 2007 ; Raynaud et Nunan, 2014 ; Vos *et al.*, 2013; Tecon et Or, 2017). Les avancées techniques ont permis de croiser les disciplines et ainsi d'apporter des éléments quantitatifs de compréhensions des processus à petite échelle, c'est-à-dire à l'échelle fonctionnelle des microorganismes. La complexité du sol et son fonctionnement nécessitent une approche intégrée faisant appel à différentes disciplines pour avoir une vision globale des processus en jeu et de leurs interactions. Tous ces travaux convergent vers l'importance du fonctionnement biologique des sols. L'adaptation des méthodes d'observation et l'analyse du sol dans son intégrité reste un enjeu principal à l'heure actuelle. Les avancées techniques permettent de nouvelles approches combinées de voir le jour; de l'étude de systèmes naturels à la simplification de systèmes en laboratoire. Il est donc crucial d'introduire des éléments de compréhension de chacune des interactions biophysiques et biogéochimiques afin de comprendre comment la structure et les transferts au sein de ces structures hétérogènes participent à la répartition spatiale des biofilms, les interactions entre la structure et la mise en place de conditions biogéochimiques particulières entraînant une sélection des microorganismes. Il est également important de comprendre comment ceux-ci sont capables d'adaptation et d'agir sur la chimie de leur micro environnement de façon très localisée ou à plus grande échelle.

En premier lieu, la question des relations entre l'état structural, la porosité qui en résulte, et l'activité bactérienne a longtemps été limitée par les possibilités de les analyser conjointement. Or, depuis une dizaine d'années, les avancées en termes d'imagerie des sols permettent d'aller plus loin.

Ainsi, de façon indirecte, le développement de biofilms apparaît contraint par les conditions climatiques que subissent les sols. Les écoulements et le taux de saturation en eau du milieu poreux régulent les flux liquides, gazeux et donc les flux de matière, influençant la répartition des sources de nutriments et leur disponibilité, comme les sources de carbone (Or *et al.*, 2007 ; Ruamps *et al.*, 2013 ; Borer *et al.*, 2018). La dynamique de l'activité bactérienne au sein du système poreux en fonction des cycles d'humectation - dessiccation à l'échelle des biofilms peut être très rapide. Ces processus conduisent à la dispersion de micro environnements décrits

en écologie microbienne (Thieme *et al.*, 2003 ; Vos *et al.*, 2013a). Il reste difficile de déconvoluer les multiples processus impliqués.

De nombreuses études concernent les relations entre la structure du sol et la diversité bactérienne. Plusieurs approches ont été menées (Vos *et al.*, 2013), soit par le suivi de l'activité biologique (respiration) (Six *et al.*, 2004), soit via des analyses ADN sur des échantillons déstructurés ou sur des agrégats, la dissection d'agrégats et enfin la visualisation par imagerie 2D ou 3D. Les avancées en termes d'imagerie ont permis d'accéder à la visualisation des structures en 3D de taille micrométrique et nanométrique des sols (Mees *et al.*, 2003; Wildenschild et Sheppard, 2013 ; Helliwell *et al.*, 2013; Sleutel *et al.*, 2008 ; Tippkötter *et al.*, 2009). L'ensemble de l'échantillon non déstructuré peut alors être étudié, permettant d'accéder à des données quantitatives plus pertinentes que les données en 2D (porosité, connectivité, tortuosité, etc). Les fortes résolutions de ces techniques ont également permis de mettre en place des expériences de marquage de biofilms afin de visualiser dans leur état *in situ* les développements de biofilms au sein des milieux poreux. Plusieurs méthodes ont alors été développées, par contrastant, pour distinguer l'eau des organismes vivants, par ajout d'iode de potassium, sulfate de baryum ou chloronaphtalène (Rolland du Roscoat *et al.*, 2014; Ivankovic *et al.*, 2016; Iltis *et al.*, 2011), ou encore par marquage des organismes par microbilles d'argent (Davit *et al.*, 2011). Ces méthodes 3D dans le cas de l'étude de sols naturels restent complémentaires aux méthodes d'intrusion au mercure ou par adsorption d'azote quant à la quantification des pores non connectés (Zong *et al.*, 2015). Ces difficultés ont ouvert le champ à des expérimentations sur des échantillons synthétiques simplifiés, reconstitués (Juyal *et al.*, 2018) pour permettre une visualisation en 3D de l'intérieur d'échantillons, de colonnes par exemple (Gargiulo *et al.*, 2008).

La micro-fluidique se définit comme une technologie de manipulation de petits volumes de fluides (10^{-8} , 10^{-9} l), dans des systèmes de taille micrométriques à nanométriques. Le développement de ces techniques jusque-là utilisées pour l'observation à petite échelle dans les domaines de l'électrochimie, de la biomédecine et de l'optique (Shih *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2008 ; Zhao *et al.*, 2009 ; Marre et Jensen, 2010 ; Wang *et al.*, 2011 ; Kumar Gunda *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2012 ; Florea *et al.*, 2013 ; Magnusson *et al.*, 2013 ; Lin *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Zhou *et al.*, 2013 ; Baek *et al.*, 2015 ; Deng *et al.*, 2015 ; Rubinstein *et al.*, 2015) viennent enrichir les applications en géosciences (Cnudde et Boone, 2013b). Les systèmes de fabrication et les nombreux matériaux disponibles (Marre et Jensen, 2010) ont permis de créer des géométries analogues à des échantillons naturels et variés (Karadimitriou et Hassanizadeh,

2012) pour l'étude physique des milieux, ils peuvent alors être définis comme des « Geological labs on chip » (GLoCs) (Morais et al., 2016). Ces approches permettent de nombreuses applications de mesures de pH, d'indicateurs colorimétriques, de spéciation métalliques (Zhao *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 2012 ; Magnusson *et al.*, 2013 ; Florea *et al.*, 2013 ; Perro *et al.*, 2016). Depuis une dizaine d'années, plusieurs auteurs ont couplé des approches de la physique, de la chimie et de la microbiologie afin d'apporter de nouvelles données quantitatives sur des systèmes expérimentaux s'approchant des conditions naturelles. Plusieurs souches bactériennes ont d'ailleurs été utilisées en système micro-fluidique pour comprendre la répartition des bactéries par rapport à la géométrie du dispositif micro-fluidique étudié, et observer l'effet des variations de saturation du milieu sur leur développement (Deng *et al.*, 2015). La simplification des systèmes passe également par la simplification de la communauté bactérienne étudiée, fréquemment par l'utilisation de souches pures connues de bactéries, isolées et cultivées. Il existe donc toujours un saut d'échelle et de complexité entre les études sur des dispositifs expérimentaux simplifiés au laboratoire et les études de terrain à celles qui concernent des sols transportés au laboratoire pour les étudier. Peu d'études, à notre connaissance, utilisent des consortiums naturels. Les quelques travaux utilisant ces consortiums utilisent des consortiums issus d'eaux de rivière ou souterraines dont la composition est modifiée en laboratoire (Davit *et al.*, 2011).

Ces approches en systèmes expérimentaux simplifiés GLoCs sont devenues complémentaires des systèmes de colonnes expérimentales. Les approches sur colonnes permettent d'obtenir des données quantitatives mesurables, avec des flux adéquats pour l'analyse de solutions par exemple. Ces données quantitatives caractérisent l'état du système en colonne dans sa globalité. De telles acquisitions ne sont pas permises à très petite échelle sur les GLoCs. L'approche en GLoCs permet, elle, d'aller observer des systèmes analogues aux colonnes à petite échelle, et d'apporter une information spatiale, à l'échelle des bactéries ou du biofilm, dans des conditions contrôlées, permettant également l'accélération des processus pour leur observation à plus court terme. . Les approches de micro-fluidique permettent également de comprendre et d'améliorer la modélisation des données, 2D ou 3D, dans des systèmes couplant micro-tomographie et micro-fluidique (Iltis *et al.*, 2011 ; Davit *et al.*, 2011). L'évolution de ces techniques s'est donc également avérée être une approche cohérente, notamment à l'aide de matériaux inertes ou biocompatibles pour l'observation du vivant dans la porosité des sols sous des contraintes physiques, permettant un contrôle des conditions expérimentales (Rubinstein *et al.*, 2015).

II.C. Interactions biophysiques

Les interactions biophysiques dans les milieux poreux ont été majoritairement étudiées et largement reprises dans la littérature (Or *et al.*, 2007 ; Martinho *et al.*, 2013 ; Tecon et Or, 2017) à l'échelle régionale ou locale mais par techniques intrusives avec des expériences en batch ou colonne. Plusieurs études ont couplé des approches de caractérisation hydrique et hydrodynamique de rétention en eau des sols, de vitesses d'écoulement, de caractérisation des films aqueux à l'échelle du pore (Figure I.14 et Figure I.15) avec des analyses microbiologiques et génomiques très utilisées en écologie mais sans toutefois prendre en compte le paramètre d'observation spatiale *in situ*. Des techniques d'étude de la biomasse en 2D sur lame mince ont permis d'apporter des informations de localisation des bactériens au sein de la structure du sol (Nunan *et al.*, 2003). L'apport de la micro-tomographie et des approches micro-fluidiques ont permis de franchir une étape supplémentaire dans le changement d'échelle vers des niveaux de résolution adéquats pour l'observation et la quantification de processus microbiologiques *in situ*. De nombreux travaux ont été réalisés concernant la localisation des films aqueux dans la porosité (Tippkötter *et al.*, 2009) .

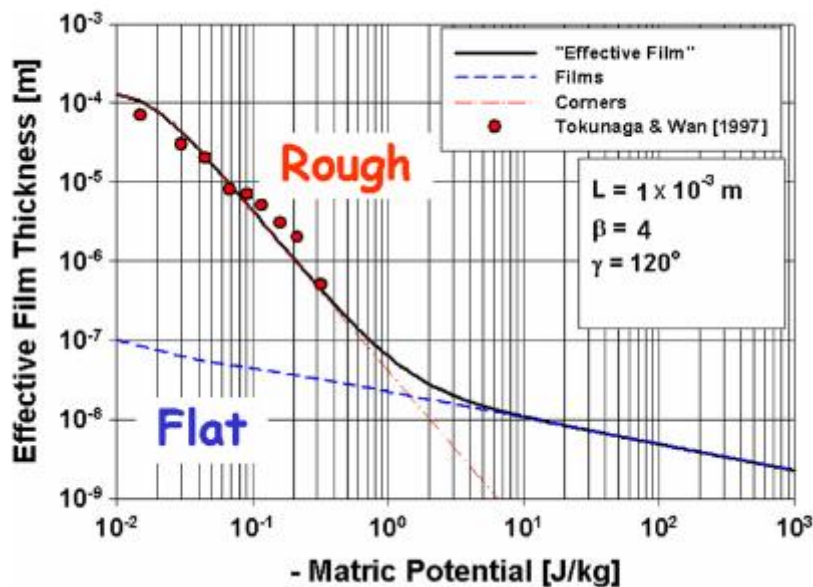


Figure I.14 : Comparaison des épaisseurs théoriques des films d'eau sur surfaces rugueuses et lisses en fonction du potentiel matriciel imposé, cité dans Or *et al.*, 2007.

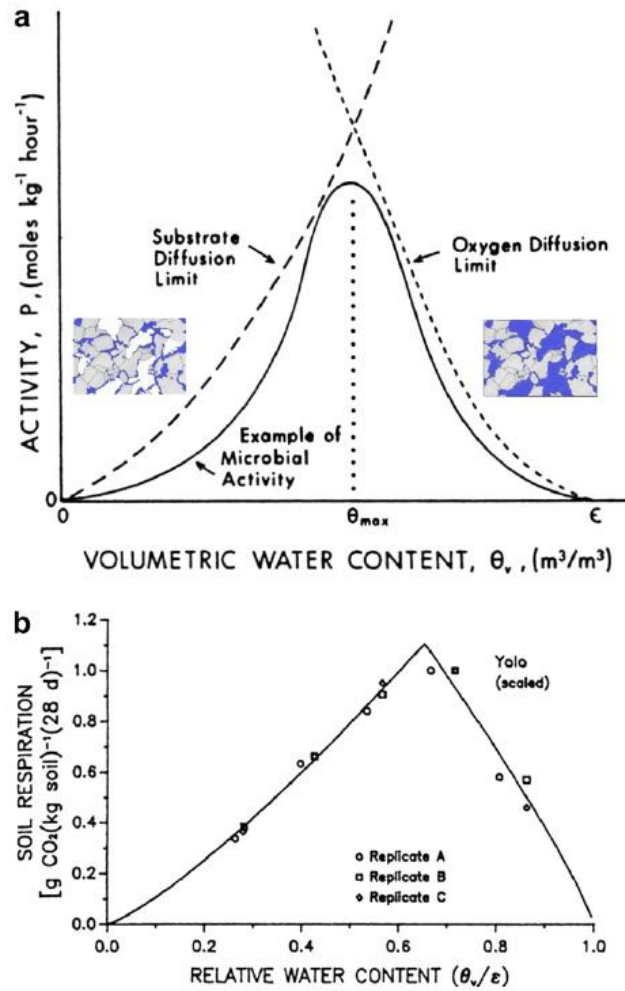


Figure I.15 : Illustration des relations entre l'activité microbienne macroscopique et les teneurs en eau des sols (a) et régression du modèle conceptuel en fonction de la respiration d'un sol (Yolo), cité dans Or et al., 2007.

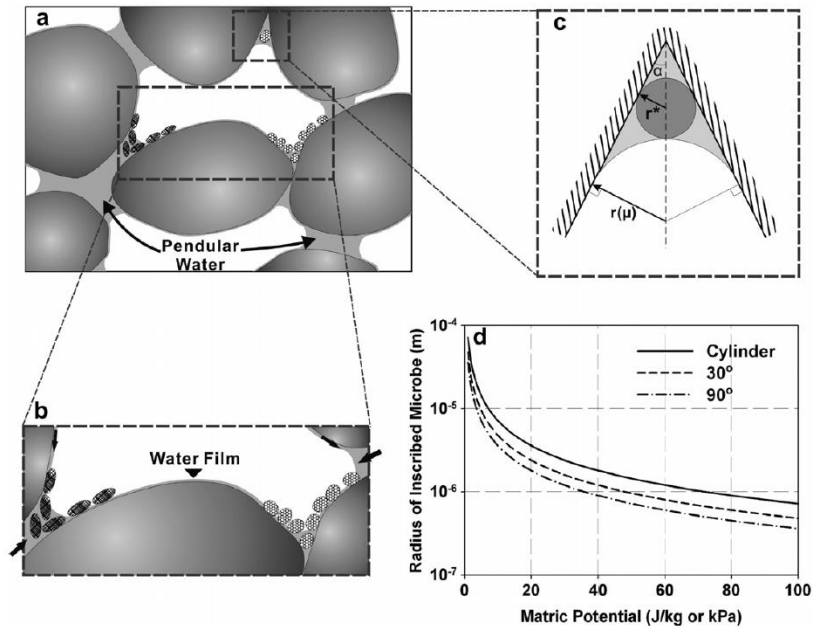


Figure I.17 : Illustration d’habitats microbiens dans l’espace poral concentrés dans les zones d’abondance d’eau (coins et espaces inter grains) (a) ; dans les zones potentiel de diffusion et disponibilité des nutriments (b) ; illustré par un schéma de localisation

Les premiers travaux réalisés afin de relier l’état physique des milieux et l’activité bactérienne se sont concentrés sur la réponse des communautés microbiennes aux changements climatiques et notamment les changements de teneur en eau, c’est-à-dire l’humidité des sols. Ces travaux ont connu un essor important, contrairement à ceux concernant la localisation des interactions biogéochimiques.

Des études ont été menées en conditions saturées et insaturées, afin de définir l’impact de la localisation des films d’eau au sein de l’espace poral du sol, variable selon l’état de saturation, sur la localisation des microorganismes, permettant ainsi de formuler des hypothèses quant au déterminisme de la localisation de micro-habitats favorables à l’activité microbienne, et d’étudier les rétroactions de l’activité microbienne sur son environnement physique. Plusieurs auteurs observent ainsi sur des sols différents, en batch, l’influence des potentiels imposés sur l’épaisseur des films d’eau (Figure I.14) et sur la diversité bactérienne (Figure I.15) (Laudone *et al.*, 2013 ; Pronk *et al.*, 2012 ; Chau *et al.*, 2011). Ces travaux sur l’importance de la structure du sol, de la composition granulométrique et du développement de l’agrégation, ont permis d’identifier des zones de type porosité inter- et intra-agrégats comme étant autant de zones préférentielles pour constituer des micro-habitats microbiens (Kravchenko *et al.*, 2013). La tomographie a permis de visualiser ces structures et de comparer les capacités de la 3D pour la visualisation de telles structures comparé aux techniques 2D (Peth *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*,

2012). Ces notions ont ouvert la voie à la modélisation du réseau poreux ainsi que, plus tard, à la création de matériaux simplifiés, analogues à ces milieux poreux bi- ou plurimodaux.

Les approches en micro-fluidique, grâce à des géométries variées, permettent de simplifier les géométries inspirées des réseaux poreux naturels en conservant des grandeurs cohérentes avec les systèmes naturels en termes de valeur de porosité, de perméabilité, de connectivité. Les applications pour répondre aux différentes hypothèses de localisation des films aqueux sont alors multiples, et ces approches permettent d'observer des « lab on chip » ou laboratoires sur puce par microscopie. Ainsi, Deng *et al.* (2015) montrent le comportement des EPS sécrétés par un biofilm dans des conditions d'hydratation variables afin d'observer leur impact sur les films aqueux à l'échelle du pore. Ils peuvent ainsi observer directement, en condition dynamique, le développement d'EPS et l'augmentation de la rétention en eau dans le système en cas de stress hydrique comme en conditions insaturées. Cette étude permet de conforter les hypothèses de rétention d'eau par la biomasse comme observé en écologie microbienne avec une adaptation des biofilms pour maintenir des conditions hydriques, de supports et d'ancrage favorables à leur métabolisme.

Les mesures de diversité bactériennes en lien avec la structure du sol ont tout d'abord été réalisées par des études microbiologiques ou écologiques visant à quantifier la respiration des organismes pour croiser ces données de suivi et de développement de la biomasse dans différents contextes d'hydratation (Figure I.15).

Des analyses de l'ADN microbien dans diverses fractions de sols (Six *et al.*, 2004 ; Baveye *et al.*, 2018), sur fractions de sol tamisées (Pronk *et al.*, 2012) et sur des agrégats ou encore sur lames minces (Gutiérrez Castorena *et al.*, 2016) ont permis une meilleure connaissance de la localisation de l'activité microbienne au sein de la structure du sol (Bailey *et al.*, 2012). Les observations 3D ont permis de visualiser les films aqueux et de définir des modèles conceptuels de localisation des micro-habitats selon la répartition en eau et nutriments (Vos *et al.*, 2013) (Figure I.17). Les techniques de tomographie 3D, notamment avec des systèmes à haute résolution comme les synchrotrons couplé ont permis d'améliorer les visualisations d'échantillons et de coupler des techniques d'analyse jusqu'ici utilisées en 2D pour la 3D. Ces techniques sont répertoriées dans les travaux de Majumdar *et al.*, 2012. Un des premiers paramètres à avoir été étudié de façon beaucoup plus importante avec les techniques de visualisation 3D est l'état de saturation en eau, considéré comme étant le paramètre le plus important quand à la variabilité des conditions géochimiques, apport en nutriments pour le vivant, et apport en oxygène. Les différentes études écologiques, microbiologiques et physiques

concluent toutes à l'importance de la localisation des films aqueux comme élément favorable à la création d'habitats, plus ou moins connectés, permettant la mise en place de communautés bactériennes adaptées aux conditions de microenvironnement. Les variations de teneur en eau des milieux participent à l'hétérogénéité de localisation des micro-habitats potentiels. L'épaisseur des films aqueux modifiés par cette diminution d'humidité des sols (par dessiccation ou imposition d'un potentiel) modifie également la mobilité des bactéries (Wang et Or, 2010 et 2013 ; Wang *et al.*, 2014). En 2011, Chowdhury *et al.* montrent qu'en contexte insaturé, les microorganismes voient leur activité modifiée dans une gamme de valeur du potentiel de l'eau (potentiel osmotique + potentiel matriciel). Le métabolisme microbien peut alors s'adapter sous un tel stress hydrique. Pour des augmentations plus importantes de stress hydrique l'adaptation n'est pas suffisante et l'activité par unité de biomasse est réduite. Wang *et al.* (2013) montrent également une diminution de la croissance de bactéries avec l'augmentation du potentiel imposé au sol influant sur la configuration de répartition de l'eau dans un réseau poreux et sur la localisation des bactéries sous différentes conditions hydriques statiques. Les variations hydriques induisent une évolution de la connectivité entre les pores occupés par l'eau (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**a et b) permettant des apports différents en nutriments et une compétition entre les espèces biologiques (Figure I.18 c et d). Plusieurs auteurs s'accordent à dire que les conditions insaturées augmentent la diversité microbienne des sols en déconnectant des habitats potentiels (Figure I.18), limitant ainsi les compétitions entre espèces (Dechesne *et al.*, 2005 et 2008 ; Vos *et al.*, 20123a). Tous ces travaux sont importants pour la compréhension de l'influence des paramètres physiques sur la dynamique de la biomasse microbienne, mais également celle des rétroactions de cette dynamique de la biomasse sur son environnement physique.

Les études menées en conditions dynamiques sont importantes pour comprendre les remaniements de structure et la localisation des bactéries au sein du réseau poreux. En effet, tout micro-habitat potentiel n'est pas exploité par la biomasse en raison des différentes conditions de circulation et d'apport de nutriments dans les différents micro-habitats au sein de la porosité. Des études montrent l'importance d'observations en batch et en conditions dynamiques (Michálková *et al.*, 2014). En 2013, Deng *et al.* étudient ainsi la réponse d'un biofilm à un changement de conditions de leur microenvironnement en suivant la diffusion de l'oxygène et les capacités de respiration des bactéries.

Les études sur colonne montrent une capacité des biofilms à remodeler leur environnement physique par modification des canaux préférentiels d'écoulements par la variation des conductivités hydrauliques mesurées (Volk *et al.*, 2016). L'ensemble des auteurs restent divisés sur la question de la localisation et de la colonisation des milieux poreux par les microorganismes. Volk *et al.* (2016) montrent sur un sol naturel étudié en batch une variation globale de la courbe de la conductivité hydraulique indiquant un effet global de la biomasse sur l'état physique du milieu. D'autres auteurs, étudiant des échantillons synthétiques, proposent des scénarii de colonisation par la porosité la plus fine, se traduisant par une modification de la conductivité hydraulique. D'autres, au contraire, proposent une colonisation de la porosité la plus large, qui influence les conductivités hydrauliques des zones humides (Volk *et al.*, 2016). Ceci pose également la question de la représentativité de l'échantillon entre le système naturel et les systèmes simplifiés, plus contraints, de laboratoire.

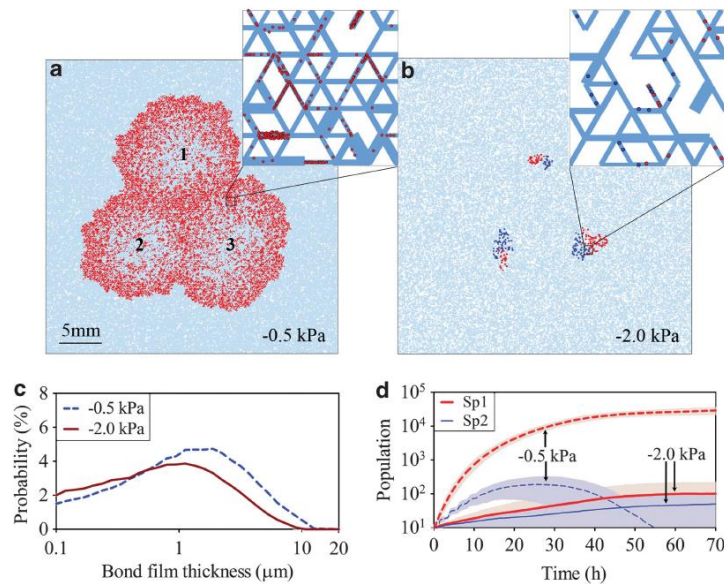


Figure I.18 : Croissance bactérienne et dynamique des populations sur une surface hétérogène sous différentes conditions d'hydratation statiques, d'après Wang *et al.*, 2013.

II. D. Interactions biogéochimiques

Du point de vue du transport de matière, les bactéries ont été longtemps considérées assimilables à des particules colloïdales (Causse 2009) (μm) et par conséquent capables d'être transférées avec les déplacements d'eau. Leur réactivité est aujourd'hui largement étudiée et participe aux processus responsables de leur distribution (Young *et al.*, 2008). Les microorganismes du sol sont répartis dans des micro-habitats au sein de la porosité du sol mais ils sont également des acteurs de la création de ce réseau, en interaction avec les différents constituants du sol, organiques et minéraux (Pronk *et al.*, 2012). Il existe donc de nombreuses interfaces possibles dans les sols. Les interactions possibles de tous ces constituants sont contrôlées par la matière organique des sols, lorsque celle-ci est présente en quantité suffisante, par adsorption, complexation ou substitution. Certaines études ont d'ailleurs montré que, dans certains cas, la matière organique et le rapport C/N contrôlent les diversités microbiennes à grande échelle (Kuramae *et al.*, 2012). Les interfaces biogéochimiques sont des zones de catalyse liées aux activités métaboliques, encore mal comprises. Les résolutions de processus sont encore mal connues bien que de nombreuses échelles fassent l'objet d'analyses poussées (Totsche *et al.*, 2010), bien que certains auteurs estiment que l'échelle de compréhension des processus se situe entre le micromètre (taille de bactéries) et l'échelle du biofilm (centaine de μm). Le paramètre de temps est également important pour comprendre le développement d'un biofilm, son activité et sa capacité de catalyse et d'adaptation.

Si la localisation de matière organique et l'étude des conditions biochimiques à grande échelle permettent de définir des micro-habitats favorables à un temps t , il est important d'étudier des systèmes en conditions non statiques pour comprendre les remaniements de structure et la localisation des bactéries au sein du réseau poreux. En effet, si tout micro-habitat potentiel n'est pas exploité par la biomasse, ceci dépend peut-être des différentes conditions de circulation et d'apport de nutriments dans les différents micro-habitats au sein de la porosité. Borer *et al.* (2018) mettent en évidence une compétition entre des espèces aérobies et anaérobies en condition de circulation au sein d'un réseau poreux. Plus la connectivité du milieu est réduite, plus la diffusion d'oxygène et nutriment est diminuée et plus les espèces anaérobies deviennent dominantes.

Le défi en termes d'approche et de compréhension de ces interfaces biogéochimiques réside dans la complexité des sols et de l'échelle d'investigation. Des approches couplées sur des expériences en batch ou sur colonnes ont permis de distinguer les effets microbiens et physico

chimiques en sélectionnant et simplifiant les systèmes. Le défi de compréhension des interfaces biogéochimiques nécessite de mieux comprendre les dynamiques de diversité, fonctionnement et structuration des microorganismes à la base des processus de régulation/transformation des cycles de nutriments et contaminants (Totsche *et al.*, 2010).

II.D.1. Microorganismes et conditions géochimiques

Les métabolismes microbiens sont contraints par les variations de potentiel redox, contrôlant les échanges entre espèces chimiques donneurs et accepteurs d'électrons (Figure I.19 (Gobat *et al.*, 2010)). Ces variations sont responsables de modifications des métabolismes au cours du temps, du simple changement d'activité au sein d'une communauté à la sélection de types de microorganismes adaptés à ces changements. Ceci dépend du temps de renouvellement des biofilms et de la durée de fluctuation des valeurs de potentiel redox dans le système (De Angelis *et al.*, 2010). Les microorganismes sont capables d'interagir avec les métaux comme le fer et le manganèse. Certaines bactéries sont capables d'oxyder ces éléments par différents fonctionnements métaboliques, comme les bactéries ferro-oxydantes en conditions aérobies (Figure I.19).

L'étude du potentiel redox reste complexe pour des études sur site en raison de la sensibilité des méthodes utilisées, fortement dépendantes de paramètres fluctuants comme la température et les teneurs en oxygène (Husson, 2013).

Les approches expérimentales en conditions contrôlées permettent de mettre en place de telles instrumentations. Ces mesures, couplées à des analyses de suivi du développement bactérien et des espèces en solution, peuvent apporter des éléments de réponse quant aux processus majeurs de régulation des microenvironnements des microorganismes ou biofilms. Deng *et al.* (2013) étudient ainsi par un suivi en micro modèle les évolutions des conditions aérobies dans un système en fonction de la diffusion d'O₂ et d'inhibiteurs. Il peut donc être intéressant d'étudier la hiérarchisation des processus pour comprendre si les bactéries sont capables de modifier leur environnement hydrogéochimique proche, à plus large échelle, et dans quelle mesure. Comme cela a été étudié dans les zones de porosité inter- et intra -agrégat (formation des agrégats par réaction avec les constituantes des sols, floculation, colloïdes, complexes organo-minéraux).

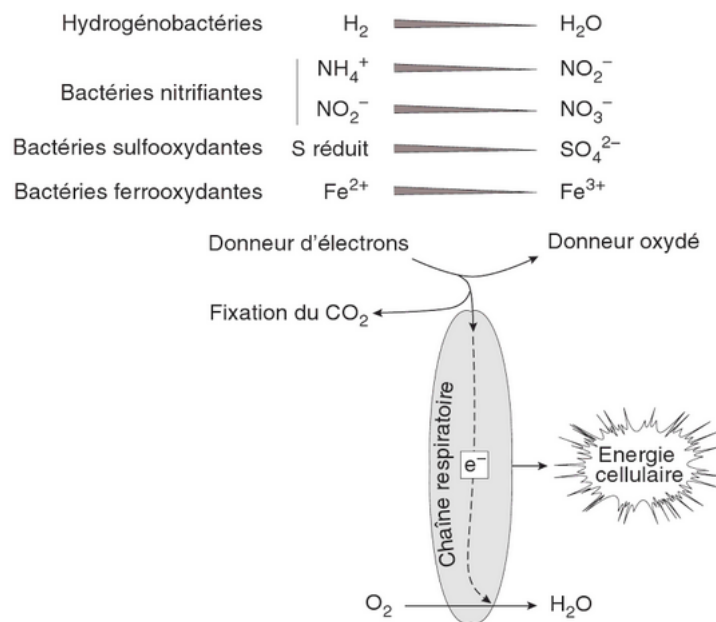


Figure I.19 : Mécanismes de respiration aérobie et anaérobie. Le sol vivant, Dunod.

II.D.2. Localisation microorganismes et matière organique

De nombreuses études ont montré l'impact des quantités et de la composition de la matière organique des sols (MOS) sur l'activité microbienne, sur des sols différents, en présence de litières et d'apports de matière variées. L'étude de la biomasse a d'ailleurs longtemps constitué un indicateur de la dynamique de transformation de la matière organique par sa capacité de réponse rapide à des modifications de composition ou selon les différents types de sols et leur teneur en eau. Ces travaux ont donné lieu à plusieurs hypothèses quant à la répartition des microorganismes dans le réseau poreux par rapport à la répartition des sources de matière organique. Certains auteurs voient les sources de matière organique comme paramètre prépondérant de l'installation des biofilms. Cependant, tout micro-habitat potentiel n'est pas exploité (Tecon et Or, 2017).

Si la localisation de matière organique et l'étude des conditions biochimiques à grande échelle permettent de définir des micro-habitats favorables à un instant t, il est important d'étudier des systèmes en conditions non statiques à plus petite échelle pour comprendre les remaniements de structure et la localisation des bactéries au sein du réseau poreux. En effet, si tout micro-

habitat potentiel n'est pas exploité par la biomasse, ceci peut dépendre des différentes conditions de circulation et d'apport de nutriments dans les différents micro-habitats au sein de la porosité. Borer *et al.* (2018) ont mis en évidence une compétition entre des espèces aérobies et anaérobies en condition de circulation au sein d'un réseau poreux. Plus la connectivité du milieu est réduite, plus la diffusion d'oxygène et de nutriments est diminuée et plus les espèces anaérobies deviennent dominantes. Ces observations sont cohérentes avec une échelle supérieure et les travaux de Zhou *et al.* (2002) sur les différents compartiments de sol de surface, sub-surface (zone non saturée) et sous-sol, avec une différence de structure de communautés microbiennes selon les teneurs en carbone des différents sols étudiés. Les auteurs observent une diversité diminuant le long du profil de sol, entre les zones de surface, sub-surface et sous-sol, dans des sols de faibles concentrations en carbone. Ceci indique une augmentation de la diversité microbienne dans les zones insaturées, comme retrouvé dans la littérature et développé plus haut. Cependant, dans les sols de fortes concentrations en carbone, les variations de la diversité observées sont moins marquées le long du profil de sol (Figure I.20).

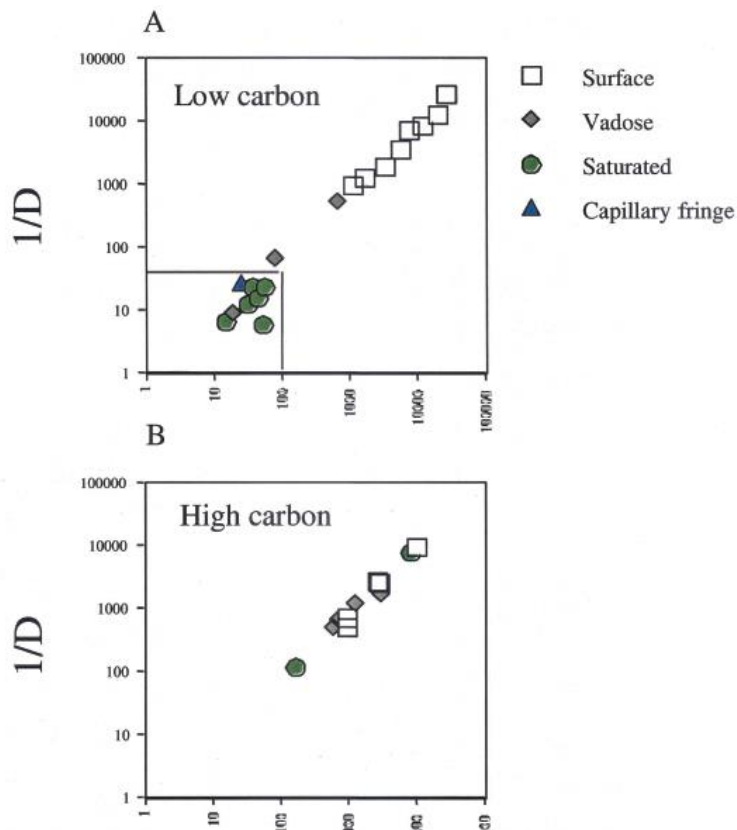


Figure I.20 : Diversité microbienne observée via l'indice de Simpson en fonction de la présence de microorganismes à différentes profondeurs de sol, en contexte de faibles teneurs en carbone (a) et fortes teneurs en carbones (b), d'après Zhou et al., 2002.

II.D.3. Interfaces biofilms-cycle géochimiques des éléments traces

De nombreuses études ont montré que la contamination en éléments traces et/ou en polluants organiques peut fortement influencer sur les écosystèmes et notamment sur les populations bactériennes et fongiques du sol (Chodak *et al.*, 2013 ; Golebiewski *et al.*, 2014 ; Epelde *et al.*, 2015). Cette contamination peut conduire à favoriser certaines populations (avec une résilience plus élevée) par rapport à d'autres et par conséquent influencer sur la biomasse du sol. Il est également reconnu que certaines bactéries utilisent les éléments traces dans leur cycle, et de ce fait, influencent leur spéciation dans le sol. Certaines populations ont évolué en développant des mécanismes de résistance aux éléments traces tels que le piégeage extra ou intracellulaire, ou encore l'exclusion (Nies, 2003 ; Hobman *et al.*, 2007).

Les teneurs et la spéciation en éléments traces dans les sols induisent des changements quantitatifs et qualitatifs des micro-organismes présents dans les sols. La biomasse microbienne totale peut être réduite par action directe des éléments traces sur le métabolisme enzymatique des organismes ou modification de leur environnement chimique (Schneider, 2016).

Cependant, les bactéries peuvent également interagir directement ou indirectement avec les métaux et métalloïdes ou modifier les conditions d'équilibre de leur microenvironnement et modifier ainsi les interactions des cycles géochimiques des éléments, d'autant en plus en contexte contaminés où comme nous l'avons vu avec l'oxydation directe de As(III) en As(V), l'oxydation de Cr(III) en Cr(VI) par l'oxydation du manganèse (cf I. B.4). Il est donc important de comprendre le poids de l'activité bactérienne dans les processus à l'origine de cette variabilité de leur microenvironnement (redox-pH), en condition analogues à un site naturel, pour comprendre la hiérarchisation des processus en place à l'échelle des biofilms.

II.D.4. Adaptation des biofilms à leur micro-habitat

Les biofilms bactériens jouent un rôle capital pour les fonctions des sols et leurs propriétés. Leur fonctionnement, et avant tout leur survie dans le sol, dépend d'adaptations métaboliques leur permettant de gérer la contrainte majeure de la zone non saturée : la teneur en eau fluctuante et les cycles d'humectation-dessiccation. De nombreuses études s'accordent à dire que le mode de développement et de répartition préférentielle des bactéries se traduit par l'adhésion des bactéries aux phases solides et entre elles, entraînant dans des conditions optimales la mise en place de colonies jusqu'à l'installation d'un biofilm. Ces développements sont possibles via

l'adaptation du métabolisme bactérien à l'origine de sécrétions d'exo-polysaccharides (EPS) par des bactéries (Wildenschild *et Sheppard*, 2013). Ces sécrétions sont plus nombreuses en réponse au stress hydrique, permettant ainsi un ancrage et un maintien de l'état d'hydratation (Or *et al.*, 2007).

Ces phénomènes sont d'autant plus présents en conditions insaturées ou les teneurs en eau très aléatoires ne permettent pas toujours aux organismes planctoniques de survivre et de se développer. Les variations de teneurs en eau entraînent des modifications des communautés, avec une adaptation de la motilité des organismes. Plusieurs études se sont concentrées sur les adaptations des cellules à la suite de variations du potentiels matriciel de l'eau au sein du sol afin d'observer leur comportement en contexte de stress hydrique, osmotique et mécanique (Potts, 2005 *in* Or *et al.*, 2007). Certaines bactéries migrent ainsi par adaptation de leur système de motilité associé à des flagelles (Kearns *et al.*, 2010). Des auteurs ont également observé des adaptations métaboliques avec des modifications permettant à des bactéries hydrophobes de devenir hydrophiles en contexte de phase stationnaire, ou encore de s'agréger, s'adaptant ainsi aux conditions hydriques du milieu (Gargiulio *et al.*, 2008). Le développement et la répartition des biofilms sont directement liés à l'hydratation du système et donc à la répartition des films aqueux, sources de nutriments pour les micro-organismes. Ces conditions sont également responsables de la diversification des communautés microbiennes et de leur adaptation au cours des cycles de dessiccation / humectation de certains micro-habitat non connectés qui en période d'humectation sont reconnectés et participent à la compétition ou adaptation des espèces présentes. Les paramètres physiques du sol (porosité, en particulier sa connectivité et perméabilité) dont dépendent directement les conditions hydrodynamiques (vitesses d'écoulement, diffusion de nutriments et de gaz) sont donc en lien très étroit avec le fonctionnement de ces biofilms bactériens et ont été beaucoup étudiés. La structuration du biofilm à l'échelle du pore conditionne les nombreuses fonctions du sol auxquelles ils contribuent (Krause *et al.*, 2014) (Figure I.21). L'activité des biofilms rayonne donc au travers de nombreuses fonctions biogéochimiques dans les sols. Il est essentiel de comparer ces fonctionnements étudiés avec des conditions de contamination afin d'observer les modifications de cette phase biologique des sols.

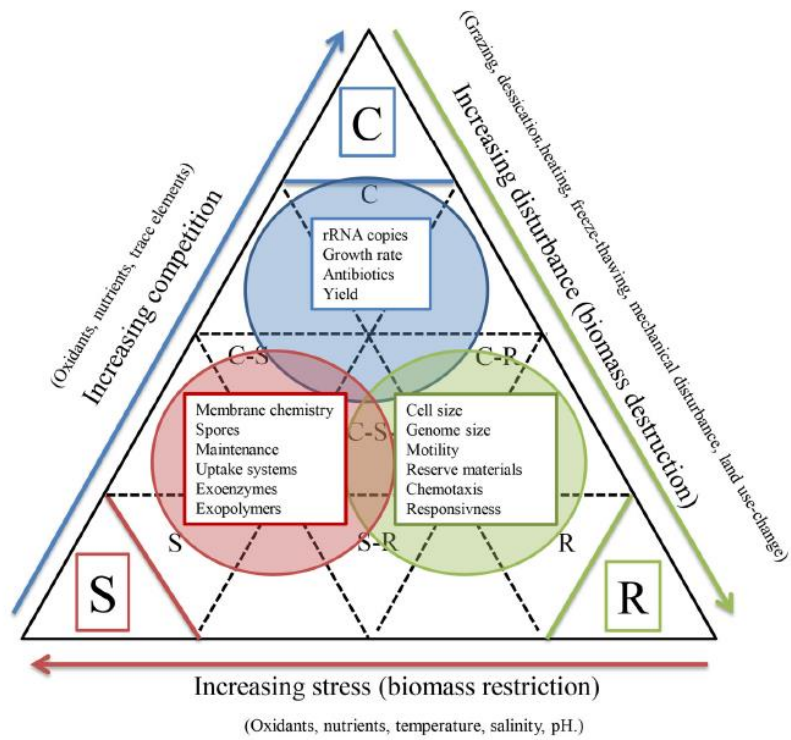


Figure I.21 : Stratégie d'adaptation des traits de caractères écologiques microbiens en réponse aux stress géochimiques et hydrologiques, d'après Krause et al., 2014.

Conclusion

Certains auteurs attribuent la répartition des biofilms aux propriétés physiques des sols par l'étude des relations entre le milieu poreux hétérogène et la répartition des films d'eau, avec notamment, l'étude de conductivité hydraulique, de la teneur en eau et des courbes de rétention en eau de ces milieux poreux hétérogènes en contexte biologique.

D'autres auteurs attribuent cette localisation à la dispersion des éléments nutritifs, comme le carbone, liée aux propriétés hydrauliques des sols comme processus de transport de la matière organique, et la répartition des films aqueux ainsi qu'à la nature des composés des sols et la composition de la matière organique.. Tecon et Or (2017) montrent qu'un micro-habitat potentiel n'est pas forcément exploité. Ceci met en évidence plusieurs notions fondamentales :

- L'échelle d'observation doit permettre de comprendre les processus clefs de mise en place des biofilms.
- Les relations entre le degré de saturation d'un milieu poreux hétérogène et son fonctionnement hydraulique.
- L'impact de la répartition des films aqueux en termes de répartition des sources de nutriments responsables de l'installation des biofilms en hotspot et en termes de stress mécanique.
- La pérennité des biofilms dans le sol via un remaniement des microenvironnements par les biofilms, entraînant une modification des gradients à l'interface biofilms- eau-gaz.
- La hiérarchisation des processus, à l'échelle des biofilms.
- La validité de ces hypothèses en condition de sols pauvres en matière organique.

Tout cela met en évidence la difficulté de comparaison entre les études et les difficultés de représentativité entre les sols réels et les sols simplifiés en laboratoire, et pose la question des contraintes expérimentales.

Le présent projet de thèse propose de mettre en place un système expérimental permettant de répondre à ces questions sur un milieu poreux en conditions de percolation de solution contaminée en métaux et métalloïdes. Il propose la mise en place d'un milieu reconstruit dont on pourra maîtriser (i) les paramètres physico-chimiques comme la température, le pH, la disponibilité de l'oxygène et (ii) les conditions hydriques, et dans lequel la phase solide

demeurera inerte (sable pur). Les paramètres microbiologiques et la composition de la phase aqueuse d'alimentation seront proches de conditions de sols réels.

Ce travail s'appuie sur deux bancs expérimentaux ; en colonnes et en lab on chip ou GLoCs. Ces deux échelles d'observation doivent permettre d'obtenir des données complémentaires aussi bien sur le milieu poreux que sur la biologie du système et la chimie de la solution de percolation, complété par une approche de visualisation par imagerie 2D et 3D. Cette approche d'un système en partie analogue à un système naturel permet d'observer le système dans sa globalité, *in situ*.

La suite de ce manuscrit s'articule donc entre les différentes approches de caractérisation et d'observation du système poreux, en condition de percolation avec des observations et caractérisations i) du milieu poreux bimodal, sa conception, son dimensionnement, ii) de la chimie de la solution en sortie de système, iii) de l'observation *in situ* par images 2D et 3D pour la localisation de la distribution des biofilms et des précipités néoformés en réponse aux conditions expérimentales et enfin iv) des premiers résultats d'observation sur lab on chip.

Chapitre II
Structure et fonctionnement hydrique des systèmes
poreux présents dans les colonnes du banc
expérimental

Chapitre II Structure et fonctionnement hydrique des systèmes poreux présents dans les colonnes du banc expérimental.	49
I. Introduction	51
II. Matériel et méthodes.....	51
II.A. Le dispositif expérimental	51
II.B. Le milieu poreux contenu par les colonnes	55
II.C. Porosimétrie au mercure	57
II.D. Micro-tomographie à rayons X	57
II.E. Analyses numériques des images.....	58
II.F. Propriétés de rétention en eau des massifs poreux.....	59
II.G. Caractérisation hydrodynamique des massifs poreux par traçage de bleu brillant ..	60
III. Résultats et discussion	62
III.A. Porosité des mélanges sableux dans les colonnes	62
III.B. Distribution des volumes poraux en fonction de leur accessibilité	63
III.C. Images 2D des systèmes poreux.....	66
III.C.1. Les massifs poreux à 10 % de sable fin.....	67
III.C.2. Les massifs poreux à 20 % de sable fin.....	67
III.C.3. Les massifs poreux à 40 % de sable fin.....	68
III.D. Propriétés de rétention en eau	68
III.E. Vitesse des écoulements dans colonnes saturées et insaturées.....	71
III.F. Propriétés de transfert et images 3D des massifs poreux dans les colonnes	75
IV. Conclusion.....	79

I. Introduction

L'observation de la répartition des films aqueux et des conditions hydriques dans les milieux poreux nécessitent une caractérisation des milieux poreux hétérogènes simplifiés utilisés au cours de l'expérience. Le banc expérimental a été conçu de façon à reproduire un analogue de sol permettant d'étudier les propriétés de transfert de métaux et métalloïdes en solution dans un milieu poreux bimodal simplifié, sous des conditions variables de saturation en eau et de conditions biotiques ou abiotiques.

Le choix du matériau, de sa structure est un des paramètres les plus importants, permettant de reproduire la physique d'un système naturel, tout en s'affranchissant de la réactivité du matériau, complexe en milieu naturel. Cette simplification du milieu permettra également d'adapter des techniques analytiques, notamment pour l'imagerie 3D.

II. Matériel et méthodes

II.A. Le dispositif expérimental

Un banc expérimental composé de plusieurs colonnes (\varnothing 0,8 cm \times H 5 cm) a été mis en place en respectant les conditions suivantes :

- L'apport de solution à la partie supérieure des colonnes est contrôlé ;
- Le degré de saturation du massif poreux peut être maintenu constant tout au long de l'expérimentation grâce, en particulier, au contrôle de la valeur de succion appliquée à la base de chaque colonne. Ceci permet de créer un système dynamique, avec un fonctionnement hydrodynamique propre selon l'état de saturation (allant d'un état saturé à un état insaturé) ;
- Le banc permet de réaliser en parallèle des expériences faisant varier le degré de saturation des massifs poreux et d'imposer une condition ou modalité biotiques ou abiotiques de ces mêmes massifs poreux ;
- La taille des colonnes doit permettre d'obtenir une image suffisamment résolue pour l'observation en micro tomographie à rayon X ;
- Les colonnes peuvent héberger des massifs poreux permettant le développement de populations bactériennes issues de consortia naturels, naturellement présents et adaptés aux conditions du site naturel sélectionné pour l'étude ;

- Le banc permet d'effectuer des prélèvements et des mesures à la base des colonnes afin d'échantillonner la solution ayant percolé dans le massif poreux.

Le montage qui remplit ces conditions se compose de quatre lignes en parallèle adaptées de (Gargiulo et al., 2008) (Figure II.1). Ces quatre colonnes représentent les quatre modalités de l'expérience (saturées abiotiques, saturées biotiques, insaturées abiotiques et insaturées biotiques) (cf. chapitre 3). Chaque colonne est alimentée par un réservoir, la solution étant à la pression atmosphérique via une prise d'air filtré à 0,20 μm . La solution circule via une pompe péristaltique à micro débit (Reglo digital, *Ismatec*) dans le circuit. L'apport de la solution en tête de colonne est contrôlé via un goutte à goutte dont on s'assure de la régularité. Pour maintenir la succion et l'état hydrique stable dans la colonne, une prise d'air permet de dissocier l'alimentation de la colonne du reste du circuit. Le débit d'entrée reste donc constant et le système de succion gère la valeur du potentiel de l'eau dans la colonne et par voie de conséquence, le degré de saturation qui en résulte dans la colonne.

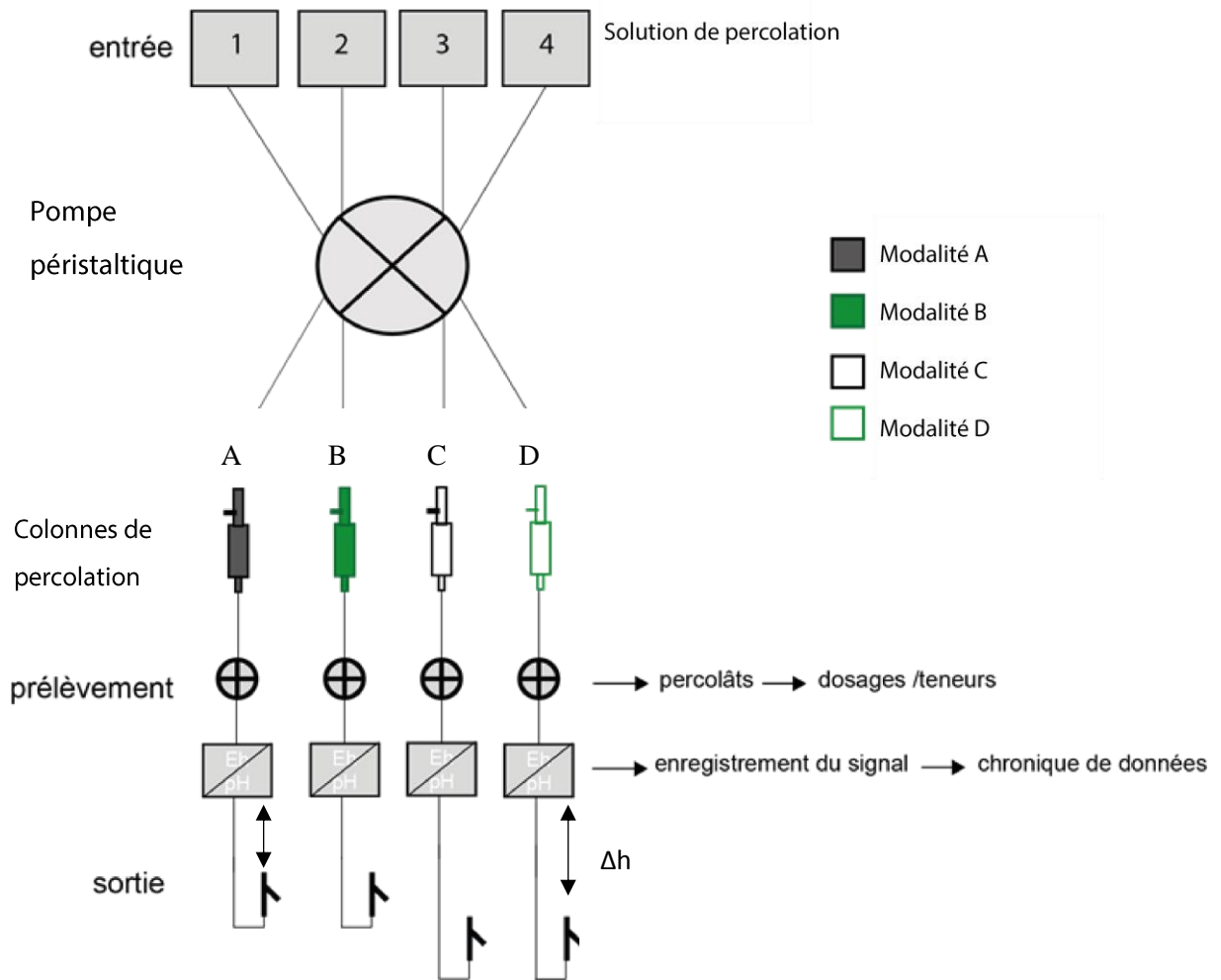


Figure II.1 : Organisation des lignes expérimentales avec en entrée les quatre solutions de percolation (1, 2,3 et 4) circulant au travers des colonnes (a, b, c et d), constituant ainsi les quatre modalités expérimentales ; saturées abiotiques (A), saturées biotiques (B), insaturées abiotiques (C) et insaturées biotiques (D).

Les colonnes sont fabriquées à partir de seringues en polypropylène (colonne de chromatographie, SPE de 0,8 cm de diamètre, sans filtre, Fisher Scientifique). Ce choix a été réalisé en raison des contraintes analytiques, le matériau devant présenter une faible absorbance aux rayons X pour l'acquisition d'image en micro-tomographie à rayons X (μ CT rayons X) ainsi que des dimensions permettant d'atteindre une taille de voxel suffisante (5,4 μ m) pour obtenir une résolution d'environ 10 μ m adaptée à la visualisation des biofilms (Ivankovic et al., 2016). Le massif poreux est maintenu dans la colonne par une membrane (Viel, 2016) localisée en bas de colonne afin d'éviter que la colonne ne se vide sous le seul poids des particules composant le milieu poreux.

Des vannes trois voies sont placées en sortie de colonne pour conserver au mieux les propriétés chimiques de la solution lors des prélèvements. Ces vannes permettent également d'effectuer la maintenance des sondes (cf. ci-dessous) sans déconnecter celles-ci et ainsi limiter la contamination extérieure de tout le dispositif.

Les électrodes de mesure et de référence (Unisense, micro électrode de platine Ag/AgCl) sont connectées à la suite des vannes trois voies. Les électrodes de mesure dans des cellules de circulation en « T » sont reliées aux électrodes de référence montées dans une cellule de polypropylène fabriquée au laboratoire (Figure II.2). Les sondes sont donc disposées à la suite les unes des autres sur chacune des lignes (a, b, c et d) dans l'ordre suivant : sonde redox - électrode de référence - sonde pH - électrode de référence. Les électrodes ont été calibrées selon le protocole du fournisseur Unisense dans des solutions tampons de pH = 4,01 et 7,00 pour les électrodes pH, et dans une solution de calibration saturée en hydroquinone 98% (Sigma Aldrich) pour les électrodes redox.

Les signaux sont transmis à un ordinateur (logiciel SensorTraceSuite, Unisense) via des amplificateurs de signaux. Les signaux sont enregistrés en continu tout au long de l'expérimentation à un pas de temps de 30 minutes. La sortie de chaque ligne (lignes 1, 2, 3 et 4) se fait via un exutoire en verre fabriqué sur mesure (verrerie Dumas). Cet exutoire fonctionne comme un vase à débordement. Ceci permet le maintien d'une surface d'eau en équilibre de pression avec l'atmosphère pour maintenir le niveau d'eau dans le système tout en permettant la circulation de la solution et son évacuation vers un réservoir final.

L'ensemble du système a été connecté grâce à des tuyaux PharMed®. Le niveau de saturation dans les colonnes a été maintenu en lui appliquant une succion, via l'ajustement de la distance

verticale entre la colonne et l'exutoire en cm (Δh) (Figure II.1) (Pot et al., 2015) permettant d'obtenir des conditions de saturation du milieu poreux ou d'insaturation.

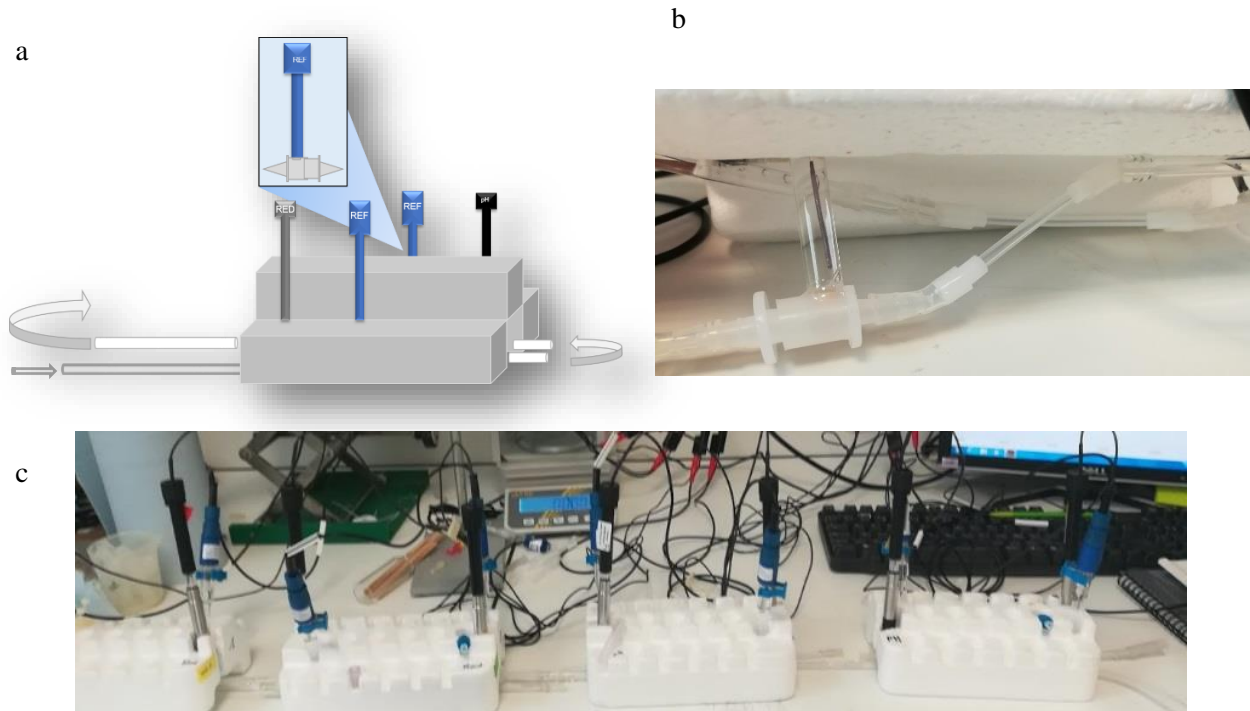


Figure II.2 : Montage des électrodes pH et redox sur la ligne expérimentale avec les cellules de polypropylène fabriquées au laboratoire avec (a) le schéma du montage des électrodes sur le support permettant la connexion des électrodes sur le circuit de circulation de la solution de percolation, (b) la fabrication des cellules et montage des électrodes sur les cellules et enfin (c) le montage final pour le raccordement sur chacune des voies expérimentales.

II.B. Le milieu poreux contenu par les colonnes

Le matériau utilisé pour fabriquer les massifs poreux, présent dans les colonnes, se compose de deux sables naturels purs en silice de référence HN 1/2.5 et HN 34 du fournisseur Dousselin (Tableau II.1 et Tableau II.2). Un sable grossier (diamètre médian $D_{50} = 1793 \mu\text{m}$) et un sable fin (diamètre médian $D_{50} = 211 \mu\text{m}$) ont été sélectionnés afin de fabriquer un massif poreux bimodal (Davit *et al.*, 2011, Pronk *et al.*, 2012), de façon à disposer de pores de taille suffisamment grande pour permettre des écoulements rapides et non saturés lorsque soumis à des valeurs de succion aisément atteignables, ainsi que de pores de tailles suffisamment petites pour demeurer saturés dans une large gamme de succion. Les massifs poreux créés doivent aussi permettre la circulation de bactéries et l'installation de biofilms, en particulier dans les

pores les plus grands. Cette configuration bimodale est retrouvée à l'état naturel pour des sols comportant une fraction grossière prépondérante associée à une fraction granulométrique fine, comme par exemple des sables ou limons grossiers associés respectivement à des sables et limons fins ; mais c'est aussi le cas en présence de biopores d'origine faunique ou racinaire dans des sols de composition granulométrique très variable (Zong *et al.*, 2015).

Tableau II.1 : Composition chimique type des deux sables grossier de diamètre 1,8 mm (Silice HN34) et fin 211 μm (Silice 1/2.5) utilisés en mélange.

Silice HN 34		Silice 1/2.5	
Éléments	%	Éléments	%
SiO ₂ supérieur à	97.87	SiO ₂ supérieur à	98.9
Fe ₂ O ₃ moyenne à	0.097	Fe ₂ O ₃ moyenne à	0.2
Al ₂ O ₃ moyenne à	0.752	Al ₂ O ₃ moyenne à	0.5
CaO moyenne à	0.066	CaO moyenne à	0.2
K ₂ O moyenne à	0.517	K ₂ O moyenne à	0.1

Tableau II.2 : Caractéristiques physiques type des deux sables grossier de diamètre 1,8 mm (Silice HN34) et fin 211 μm (Silice 1/2.5) utilisés en mélange.

Silice HN 34- Silice 1/2.5	
Densité réelle (Pycnomètre)	2.65
dureté (Mohs)	7
pH	7.5
densité apparente sable sec	1.5

Des mélanges de sables présentant des proportions variables de sables fins (211 μm) ont été réalisés. Ces mélanges seront nommés 0 %, 10 %, 20 %, 40 % et 100 % en fonction de la proportion de sable fin (un mélange à 10 % correspond à 10 % de sables fins en proportion massique de la masse totale de l'échantillon). La reproductibilité et répétabilité de ces mélanges a été testée sur cinq répliquas pour chacune des mesures de porosité totale (porosimétrie au mercure, porosité calculée à saturation en eau de l'échantillon, porosité calculée via les valeurs de densité apparente obtenues en cylindres). La reproductibilité du protocole a ainsi pu être établie, ce qui a permis d'alléger le protocole final de préparation des milieux (Tableau II.3).

Tableau II.3 : Caractéristiques des colonnes de sable avec A, la section des colonnes, h, la hauteur totale du volume utile des colonnes, h_{sable} , la hauteur de sable dans la colonne correspondant au volume de sable $V_{\text{éch}}$, et à la masse de sable m_s dans le volume totale V_{total} de la colonne.

colonne	
A (cm ²)	0,5024
h (cm)	6
h_{sable}	5
m_s (g)	5
V_{total} (cm ³)	3,0144
$V_{\text{éch}}$ (cm ³)	2,512

II.C. Porosimétrie au mercure

Les mélanges à 10 %, 20 % et 40 % de sables fins ainsi que les deux références à 0% de sable fin (uniquement des sables grossiers) et à 100% de sable fin ont été analysés en porosimétrie au mercure. Un équipement de type Autopore IV 9500 (Micromeritics) a été utilisé avec une pression d'intrusion du mercure allant jusqu'à 414 MPa (60 000 Psia), soit une gamme de diamètre de pore équivalent de 360 à 0,003 μm . Les valeurs utilisées pour l'angle de contact solide – mercure et la tension de surface du mercure sont respectivement de 130° et 485 dynes/cm (Sigal, 2009, Klaver *et al.*, 2012).

II.D. Micro-tomographie à rayons X

Des images 3D des massifs poreux présents au sein des colonnes ont été acquises en micro-tomographie à rayons X sur un tomographe de laboratoire (Micro-tomographe X PHOENIX, Nanotom) (Wildenschild et Sheppard, 2013). L'acquisition sur les colonnes de sable de 0,9 mm de diamètre a été réalisée à une tension de 120 kV et une intensité de 100 μA , avec un temps d'acquisition de 500 ms par projection, 1600 projections de 0 à 360° (2263 x 1152 pixels), une taille de voxel de 5,4 μm^3 (pixel 3D) et un temps d'acquisition de 3h15. Après acquisition des projections, les images ont été reconstruites pour obtenir des images de coupe 2D de l'échantillon en niveaux de gris. Les images 2D reconstruites ont été découpées (1800 x 1800 pixel) et ont permis d'obtenir une image 3D de 1800 x 1800 x 1152 pixels. Ces images seront segmentées dans le chapitre suivant pour distinguer les différentes phases (air, eau, biofilms, particules solides).

L'acquisition des images a été réalisée sur les mêmes mélanges que ceux ayant fait l'objet des mesures de porosité (10, 20 et 40 %) pour observer la répartition des deux fractions sableuses ainsi que la porosité résultant de leur assemblage (diamètres des grains de 1793 μm et 211 μm).

II.E. Analyses numériques des images

Pour chacune des acquisitions, l'ensemble des projections est reconstruit pour créer un set/pile d'images de coupes transversales et reconstruire un volume 3D. Le bruit des images a été diminué par un filtrage issu de la morphologie mathématique (ouverture-fermeture). Ces images ont ensuite été simplifiées par un processus de watershed (Letrong *et al.*, 2008) (Figure II.3). Pour chacun des échantillons présentés dans ce chapitre, un volume élémentaire représentatif a été extrait du volume total (VGstudio max). Les différentes fractions solides liquides et gazeuses ont été seuillées manuellement d'après l'histogramme de niveaux de gris.

Les calculs de porosité ont été réalisés sur des sous régions de l'échantillon ; les ROI (région d'intérêt). Ces ROI ont été définis en choisissant des volumes caractérisés par des valeurs de porosité similaires à celles calculées sur l'échantillon total. Le calcul de porosité correspond au rapport entre le nombre de voxel de la fraction gazeuse rapportée au volume total du ROI. Les valeurs de teneur en eau ont été calculées par le nombre de voxel de la fraction liquide rapporté au nombre de voxel de la fraction solide (rapporté en masse par multiplication de la densité des sables 2.65) sur le ROI.

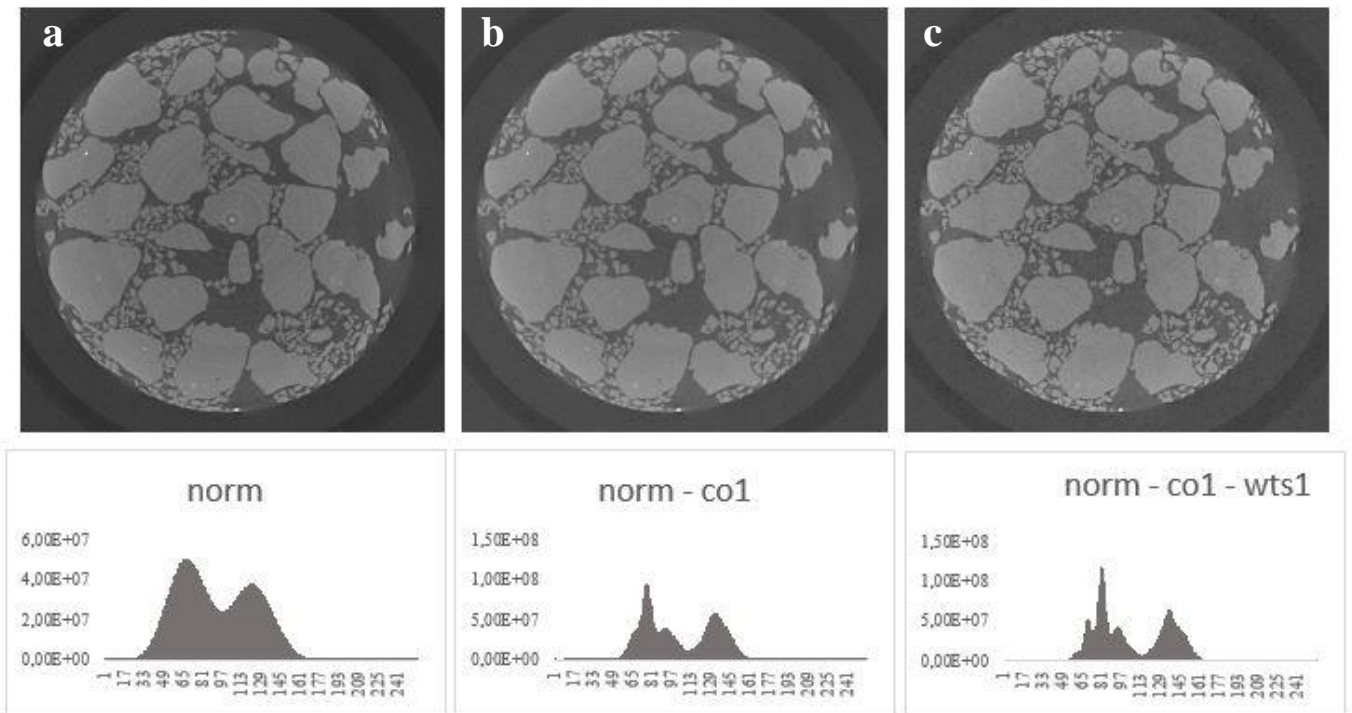


Figure II.3 : Dé bruitage, simplification des coupes 2D et histogrammes associés pour l'image de base (a), l'image avec diminution du bruit après ouverture-fermeture (b) et l'image final simplifiée par watershed (c).

II.F. Propriétés de rétention en eau des massifs poreux

Les courbes de rétention en eau ont été établies uniquement sur les échantillons des mélanges à 20% de sables fins. Ces échantillons ont été choisis pour la composition finale des colonnes lors des premières phases de description des milieux poreux. Ils représentent le meilleur compromis structural en termes d'analogie à un milieu sableux naturel et une ouverture du milieu poreux permettant la mise en place de microenvironnement adéquat pour leur observation. Les échantillons saturés en eau sur bac à sable ont été placés dans un dispositif de presses pneumatiques (Bruand, 1996) pendant quatre jours à sept valeurs de pression différentes. Les pesées en sortie de presse et à l'état sec après 24h en étuve à 105°C ont permis de calculer des teneurs en eau massiques (W en $g \cdot g^{-1}$) des massifs poreux aux différentes valeurs de pression pneumatique, et par conséquent de potentiel de l'eau ou de succion correspondants.

Les courbes de rétention permettent de déterminer les teneurs en eau des échantillons sous différentes pressions, et ainsi de définir la valeur de succion (Δh) à appliquer à l'exutoire des colonnes afin de fixer le degré de saturation des colonnes.

Deux états de saturation sont ainsi imposés sur les quatre colonnes. Les lignes 1 et 2 sont dans un état proche de la saturation totale et les lignes 3 et 4 insaturées (cf. partie IV, b).

II.G. Caractérisation hydrodynamique des massifs poreux par traçage de bleu brillant

La circulation dans le dispositif a été fixée à un débit de $0,08 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, afin de limiter les vitesses d'écoulement susceptibles de produire de trop fortes contraintes mécaniques sur les biofilms et leur développement, et ainsi de limiter les risques d'arrachement. Ces débits, bien que très supérieurs à des écoulements percolant et des lames d'eau naturelles correspondantes, ont permis de calibrer notre système en fonction des contraintes expérimentales afin d'obtenir des données quantifiables sur la durée de l'expérience (masse de sol disponible, volume de prélèvement nécessaire et durée de l'expérimentation).

La caractérisation hydrodynamique a été suivie par traçage dans la colonne à l'aide d'un colorant alimentaire : le bleu brillant (E133), très utilisé en pédologie en raison de sa stabilité dans une large gamme de pH, ainsi que sa faible réactivité vis-à-vis de la phase solide sableuse (Aeby *et al.*, 1997). Un collecteur de fraction en sortie de colonne a recueilli un échantillon de volume et de concentration de bleu brillant à des pas de temps de 16 min après l'injection d'un pulse de bleu brillant de concentration $0,017 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Les résultats sont obtenus par mesure de densité optique à 633 nm en spectroscopie UV.

Les vitesses apparentes, vitesses réelles et temps de séjours sont calculés selon l'équation de distribution des temps de séjour (DTS) (Dedewanou *et al.*, 2015) à débit constant :

$$\text{Si } Q = Cte$$

$$h(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t) dt}$$

avec :

Débit d'entrée : Q

Distribution des temps de séjour : h(t)

La concentration en traceur : C

$$\text{Temps moyen de séjour : } ts = \int_0^{\infty} t h(t) dt$$

$$\text{Vitesse moyenne de transit : } V = L \int_0^{\infty} \frac{1}{t} h(t) dt$$

$$\text{Vitesse apparente : } V_{app} = L/ts \quad \text{avec } L : \text{ hauteur de colonne}$$

$$\text{Vitesse réelle : } V_{réelle} = V_{app} * \phi \quad \text{avec } \phi : \text{ porosité de l'échantillon}$$

Les expériences ont été réalisées en double pour chaque état de saturation des massifs poreux afin de mettre en place les quatre conditions expérimentales saturées abiotiques, saturées biotiques insaturées abiotiques et insaturées biotiques.

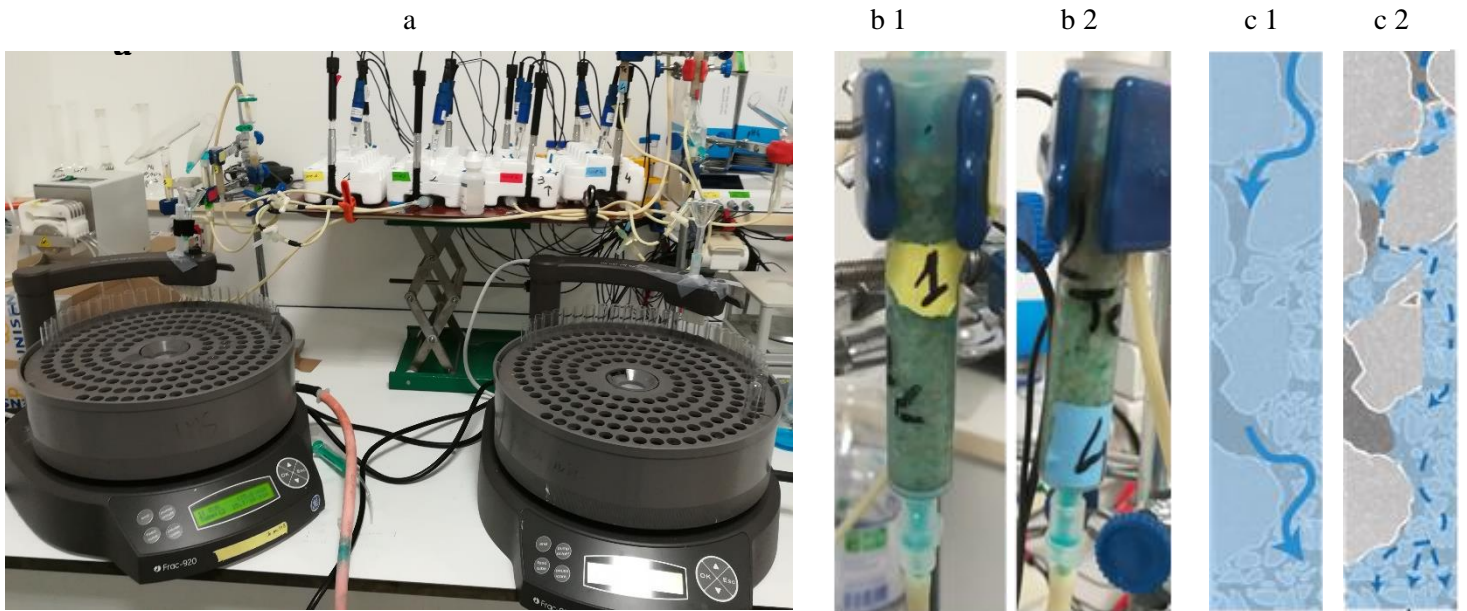


Figure II.4 : Montage expérimental pour l'obtention des courbes de percée au Bleu Brillant (BB) avec (a) mise en place des collecteurs de fraction, (b1) colonne proche de l'état de saturation sur la ligne 1, (b2) colonne insaturée sur la ligne 4, (c1) schématisation de l'écoulement dans l'échantillon saturé et (c2) schématisation de l'écoulement dans l'échantillon insaturé.

III. Résultats et discussion

III.A. Porosité des mélanges sableux dans les colonnes

Les valeurs de porosité totale enregistrées par porosimétrie au mercure et moyennées sur les trois réplicas de mesure pour les mélanges à 10%, 20%, 40% et 100% de sables fins (211 μm) sont respectivement de 30,6 %, 28,1 %, 31,7 % et 48,6 % (Tableau II.4). Plus la proportion de fraction fine augmente et plus la porosité totale de l'échantillon augmente, ce qui est conforme à ce que l'on sait des milieux granulaires et à leur variation de porosité (Wang *et al.*, 2017) excepté pour l'échantillon à 10%. En volume poral massique, c'est-à-dire en volume de pores par unité de masse, les volumes poraux massiques pour les mélanges à 10%, 20%, 40% et 100% de sables fins (211 μm) sont respectivement de 0,166 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 0,148 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 0,178 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ et 0,370 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (Tableau II.4). Les teneurs en eau à saturation déterminées sur les mélanges à 20%, 40% et 100% de sables fins sont respectivement de 0,148 $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 0,177 $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ et 0,339 $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (Tableau II.5) et par conséquent cohérentes avec les volumes poraux déterminés en porosimétrie au mercure (Tableau II.4).

Tableau II.4 : de porosité totales mesurée par porosimétrie au mercure en volume massique (V_{Hg}) ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) et porosité (Φ_{Hg}) (%).

Teneur en sable fin dans le mélange	V_{Hg} ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Φ_{Hg} (%)
20 %	0,148	28,1
40 %	0,178	31,7
100 %	0,370	48,6

Tableau II.5 : Teneurs en eau massiques à saturation W en $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ des échantillons 20 %, 40 % et 100% obtenues par pesées sèches et humides.

Teneur en sable fin	W_{sat} ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
20%	0,148
40%	0,177
100%	0,339

III.B. Distribution des volumes poreux en fonction de leur accessibilité : mesures par porosimétrie au mercure

Les courbes du volume poral cumulé en fonction du diamètre de pore équivalent varient en fonction de la proportion de particules fines présentes dans les colonnes (Figure II.5 et Figure II.6). Le fait que les échantillons soient constitués uniquement de particules de la taille des sables conduit à faire quelques commentaires préalables concernant ces données acquises en porosimétrie au mercure. En effet, la faible cohésion du mélange sableux à la pression d'entrée du mercure dans la porosité pourrait être source de modifications du mode d'arrangement des particules de sable durant la montée en pression et la pénétration progressive du mercure dans l'espace poral inter-particule. Le caractère progressif de la montée en pression permet d'accepter l'hypothèse que l'assemblage des particules n'est pas modifié lors de la pénétration du mercure. Par ailleurs, une évolution du mode d'assemblage des particules conduirait inmanquablement à un assemblage plus compact et se traduirait par une intrusion apparente de mercure brutale. Or, aucune courbe ne montre la présence d'une telle intrusion brutale, correspondant en fait à un effondrement brutal du massif poreux et la compensation de sa diminution de volume par une entrée de mercure équivalente dans la cellule contenant l'échantillon.

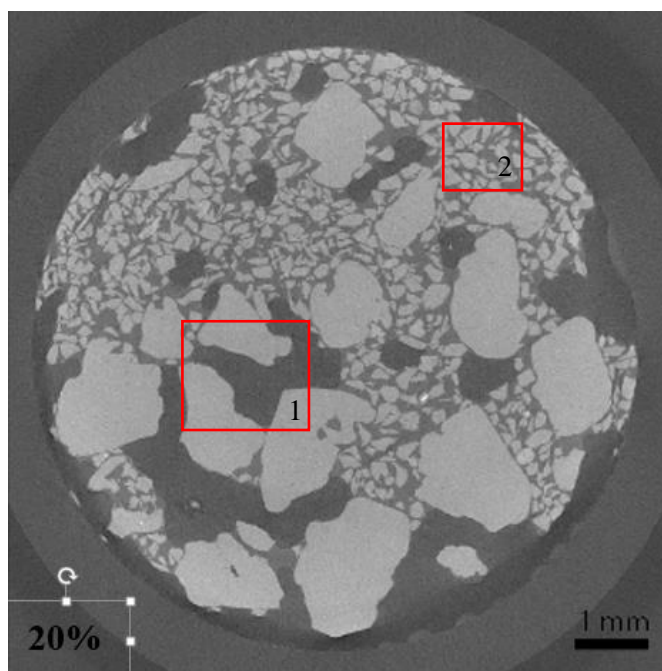


Figure II.5 : Coupe 2D d'échantillon à 20 % obtenue en micro tomographie aux rayons X montrant la présence de deux types de volume poreux : pores résultant de l'assemblage des sables grossiers (1) et pores résultant de l'assemblage des sables fins (2).

Par ailleurs, parmi les questions généralement abordées concernant la qualité des mesures effectuées en porosimétrie au mercure, il y a celle de la prise en compte potentiellement partielle des volumes poreux accessibles aux pores équivalents les plus grands d'une part, et des volumes poreux accessibles aux pores équivalents les plus petits d'autre part (Figure II.4) (effet bouteille d'encre) (Zong *et al.*, 2015). La réponse à de telles interrogations est fournie par la façon dont la courbe cumulée (Figure II.6) débute du côté des pores équivalents les plus grands et la façon dont elle se termine du côté des pores équivalents les plus petits. Or la courbe peut être considérée comme tangente à l'axe des abscisses pour les pores équivalents les plus grands, et tangente à une parallèle à l'axe des abscisses pour les pores équivalents les plus petits. On peut alors en déduire que l'ensemble des volumes poreux accessibles aux pores équivalents dans la gamme de diamètres étudiée a été correctement décrit en porosimétrie au mercure.

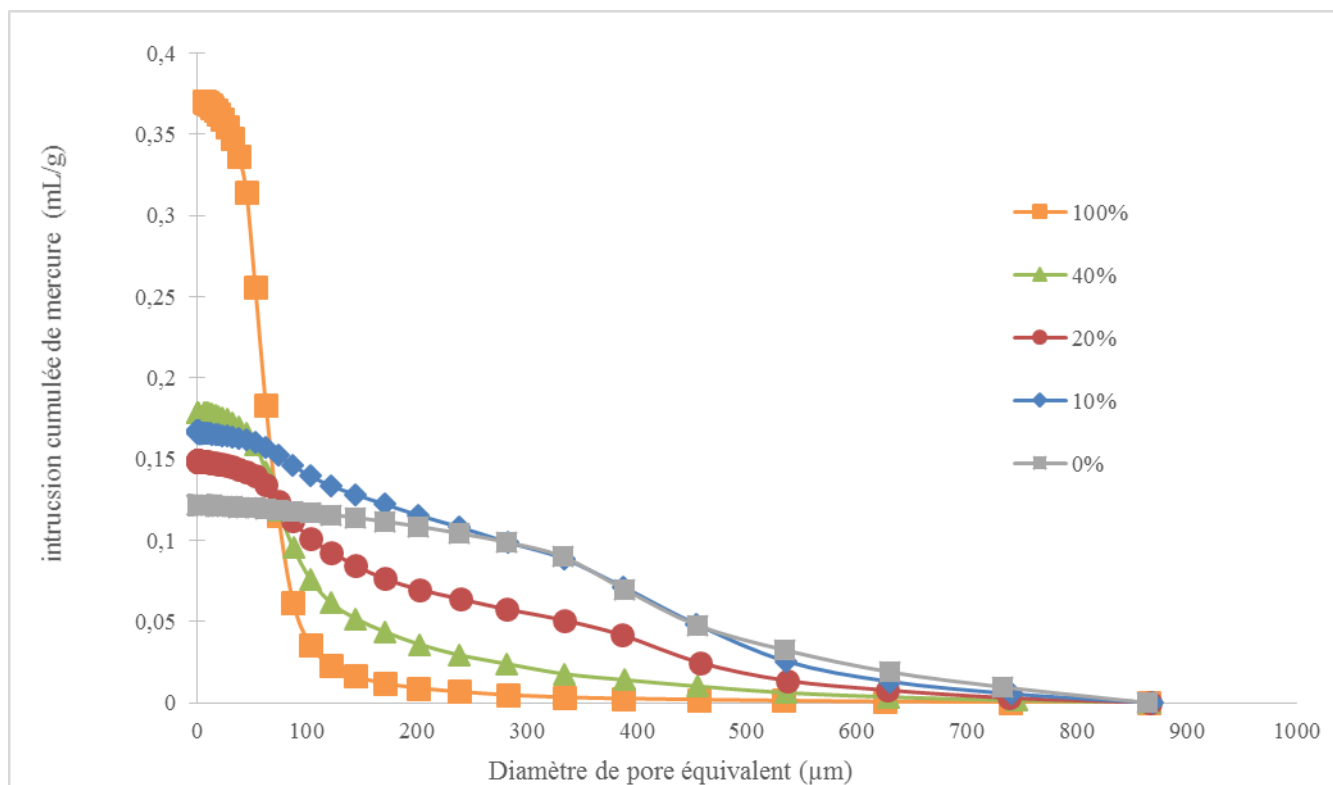


Figure II.6 : Courbes cumulées de volume poral accessible en fonction du diamètre de pore équivalent (nommés en % de mélange de fractions fines dans la fraction totale) obtenues par mesure en porosimétrie mercure.

Les courbes dérivées (distribution des volumes de pores en fonction du diamètre de pore équivalent) présentent un caractère bimodal très variable (Figure II.7). Les valeurs des diamètres de pore équivalent et des volumes accessibles associés sont présentées dans le Tableau 6.

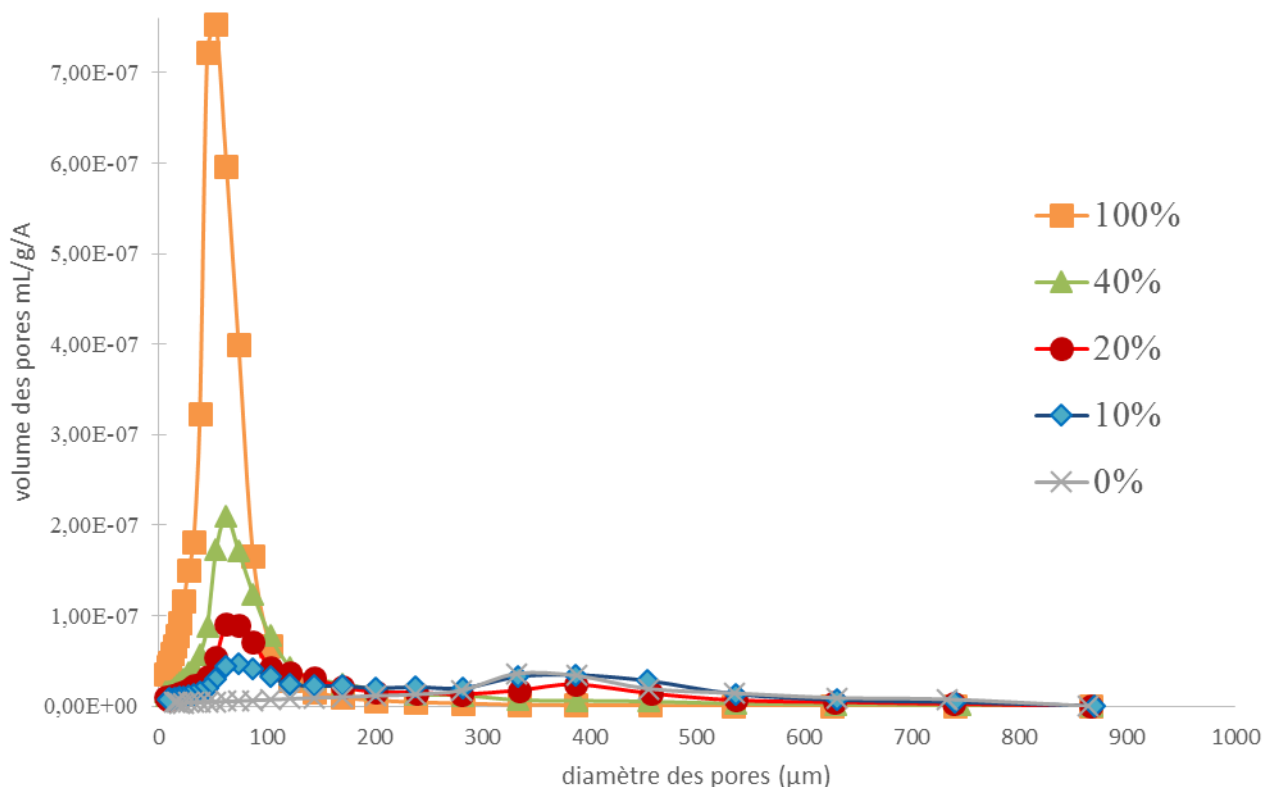


Figure II.7 : Courbes dérivées de distribution des volumes de pores en fonction du diamètre de pore équivalent par échantillon (nommé en % de mélange de fractions fines dans la fraction totale) obtenues par mesure en porosimétrie mercure.

Tableau II.6: Valeurs maximales des distributions de taille de diamètre de pore d'après les mesures de porosimétrie au mercure.

Echantillon	Distribution	Diamètre de pore (µm)		Volume de pore (ml/g/A)	
0%	uni modale	332,57		3,59E-08	
100%		52,93		7,53E-07	
10%	bimodale	73,94	333,42	4,68E-08	3,24E-08
20%		62,54	386,75	9,07E-08	2,39E-08
40%		62,57	333,50	2,09E-07	6,71E-09

Les échantillons à 0 % de sables fins, c'est-à-dire composés uniquement de la fraction grossière présentent une distribution de taille de pore équivalent centrée autour de 332 μm de diamètre. Les échantillons à 100 % de sables fins, c'est-à-dire composés uniquement de fraction fine présentent une distribution centrée autour de 52 μm de diamètre de pores équivalent. L'échantillon à 40 % de sables fins présente également une distribution de taille de diamètre de pore équivalent unimodale centrée sur des diamètres de pore équivalent de 63 μm . Les échantillons 20 % et 10 % présentent une distribution bimodale, avec une distribution centrée autour de deux tailles de pore équivalent de 63 μm et 387 μm pour les échantillons à 20 % et de 74 μm à 333 μm pour l'échantillons à 10 % de sables fins.

III.C. Images 2D des systèmes poreux

L'acquisition des images en micro-tomographie aux rayons X a concerné les deux systèmes présentant une porosité bimodale (10 % et 20 % et de sables fins) et le système à 40 % qui présente une distribution unimodale (Figure II.8).

Dans un premier temps, ce sont les images 2D qui ont été analysées. Celles-ci présentent deux grands types de pores : (i) des pores résultant de l'assemblage des particules de sables grossiers (1,8 mm) et (ii) des pores de beaucoup plus petite taille qui eux résultent de l'assemblage des particules de sables fins (211 μm). Il est intéressant à ce stade de noter que le niveau de gris des pores les plus grands est différents de ceux résultant de l'assemblage des particules de sables fins. Cette différence est liée à l'occupation par l'air des pores les plus grands et par l'eau des pores les plus petits. Les ménisques séparant ces deux phases sont aisément observables à l'œil.

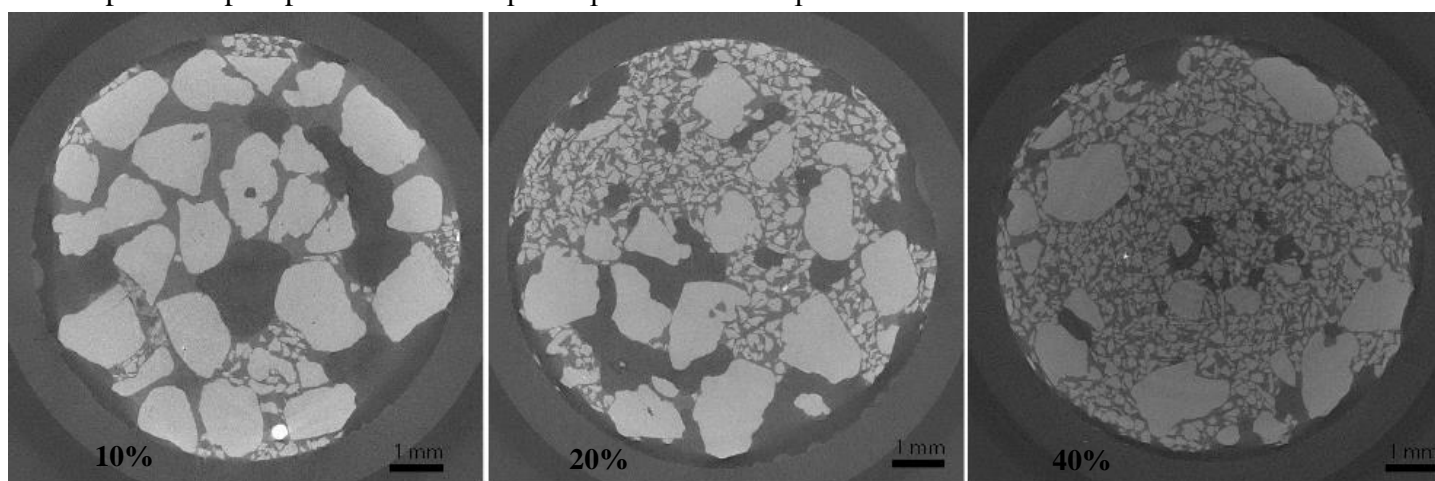


Figure II.8 : Image de coupe transversales de la répartition des fractions fines (211 μm) et grossières (1,8 mm) dans les colonnes pour les trois mélanges expérimentaux 10 % (a), 20 % (b) et 40 % (c) (en pourcentage de masse $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

III.C.1. Les massifs poreux à 10 % de sable fin

L'échantillon à 10 % de sables fins présente une porosité très ouverte. Elle est constituée essentiellement de larges pores dont la taille est millimétrique à pluri-millimétrique sur les images 2D, et qui résultent de l'assemblage des sables grossiers de 1,8 mm de diamètre moyen entre eux (Figure II.8). Si l'on rapproche ces observations des mesures effectuées en porosimétrie au mercure, les pores les plus grands correspondent aux volumes poraux accessibles à des pores équivalents de diamètre voisin de 387 μm (Tableau II.6). Compte tenu de la faible présence de particules de sables fins, les pores qui sont liés à leur assemblage sont peu nombreux (Figure II.8). Ils sont présents au sein des quelques amas de sables fins entre les sables grossiers. Les pores liés à l'assemblage des grains de sables fin de 211 μm de taille moyenne correspondent aux volumes poraux accessibles à des diamètres de pore équivalent de 74 μm observés en porosimétrie au mercure (Figure II.7). On relève une différence de taille d'un ordre de grandeur entre les tailles des pores observées sur les images 2D et les valeurs de diamètre de pore équivalent enregistrées en porosimétrie au mercure et donnant les diamètres de pore équivalent par lesquels ces volumes sont accessibles. Une telle différence est cohérente avec les résultats enregistrés par (Bruand et al., 1996).

III.C.2. Les massifs poreux à 20 % de sable fin

L'échantillon à 20 % de sables fins présente sur les images 2D un plus faible nombre de pores de tailles millimétriques à pluri-millimétriques (Figure II.8). Les pores résultant de l'assemblage des particules de sable fin sont en revanche plus nombreux puisque la proportion de sable fin est la double de la précédente. Si comme précédemment, on rapproche ces observations des mesures effectuées en porosimétrie au mercure, les pores les plus grands correspondent aux volumes poraux accessibles à des pores équivalents de diamètre voisin de 387 μm (Figure II.7). Les pores liés à l'assemblage des grains de sables fin de 211 μm de taille moyenne correspondent aux volumes poraux accessibles à des diamètres de pores équivalents de 74 μm observés en porosimétrie au mercure (Figure II.7).

Cet échantillon présente une géométrie permettant la mise en place de chemins préférentiels d'écoulement de solution de sol, mais également de transfert de gaz, bordés par une porosité fine créant ainsi des sous domaines de porosité distincts en termes de vitesse d'écoulement,

avec des gammes de taille de pores suffisamment larges pour contenir des microorganismes et permettre leur circulation au travers du milieu poreux.

III.C.3. Les massifs poreux à 40 % de sable fin

Les images 2D des massifs poreux à 40 % de sable fin présentent aussi les deux types de pores mais cette fois, les pores millimétriques à pluri-millimétriques sont très peu nombreux et de plus petite taille que pour les massifs poreux à 10 et 20 % (Figure II.8). Si une nouvelle fois, on rapproche ces observations des mesures effectuées en porosimétrie au mercure, les courbes du volume poral cumulé ne présentent qu'une seule entrée de mercure (distribution unimodale) avec des volumes poraux accessibles à des pores équivalents de diamètre de 63 μm . Le caractère unimodale de la distribution de volumes poraux enregistrée en porosimétrie au mercure (Figure II.7) indique que les quelques pores de taille millimétrique à submillimétrique observables sur les image 2D enregistrées en micro-tomographie aux rayons X ne sont en fait accessibles que par l'intermédiaire du réseau de pores résultant de l'assemblage des particules de sable fin.

Le milieu à 40 % ne présente pas de distribution bimodale. Le mélange à 10 % quant à lui présente une distribution bimodale faiblement marquée et l'observation des coupes 2D montre un milieu très ouvert, avec de très petites zones de porosité fine. Par conséquent, ces observations ont permis de retenir le mélange à 20% de sables fins pour la suite de ce travail.

III.D. Propriétés de rétention en eau

Les courbes de rétention en eau obtenues décrivent le comportement des échantillons sous différentes pressions imposées (Figure II.9). Ces données ont permis de déterminer la valeur de succion qui sera imposée à la base de chaque colonne (Δh), et ainsi d'approcher les domaines de saturation / insaturation d'intérêt pendant l'expérimentation en colonnes. La teneur en eau représente une variable clé entre les colonnes, responsable de la mise en place d'environnements physico-chimiques différents et de propriétés de transfert distinctes.

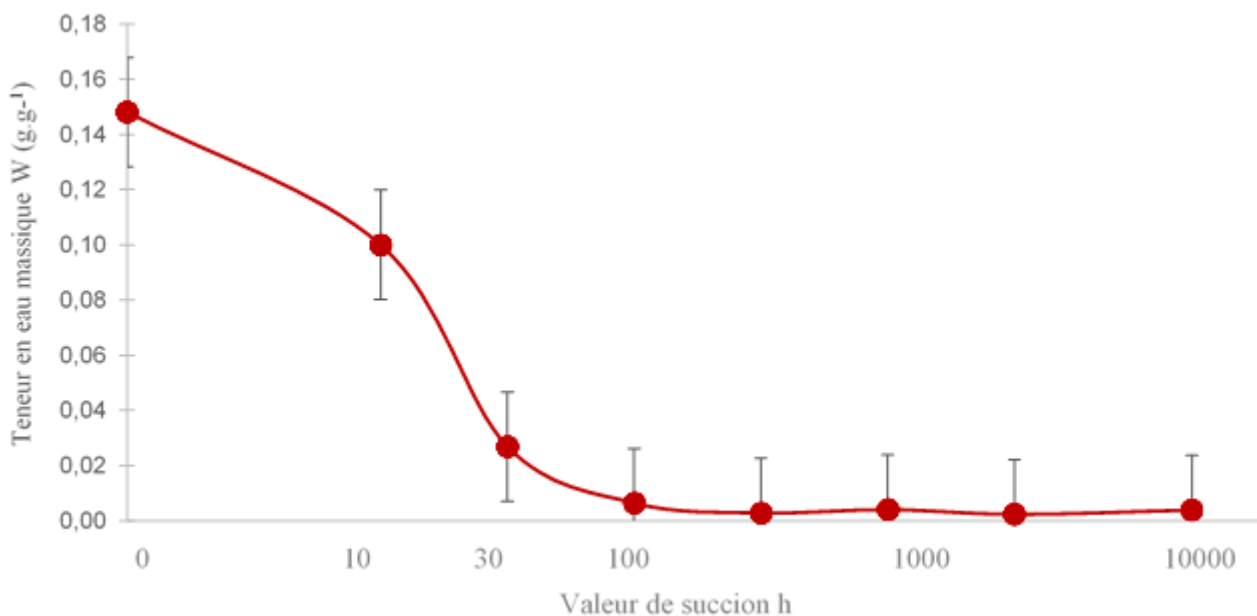


Figure II.9 : Courbes de rétention en eau des échantillons 20% obtenues en cellules

La courbe de rétention en eau enregistrée pour le massif poreux à 20 % de sable fin indique que l'essentiel de la sortie d'eau du massif poreux se produit entre 10 et 33 cm de succion (Figure II.9). Une telle distribution de la sortie d'eau en fonction de la succion est cohérente avec les courbes de rétention en eau théoriques des sols en fonction de leur composition granulométrique (Figure II.10) (Girard *et al.*, 2011). La teneur en eau à saturation est de 0,148 g.g⁻¹, valeur qui est cohérente avec le volume poral total déterminé en porosimétrie au mercure (0,148 g.g⁻¹).

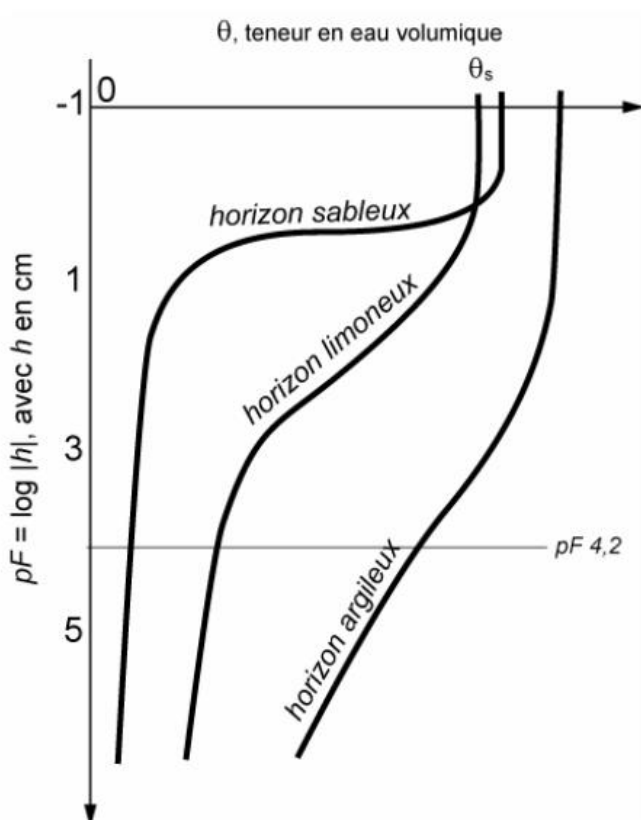


Figure II.10 : Tendance des courbes théoriques de rétention en eau sur les sols selon les trois grandes classes de texture des sols sableux, limoneux, argileux.

Si l'on utilise la loi de Jurin qui permet d'établir une correspondance entre les valeurs de succion et le diamètre des pores équivalents concernés par la dynamique de sortie de l'eau, une succion de 10 cm correspond à des pores de 300 μm de diamètre équivalent et une succion de 100 cm correspond à des pores de 30 μm de diamètre équivalent. Si l'on compare/replace cette courbe de rétention en eau et les diamètres de pore équivalents concernés avec la courbe cumulée de diamètre de pore équivalent mettant en avant les paliers représentant les deux tailles de diamètre de pore équivalent retrouvés dans notre système en porosimétrie au mercure (387 et 74 μm) (Figure II.11), alors ce sont les pores liés à l'assemblage des sables fins qui se vident de leur eau entre 10 et 100 cm de succion. Entre l'état saturé et 10 cm de succion, ce sont en revanche les pores millimétriques observés sur les images 2D (Figure II.8) et résultant pour l'essentiel de l'assemblage des sables grossiers qui se vident de leur eau.

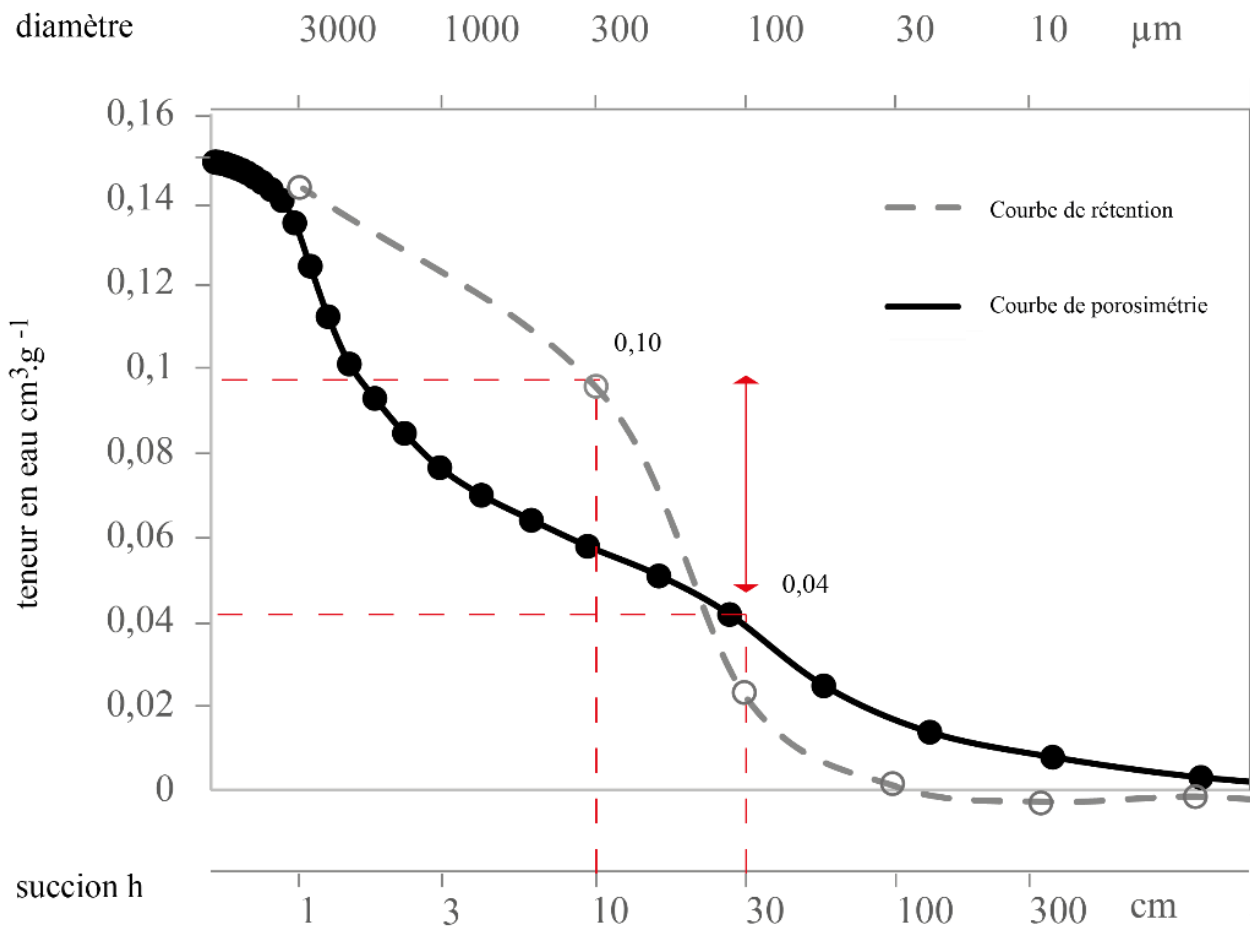


Figure II.11 : Comparaison des courbes de rétention en eau et de la courbe de rétention en eau retrouvée d'après la courbe cumulée de diamètre de volumes de pore équivalent obtenue par porosimétrie au mercure. Les deux courbes sont tracées par rapport aux diamètres obtenus par porosimétrie mercure et calculés à chacune des valeurs de succion d'après la loi de Jurin $r = 1500/h$ avec le rayon de pore équivalent (r) en μm et la succion appliquée (h) en cm.

Pour déterminer les conditions de succion qui seront appliquées à la base des colonnes pour créer des conditions insaturées, c'est la valeur de succion de 10 cm qui est choisie de telle façon à disposer d'un massif poreux dans lequel seuls les pores millimétriques observés sur les images 2D sont non saturés, les pores résultant de l'assemblage des sables fins sont en revanche saturés. Les mesures sur colonnes des teneurs en eau massiques montrent qu'en pratique sur notre système percolant dynamique une succion de 30 cm doit être appliquée sur le système pour obtenir une valeur de teneur en eau de $0,10 \text{ g.g}^{-1}$ correspondant à une succion de 10 cm.

Les gammes de potentiel matriciel imposées par une succion définie par un Δh de 0 à 30 cm équivalent à une succion réelle définie par un $\Delta h = 10 \text{ cm}$ (-1 kPa) ne sont pas un obstacle au développement bactérien. Plusieurs études montrent que ces valeurs de potentiel ne sont pas limitantes pour le développement bactérien. En 2013, Wang et Or montrent un ratio d'expansion proche de 1 pour des potentiels matriciels de -0.5 kPa .

III.E. Vitesse des écoulements dans colonnes saturées et insaturées

Le suivi du transfert du traceur bleu brillant au travers de la colonne a permis de définir une courbe de percée caractéristique de nos systèmes poreux. Le système choisi à 20 % de sable fin a donc été utilisé pour tester nos deux conditions hydriques expérimentales, avec deux mesures réalisées en parallèle ; un échantillon sur colonne saturée en eau, et un échantillon sur colonne insaturée (Figure II.12). Les courbes de percée des conditions saturée et insaturée présentent deux pics nets autour de la valeur de concentration initiale (et maximale) retrouvée en sortie de système. Ceci traduit la caractéristique de traceur parfait du bleu brillant et sa faible diffusion dans le système, ce qui est également visible sur la photo (Figure II.12) avec l'avancée du front de coloration nette sur les sables. Les courbes en condition saturée et insaturée reflètent un transfert différent du traceur pour un même débit d'entrée. Dans les deux cas les valeurs de concentration atteintes correspondent à la valeur de concentration du pulse de bleu brillant ($C = 0,016 \text{ g.L}^{-1}$). En condition saturée, le front de colorant ne présente pas de queue de diffusion indiquant un transfert direct et net le long de la colonne. En condition insaturée, on observe une queue de dispersion en sortie de système.

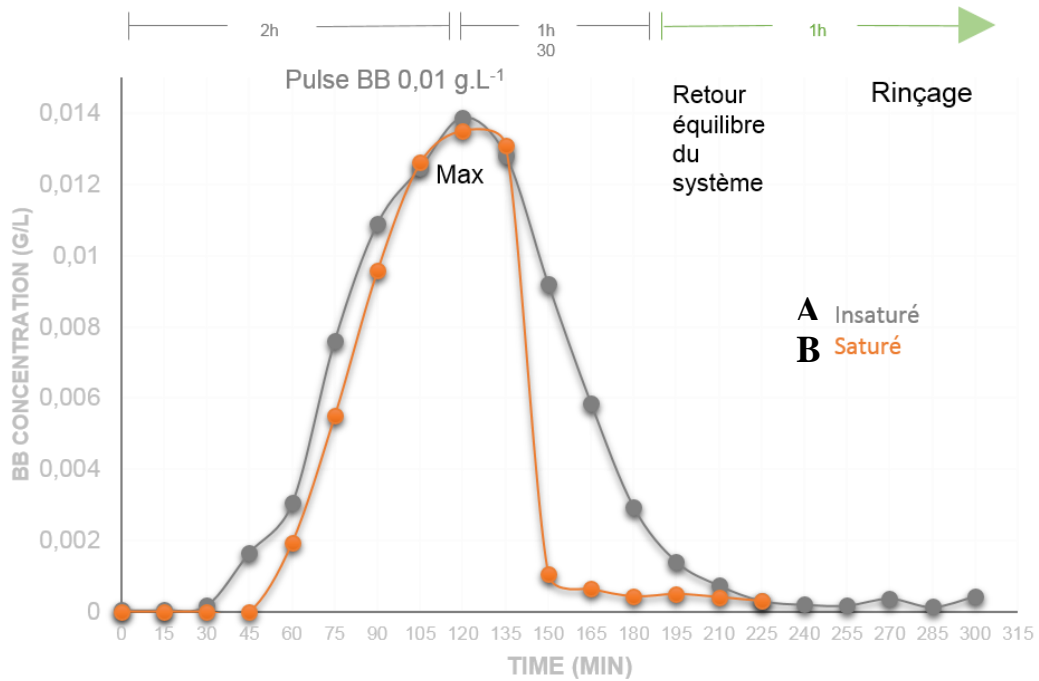


Figure II.12 : Courbe de percée obtenue sur les échantillons expérimentaux (mélange à 20% de masse) en conditions saturée et insaturée. Les courbes sont obtenues après circulation dans le système d'une solution de traçage de concentration $C = 0.016 \text{ g.l}^{-1}$ de bleu brillant (E133).

Ces observations sont à rapprocher de la structure des échantillons. En condition saturée, toute la porosité est en eau, tous les pores sont connectés et participent à l'écoulement de la solution de percolation. En condition insaturée, la gamme de large taille de pore est vidangée plus rapidement par la succion en sortie de système, tandis que la porosité la plus fine nécessitant une succion plus importante pour atteindre l'eau capillaire est vidangée avec des vitesses plus faibles, comme on peut le constater sur les photos (Figure II.13). En effet, en condition saturée (**b**) tous les pores sont connectés et en eau et le front du traceur se déplace le long de la colonne. En condition insaturée (**a**), la grande porosité est en air, le front se déplace au sein de la porosité fine.

Les chroniques de dosage permettent de recalculer les vitesses de transfert de solution ainsi qu'une valeur de temps de séjour par une méthode de distribution des temps de séjour (DTS) (Tableau II.7). Les différents tests indiquent que pour une diminution de débit $Q_{\text{entrée}}$, on observe une diminution des vitesses de circulation dans les deux systèmes saturés et insaturé. Les vitesses apparentes et réelles en insaturé sont inférieures aux vitesses en saturé. Les temps de séjour t_s augmentent avec la diminution du débit d'entrée, on passe ainsi de 1,45 à 1,98 heure en saturé et 1,99 à 2,30 heure en insaturé. Ces temps sont donc plus élevés à l'état insaturé qu'à

l'état saturé. Cette différence s'explique par une différence de porosité participant à l'écoulement (Figure II.14) et donc de conductivité hydraulique K plus importante en conditions saturées.

Tableau II.7 : Valeurs des vitesses apparentes V_{app} , vitesses réelles $V_{réelle}$ et temps de séjours (t_s) calculées par intégration des courbes de percée des expérimentations de traçage au BB (bleu brillant) selon l'équation de distribution des temps de séjours à débit constant (cf. chapitre 2, A, II, b).

$Q_{entrée}$	V_{app} (m.s ⁻¹)		$V_{réelle}$ (m.s ⁻¹)		t_s (h)	
	saturé	insaturé	saturé	insaturé	saturé	insaturé
90	9,3E-06	6.7E-06	1,9E-06	1,4E-06	1,49	2.049
80	1,4E-07	1,2E-07	2,8E-08	2,4E-08	1,98	2,30
80 30 cm	1,4E-07	2,2E-07	2,8E-08	4,4E-08	1,98	0,04

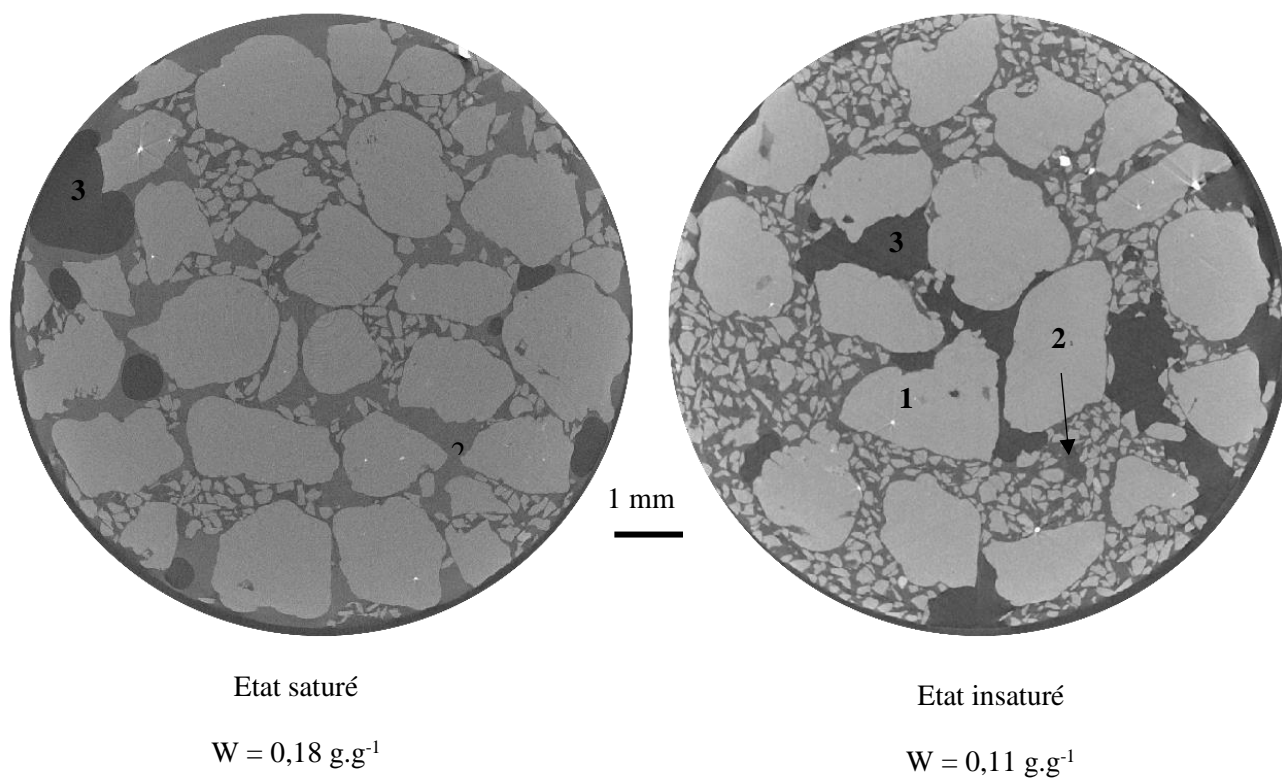


Figure II.13 : Coupes 2D des colonnes a) saturée ($\theta=0,30 \text{ cm}^3.\text{cm}^{-3}$) et b) insaturée ($0,18 \text{ cm}^3.\text{cm}^{-3}$) après acquisition au micro-tomographe. Avec 1) niveaux de gris clairs représentant les fractions siliceuses les plus absorbantes aux rayons X, 2) niveau de gris intermédiaire représentant la fraction liquide moins absorbante aux rayons X et enfin 3) les niveaux de gris les plus foncés (à noir) représentant la fraction gazeuse non absorbante aux rayons X.

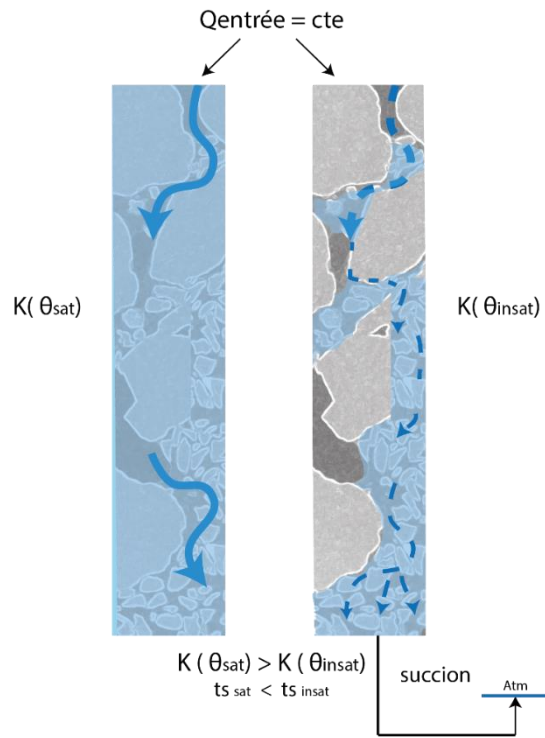


Figure II.14 : Schémas d'illustration du comportement hydraulique au sein des milieux poreux sur colonne saturée et insaturée.

III.F. Propriétés de transfert et images 3D des massifs poreux dans les colonnes

Les images 3D obtenues en micro-tomographie aux rayons X permettent d’imager les états hydriques imposés sur les colonnes d’après les données des propriétés de rétention en eau enregistrées, en particulier d’imager la répartition des phases liquides et gazeuse dans les deux sous domaines de porosité (fine et grossière). En condition saturée, la fraction liquide occupe toute la porosité alors qu’en conditions insaturées, la fraction liquide est observée seulement au sein des pores résultant de l’assemblage des sables fins, et donc de la plus petite porosité, la porosité millimétrique étant occupée par la phase gazeuse.

Les teneurs en eau des colonnes en condition saturées et insaturées ont été calculées en fin d’expérience. Les teneurs en eau enregistrées pour les colonnes à l’état saturé ($0,176 \text{ g.g}^{-1}$) sont plus élevées que la teneur en eau à saturation obtenue lors de l’étude des propriétés de rétention en eau ($0,148 \text{ g.g}^{-1}$) (Tableau II.8). De même pour les valeurs en insaturée avec $0,107 \text{ g.g}^{-1}$ calculé sur les colonnes et $0,027 \text{ g.g}^{-1}$ d’après l’expérience des courbes de rétentions (Tableau II.8

Tableau II.8 : Tableau bilan des valeurs de teneurs en eau moyennes obtenues pour l’échantillons 20 % et calculées via a) les courbes de rétention en eau, à saturation ($W_{\text{sat}} \text{ g.g}^{-1}$) et insaturée ($W_{\text{insat}} \text{ g.g}^{-1}$) à $pF = 1,5$ équivalent à $\Delta h = 30 \text{ cm}$, b) les mesures de porosimétrie mercure avec le volume poral total ($V_{\text{Hg sat}} \text{ (en cm}^3.\text{g}^{-1})$) et une valeur de porosité totale ($\Phi_{\text{HG sat}} \text{ (\%)} \text{ équivalente c) les pesées des colonnes saturées } (W_{\text{sat}}) \text{ et insaturées } (W_{\text{insat}}) \text{ en fin d'expérimentation hydrodynamiques et d) issus des calculs en volumes 3D en conditions saturée } (V_{\text{sat}} \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}) \text{ et insaturée } (V_{\text{insat}} \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}) \text{ sur un ROI. Les calculs ont été réalisés grâce au volume de voxel de l'eau / volume de voxel du solide rapporté en masse par la densité des sables (2.65) (Vgstudiomax).$

teneur en sable fin	rétention en eau		porosimétrie mercure		colonne		3D			
	$W_{\text{sat}} \text{ (g.g}^{-1})$	$W_{\text{insat}} \text{ (g.g}^{-1})$	$V_{\text{Hg sat}} \text{ (cm}^3.\text{g}^{-1})$	$\Phi_{\text{HG sat}} \text{ (\%)} \text{)}$	$W_{\text{sat}} \text{ (g.g}^{-1})$	$W_{\text{insat}} \text{ (g.g}^{-1})$	$V_{\text{sat}} \text{ (cm}^3.\text{g}^{-1})$	$V_{\text{insat}} \text{ (cm}^3.\text{g}^{-1})$	$\Phi_{3\text{D sat}} \text{ (\%)} \text{)}$	$\Phi_{3\text{D insat}} \text{ (\%)} \text{)}$
20%	0,148	0,027	0,150	28,120	0,176	0,107	0,163	0,045	30,2	28,6

Cette augmentation des valeurs sur les systèmes en colonne peut traduire une ouverture du système, du au remplissage du système avec une augmentation de la porosité la plus large, notamment en bordure de colonnes.

Des calculs de teneur en eau ont été réalisés d’après les acquisitions d’images en conditions saturées et insaturées des milieux en colonnes. Un ROI a été extrait sur le volume total au cœur de la colonne (Figure II.15 et Figure II.16). Le seuillage de l’histogramme de niveaux de gris

total du ROI a permis d'extraire les différentes phases solide, liquide et gazeuse sur ce ROI. Le volume en μm^3 est calculé dans le logiciel grâce au nombre de voxel par phase et la résolution de l'image ($5,4 \mu\text{m}^3$ par voxel). On obtient ainsi un volume en μm^3 (et converti en cm^3) (Tableau II.9). Le rapport entre les volumes de la phase liquide et de la phase solide (rapportée en masse par la valeur de densité 2,65) a permis de calculer la teneur en eau massique de chaque échantillon. On obtient des valeurs de $0,045 \text{ g.g}^{-1}$ en conditions insaturées et $0,163$ et $0,157 \text{ g.g}^{-1}$ en conditions saturées. Le rapport des volumes de la phase gazeuse sur le volume total du ROI ont permis de calculer une valeur de volume poral total de $0,28$ à $0,29$ sur différents échantillons saturés et insaturés.

Tableau II.9 : Volumes des différentes fractions solide, liquide et gazeuse de l'échantillon sur le ROI teneurs en eau, porosité totale et résiduelle (influence de la biomasse) calculés en conditions saturées et insaturées d'après le nombre de voxel des différentes fractions présentées en figures 18 et

phases	Volumes (cm^3)		
	insaturé abiotique	saturé abiotique	saturé biotique
gazeuse	0,647	1,091	0,488
liquide	0,275	1,091	0,379
solide	2,304	2,522	3,761
total	3,226	4,704	5,326
biologique	-	-	0,094
teneur en eau (g.g^{-1})	0,045	0,163	0,157
porosité totale	0,286	0,302	0,294
porosité post bio	-	-	0,130

On retrouve des valeurs très proches de celles calculées par pesées sur les colonnes, avec pour les conditions saturées $0,176 \text{ g.g}^{-1}$ (Figure II.15) et pour les conditions insaturées $0,11 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ (Figure II.16). Les valeurs en condition insaturées sous estiment la teneur en eau.

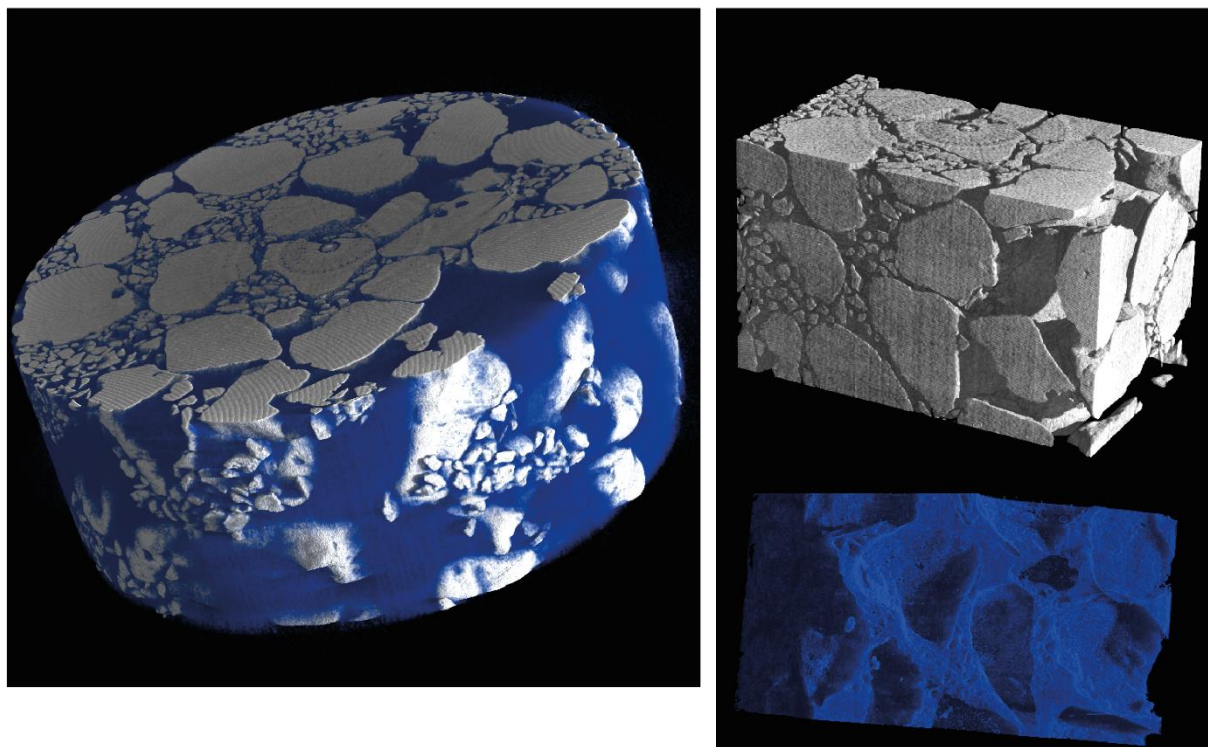


Figure II.15 : Représentation 3D d'une colonne contenant un milieu poreux bimodal de sable 20 % saturé en eau après circulation d'eau. Les images de coupe transversale ont été traitées par ouverture –fermeture et watershed. Le volume a été compilé dans VGStudiomax. Le volume (a) a été découpé selon un ROI pour les trois fractions ; solide (b), liquide (c). La porosité est totalement occupée par la fraction liquide. Les rapports des volumes ou nombre de pixel permettent de calculer la proportion des différentes fractions.

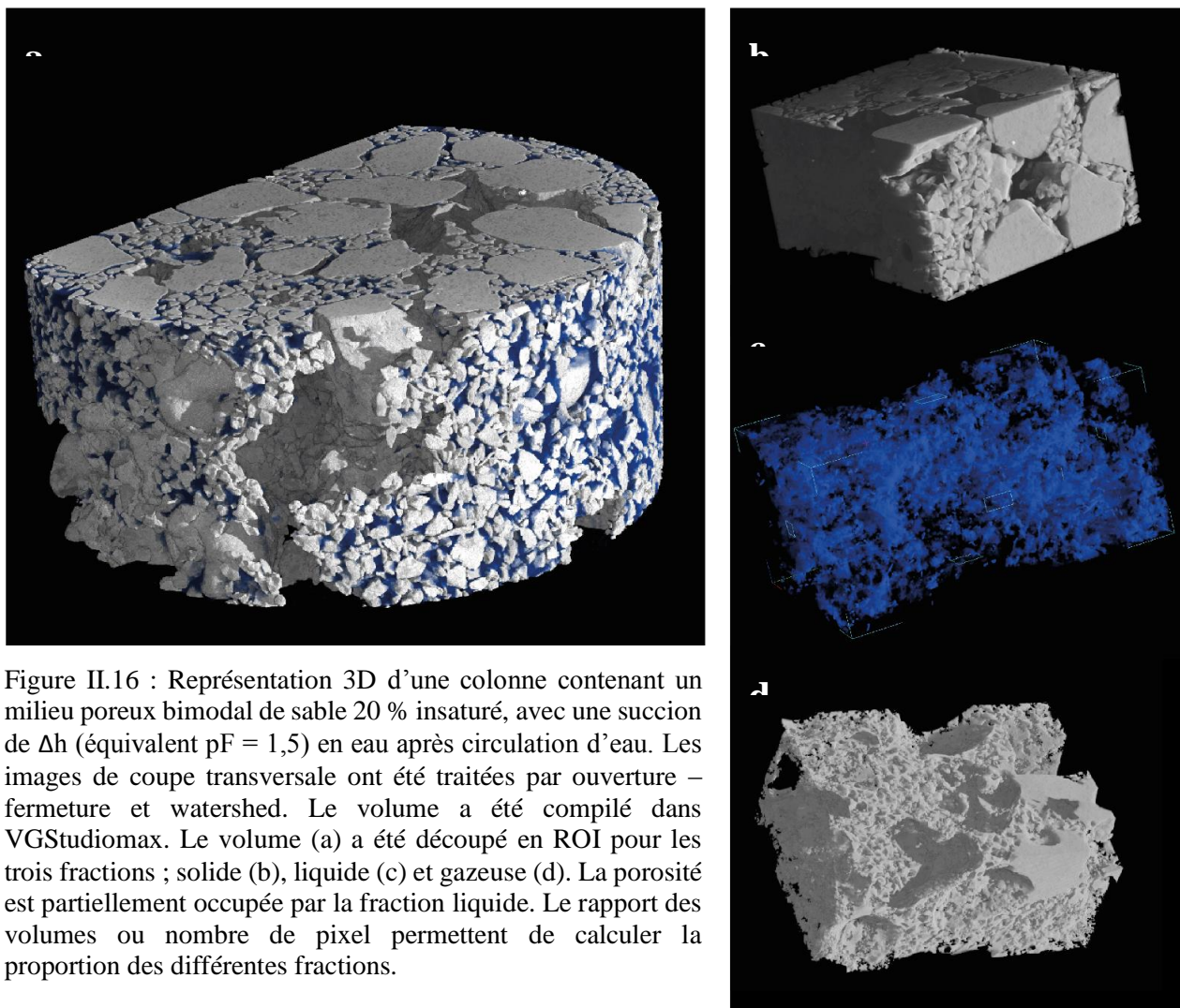


Figure II.16 : Représentation 3D d'une colonne contenant un milieu poreux bimodal de sable 20 % insaturé, avec une succion de Δh (équivalent $pF = 1,5$) en eau après circulation d'eau. Les images de coupe transversale ont été traitées par ouverture – fermeture et watershed. Le volume a été compilé dans VGStudiomax. Le volume (a) a été découpé en ROI pour les trois fractions ; solide (b), liquide (c) et gazeuse (d). La porosité est partiellement occupée par la fraction liquide. Le rapport des volumes ou nombre de pixel permettent de calculer la proportion des différentes fractions.

Ces différentes techniques ont été comparées et discutées dans la littérature pour différents types de sols (Zong *et al.*, 2015). Ces travaux montrent une cohérence des valeurs de porosité calculées selon les mesures de porosimétrie au mercure et les calculs 3D, sur une gamme de pores de recouvrement entre les deux techniques (3,74 – 100 μm). Hors de cette gamme, les variabilités de valeurs peuvent être discutées par rapport à i) l'erreur commise lors de la phase de segmentation de l'histogramme, ii) l'erreur due à la discrétisation de l'image 3D lorsque les tailles de pores sont proches de la taille des voxels, iii) la détection en technique d'analyse 3D des pores non connectés au reste du système et qui ne seront pas détectés en porosimétrie au mercure, ou par mesure à saturation.

Nos valeurs entre les calculs sur colonne par pesée et 3D sont cohérentes entre elles et supérieures aux mesures en porosimétrie au mercure. Dans ce cas, la 3D semble bien décrire l'ensemble du système. La différence avec les valeurs de porosimétrie mercure mettent donc en évidence une ouverture du système qui peut être dû au remplissage même des colonnes et aux effets de bords, augmentant les tailles de pore les plus larges.

La comparaison des deux méthodes permet donc de mieux définir l'ensemble de la gamme de taille de pores et d'apporter des éléments de description du système poreux, par rapport à la connectivité du système, la distribution spatiale et la morphologie des pores (Wildenschild and Sheppard, 2013). Si nos deux systèmes poreux sont identiques dans les deux conditions hydriques saturée et insaturée, le fonctionnement hydraulique est lui différent selon les chemins d'écoulement empruntés au sein de ce milieu poreux bimodal.

IV. Conclusion

Les deux conditions expérimentales hydriques mettent bien en fonctionnement deux systèmes différents saturés et insaturés, avec des conditions hydrauliques distinctes. La connaissance de la structure du milieu est indissociable de l'étude de la répartition des microorganismes. Les différentes études retrouvées dans la littérature montrent l'importance de cette structure et de la caractériser en contexte expérimental. Juyal *et al.*, 2018 montrent l'importance de l'étude des différentes structures et porosités créées par la densité apparente, et montrent la diminution de la biomasse mesurée avec l'augmentation de la densité apparente de l'échantillon. Ces résultats sont à relier avec la répartition des hotspot microbiens en fonction de la connectivité du système permettant d'augmenter la diversité microbienne dans les milieux ouverts insaturés. La comparaison de différentes structures induites par les mélanges à 10, 20, 40 % nous ont permis de définir un système supposé fixe en terme de connectivité, conductivité hydraulique, porosité et gamme de tailles de pores. L'échantillon à 20 % a, en particulier, permis d'obtenir une ouverture du système et de pouvoir y maintenir des teneurs en eaux insaturées permettant de créer des chemins d'écoulement préférentiels aux abords de zones d'eau capillaire ou liée, afin de répondre à l'hypothèse de localisation des biofilms. Il pourrait être intéressant de faire cette même expérience sur les échantillons à 10% et 40%, si l'on souhaite travailler sur la variabilité induite par différents réseaux poreux. Ici le choix a été fait de travailler sur un mélange identique pour les quatre modalités d'expérience, à 20 %, afin d'observer la variabilité interne au milieu poreux bimodal.

Une réplique de l'expérimentation sur colonne pourrait être menée sur un plus long terme pour une mesure des propriétés hydrauliques après développement bactérien, ce qui n'a pas pu être réalisé durant ce travail. Ceci pourrait conforter ou non les variations de calcul de teneurs en eau et les estimations de masse de biofilms via les analyses 3D. Ces analyses auraient nécessité une colonne supplémentaire afin de pouvoir faire circuler un traceur et réaliser des courbes de percées en fin d'expérience. Le traceur étant organique, il aurait pu interférer avec les analyses suivantes de la biomasse et du carbone sur les colonnes.

L'analyse d'objets 3D a permis de valider le protocole d'acquisitions. La reconstruction d'un volume d'après les images filtrées et segmentées permettra de modéliser en 3D les écoulements

aux seins de nos deux systèmes saturé dans un premier temps, puis insaturé. Des traitements d'image de conversions de format et de reconstructions ont été entrepris afin de proposer une modélisation sous OPEN FOAM. Cette modélisation permettra également d'extraire des données ponctuelles de probabilité de répartition des vitesses et de les comparer aux mêmes types de données quantitatives mesurées sur les micros modèles (cf. Chapitre V).

Chapitre III

Développement de biofilms et analyse de leur localisation sur les milieux poreux des colonnes du banc expérimental

Chapitre III	81
Développement de biofilms et analyse de leur localisation sur les milieux poreux des colonnes du banc expérimental.....	81
I. Introduction.....	83
II. Matériel et méthodes.....	83
II.A. La solution de percolation.....	83
II.B. Préparation de la suspension bactérienne permettant d’inoculer un consortium de micro-organismes dans les massifs poreux sur colonnes	85
II.C. Inoculation des milieux poreux.....	85
II.C. Conditions expérimentales de développement des biofilms sur colonnes.....	87
II.D. Observations par microscopie électronique à balayage (MEB).....	90
II.E. Analyse en micro tomographie à rayon X et traitement d’images.....	90
II.F. Introduction d’un agent contrastant pour les biofilms présents dans le massif poreux.	90
II.G. Mesure des teneurs en carbone sur la fraction solide des milieux poreux.....	92
III. Résultats et discussion.....	93
III.A. Identification des biofilms en micro tomographie à rayon X.....	93
III.B. Présentation des images obtenues en microscopie électronique à balayage (MEB).	104
.....	108
III.C. Données des analyses réalisées à l’aide du détecteur dispersif en énergie (EDS)	111
III.D. Bilan de carbone et activité bactérienne	115
IV. Conclusion	116

I. Introduction

Pour comparer la localisation des biofilms dans les milieux poreux hétérogènes à celle décrite dans la littérature et pour comprendre l'impact de la structure des systèmes et de leur saturation sur la répartition des biofilms, une colonne biotique est mise en place pour chacune des conditions hydriques saturées et insaturées. Les quatre modalités d'expérimentations, respectivement saturées abiotiques, saturées biotiques, insaturées abiotiques et insaturées biotiques ont été mise en place afin d'observer les développements de biofilms dans ces quatre conditions, au contact des métaux et métalloïdes présents dans la solution de percolation en entrée. Le développement des biofilms a été caractérisé par plusieurs méthodes descriptives sur des échantillons remaniés et *in situ*.

II. Matériel et méthodes

II.A. La solution de percolation

Pour étudier l'impact de l'activité des biofilms sur la mobilité et le devenir des métaux et métalloïdes, des échantillons de sol frais ont été prélevés sur un site présentant des concentrations en contaminants inorganiques (métaux et métalloïdes) élevées (Cr, Cu, Pb et As). Les bases de données BASOL et BASIAS ont permis d'identifier un ancien site industriel à technosol (traitement de surface métallique) géré actuellement par l'Agence De l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie (ADEME) (Figure III.1). La prospection sur site à l'aide d'un système portable de terrain de fluorescence à rayon X XL3t800 NITON © (pXRF) a permis d'identifier les points de prélèvement à fortes concentrations en polluants inorganiques (Cr, Cu, Pb et As).

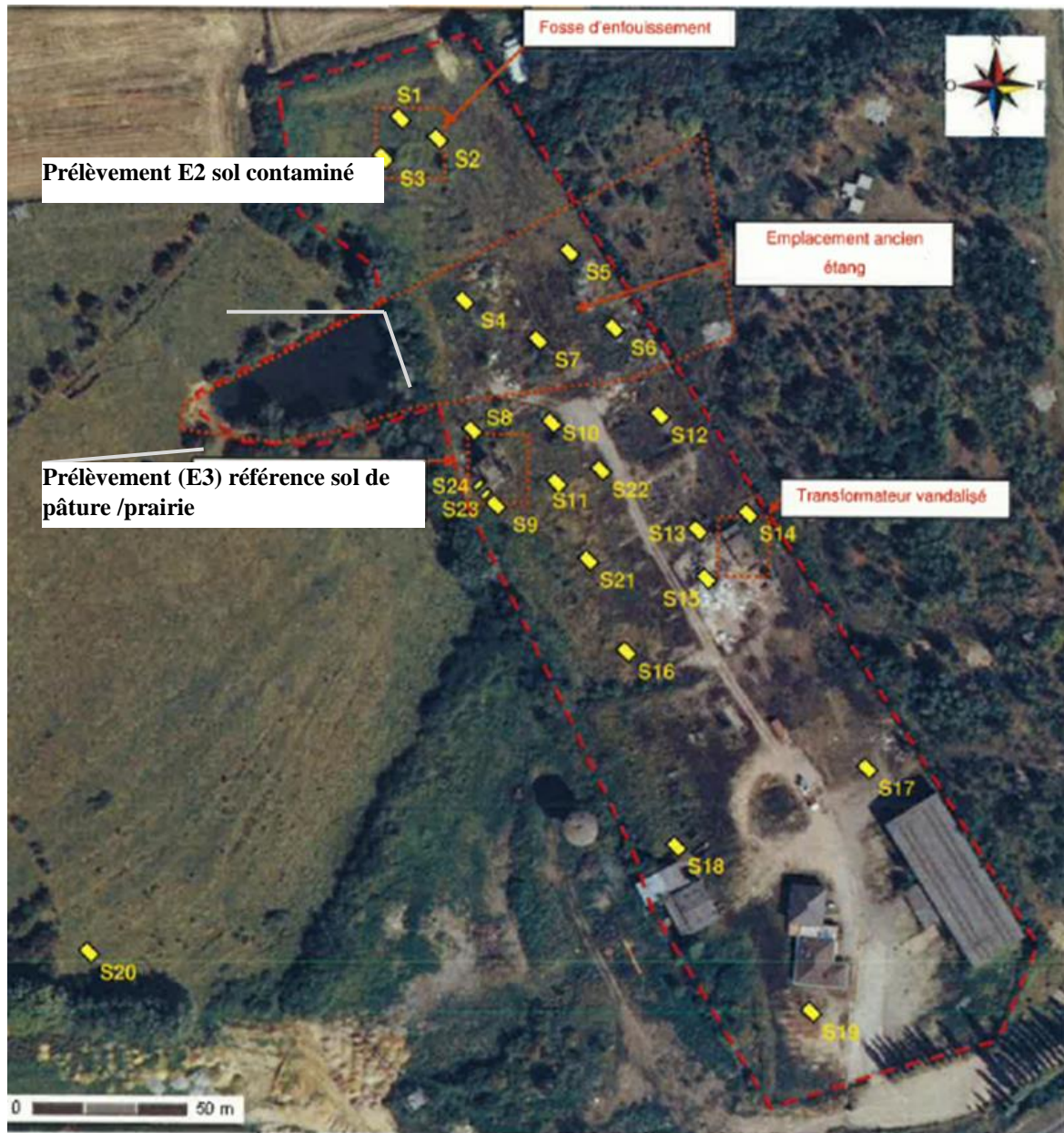


Figure III.1 : Vue aérienne du site de prélèvement d'échantillons. Site ADEME et zones de prélèvements d'échantillons.

II.B. Préparation de la suspension bactérienne permettant d'inoculer un consortium de micro-organismes dans les massifs poreux sur colonnes

Un inoculum a été préparé à partir d'une infusion (extraite en laboratoire) de sol frais issu d'un site pollué en métaux et metalloïdes. C'est aussi à partir de ce sol que la solution de percolation qui alimentera les colonnes du banc expérimental a été préparée (cf. chapitre IV). Ce protocole a permis d'extraire et de soutenir la croissance d'un consortium mixte de bactéries naturellement présentes sur le site et ainsi de permettre le développement de biofilms proches de ceux développés in situ dans le sol et adaptés aux conditions du site naturel (Davit et al., 2011). Ce protocole permet de travailler dans des conditions peu étudiées jusqu'à présent, car la plupart des travaux sur les biofilms sont effectués avec une seule souche bactérienne comme *E.coli*, *Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas veronii*, ou *Rhodococcus* (Gargiulo et al., 2008; Iltis et al., 2011; Volk et al., 2016; Wang and Or, 2010; Borer et al., 2018).

II.C. Inoculation des milieux poreux

Les échantillons ont été prélevés dans des bocaux en verre stériles de 2 litres préalablement autoclavés (120°C pendant 20 min). Les échantillons ont été quartés manuellement en laboratoire puis conservés en chambre froide.

Suite à cette campagne de terrain (février 2016), la solution de sol a été extraite en laboratoire par lixiviation de 10% (en masse) de sol humide dans de l'eau minérale Mont Roucous (pH = 5,85 ; [Na⁺] = 3,1 mg.L⁻¹ ; Ca²⁺ = 2,4 mg.L⁻¹ ; Mg²⁺ = 0,5 mg.L⁻¹ ; SO₄²⁻ = 2,0 mg.L⁻¹ ; HCO₃⁻ = 6,3 mg.L⁻¹ ; NO₃⁻ = 3 mg.L⁻¹), de composition proche de celle de l'eau de pluie. Ici, le protocole d'extraction a été adapté des protocoles BIOLOG, norme ISO/TS 22939, en remplaçant la solution isotonique au NaCl 9⁰/₀₀ ou une solution tampon par de l'eau minérale Mont Roucous) (Thouin *et al.*, 2017). La solution est extraite en deux temps pour obtenir une suspension bactérienne d'inoculation du sable et une solution d'alimentation de la ligne expérimentale (filtrée à 0.2 µm).

Un volume de suspension bactérienne (50 ml) a été préparé par agitation sur rouleaux pendant 4 heures de 5 g de sol humide dans 45 ml d'eau Mont Roucous. Cette suspension est ensuite centrifugée (7500 rpm, pendant 10 min) pour éliminer les particules de sol mais pas les

bactéries libres ou détachées du sol. Le surnageant est récupéré et injecté dans les colonnes biotiques, en conditions saturées et insaturées, pour assurer le transfert de la solution riche en métaux et métalloïdes en présence de microorganismes. Par la suite, la solution de percolation ayant circulé dans les colonnes biotiques ou abiotique, saturées ou insaturées, a été obtenue par filtration à 0,20 µm de la suspension résultant du même protocole que celui permettant l'obtention de la suspension bactérienne.

Le reste du surnageant est filtré à 0,20 µm et conservé au réfrigérateur pour les dosages des anions et cation majeurs (chromatographie liquide), du Carbone organique dissous (COD) et des métaux et métalloïdes (ICP-MS, échantillons acidifiés pour conservation).

Les colonnes en polypropylène (diamètre 0,8 cm) ont été préparées avec 5 g de mélange sableux possédant 20 % de sable fin en proportion massique, préalablement stérilisé à l'autoclave par voie humide, à 125°C pendant 25 min, trois fois, dont une dernière après 72 h afin d'éliminer les spores de bactéries résistantes à l'autoclavage (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**a). Les colonnes sont stérilisées avant remplissage puis manipulées sous hotte à flux laminaire en conditions stériles.

L'injection des solutions filtrées (0,20 µm) et non filtrées a été réalisée à l'aide de seringues stériles sous hotte à flux laminaire (Figure III.2b). L'injection est faite lentement par le bas de la colonne, pour favoriser une imbibition et une saturation de la colonne qui soient satisfaisantes.

Les colonnes ont ensuite été fermées par un bouchon stérilisé percé par une aiguille connectée à un filtre stérile de 0,20 µm. Le bas de la colonne est scellé avec un tuyau et une gaine plastique rétractable à la chaleur (Figure III.2c). Les colonnes inoculées (biotique avec la suspension bactérienne et abiotique avec la suspension bactérienne filtrée) ont été laissées en macération pendant 10 jours.

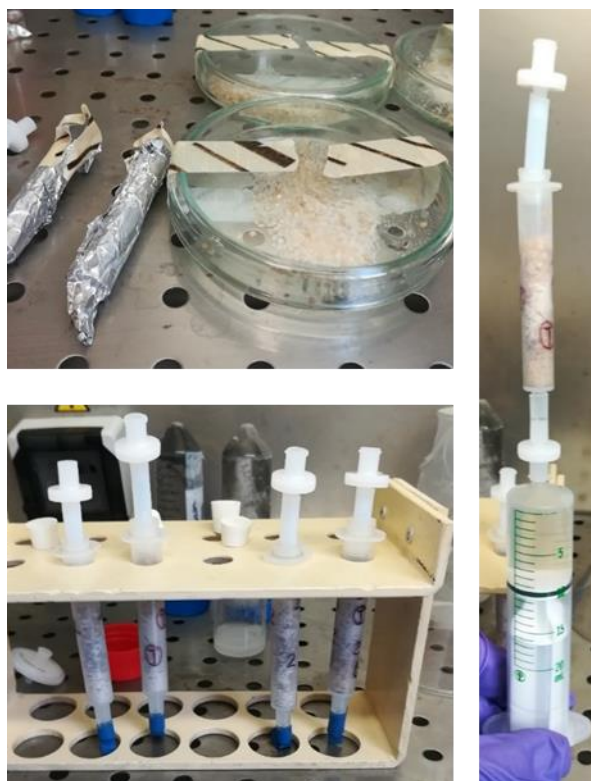


Figure III.2 : Phase d'inoculation des milieux après stérilisation des sables et des colonnes (a), inoculation des colonnes contenant le milieu poreux (b) et phase de macération après fermeture des colonnes (c).

II.C. Conditions expérimentales de développement des biofilms sur colonnes

Les quatre lignes expérimentales (Figure III.3) ont été mises en fonctionnement en parallèle pour une durée d'un mois (Figure III.4). Les différents éléments du système (réservoirs d'entrée, tuyaux d'alimentation, connexion au goutte à goutte) ont été connectés sous hotte afin de limiter les contaminations extérieures. L'expérimentation s'est déroulée dans des conditions de débit stable à $80 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, en condition de pression proche de la pression atmosphérique, et entre 20 et 25°C. Le débit d'entrée de la solution tout au long de l'expérience a été contraint par le volume de sol disponible, les paramètres hydriques à maintenir dans la colonne, et les volumes nécessaires de prélèvement (Tableau III.1). Ce débit a permis de favoriser des conditions de développement et de fonctionnement des biofilms. En effet, il était important de ne pas imposer une contrainte mécanique trop importante sur les biofilms afin d'éviter le risque d'arrachement et ainsi de favoriser leur installation et développement dans la colonne.

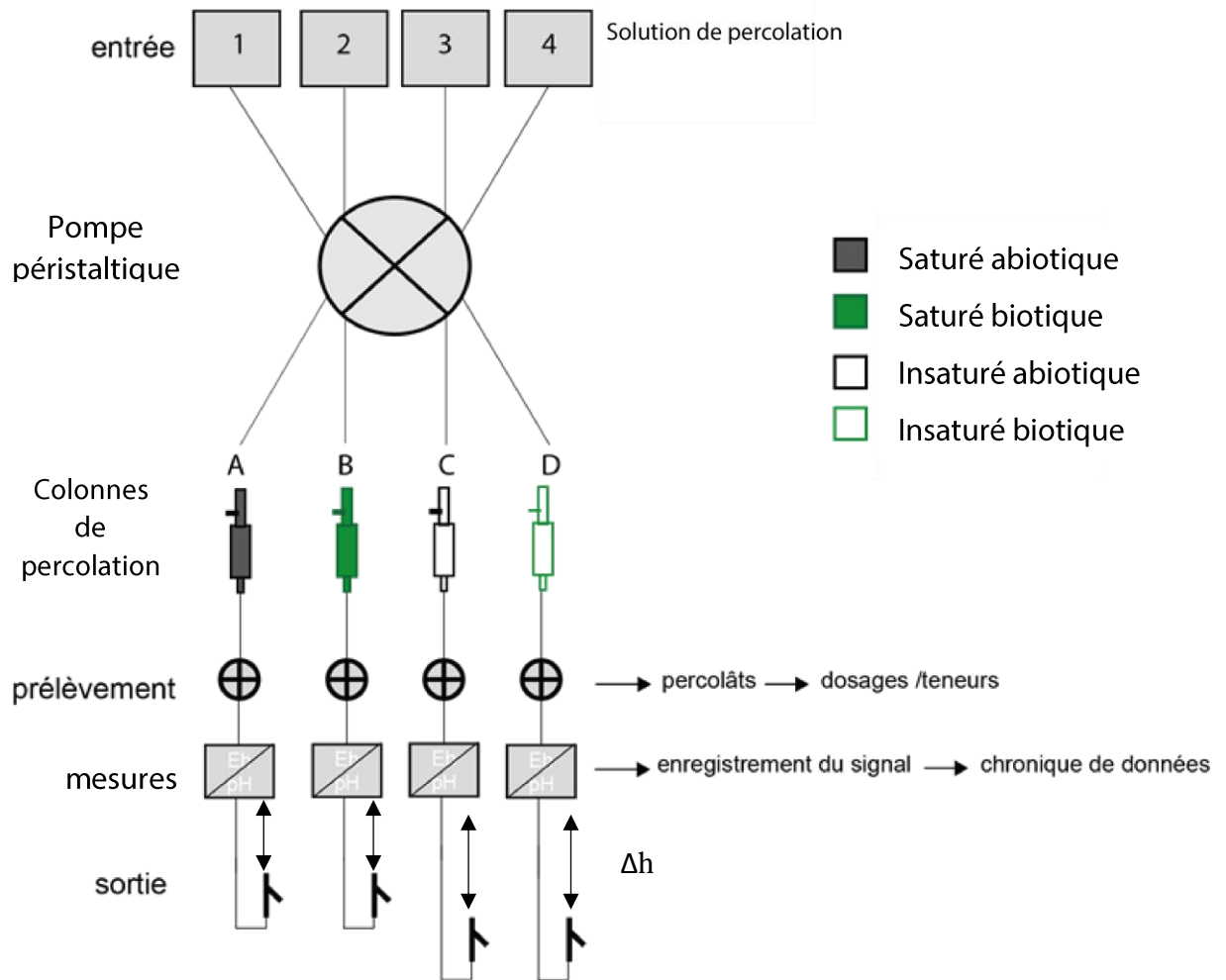


Figure III.3 : Présentation des quatre lignes et quatre conditions expérimentales imposées au système poreux sur colonnes; saturé abiotique, saturé biotique, insaturé abiotique et insaturé biotique.

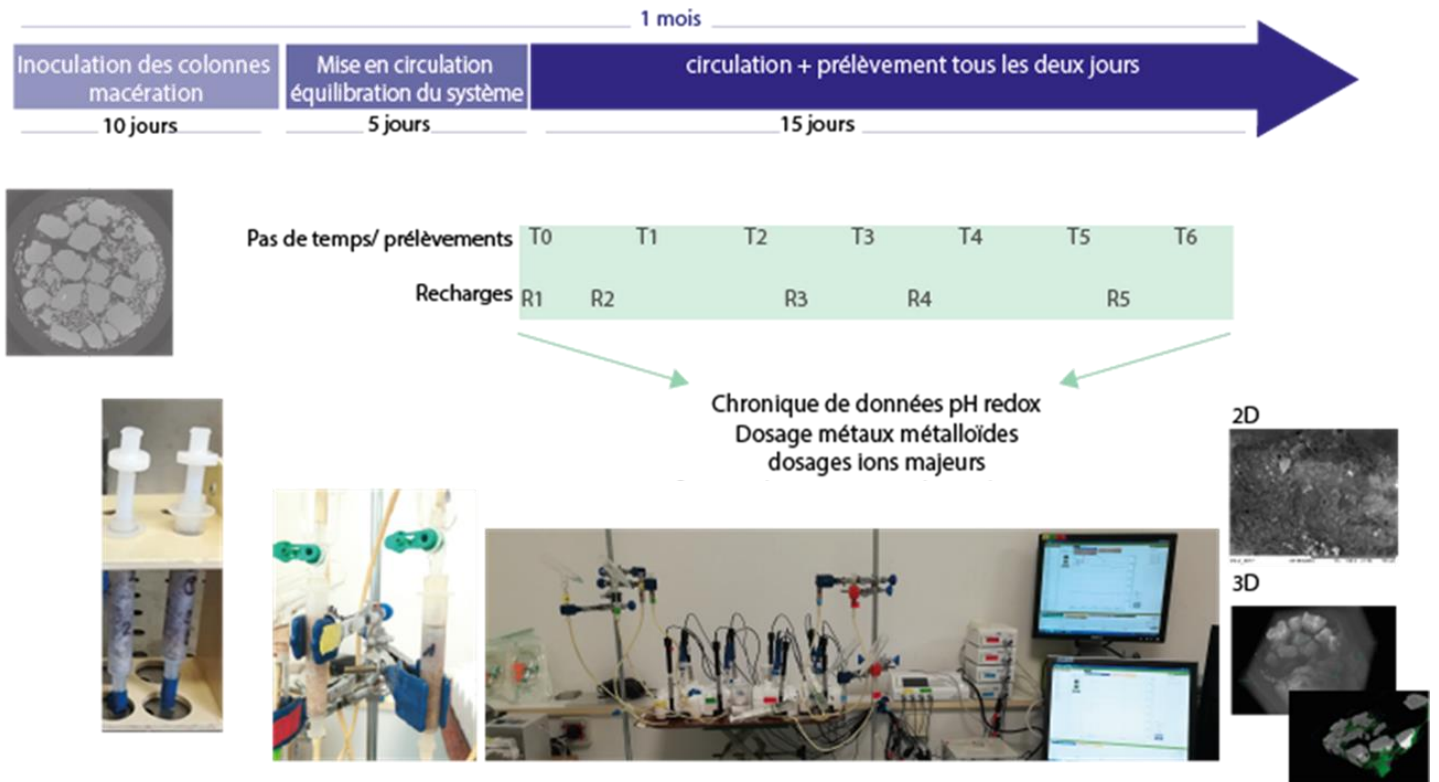


Figure III.4 : Séquence expérimentale appliquée à chacune des quatre colonnes et condition expérimentale avec 10 jours de macération, une phase d'équilibration de 5 jours des conditions hydriques en colonnes et 15 jours de circulation de la solution de percolation. Sont représentés en dessous (encadré vert) les pas de temps de prélèvements (T0 à T6), les pas de temps de recharge (R1 à R5), les types d'analyses et les images du banc expérimental et des différentes étapes d'analyses.

Tableau III1 : Conditions et modalités expérimentales de contrôle des colonnes ; avec les modalités hydriques (saturées / insaturées) et biologiques (abiotique / biotique), le débit constant d'entrée $Q_{\text{entrée}}$ ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$), la succion imposée au système par la valeur de Δh (cm) et la teneur en eau massique W ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), maintenue constante dans chacune des quatre colonnes.

colonne	1	2	3	4
état hydrique	saturé	saturé	insaturé	insaturé
état biologique	abiotique	biotique	abiotique	biotique
$Q_{\text{entrée}}$ ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)	80	80	80	80
Δh (cm)	0	0	30	30
W ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,16	0,19	0,09	0,13

II.D. Observations par microscopie électronique à balayage (MEB)

Des échantillons de massif poreux, après réalisation des expériences de percolation de solution en conditions biotiques, ont été observées en microscopie électronique à balayage et analysés à l'aide d'un détecteur dispersif en énergie (MEB –EDS). Cette analyse permet d'observer la morphologie des biofilms et d'identifier de façon qualitative, dès lors que les seuils de détections sont atteints, les métaux et metalloïdes d'intérêt (Cr, Cu, Pb et As) mais également les différentes morphologies des précipités d'oxydes de fer, aluminium et de manganèse, lorsqu'ils sont présents.

II.E. Analyse en micro tomographie à rayon X et traitement d'images

Des acquisitions en micro-tomographie X ont été effectuées sur les échantillons humides en fin d'expérience afin d'obtenir des données structurales, mais également de visualiser les biofilms au sein des massifs poreux. Les images ont été réalisées en suivant le même protocole d'acquisition mis en place précédemment (cf. chapitre II). Cependant, cette méthode n'a pas permis de distinguer les phases biologiques. La très faible et très proche absorbance aux rayons X, des fractions liquides, biologiques et gazeuses ne permet pas de les distinguer sur les images en niveau de gris issues des acquisitions en micro tomographie à rayons X.

Plusieurs méthodes devant permettre d'accroître le contraste entre les biofilms et les autres phases présentes ont été utilisées afin de faciliter l'observation des biofilms en imagerie 3D. Les absorbances aux rayons X des différentes fractions des échantillons sableux varient selon leur composition (solide > liquide > biologique > gazeuse).

II.F. Introduction d'un agent contrastant pour les biofilms présents dans le massif poreux.

En tomographie aux rayons X, les contrastes entre les phases peuvent être faibles, limitant de la sorte la capacité de les distinguer à l'œil et par voie de conséquence encore plus fortement en faisant appel à un traitement d'images après identification des phases sur un histogramme de niveaux de gris. Une telle limitation résulte de la proximité des coefficients d'absorption aux rayons X des différentes phases, coefficient lié à la composition chimique des phases (essentiellement carbone, oxygène et hydrogène).

Pour y remédier, plusieurs méthodes ayant pour objectifs d'accroître le contraste entre les biofilms et les autres phases présentes ont été utilisées afin de faciliter l'observation des

biofilms en imagerie 3D. In fine ce sont les niveaux de gris des phases gazeuses, aqueuses et biologiques qui sont très proches en raison du très faible coefficient d'absorption des phases aqueuses (solution présente dans la porosité) et biologique (biofilms). Il est donc difficile de distinguer l'eau du biofilm. Notons qu'au cours des tests réalisés, l'observation détaillée des images en coupe reconstruites en 2D et leur succession dans la colonne poreuse est essentielle pour identifier au sein de la porosité des zones pouvant correspondre à des biofilms. En effet, si les biofilms hydratés présentent des niveaux de gris proches des niveaux de gris des phases gazeuses et liquide, ils possèdent cependant une géométrie particulière qui permet de les identifier. Il est donc important de bien observer la phase aqueuse pour identifier les zones présentant des filaments ou des formes de ménisques aqueux anormaux.

Plusieurs stratégies existent pour augmenter les contrastes. Il est possible d'augmenter l'absorbance de la phase aqueuse en l'alourdissant par ajout de solution d'iodure de potassium (KI) (Iltis et al., 2011). L'eau, alors plus absorbante aux RX, atteint des niveaux de gris plus proches de la silice. D'autres auteurs procèdent par marquage indirect des biofilms via des particules, comme l'argent (Ag) (Iltis *et al.*, 2011). Les particules apparaissent alors nettement à l'image. Cette technique permet de mettre en avant les interfaces entre biofilm-eau et biofilm-air, et de s'affranchir ainsi de la structure interne du biofilm. Des contrastants s'inspirant des outils de traçage de l'eau utilisés en pédologie, augmentant le contraste des phases aqueuses, comme les bromures ont été expérimentés. Cet élément est habituellement utilisé comme traceur de l'eau, dans des analyses de dosages par HPLC. D'absorption importante en raison du numéro atomique du brome, il est apporté au système par dissolution du CaBr_2 dans l'eau. Il se trouve alors sous les formes ioniques Br^- et Ca^{2+} .

Des tests avec des microbilles d'argents ont également été réalisés. Néanmoins, la gamme de taille de billes utilisées de diamètre 0-20 μm (optimal pour leur circulation entre les grains les plus fins estimés à 60 μm) est trop petite par rapport à la résolution des images (5,4 μm) ce qui a conduit à des résultats non concluants sur l'ensemble des images. Bien que la répartition des microbilles soit difficile à visualiser dans nos conditions expérimentales, ces images ont cependant apporté des indications complémentaires aux observations avec chloronaphtalène qui sont détaillées par la suite.

D'autres molécules comme le chloronaphtalène sont utilisées pour leurs propriétés hydrophobes (Roscoat et al., 2014). Le contrastant reste alors immiscible avec la phase aqueuse et les biofilms (hydratés) et ne présente pas d'interactions avec la fraction biologique.

L'absorbance du chloronaphtalène permet également d'obtenir un contraste de niveaux de gris permettant de délimiter les phases liquides et gazeuses.

Ces techniques de contraste à l'exception du chloronaphtalène, ne permettent pas, à la résolution de 5,4 μm , dans les conditions expérimentales d'acquisition d'image, de distinguer les bordures des biofilms, eux-mêmes hydratés. Le chloronaphtalène a été utilisé pour l'amélioration des contrastes et l'observation de biofilms sur des images d'échantillons obtenues sur micro tomographes de laboratoire (Ivankovic et al., 2016). Pour cette raison, ce contrastant sera utilisé dans cette étude.

Le chloronaphtalène a été injecté par le bas de la colonne, très lentement afin de lui permettre de se répandre dans toute la porosité. Le chloronaphtalène étant immiscible avec l'eau, toute l'eau de l'échantillon a alors été remplacée par le contrastant (qui sature les colonnes), de plus forte absorbance aux rayons X.

II.G. Mesure des teneurs en carbone sur la fraction solide des milieux poreux

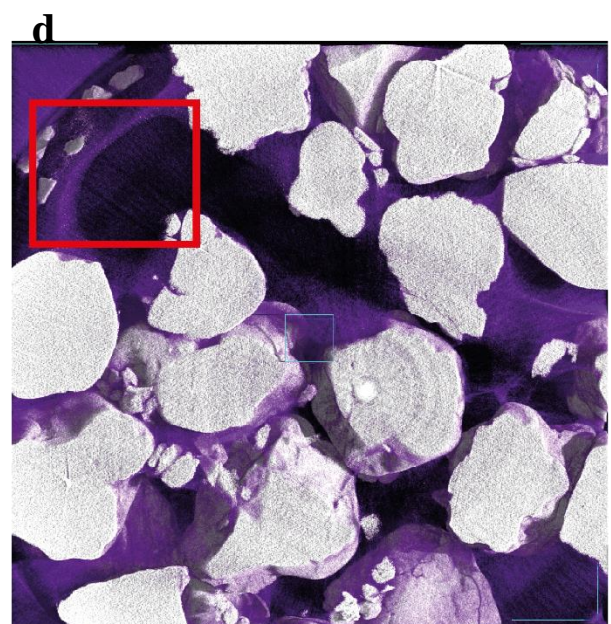
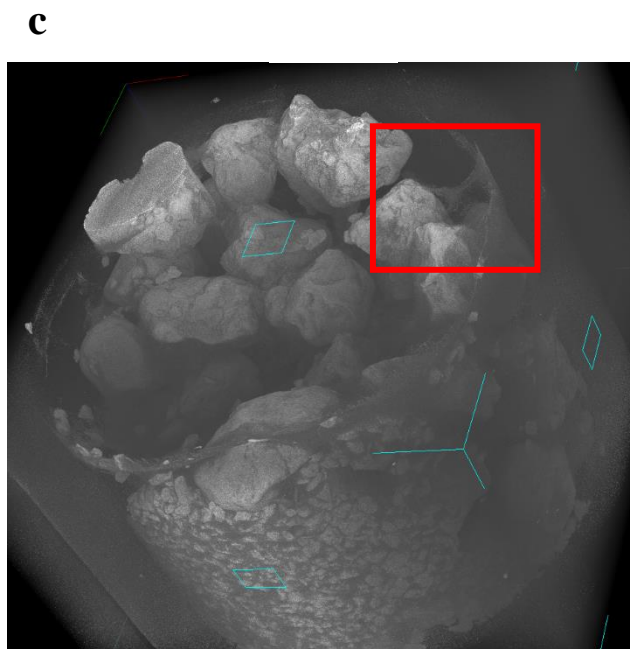
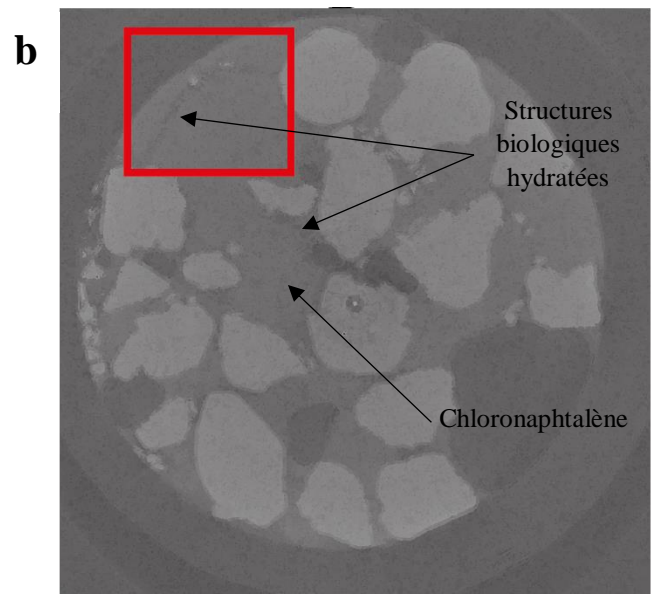
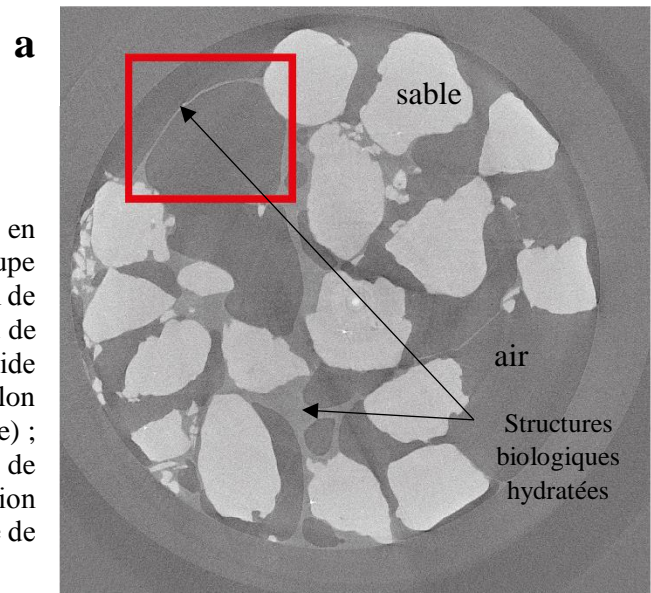
En fin d'expérimentation, plusieurs analyses sont réalisées sur le sable de colonnes tamisé pour isoler les deux fractions granulométriques de sable (1,8 mm et 211 μm). Les deux fractions ont été broyées à 160 μm et l'analyse élémentaire en carbone total a été réalisée par pyrolyse (CHNS, Flash 2000, Thermo Fischer Scientific). L'analyse du carbone organique total a été obtenue par pyrolyse Rock-Eval (Rock-Eval 6 Turbo, Vinci Technologies).

III. Résultats et discussion

III.A. Identification des biofilms en micro tomographie à rayon X

Les premières acquisitions d'image en micro tomographie aux rayons X ont été réalisées sur un échantillon biologique issu d'une macération de bactéries et champignons différents de ceux obtenues dans les conditions de l'expérience sur colonnes. Le but a été d'obtenir du matériel biologique afin de tester les protocoles d'acquisition en amont de l'expérience sur colonnes. Ces premières images ont permis de vérifier si les biofilms bactériens peuvent être observés *in situ* au sein des colonnes inoculées, de façon à permettre tout d'abord la visualisation de matériel biologique sur nos échantillons. Les observations révèlent la présence, en tête de colonne, de structures hydratées dont les morphologies sont compatibles avec des morphologies de biofilms. Ces structures possèdent en effet des niveaux de gris très proches de ceux correspondant à la phase liquide, mais avec des formes de ménisques très différentes de ceux de la phase liquide (Figure III.5a). Avec l'injection de chloronaphtalène (Figure III.5ab), la phase liquide est remplacée par le contrastant et on constate que la structure biologique observée apparaît en négatif par rapport à l'image A. le contrastant immiscible avec l'eau et non réactif vis-à-vis des biofilms encadre celui-ci. La structure biologique apparaît donc avec un niveau de gris proche de celui de l'air (gris foncé à noir) et reste bien distinct de la fraction liquide composée de contrastant. Une visualisation 3D de cette structure a été réalisée sur un ensemble d'images de coupes transversales encadrant cette structure biologique (Figure III.5c, d). Un seuillage visuel a permis d'identifier le contrastant et d'éteindre les fractions de contrastant et de gaz, pour obtenir une visualisation de structures biologiques, qui peuvent être identifiées comme résultantes du développement d'éléments biologiques.

Figure III.5 : Imagerie de structures biologiques en coupe transversales (μ CT à rayons X) avec a) coupe transversale d'échantillon humide avec identification de formes de filaments biologiques hydratés, en niveau de gris intermédiaire entre l'air (noir) et la fraction solide (blanc), b) coupe transversale du même échantillon après injection de contrastant (chloronaphtalène) ; identification de la structure biologique en niveau de gris proche de celui de l'air (noir) et c) reconstitution 3D de la zone d'intérêt (VGSTUDIO) et d) tentative de seuillage pour extraire les structures biologiques.



L'observation des développements bactériens dans les conditions expérimentales ne permet pas d'observer et de distinguer des structures similaires aux expériences préparatoires. Les images acquises en fin d'expérimentation permettent d'observer des zones de niveau de gris différentes entre les fractions en air, en eau et les grains. On observe des zones délimitées par le contrastant, de niveau de gris plus foncé, proches des niveaux de gris de la phase gazeuse (Figure III.6). Ces niveaux de gris forment une masse au sein de la porosité la plus fine, avec des délimitations présentant de nombreuses irrégularités, visibles sur les images en coupe 2D traitées (filtration par ouverture - fermeture et watershed). Ces zones de niveaux de gris irrégulières peuvent laisser penser que le développement des biofilms s'effectue à la limite des deux grands types de porosités.

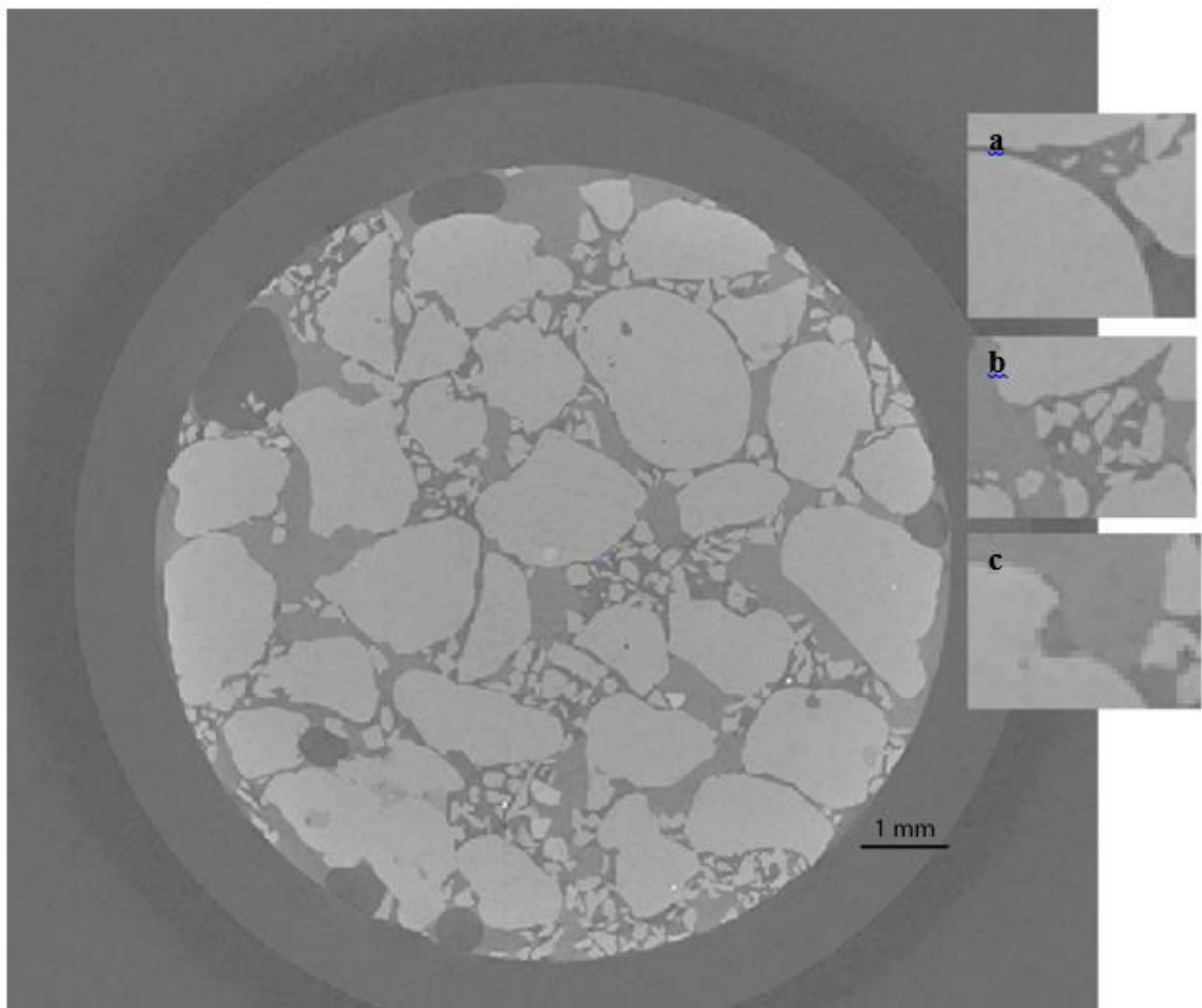


Figure III.6 : Coupe transversale 2D acquise en μ CT à rayons x après injection de chloronaphtalène dans le milieu poreux et identification de zones particulières sur les coupes 2D de la même colonne (a, b et c) de l'image pouvant être attribuées à la présence de développement biologiques dans la porosité.

Pour tenter de mieux distinguer les différentes phases de l'image, en particulier la phase biologique et la phase liquide/contrastant, une deuxième méthode de traitement d'image a été appliquée. Chacune des phases gazeuse, solide et liquide est isolée par seuillage sur l'histogramme des niveaux de gris pour les phases gazeuses et solides. Les différentes phases ont été soustraites de l'image d'origine et traitées indépendamment par filtrage à l'aide de l'outil morpho-mathématique d'ouverture-fermeture (Figure III.7).

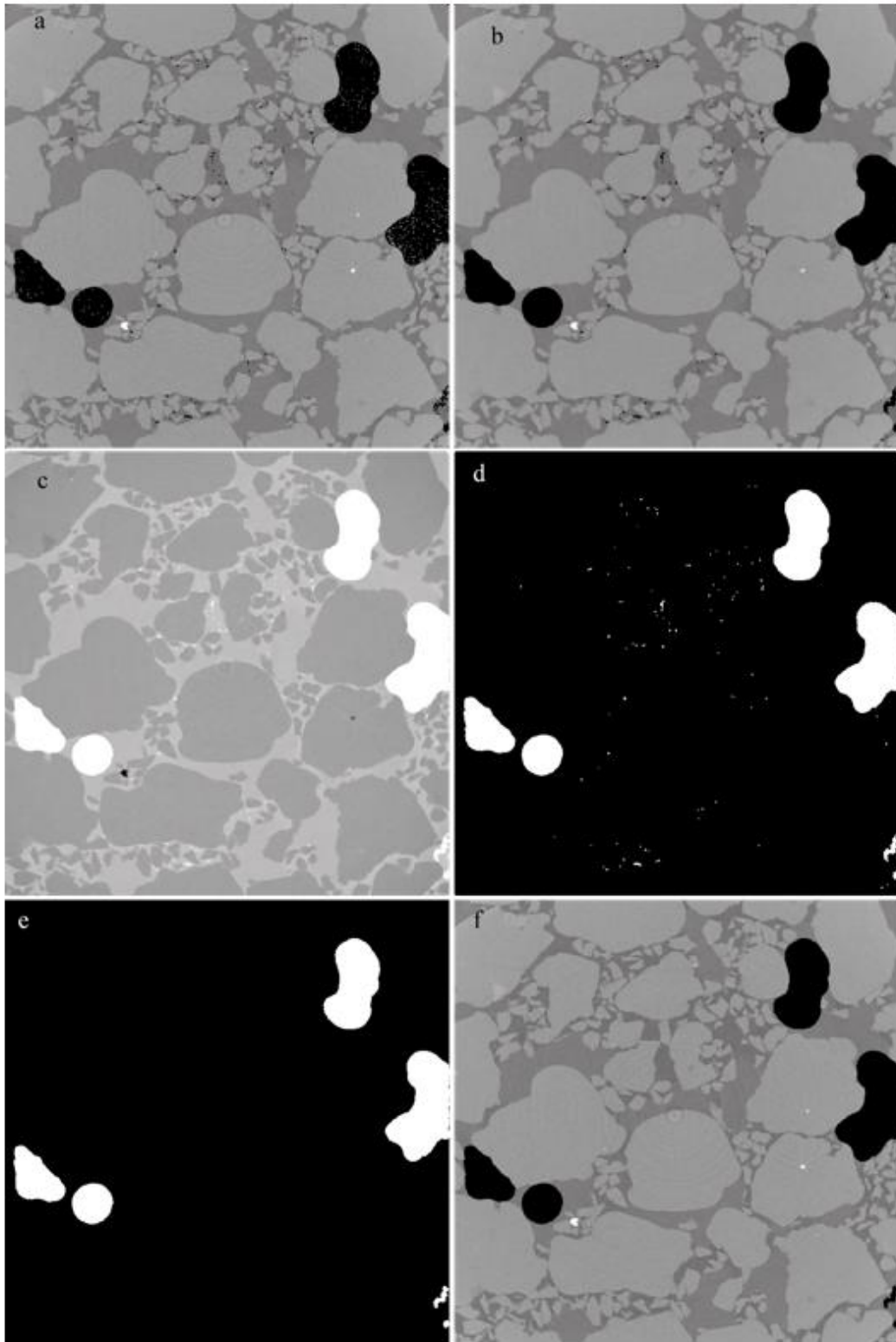


Figure III.7 : Succession d'étapes de débruitage des différentes phases gazeuses, liquides et solide des images obtenues sur un échantillon saturé biotique. Le traitement est réalisé via un outil morpho mathématiques d'ouverture-fermeture sur chacune des phases extraites de l'image.

Sur les images en fin d'expérimentation (Figure III.8 a), les zones de gris identifiées correspondant potentiellement à un développement biologique (illustrées en rouge sur l'image par seuillage visuel, Image J) (Figure III.8 b) ne sont pas identifiables. On obtient alors une image des grains (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.c**) et une image de la phase liquide/biofilm (Figure III.8 d). Cette image présente un histogramme bimodal, avec une première distribution pour les zones de niveau de gris les plus foncés et une seconde représentant les zones de niveau de gris plus claires. Ces zones plus claires ne permettent pas de distinguer numériquement le biofilm du contrastant. Il en résulte donc une phase en niveau de gris visible sur la Figure III.8d, non dissociable comme le montre également l'histogramme avec deux pics (solide et phase contrastant et biofilms).

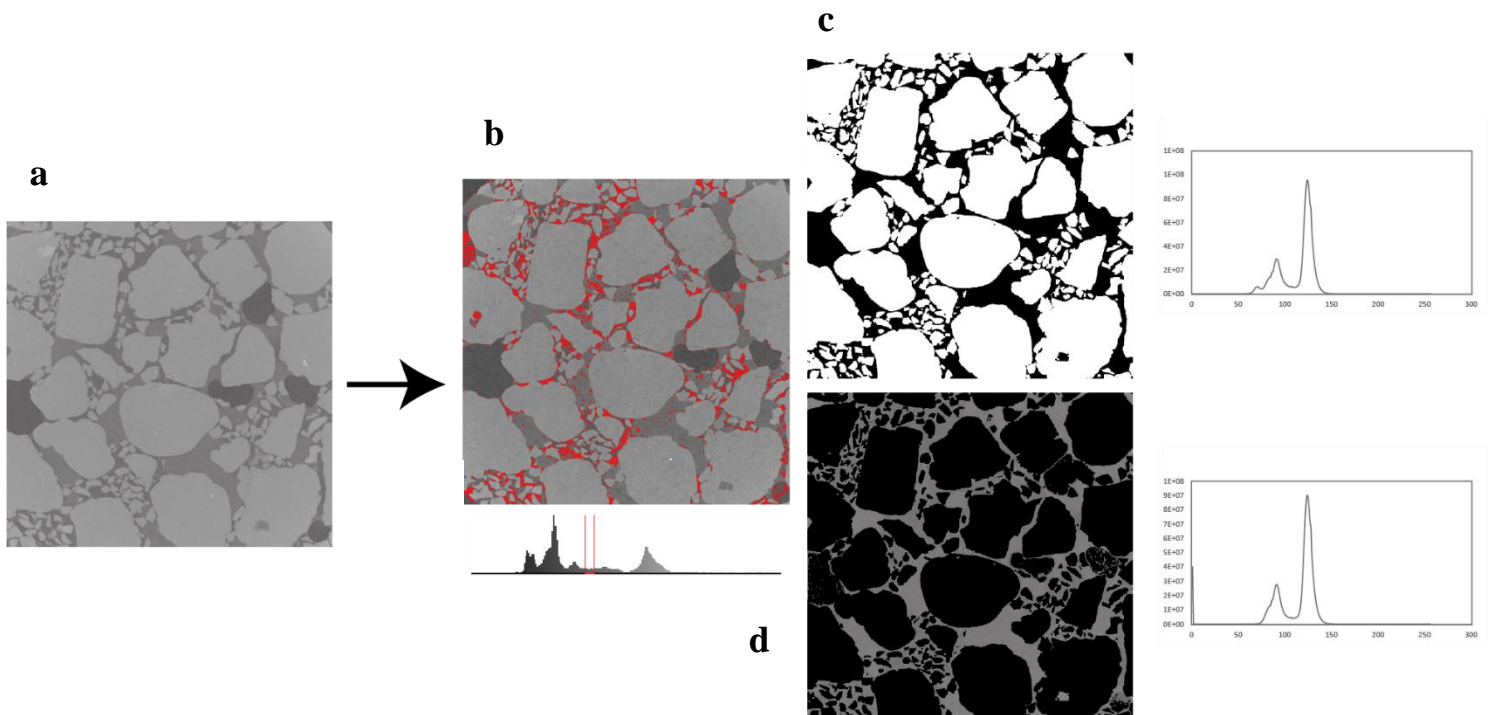


Figure III.8 : Illustration et limite de la méthode de traitement d'image dans les conditions d'acquisition en micro tomographie à rayons X. En (a) l'image de base traitée par ouverture fermeture, avec (b) seuillage des phases biologiques ; à laquelle la phase solide (c) est extraite pour ne laisser que la phase liquide biologique (d) c'est-à-dire le chloronaphtalène et les biofilms, avec les histogrammes de niveaux de gris correspondants.

Une estimation de la phase biologique a été réalisée par seuillage visuel sur le volume construit à partir de cette série d'images (Figure III.9). Le seuillage a été réalisé en observant les images de coupe 2D et le bloc 3D afin d'isoler les phases contrastantes et le biofilms (Figure III.9a), puis la phase biologique au sein du milieu poreux (Figure III.9b), et enfin extraire la phase biologique seule (Figure III.9c). Ces images mettent en avant des formes potentiellement biologiques avec des zones particulières. Une estimation de la phase biologique a été réalisée en ajustant au mieux le seuillage visuel (Figure III.10 a et b), afin d'obtenir une image de la répartition potentielle des biofilms dans la porosité (Figure III.10c). Le passage à la 3D permet d'observer ce qui semble être un développement de biofilms dans des zones de la porosité la plus grande connecté à la petite porosité (Figure III.10c). Si les niveaux de gris assimilés à du biofilm représentaient l'eau qui n'a pas pu être chassée par le contrastant, toute la porosité fine serait remplie de cette fraction biologique. Or sur l'image, bien que celle-ci représente une estimation de la localisation de biofilms (Figure III.10c), on constate que des biofilms semblent se trouver dans la grande porosité en majorité. Notons que ce traitement a été réalisé sur une image en fin d'expérience en conditions biotiques saturées. Les résultats présentés dans la littérature ne tranchent pas sur les conditions d'installation des biofilms. L'image en conditions biotique insaturée n'a pas permis de réaliser ce traitement. Cependant, au vu de la répartition des biofilms, on peut penser que la répartition en conditions insaturées serait similaire à celles en conditions saturées, avec des développements moins importants dans la porosité la plus importante, permettant aux biofilms de conserver une interface avec les films d'eau tout en conservant leur caractère aérobie. Les observations tirées de la littérature sont parfois contradictoires quant à la mise en place des biofilms dans des systèmes de porosité bimodale. Dans le cas de cette expérience, les colonnes ont été inoculées de façon saturées avant la mise en place sur le banc expérimental et la mise en circulation selon les modalités saturées et insaturées. On peut émettre l'hypothèse qu'en conditions insaturées, la localisation serait similaire, avec une biomasse moins importante selon les conditions de potentiel hydriques imposés, semblable aux gammes de potentiels mentionnées dans la littérature (Wang and Or, 2013).

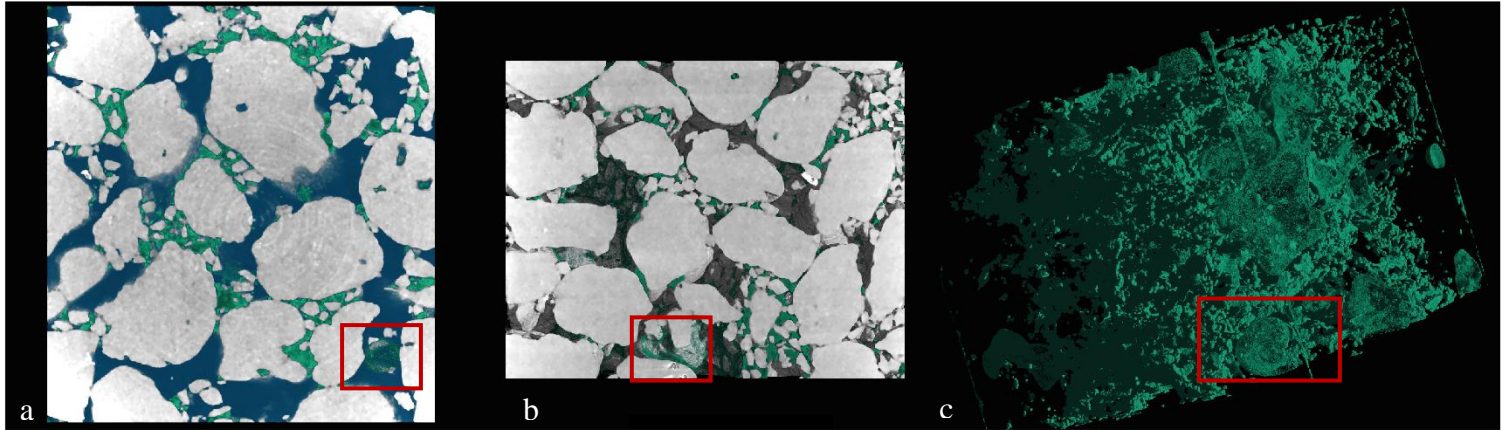
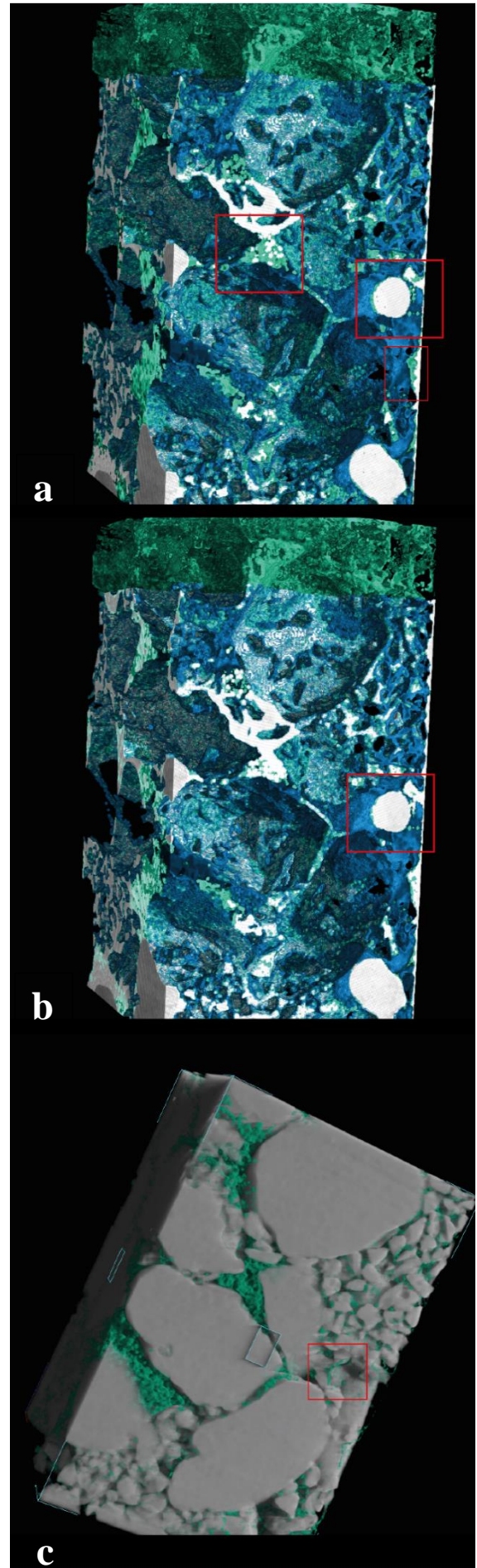


Figure III.9 : Trois étapes d'identification de la phase biologique sur les images 2D et 3D d'un échantillon. Le passage sous VGstudio max a permis de colorer les différentes phases, pour permettre de mettre en évidence le chloronaphtalène en bleu (a) et isoler le biofilm (b) pour obtenir une visualisation en 3D du biofilm seul au sein de la porosité (c). En encadré rouge sont ciblées des zones particulières de formes de phase biologiques.

Figure III.10 : Volume des images de colonne biotique saturée après injection de chloronaphtalène (phase bleue) pour la visualisation de la phase biologique (verte) au sein du milieu poreux, avec en blanc la phase gazeuse. Deux seuillages visuels ont été appliqués (a) et (b) pour tenir compte des observations macroscopiques sur les coupes transversales 2D, avec notamment les limites de phases gazeuses – biologiques visibles sur les parois des pores (encadrés rouges).



Ce traitement sur le ROI a permis d'estimer une porosité dite résiduelle de 13 %, c'est-à-dire la porosité après développement du biofilm (Tableau III.2), en considérant dans cette estimation que le biofilm n'est pas poreux, ce qui est discutable étant donné que selon son stade de développement, le biofilm peut lui-même ajouter une modalité de porosité. Cependant la résolution des images n'a pas permis d'observer la répartition du chloronaphtalène au sein des structures identifiées comme de potentiels biofilms. Ces observations seront complétées par les observations sur micro modèle.

Tableau III.2 : Valeurs de volumes calculés sur un ROI d'après les images 3D (VGStudiomax) pour chacune des phases gazeuse, liquide et solide, en cm³, permettant le calcul des teneurs en eau et de la porosité totale ainsi que la porosité après croissance des biofilms (porosité résiduelle).

phases	Volumes (cm ³)		
	insaturé abiotique	saturé abiotique	saturé biotique
gazeuse	0,65	1,09	0,49
liquide	0,28	1,09	0,38
solide	2,30	2,52	3,76
total	3,23	4,70	5,33
biologique)	-	-	0,09
teneur en eau (g.g ⁻¹)	0,05	0,16	0,16
porosité totale	0,29	0,30	0,29
porosité résiduelle	-	-	0,13

Les zones les plus importantes contenant du biofilm semblent se localiser aux abords de la porosité la plus large (Figure III.10c). Pour certains auteurs, les biofilms se développent préférentiellement dans la porosité la plus fine comme lieu d'installation ou au contraire une installation dans les pores les plus larges Les zones de petites porosités pourraient être assimilées à des zones d'eau « morte » et donc des zones de faible apports en termes de flux nutritifs. Volk *et al.*, (2016) montrent une variation homogène de la courbe de conductivité hydraulique, n'indiquant aucune colonisation préférentielle de la porosité, qu'elle soit petite ou

large. On peut alors penser que l'installation des biofilms est permise dans des zones de compromis entre les stress mécaniques et géochimiques d'apports en nutriments.

Ces observations permettent de penser que le biofilm se développe dans des zones de circulation du fluide (ici l'ensemble de l'échantillon saturé) ou à proximité mais que son installation peut être induite par des paramètres différents. Les corrélations entre le développement de biofilms et la présence de gradients nutritifs retrouvés dans la littérature (Nunan et al., 2003) montrent qu'au cours de son développement, le biofilm est capable de recréer des gradients dans son environnement proche pour lui permettre de survivre à la diminution d'un facteur limitant (Tecon and Or, 2017).

III.B. Présentation des images obtenues en microscopie électronique à balayage (MEB).

Les observations en microscopie électronique à balayage (MEB) ont permis de comparer les morpho-phénotypes biologiques entre les échantillons biotiques saturés et insaturés.

Dans un premier temps, les images mettent en évidence des développements de structures bactériennes sur les milieux poreux ayant fonctionné en conditions saturées (Figure III.11) et insaturées (Figure III.12). Dans les conditions saturées, on observe un développement biologique important entre les plus petits sables fins mais également sur les sables grossiers (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**a et b). Si l'on se concentre sur ces amas biologiques, l'observation à plus fort grossissement montre un réseau de filaments (Figure III.11 c et d), dont la morphologie suggère la présence d'un réseau d'exopolysaccharides microbiens typique des biofilms, au sein duquel on peut observer des « grains » ou « structures » piégées, possédant des niveaux de gris plus clairs (Figure III.11 d, e, f, g et h). Ces « structures », en niveau de gris plus clair semblent enchevêtrées dans le réseau de filaments (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**f), avec des formes rappelant des morphologies biologiques. Cette première observation met en avant un potentiel effet des structures biologiques sur la localisation de ces « grains ».

En conditions insaturées, la répartition des dépôts et des amas biologiques semble plutôt associée aux particules de sables grossiers (Figure III.12a). De nombreuses structures se distinguent des structures biologiques. A plus petite échelle, les réseaux biologiques présentent une structure non pas en filaments mais en tapis constitués d'éléments de type « coque » bien identifiables avec des adhérences (Figure III.12d). Les « grains » de niveaux de gris plus clairs retrouvés dans les structures biologiques sont de type tubulaire (Figure III.12a, e et h). A plus fort grossissement on retrouve des niveaux de gris plus clairs dans le réseau biologique (Figure III.12i). Des dépôts ou précipités sont également retrouvés hors des zones biologiques, sur des particules grossières. Ces dépôts présentent des contours moins lisses que ceux présents au sein des structures biologiques (Figure III.12c).

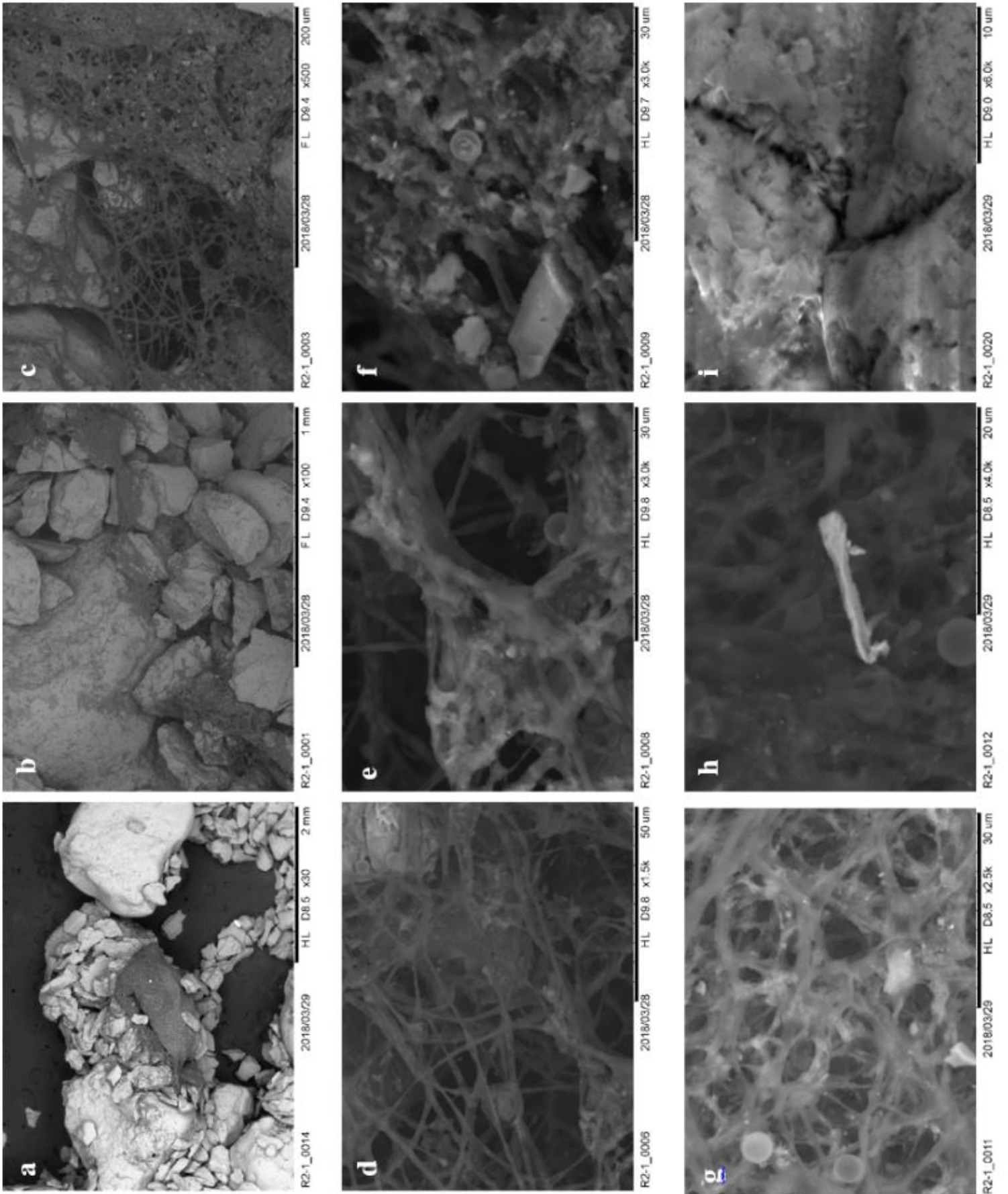


Figure III.11 : Image MEB des milieux en conditions saturées biotiques acquises en fin d'expérimentation des échantillons collectés en tête de colonne.

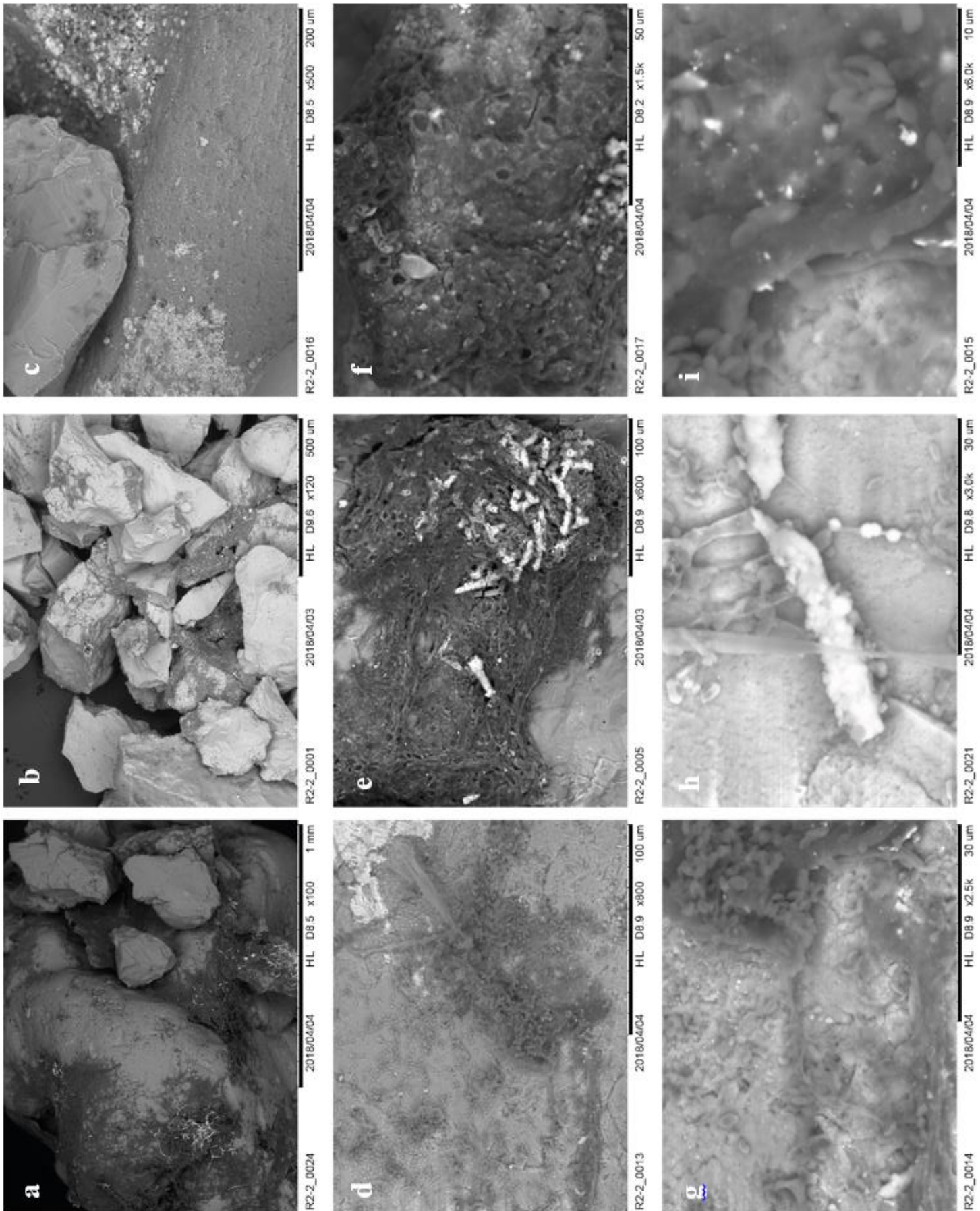


Figure III.12 : Image MEB des milieux en conditions insaturé biotique acquises en fin d'expérimentation des échantillons collectés en tête de colonne

D'après ces observations, on retrouve une différence significative entre les conditions biologiques saturées et insaturées (Figure III.13). Des précipités semblent se former dans les deux conditions biotiques (saturées et insaturées), dans les zones de développement biologique mais également dans les zones sans structures biologiques (Figure III.13A et B). En conditions insaturées, les développements biologiques semblent se situer au sein des pores résultant de l'assemblage des sables fins, mais également au contact de la porosité de plus grande taille (Figure III.13B), contrairement aux observations en milieu saturé où le développement biologique semble se restreindre aux seuls pores (Figure III.13A). Les biofilms en conditions insaturées présentent de nombreuses zones de dépôt très structurés tubulaires (Figure III.13B) contrairement aux dépôts en conditions saturées.

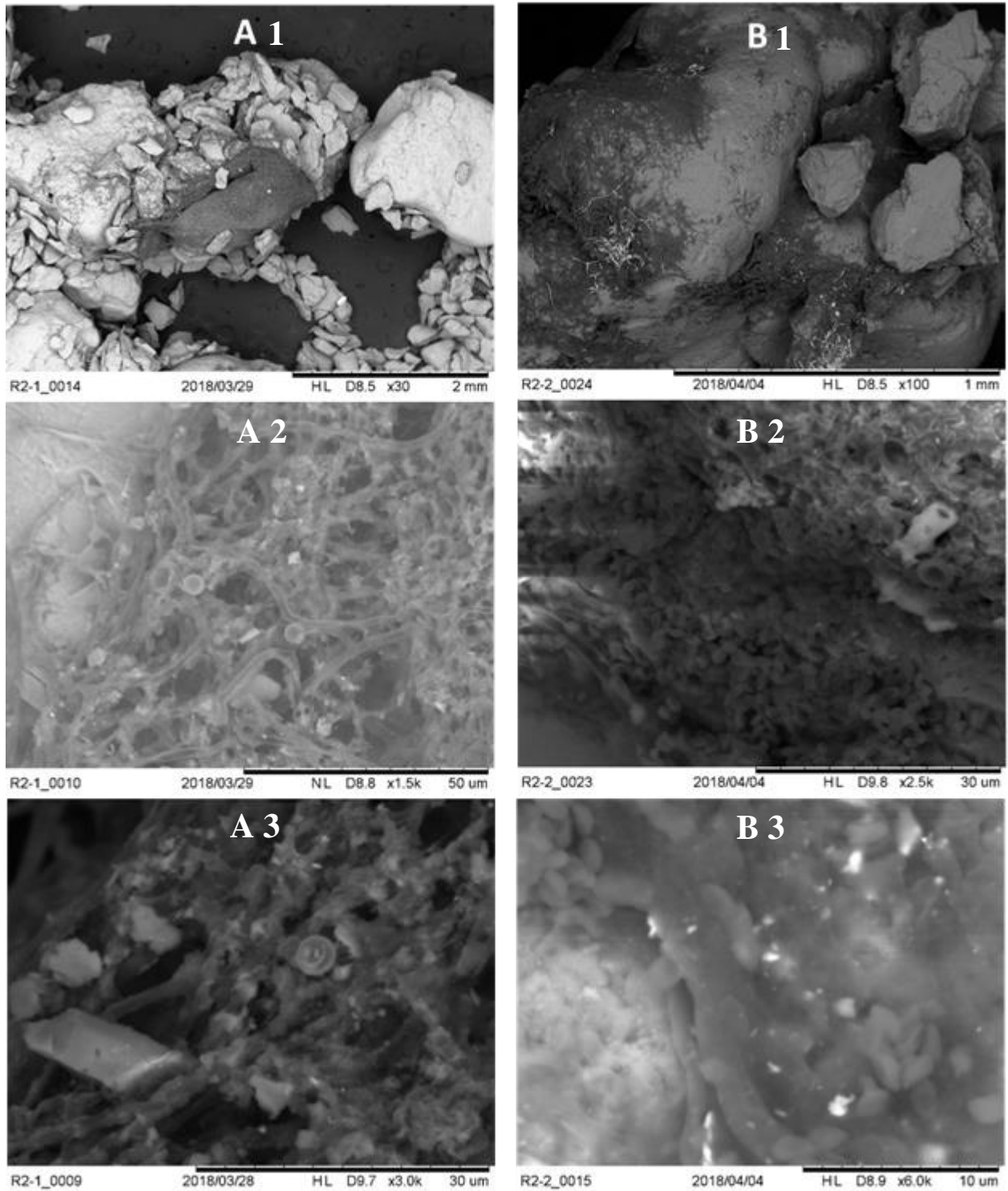


Figure III.13 : Observation au MEB environnemental d'échantillons secs de sables collectés en tête de colonnes à trois grossissements avec la colonne de gauche : A) échantillons des milieux biotiques saturés et la colonne de droite ; B) échantillons de milieux biotiques insaturés.

Les morpho-phénotypes observés dans les colonnes saturées et insaturées sur une matrice sableuse sont semblables à des biofilms observés sur des sables et ayant un enchevêtrement de bactéries, de particules solides et de filaments ; les EPS permettant l'adhérence des bactéries entre elle et sur les surfaces des grains de sable (Tecon *et al.*, 2018) (Figure III.14). Cependant, les morpho-phénotypes des développements biologiques sont également très différents d'une condition à l'autre, avec un développement en réseau de filaments en conditions saturées (Figure III.11c) et un tapis de microorganismes bien distincts en condition insaturée (Figure III.12d).

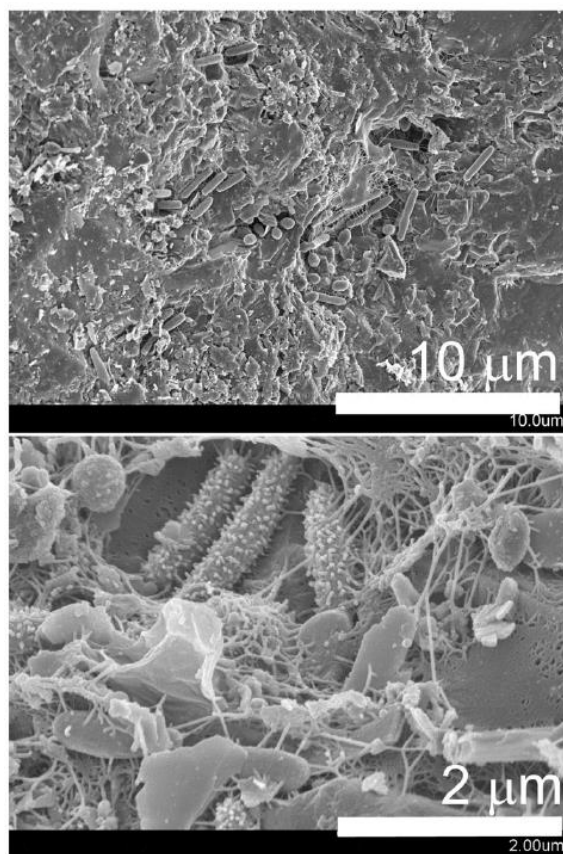


Figure III.14 : Images obtenues en microscopie électronique à balayage d'un développement de bactéries adhérentes à une matrice sableuse via un réseau filamenteux d'EPS, d'après Tecon et Or 2017.

Il semble donc y avoir, dans nos deux conditions expérimentales biologiques, deux fonctionnements distincts. Les différents précipités inorganiques retrouvés au contact du développement biologique semblent montrer une activité différente, ou des conditions physico chimiques différentes entre les deux morpho-phénotypes observés. Cette variabilité fonctionnelle est retrouvée dans la littérature, avec un impact des conditions hydriques. Plusieurs études d'impact des potentiels hydriques sur le développement de biofilms montrent

un effet sur la survie des biofilms, avec une diminution de la survie d'un inoculum bactérien avec l'augmentation du potentiel matriciel imposé (Rattray et al., 1992). En 2011, (Chowdhury et al., 2011) montrent que le potentiel matriciel seul ne peut être considéré et que le potentiel de l'eau (potentiel osmotique + potentiel matriciel) doit être considéré, afin de prendre en compte la salinité des sols. Ceci doit être pris en compte d'autant plus en condition de séchage qui s'apparentent à des conditions naturelles d'insaturation des sols, où les sels sont concentrés dans la solution de sol, ce qui est d'autant plus vrai dans un sol sableux au vu des faibles teneurs en eau de ces sols. Ces notions sont également retrouvées en écologie microbienne, avec une augmentation de la diversité bactérienne lorsque la connectivité des pores diminue, permettant la mise en place de microenvironnements géochimiques particuliers en conditions insaturées (Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015; Or et al., 2007, 2007; Vos et al., 2013).

Il est donc important de croiser les données de localisation des phases liquides et biologiques mais également de caractériser la solution afin de comprendre les spéciations et la mobilité de chacune des espèces retrouvées en microscopie MEB, en analyse EDS et en solution (Cf chapitre IV).

III.C. Données des analyses réalisées à l'aide du détecteur dispersif en énergie (EDS)

L'analyse chimique semi-quantitative à l'aide d'un détecteur dispersif en énergie (EDS) permet de caractériser en termes de composition chimique toutes les structures observées afin de discuter leur composition et donc leur origine. Les spectres obtenus par analyses ponctuelles permettent de qualifier qualitativement la composition chimique des structures biologiques identifiées en analyse MEB. (Figure III.15, Figure III.16 et Figure III.17).

En condition insaturées biotiques (Figure III.15), on observe ainsi des précipités d'oxydes de fer et manganèse, au sein de la structure des biofilms. Les oxydes de manganèse sont présents sous la forme de tubulures formés par précipitation autour de cellules. Ces structures observées sont similaires à des tubulures produites par des bactéries du genre *Leptothrix* (Katsoyiannis and Zouboulis, 2004; Sawayama et al., 2011) connues pour oxyder le fer et le manganèse. On observe également la présence de grains riches en Cr mais ces derniers sont généralement localisés au contact des biofilms et non en position enchevêtrée au sein de la structure des biofilms.

En conditions saturées (Figure III.17) on observe également des précipités d'oxydes de manganèse au sein des biofilms mais qui ne présentent pas de structures tubulaires, suggérant une différence d'activité biologique et/ou de communauté microbienne.

Ces observations mettent en avant deux morpho-phénotypes de biofilms différents, entre les conditions saturées biotique et insaturée biotique, associés à des phénomènes de précipitation d'oxydes de fer et manganèse au contact des biofilms. Du cuivre et du zinc sont également détectés. Le cuivre est présent en faible quantité par rapport au manganèse et au fer. Peu d'arsenic est détecté, mettant en évidence une faible présence de cet élément sous forme solide ou bien que celui-ci n'est pas détecté (cf. spectres Figure III.15, Figure III.16, Figure III.17). Ces informations seront importantes à recouper avec les valeurs des teneurs de ces éléments en solution. Le comportement de ces éléments est d'autant plus important en conditions insaturées où les oxydes de manganèse sont retrouvés en tubulures. Il semble y avoir une activité biologique importante mais différente selon les conditions qui pourrait être soit une conséquence d'environnements physico-chimiques distincts ou ii) environnements hydriques distincts.

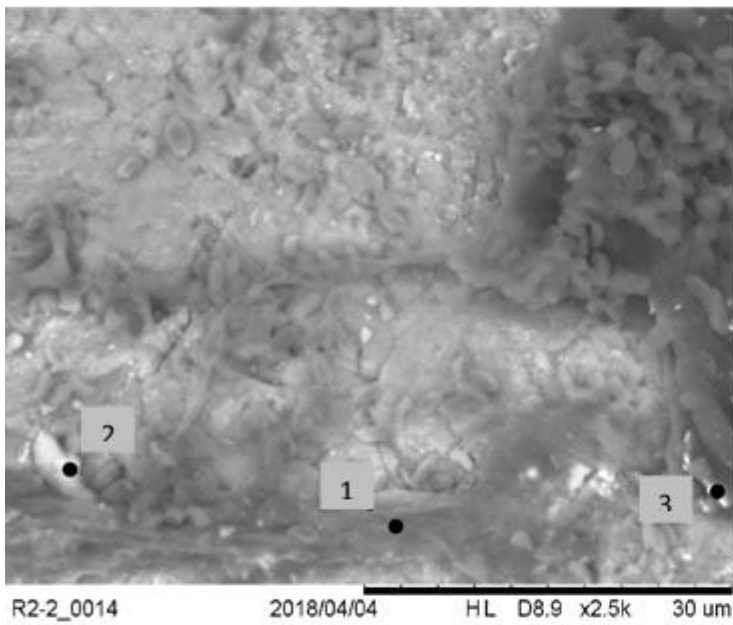
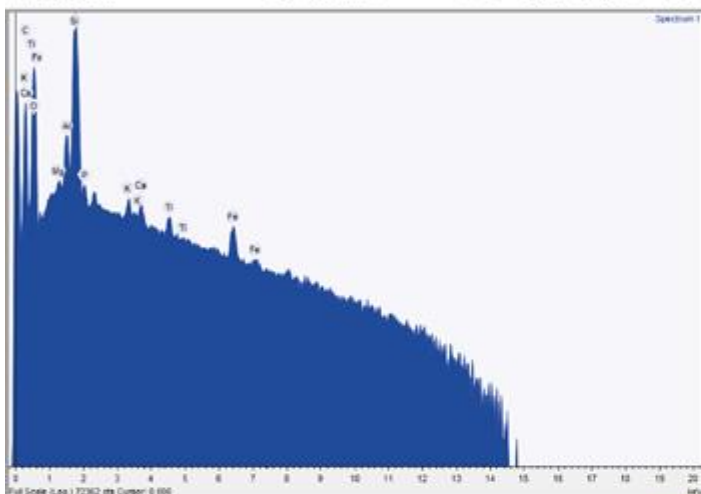
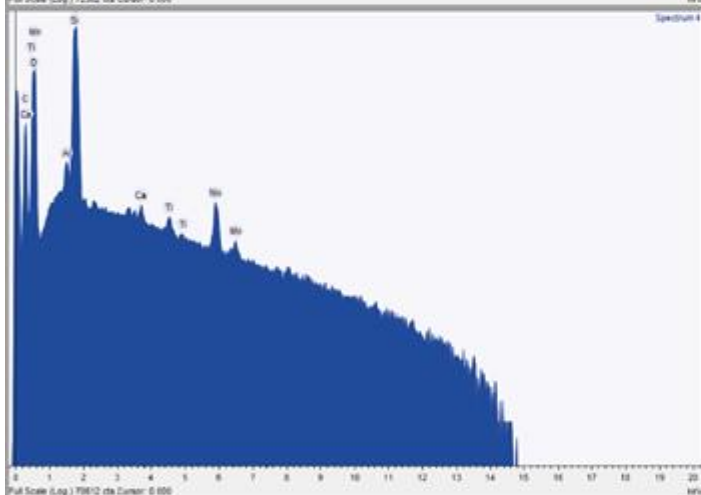


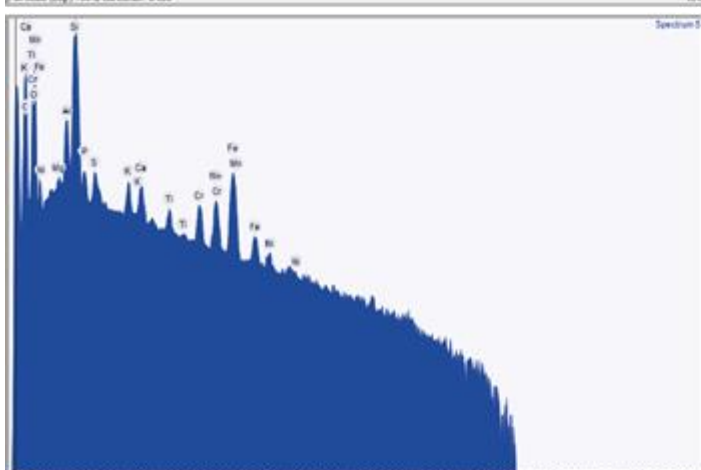
Figure III.15 : Localisation des points d'analyse EDS sur les images d'échantillons biotiques insaturés obtenues en microscopie électronique à balayage sur MEB environnemental. Les analyses sont présentées sous forme de spectre et une quantification en poids moléculaire



Element	Weight %	Weight % σ	Atomic %
Carbon	32.521	0.451	44.035
Oxygen	39.232	0.285	39.880
Magnesium	0.095	0.012	0.064
Aluminium	0.803	0.016	0.484
Silicon	25.909	0.183	15.003
Phosphorus	0.263	0.016	0.138
Potassium	0.167	0.014	0.069
Calcium	0.191	0.014	0.078
Titanium	0.224	0.018	0.076
Iron	0.594	0.032	0.173



Element	Weight %	Weight % σ	Atomic %
Carbon	22.252	0.190	31.686
Oxygen	46.494	0.158	49.704
Aluminium	0.296	0.014	0.188
Silicon	29.427	0.102	17.920
Calcium	0.153	0.016	0.065
Titanium	0.190	0.021	0.068
Manganese	1.188	0.037	0.370



Element	Weight %	Weight % σ	Atomic %
Carbon	44.863	0.325	57.818
Oxygen	31.597	0.223	30.571
Magnesium	0.092	0.011	0.059
Aluminium	1.033	0.016	0.593
Silicon	16.494	0.105	9.090
Phosphorus	0.338	0.014	0.169
Sulfur	0.231	0.013	0.112
Potassium	0.332	0.013	0.132
Calcium	0.406	0.014	0.157
Titanium	0.221	0.016	0.071
Chromium	0.561	0.023	0.167
Manganese	0.866	0.029	0.244
Iron	2.701	0.044	0.749
Nickel	0.265	0.035	0.070

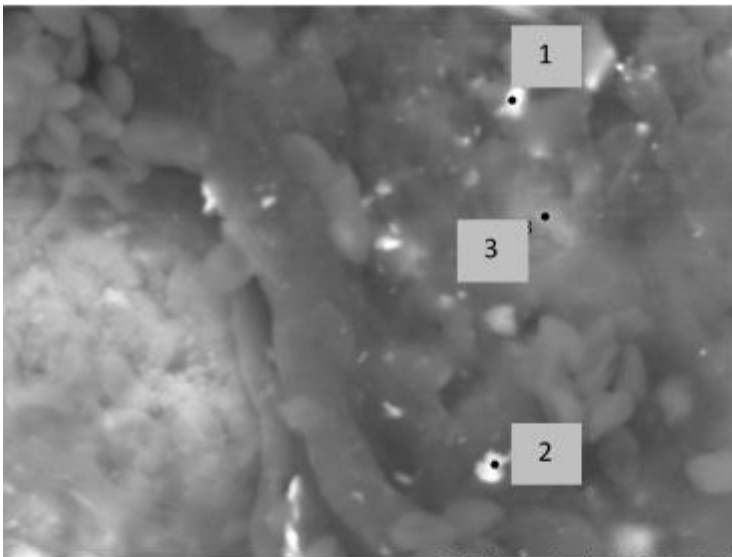
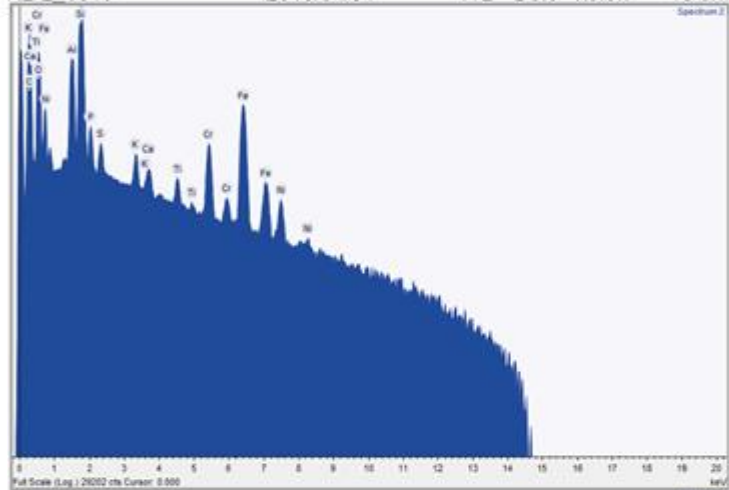
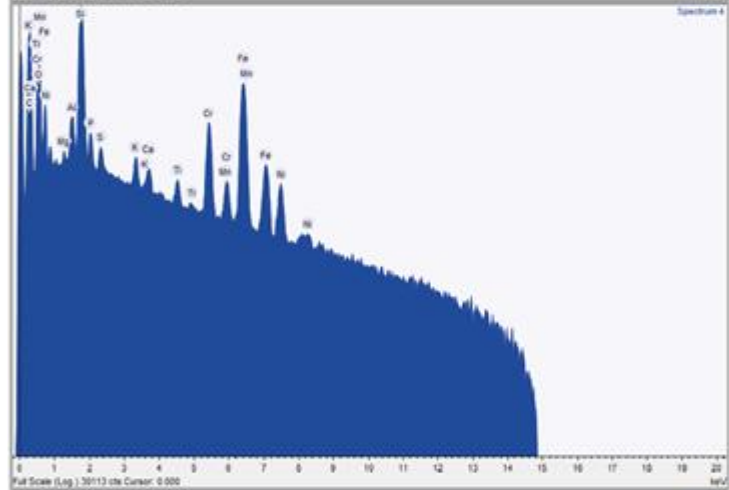


Figure III.16 : Localisation des points d'analyse EDS sur les images d'échantillons biotiques insaturés obtenues en microscopie électronique à balayage sur MEB environnemental. Les analyses sont présentées sous forme de spectre et une quantification en poids moléculaire.

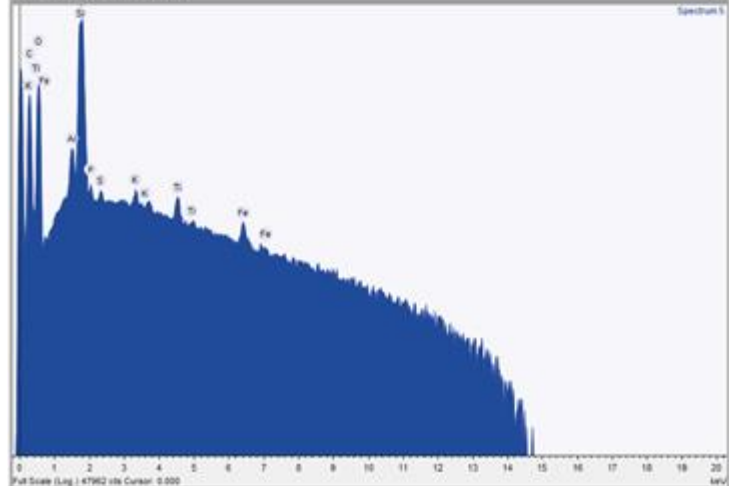
R2-2 0015 2018/04/04 HL D8.9 x6.0k 10 um



Element	Weight %	Weight % σ	Atomic %
Carbon	48.243	0.333	63.567
Oxygen	24.656	0.211	24.390
Aluminum	2.946	0.029	1.728
Silicon	11.205	0.080	6.314
Phosphorus	0.634	0.018	0.324
Sulfur	0.338	0.014	0.167
Potassium	0.400	0.015	0.162
Calcium	0.247	0.015	0.098
Titanium	0.328	0.019	0.108
Chromium	1.841	0.034	0.560
Iron	8.172	0.082	2.316
Nickel	0.990	0.049	0.267



Element	Weight %	Weight % σ	Atomic %
Carbon	48.546	0.301	65.949
Oxygen	21.293	0.186	21.716
Magnesium	0.093	0.012	0.063
Aluminum	0.512	0.014	0.309
Silicon	10.556	0.069	6.133
Phosphorus	0.465	0.016	0.245
Sulfur	0.239	0.013	0.121
Potassium	0.310	0.013	0.130
Calcium	0.221	0.013	0.090
Titanium	0.265	0.017	0.090
Chromium	2.895	0.038	0.908
Manganese	0.263	0.028	0.078
Iron	12.784	0.101	3.735
Nickel	1.557	0.050	0.433



Element	Weight %	Weight % σ	Atomic %
Carbon	41.707	0.382	54.935
Oxygen	29.353	0.245	29.026
Aluminum	0.474	0.017	0.278
Silicon	27.078	0.189	15.253
Phosphorus	0.206	0.021	0.105
Sulfur	0.123	0.018	0.061
Potassium	0.180	0.020	0.073
Titanium	0.444	0.029	0.147
Iron	0.434	0.046	0.123

Chapitre III

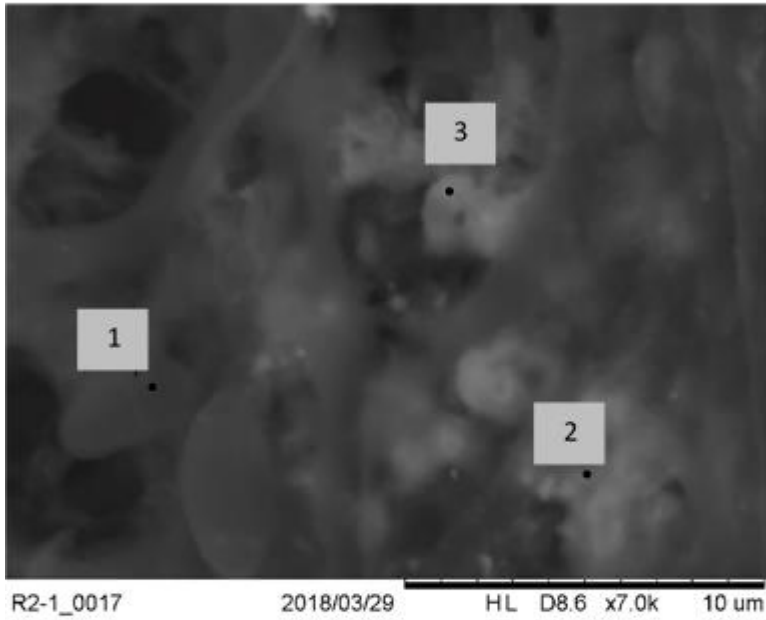
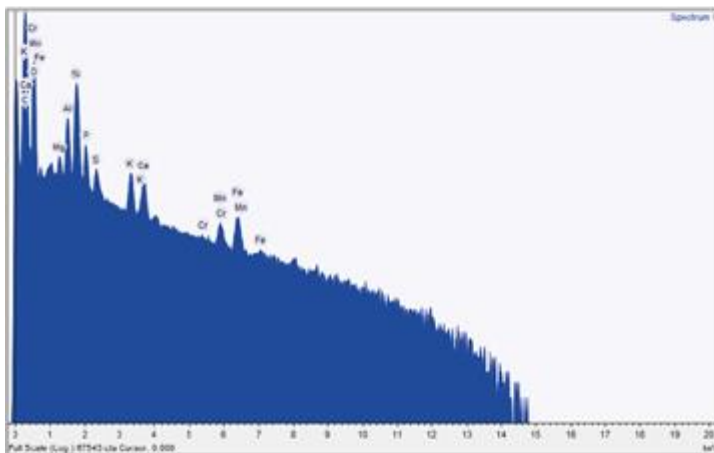
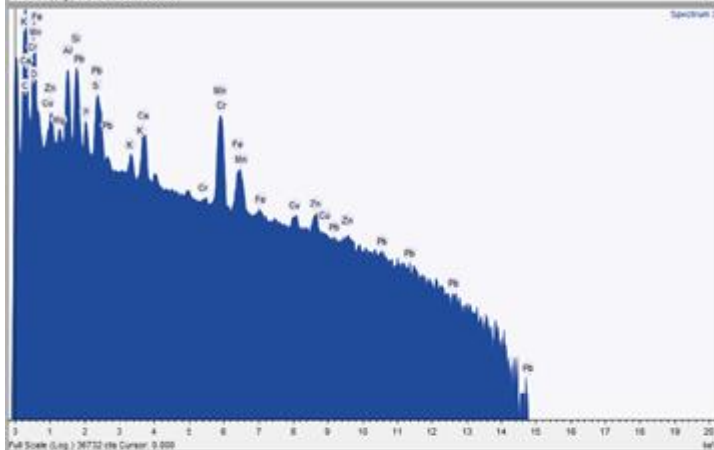


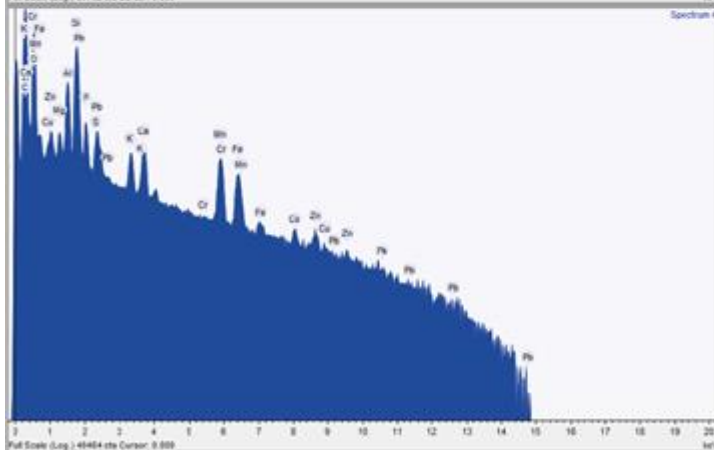
Figure III.17 : Localisation des points d'analyse EDS sur les images d'échantillons biotiques saturés obtenues en microscopie électronique à balayage sur MEB environnemental. Les analyses sont présentées sous forme de spectre et une quantification en poids moléculaire et atomique des éléments identifiés sur les spectres.



Element	Weight %	Weight % σ	Atomic %
Carbon	65.318	0.154	72.741
Oxygen	30.319	0.149	25.349
Magnesium	0.149	0.008	0.082
Aluminum	0.677	0.010	0.336
Silicon	2.117	0.015	1.008
Phosphorus	0.384	0.009	0.166
Sulfur	0.132	0.007	0.055
Potassium	0.247	0.008	0.084
Calcium	0.222	0.008	0.074
Chromium	0.004	0.010	0.001
Manganese	0.141	0.014	0.034
Iron	0.289	0.017	0.069



Element	Weight %	Weight % σ	Atomic %
Carbon	48.774	0.197	60.510
Oxygen	37.876	0.170	35.277
Magnesium	0.165	0.011	0.101
Aluminum	1.642	0.015	0.907
Silicon	1.832	0.016	0.972
Phosphorus	0.393	0.011	0.189
Sulfur	0.221	0.014	0.103
Potassium	0.195	0.010	0.074
Calcium	0.661	0.013	0.246
Chromium	0.026	0.015	0.007
Manganese	3.334	0.036	0.904
Iron	0.518	0.027	0.138
Copper	0.496	0.058	0.116
Zinc	1.137	0.042	0.259
Lead	2.730	0.049	0.196



Element	Weight %	Weight % σ	Atomic %
Carbon	54.536	0.188	64.605
Oxygen	35.285	0.168	31.380
Magnesium	0.219	0.010	0.128
Aluminum	1.281	0.013	0.675
Silicon	3.734	0.023	1.891
Phosphorus	0.510	0.011	0.234
Sulfur	0.191	0.010	0.085
Potassium	0.291	0.009	0.106
Calcium	0.431	0.011	0.153
Chromium	0.003	0.012	0.001
Manganese	1.078	0.023	0.279
Iron	0.794	0.024	0.202
Copper	0.353	0.048	0.079
Zinc	0.616	0.034	0.134
Lead	0.677	0.035	0.047

III.D. Bilan de carbone et activité bactérienne

Des mesures de carbone sur la fraction solide ont été réalisées sur des colonnes en fin d'expérimentation (Tableau III.3). Les valeurs de C total représentent une gamme de valeur entre 0,02 et 0,17 % en masse d'échantillon. La comparaison des échantillons dans leur totalité (fractions fines et grossières confondues) montrent que le plus fort pourcentage de C total est retrouvé dans les échantillons insaturés. Le C inorganique est également retrouvé en plus fort pourcentage dans les échantillons insaturés. La comparaison des pourcentages de C organique et C inorganique dans la fraction de C total des échantillons montre que les valeurs de C organique se situent entre 0,01 et 0,06 %. Les pourcentages de C inorganique sont compris entre 0,01 et 0,07 %. Les variations les plus importantes sont retrouvées pour le C inorganique, sur les fractions grossières des échantillons biotiques insaturées (Tableau III.3). Pour comparer les ratios entre C organique et C inorganique entre les différentes conditions saturées et insaturée des échantillons biotiques en fin d'expérience, les valeurs de C organique et C inorganique sont rapportées à 100 % de la fraction de C totale (Figure III.18). Les valeurs de C organique retrouvées peuvent être témoins de la biomasse microbienne mais également de résidus apportés par l'inoculation des colonnes avec le surnageant issu de la centrifugation. Une première observation des pourcentages met en avant un pourcentage de C inorganique supérieur sur les fractions grossières des échantillons saturés et insaturés. Les fractions fines présentent des pourcentages identiques (Figure III.18a, b).

Tableau III.3 : Valeurs de carbone organiques (%) et inorganiques (%) mesurées sur les fractions granulométrique des sables seche pour les modalité biotiques (satur es et insatur es).

conditions	granulométrie	C total	C organique	C inorganique
sature biotique	total	0,11	0,07	0,04
	G	0,02	0,01	0,01
	F	0,09	0,06	0,03
insature biotique	total	0,17	0,07	0,10
	G	0,08	0,01	0,07
	F	0,09	0,06	0,03

Ces données mettent en avant une augmentation de la fraction inorganique du carbone sur les fractions de sables grossiers. Une diminution significative du carbone organique au profit de

l'inorganique est observée en condition biotique insaturé. Cette augmentation du carbone inorganique pourrait être liée à une minéralisation importante en contexte biologique (cf. Chap IV). La minéralisation semble plus importante en conditions biotiques insaturées qu'en conditions biotiques saturées. Cette variabilité dans la fraction granulométrique la plus grossière apporte également une indication de localisation des processus. On peut donc supposer que les développements bactériens les plus actifs se situent à la transition des deux types de porosité, avec une minéralisation importante du carbone dans la zone de stress hydrique, contrairement aux échantillons saturés. Cette discussion sera reprise dans le chapitre IV avec les résultats d'analyse de la solution de percolation nutritive. Les données des concentrations en carbone organique dissous permettront de compléter les interprétations sur la régulation du système géochimique dans les colonnes. Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, en contexte de sol naturel aéré, la richesse en source de carbone et la respiration bactérienne peuvent être les processus principaux de régulation des paramètres redox et pH. En contexte de sol contaminé, ces processus peuvent être impactés fortement, et la régulation des conditions Eh-pH peut être modifiée.

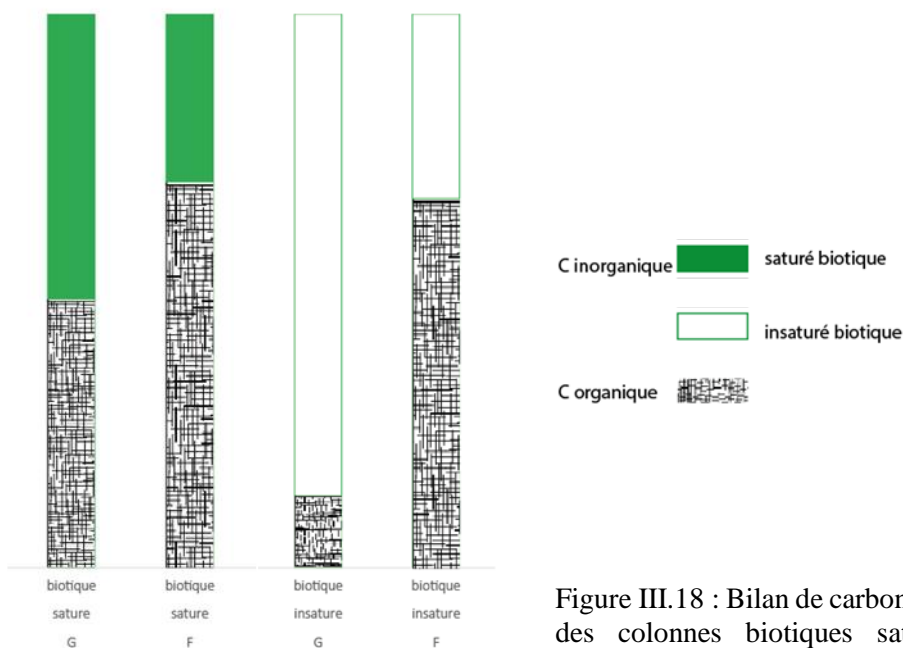


Figure III.18 : Bilan de carbone sur la fraction solide des colonnes biotiques saturées et insaturées. Répartition des valeurs des teneurs en carbone organique et inorganique mesurées sur les sables tamisés en fin d'expérimentation (1 mois) rapportées à 100%. Les données sont présentées par fraction granulométrique, sur les sables fins (F) et grossiers(G).

L'étude du développement de biofilms au sein des milieux poreux sur colonne a permis de mettre en avant une réelle différenciation fonctionnelle des microorganismes développés. Ce fonctionnement est notamment visible avec les observations de morphologie des microorganismes en imagerie MEB. Ces observations ont également mis en avant une différenciation de fonctionnement géochimique du système, avec des précipités en conditions biotiques de morphologie variable et des compositions différentes notamment vis-à-vis des oxydes et des métaux et métalloïdes. Ces observations sont à rapprocher des analyses des éléments en solution et permettront lors de l'étude statistique globale (Chapitre IV) de mieux comprendre les paramètres de régulation du système selon les conditions hydriques et biologiques.

Les observations en micro tomographie n'ont pas permis d'aller aussi loin que souhaité dans la visualisation malgré un paramétrage optimal. Ceci peut s'expliquer par le fait que les biofilms sont issus d'un consortium naturel issu de sol frais et que le banc expérimental n'avait pas pour objectif de créer des conditions visant à amplifier leur développement, le choix ayant été ici de laisser le biofilm se développer dans des conditions proches du milieu naturel, sans amplifier sa croissance. Les images obtenues sont alors différentes des images obtenues dans d'autres travaux. Malgré ceci, les images en 2D et 3D ont permis de mieux comprendre le système et de pouvoir proposer des perspectives et améliorations. Les observations en 3D couplées aux résultats des analyses de carbone sur le milieu poreux en fin d'expérience ont permis de proposer une localisation des activités microbiennes et de discuter les localisations des processus les plus actifs. Les estimations de localisation des biofilms dans les images 3D laissent penser que ce développement se fait dans les zones intermédiaires entre la grande et la petite porosité. Ces observations sont retrouvées dans la littérature avec des localisations de bactéries dans des zones de meso et microporosité pour les bactéries nécessitant une interface avec l'eau (Juyal et al., 2018). Ces observations ont été complétées par les observations effectuées sur le suivi du développement des biofilms observés au sein du milieu poreux sur système micro fluide (cf. Chapitre V). Les estimations de localisation des biofilms dans les images 3D laissent penser que ce développement se fait dans les zones intermédiaires entre la grande et la petite porosité.

De même que pour les écoulements en milieu poreux (Chapitre II), un traitement d'image pour préparer un volume a été initié dans le but de pouvoir tester une modélisation sous OPEN FOAM et permettre d'étudier l'impact des biofilms sur la porosité, leur porosité propre, la connectivité du système et les écoulements, en extrayant des données ponctuelles dans des zones d'intérêt du système. Une nouvelle expérimentation sur banc pourrait permettre de compléter cette modélisation.

Chapitre IV

Composition chimique des percolats et géochimie du système

Chapitre IV Composition chimique des percolats et géochimie du système	119
I. Introduction.....	121
II. Matériel et méthode	122
II.A. Les analyses au cours de l'expérimentation	122
III. Résultats et discussion.....	122
III.A. Les conditions Redox (Eh) –pH	123
III.B. Evolution du carbone organique dissout (COD) dans les percolats	127
III.C. Evolution de la concentration en ions majeurs	130
III.D. Evolution des concentrations et spéciations des métaux et métalloïdes présents dans les percolats	131
III.E. Analyse statistique des données géochimiques mesurées en sortie de colonnes..	134
IV. Conclusion	144

I. Introduction

La visualisation de la localisation des biofilms en conditions saturées biotiques et insaturées biotiques a montré la présence et le développement de deux phénotypes de microorganismes différents et de fait deux fonctionnements biologiques distincts sont supposés être en place dans les deux systèmes, saturés et insaturés.

Les deux conditions de diffusion des nutriments et des gaz en conditions saturées et insaturées, et cela via la répartition des films aqueux dans le milieu poreux bimodal observé, sont susceptibles de mettre en place deux environnements géochimiques différents en terme d'espèces chimiques en solution et de formes de métaux et métalloïdes retrouvées. L'installation des biofilms observés, qui découle de cette hétérogénéité de structure et des différences de fonctionnement qui en résultent, peut être une conséquence de la géochimie des microenvironnements mais pourrait également participer activement au remaniement de ces microsites (ou hotspots).

L'objectif est ici d'étudier la composition chimique de percolats, contenant initialement des métaux et métalloïdes, à l'issue du transfert dans les milieux poreux présents dans les colonnes. La solution de percolation utilisée (cf. Chapitre III) permet de travailler dans des conditions de composition chimique des eaux de percolation naturelles, en particulier pour les éléments métalliques chrome, cuivre et plomb, ainsi que le métalloïde arsenic. Le suivi des espèces chimiques en solution a pour objectif de mieux comprendre les processus en jeu lors de l'expérience associant conditions saturées ou insaturées et biotiques et abiotiques.

II. Matériel et méthode

II.A. Les analyses au cours de l'expérimentation

Le calendrier d'analyse mis en place au cours de l'expérience est présenté chapitre III. Six prélèvements à six pas de temps ont été analysés. Comme vu précédemment, la séquence expérimentale a débuté par 10 jours d'inoculation des systèmes poreux avec l'inoculât de micro-organismes, et ceci en condition saturée. A la suite de ces 10 jours, les colonnes ont été connectées au reste du dispositif expérimental et la circulation de la solution de percolation a débuté par une première phase de stabilisation de 5 jours afin de stabiliser (d'un point de vue hydrodynamique) les conditions hydriques de saturation ou de non saturation présentées dans le chapitre II. Au cours de l'expérience, des analyses chimiques ont été réalisées sur des échantillons de percolats. Ainsi, à chacun des six pas de temps, un volume total de solution de 20 ml a été prélevé puis divisé en quatre volumes de 5 ml filtrés à 0,20 μm et conservé à 4 °C en vue de l'analyse (i) des ions majeurs par chromatographie ionique, (ii) des métaux et métalloïdes par ICP-MS et (iii) du carbone organique dissous (COD) et azote total (NT) grâce à un analyseur élémentaire TOC 5050/SSM5000-A (Shimadzu).

III. Résultats et discussion

Les concentrations totales en ions majeurs, en métaux, en COD et NT aux six pas de temps de prélèvements sont présentées en Annexe 1. L'ensemble des valeurs permet d'observer les évolutions temporelles de chaque élément au cours du temps pour chaque condition expérimentale.

Les valeurs moyennes pour les pas de temps T3 à T6 (après stabilisation du système) pour chacune des quatre conditions expérimentales ont permis de comparer les quatre environnements créés au cours de l'expérimentation pour comprendre l'influence de l'activité microbiologique dans le système poreux. Ces données permettent de décrire le comportement des quatre dispositifs poreux : saturé et biotique, saturé et abiotique, insaturé et biotique et insaturé et abiotique mettant en avant quatre fonctionnements distincts et une activité microbienne marquée, responsable de modifications géochimiques importantes notamment vis-à-vis des conditions Eh, pH et des spéciations des métaux et métalloïdes.

III.A. Les conditions Redox (Eh) –pH

Le suivi des conditions pH et Eh dans les dispositifs expérimentaux a permis de comparer leur évolution en fonction des conditions hydriques et biologiques. Les gammes de valeurs d'Eh retrouvées dans les conditions de l'expérience sont comprises entre 200 et 400 mV, avec des valeurs entre 350 et 400 mV en conditions saturées et des valeurs comprises entre 200 et 350 mV en conditions insaturées. Les quatre conditions se détachent des valeurs de pH et redox du point de mesure à T0, caractérisant la solution au début de la percolation au travers des colonnes. La solution à T0 est définie par un potentiel redox de 295 mV et un pH =7. Les résultats mettent en évidence de façon surprenante des conditions plus oxydantes avec une augmentation d'Eh en conditions saturées par rapport aux conditions insaturées. La présence de microorganismes semble augmenter le potentiel Eh en conditions insaturées (Figure IV.1).

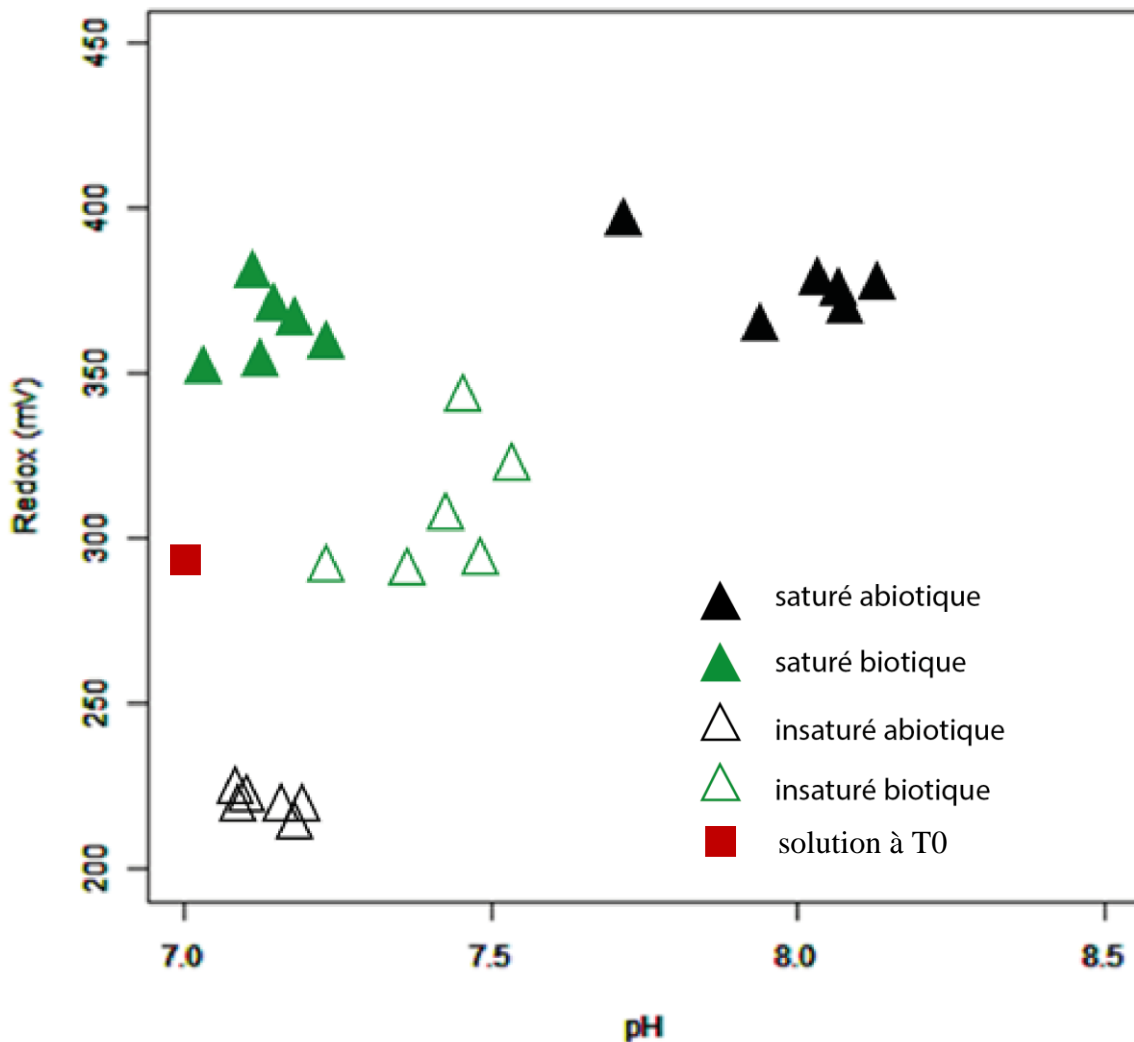


Figure IV.1 : Données de suivi redox et pH des quatre colonnes au cours de l'expérimentation menée à 25°C et représentation des domaines redox et pH identifiés par modalités hydriques (saturé insaturé) et biologique (biotique, abiotique).

L'augmentation de la teneur en eau dans un sol conduit généralement à une diminution du potentiel Eh, par diminution de la diffusion du dioxygène. Ce phénomène peut également être catalysé par la présence de microorganismes qui consomment plus rapidement le dioxygène (Savant et Ellis, 1964 in Husson, 2013). Le système peut évoluer alors vers un état anaérobie si la concentration en matière organique est suffisante pour consommer l'oxygène plus rapidement qu'il diffuse dans l'eau porale. Cette respiration microbienne participe en conditions oxiques à la dégradation de la matière organique présente comme source de nutriments pour le développement bactérien. Le dioxygène est le principal oxydant de la matière organique dans des milieux bien aérés. Aucune diminution du potentiel redox n'est observée en conditions biotiques par rapport aux conditions abiotiques, ni au cours du temps en conditions abiotiques ou biotiques. La respiration couplée à la dégradation de matière organique en conditions saturées biotiques ne semble donc pas être le processus d'oxydation majeur de notre système. L'oxygène serait donc toujours disponible et non limitant, au moins à l'échelle globale de la colonne (la présence de microenvironnements ne peut pas être exclue). Dans les gammes de valeurs d'Eh mesurées, le fer et le manganèse pourraient alors jouer un rôle prépondérant dans la régulation géochimique du système comme source d'électrons principaux et également dans le contrôle de la valeur de Eh, qui serait liée aux rapports Fe(II)/Fe(III) et/ou Mn(II)/Mn(IV) en solution. Les percolats présentent des concentrations non négligeables en Fe et Mn total.. Le stade anaérobie n'étant jamais atteint, au vu du potentiel redox, toujours positif dans le système, même dans les conditions saturées en fin d'expérience. Aucune accumulation de matière organique dissoute n'est observée. Tous ces indices semblent montrer qu'une autre source d'électrons régule le système, ce qui conduit à l'augmentation de la valeur de Eh en conditions biotiques, et d'autant plus en conditions biotiques avec augmentation de l'humidité du sol. L'augmentation de pH vers des valeurs de 8 en condition saturées abiotiques peut entraîner une oxydation abiotique importante du Fe, augmentant le redox. En conditions saturées biotiques en revanche, à pH plus bas (environ 7), le potentiel redox reste dans les mêmes gammes de valeurs qu'en conditions saturées abiotiques. On peut supposer que cette régulation passe par une action directe des bactéries sur le Fe et le Mn. Si le Fe(II) peut être oxydé sans bactéries aux valeurs de pH de l'expérience, des bactéries sont connues pour contribuer à cette réaction par bio-catalyse (*Leptothrix*, *Gallionella* en particulier). Dans le cas du manganèse dans les conditions Eh-pH de l'expérience, l'oxydation de Mn(II) n'a pu être réalisée que dans les conditions biotiques.

Les concentrations en fer total en solution sont constantes au cours de l'expérimentation, mais cela ne signifie pas que sa spéciation ne soit pas modifiée (Figure IV.2). Les concentrations en manganèse total en solution présentent une diminution au cours de l'expérimentation (Figure IV.2), et ceci d'autant plus en conditions saturées. Notons que le système est contraint par une alimentation et une circulation permanente, la diminution des concentrations pourrait donc indiquer une précipitation du manganèse, d'autant plus forte en conditions biotiques par rapport aux conditions abiotiques. Si l'on reprend les données d'observation MEB-EDS, on constate que d'importants précipités de manganèse sont présents dans les échantillons insaturés biotiques. Les échantillons abiotiques ne présentent aucun précipité de manganèse ou fer (cf. chapitre III). Les précipités retrouvés en conditions biotiques sont présents au contact ou enchevêtrés dans les biofilms. Ceci permet d'émettre l'hypothèse d'un rôle important des biofilms dans le système quant au changement de spéciation de fer et Mn. Les interactions entre les biofilms, le fer et manganèse semblent être un processus important au sein des colonnes. Cette hypothèse est appuyée par les observations des images MEB, permettant de distinguer deux phénotypes de biofilms différents entre les deux conditions hydriques et donc deux fonctionnements différents d'un point de vue biogéochimique.

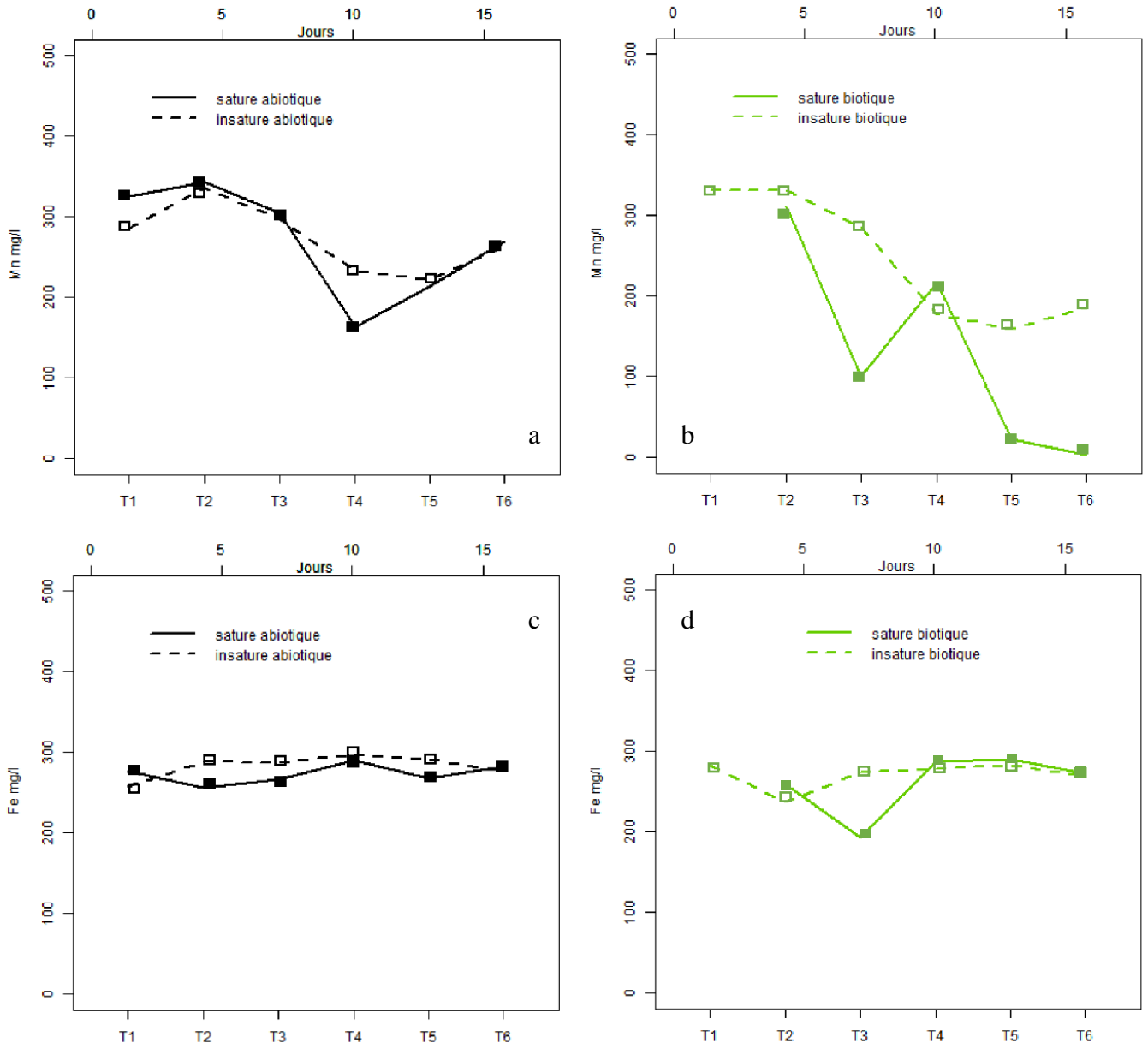


Figure IV.2 : Evolution temporelle des concentrations en fer et manganèse au cours de l'expérience en $\mu\text{g.l}^{-1}$.

III.B. Evolution du carbone organique dissout (COD) dans les percolats

L'ensemble des apports en matière organique du système expérimental est contenu dans la fraction dissoute et apportée par la solution de sol en entrée du système expérimental. Les concentrations en carbone dissout (COD) sont présentées en (Annexe 1). Les concentrations en COD des expériences (Tableau IV.1) en conditions biotiques sont similaires aux concentrations observées dans des eaux de surface ou des eaux de transitions entre la surface et les eaux souterraines (Figure IV.3). L'évolution temporelle des concentrations est présentée en Annexe 2.

Tableau IV.1 : Valeurs des concentrations en COD (carbone organique dissout) obtenues sur les échantillons de recharge en entrée d'expérimentation et moyennes des concentrations des percolats prélevés en sortie de colonne en mg.l⁻¹.

condition expérimentales	lixiviations
	COD
recharge 1	10,295
recharge 2	14,9
recharge 3	3,0935
recharge 4	15,15
sature abiotique	571,91
sature biotique	6,91
insature abiotique	629,83
insature biotique	8,69

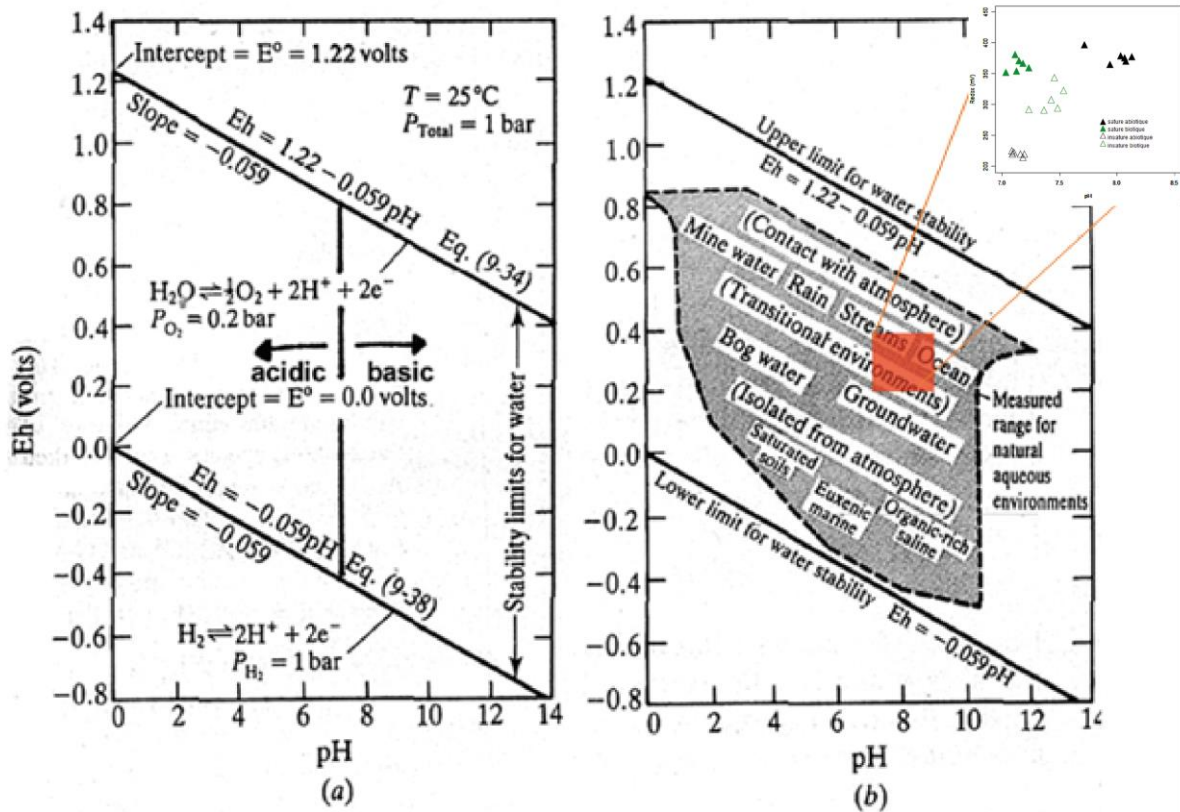


Figure IV.3 : Diagrammes pH-redox : domaines de stabilité de l'eau (a) et domaines caractéristiques des signatures des différentes eaux de surface et profondeur (b). En rouge les conditions redox-pH des expérimentations en laboratoire (Motelica, Université d'Orléans).

Si l'on compare les concentrations moyennes pour chaque modalité expérimentale (Tableau IV.1), on retrouve des concentrations très supérieures en conditions abiotiques comparées à ce qu'elles sont en conditions biotiques. Cette différence s'explique par la présence de formaldéhyde en milieu abiotique afin de limiter le développement microbien. Si l'on compare les valeurs pour les deux conditions biotiques, les concentrations en COD des conditions insaturées biotiques sont supérieures à celles des conditions saturées biotiques avec 8,69 contre 6,91 mg.l⁻¹.

En condition aérobie dans les colonnes, l'oxydation du COD résulte (i) d'une oxydation via l'O₂ présent dans le milieu, (ii) d'une respiration et donc d'une activité des microorganismes du milieu. Dans certaines conditions le COD peut être le facteur limitant de croissance des bactéries. Dans notre système, la question se pose vis-à-vis des concentrations en COD qui pourrait être limitantes dans le fonctionnement chimique et biologique des colonnes. Au vu des concentrations en COD, en fer et manganèse, les apports en COD ne semblent pas réguler le système géochimique.

Ces considérations seront discutées (cf. III.E) en confrontant les données géochimiques en éléments (ions, métaux, métalloïdes) présents dans les colonnes. Ceci permettra d'apporter des éléments de réponse quant à la hiérarchisation des processus biologiques, et leur éventuel rôle moteur dans les évolutions géochimiques enregistrées.

Les données de domaines de potentiel redox et pH ont permis d'identifier les formes potentiellement présentes en solution pour les éléments mesurés, dans un état d'équilibre. On peut ainsi estimer l'une des espèces carbonées retrouvées en solution dans le milieu (bicarbonates HCO₃⁻) (Figure IV.4). Ceci reste très indicatif au vu des molécules organiques complexes constituant la matière organique dont la dégradation est dépendante de l'activité bactérienne. De plus, toutes les molécules organiques apportées dans le sol ne sont pas

dégradables. Certaines molécules complexes, ou aromatiques ou encore les acides humiques ne sont pas ou peu dégradées par la microflore des sols.

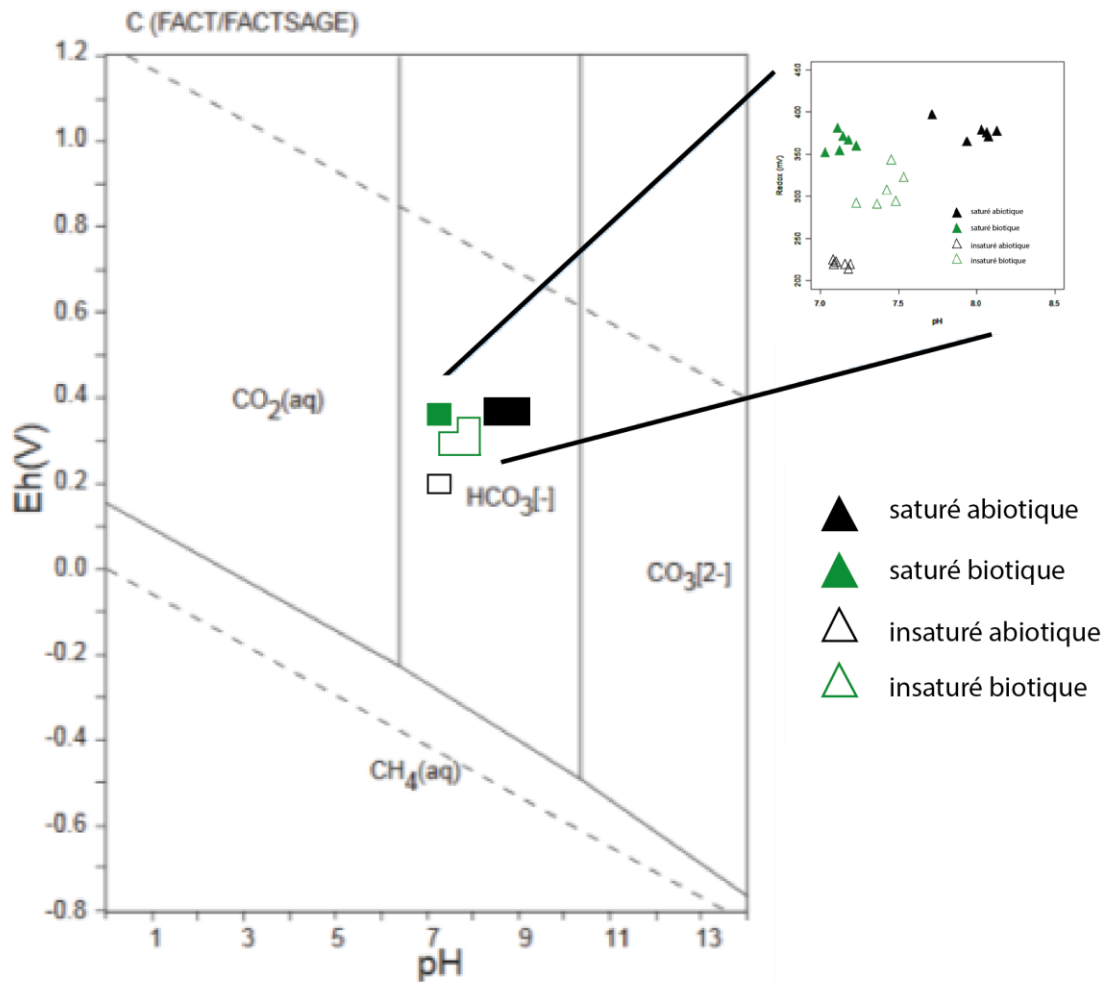


Figure IV.4 : Projection des conditions Eh-pH expérimentales des colonnes sur le diagramme de stabilité du carbone en solution, à 25°C, d'après Takeno, 2005.

III.C. Evolution de la concentration en ions majeurs

Il y a peu de différence concernant l'évolution des concentrations en ions majeurs au cours du temps (Annexe 2) et entre les différentes modalités étudiées (Annexe 1). Certaines augmentations ou diminution en début d'expérimentation peuvent être attribuées à une valeur élevée de recharge ou un point de mesure aberrant, mais en règle générale, les valeurs ont tendance à se stabiliser en fin d'expérience. L'évolution temporelle des concentrations est présentée en Annexe 3.

La comparaison des valeurs moyennes sur les pas de temps T3 à T6 (Tableau IV.2) présentent des variations non significatives, avec une augmentation pour les nitrates en solution en condition abiotique (saturé et insaturé), de même pour les ions Na⁺ et K⁺.

Tableau IV.2: Moyennes des concentrations en ions majeurs (mg.l⁻¹) en solution dans les échantillons de sortie de colonnes expérimentales. Seuls les ions mesurés sont présentés, les ions NH₄⁺ et NO₂⁻ n'ont pas pu être mesurés.

colonne	caracteristique hydrique	caracteristique biologique	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ²⁻	Na ⁺	K ⁺
1	sature	abiotique	9,07	4,14	5,25	0,49	3,27	3,17
2	sature	biotique	9,03	3,00	5,01	0,76	3,61	6,50
3	insature	abiotique	6,45	3,65	3,79	0,41	3,39	6,47
4	insature	biotique	9,03	2,73	5,03	0,17	4,10	7,01

III.D. Evolution des concentrations et spéciations des métaux et métalloïdes présents dans les percolats

III.D.1 Concentration des métaux et métalloïdes présents dans les percolats

L'évolution temporelle des concentrations et les concentrations brutes sont présentées en Annexe 4 et Annexe 1. Les concentrations moyennes par modalité expérimentale (Tableau IV.3) représentent les moyennes des concentrations totales en métaux, dosées en solution sur échantillons filtrés à 0,22 µm. Le postulat est fait que les formes particulières représentent un faible pourcentage de ces valeurs, mais que les concentrations peuvent représenter la somme des espèces dissoutes et colloïdales. Les éléments présentent des concentrations de 3,7 à 14,1 µg.l⁻¹ pour le chrome (Cr), de 4,1 à 342,8 µg.l⁻¹ pour le manganèse (Mn), de 192,8 à 297,6 µg.l⁻¹ pour le fer (Fe), de 13,7 à 65,9 µg.l⁻¹ pour le cuivre (Cu), de 2,4 à 4 µg.l⁻¹ pour l'arsenic (As) et de 1,4 à 19,3 µg.l⁻¹ pour le plomb (Pb). Les éléments les plus présents sont par conséquent le manganèse (Mn) et le fer (Fe).

Si l'on observe les concentrations moyennées (Tableau IV.3) en fin d'expérience, les conditions biotiques et abiotiques se distinguent clairement par les valeurs des concentrations en métaux et métalloïdes totales. On observe ainsi une augmentation de la concentration totale moyenne en chrome en solution, avec 9 µg.l⁻¹ en conditions saturées biotiques et 9 µg.l⁻¹ en conditions insaturées biotiques, contre 8 et 5 µg.l⁻¹ en conditions saturées abiotiques et insaturées abiotiques.

Tableau IV.3: Moyennes des concentrations totales en métaux et métalloïdes ($\mu\text{g.l}^{-1}$) en solution dans les échantillons en sortie de colonnes, mesurées sur des échantillons filtrés à $0,22 \mu\text{m}$.

colonne	caractéristique hydrique	caractéristique biologique	Cr	Mn	Fe	Cu	As	Pb
1	sature	abiotique	7,82	237,97	276,73	45,18	3,03	13,72
2	sature	biotique	8,99	85,78	260,43	35,70	2,75	6,28
3	insature	abiotique	5,35	254,00	288,46	35,39	3,20	15,51
4	insature	biotique	8,56	201,96	275,88	40,25	2,70	8,40

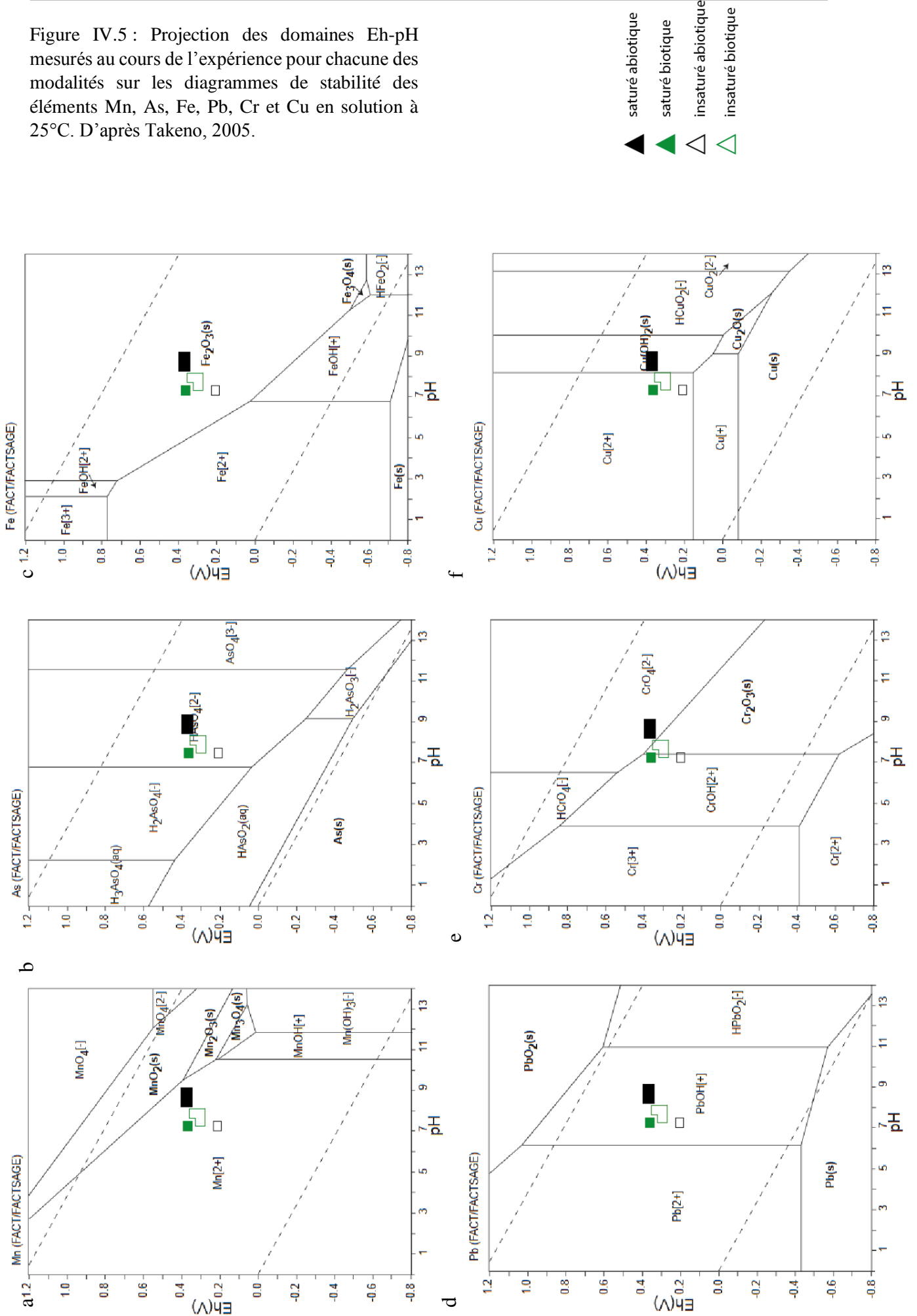
Les valeurs enregistrées pour le manganèse présentent une tendance inverse à celle observée pour les concentrations moyennées de chrome, avec 238 et $254 \mu\text{g.l}^{-1}$ en conditions respectivement « saturées abiotiques » et « insaturées abiotiques » contre 86 et $202 \mu\text{g.l}^{-1}$ en conditions respectivement « saturées biotiques » et « insaturées biotiques ». Les concentrations en fer sont également plus importantes en conditions abiotiques avec des concentrations de 277 et $288 \mu\text{g.l}^{-1}$ contre 260 et $276 \mu\text{g.l}^{-1}$ en conditions biotiques. Les différences de concentration en fer sont toutefois moins marquées que pour le manganèse. Les concentrations en arsenic présentent peu de variabilité avec des concentrations de en conditions biotiques et en conditions abiotiques. Les concentrations totales moyennes en plomb présentent des concentrations moyennes plus élevées en conditions abiotiques, avec $14 \mu\text{g.l}^{-1}$ en conditions « saturées abiotiques » et $15 \mu\text{g.l}^{-1}$ en conditions « insaturées abiotiques », contre $6 \mu\text{g.l}^{-1}$ et $8, \mu\text{g.l}^{-1}$ en conditions biotiques saturées et insaturées.

Les quatre conditions expérimentales conduisent par conséquent à des percolats aux concentrations différentes en métaux et métalloïdes. Les concentrations en plomb, manganèse, fer et arsenic en solution sont plus faibles en conditions biotiques qu'en conditions biotiques. Ces concentrations sont d'autant plus faibles que l'on est en conditions saturées. A l'inverse, les concentrations en chrome en solution sont plus élevées en conditions biotiques qu'en conditions abiotiques, et cela de façon encore plus marquée lorsque l'on va vers des conditions saturées.

III.D.2. Spéciation des métaux et métalloïdes présents dans les percolats

Les degrés d'oxydation, et donc la forme des éléments métalliques présents en solution, sont approchés en reportant les données de redox et de pH mesurées aux pas de temps de prélèvement lors de l'expérience sur les diagrammes de stabilité des éléments dans l'eau à 25°C (Figure IV.5). Ces informations nous permettront de discuter des formes présentes en solution de chacun des éléments et leur rôle dans les variabilités de conditions biogéochimiques.

Figure IV.5 : Projection des domaines Eh-pH mesurés au cours de l'expérience pour chacune des modalités sur les diagrammes de stabilité des éléments Mn, As, Fe, Pb, Cr et Cu en solution à 25°C. D'après Takeno, 2005.



Les diagrammes Eh-pH représentent les domaines d'existence ou de prédominance des différentes formes d'un élément considéré (complexe, précipité, ion, métal) de stabilité pour l'élément considéré lorsque l'équilibre thermodynamique est atteint. Le diagramme n'apporte aucune donnée sur les cinétiques de réactions. De plus ces diagrammes ne tiennent pas compte des formes d'oxydes ou d'ions simples. Les projections des valeurs aux pas de temps de prélèvement permettent donc simplement d'estimer la probabilité d'existence d'une forme chimique de l'élément considéré. Les projections sur les diagrammes de stabilité de chacun des éléments (Figure IV.5) dans les conditions de pH et Eh de l'expérience permettent d'estimer la forme de l'élément considéré. Le manganèse est présent sous forme soluble Mn^{2+} dans des conditions à la limite des oxydes de manganèse précipités MnO_2 (Figure IV.5.a). On retrouve des formes majoritairement solubles pour l'arsenic avec l'arsenate $HAsO_4^{2-}$ (Figure IV.5b). Le fer est lui représenté par des formes solides précipitées d'oxyde de fer Fe_2O_3 . (Figure IV.5c). Le plomb est lui aussi retrouvé sous forme majoritairement soluble avec l'hydroxyde de plomb $Pb(OH)^+$ (Figure IV.5.d). Le chrome est présent également sous plusieurs formes, autour des frontières de stabilité. On retrouve ici des formes dissoutes $Cr(OH)^{2+}$ et CrO_4^{2-} ainsi que des formes précipitées Cr_2O_3 (Figure IV.5.e).

Le cuivre est présent sous plusieurs formes, solubles et précipitées avec le Cu^{2+} et $Cu(OH)_2$ (Figure IV.5.f).

III.E. Analyse statistique des données géochimiques mesurées en sortie de colonnes

L'analyse en composantes principales (ACP) des données différencie également les quatre modalités expérimentales étudiées. Cette analyse permet en effet d'observer les corrélations entre paramètres et les différences entre les modalités expérimentales. La distribution des échantillons sur le plan factoriel (Figure IV.6) permet d'identifier les axes F1 (expliquant 48,91 % de la variabilité totale) et F2 (expliquant 36,04 % de la variabilité totale) qui définissent un pôle biotique et un pôle abiotique sur l'axe F1. On retrouve en effet les échantillons biotiques sur la gauche du graphique et les échantillons abiotiques sur la droite du graphique. On définit également un pôle insaturé en bas de graphique et saturé en haut du graphique identifiant l'axe F2 comme corrélé à un gradient de saturation en eau des colonnes (Figure IV.6).

Plusieurs variables sont représentées en variables supplémentaires : les concentrations en COD, pour ne pas biaiser le rôle des concentrations en COD des échantillons abiotiques

(formaldéhyde), les concentrations en carbone total (CT), carbone inorganique (Cinorg), et carbone organique (Corg) issues des analyses sur solide, le temps de séjour et la teneur en eau.

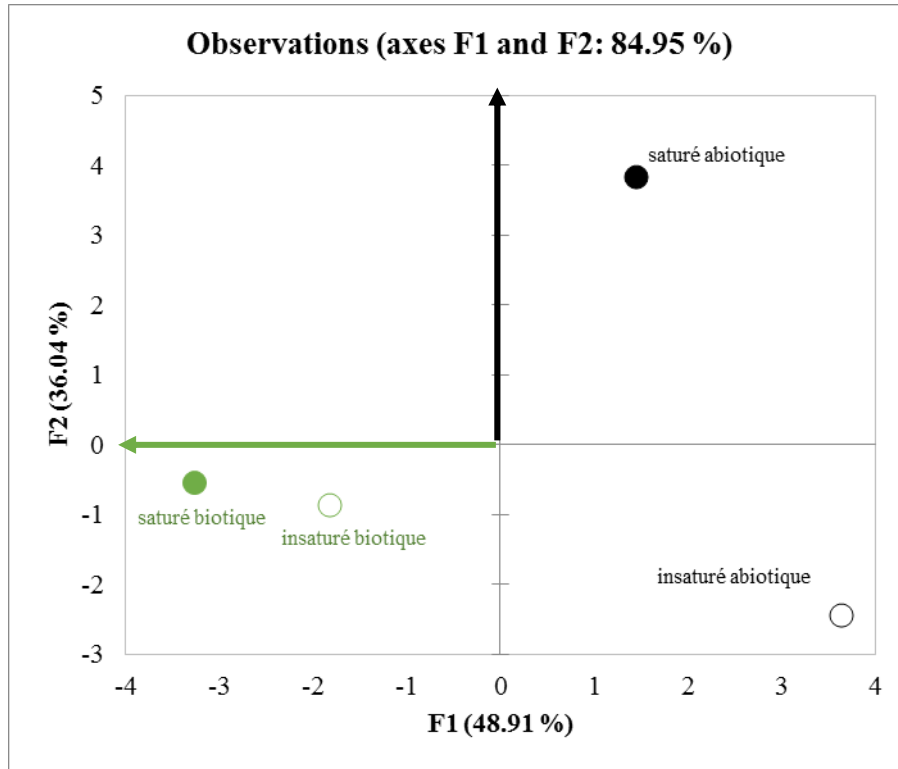


Figure IV.6 : Projection des corrélations des quatre groupes de données sur les axes F1 et F2 expliquant 84,95 % de la variabilité des données. Réalisé sur les données moyennées sur les pas de temps T3 à T6 (après stabilisation des conditions). En vert, la flèche définissant le domaine biotique et en noir la flèche définissant la variabilité de teneur en eau vers le milieu saturé.

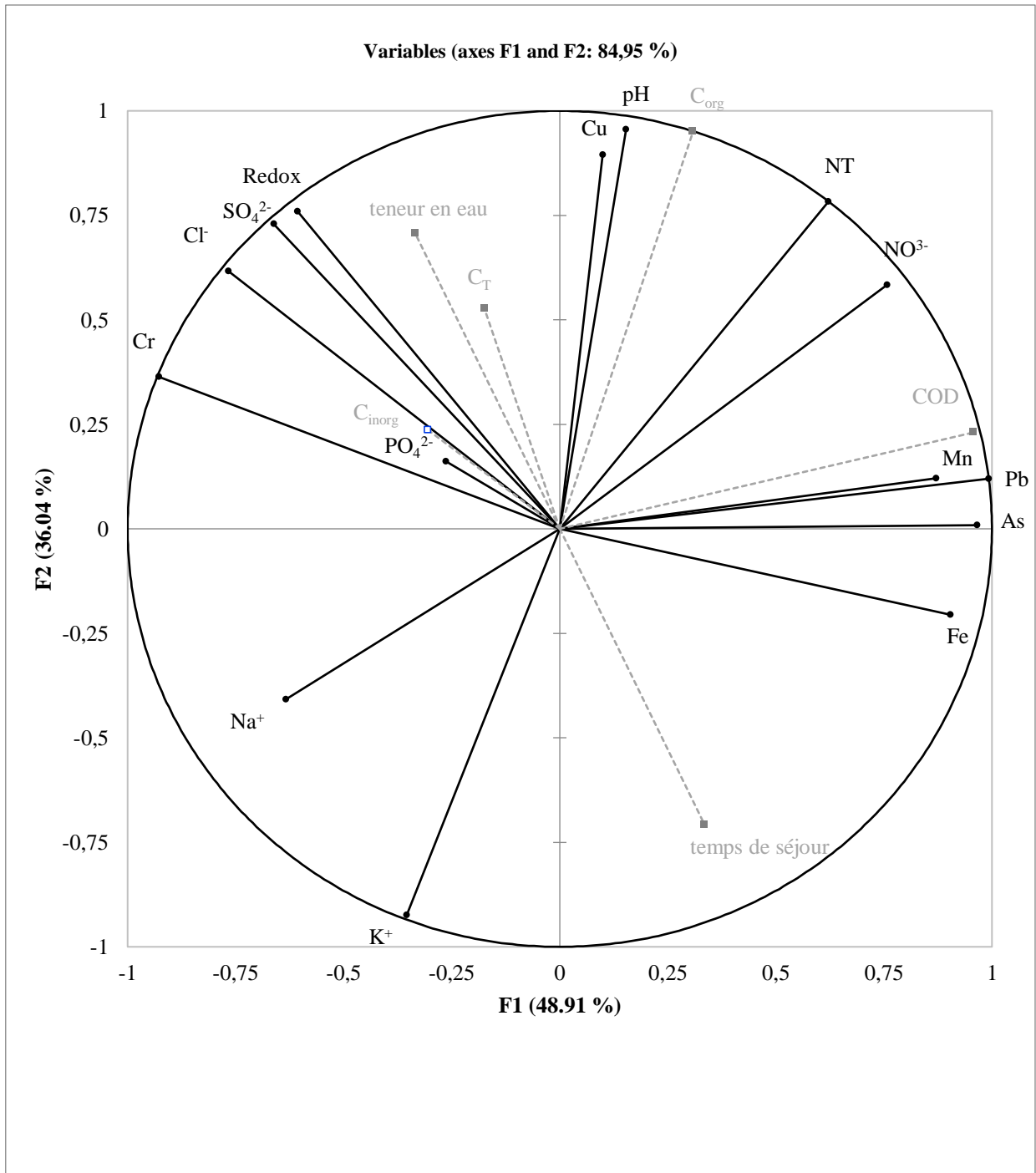
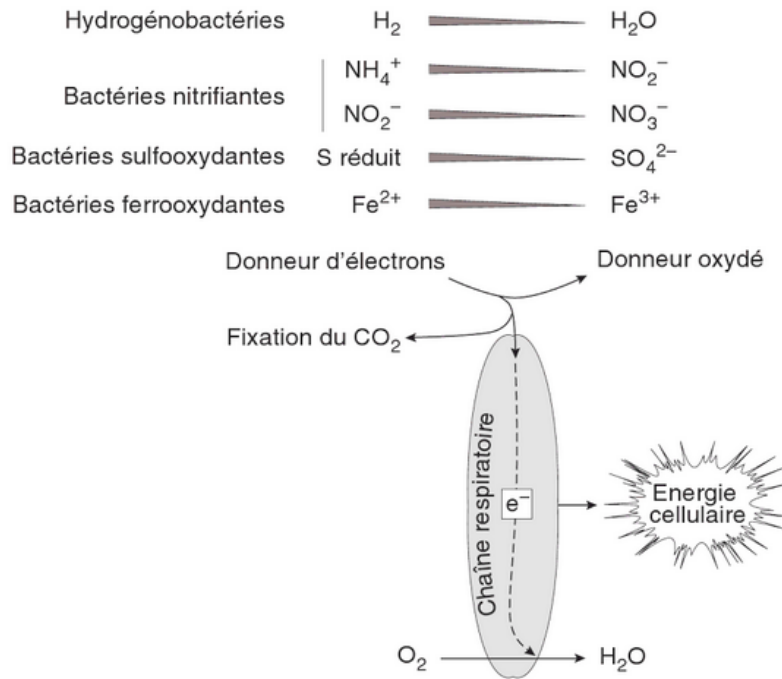


Figure IV.7 : Analyse en composante principale (ACP) des données expérimentales moyennées par colonne sur les variables stabilisées à partir de T3 au cours de l'expérimentation, pour chacune des quatre conditions expérimentales. Les axes F1 et F2 expliquent 84,95% de la variabilité des données. Les données quantitatives sont présentées en trait plein noir et les données supplémentaires qualitatives sont présentées en pointillées gris.

L'observation des résultats de l'ACP (Figure IV.7) traduit la forte diminution des espèces dissoutes Mn, Pb, As et Fe en conditions biotiques, et ce d'autant plus en conditions insaturées. Les variables de potentiel redox, teneur en eau, pH et temps de séjour confirment l'identification d'un axe biotique et d'un axe de teneur en eau : les redox les plus importants sont mesurés en conditions saturées biotiques (teneurs en eau les plus importantes) ; le pH est plus élevé en conditions saturées abiotiques.

L'augmentation du potentiel redox est anti-corrélé avec les concentrations en Fe et Mn qui sont maximales sur la partie droite de l'ACP selon l'axe F1. Ceci est en accord avec le contrôle du potentiel redox par les donneurs d'électrons manganèse et fer, comme suggéré précédemment. Les modalités biotiques présentent un potentiel redox plus élevé, témoin d'un processus de régulation du redox par la création d'espèces oxydées de Fe (FeIII) et Mn (MnIV), indépendant de la simple consommation d'O₂ lors de la dégradation de la matière organique. La forte corrélation des concentrations dissoutes en manganèse, fer plomb et arsenic avec l'axe F1 expliquant la variabilité du système met en évidence l'activité microbienne importante au niveau des cycles de Fe (Miot et al., 2014) et Mn. Cette variabilité du fer pourrait être expliquée par l'activité bactérienne utilisant comme donneurs d'électrons le fer (Figure IV.8) et le manganèse. L'oxydation de la forme utilisée comme source d'électron par les bactéries entraîne une transformation du fer et manganèse en solution évoluant vers des formes de précipités oxydés, se traduisant par une diminution importante en solution, surtout pour le manganèse en solution ; les concentrations de Fe et Mn sont alors minimales sur la partie gauche de l'ACP. Le Fe et le Mn sont, de plus, présents en forte concentration en solution et constituent des couples redox forts.



FigureIV. 8: Diagramme simplifié de la chimiolithotrophie aérobie.

Le fer et le manganèse ont beaucoup été étudiés quant à la stabilisation des ETM, pour la remédiation des sols pollués par l'ajouts d'oxyhydroxydes de fer, sous forme d'amendements variés (Kumpiene et al., 2009, 2008). De nombreuses études ont été menées sur sites pollués par le chrome, le cuivre et l'arsenic (CCA) dans le cadre des contaminations des sols après traitement du bois.

Le manganèse présente un domaine de stabilité sous forme soluble important et nécessite une augmentation importante du potentiel Eh et la catalyse par des micro-organismes (Mariner *et al.*, 2008) pour précipiter sous formes d'oxydes. La présence importante d'oxydes de manganèse observée sur les images MEB en contexte biotique renforce l'hypothèse de l'interaction forte entre les biofilms et le manganèse, responsable des variations redox dans les colonnes.

Ces différents travaux montrent des comportements similaires retrouvés dans plusieurs contextes pour chacun des éléments. L'arsenic et le plomb peuvent être précipités et/ou adsorbés en présence de fer. Dans les colonnes, on peut donc penser que les réactions biologiques de transformation du fer et du manganèse vers des formes oxydées provoquent la

co-précipitation ou l'adsorption de l'arsenic et du plomb qui se retrouvent sous forme d'oxydes, comme le suggèrent les observations en microscopie et les spectres obtenus par mesure EDS sur les observations MEB. Ces observations sont cohérentes, dans les gammes de pH et redox mesurées, avec les formes estimées en solution. Le plomb peut également être précipité avec des carbonates (Dong et al., 2000). Si peu de calcium est mesuré dans le système, l'analyse du carbone inorganique associé à la fraction solide des échantillons, anti-corrélé avec le plomb, soutiendrait cette hypothèse. Cependant, ce processus, au vu des fortes concentrations du système en fer et manganèse ne représente peut-être qu'un phénomène mineur d'immobilisation du plomb par rapport à la co-précipitation avec le fer et le manganèse.

Le chrome et le cuivre présentent quant à eux des comportements différents. Les espèces du chrome les plus toxiques Cr(VI) retrouvées dans l'environnement sont généralement apportées par les activités anthropiques. Ces apports le plus souvent sous forme de Cr(VI) sont rapidement réduites en Cr(III) et immobilisées (Kumpiene et al., 2009) par complexation à la matière organique, souvent substitué aux ions SO_4^{2-} . Dans les colonnes, du chrome en solution est retrouvé majoritairement en conditions biotiques saturées ainsi que les ions SO_4^{2-} , PO_4^{2-} , Cl^- . Les gammes de potentiel redox Eh et la valeur de pH indiquent que le chrome est présent en solution sous des formes variables à la limite de stabilité entre les formes dissoutes et solides (Figure 8). Il est également anti-corrélé au carbone organique dissous et corrélé aux proportions de carbone inorganique. Ceci semble montrer que le chrome dans les colonnes biotiques saturées est relargué avec les ions en solution après oxydation de la matière organique. Ici le chrome serait retrouvé en solution sous sa forme oxydée la plus toxique Cr(VI), les bactéries pouvant y contribuer indirectement par la production d'oxydes de manganèse. En effet, il est connu que le Cr(III) peut être oxydé chimiquement par le Mn(IV) (Eary et al., 1987).

Le cuivre présente un comportement également différent des métaux et métalloïdes comme retrouvé dans la littérature. Les amendements sont d'ailleurs pour la plupart inefficaces sur l'immobilisation du cuivre (Kabata-Pendias and Pendias, 1986) et la mobilité du cuivre semble dépendante de la matière organique dissoute, avec une augmentation de cette mobilité par complexation aux acides humiques. La spéciation du cuivre est également fortement dépendante du pH (Kumpiene et al., 2009, 2008). Ces résultats sont retrouvés dans les colonnes avec des concentrations en cuivre fortement corrélées aux valeurs de pH et non corrélées aux concentrations de fer et manganèse en solution.

Les concentrations en carbone sont maximales en conditions abiotiques, sur la droite de l'ACP. Ceci indique que le COD est consommé ou dégradé en conditions biotiques. Les teneurs en carbone organique associées au solide sont maximales en conditions abiotiques. Le carbone inorganique associé au solide est lui maximal en conditions biotiques. Cette représentation suggère donc que le carbone organique associé au solide resterait plus sous forme organique en conditions abiotiques et serait converti en carbone inorganique (carbonates) en présence de bactéries, pouvant ainsi piéger des métaux comme le plomb, par co-précipitation, comme vu précédemment. Les spectres obtenus sur les échantillons par EDS identifiant du plomb sur les biofilms et les phases associées montrent un pic de calcium. Les quelques valeurs de calcium mesurées en solution, bien que faibles (30 mg.l^{-1}), peuvent indiquer qu'une adsorption du plomb est possible. Les données hydriques montrent bien les valeurs de saturation maximales en conditions saturées. Elles sont anti-corrélées au paramètre de temps de séjour dans les colonnes. Les valeurs sont maximales en conditions saturées biotiques. Ceci peut mettre en évidence une différence due au maintien des conditions hydriques avec une teneur en eau inférieure en condition abiotique, ou traduire la capacité du biofilm à maintenir une condition hydrique légèrement supérieure dans les colonnes. Cette répartition sur l'ACP pourrait indiquer que les processus de dégradation de la matière organique se font plus rapidement dans les colonnes saturées, peut être sous l'effet de l'élévation de potentiel redox, qui permet une activité plus importante de la biomasse microbienne (Husson, 2013). Plusieurs auteurs montrent également l'impact de la dessiccation partielle ou de la distribution des biofilms selon l'humidité des sols. On peut donc supposer qu'en condition saturées le développement de biomasse globale est plus élevé. Plusieurs auteurs montrent en effet les vitesses de colonisation plus importantes avec l'augmentation de l'humidité des sols (Or et al., 2007).

La distribution des modalités expérimentales sur le plan factoriel ne distingue pas de façon significative les deux modalités biologiques, saturées et insaturée. Ceci peut être expliqué par l'évolution de l'activité biologique au cours du temps. Les chroniques de suivi d'expériences montrent une stabilisation des concentrations des différents éléments, pouvant indiquer une stabilisation du système. En 2010, De Angelis et al, montrent que l'activité des communautés microbiennes, influencée par le potentiel redox du milieu, peut être modifiée sans changement de composition de la communauté. Les observations en microscopie électronique à balayage mettent en évidence deux phénotypes de microorganismes différents qui pourraient indiquer que les conditions de l'expérience ont permis d'établir deux conditions biologiques bien

distinctes. Les deux modalités biotiques saturées et insaturées en parallèles ont donc permis l'installation de biofilms morphologiquement distincts dans des conditions hydrogéochimiques distinctes, responsables de la régulation du potentiel redox par leur activité d'oxydation du fer et du manganèse. Les communautés microbiennes sont donc en partie responsables des changements géochimiques de leur environnement.

Une approche méta-génomique sur de l'ADN extrait des fixations de microorganismes permettrait de donner une information sur le fonctionnement des biofilms des colonnes. Les extractions d'ADN initiées sur les échantillons n'ont pas permis d'extraire assez de matériel pour ces analyses. Une des perspectives envisagées serait de tripler les modalités expérimentales afin d'avoir accès à plus de matériel biologique en fin d'expérimentation, dédié à ces analyses. Ces analyses méta-génomiques pourraient également apporter des informations quant au type de microorganismes présents dans l'inoculum avant l'injection dans les colonnes et en fin expérience de percolation sur colonne. Ces données pourraient être croisées avec la localisation des biofilms entre les conditions saturées et insaturées pour comparer notre système aux expériences de sélection retrouvées dans la littérature en écologie des sols.

Une ACP réalisée sur les échantillons biologiques seuls permet de conforter nos hypothèses (Figure IV.9 et Figure IV.10). Cette ACP n'explique qu'un faible pourcentage de variabilité des échantillons, elle doit donc être analysée avec précaution. Cependant on peut observer des corrélations intéressantes. Les valeurs de redox maximales sont retrouvées dans la partie inférieure de l'ACP, correspondant au domaine de projections des échantillons saturés en eau. Le potentiel redox est ici anti-corrélé aux concentrations en manganèse. Ceci serait en accord avec l'hypothèse selon laquelle le manganèse en conditions biologique est bien responsable des modifications de potentiel redox. Le chrome apparaît également anti-corrélé au COD, indiquant son relargage mais il est également corrélé au potentiel redox, comme discuté précédemment. Le plomb ici semble corrélé au carbone inorganique et au fer, avec une corrélation plus importante avec le fer. La plus forte anti-corrélation du manganèse avec le redox, par rapport au fer, pourrait indiquer que le manganèse est l'élément le plus fortement impliqué dans la modification du potentiel redox en conditions biotiques. Cette observation est également cohérente avec l'hypothèse avancée précédemment d'une oxydation du Cr(III) par le Mn(IV) (Eary et al., 1987). Le fer serait alors responsable de l'augmentation du potentiel redox et du pH en conditions abiotiques tandis qu'en conditions biotique, l'activité biologique augmenterait

l'oxydation du système permettant au manganèse de s'oxyder. Le manganèse semble alors réguler le potentiel redox en condition biotique, plus que le fer. En conditions biotiques saturées, on peut supposer que l'activité des microorganismes est plus importante ce qui augmente l'oxydation du fer et du manganèse, augmentant ainsi l'oxydation du Cr(III) en Cr(VI), comme retrouvé en conditions saturées biotiques sur les deux ACP.

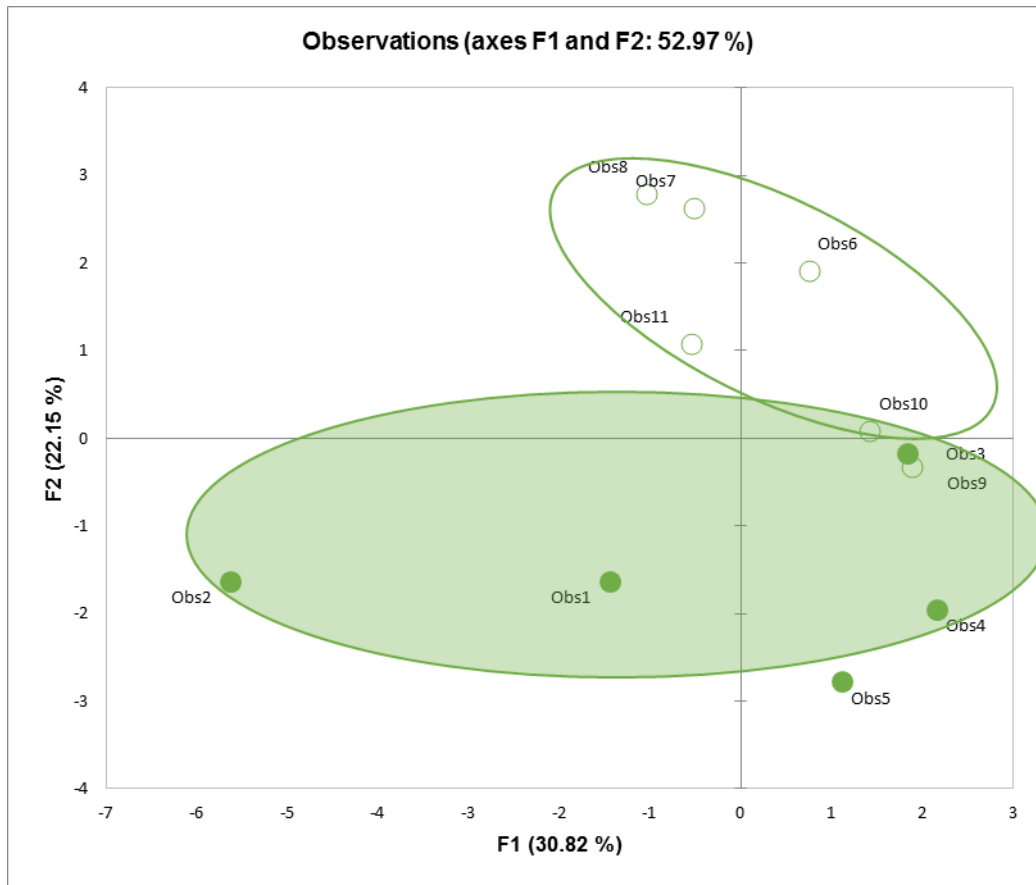


Figure IV.9 : Projection des corrélations des données biotiques (saturées et insaturées) de données sur les axes F1 et F2 expliquant 53,97 % de la variabilité des données. Réalisé sur les données non moyennées sur les pas de temps T3 à T6 (après stabilisation des conditions). L'ellipse verte avec remplissage représente les variables biotiques saturées et l'ellipse verte simple représente les échantillons biotiques insaturés.

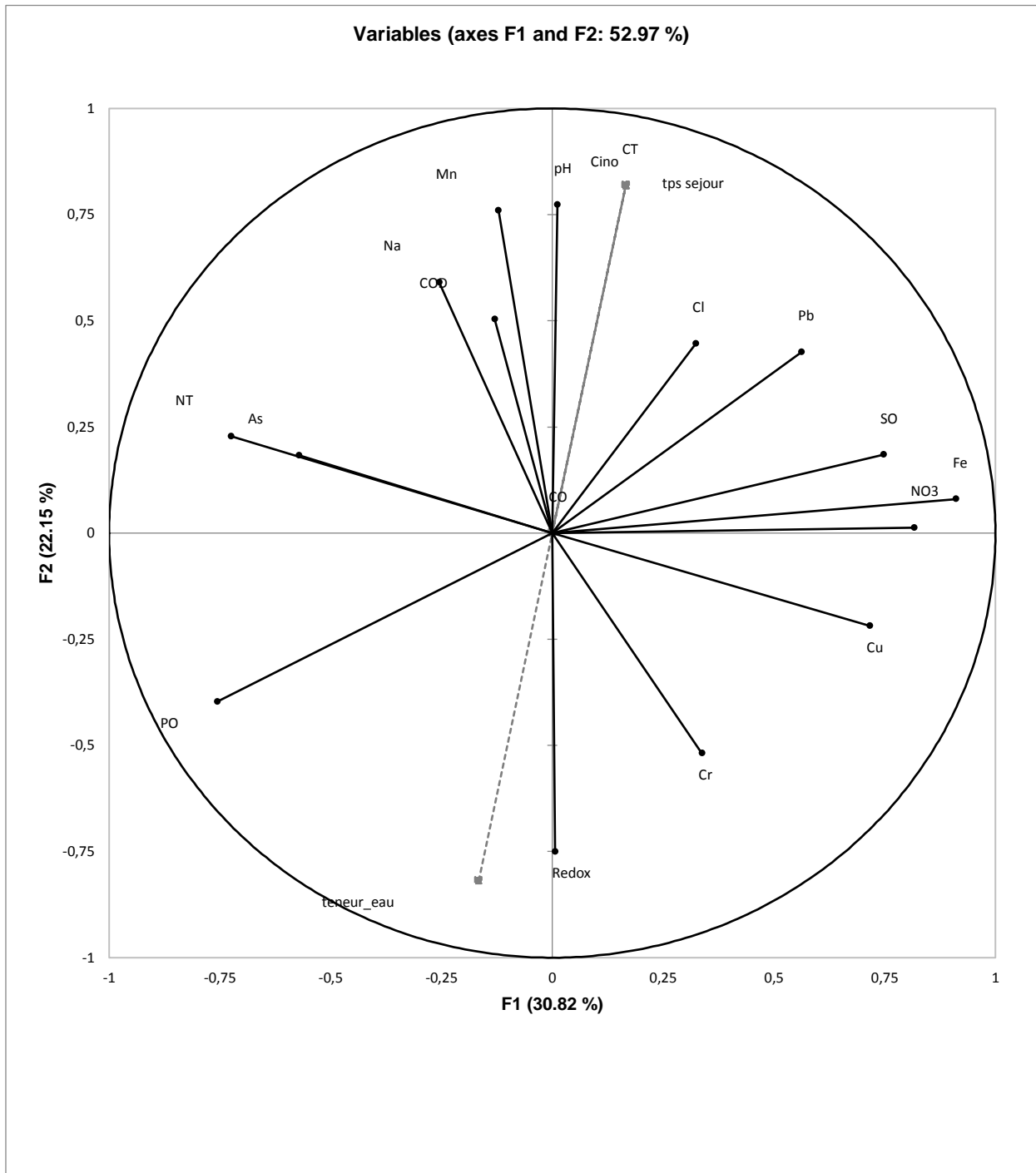


Figure IV.10 : Analyse en composante principale (ACP) des données brutes biotiques sur les six pas de temps pour chacune des deux conditions hydriques biotiques expérimentales. Les axes F1 et F2 expliquent 52,97% de la variabilité des données.

IV. Conclusion

L'analyse des percolats a permis dans un premier temps de valider les conditions expérimentales. Les expériences mises en place ont permis de reconstituer des environnements hydrogéochimiques proches des conditions naturelles. Les quatre modalités de l'expérience ont créé quatre environnements hydrogéochimiques distincts. L'étude du potentiel redox a été permise par les contraintes de l'expérience et son suivi a permis d'obtenir des données cohérentes avec des éléments de littérature en conditions naturelles, dans les eaux de surface à sub surface, c'est-à-dire analogues à des eaux de zone non saturée (ZNS). L'analyse des percolats a permis de montrer l'importance de l'activité biologique en conditions hydriques distinctes (Figure IV.11). Les conditions géochimiques ont permis de mettre en place deux types de biofilms différents développés dans le milieu poreux bimodal. Ces deux biofilms contraints par les répartitions d'eau sont cependant responsables des modifications de l'environnement géochimique, et pas seulement des conséquences des deux états hydriques. Ces observations recourent les informations de localisation des biofilms (cf. chapitre III) ainsi que l'importance de la caractérisation du milieu physique (cf. chapitre II).

Un résultat important de cette expérience est la démonstration que le régime hydrique influence l'activité bactérienne vis-à-vis du manganèse. Cet élément est davantage oxydé biologiquement en condition saturée oxygène qu'en condition insaturée. Or, l'oxydation du manganèse, indirectement pourrait induire une mobilisation de chrome par oxydation du Cr(III) en Cr(VI). Il serait donc pertinent de chercher à comprendre de façon plus approfondie ce phénomène, en particulier de déterminer si les communautés microbiennes des biofilms obtenus en conditions saturée et insaturée sont distinctes.

Pour cela, une expérience similaire pourrait être menée pour obtenir le matériel génétique nécessaire aux analyses méta-génomiques et ainsi répondre à l'hypothèse de fonctionnement distinct des biofilms retrouvés entre les conditions saturées et insaturées. Ces essais complémentaires permettraient de déterminer si les différences observées sur la dégradation de la matière organique et le comportement des métaux et métalloïdes dépendent d'un changement d'activité ou d'un changement de communauté complète, et si certains microorganismes sont représentés de façon identique entre les deux conditions hydriques.

Une expérience similaire pourrait également être menée avec un inoculum issu de solution de percolation du site de référence non contaminé et d'une circulation de solution de percolation issue du site contaminé. Cette expérience permettrait d'observer les effets toxiques des métaux sur la biomasse et d'observer son comportement avec notamment des concentrations différentes en fer et manganèse.

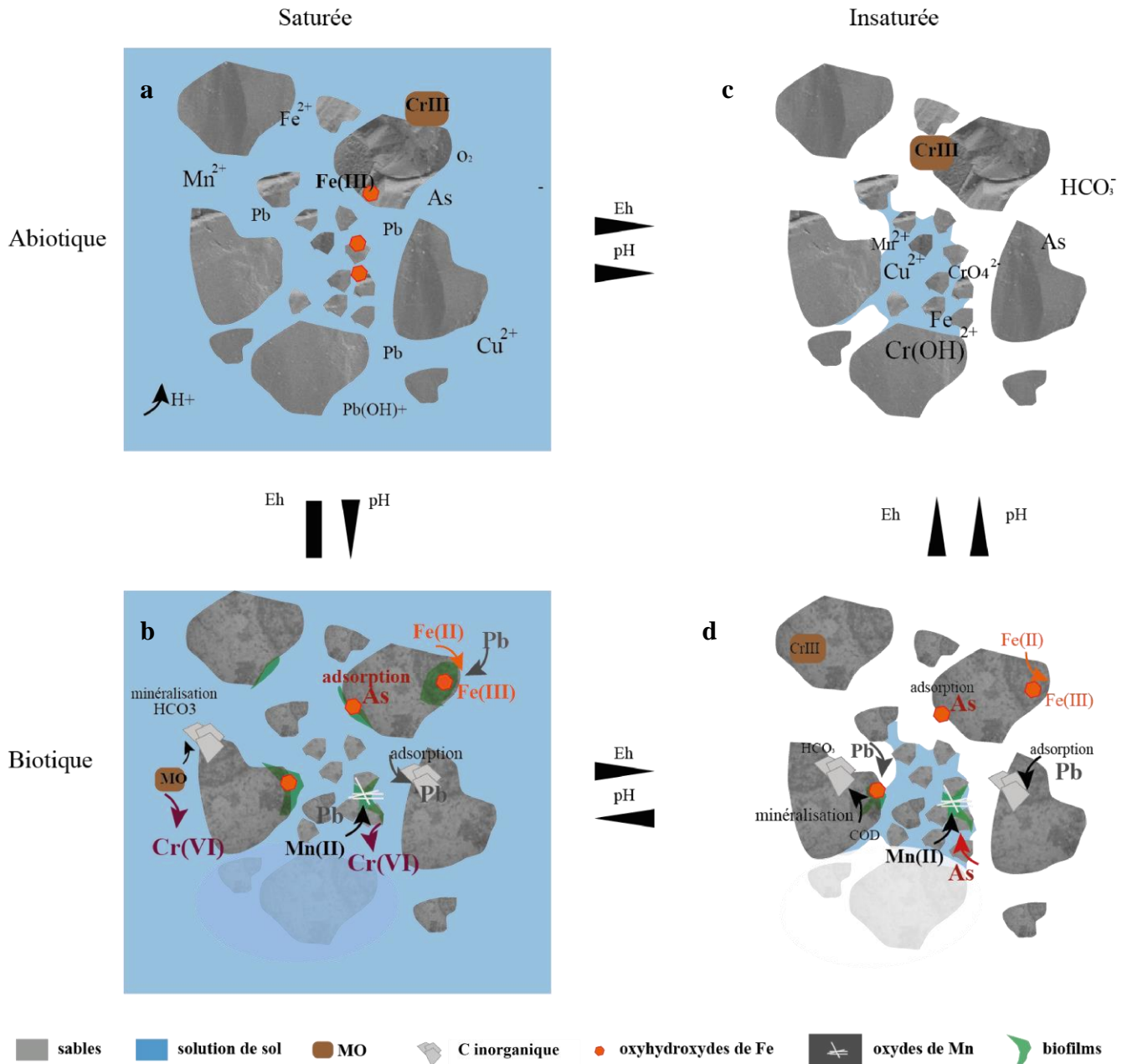


Figure IV.11 : Schémas conceptuel des processus biogéochimiques de modification des spéciations métalliques dans les systèmes poreux en colonne au cours de l'expérience de percolation, en contexte saturé abiotique (a), saturé biotique (b), insaturé abiotique (c) et insaturé biotique (d).

Chapitre V

Développement de biofilms au sein d'un dispositif de type Geological Lab on Chip

Apports de la micro fluidique

Chapitre V	146
Développement de biofilms au sein d'un dispositif de type Geological Lab on Chip	146
Apports de la micro fluidique.....	146
I. Introduction.....	148
II. Matériel et méthodes.....	148
II.A. Conception du GLoCs	148
II.C. Inoculation du GLoCs.....	153
II.D. Modélisation des écoulements dans le GLoCs	155
La modélisation numérique du milieu poreux a permis de superposer les données de champs de vitesse, de pression et de lignes de courant à l'observation sous microscope. Pour cette approche numérique, la géométrie est supposée bidimensionnelle. Cette réduction de la dimension spatiale (de 3D à 2D), la simplicité de la matrice (composées de disques) permet une résolution numérique des équations régissant l'écoulement dans la porosité. Ces données ont été obtenues par la résolution de l'équation de Navier Stokes pour un fluide newtonien, en condition de température stable et sur un fluide de densité constante dans le milieu poreux simplifié (Narsilio <i>et al.</i> , 2009) :	155
II.E. Analyse en spectroscopie Raman.....	156
III. Résultats et discussions	160
III.A. Structure du milieu poreux bimodal analogue à celui présent dans les colonnes	160
III.B. Modélisation des écoulements dans le « GLoCs ».....	161
III.C. Installation et développement biologiques dans le GLoCs.....	163
III.C.1. Suspension bactérienne en conditions statiques	163
III.C.2. Suspension bactérienne en conditions dynamiques.....	165
III.C.3. Devenir des biofilms en conditions dynamiques de percolation de solution analogue à l'expérience sur colonnes.....	167
III.D. Caractérisation de l'échantillon biologique par spectrométrie et micro-spectrométrie confocale Raman pour le suivi in situ des biofilms au sein des GLOCs.....	169
IV. conclusion	178

I. Introduction

L'approche micro fluidique permet l'observation directe en microscopie des dépôts et développements des biofilms au sein de dispositifs poreux analogues suffisamment transparents pour être étudiés en microscopie. Cette approche est complémentaire de l'approche sur colonnes. Les lab on chip, ou micro modèles ou Geological lab on chips : GLoCs sont cependant une simplification du milieu réel tel qu'il peut être observé dans les colonnes. La simplification géométrique a permis de mieux cerner les chemins d'écoulement, de faciliter leur étude numérique et d'envisager d'éventuelles corrélations entre les chemins préférentiels d'écoulement, les comportements hydrodynamiques et le développement des microorganismes. Cette approche a permis de créer une géométrie et un dispositif expérimental (Iltis et al., 2011; Wang et al., 2011; Wu et al., 2012) qui permettent d'observer les dépôts de biofilms et leur développement sous des contraintes d'écoulement analogues aux conditions d'écoulement présentes dans les colonnes.

II. Matériel et méthodes

II.A. Conception du GLoCs

Les possibilités offertes par les techniques de fabrications des « lab on chip » permettent, en termes de géométrie 3D, de détails et de matériaux, d'accéder à des modèles expérimentaux à petite échelle (Figure V.1) pour l'observation précise de processus en conditions contrôlées, impossibles sur d'autres systèmes (Marre and Jensen, 2010a). Leurs avantages sont multiples et ils permettent de réaliser notamment des observations et mesures *in situ* non destructives, de quantifier des grandeurs physiques, d'accéder à de petits volumes (μl), de fixer des conditions d'écoulement laminaires, de contrôler des paramètres comme la température et la pression, et de travailler sur de brefs temps d'expérience. Les outils micro fluidiques sont ainsi utilisés dans de nombreux domaines ; en électrochimie, en biomédecine et en optique (Baek et al., 2015; Cai et al., 2008; Deng et al., 2015; Florea et al., 2013; Lin et al., 2013; Magnusson et al., 2013) (Kumar Gunda et al., 2011; Rubinstein et al., 2015; Wang et al., 2011; Wu et al., 2012; Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2009; Zhou and Zhou, 2013). L'étude à petite échelle permise par ces dispositifs, couplée aux propriétés de transparence (240 nm – 1100 nm) des matériaux comme les polymères type PDMS (Deng et al., 2015), ainsi que leur biocompatibilité, en font d'excellents outils potentiels pour le suivi du développement bactérien sous microscope. Ce

type de dispositif permet un suivi en temps réel du développement bactérien *in situ*, avec des possibilités de marquage et de coloration chimiques ou biologiques (marqueurs pH colorimétriques, marqueurs biologiques DAPI, etc). Son procédé de fabrication permet également de reproduire une géométrie précise et à façon.

Un GLocs poreux a été développé et utilisé au cours de ce travail avec pour objectif la réalisation d'un analogue structural des milieux sableux bimodaux réalisés dans les colonnes (Chau et al., 2011; Deng et al., 2015, 2013).

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour la conception des micro-modèles, selon la nature du matériau utilisé et l'objectif d'étude. Il existe ainsi des micro-modèles en Polyméthacrylate de Méthyle (PMMA) qui est un polymère thermo-formable, en plexiglass et en polystyrène (Davit et al., 2011), en verre (Kone et al., 2014), en résine (Díaz et al., 2011), ou encore en PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) qui est un polymère organo-minéral. Le PDMS présente des propriétés optiques, mais également chimiques, très favorables à l'observation en microscopie optique, tout en présentant des charges de surface identiques à celles de la silice après traitement chimique (Marre et Jensen 2010a ; Roman *et Culbertson*, 2006 *dans Deng et al.*, 2015).

Plusieurs systèmes conçus par la disposition de piliers homogènes, ou encore des géométries hétérogènes plus complexes (distributions bimodales) ont été utilisés dans des contextes d'études variées (Figure V.1) (Marre and Jensen, 2010a). La géométrie choisie ici se distingue de certaines géométries périodiques retrouvée dans la littérature. Cette géométrie a été imaginée pour créer des chemins d'écoulement préférentiels dans un milieu poreux bimodal et des zones particulières comme des zones de culs de sac ou encore d'étranglement des écoulements. Ainsi cette structure permet de créer des écoulements variés au sein du système poreux et d'observer le développement des microorganismes selon ces modalités.

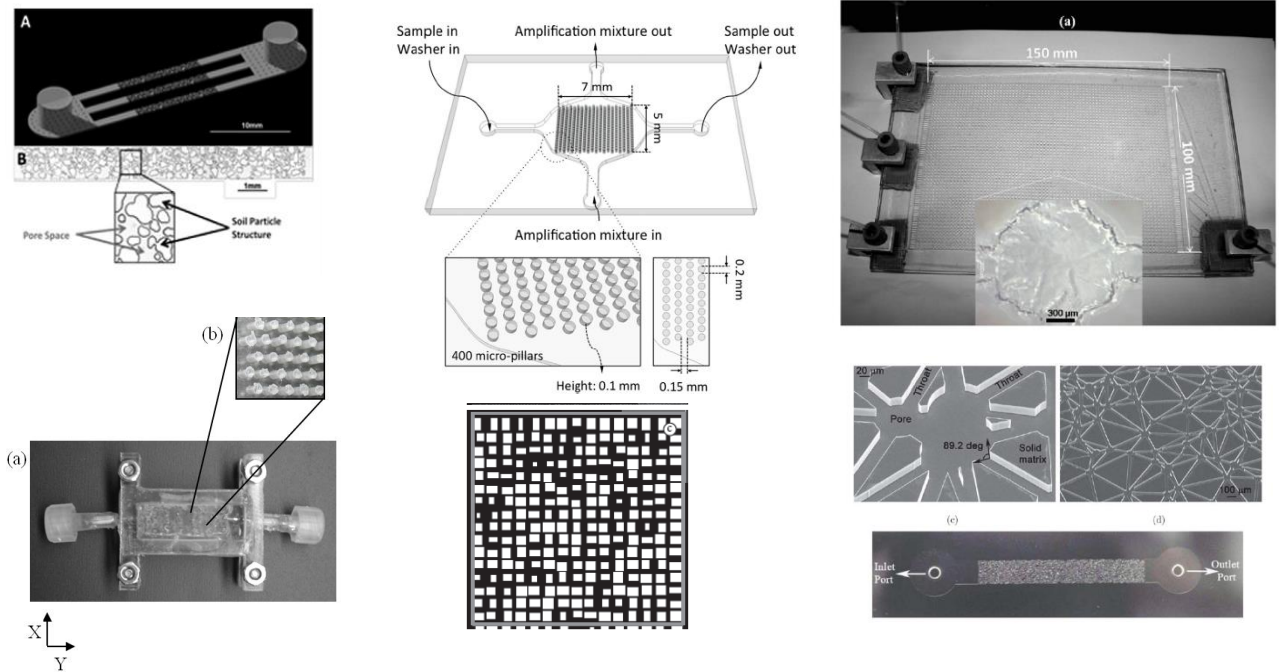


Figure V.1 : Exemples de géométries utilisées en microfluidique ; Wang *et al.*, 2011; Iltis *et al.*, 2011; Kumar Gunda *et al.*, 2011; Baek *et al.*, 2015 ; Deng *et al.*, 2015.

La géométrie conçue au cours de ce travail a été définie en tenant compte de la taille des sables fins et grossiers présentés précédemment pour la conception des milieux poreux en colonnes. Les paramètres clés comme, le rapport des tailles entre les particules et la valeur de porosité totale des massifs poreux ont guidé la conception de la géométrie (cf. chapitre II). Cette géométrie ne se veut pas strictement représentative d'un milieu naturel hétérogène, mais en conserve en particulier le caractère bimodal. Ce choix, avec une large porosité connectée et une porosité plus fine analogue au mélange sableux à 20 % de sables fins utilisé dans les colonnes (Figure V.2a), permet de créer des domaines de vitesses et d'écoulement préférentiels, contrôlés par la géométrie elle-même.

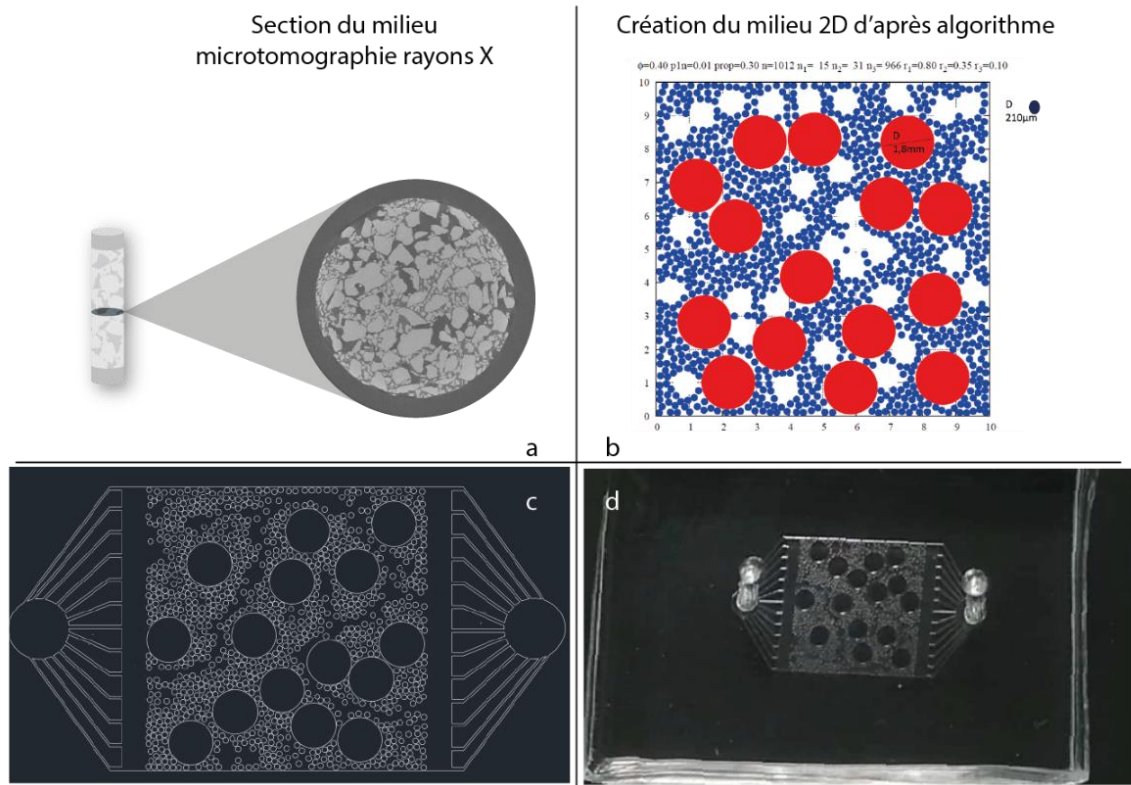


Figure V.2 : Conception de la géométrie des labo on chip comme analogue sutrcuturax des milieux poreux biomodaux en colonnes (a) modélisés par un algorithme de type Monte Carlo selon les paramètres physiques des systèmes en colonnes (b) avec une ouverture de chemin d'écoulement préférentiels et culs de sacs (c) permettant de créer une connectivité analogue au milieux poreux en colonnes et fabrication du lab on chip en PDMS de 23 μ m d'épaisseur fermé par lame de verre (d).

II.B. Fabrication du GLoCs

Pour tester les hypothèses du développement de tapis bactérien au sein du milieu poreux, une géométrie simplifiée a été choisie suivant les idées directrices de conception décrite précédemment. Le milieu est délimité par un parallépipède rectangle de hauteur h et de cotés l et L . La géométrie a été obtenue en collaboration avec Jean Louis Rouet, (Université d'Orléans). La matrice poreuse est constituée de sections de colonnes parallèles entre elles. Pour des colonnes infiniment hautes, il est possible de réduire l'espace à un espace à deux dimensions (ce qui sera repris dans l'approche numérique). En 2D, les colonnes apparaissent donc comme des disques. Pour reproduire le caractère bimodale de la distribution poreuse du milieu, deux valeurs de rayons de disques ont été choisies ; r_1 et r_2 avec $r_1 = a r_2$. Les centres des cylindres sont répartis de façon aléatoire et uniforme dans l'espace disponible (la zone dans

laquelle sont tirés les centres est réduite de leur rayon afin que les disques ne s'interpénètrent pas).

Pour optimiser la répartition des disques et bien représenter les chenaux préférentiels d'écoulement (grandes tailles de pores dans les colonnes expérimentales) une taille de disques supplémentaire a été introduite de rayon r_3 supérieure à r_1 et r_2 dont la surface sera assimilée à de la porosité.

La répartition des disques suit une méthode de Monte Carlo, pour atteindre les paramètres fixés identiques aux colonnes (porosité totale, tailles des rayons des disques équivalents aux tailles de rayon des grains de sables, ratio de taille de rayons). Les disques ont été répartis sur la surface disponible en tirant les coordonnées de leur centre au hasard de façon uniforme en commençant par les disques de plus grand rayon. Lorsque tous les disques de plus grand rayon ont été placés, c'est le tour des disques de rayon juste inférieur, puis on termine en plaçant les disques de plus petit rayon. À chaque tirage, une vérification des conditions de répartition (chevauchements) est effectuée. Si les conditions sont satisfaisantes, c'est à dire pas de recouvrement, le disque est accepté, sinon, on rejette son positionnement et de nouvelles coordonnées sont appliquées à son centre. Dans le cas d'un trop grand nombre de rejets consécutifs, un disque est supprimé au hasard et la répartition des disques de cette gamme de taille est relancée. L'image obtenue (Figure V.2b) est ensuite manuellement modifiée (Adobe illustrator) pour obtenir une géométrie final avec une ouverture de chenal préférentiel d'écoulement (Figure V.2c).

La phase de fabrication du polymère PolyDiMéthylSiloxane $[O-Si(CH_3)_2]_n$ (PDMS) a été réalisée en collaboration avec Samuel Marre, de l'ICMCB de Bordeaux (Marre and Jensen, 2010a; Perro et al., 2016). On obtient ainsi un GLoCs scellé sur lame de microscope, prêt pour une connexion au système de circulation de solution (Figure V.2d).

II.C. Inoculation du GLoCs

Tous les constituants du circuit (tuyaux, raccords, réservoir de sortie de la solution percolante avec filtre 0,22 μm) ont été autoclavés (20 min, 121°C). Deux rinçages successifs du GLoCs ont été réalisés à l'éthanol et eau milli Q, puis il a été inoculé comme les milieux poreux utilisés dans les colonnes, via une injection de la solution de sol extraite en laboratoire (cf. chapitre 3). La solution de percolation est identique à celle utilisée en solution d'entrée des quatre colonnes. Cette solution a été prélevée dans une seringue stérile de 5 ml sous hotte à flux laminaire. Tout le système a ensuite été connecté sous hotte à flux laminaire.

L'ensemble du circuit a été placé sous microscope (Figure V.3) et deux expériences préliminaires ont été suivies par acquisition d'images pour observer l'évolution des communautés bactériennes :

- Une première expérience a été réalisée afin d'observer le devenir des microorganismes en condition de macération statique, c'est-à-dire sans circulation de solution nutritive au travers du système, lors de l'inoculation et au cours de l'évaporation du système afin d'observer les dépôts de bactéries ou de biofilms possibles dans ce milieu synthétique pendant l'évaporation de la solution du système ;
- Une expérience similaire a été menée en conditions dynamiques, pour comparer le devenir des microorganismes en conditions de transfert de flux dans le système

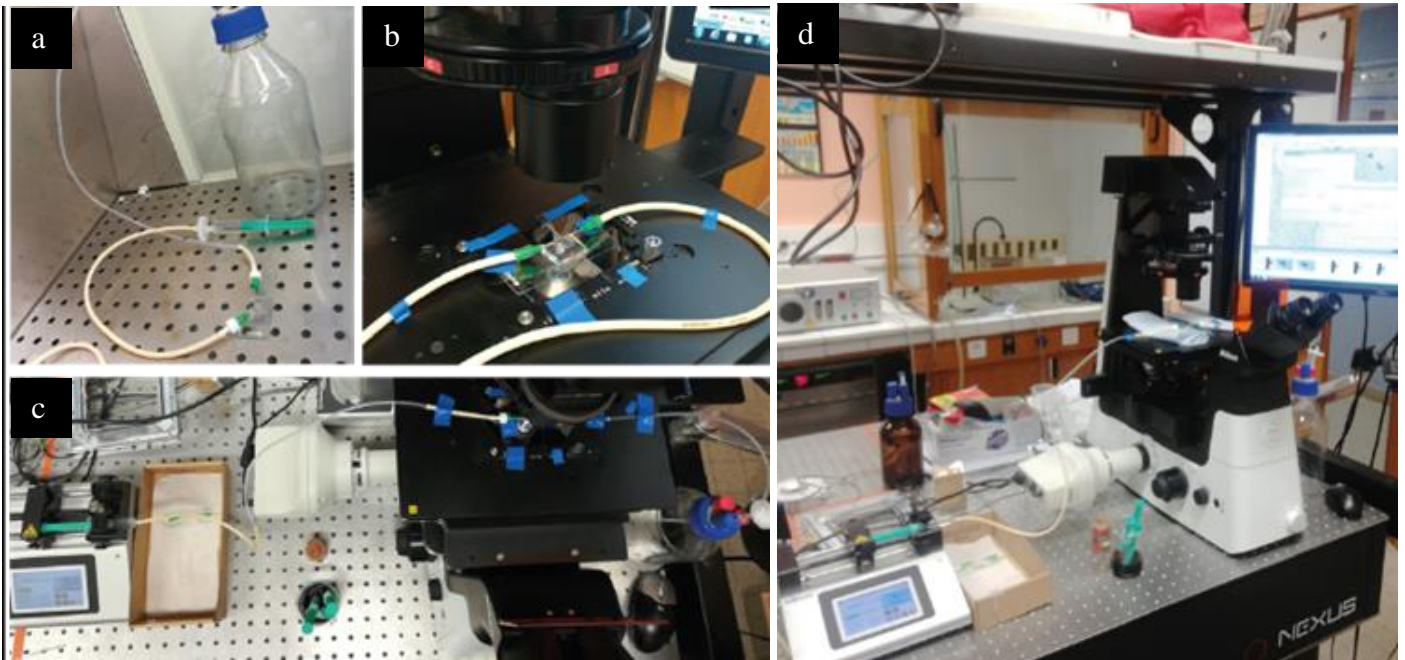


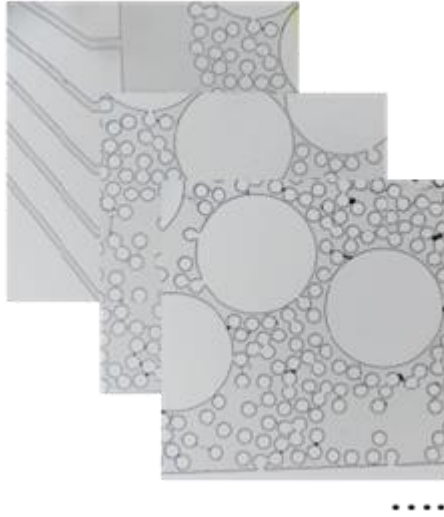
Figure V.3 : Montage du banc expérimental connecté en conditions stériles sous hotte (a). le montage est placé sous microscope (b) et l'injection est régulée par montage de la seringue d'alimentation sur un pousse seringue (c) pour un suivi en continue par acquisition d'images (d).

L'expérience analogue à la percolation en colonnes a ensuite été menée en conditions dynamiques avec une circulation de solution nutritive.. L'injection a été pratiquée en continu par un pousse seringue, avec un débit de $1 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figure V.3) (Tableau V.1). La taille des échantillons sur colonne ($2,51 \text{ cm}^3$) a été divisée par cent pour obtenir la taille des systèmes GLocs ($0,0026 \text{ cm}^3$). Le débit en entrée des GLocs a été défini pour respecter une condition de flux laminaire et diviser le débit d'entrée des colonnes (cf. chapitre II) par dix, pour permettre de saturer la géométrie. L'expérience a été mise en place pour une durée de 5 jours. Une série d'images a été réalisée à j0 (le jour de l'inoculation) et à quatre pas de temps successifs jusqu'à j5. A chacun des pas de temps une série d'images a permis de reconstruire une image globale du micro-modèle (Photoshop) (Figure V.4).

Tableau V.1 : Paramètres de l'expérience de cinq jours dans le micro-modèle.

paramètres du milieu poreux bimodal	
longueur L	1 cm
largeur l	1 cm
porosité totale	0,4
diamètre de piliers	1,8 mm - 211 μm
profondeur	26 μm
débt d'entrée	$1 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$

Série d'image microscope inversé



Reconstruction, mosaïc d'image (Photoshop)

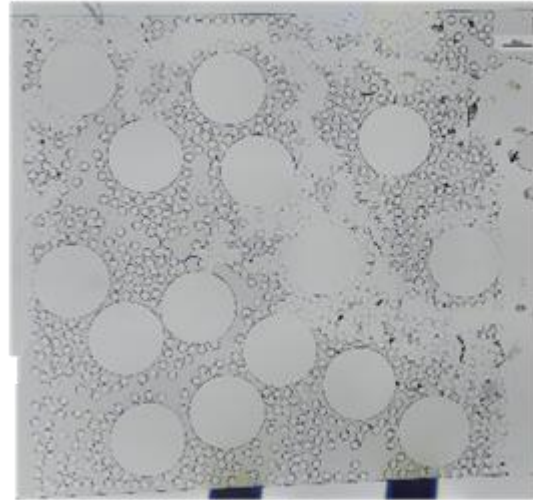


Figure V.4 : Acquisition d'images en microscopie inversée (a) et reconstruction du panorama complet du micro modèle (b) par mosaïc d'images (a) (Photoshop).

II.D. Modélisation des écoulements dans le GLoCs

La modélisation numérique du milieu poreux a permis de superposer les données de champs de vitesse, de pression et de lignes de courant à l'observation sous microscope. Pour cette approche numérique, la géométrie est supposée bidimensionnelle. Cette réduction de la dimension spatiale (de 3D à 2D), la simplicité de la matrice (composées de disques) permet une résolution numérique des équations régissant l'écoulement dans la porosité. Ces données ont été obtenues par la résolution de l'équation de Navier Stokes pour un fluide newtonien, en condition de température stable et sur un fluide de densité constante dans le milieu poreux simplifié (Narsilio *et al.*, 2009) :

$$\rho_w \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + \rho_w (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} + \nabla p - \eta \nabla^2 \mathbf{v} = \mathbf{F}$$

Avec ρ_w la densité du fluide, \mathbf{v} la vitesse du fluide, η la viscosité dynamique du fluide, p la pression et \mathbf{F} la force volumique.

Cette équation est résolue selon le principe de continuité :

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = 0$$

La résolution de l'équation est réalisée en tout point du maillage de la géométrie (COMSOL Multiphysics®). Ce maillage a été réalisé par la technique de triangulation de Delaunay. Une valeur de vitesse $v_{\text{entrée}}$ en m.s^{-1} a été imposée en entrée du système et la vitesse en tout point du motif a été prise égale à cette vitesse soit $v=v_{\text{entrée}}$. La sortie est assimilée à une limite libre, sans contrainte de pression. Les paramètres de viscosité dynamique (10^{-3} Pa.s) et la masse volumique ($\rho = 10^3$ kg.m^{-3}) de l'eau ont été utilisés dans le modèle (Narsilio *et al.*, 2009). La simulation a été réalisée selon l'axe x.

Différentes vitesses en entrée $v_{\text{entrée}}$, ont été implémentées de 1.10^{-5} à 1.10^{-3} m.s^{-1} et ont permis de maintenir le système en régime laminaire avec des valeurs du nombre de Reynolds Re inférieures à 2000 (limite du régime turbulent) :

$$Re = \frac{\rho v D}{\mu}$$

Avec :

Re : le nombre de Reynolds de l'écoulement

ρ : la masse volumique du fluide

v : la vitesse au sein du système

D : le diamètre de la zone d'écoulement

μ : la viscosité du fluide

II.E. Analyse en spectroscopie Raman

Etant donné la grande sensibilité des techniques de spectroscopie vibrationnelle vis-à-vis des liaisons chimiques et de leur déformation (Williams., 1995) cette méthode a été utilisée pour l'identification et la caractérisation des liaisons chimiques constituant les biofilms au sein des GLoCs. Plusieurs auteurs ont analysé la composition des biofilms par spectroscopie Raman sur des culots ou des tapis bactériens ((Choo-Smith et al., 2001); Wagner *et al.*, 2009; Aldeek 2010; Mauline 2012; Jamal, 2015). Cette technique permet d'étudier les biofilms de façon *in situ*. Comme la spectroscopie infrarouge, cette technique permet d'identifier les types de

liaisons chimiques mais elle permet également de pouvoir identifier des liaisons chimiques selon leur environnement et d'identifier les molécules dans lesquelles sont retrouvées ces liaisons. La spectroscopie Raman permet également de diminuer le signal de l'eau, ce qui est essentiel dans l'expérience conçue en conditions hydratées. Les échantillons biologiques possèdent des types de liaisons chimiques caractéristiques connues (de type C-H, C-N, C-C, C-O-C, COO⁻, COOH, C-CH₃, C-N et C-OH) sur lesquelles se sont basé l'analyse des biofilms au cours de l'expérience en GLoCs. Il est important de pouvoir différencier le signal biologique du signal des supports de bactéries à savoir ici la lame de verre (Si-O), le PDMS (C-H) et l'eau (O-H) dans le cas de suspensions bactériennes. Les analyses ont donc été menées par exploration de spectres obtenus dans la littérature (Figure V.5) afin d'identifier les bandes de nombre d'onde caractéristiques de ces grands types de liaisons chimiques entre 100 et 4000 cm⁻¹ (Tableau V.2).

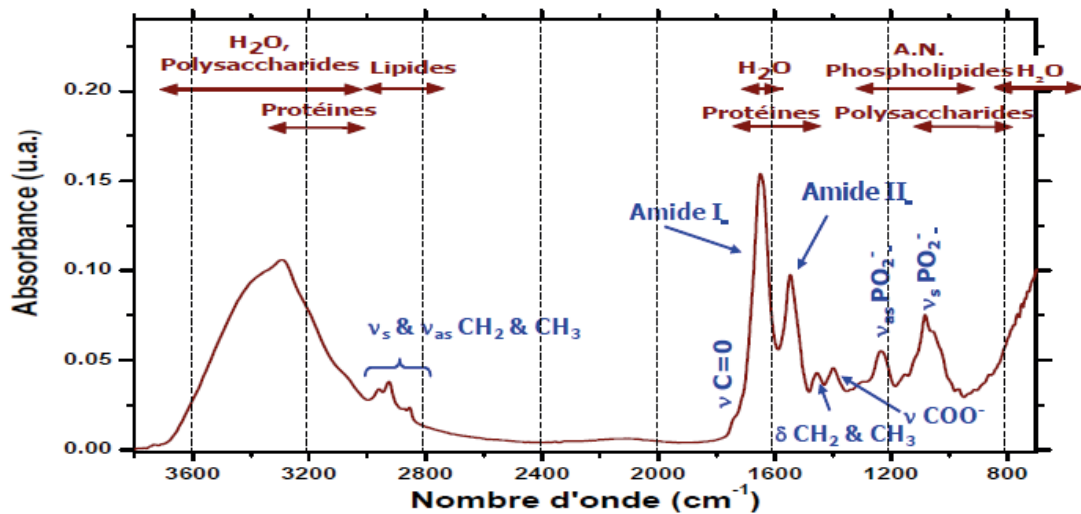


Figure V.5 : Spectre IR caractéristique des réponses d'un échantillon bactérien partiellement hydraté D'après Jamal, 2015.

Les analyses ont été réalisées en deux temps ; une première approche de test par micro-spectroscopie Raman en analyses ponctuelles non confocale pour tenter de caractériser les différents composants des micro-modèles et l'échantillon biologique. Une seconde approche par micro-spectrométrie confocale (ponctuelle et cartographique) a été mise en place pour obtenir des informations localisées à l'échelle du biofilm (µm) (Jamal, 2015).

i. Expériences préliminaires en spectroscopie vibrationnelle Raman

Des mesures préliminaires ponctuelles ont été menées *ex situ* par spectroscopie (spectromètre ANDOR Shamrock 500i, laboratoire ISTO) avec une excitation laser 532 nm, un réseau de 600 traits/mm, objectif de grossissement 20x et une ouverture numérique de 0,4. Deux mesures ont été effectuées sur i) des échantillons de suspension bactérienne (cf. chapitre III et IV) déposée sur lame, et ii) un échantillon de suspension bactérienne après évaporation de l'eau. Pour identifier le signal de l'échantillon biologique deux caractérisations préalables ont été réalisées sur les deux composants du support des bactéries c'est-à-dire le PDMS et la lame de verre.

ii. Analyses approfondies en micro-spectroscopie vibrationnelle confocale Raman

Pour approfondir cette première approche ponctuelle, des mesures par micro-spectroscopie confocale ont été réalisées (système de microscopie RAMAN Renishaw InVia Reflex, laboratoire CEMTHI) avec deux longueurs d'ondes d'excitation de 785 nm et 514 nm, un réseau de 600 traits/mm, objectif 50 x et une ouverture numérique de 0,5. Les analyses cartographiques et ponctuelles ont été menées sur (i) le système clos humide, (ii) le système évaporé, et (iii) des dépôts de biofilms sur lame de verre après suppression du PDMS (Figure V.6). Les résultats de cartographie ont fait l'objet d'un traitement statistique.

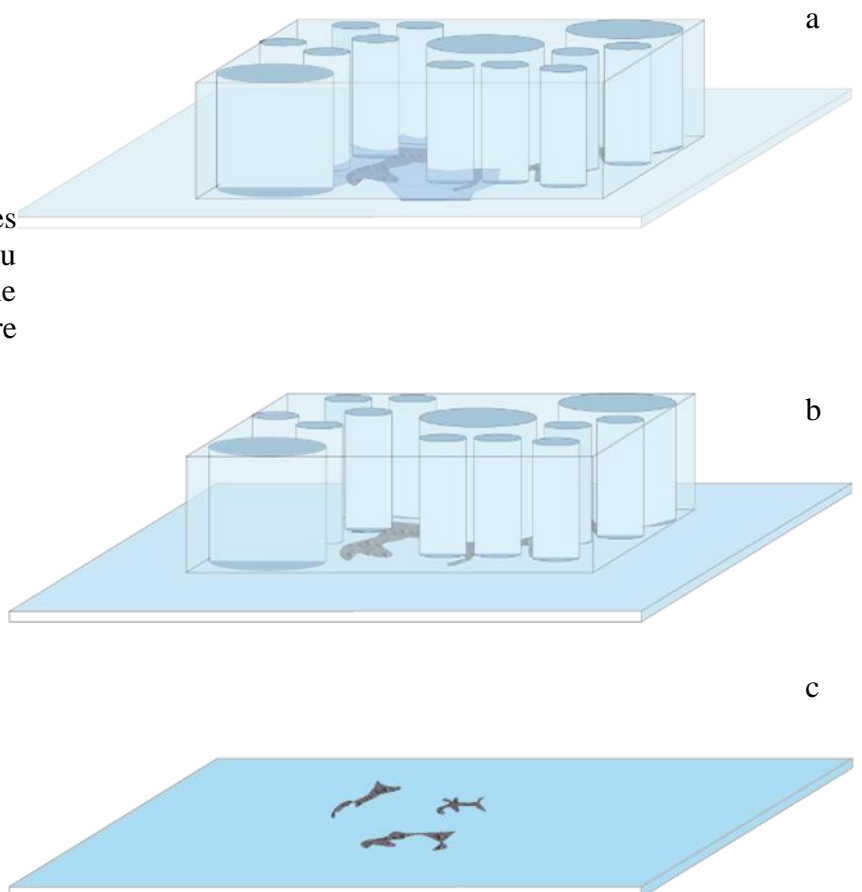


Figure V.6 : Conditions expérimentales des analyses sur les échantillons in situ en eau (a) et sec (b) et sur un système déstructuré avec découpe du polymère (c).

Chapitre V

Tableau V.2 : Attributions des bandes de nombre d'onde (cm^{-1}) d'échantillon biologiques sur *E.coli* et *P.fluorescens* tiré de Jamal, 2015 (références incluses) avec les attribution de chacune des bandes aux différents constituants des biofilms (en noir) et données issues de Wagner et al., 2010 (références incluses) et Jamal, 2015, sur un consortium de bactéries issu d'échantillons d'eaux usées. Les différents types de déformation sont représentés avec ν la vibration d'élongation, δ la vibration de déformation. (PL les phospholipides, A.G les acides gras, Phe, Tyr, Trp les acides aminés, A, C, T, G et U les acides nucléiques constituant l'ADN (acide désoxyribonucléique) et l'ARN (acide ribonucléique). Ar : aromatique, ep : épaulement, sq : squelettique).

Nombre d'onde cm^{-1}		Attributions			
		Polysaccharides (a)	Protéines (a)	Acides nucléiques (a)	Lipides (a)
~3300	~3300	νOH	$\nu\text{OH}, \nu\text{NH}$	νOH	
3061	3061		$\nu\text{C I}''$ 2571		
2964 (ép)	2963 (ép)		va., CH_3		$\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$
2937	2935		$\nu_{\text{as}}\text{CH}_3, \text{CH}_2$		$\nu_{\text{as}}\text{CH}_3, \text{CH}_2$
2879	2873		$\nu_{\text{as}}\text{CH}_3, \text{CH}_2$		
2850	2854				$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$
1745					$\nu > \text{C} = \text{O}$ (esters. PL. A.G. estérifiés)
C=O					
1657	1657		$\nu\text{C} = \text{O}$ (amide I)		$\nu\text{C} = \text{C}$
1650			Amide I		
1645			C=C, C=O lignin like		
1650-1640			COO-		
	1625		$\nu\text{C} = \text{C}$ (aromatiques)		
1620-1605			C=C Tyr, Trp, Phe		
1608	1607		δCH_2 (aromatiques)		
1600			arom ring str, lignin like		
1583			G,A ring str		
1576	1577			ν (cycle) G, A	
1510			C=C str, carotenoid		
1482	1480			(G, A)	
1450-1440			δCH_2		
1448	1452	δCH_2	δCH_2		δCH_2
1420-1400			COO ⁻ symm		
1372	1363	$\delta\text{CH}_2, \nu\text{COO}^-$	δCH_2		δCH_2
1345			δCH		
1335	1339	δCH	δCH	A,G	
1330-1300	1300-1300	δCH	$\delta\text{CH}, \delta\text{CH}_2, \delta\text{OH}$	G	δCH
1260			Amide III		
1260-1210	1260-1210		Amide III	A, G, U, C	
1175	1174		δCH (Tyr)		
1155			C-C str carotenoids		
1160-1145			C-C, C-O		
~1150	~1150	δCOH	$\nu\text{CC}, \nu\text{CN}$		
1127-1125			C-C str, C-O-C glycosidic link, ring breath, symm, C-N str		
1125	1126	$\nu\text{CC}, \nu\text{g COC}$	$\nu\text{CC}, \nu\text{CN}$		νCC
1110-1060	1110-1060	vas COC, $\nu\text{CO}, \nu\text{CC}, \delta\text{COH}, \delta\text{CH}$	νCN	vs PO_2^-	vs. CC, vs PO_2^-
1095-1090			C-C str, C-O-C glycosidic link, ring breath, symm, C-N str		
1080			C-O-H bend, CH bend		
1060			C-O, C-C, C-N str		
1031	1031		Tyr enfoui, $\nu\text{CC}_{\text{cycle}}$		νCesq 12571
			δCH (dans le plan. Phe).		
1003	1004		$\nu\text{CC}_{\text{cycle ar}}$ (Phe)		
1003			ring breath Phe		
899-855			C-C str, C-O-C 1,4 glycosidic link, ring		
860-940	860-940	$\nu\text{CC}, \nu\text{COC}$ (1-4) $\delta\text{COH}, \delta\text{CH}$			$\nu, \text{C-C-N}$
853	853		Tyr enfoui, $\nu\text{CC}_{\text{cycle}}$		
828			ring breath Tyr		
824	825		Tyr exposé, δCCH	$\nu\text{O-P-O}$	
810	810			$\nu\text{O-P-O}$ (ARN)	
783	784			$\nu\text{O-P-O}$ (ADN), (C, U) T	
730-720			$\text{CH}_2, \text{A}, \text{ring breath tyr}$		
727	727		Trp	$\delta\text{CH}_2, \text{A}$	
666	60		νCS	T, G	
645	641		$\delta\text{NCO}, \delta\text{CC}$ (Tyr)		
623	622		$\delta\text{NCO}, \delta\text{CC}$ (Phe)		
540-530			$\delta\text{C-O-C}$ glycosidic ring		
480-306			carbohydrates		

III. Résultats et discussions

III.A. Structure du milieu poreux bimodal analogue à celui présent dans les colonnes

Le milieu poreux bimodal présente une porosité totale de 40 % supérieure à la porosité des milieux poreux bimodaux des colonnes avec une porosité totale de 0,28. L'ouverture d'un chenal préférentiel a permis de créer des connections entre les zones de porosité fine (analogue de la porosité résultant de l'assemblage des sables fins) (Figure V.7) comme observé pour les massifs poreux des colonnes en micro-tomographie aux rayons X. L'hétérogénéité de la géométrie a permis de mettre en place des écoulements contraints. La géométrie choisie ici se distingue de certaines géométries périodiques retrouvée dans la littérature. La géométrie imaginée a bien permis de créer des chemins d'écoulement préférentiels visibles expérimentalement.

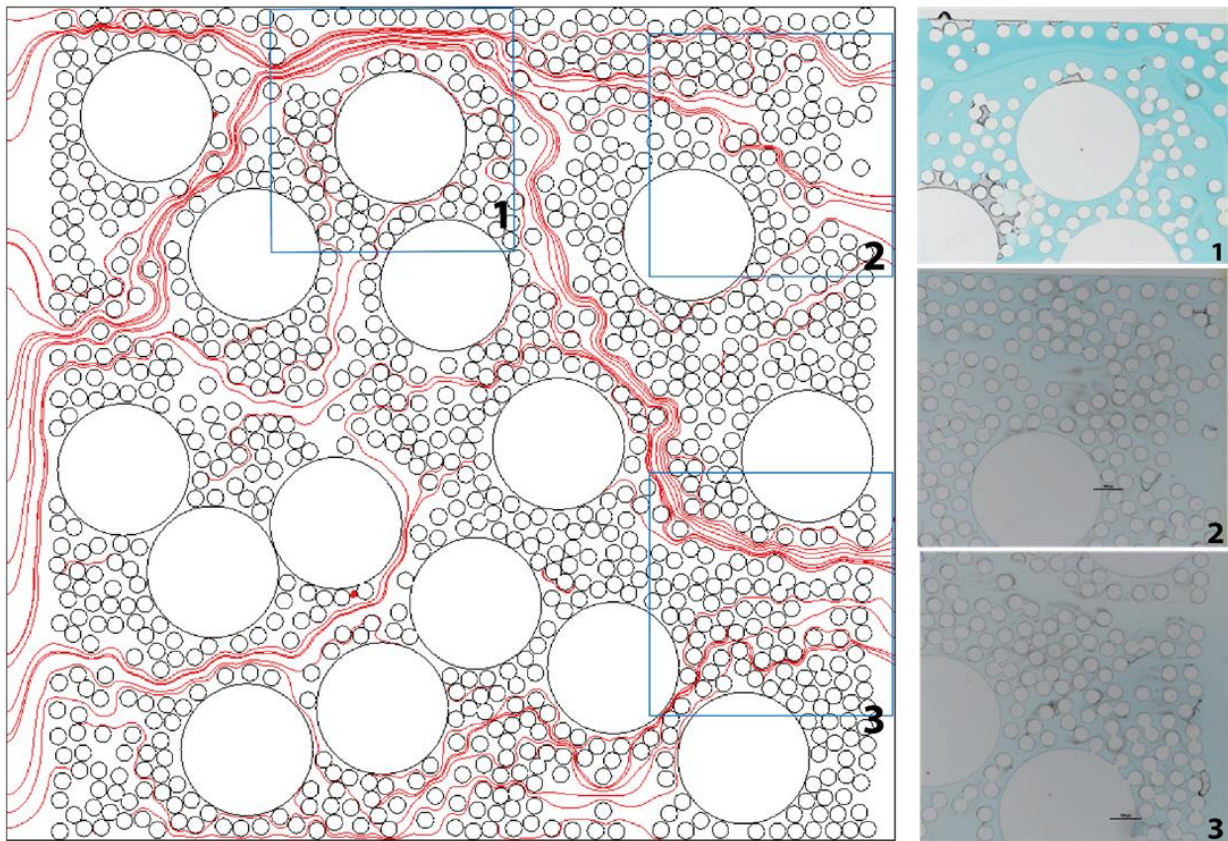


Figure V.7 : Observation des lignes de courant par modélisation des écoulements au sein du lab on chip par résolution de l'équation de Navier Stokes en condition saturée (COMSOL multiphysics®). Avec v la vitesse d'entrée du système = 10^{-4} m.s $^{-1}$, avec 1, 2 et 3 : images issus des tests expérimentaux de traçage au sein des lab on chip.

III.B. Modélisation des écoulements dans le « GLoCs »

Une expérience a été réalisée pour comparer les résultats d'écoulement dans le GLoC avec les résultats de modélisation.

Des tests d'écoulement ont été réalisés à l'aide du traceur bleu brillant utilisé dans les expérimentations sur colonnes. Ces tests ont permis d'illustrer la présence d'un écoulement préférentiel dans le chenal comme souhaité lors de la création de la géométrie de distribution des piliers dans le GLoCs. Ce chenal est visible via la présence d'un gradient de vitesse au sein du GLoCs avec les zones de large porosité et les zones de porosité fine (Figure V.7). Ces zones se traduisent par une intensité variable de la coloration au bleu brillant. Les premiers résultats de traçage au bleu brillant observés sont cohérents avec les résultats obtenus à l'issue de la modélisation numérique pour obtenir la répartition des gradients de vitesse.

La modélisation par résolution de l'équation de Navier Stokes a permis d'extraire des données en tout point du micro modèle. On peut alors observer les lignes de courant régissant les écoulements du système poreux (Figure V.7). On retrouve bien ici un chemin préférentiel et plusieurs chemins annexes également permettant de connecter des zones de large porosité via la porosité fine. La modélisation des écoulements permet également d'extraire des valeurs du gradient de vitesse (Figure V.8) et du nombre de Reynolds (Figure V.9). Les zones qui concentrent les lignes de courant préférentielles sont également les zones de vitesses les plus importantes et du nombre de Reynolds le plus élevé. La comparaison des sorties du modèle et des images acquises lors de l'expérimentation mettent en évidence des zones de gradient variable comme représentées dans les différentes zones 1, 2 et 3 (Figure V.7). La modélisation permet également de définir les régimes d'écoulement dans le système. La visualisation des nombres de Reynolds met en avant des régimes laminaires avec des valeurs comprises entre 0 et 1 (Figure V.9).

La modélisation a permis de reproduire les gradients observés en expérience avec le traçage au bleu brillant.

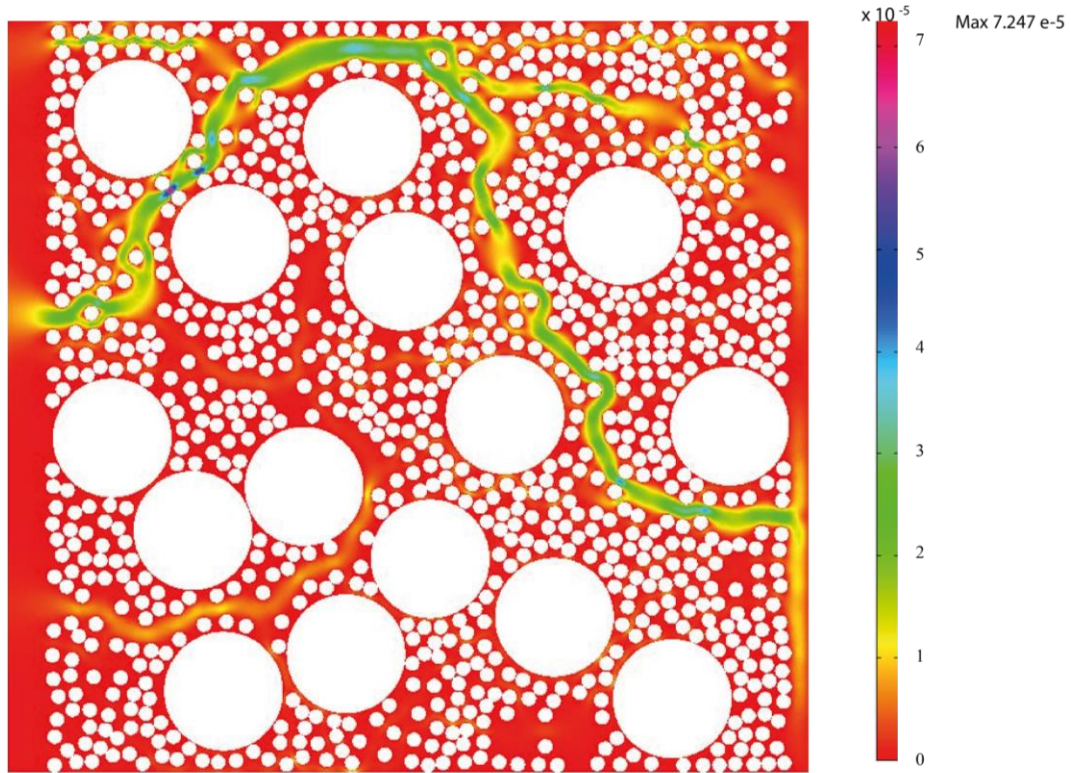


Figure V.8 : Visualisation des gradients de vitesse et des champs de vitesse par modélisation des écoulements au sein du lab on chip par résolution de l'équation de Navier Stokes en condition saturée (COMSOL multiphysics®). Avec v la vitesse

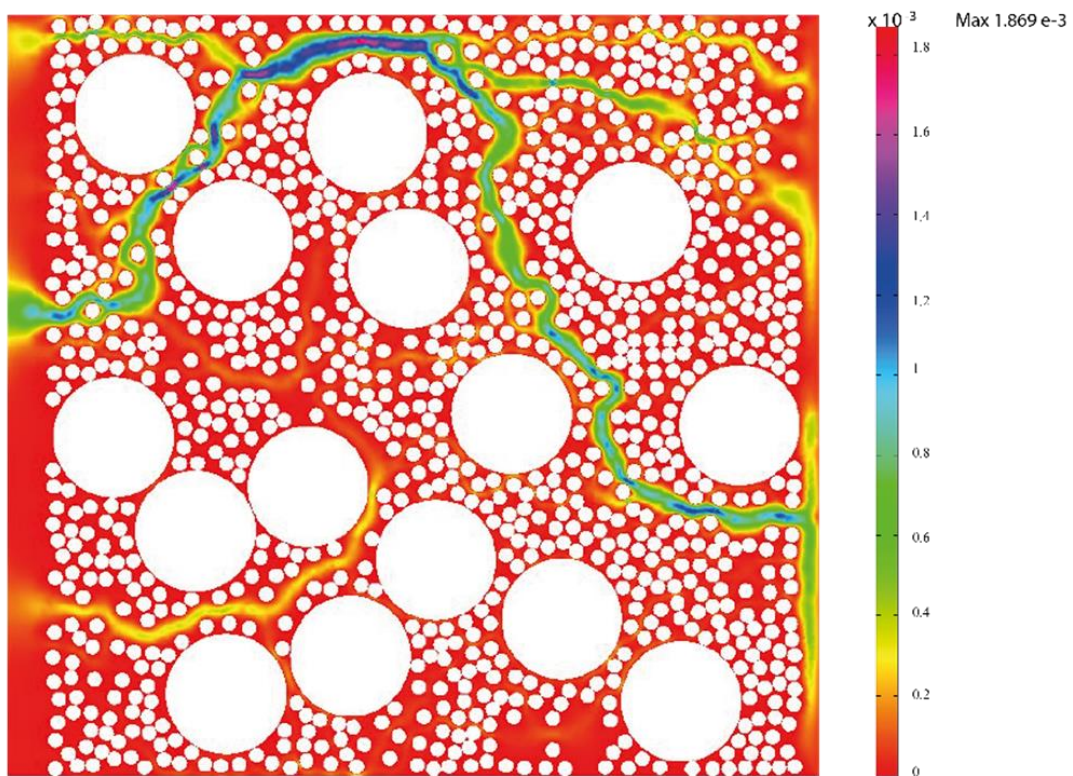


Figure V.9 : Visualisation des gradients du nombre de Reynolds par modélisation des écoulements au sein du lab on chip par résolution de l'équation de Navier Stokes en condition saturée (COMSOL multiphysics®). Avec v la vitesse d'entrée du système $= 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$.

III.C. Installation et développement biologiques dans le GLoCs

Le développement biologique a été observé au cours de deux premiers tests avant l'expérience i) en conditions statiques et ii) en conditions dynamiques. L'expérience de cinq jours a ensuite été mise en place, avec une solution analogue à la solution de percolation sur les colonnes.

III.C.1. Suspension bactérienne en conditions statiques

Une première observation valide la présence de bactéries vivantes dans le système, capables des mouvements de micro-vibrations et de déplacements dans le milieu. Plusieurs types de bactéries sont présents avec des formes en coques et en bacilles. En conditions statiques, les bactéries ne sont présentes que dans la suspension bactérienne, toutes les bactéries observées dans le micro-modèle sont localisées dans les gouttes (Figure V.10). Si l'on observe ces suspensions à différents pas de temps, on constate que les bactéries se concentrent aux interfaces air-eau (Figure V.10). Sur un premier test à évaporation du système, les dépôts bactériens suivent les formes des ménisques d'eau. Avec l'évaporation de la solution, des ménisques d'eau se forment et des amas de bactéries sont observés aux abords des piliers de polymère ainsi que le long des ménisques entre les piliers en forme de « diabolo » (Figure V.10), témoins de l'évaporation de l'eau. Cette répartition peut être due aux forces capillaires et aux tensions de surface aux interfaces eau-air imposant un stress mécanique sur les bactéries présente dans les phases aqueuses.

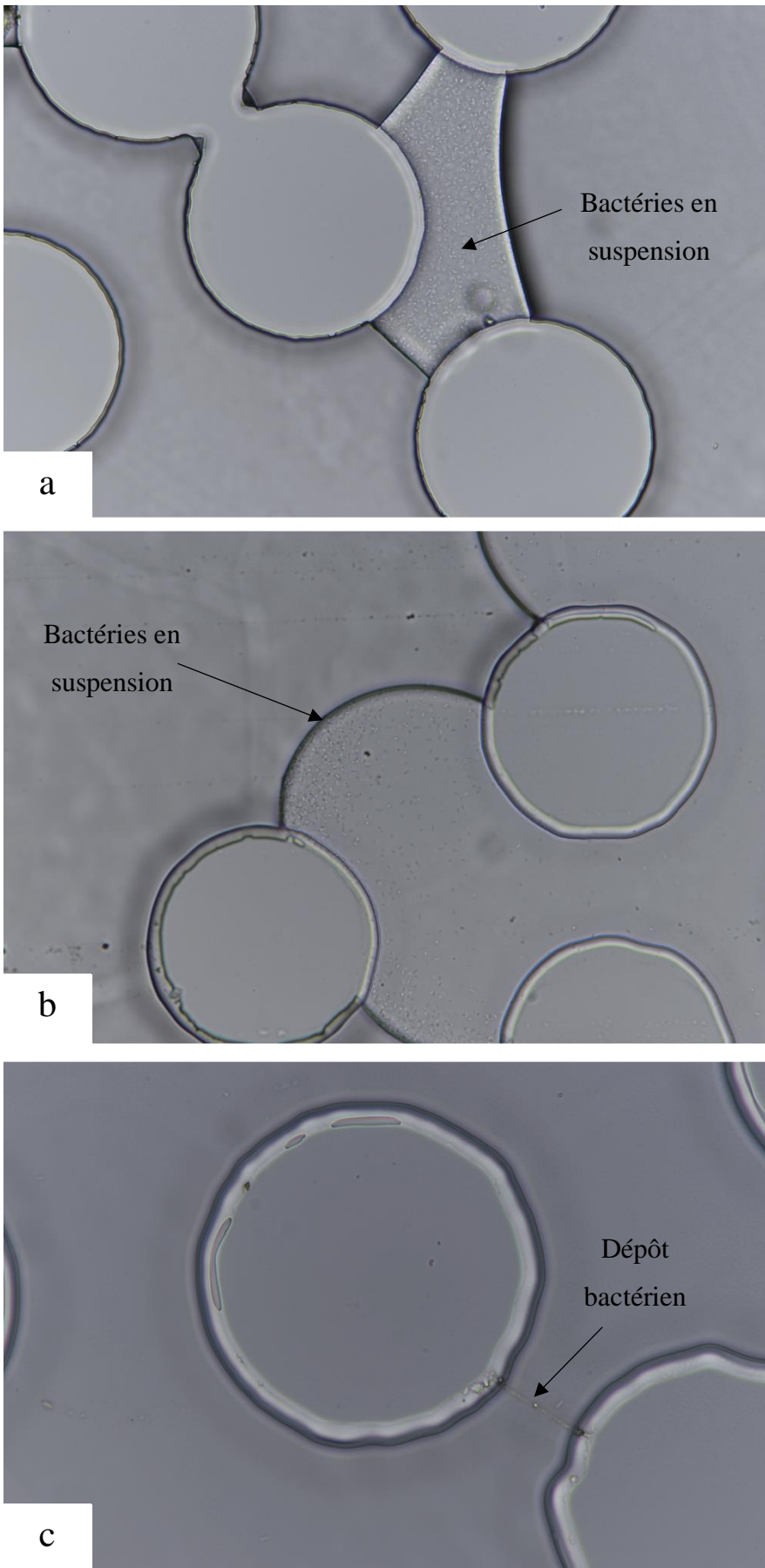


Figure V.10 : Images en microscopie inversée de suspension bactérienne injectées dans le lab on chip en macération avec une suspension de bactéries dans une goutte de solution (a), une concentration de bactéries concentrées à l'interface air-eau(b) et un dépôt de bactérie après évaporation le long de la forme du ménisque d'eau évaporé (c).

III.C.2. Suspension bactérienne en conditions dynamiqués

Lors de cette première expérience en conditions dynamiques, la circulation de faible débit imposée dans le lab on chip n'a pas permis de mettre en place des conditions de saturation complète de la géométrie. La répartition des bactéries observées est différente de celle observée en conditions statiques. D'une part, on retrouve les bactéries dans le flux de solution (Figure V.11). D'autre part, ces bactéries sous forme d'amas et de filaments s'agrègent en biofilms présentant des structures dendritiques hydratées, contrairement aux bactéries observées en conditions statiques (Figure V.11). Des biofilms ont alors une structure propre qui leur permet de s'affranchir des limites des interfaces liquide/gaz, par le développement d'exopolysaccharides (EPS)(Figure V.11) mais également après évaporation du système (Engström *et al.*, 2015) et permet son maintien même en cas de mort cellulaire de certaines des bactéries (Figure V.12).

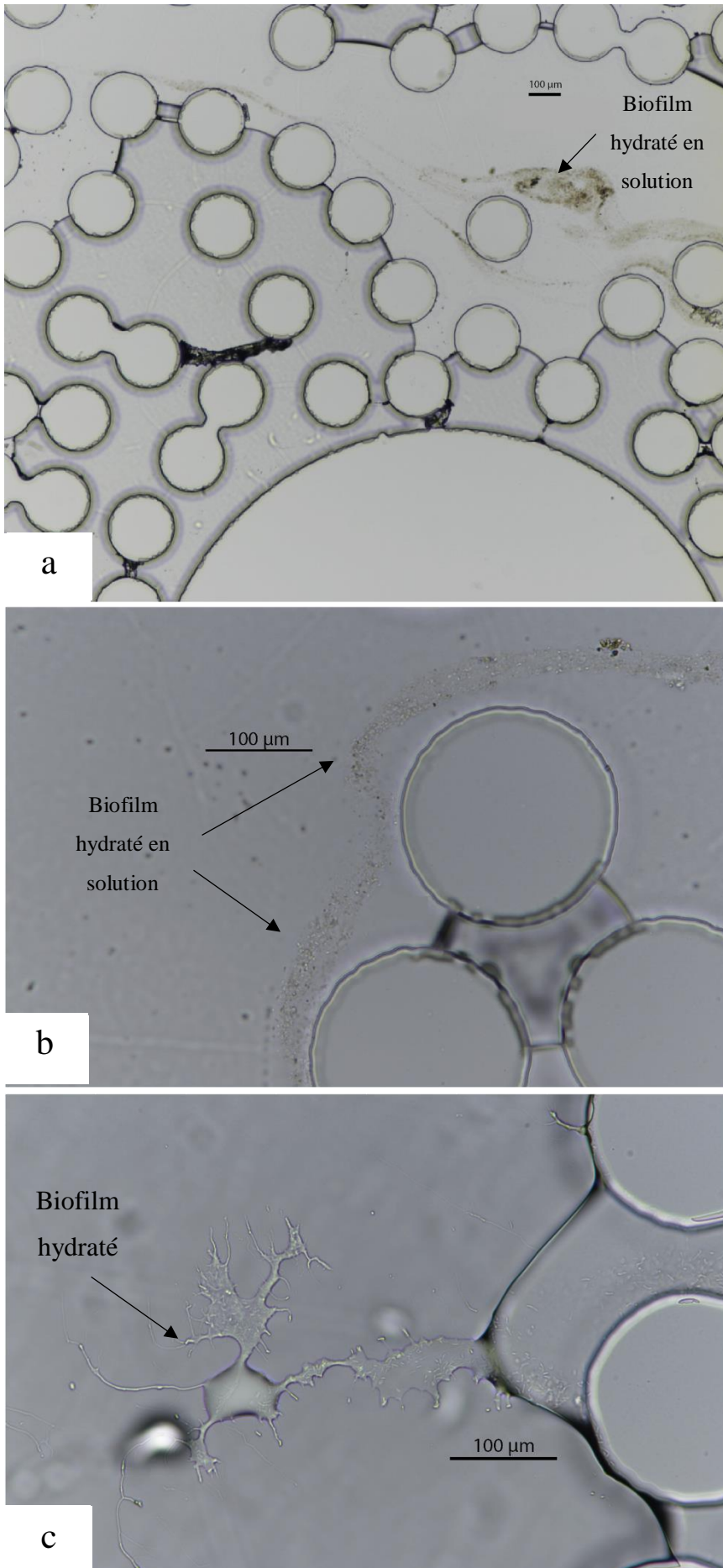


Figure V.11 : Images en microscopie inversée de suspension bactérienne injectées dans le lab on chip en circulation avec des biofilms bactériens structurés dans un canal préférentiel en circulation de solution (a), des biofilms bactériens en contexte de circulation suivant les lignes de courant (b) et un dépôt de biofilms bactériens après circulation en conditions d'évaporation et modification de la forme du ménisque d'eau par la structure dendritique hydratée du biofilm (c).

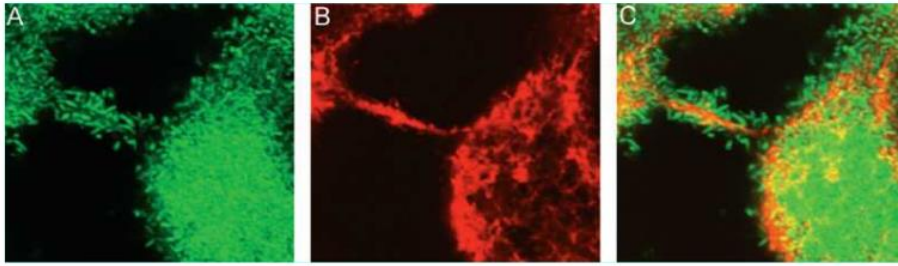


Figure V.12 : Images de fluorescence du biofilms *P. aeruginosa*, d'après Aldeek, 2010.

III.C.3. Devenir des biofilms en conditions dynamiquement de percolation de solution analogue à l'expérience sur colonnes

L'expérience de cinq jours a permis de suivre l'inoculation du milieu avec le dépôt de bactéries, leur installation et développement en biofilms, en conditions insaturées dans le système poreux (Figure V.13). Bien que des conditions de saturation en eau du système n'aient pas pu être mises en place pour être comparées à un état insaturé, ces premières images mettent en évidence la rapidité d'installation des bactéries dans les zones d'écoulement préférentiel du système, structurées en biofilms dans les zones de plus faible vitesse, et par conséquent en quelque sorte en position abritée (Figure V.13). Après trois jours de circulation, ces biofilms sont de plus en plus épais dans les zones d'écoulement préférentiel et en revanche peu présents dans la porosité fine quand une partie de celle-ci est en eau (Figure V.13). A j4, les biofilms semblent plus épais mais toujours contraints par les lignes de courant que le jour j3 (Figure V.13).

Ces différentes observations mettent en évidence les contraintes mécaniques imposées aux biofilms et leur installation dans le flux nutritif. La comparaison des conditions stationnaires et dynamiques met en avant la production de systèmes d'adhérences. Il semble donc que les bactéries soient capables d'adaptation, de la simple adaptation à une sélection de certaines bactéries (cf. chapitre II) comme retrouvé d'après les observations MEB des deux morphotypes distincts de biofilms. On retrouve des bactéries dites planctoniques présentes en suspension dans la solution de percolation, et des bactéries établies en biofilms. Ces observations à petite échelle sont cohérentes, avec les résultats de sélection ou de modification d'activité de la biomasse observés à plus grande échelle sous différentes contraintes de potentiel hydrique (cf. chapitre III). Wagner *et al.*, (2010) montrent une modification des composés

constituant les biofilms en fonction du nombre de Reynolds des écoulements imposés aux biofilms en développement.

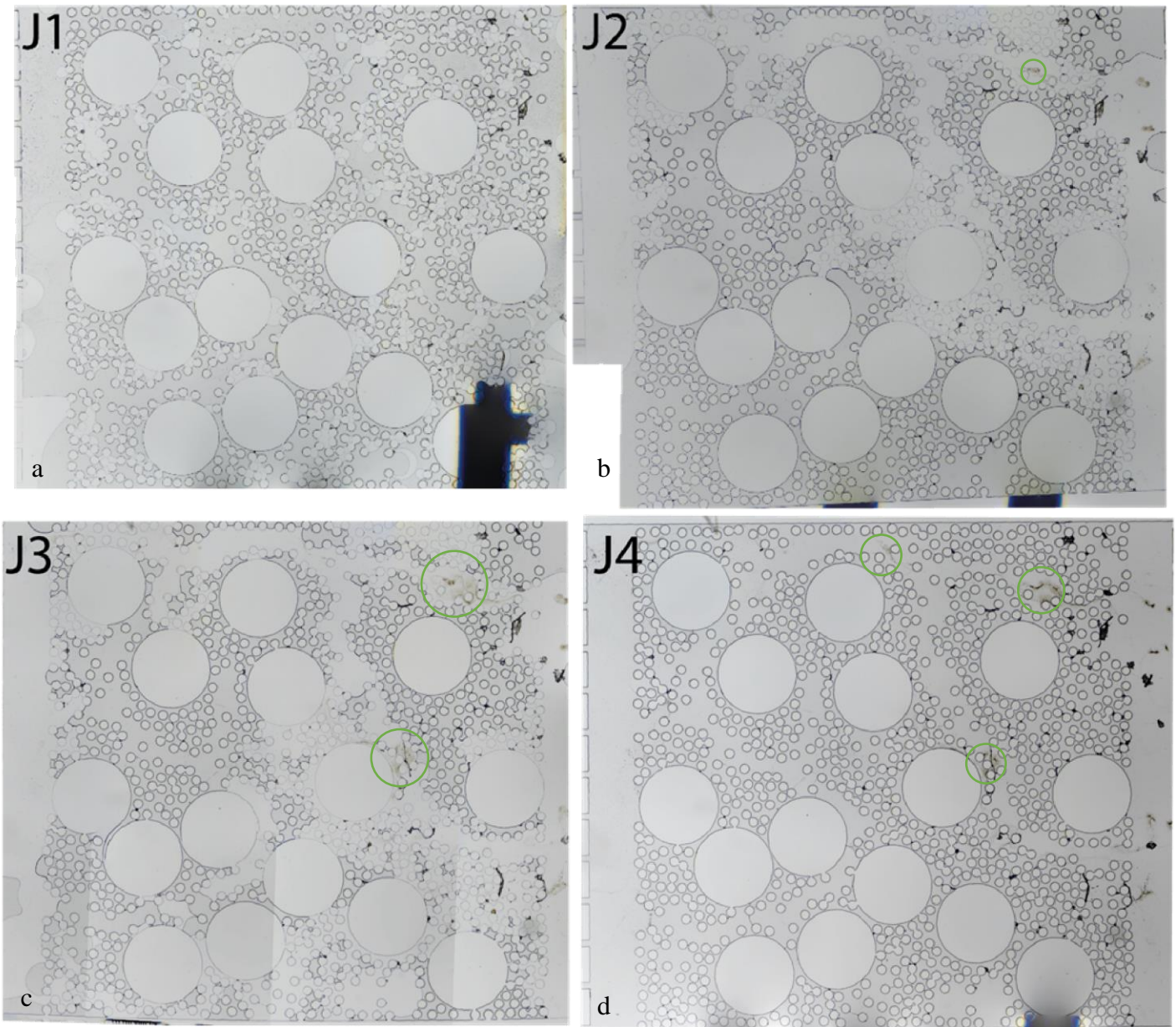


Figure V.13 : Panoramas du lab on chip au cours de l'expérience de quatre jours de J1 à J4. Avec au premier en J1 les conditions initiales à l'injection de solution dans le lab on chip (a), le panorama à J2 montrant l'installation de dépôt bactériens (b), le développement sur ces dépôts de biofilms bactériens (c) et

III.D. Caractérisation de l'échantillon biologique par spectrométrie et micro-spectrométrie confocale Raman pour le suivi in situ des biofilms au sein des GLOCs.

Les premières mesures ponctuelles en spectroscopie Raman ont permis d'obtenir un signal caractéristique du PDMS et du verre. Le PDMS présente un signal avec de fines bandes (matériau cristallin) centrées sur 170, 490, 620, 710, 1400, 2920 et 2980 cm^{-1} (Figure V.14a). Le deuxième support (lame de verre) présente un signal diffus typique de matériaux amorphes (base de donnée RUFF) avec de larges bandes centrées sur 170, 590, 1100 et 2340 cm^{-1} (Figure V.14b). A 2500 cm^{-1} et au-delà, le signal augmente fortement témoignant de la fluorescence du matériau.

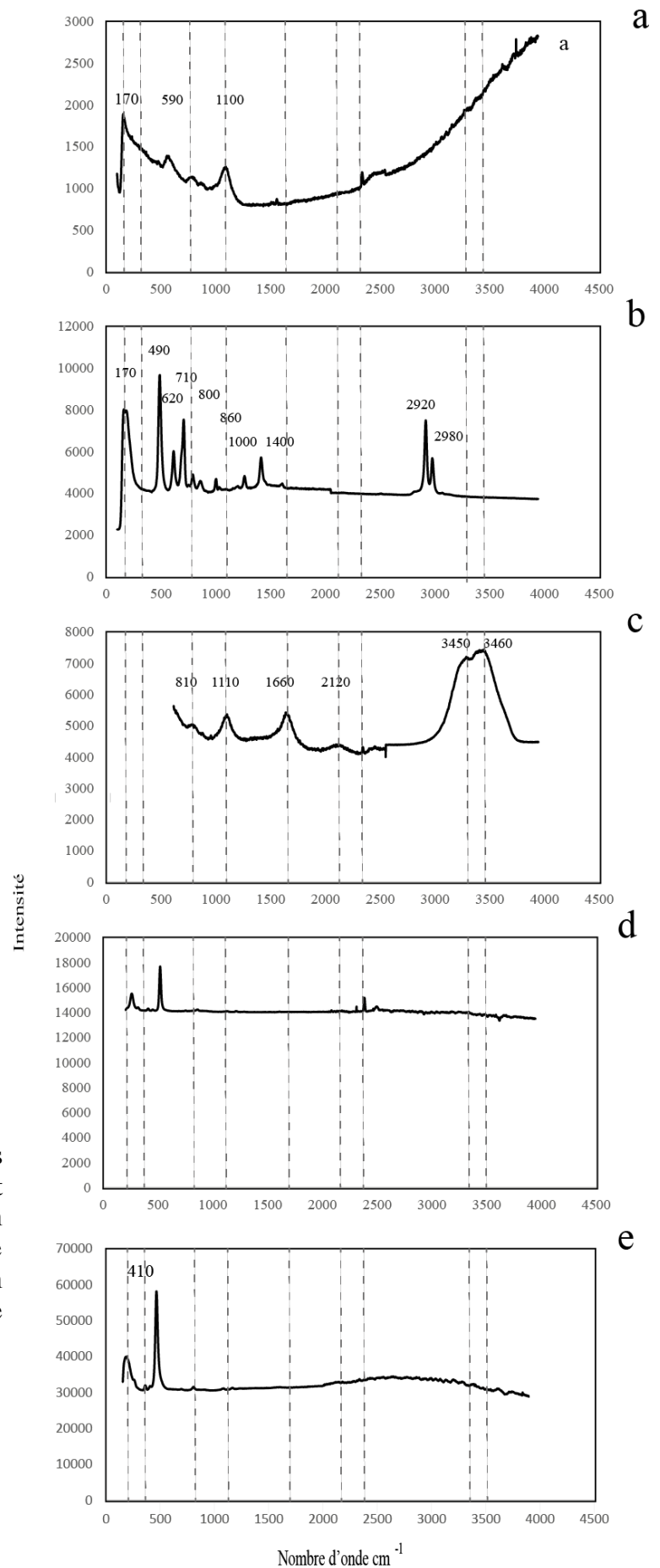


Figure V.14 : Spectre Raman obtenus sur les deux supports ; verre (a) et PDMS (b) et spectre d'un échantillon de suspension bactérienne (c) comparé aux bandes de nombre d'onde des supports (a et b), à un macérât après évaporation (d) et une deuxième solution biologique de test (e).

Selon les données de la littérature, les bandes attendues pour la signature d'échantillons biologiques se situent entre 300 et 3000 cm^{-1} (Figure V.15), (Tableau V.2). La plupart des auteurs analysent les échantillons biologiques de 300 à 2000 cm^{-1} . Les bandes de 2000 à 4000 cm^{-1} peuvent être attribuées à des élongations de liaison de type CH_2 , CH_3 et OH (Figure V.14)(Tableau V.2). Les liaisons type OH traduisent la présence d'eau moléculaire mais peuvent également traduire la présence de polysaccharides ou d'acides nucléiques qui composent les EPS des biofilms (Tableau V.2) (Jamal, 2015). Comme le montre la Figure V.15, les deux supports sont donc susceptibles de masquer le signal de l'échantillon biologique par leur signal important entre 170 et 1420 cm^{-1} et au-delà de 2000 cm^{-1} (Figure V.15a). Le spectre de l'échantillon biologique en suspension déposé sur une lame de verre identique à la lame de verre de référence présente un spectre caractéristique d'eau moléculaire, avec une bande à 1650 cm^{-1} et un signal très fort entre 3000 et 4000 cm^{-1} avec deux bandes distinctes (Figure V.15b). L'échantillon en suspension présente deux bandes diffuses à 3310 et 3470 cm^{-1} . Ces bandes peuvent être masquées par un fort signal de l'eau moléculaire (difficile à obtenir en spectroscopie Raman) ou être attribués aux polysaccharides et acides nucléiques. Deux autres bandes diffuses sont visibles à 810, 1110 cm^{-1} . La bande à 1110 cm^{-1} est également retrouvée sur le signal du verre (Figure V.15b). La bande à 810 cm^{-1} quant à elle n'est retrouvée ni sur le signal du verre ni sur celui du PDMS. Cette bande peut être caractéristique de l'élongation des liaisons O-P-O caractéristique des acides nucléiques présents dans les ARN (tableau V.2), ou encore dans les gammes de nombre d'onde retrouvés pour les acides aminés aromatiques (Tableau V.4). Pour s'affranchir du signal important de l'eau au-delà de 2000 cm^{-1} , également susceptible de masquer le signal de l'échantillon biologique, une mesure a été réalisée sur un échantillon biologique macéré et déposé sur lame de verre puis évaporé. Les résultats ne présentent pas de signal distinct du signal du verre dans la gamme attendue entre 500 et 2000 cm^{-1} (Figure V.15b).

Un troisième échantillon biologique a été analysé (figure V.15b). Cet échantillon se caractérise également par des bandes à 810 cm^{-1} comme l'échantillon de suspension bactérienne. Le reste des bandes retrouvées à 420, 1120 et 2120 cm^{-1} peut correspondre à la signature de liaisons de type carbohydrates, retrouvées dans les polysaccharides, protéines, acides nucléiques et lipides. Ces différents résultats mettent en évidence plusieurs contraintes. Le polymère, bien que biocompatible et très utilisé en micro fluidique, présente une signature forte. L'échantillon biologique présente lui un signal faible avec peu de bactéries en présence dans l'échantillon. Les spectres semblent cohérents avec les spectres biologiques retrouvés en littérature, avec des

signaux de faible intensité et de larges bandes aussi bien pour des souches bactériennes connues (Jamal, 2015) ou sur un consortium bactérien comme étudié dans ce travail (Wagner *et al.*, 2010). Il faut également noter que ce signal varie suivant le matériel biologique observé : les bactéries, les polysaccharides ou encore les protéines des biofilms (Figure V.15). Ces faibles signaux sont également susceptibles de varier si l'on observe l'évolution temporelle d'un biofilm (Figure V.16) (Jamal., 2015). Ceci traduit des modifications de structure de ces biofilms mais également de fonctionnalité. Quelques valeurs du nombre d'onde ou gamme de nombre d'onde référencés dans la littérature permettent cependant de penser qu'un signal, bien que faible, est enregistré pour l'échantillon biologique par cette première approche en spectroscopie.

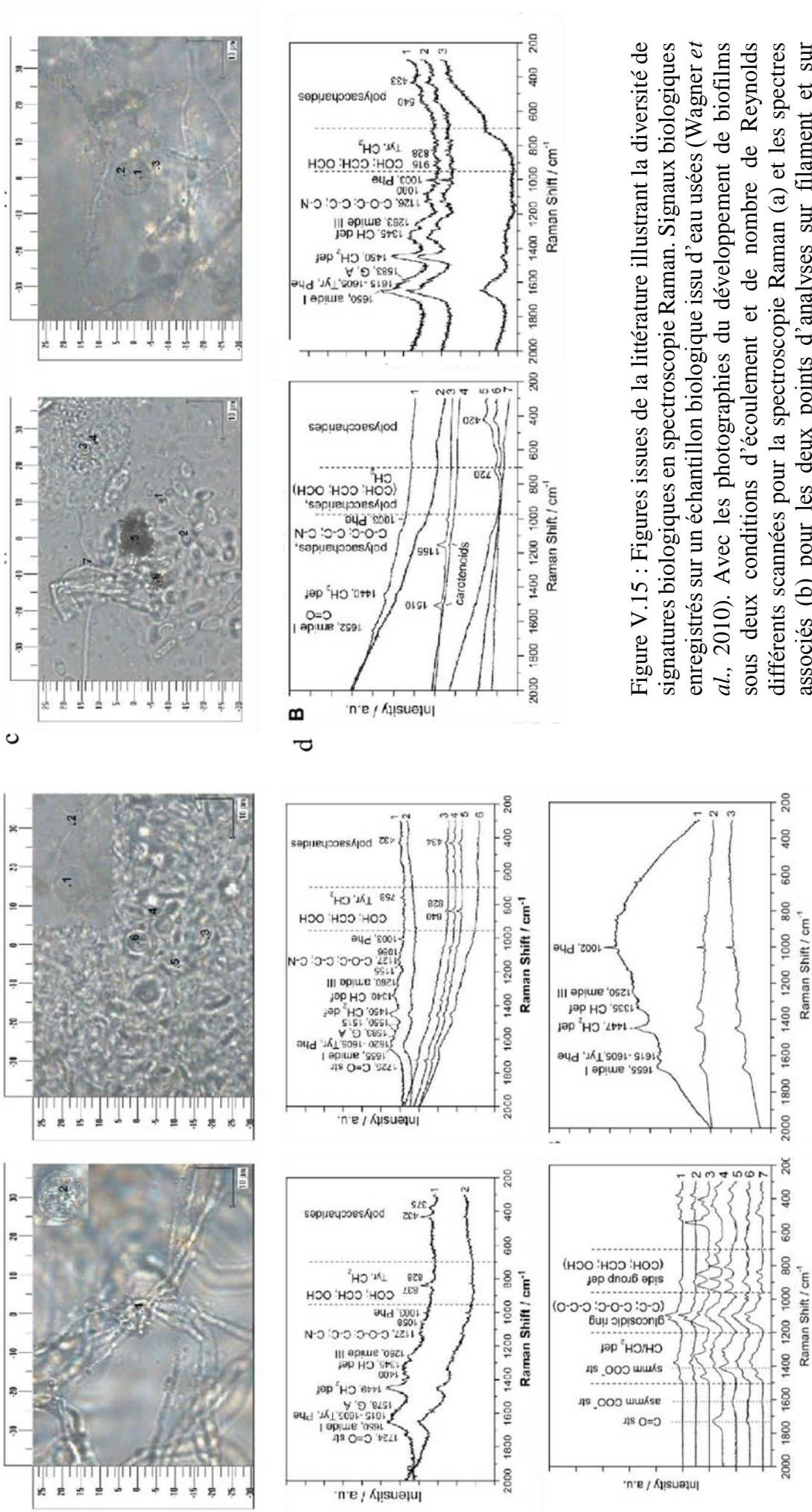


Figure V.15 : Figures issues de la littérature illustrant la diversité de signatures biologiques en spectroscopie Raman. Signaux biologiques enregistrés sur un échantillon biologique issu d'eau usées (Wagner *et al.*, 2010). Avec les photographies du développement de biofilms sous deux conditions d'écoulement et de nombre de Reynolds différents scannées pour la spectroscopie Raman (a) et les spectres associés (b) pour les deux points d'analyses sur filament et sur cellules du biofilms (1 et 2). Photographies (c) spectres associés de deux biofilms à différents temps de croissance (d). Spectres de deux types de constituants des biofilms, polysaccharides et protéines (e).

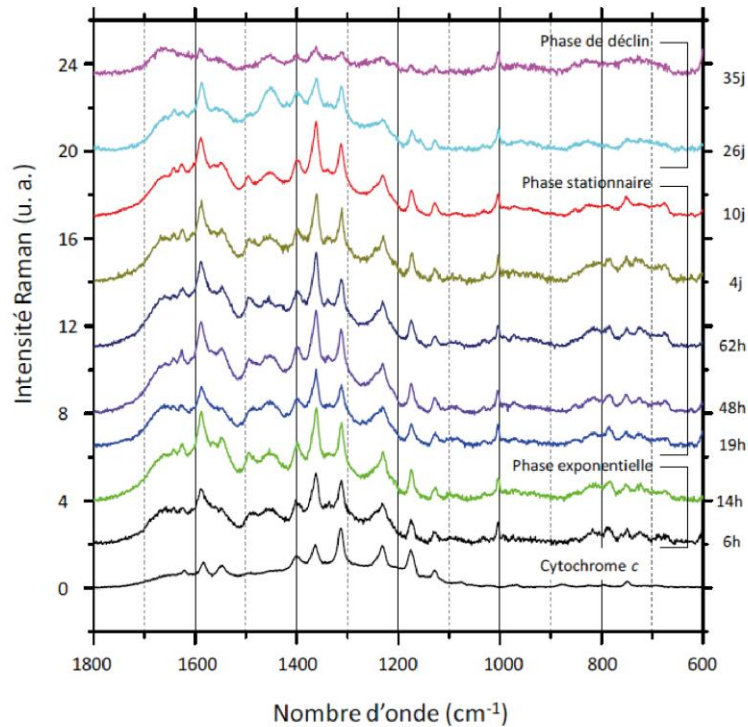


Figure V.16 : Spectres Raman à différents temps de culture de culots bactériens partiellement hydratés. D'après Jamal, 2015.

Pour tenter de mieux observer la signature de l'échantillon biologique, les analyses en spectroscopie confocale Raman ont été réalisées pour tenter d'atteindre l'échelle des biofilms (μm) et de cartographier une zone d'intérêt avec un développement de biofilm *in situ* visible autour du PDMS et/ou de la lame de verre dans le micro-modèle clos (Figure V.13). Les deux supports ont été analysés et l'échantillon biologique analysé après 5 jours de développement du biofilm dans le micro-modèle. Les analyses ont été effectuées sur i) le biofilm dans le micro-modèle en conditions hydraté ii) après évaporation de l'eau et iii) sur lame de verre après retrait du PDMS.

Les mesures obtenues en conditions confocales et par cartographie ont permis d'investiguer plus en détail les signatures de l'échantillon biologique entre les bandes 500 et 2000 cm^{-1} . Le PDMS présente un signal identique à celui retrouvé pour le premier test de spectroscopie ponctuelle, avec des bandes principales centrées sur 170, 490, 620, 710 et 1400, 2920 et 2980 cm^{-1} . Le verre présente un signal caractéristique de la silice avec des bandes centrées sur 186, 570 cm^{-1} avec une fluorescence en fin de spectre vers les hautes fréquences (Figure V.17). Le signal important du polymère et de la lame de verre ne permettent pas de distinguer le signal

des bactéries (Figure V.18). Les analyses par cartographie montrent un spectre unique en tout point de la zone d'analyse bien que le biofilm soit visible (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

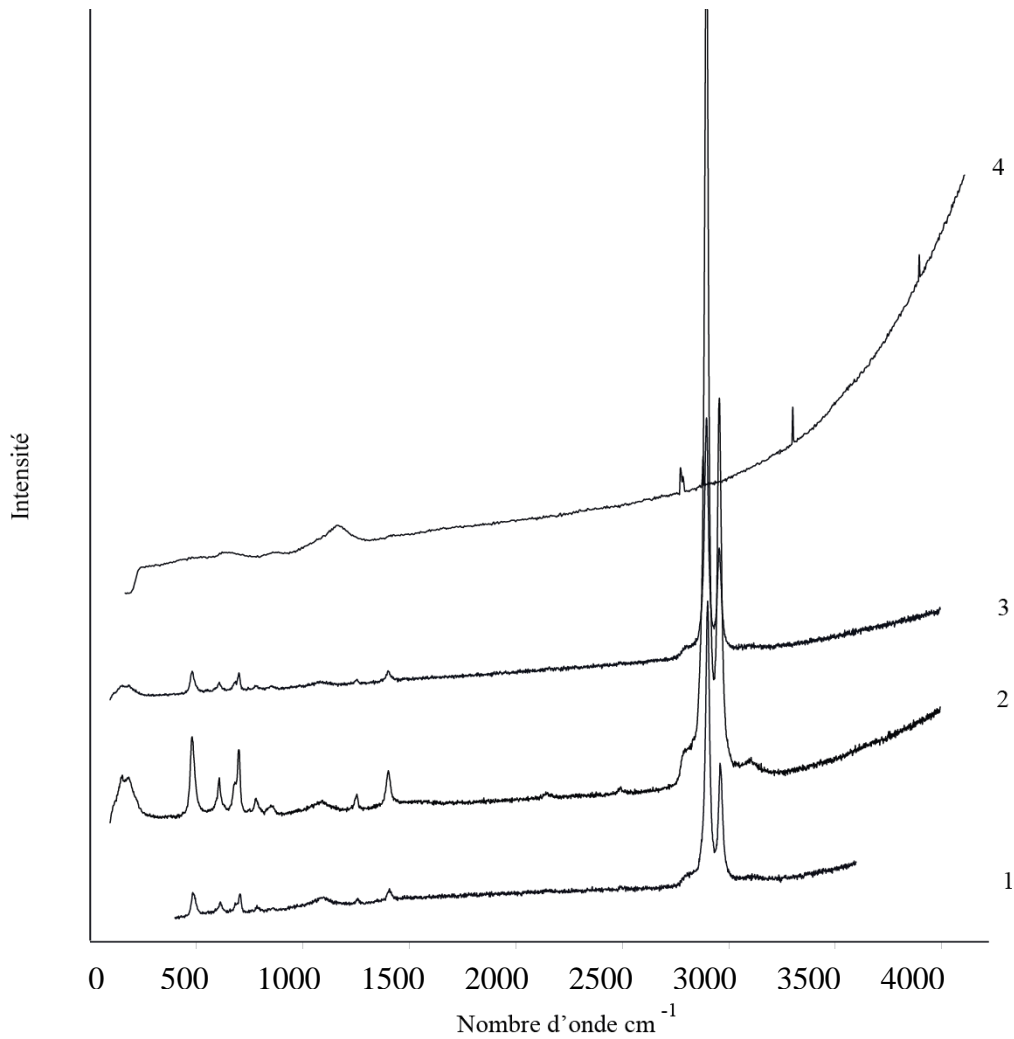


Figure V.17 : Spectres Raman des échantillons biologiques analysés sur une zone de biofilms développé de 5 jours, grossissement 20x en système clos (1), sur une seconde zone de biofilm (2), sur le premier support PDMS (3) et sur de la lame de verre (4).

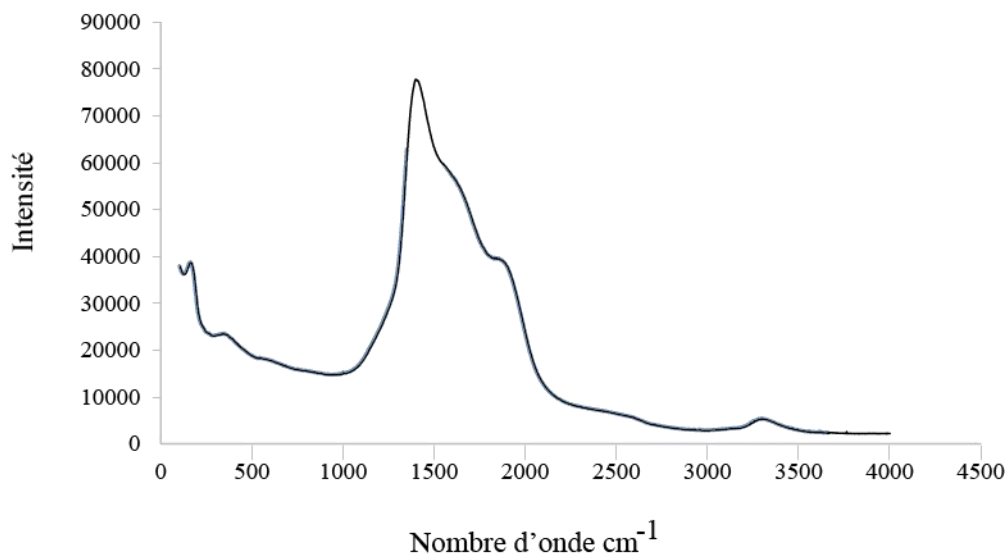
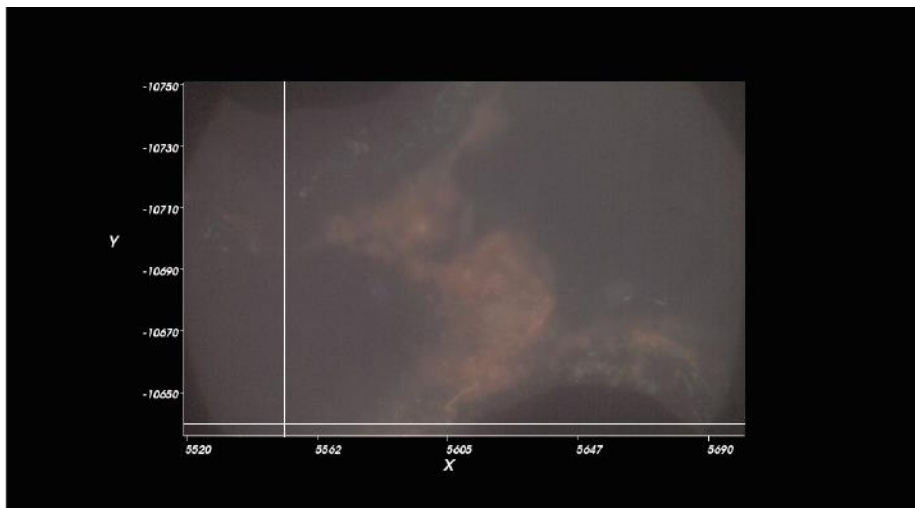


Figure V.18: Image de biofilms après 5 jours de développement en système clos, grossissement 100x (a) et spectre d'analyse de ce biofilm par spectroscopie confocale cartographique.

Plusieurs pistes sont envisageables pour expliquer le faible signal des bactéries :

- les biofilms déposés en 5 jours sur les parois de la lame de verre ou du PDMS rendent la focalisation difficile avec les équipements spectrométrique Raman classiques. Trop peu de matériel biologique étant présent à l'issue de l'expérience, les groupements chimiques spécifiques aux biofilms ne seraient pas identifiables. Il faudrait alors envisager des expériences de plus longue durée pour les volumes de biofilm suffisants pour que le signal qui leur est lié émerge du bruit de fond causé par la lame de verre et au PDMS ;

- Une autre façon de procéder pourrait consister à diminuer le bruit de fond en diminuant l'épaisseur du PDMS et en utilisant une lame d'une autre composition chimique.
- La fluorescence importante des échantillons peut être attribuée aux supports ou à l'échantillon biologique.
- Plusieurs puissances lasers peuvent être utilisées. Ici, à 514 nm, les matériaux, notamment le verre, présentent une forte fluorescence. L'augmentation de la puissance laser diminue cette fluorescence. Une telle augmentation peut amplifier le signal biologique mais risque de déstructurer et détruire les biofilms, ce qui n'est pas compatible avec une observation *in situ*, sur plusieurs pas de temps.

Ces premiers résultats sur la solution d'inoculation ont permis de penser qu'une mesure d'un signal biologique était possible sur ce type de solution de concentration en bactéries identiques à des concentrations retrouvées dans la nature par percolation de l'eau au travers du sol. Les mesures sur système clos, malgré un développement de biofilm visible en microscopie ne permettent pas de suivre une expérience sur un GLoC fabriqué en PDMS. Plusieurs améliorations sont envisageables pour pouvoir suivre une expérience *in situ* :

- notamment la fabrication des lab on chip avec un matériau plus adapté avec un signal très spécifique hors des gammes de nombre d'onde attendues pour les signaux des échantillons biologiques,
- utiliser des techniques permettant d'amplifier les réponses des signaux biologique comme les techniques d'amplification des signaux par exaltation de surface (SERS : Surface Enhance Raman Spectroscopy)
- ou encore l'utilisation du saphir pour ses propriétés de transparence.

Des analyses sont en perspective sur un nouveau dispositif permettant le couplage entre un spectromètre Raman et un microscope à fluorescence. Cela permettrait d'obtenir une meilleure focalisation sur les objets biologiques et des suivis possibles par coloration et fluorescence des bactéries, ou encore des indicateurs colorimétriques (pH, redox, O₂). Une adaptation de la fabrication des lab on chip est également envisageable avec notamment des matériaux type amorphes, une géométrie permettant d'accéder à des zones de l'échantillon par des fenêtres d'acquisition.

IV. conclusion

L'observation des bactéries dans les systèmes GLoCs montre une adaptation des biofilms aux contraintes dynamiques, en témoignent les morphologies différentes des biofilms. En conditions dynamiques, les bactéries s'agrègent en biofilms et l'on peut observer la production d'EPS permettant l'adhésion des bactéries entre elles et au support.

Les conditions expérimentales dynamiques ont créé un système insaturé. Ceci met en avant les difficultés expérimentales pour obtenir un système proche du système en colonne ou naturel. En effet, les écoulements et la répartition des films aqueux dans la porosité la plus fine n'est pas observée, alors que sur les colonnes insaturées, la capillarité induit des écoulements dans la porosité la plus fine en priorité. Cette configuration a permis d'observer un premier critère d'installation du biofilm dans les zones de circulation d'eau et d'apport de nutriments. Les biofilms s'installent en priorité dans ce flux en adhérant au support, le plus souvent dans des zones de moindre vitesse, à l'arrière de piliers, dans des zones abritées. Les conditions insaturées induites par la mise en œuvre expérimentale ne permettent pas en l'état de discuter de l'installation des bactéries au sein de la plus petite porosité. Seules quelques zones du lab on chip permettent d'observer un développement au sein de poches localisées dans la porosité la plus fine. L'évaporation ou la pression insuffisante d'injection de la solution dans le micro modèle montre les limites de création de systèmes analogues en termes de vitesse par rapport à un milieu naturel. Néanmoins, ces conditions induites par l'expérience de désaturation en eau du milieu soulèvent également la question de l'observation du potentiel d'un biofilm à résister aux cycles d'humectation/dessiccation. Plusieurs scénarii existent dans la littérature pour la modélisation des déplacements bactériens (Engström *et al.*, 2015). La prise en compte du biofilms dans les modélisations est importante. Comme discuté dans le chapitre III, les biofilms peuvent également produire des sous domaines de porosité dans la porosité du milieu, qu'il est important de prendre en compte.

Une modélisation via l'outil OPEN FOAM a été initiée, et permettra de modéliser en 3D les lab on chip afin d'extraire des données plus pertinentes sur un suivi d'expérience avec entre autre : la distinction des différents champs de vitesses, avant et après développement de biofilms, le suivi du pH par des indicateurs colorimétriques (Florea *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013), le suivi de l'O₂ par des membranes (Deng *et al.*, 2013), et l'identification de sous domaines poreux du biofilm. Elle permettra également une modélisation 3D sur les objets en colonne. Ces

modélisations permettront également d'extraire des fonctions de densité de probabilité (pdf) de vitesse (Couzinet, 2008) permettant d'identifier à chaque pas de temps les sous domaines de porosités créés au sein de la petite porosité ou par le développement de biofilm (Carrel et al., 2018). Une observation sous UV ainsi que des colorations en microscopie à fluorescence permettraient également de mieux suivre le développement du biofilm. Ces techniques de fluorescence ont déjà été étudiées pour la détection des métaux comme le plomb (Zhao et al., 2009).

Les premiers tests Raman dans le cadre de cette étude ont montré la limite du polymère dans un contexte de faible développement biologique. Ceci révèle la difficulté d'adapter des techniques analytiques déjà utilisées en biologie avec un nouveau système expérimental d'observation. L'adaptation du polymère reste une question en vue des analyses Raman.

Synthèse

Ce travail de thèse s'est articulé autour quatre grands axes : une approche de caractérisation de la physique du milieu poreux, une quantification et une caractérisation géochimique des eaux de percolation, une approche d'imagerie et enfin un suivi en GLoCs permettant de changer l'échelle d'observation. Ce couplage d'approches a permis de suivre non seulement le fonctionnement biogéochimique d'un milieu poral bimodal au sein duquel une solution riche en éléments traces circule mais aussi en se donnant la possibilité d'observer ce milieu poral, en particulier de localiser l'activité microbienne. L'objectif est ici d'apporter des éléments de réponse à la question du devenir des éléments traces dans un sol contaminé en comprenant mieux les interactions avec la biosphère présente de façon naturelle dans le sol, et de déterminer ainsi dans quelle mesure l'activité biologique peut être un des paramètres majeurs de l'activité géochimique des micro-habitats (Hanzel *et al.*, 2013). Si la visualisation des biofilms *in situ* sur des échantillons naturels reste un défi, le choix a été fait ici de travailler sur un système simplifié d'un point de vue de la structure du milieu poreux, tout en conservant des conditions de complexité naturelle pour l'alimentation en solution de percolation et pour la microflore. Ce travail propose une approche intégrée multiparamétrique pour l'observation à petite échelle. La réduction de l'échelle a permis de définir la résolution des processus biogéochimiques observés.

Deux défis se sont imposés pour répondre à ces objectifs : *i*) proposer un système expérimental analogue et fonctionnel pour l'étude biogéochimique de la percolation d'eaux contaminées dans les sols et *ii*) contraindre le système pour permettre l'observation de développements de biofilms dans ces conditions semi-contrôlées analogues aux conditions naturelles avec un consortium naturel. Cette approche est peu fréquemment mise en œuvre dans la littérature, contrairement aux systèmes expérimentaux contrôlés à l'aide d'une souche unique de bactéries.

Les observations issues de ce travail ont permis de valider le dispositif expérimental et de proposer des améliorations, d'apporter des informations sur les interfaces biophysiques et biogéochimiques dans les milieux poreux, à travers l'activité des biofilms au sein de micro environnement de ce milieu poreux.

Le dispositif expérimental sur colonne a été conçu de façon à pouvoir mettre en œuvre le suivi de paramètres physiques, géochimiques et d'imagerie du milieu artificiel expérimental simplifié. Il a donc été pensé comme un compromis entre les possibilités et les contraintes analytiques (tailles d'échantillons, volumes de prélèvements de solution) et les besoins de création des modalités expérimentales permettant de répondre à la problématique (débits analogues aux milieux naturels, quantité de biomasse). Le dimensionnement des colonnes a été réalisé en fonction de la résolution voulue pour les images en micro tomographie à rayon X, tout en conservant une taille de colonne adéquate pour un suivi des écoulements analogues à des écoulements dans un milieu sableux naturel. La taille des colonnes a en grande partie conditionné les types de suivi. La réduction d'échelle de colonnes analytiques instrumentées comme retrouvées dans la littérature nécessite une adaptation importante.

Le choix des paramètres suivi a été établi de façon à pouvoir réaliser des analyses variées. Bien que certains paramètres restent assez indirects, c'est avant tout la stabilité des conditions expérimentales et le couplage des différentes analyses qui a permis d'observer un comportement global des milieux géochimiques. Le suivi hydriques a été mené avec les variables de teneur en eau bien que les études actuelles tendent à montrer que des paramètres comme la connectivité hydraulique ou encore la perméabilité, soient des paramètres plus robustes et précis. Il en a été de même pour le suivi de l'activité bactérienne, avec les mesures de concentration en carbone organique dissous des eaux de percolation en sortie de système. De même les observations réalisées en microscopie électronique à balayage sur MEB environnemental ont été effectuées sur des fractions de sable en tête de colonne et n'ont pas fait l'objet d'un protocole de fixation des échantillons comme on peut le retrouver dans la littérature. Ce suivi pouvant s'apparenter à un suivi global à l'échelle de la colonne apporte en réalité de nombreuses informations complémentaires, de par la taille des colonnes qui permettent de réduire l'échelle d'observation. La réalisation du banc expérimental complet a permis de suivre quatre colonnes en parallèle pour distinguer quatre conditions ou modalités expérimentales.

Le suivi du potentiel redox et pH ont été mis en place pour tenter d'approcher les conditions de spéciation des métaux dont les concentrations ont été mesurées en sortie de système. Ce suivi a été délicat à mettre en place au vu de la sensibilité des électrodes de mesure.

La conception du milieu poreux bimodal reproductible a permis de pouvoir comparer les quatre lignes expérimentales et de faire varier les paramètres principaux, comme la teneur en eau

créant deux modalités saturées et insaturées et la présence de microorganismes avec les modalités biotiques – abiotiques. Le suivi des conditions a donc pu être réalisé en parallèle dans les mêmes conditions d'alimentation du système, de température et ainsi permettre de faire varier une seule modalité à la fois. Le choix des modalités a permis de comparer dans les mêmes conditions expérimentales l'influence de la variabilité hydrique des milieux et également de l'impact de l'activité microbienne.

Le défi à cette échelle a également été de dimensionner les apports en solution en entrée du banc afin de rester dans des gammes de vitesses et débits proches de ceux retrouvés dans la nature tout en permettant d'obtenir un volume de prélèvement suffisant, avec des pas de temps de prélèvement qui restent représentatifs du système (temps de séjours). Une des questions principale était de rester représentatif d'un système naturel et de ne pas créer un système de laboratoire complètement artificiel.

Le choix du consortium bactérien issu du site naturel au-delà d'une approche novatrice a permis également de participer à la stabilité du banc expérimental.

Le choix des paramètres a également été important. L'étude *in situ* nécessitant le moins de dégradation possible, le choix a été fait de ne retenir que certains paramètres et certains types d'analyse, au risque de ne pas choisir les plus pertinents, comme expliqué précédemment. Cependant, la diversité des données obtenues a permis d'intégrer un nombre varié de paramètres afin de comprendre le fonctionnement global de ce milieu à petite échelle. Les données ont donc permis de valider notre système expérimental, mais également de proposer une interprétation des processus biogéochimiques. Si les paramètres pris indépendamment ne sont pas optimisés, l'ensemble des données a permis de distinguer statistiquement nos conditions expérimentales, cohérentes avec des gammes de valeurs retrouvées sur des sites naturels, ou des études antérieures en batch ou colonne.

Les premiers résultats ont permis de valider le système expérimental. Il était difficile d'appréhender au mieux la représentativité du système à cette échelle, au vu du nombre de paramètres pris en compte dans tout le dispositif. Les dispositifs expérimentaux se sont avérés prometteurs pour plusieurs aspects. Tout d'abord, la reproductibilité des colonnes a permis de s'affranchir d'un éventuel effet de matrice. Les quatre modalités expérimentales mises en place se sont distinguées par des réponses chimiques distinctes, créant ainsi quatre environnements

bien différenciés. L'ensemble des données géochimiques a permis de conforter cette signature. De plus les gammes de potentiel redox et de pH retrouvées pour les quatre modalités sont cohérentes avec des valeurs retrouvées pour les systèmes naturels.

Le suivi du potentiel redox, rarement établi sur les sols naturels, en raison des biais importants liés à la mesure, en complément des suivis de conditions pH, a permis d'intégrer l'activité biologique, régie par les réactions redox, à l'étude globale des systèmes sur colonnes. Il en a résulté des premières données surprenantes vis-à-vis des hypothèses d'évolutions des potentiels redox entre les modalités de l'expérience, et au cours du temps, avec les tendances observées entre conditions biotiques- abiotiques et saturées insaturées, révélant un système plus complexe, mettant en jeu des paramètres limitants différents de ceux retrouvés en conditions naturelles, comme l'oxygène et la matière organique. Ces résultats peuvent être liés au fait que dans les colonnes, le support de sable ne contient pas de matière organique, contrairement à un sol naturel fertile. Cependant, notre système expérimental peut représenter les processus se déroulant dans des technosols, très minéraux et pauvres en nutriments. Ces caractéristiques sont courantes sur les friches industrielles. Les évolutions des potentiels redox entre les conditions biotiques et abiotiques, surprenantes a priori, se sont révélées être un des paramètres importants dans la compréhension de notre système, permettant de juxtaposer les connaissances sur le fonctionnement du métabolisme microbien (dépendant des échanges d'électrons) avec l'ensemble des données.

La variété d'expériences mises en place dans la littérature ne permet pas toujours de comparer précisément des données d'une expérience à une autre, d'autant plus dans le cas d'expériences avec des contraintes de type de sol ou de matrice, l'utilisation d'une souche pure de bactéries ou encore des caractéristiques d'alimentation en solution différentes par exemple. De plus le couplage entre une expérience de laboratoire contrôlée et des apports naturels, peu retrouvé dans la littérature (solution de sol, consortium microbien) n'ont pas toujours permis de dimensionner au mieux ou de prévoir les gammes de concentrations attendues. C'est le cas par exemple des analyses de la spéciation de l'As, des analyses de méta-génomique pour l'étude de la diversité microbienne. Cependant cette première expérience a permis d'identifier des améliorations pour permettre d'intégrer ces nouveaux paramètres.

Le banc expérimental créé pourrait être amélioré par un dimensionnement plus précis du suivi des teneurs en eau. La multiplication des modalités pourrait permettre de mettre en place deux doublons biotiques saturés et insaturés permettant d'obtenir de meilleures images par microtomographie, en dédiant ces colonnes à l'amélioration des protocoles d'acquisition. Un autre

doublon pourrait être consacré au prélèvement d'échantillons suffisamment riches en ADN, ou le suivi de paramètre comme la respiration au sein des milieux. Au vu des faibles quantités de biomasses présentes dans le système, l'expérience pourrait également être reconduite sur une plus longue période, ce qui permettrait d'obtenir plus de points de prélèvement et vérifier si la stabilisation du système observée est pérenne ou non.

L'expérience sur lab on chip ou GLoCs a également permis un retour sur expérience primordial pour l'amélioration des techniques. Ces travaux, bien que préliminaires, permettent d'entrevoir de nombreuses perspectives. Les observations qualitatives effectuées pourraient être complétées par des informations quantitatives grâce à de nouvelles expériences, de nouveaux traitements d'images obtenues en microscopie et d'une modélisation en lien avec les observations expérimentales permettant une analyse statistique (probabilité de distribution des gradients de vitesse PDF). Des analyses géochimiques sur les micros modèles pourraient également être mises en place. Néanmoins les premières observations sur lab on chip sont cohérentes avec les observations et résultats obtenus sur les colonnes. Elles ont permis d'apporter de nouvelles observations quant au comportement des biofilms en conditions dynamiques. L'étude Raman a également mis en évidence la complexité de l'analyse d'échantillons présentant des développements biologiques analogues à des conditions naturelles, sans développement amplifié dans les GLoCs. Les données obtenues en spectroscopie vibrationnelle Raman présentent un faible signal au vu du peu de biomasse développée mais présentent des signaux similaires à ceux retrouvés dans la littérature sur des échantillons biologiques. Si le polymère a été longtemps utilisé pour l'observation sous microscope des biofilms, en électrochimie ou en médecine, ou encore la création de réacteurs microbiens pour l'observation et la production de molécules, le suivi de biofilms se développant en conditions proches de celles des sites naturels, *in situ* dans ce genre de GLoCs reste un défi. L'adaptation des techniques déjà utilisées sur souches ou culots bactériens sur lame, telles que la spectroscopie vibrationnelle Raman reste à perfectionner sur ce genre de systèmes expérimentaux. Les premiers résultats permettent déjà de réfléchir à une optimisation des systèmes expérimentaux.

Ces deux bancs expérimentaux imaginés autour d'une structure analogue montrent la complexité d'adaptation de techniques et la nécessité de développer des outils toujours plus adaptés aux particularités hétérogènes des sols. Ils ont aussi permis d'observer le développement de biofilms dans des zones similaires et de montrer la capacité d'adaptation du biofilm au stress hydrique mécanique (GLoCs) mais également géochimique (colonnes). Le

développement d'analyses géochimiques sur les GLoCs permettrait de préciser les observations faites sur la globalité des colonnes.

La localisation de l'activité bactérienne a été une des analyses les plus complexes à mettre en œuvre. Dans la littérature cette question est traitée selon plusieurs angles d'approches. De nombreux travaux en science du sol se sont attachés à comprendre l'évolution de la biomasse microbienne des sols sous les effets mécaniques liés aux changements de saturation en eau des sols, à différentes échelles, sous l'influence de divers paramètres comme la teneur en eau, la connectivité des films aqueux, les potentiels matriciels de l'eau (cf chapitre I). Ces hypothèses ont également été développées en écologie microbienne et l'eau est alors vecteurs de nutriments et peut donc être un facteur limitant au fonctionnement de certaines communautés. En écologie microbienne toujours, la diversité, la sélection et la compétition des espèces sont régis par la connectivité de ces films aqueux permettant la mise en contact d'espèces en compétitions vis-à-vis des nutriments ou encore des conditions d'oxygénation. Les approches pluridisciplinaires tendent à émettre des hypothèses à petite échelle (μm à la centaine de μm) quant aux processus de régulation/transformation des cycles de nutriments et contaminants. On distingue ainsi des paramètres de régulation de mise en place des microorganismes, les paramètres limitants, et de remaniement des biofilms leur permettant de subsister (Nunan *et al.*, 2003; Totsche *et al.*, 2010).

L'approche pluridisciplinaire développée au cours de ce travail a permis de mettre en avant les effets de la saturation en eau du milieu poreux. La variabilité du degré de saturation a ici été utilisée comme paramètre à l'échelle de la colonne pour modifier les conditions d'oxygénation du milieu et modifier les chemins d'écoulement, les vitesses de circulation du fluide et par conséquent les temps de séjour. Si le degré de saturation a été le premier paramètre utilisé sur le banc expérimental pour la mise en place des conditions géochimiques de départ de l'expérience, le système a montré à cette échelle d'observation (cm) la possibilité d'observer les rétroactions des microorganismes sur leur milieu. En effet, les adaptations morphologiques de structure des bactéries, décrites en écologie microbienne (le développement de tapis microbiens, la formation de biofilms et la sécrétion d'EPS) (Or *et al.*, 2007) ont pu être observées expérimentalement au cours de ce travail, que ce soit sur les milieux poreux en colonne (images MEB) ou dans les lab on chip avec des observations de morpho-phénotypes différents entre les conditions stationnaires et dynamiques. Ces adaptations de support ont permis aux biofilms de

se développer mais également d'avoir un effet sur leur environnement géochimique proche nous y reviendrons.

Les hypothèses de localisation des biofilms, de leur colonisation dans le milieu restent indéterminées. De nombreuses études ont montré le lien entre les caractéristiques hydriques d'un système et la biomasse microbienne. Tout d'abord, les hypothèses de localisation, bien que toujours « conflictuelles » dans la littérature, au vu des nombreux systèmes expérimentaux, ont permis d'être appuyés ici, par l'observation directe du développement des biofilms ainsi que des traceurs de leur activité (carbone). Durant ce travail, l'analyse des images 3D a été optimisée pour l'observation de biofilm, de l'acquisition au traitement d'images. Les observations n'ont pas permis de montrer avec certitude une localisation précise des biofilms au sein du milieu poreux. Contrairement aux études sur souche pur développées dans la littérature, une faible quantité de biomasse semble s'être développée dans les conditions expérimentales.

L'observation des images en 3D, avec seuillage visuel a permis d'estimer la présence de biofilms dans les pores les plus grands du système bimodal.

Les micro modèles ont également permis d'observer un développement de biofilms influencé par la dynamique du système, différent en condition dynamiques par rapport aux observations réalisées en conditions statiques. Le biais expérimental de remplissage du micro modèle ne permet pas de conclure quant à la localisation du biofilm entre petite et grande porosité, cependant des développements de biofilms sont observés en bordure du chenal préférentiel d'écoulement, correspondant à des zones de faible gradient de vitesse. Ceci met en avant la régulation mécanique des développements de biofilms, par les vitesses d'écoulement dans le micro-modèle. L'utilisation de débits suffisants pour saturer la petite porosité pourrait être complètement incohérent avec des vitesses naturelles. Les analyses envisagées n'ont pas pu toutes être réalisées, mais les perspectives d'amélioration des techniques expérimentales sur les GLoCs sont nombreuses, et pourraient permettre d'adapter ces techniques à des écoulements analogues aux conditions naturelles.

Les deux techniques permettant l'observation des biofilms ont été biaisées par la résolution des images pour la micro tomographie et par un biais expérimental de remplissage pour GLoCs.

Cependant, les observations d'images MEB, bien que les sables aient été déstructurés montrent des biofilms adhérant sur les particules de sables les plus grossiers. Le couplage des techniques d'observation et des résultats de quantification du carbone organique et inorganique sur les

fractions granulométriques de sables en fin d'expérience montrent des concentrations plus importantes en carbone inorganique sur les fractions les plus grossières, pouvant témoigner d'une activité de minéralisation plus importante sur cette fraction granulométrique.

Les conditions hydriques, dans un premier temps, ont donc permis de différencier en partie le biofilm. Deux morpho-phénotypes distincts sont observés entre les conditions saturées et insaturées. Leur activité semble également différenciée, et l'on retrouve des espèces chimiques plus oxydées comme le manganèse en conditions saturées. Les temps de séjours au sein du milieu poreux bimodal en conditions saturées biotiques sont les plus courts. C'est également dans ces conditions que les processus biologiques sont les plus forts et rapides. La modification de morpho phénotype pourrait également être le résultat d'une sélection des espèces présentes au sein du consortium. Les tentatives d'extraction et amplification d'ADN en vue d'analyses méta génomiques n'ont pas été fructueuses, en raison de la trop faible quantité d'ADN. Ces analyses constituent une perspective intéressante pour aller plus loin dans l'analyse de la distinction des biofilms. Ceci permettrait de comprendre si les biofilms sont modifiés morphologiquement avec une baisse d'activité ou si les conditions hydriques et le potentiel imposé entraînent des modifications plus importantes d'ordre métaboliques, ou des sélections d'espèces amenées à se développer de façon plus importante.

Au-delà de l'influence de la teneur en eau, quatre microenvironnements stables ont été observés. La résolution de l'expérience sur petites colonnes a permis de montrer l'importance de l'activité microbienne dans les variations d'Eh-pH, montrant également que la taille des colonnes permet une résolution suffisante pour observer un micro environnement bactérien et permet de hiérarchiser les processus en jeu aux interfaces biogéochimiques dans le milieu poreux. Si les variations de teneur en eau représentent un paramètre clé à plus grande échelle, les bactéries semblent ici capables à cette échelle d'observation de maintenir leur environnement proche en termes de conditions géochimiques. L'ensemble des paramètres pour chacune des conditions expérimentales tend à une stabilisation des valeurs dans le temps, de même que les valeurs des potentiels redox et pH. Bien que ceux-ci présentent une stabilisation au cours du temps ils se distinguent entre les quatre grandes modalités expérimentales.

Les évolutions montrent une tendance à l'augmentation du potentiel redox en conditions saturées biotiques, contrairement à ce qui pourrait être observé en conditions naturelles, sur site non pollué, en présence de matière organique. Dans cette étude, les concentrations en carbone

ne sont pas un facteur limitant malgré leurs faibles valeurs. Ici l'activité microbienne permet de modifier les équilibres redox / pH et d'atteindre des conditions permettant l'oxydation de Fe et Mn. Dans ce cas les bactéries ne subissent pas simplement les conséquences des évolutions des paramètres géochimiques comme les variations de potentiel redox induisant une modification des activité voir une sélection des types de bactéries présentent au sein d'une communauté (DeAngelis *et al.*, 2010) mais sont des acteurs de leur environnement proche (Hanzel *et al.*, 2013). Cet effet est directement démontré par les observations en microscopie électronique à balayage. L'équilibre des systèmes est contrôlé en partie par l'activité microbienne et les couples redox du fer et du manganèse, éléments présents en fortes concentrations dans le milieu contaminé et qui permettent aux espèces comme le plomb, le cuivre et l'arsenic d'être immobilisés. Cependant, les processus d'oxydation (matière organique, manganèse) entraînent un relargage du chrome sous sa forme la plus toxique.

Les systèmes de hotspot décrits dans la littérature mettent en avant des zones de forte activité bactériennes au contact des racines, ou de sources possibles en carbone labile, rapidement et facilement utilisable par les microorganismes (Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015). Si la consommation rapide et une activité forte caractérisent ces habitats, cela n'est pas forcément durable dans le temps, les activités de ces hotspot pouvant décroître plus lentement que la diminution des facteurs limitants en sources de nutriments. La notion de flux est alors primordiale pour comprendre le fonctionnement de ces micro habitat et leur durée dans le temps. Il existe un turnover et une variabilité temporelle de fonctionnement de ces hotspot. En se basant sur ces observations, dans le cas de l'expérience en colonne menée au cours de cette étude, il serait intéressant de prolonger l'étude pour observer un turnover ou identifier les paramètres limitants dans le cas de sols contaminés. Les mesures de débit et de vitesse de percolation pourraient permettre d'apporter une quantification des flux au cours de l'expérience, et de comparer l'activité microbienne des colonnes saturées et insaturées en fonction de leurs temps de séjours variables.

Conclusion générale

Tout au long du déroulement de la présente thèse, la mise au point de dispositifs expérimentaux et de méthodes de caractérisation des biofilms a nécessité de nombreux aller-retours entre expériences et analyses de données. Les différentes expériences réalisées en milieu poreux ont abouti à : (1) la mise en place de quatre environnements géochimiques différents dans un modèle de laboratoire alimenté en continu, (2) de mettre en place le suivi de paramètres peu étudiés dans ce domaine de recherche, comme le redox, qui se sont avérés essentiels à l'interprétation et au « recoupement » avec les données chimiques et de fonctionnement des microorganismes, (3) d'acquérir des données dont l'analyse statistique croisée aux observations en MEB permet d'interpréter le système. De plus, ces données sont cohérentes avec des caractérisations d'eaux naturelles de percolation décrites dans la littérature, ce qui indique que le système développé est pertinent pour représenter des phénomènes représentatifs de certains processus se réalisant sur des sites réels.

La résolution du système, bien que les observations aient été réalisées sur l'ensemble de la colonne miniature, a permis d'observer une échelle fonctionnelle, traduisant l'activité du biofilm. La résolution expérimentale inspirée des colonnes classiquement utilisées en sciences du sol a permis de montrer qu'une approche multi échelles peut permettre de répondre à une problématique environnementale à l'échelle de la communauté microbienne, par l'observation de paramètres traduisant directement ou indirectement le fonctionnement du biofilm dans des conditions analogues au milieu naturel, alors que la plupart des études antérieures étaient réalisées avec des souches bactériennes pures dont la croissance était stimulée par des milieux synthétiques riches. Cette expérience a permis de mettre au point un système expérimental de laboratoire qui permettra à l'avenir de multiplier les études en conditions expérimentales reproductibles, pour répondre à des questions soulevées par cette première expérience, telles que l'évolution de la communauté microbienne, à travers l'étude ADN de ces biofilms, l'influence de ces biofilms sur les polluants, par des analyses de spéciation métalliques plus poussées, l'effet de différentes concentrations métalliques sur l'activité microbienne.

La poursuite de la mise au point d'expériences en Lab on chip permettra également d'affiner la compréhension de la dynamique des polluants en interaction avec des biofilms à différentes

Conclusion générale

échelles. Les informations obtenues à travers la mise en œuvre de ces dispositifs expérimentaux de laboratoire devraient permettre d'améliorer la fiabilité des modèles développés pour comprendre et prévoir le comportement des polluants dans le système sol-eau à différentes échelles et dans différents contextes de saturation. Le développement de tels modèles fiables est nécessaire pour prévoir et/ou réduire les risques associés aux pollutions anthropiques.

Références bibliographiques

Chapitre I

- Alloway, B.J., 2013. Sources of Heavy Metals and Metalloids in Soils, in: Alloway, B.J. (Ed.), *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and Their Bioavailability, Environmental Pollution*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 11–50. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7_2
- Baek, C., Kim, H.Y., Na, D., Min, J., 2015. A microfluidic system for the separation and detection of *E. coli* O157:H7 in soil sample using ternary interactions between humic acid, bacteria, and a hydrophilic surface. *Sens. Actuators B Chem.* 208, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.11.028>
- Bailey, V.L., Bilskis, C.L., Fansler, S.J., McCue, L.A., Smith, J.L., Konopka, A., 2012. Measurements of Microbial Community Activities in Individual Soil Macroaggregates. *Soil Biol. Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.01.004>
- Battaglia-Brunet, F., Dictor, M.-C., Garrido, F., Crouzet, C., Morin, D., Dekeyser, K., Clarens, M., Baranger, P., 2002. An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *J. Appl. Microbiol.* 93, 656–667. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01726.x>
- Borer, B., Tecon, R., Or, D., 2018. Spatial organization of bacterial populations in response to oxygen and carbon counter-gradients in pore networks. *Nat. Commun.* 9, 769. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03187-y>
- Cai, D.K., Neyer, A., Kuckuk, R., Heise, H.M., 2008. Optical absorption in transparent PDMS materials applied for multimode waveguides fabrication. *Opt. Mater.* 30, 1157–1161. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2007.05.041>
- Chau, J.F., Bagtzoglou, A.C., Willig, M.R., 2011. The Effect of Soil Texture on Richness and Diversity of Bacterial Communities. *Environ. Forensics* 12, 333–341. <https://doi.org/10.1080/15275922.2011.622348>
- Clark, J.S., Bell, D.M., Hersh, M.H., Kwit, M.C., Moran, E., Salk, C., Stine, A., Valle, D., Zhu, K., 2011. Individual-scale variation, species-scale differences: inference needed to understand diversity. *Ecol. Lett.* 14, 1273–1287. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01685.x>
- Cnudde, V., Boone, M.N., 2013. High-resolution X-ray computed tomography in geosciences: A review of the current technology and applications. *Earth-Sci. Rev.* 123, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2013.04.003>
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. *Microbial Biofilms* 35.
- Crawford, J., Harris, J., Ritz, K., Young, I., 2005. Towards an evolutionary ecology of life in soil. *Trends Ecol. Evol.* 20, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.11.014>
- Davit, Y., Iltis, G., Debenest, G., Veran-Tissoires, S., Wildenschild, D., Gerino, M., Quintard, M., 2011. Imaging biofilm in porous media using X-ray computed microtomography:

- imaging biofilm in porous media using x-ray computed microtomography. *J. Microsc.* 242, 15–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2010.03432.x>
- DeAngelis, K.M., Silver, W.L., Thompson, A.W., Firestone, M.K., 2010. Microbial communities acclimate to recurring changes in soil redox potential status: Fluctuating redox microbial communities. *Environ. Microbiol.* 12, 3137–3149. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02286.x>
- Dechesne, A., Pallud, C., Bertolla, F., Grundmann, G.L., 2005. Impact of the Microscale Distribution of a *Pseudomonas* Strain Introduced into Soil on Potential Contacts with Indigenous Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8123–8131. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8123-8131.2005>
- Deng, J., Orner, E.P., Chau, J.F., Anderson, E.M., Kadilak, A.L., Rubinstein, R.L., Bouchillon, G.M., Goodwin, R.A., Gage, D.J., Shor, L.M., 2015. Synergistic effects of soil microstructure and bacterial EPS on drying rate in emulated soil micromodels. *Soil Biol. Biochem.* 83, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.12.006>
- Eary, E., Rai, D., Society, A.C., 1987. Kinetics of chromium (III) oxidation of chromium (IV) by reaction with manganese dioxide. *Environ. Sci. Technol.* 21, 1187–93.
- Emerson, D., Fleming, E.J., McBeth, J.M., 2010. Iron-Oxidizing Bacteria: An Environmental and Genomic Perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 561–583. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134208>
- Florea, L., Fay, C., Lahiff, E., Phelan, T., O'Connor, N.E., Corcoran, B., Diamond, D., Benito-Lopez, F., 2013. Dynamic pH mapping in microfluidic devices by integrating adaptive coatings based on polyaniline with colorimetric imaging techniques. *Lab. Chip* 13, 1079–1085. <https://doi.org/10.1039/C2LC41065F>
- Gargiulo, G., Bradford, S.A., Simunek, J., Ustohal, P., Vereecken, H., Klumpp, E., 2008. Bacteria Transport and Deposition under Unsaturated Flow Conditions: The Role of Water Content and Bacteria Surface Hydrophobicity. *Vadose Zone J.* 7, 406. <https://doi.org/10.2136/vzj2007.0068>
- Gobat, J.-M., Aragno, M., Matthey, W., 2010. *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*. PPUR Presses polytechniques.
- Gutiérrez Castorena, E.V., Gutiérrez-Castorena, M. del C., González Vargas, T., Cajuste Bontemps, L., Delgadillo Martínez, J., Suástegui Méndez, E., Ortiz Solorio, C.A., 2016. Micromapping of microbial hotspots and biofilms from different crops using digital image mosaics of soil thin sections. *Geoderma* 279, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.05.017>
- Hattab, N., 2013. *Ecodynamique des éléments traces et caractérisation de l'exposition des sols contaminés: expérimentation et modélisation par les réseaux de neurones artificiels*. Université d'Orléans.
- Hettiarachchi, G.M., Pierzynski, G.M., 2004. Soil lead bioavailability and in situ remediation of lead-contaminated soils: A review. *Environ. Prog.* 23, 78–93. <https://doi.org/10.1002/ep.10004>
- Husson, O., 2013. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant Soil* 362, 389–417. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1429-7>

- Iltis, G.C., Armstrong, R.T., Jansik, D.P., Wood, B.D., Wildenschild, D., 2011. Imaging biofilm architecture within porous media using synchrotron-based X-ray computed microtomography: TECHNICAL NOTE. *Water Resour. Res.* 47, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2010WR009410>
- Ivankovic, T., Rolland du Roscoat, S., Geindreau, C., Séchet, P., Huang, Z., Martins, J.M.F., 2016. Development and evaluation of an experimental protocol for 3-D visualization and characterization of the structure of bacterial biofilms in porous media using laboratory X-ray tomography. *Biofouling* 32, 1235–1244. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1249865>
- Juyal, A., Eickhorst, T., Falconer, R., Baveye, P.C., Spiers, A., Otten, W., 2018. Control of Pore Geometry in Soil Microcosms and Its Effect on the Growth and Spread of *Pseudomonas* and *Bacillus* sp. *Front. Environ. Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00073>
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 1986. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Karadimitriou, N.K., Hassanizadeh, S.M., 2012. A Review of Micromodels and Their Use in Two-Phase Flow Studies. *Vadose Zone J.* 11. <https://doi.org/10.2136/vzj2011.0072>
- Katsoyiannis, I.A., Zouboulis, A.I., 2004. Biological treatment of Mn(II) and Fe(II) containing groundwater: kinetic considerations and product characterization. *Water Res.* 38, 1922–1932. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.014>
- Kearns, D.B., 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Krause, S., Le Roux, X., Niklaus, P.A., Van Bodegom, P.M., Lennon, J.T., Bertilsson, S., Grossart, H.-P., Philippot, L., Bodelier, P.L.E., 2014. Trait-based approaches for understanding microbial biodiversity and ecosystem functioning. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00251>
- Kravchenko, A., Chun, H.-C., Mazer, M., Wang, W., Rose, J.B., Smucker, A., Rivers, M., 2013. Relationships between intra-aggregate pore structures and distributions of *Escherichia coli* within soil macro-aggregates. *Appl. Soil Ecol.* 63, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.10.001>
- Kumar Gunda, N.S., Bera, B., Karadimitriou, N.K., Mitra, S.K., Hassanizadeh, S.M., 2011. Reservoir-on-a-Chip (ROC): A new paradigm in reservoir engineering. *Lab. Chip* 11, 3785. <https://doi.org/10.1039/c1lc20556k>
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C., 2008a. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Manag.* 28, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.012>
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C., 2008b. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Manag.* 28, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.012>
- Kumpiene, J., Ragnvaldsson, D., Lövgren, L., Tesfalidet, S., Gustavsson, B., Lättström, A., Leffler, P., Maurice, C., 2009. Impact of water saturation level on arsenic and metal mobility in the Fe-amended soil. *Chemosphere* 74, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.068>

- Kuramae, E.E., Yergeau, E., Wong, L.C., Pijl, A.S., Veen, J.A., Kowalchuk, G.A., 2012. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 12–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x>
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biol. Biochem.* 83, 184–199. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025>
- Laudone, G.M., Matthews, G.P., Gregory, A.S., Bird, N.R.A., Whalley, W.R., 2013. A dual-porous, inverse model of water retention to study biological and hydrological interactions in soil. *Eur. J. Soil Sci.* 64, 345–356. <https://doi.org/10.1111/ejss.12055>
- Lespagnol, G., 2003. Lixiviation du Chrome, du Cuivre et de l'Arsenic (CCA) à partir de sols contaminés sur des sites de traitement du bois. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
- Li, X., Thornton, I., 2001. Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. *Appl. Geochem.* 16, 1693–1706.
- Lin, Y.-H., Das, A., Wu, M.-H., Pan, T.-M., Lai, C.-S., 2013. Microfluidic Chip Integrated with an Electrolyte-Insulator-Semiconductor Sensor for pH and Glucose Level Measurement. *Int J Electrochem Sci* 8, 16.
- Maeda, S., 1994. Safety and Environmental Effects, in: *Organic Arsenic, Antimony and Bismuth Compounds* (1994). John Wiley & Sons, Ltd, pp. 725–759. <https://doi.org/10.1002/0470023473.ch19>
- Magnusson, E.B., Halldorsson, S., Fleming, R.M.T., Leosson, K., 2013. Real-time optical pH measurement in a standard microfluidic cell culture system. *Biomed. Opt. Express* 4, 1749. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.001749>
- Mahar, A., Wang, P., Li, R., Zhang, Z., 2015. Immobilization of Lead and Cadmium in Contaminated Soil Using Amendments: A Review. *Pedosphere* 25, 555–568. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)30036-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)30036-9)
- Majumdar, S., Peralta-Videa, J.R., Castillo-Michel, H., Hong, J., Rico, C.M., Gardea-Torresdey, J.L., 2012. Applications of synchrotron μ -XRF to study the distribution of biologically important elements in different environmental matrices: A review. *Anal. Chim. Acta* 755, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.09.050>
- Manceau A., and Charlet L., 1992. X-Ray absorption spectroscopic study of the sorption of Cr(III) at the oxide-water interface. Molecular mechanism of Cr(III) oxidation on Mn oxydes. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol.148, pp.425-442.
- Marre, S., Jensen, K.F., 2010. Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1183–1202. <https://doi.org/10.1039/B821324K>
- Martinho, E., Abreu, M.M., Oliveira, A., Alegria, F., Pampulha, M.E., 2013. Monitoring of biophysicochemical changes in a silty clay soil contaminated with LNAPLs. *Geoderma* 197–198, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.01.003>
- Mees, F., Swennen, R., Geet, M.V., Jacobs, P., 2003. Applications of X-ray computed tomography in the geosciences. *Geol. Soc. Lond. Spec. Publ.* 215, 1–6. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2003.215.01.01>

- Micháľková, Z., Komárek, M., Šillerová, H., Della Puppa, L., Joussein, E., Bordas, F., Vaněk, A., Vaněk, O., Ettler, V., 2014. Evaluating the potential of three Fe- and Mn-(nano)oxides for the stabilization of Cd, Cu and Pb in contaminated soils. *J. Environ. Manage.* 146, 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.08.004>
- Miot, J., Benzerara, K., Kappler, A., 2014. Investigating Microbe-Mineral Interactions: Recent Advances in X-Ray and Electron Microscopy and Redox-Sensitive Methods. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 42, 271–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-050212-124110>
- Morais, S., Liu, N., Diouf, A., Bernard, D., Lecoutre, C., Garrabos, Y., Marre, S., 2016. Monitoring CO₂ invasion processes at the pore scale using geological labs on chip. *Lab. Chip* 16, 3493–3502. <https://doi.org/10.1039/C6LC00830E>
- Nunan, N., Wu, K., Young, I.M., Crawford, J.W., Ritz, K., 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 203–215. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00027-8)
- Or, D., Smets, B.F., Wraith, J.M., Dechesne, A., Friedman, S.P., 2007. Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media – a review. *Adv. Water Resour.* 30, 1505–1527. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2006.05.025>
- Perro, A., Lebourdon, G., Henry, S., Lecomte, S., Servant, L., Marre, S., 2016. Combining microfluidics and FT-IR spectroscopy: towards spatially resolved information on chemical processes. *React Chem Eng* 1, 577–594. <https://doi.org/10.1039/C6RE00127K>
- Peth, S. [b1] (analytic), Horn, R. [b1] (analytic), Beckmann, F. [b1] (analytic), Donath, T. [b1] (analytic), Fischer, J. [b1] (analytic), Smucker, A.J.M. [b1] (analytic), 2008. Three-Dimensional Quantification of Intra-Aggregate Pore-Space Features using Synchrotron-Radiation-Based Microtomography (English). *Soil Sci Soc Am J* 72, 897–907.
- Potts, M., 2005. Desiccation Tolerance of Prokaryotes: Application of Principles to Human Cells. *Integr. Comp. Biol.* 45, 800–809. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.800>
- Pronk, G.J., Heister, K., Ding, G.-C., Smalla, K., Kögel-Knabner, I., 2012. Development of biogeochemical interfaces in an artificial soil incubation experiment; aggregation and formation of organo-mineral associations. *Geoderma* 189–190, 585–594. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.05.020>
- Raynaud, X., Nunan, N., 2014. Spatial Ecology of Bacteria at the Microscale in Soil. *PLoS ONE* 9, e87217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087217>
- Ritz, K., Young, I., 2011. *The Architecture and Biology of Soils: Life in Inner Space*. CABI.
- Rolland du Roscoat, S., Martins, J.M.F., Séchet, P., Vince, E., Latil, P., Geindreau, C., 2014. Application of synchrotron X-ray microtomography for visualizing bacterial biofilms 3D microstructure in porous media. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 1265–1271. <https://doi.org/10.1002/bit.25168>
- Roy, M., Giri, A.K., Dutta, S., Mukherjee, P., 2015. Integrated phytobial remediation for sustainable management of arsenic in soil and water. *Environ. Int.* 75, 180–198. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.010>

- Ruamps, L.S., Nunan, N., Pouteau, V., Leloup, J., Raynaud, X., Roy, V., Chenu, C., 2013. Regulation of soil organic C mineralisation at the pore scale. *FEMS Microbiol. Ecol.* 416, 26–35. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12078>
- Rubinstein, R.L., Kadilak, A.L., Cousens, V.C., Gage, D.J., Shor, L.M., 2015. Protist-Facilitated Particle Transport Using Emulated Soil Micromodels. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1384–1391. <https://doi.org/10.1021/es503424z>
- Schmieman Eric A., Yonge David R., Rege Mahesh A., Petersen James N., Turick Charles E., Johnstone Donald L., Apel William A., 1998. Comparative Kinetics of Bacterial Reduction of Chromium. *J. Environ. Eng.* 124, 449–455. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1998\)124:5\(449\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1998)124:5(449))
- Schneider, A., 2016. Comportement et mobilité des éléments traces métalliques dans des sols environnant une usine de seconde fusion du plomb. Approches expérimentales et modélisation. (thesis). Reims.
- Schneider, A.R., Cancès, B., Ponthieu, M., Sobanska, S., Benedetti, M.F., Pourret, O., Conreux, A., Calandra, I., Martinet, B., Morvan, X., Gommeaux, M., Marin, B., 2016. Lead distribution in soils impacted by a secondary lead smelter: Experimental and modelling approaches. *Sci. Total Environ.* 568, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.001>
- Seyfferth, A.L. [b1] (analytic), Webb, S.M. [b2] (analytic), Andrews, J.C. [b2] (analytic), Fendorf, S. [b1] (analytic), 2010. Arsenic Localization, Speciation, and Co-Occurrence with Iron on Rice (*Oryza sativa* L) Roots Having Variable Fe Coatings (English). *Env. Sci Technol* 44, 8108–8113.
- Shakoori, A.R., Tahseen, S., Haq, R.U., 1999. Chromium-tolerant bacteria isolated from industrial effluents and their use in detoxication of hexavalent chromium. *Folia Microbiol. (Praha)* 44, 50–54. <https://doi.org/10.1007/BF02816221>
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., Denef, K., 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil Tillage Res., Advances in Soil Structure Research* 79, 7–31. <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.03.008>
- Sposito, G., 1993. Principles of contaminant transport in soils: By RN Yong, AMO Mohamed and BP Warkentin, *Developments in Geotechnical Engineering*, vol. 73, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1992, 327 pp., hardcover, US \$137 (Dfl. 240.-), ISBN 0-444-88293-6, paperback, US \$68.50 (Dfl. 120.-), ISBN 0-444-89819-0. Elsevier.
- Srivastava, P., Singh, B., Angove, M., 2005. Competitive adsorption behavior of heavy metals on kaolinite. *J. Colloid Interface Sci.* 290, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.04.036>
- Stüben, D., Berner, Z., Chandrasekharam, D., Karmakar, J., 2003. Arsenic enrichment in groundwater of West Bengal, India: geochemical evidence for mobilization of As under reducing conditions. *Appl. Geochem.* 18, 1417–1434. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(03\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(03)00060-X)
- Tecon, R., Or, D., 2017. Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 599–623. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux039>

- Terry, N., Banuelos, G.S., 1999. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. CRC Press.
- Thieme, J., Schneider, G., Knöchel, C., 2003. X-ray tomography of a microhabitat of bacteria and other soil colloids with sub-100 nm resolution. *Micron* 34, 339–344. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(03\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(03)00061-1)
- Tippkötter, R., Eickhorst, T., Taubner, H., Gredner, B., Rademaker, G., 2009. Detection of soil water in macropores of undisturbed soil using microfocus X-ray tube computerized tomography (μ CT). *Soil Tillage Res.* 105, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.still.2009.05.001>
- Totsche, K.U., Rennert, T., Gerzabek, M.H., Kögel-Knabner, I., Smalla, K., Spiteller, M., Vogel, H.-J., 2010a. Biogeochemical interfaces in soil: The interdisciplinary challenge for soil science. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 173, 88–99. <https://doi.org/10.1002/jpln.200900105>
- Totsche, K.U., Rennert, T., Gerzabek, M.H., Kögel-Knabner, I., Smalla, K., Spiteller, M., Vogel, H.-J., 2010b. Biogeochemical interfaces in soil: The interdisciplinary challenge for soil science. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 173, 88.
- Turick, C.E., Apel, W.A., 1997. A bioprocessing strategy that allows for the selection of Cr(VI)-reducing bacteria from soils. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18, 247–250. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900373>
- Volk, E., Iden, S.C., Furman, A., Durner, W., Rosenzweig, R., 2016. Biofilm effect on soil hydraulic properties: Experimental investigation using soil-grown real biofilm: hydraulic properties of biofilm amended soil. *Water Resour. Res.* 52, 5813–5828. <https://doi.org/10.1002/2016WR018866>
- Vos, M., Wolf, A.B., Jennings, S.J., Kowalchuk, G.A., 2013. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 936–954. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12023>
- Wang, G., Or, D., 2013. Hydration dynamics promote bacterial coexistence on rough surfaces. *ISME J.* 7, 395–404.
- Wang, G., Or, D., 2010. Aqueous films limit bacterial cell motility and colony expansion on partially saturated rough surfaces. *Environ. Microbiol.* 12, 1363–1373. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02180.x>
- Wang, Q., Lee, J.-H., Jeong, S.-W., Jang, A., Lee, S., Choi, H., 2011. Mobilization and deposition of iron nano and sub-micrometer particles in porous media: A glass micromodel study. *J. Hazard. Mater.* 192, 1466–1475. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.066>
- Wang, W. [b1] (analytic), Kravchenko, A.N. [b2] (analytic), Smucker, A.J.M. [b2] (analytic), Liang, W. [b3] (analytic), Rivers, M.L. [b4] (analytic), 2012. Intra-aggregate Pore Characteristics: X-ray Computed Microtomography Analysis (English). *Soil Sci Soc Am J* 76, 1159–1171.
- Wang, Y., Bradford, S.A., Šimůnek, J., 2014. Estimation and upscaling of dual-permeability model parameters for the transport of *E. coli* D21g in soils with preferential flow. *J. Contam. Hydrol.* 159, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2014.01.009>

- Wu, T., Zhao, L., Faye, D., Lefevre, J.-P., Delaire, J., Leray, I., 2012. Determination of lead in water by combining precolumn adsorption and fluorimetric detection in a microfluidic device. *Anal. Methods* 4, 989. <https://doi.org/10.1039/c2ay05677a>
- Yong, R.N., Mohamed, A.-M.O., Warkentin, B.P., 1992. Principles of contaminant transport in soils, *Developments in geotechnical engineering*. Elsevier, Amsterdam.
- Young, I.M., Crawford, J.W., Nunan, N., Otten, W., Spiers, A., 2008. Chapter 4 Microbial Distribution in Soils, in: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 81–121. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)00604-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)00604-4)
- Zhang, H., Faye, D., Lefèvre, J.-P., Delaire, J.A., Leray, I., 2013. Selective fluorimetric detection of cadmium in a microfluidic device. *Microchem. J.* 106, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.06.005>
- Zhao, L., Wu, T., Lefèvre, J.-P., Leray, I., Delaire, J.A., 2009. Fluorimetric lead detection in a microfluidic device. *Lab. Chip* 9, 2818. <https://doi.org/10.1039/b904641k>
- Zheng, Han, Jiang, W., Rashid, M., Cai, Y., Dionysiou, D., O’Shea, K., 2015. Selective Reduction of Cr(VI) in Chromium, Copper and Arsenic (CCA) Mixed Waste Streams Using UV/TiO₂ Photocatalysis. *Molecules* 20, 2622–2635. <https://doi.org/10.3390/molecules20022622>
- Zhou, J., Xia, B., Treves, D.S., Wu, L.-Y., Marsh, T.L., O’Neill, R.V., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M., 2002. Spatial and Resource Factors Influencing High Microbial Diversity in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 326–334. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.326-334.2002>
- Zhou, J., Zhou, X., 2013. Scanning tunneling microscopy of hundred-nanometer thick Nafion polymer covered Pt and highly ordered pyrolytic graphite. *J. Appl. Phys.* 113, 234901.
- Zong, Y., Yu, X., Zhu, M., Lu, S., 2015. Characterizing soil pore structure using nitrogen adsorption, mercury intrusion porosimetry, and synchrotron-radiation-based X-ray computed microtomography techniques. *J. Soils Sediments* 15, 302–312. <https://doi.org/10.1007/s11368-014-0995-0>

Chapitre II

- Aeby, P., Forrer, J., Flühler, H., Steinmeier, C., 1997. Image Analysis for Determination of Dye Tracer Concentrations in Sand Columns. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61, 33–35. <https://doi.org/10.2136/sssaj1997.03615995006100010006x>
- Bruand, A., Duval, O., Gaillard, H., Darthout, R., Jamagne, M., 1996. Variabilité des propriétés de rétention en eau des sols: importance de la densité apparente. *Étude Gest. Sols* 15.
- Davit, Y., Iltis, G., Debenest, G., Veran-Tissoires, S., Wildenschild, D., Gerino, M., Quintard, M., 2011. Imaging biofilm in porous media using X-ray computed microtomography: imaging biofilm in porous media using x-ray computed microtomography. *J. Microsc.* 242, 15–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2010.03432.x>
- Dedewanou, M., Binet, S., Rouet, J.L., Coquet, Y., Bruand, A., Noel, H., 2015. Groundwater Vulnerability and Risk Mapping Based on Residence Time Distributions: Spatial

- Analysis for the Estimation of Lumped Parameters. *Water Resour. Manag.* 29, 5489–5504. <https://doi.org/10.1007/s11269-015-1130-8>
- Gargiulo, G., Bradford, S.A., Simunek, J., Ustohal, P., Vereecken, H., Klumpp, E., 2008. Bacteria Transport and Deposition under Unsaturated Flow Conditions: The Role of Water Content and Bacteria Surface Hydrophobicity. *Vadose Zone J.* 7, 406. <https://doi.org/10.2136/vzj2007.0068>
- Ivankovic, T., Rolland du Roscoat, S., Geindreau, C., Séchet, P., Huang, Z., Martins, J.M.F., 2016. Development and evaluation of an experimental protocol for 3-D visualization and characterization of the structure of bacterial biofilms in porous media using laboratory X-ray tomography. *Biofouling* 32, 1235–1244. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1249865>
- Juyal, A., Eickhorst, T., Falconer, R., Baveye, P.C., Spiers, A., Otten, W., 2018. Control of Pore Geometry in Soil Microcosms and Its Effect on the Growth and Spread of *Pseudomonas* and *Bacillus* sp. *Front. Environ. Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00073>
- Klaver, J., Desbois, G., Urai, J.L., Littke, R., 2012. BIB-SEM study of the pore space morphology in early mature Posidonia Shale from the Hils area, Germany. *Int. J. Coal Geol., Shale Gas and Shale Oil Petrology and Petrophysics* 103, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2012.06.012>
- Pot, V., Peth, S., Monga, O., Vogel, L.E., Genty, A., Garnier, P., Vieublé-Gonod, L., Ogurreck, M., Beckmann, F., Baveye, P.C., 2015. Three-dimensional distribution of water and air in soil pores: Comparison of two-phase two-relaxation-times lattice-Boltzmann and morphological model outputs with synchrotron X-ray computed tomography data. *Adv. Water Resour.* 84, 87–102. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2015.08.006>
- Pronk, G.J., Heister, K., Ding, G.-C., Smalla, K., Kögel-Knabner, I., 2012. Development of biogeochemical interfaces in an artificial soil incubation experiment; aggregation and formation of organo-mineral associations. *Geoderma* 189–190, 585–594. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.05.020>
- Sigal, R.F., 2009. A methodology for blank and conformance corrections for high pressure mercury porosimetry. *Meas. Sci. Technol.* 20, 045108. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/20/4/045108>
- Viel, E., 2016. Etude des processus de transport des solutés hors équilibre physique : application à la zone non saturée des calcaires de Beauce (thesis). Orléans.
- Wang, J.-P., Hu, N., François, B., Lambert, P., 2017. Estimating water retention curves and strength properties of unsaturated sandy soils from basic soil gradation parameters. *Water Resour. Res.* 53, 6069–6088. <https://doi.org/10.1002/2017WR020411>
- Wildenschild, D., Sheppard, A.P., 2013. X-ray imaging and analysis techniques for quantifying pore-scale structure and processes in subsurface porous medium systems. *Adv. Water Resour.* 51, 217–246. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2012.07.018>
- Zong, Y., Yu, X., Zhu, M., Lu, S., 2015. Characterizing soil pore structure using nitrogen adsorption, mercury intrusion porosimetry, and synchrotron-radiation-based X-ray computed microtomography techniques. *J. Soils Sediments* 15, 302–312. <https://doi.org/10.1007/s11368-014-0995-0>

Chapitre III

- Borer, B., Tecon, R., Or, D., 2018. Spatial organization of bacterial populations in response to oxygen and carbon counter-gradients in pore networks. *Nat. Commun.* 9, 769. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03187-y>
- Chowdhury, N., Marschner, P., Burns, R.G., 2011. Soil microbial activity and community composition: Impact of changes in matric and osmotic potential. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1229–1236. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.02.012>
- Davit, Y., Iltis, G., Debenest, G., Veran-Tissoires, S., Wildenschild, D., Gerino, M., Quintard, M., 2011. Imaging biofilm in porous media using X-ray computed microtomography: imaging biofilm in porous media using x-ray computed microtomography. *J. Microsc.* 242, 15–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2010.03432.x>
- Gargiulo, G., Bradford, S.A., Simunek, J., Ustohal, P., Vereecken, H., Klumpp, E., 2008. Bacteria Transport and Deposition under Unsaturated Flow Conditions: The Role of Water Content and Bacteria Surface Hydrophobicity. *Vadose Zone J.* 7, 406. <https://doi.org/10.2136/vzj2007.0068>
- Iltis, G.C., Armstrong, R.T., Jansik, D.P., Wood, B.D., Wildenschild, D., 2011. Imaging biofilm architecture within porous media using synchrotron-based X-ray computed microtomography: TECHNICAL NOTE. *Water Resour. Res.* 47, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2010WR009410>
- Ivankovic, T., Rolland du Roscoat, S., Geindreau, C., Séchet, P., Huang, Z., Martins, J.M.F., 2016. Development and evaluation of an experimental protocol for 3-D visualization and characterization of the structure of bacterial biofilms in porous media using laboratory X-ray tomography. *Biofouling* 32, 1235–1244. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1249865>
- Juyal, A., Eickhorst, T., Falconer, R., Baveye, P.C., Spiers, A., Otten, W., 2018. Control of Pore Geometry in Soil Microcosms and Its Effect on the Growth and Spread of *Pseudomonas* and *Bacillus* sp. *Front. Environ. Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00073>
- Katsoyiannis, I.A., Zouboulis, A.I., 2004. Biological treatment of Mn(II) and Fe(II) containing groundwater: kinetic considerations and product characterization. *Water Res.* 38, 1922–1932. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.014>
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biol. Biochem.* 83, 184–199. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025>
- Nunan, N., Wu, K., Young, I.M., Crawford, J.W., Ritz, K., 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 203–215. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00027-8)
- Or, D., Smets, B.F., Wraith, J.M., Dechesne, A., Friedman, S.P., 2007. Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media – a review. *Adv. Water Resour.* 30, 1505–1527. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2006.05.025>

- Rattray, E.A.S., Prosser, J.I., Glover, L.A., Killham, K., 1992. Matric potential in relation to survival and activity of a genetically modified microbial inoculum in soil. *Soil Biol. Biochem.* 24, 421–425. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90204-B](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90204-B)
- Roscoat, S.R.D., Martins, J.M.F., Séchet, P., Erwan, V., Latil, P., Geindreau, C., 2014. Application of synchrotron X-ray microtomography for visualizing bacterial biofilms 3D microstructure in porous media. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 1265–1271. <https://doi.org/10.1002>
- Sawayama, M., Suzuki, T., Hashimoto, H., Kasai, T., Furutani, M., Miyata, N., Kunoh, H., Takada, J., 2011. Isolation of a *Leptothrix* Strain, OUMS1, from Ocherous Deposits in Groundwater. *Curr. Microbiol.* 63, 173–180. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9957-6>
- Tecon, R., Or, D., 2017. Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 599–623. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux039>
- Volk, E., Iden, S.C., Furman, A., Durner, W., Rosenzweig, R., 2016. Biofilm effect on soil hydraulic properties: Experimental investigation using soil-grown real biofilm: hydraulic properties of biofilm amended soil. *Water Resour. Res.* 52, 5813–5828. <https://doi.org/10.1002/2016WR018866>
- Vos, M., Wolf, A.B., Jennings, S.J., Kowalchuk, G.A., 2013. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 936–954. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12023>
- Wang, G., Or, D., 2013. Hydration dynamics promote bacterial coexistence on rough surfaces. *ISME J.* 7, 395–404.
- Wang, G., Or, D., 2010. Aqueous films limit bacterial cell motility and colony expansion on partially saturated rough surfaces. *Environ. Microbiol.* 12, 1363–1373. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02180.x>

Chapitre IV

- Dong, D., Nelson, Y.M., Lion, L.W., Shuler, M.L., Ghiorse, W.C., 2000. Adsorption of Pb and Cd onto metal oxides and organic material in natural surface coatings as determined by selective extractions: new evidence for the importance of Mn and Fe oxides. *Water Res.* 34, 427–436. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00185-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00185-2)
- Eary, E., Rai, D., Society, A.C., 1987. Kinetics of chromium (III) oxidation of chromium (IV) by reaction with manganese dioxide. *Environ. Sci. Technol.* 21, 1187–93.
- Husson, O., 2013. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant Soil* 362, 389–417. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1429-7>
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 1986. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C., 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Manag.* 28, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.012>
- Kumpiene, J., Ragnvaldsson, D., Lövgren, L., Tesfalidet, S., Gustavsson, B., Lättström, A., Leffler, P., Maurice, C., 2009. Impact of water saturation level on arsenic and metal mobility in the Fe-amended soil. *Chemosphere* 74, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.068>
- Miot, J., Benzerara, K., Kappler, A., 2014. Investigating Microbe-Mineral Interactions: Recent Advances in X-Ray and Electron Microscopy and Redox-Sensitive Methods. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 42, 271–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-050212-124110>
- Or, D., Smets, B.F., Wraith, J.M., Dechesne, A., Friedman, S.P., 2007. Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media – a review. *Adv. Water Resour.* 30, 1505–1527. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2006.05.025>

Chapitre V

- Aldeek, F., 2010. Synthèse et fonctionnalisation de nanocristaux fluorescents (Quantum Dots) pour l'imagerie et la caractérisation des propriétés hydrophobes/hydrophiles de biofilms bactériens (thesis). Nancy 1.
- Baek, C., Kim, H.Y., Na, D., Min, J., 2015. A microfluidic system for the separation and detection of *E. coli* O157:H7 in soil sample using ternary interactions between humic acid, bacteria, and a hydrophilic surface. *Sens. Actuators B Chem.* 208, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.11.028>
- Cai, D.K., Neyer, A., Kuckuk, R., Heise, H.M., 2008. Optical absorption in transparent PDMS materials applied for multimode waveguides fabrication. *Opt. Mater.* 30, 1157–1161. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2007.05.041>
- Carrel, M., Morales, V.L., Beltran, M.A., Derlon, N., Kaufmann, R., Morgenroth, E., Holzner, M., 2018. Biofilms in 3D porous media: Delineating the influence of the pore network geometry, flow and mass transfer on biofilm development. *Water Res.* 134, 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.059>
- Chau, J.F., Bagtzoglou, A.C., Willig, M.R., 2011. The Effect of Soil Texture on Richness and Diversity of Bacterial Communities. *Environ. Forensics* 12, 333–341. <https://doi.org/10.1080/15275922.2011.622348>
- Choo-Smith, L.-P., Maquelin, K., van Vreeswijk, T., Bruining, H.A., Puppels, G.J., Thi, N.A.N., Kirschner, C., Naumann, D., Ami, D., Villa, A.M., Orsini, F., Doglia, S.M., Lamfarraj, H., Sockalingum, G.D., Manfait, M., Allouch, P., Endtz, H.P., 2001. Investigating Microbial (Micro)colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1461–1469. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1461-1469.2001>
- Couzinet, A., 2008. Approche PDF jointe fluide-particule pour la modélisation des écoulements turbulents diphasiques anisothermes [WWW Document]. URL <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000543/> (accessed 2.15.19).
- Davit, Y., Iltis, G., Debenest, G., Veran-Tissoires, S., Wildenschild, D., Gerino, M., Quintard, M., 2011. Imaging biofilm in porous media using X-ray computed microtomography: IMAGING BIOFILM IN POROUS MEDIA USING X-RAY COMPUTED MICROTOMOGRAPHY. *J. Microsc.* 242, 15–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2010.03432.x>

- Deng, J., Dhummakupt, A., Samson, P.C., Wikswo, J.P., Shor, L.M., 2013. Dynamic Dosing Assay Relating Real-Time Respiration Responses of *Staphylococcus aureus* Biofilms to Changing Microchemical Conditions. *Anal. Chem.* 85, 5411–5419. <https://doi.org/10.1021/ac303711m>
- Deng, J., Orner, E.P., Chau, J.F., Anderson, E.M., Kadilak, A.L., Rubinstein, R.L., Bouchillon, G.M., Goodwin, R.A., Gage, D.J., Shor, L.M., 2015. Synergistic effects of soil microstructure and bacterial EPS on drying rate in emulated soil micromodels. *Soil Biol. Biochem.* 83, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.12.006>
- Díaz, R.E., Acuña, S.M., Segura, L.A., 2011. Construction of 2D transparent micromodels in polyester resin with porosity similar to carrots. *Food Sci. Technol. Camp.* 31, 960–966.
- Engström, E., Thunvik, R., Kulabako, R., Balfors, B., 2015. Water Transport, Retention, and Survival of *Escherichia coli* in Unsaturated Porous Media: A Comprehensive Review of Processes, Models, and Factors. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45, 1–100. <https://doi.org/10.1080/10643389.2013.828363>
- Florea, L., Fay, C., Lahiff, E., Phelan, T., O'Connor, N.E., Corcoran, B., Diamond, D., Benito-Lopez, F., 2013. Dynamic pH mapping in microfluidic devices by integrating adaptive coatings based on polyaniline with colorimetric imaging techniques. *Lab. Chip* 13, 1079–1085. <https://doi.org/10.1039/C2LC41065F>
- Iltis, G.C., Armstrong, R.T., Jansik, D.P., Wood, B.D., Wildenschild, D., 2011. Imaging biofilm architecture within porous media using synchrotron-based X-ray computed microtomography: TECHNICAL NOTE. *Water Resour. Res.* 47, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2010WR009410>
- Jamal, D., n.d. Docteur de l'Université de Lorraine 227.
- Kone, T., Golfier, F., Orgogozo, L., Oltéan, C., Lefèvre, E., Block, J.C., Buès, M.A., 2014. Impact of biofilm-induced heterogeneities on solute transport in porous media. *Water Resour. Res.* 50, 9103–9119. <https://doi.org/10.1002/2013WR015213>
- Kumar Gunda, N.S., Bera, B., Karadimitriou, N.K., Mitra, S.K., Hassanizadeh, S.M., 2011. Reservoir-on-a-Chip (ROC): A new paradigm in reservoir engineering. *Lab. Chip* 11, 3785. <https://doi.org/10.1039/c1lc20556k>
- Lin, Y.-H., Das, A., Wu, M.-H., Pan, T.-M., Lai, C.-S., 2013. Microfluidic Chip Integrated with an Electrolyte-Insulator-Semiconductor Sensor for pH and Glucose Level Measurement. *Int J Electrochem Sci* 8, 16.
- Magnusson, E.B., Halldorsson, S., Fleming, R.M.T., Leosson, K., 2013. Real-time optical pH measurement in a standard microfluidic cell culture system. *Biomed. Opt. Express* 4, 1749. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.001749>
- Marre, S., Jensen, K.F., 2010a. Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1183–1202. <https://doi.org/10.1039/B821324K>
- Marre, S., Jensen, K.F., 2010b. Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1183-. <https://doi.org/10.1039/b821324k>
- Mauline, L., 2012. Élaboration de nanoparticules de silice bifonctionnelles : outils innovants pour l'exploration de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* (thesis). Toulouse 3.
- Narsilio, G.A., Buzzi, O., Fityus, S., Yun, T.S., Smith, D.W., 2009. Upscaling of Navier–Stokes equations in porous media: Theoretical, numerical and experimental approach. *Comput. Geotech.* 36, 1200–1206. <https://doi.org/10.1016/j.compgeo.2009.05.006>
- Perro, A., Lebourdon, G., Henry, S., Lecomte, S., Servant, L., Marre, S., 2016. Combining microfluidics and FT-IR spectroscopy: towards spatially resolved information on chemical processes. *React Chem Eng* 1, 577–594. <https://doi.org/10.1039/C6RE00127K>

- Rubinstein, R.L., Kadilak, A.L., Cousens, V.C., Gage, D.J., Shor, L.M., 2015. Protist-Facilitated Particle Transport Using Emulated Soil Micromodels. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1384–1391. <https://doi.org/10.1021/es503424z>
- Wagner, M., Ivleva, N.P., Haisch, C., Niessner, R., Horn, H., 2009. Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigations on EPS – Matrix. *Water Res.* 43, 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.034>
- Wang, Q., Lee, J.-H., Jeong, S.-W., Jang, A., Lee, S., Choi, H., 2011. Mobilization and deposition of iron nano and sub-micrometer particles in porous media: A glass micromodel study. *J. Hazard. Mater.* 192, 1466–1475. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.066>
- Wu, T., Zhao, L., Faye, D., Lefevre, J.-P., Delaire, J., Leray, I., 2012. Determination of lead in water by combining precolumn adsorption and fluorimetric detection in a microfluidic device. *Anal. Methods* 4, 989. <https://doi.org/10.1039/c2ay05677a>
- Zhang, H., Faye, D., Lefèvre, J.-P., Delaire, J.A., Leray, I., 2013. Selective fluorimetric detection of cadmium in a microfluidic device. *Microchem. J.* 106, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.06.005>
- Zhao, L., Wu, T., Lefèvre, J.-P., Leray, I., Delaire, J.A., 2009. Fluorimetric lead detection in a microfluidic device. *Lab. Chip* 9, 2818. <https://doi.org/10.1039/b904641k>
- Zhou, J., Zhou, X., 2013. Scanning tunneling microscopy of hundred-nanometer thick Nafion polymer covered Pt and highly ordered pyrolytic graphite. *J. Appl. Phys.* 113, 234901.

Synthèse

- DeAngelis, K.M., Silver, W.L., Thompson, A.W., Firestone, M.K., 2010. Microbial communities acclimate to recurring changes in soil redox potential status: Fluctuating redox microbial communities. *Environ. Microbiol.* 12, 3137–3149. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02286.x>
- Hanzel, J., Myrold, D., Sessitsch, A., Smalla, K., Tebbe, C.C., Totsche, K.U., 2013. Microbial ecology of biogeochemical interfaces - diversity, structure, and function of microhabitats in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 1–2. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12194>
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biol. Biochem.* 83, 184–199. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025>
- Nunan, N., Wu, K., Young, I.M., Crawford, J.W., Ritz, K., 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 203–215. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00027-8)

Tables des figures

Chapitre I

Figure I.1 : répartition des ETM dans les sols de surface sur le territoire français. Sont présentées les teneurs totales et les teneurs extractibles à l'EDTA (teneurs disponibles pour les organismes végétaux) ; source Gis Sol, RMQS, 2011 ; Inra BDGSF, 1998.....	10
Figure I.2 : Localisation des sites et sols pollués répertoriés et identifiés pour la surveillance ou la remédiation sur tout le territoire français. Source : Medde, DGPR (Basol au 16 janvier 2012), 2012.....	11
Figure I.3 : Evolution de l'occurrence des ETM dans les horizons de sol. Evolution du fond pédogéochimique naturel (FPGN) par la dégradation des matériaux parentaux pendant la pédogénèse, et apport anthropiques exogènes d'ETM au milieu naturel par les différents usages (agricoles et industriels). Denis Baize, Université de Poitiers.	12
Figure I.4 : Poids global des 7 familles de polluants identifiés dans les sols ou nappes des sites et sols pollués en 2012. Source : Medde, DGPR (Basol au 16 janvier 2012), 2012.....	13
Figure I.5 : Réactivité des métaux dans le sol, cours Patrick Sharrock.	15
Figure I.6 : Schéma de fractionnement des ETM entre les différentes phases et constituants réactifs du sol et leur spéciation dans la solution de sol, d'après Schneider, 2016.....	17
Figure I.7 : Diagramme Eh-pH de stabilité du plomb.....	20
Figure I.8 : Diagramme Eh-pH de stabilité du cuivre.	20
Figure I.9 : Cycle biogéochimique du chrome. D'après Lespagnol, 2003.....	22
Figure I.10 : Diagramme Eh-pH de stabilité du chrome.	22
Figure I.11 : Diagramme Eh-pH de stabilité de l'arsenic.....	25
Figure I.12 : Cycle biogéochimique de l'arsenic.	25
Figure I.13 : Schéma de développement d'un biofilm, d'après Otto, 2009.	28
Figure I.14 : Schématisation de la distribution spatial des habitats microbiens à grande échelle et à l'échelle du pore, d'après Vos et al., 2013.	30

Figure I.15 : Comparaison des épaisseurs théoriques des films d'eau sur surfaces rugueuses et lisses en fonction du potentiel matriciel imposé, cité dans Or et al., 2007.	34
Figure I.16 : Illustration des relations entre l'activité microbienne macroscopique et les teneurs en eau des sols (a) et régression du modèle conceptuel en fonction de la respiration d'un sol (Yolo), cité dans Or et al., 2007.	35
Figure I.17 : Illustration d'habitats microbiens dans l'espace poral concentrés dans les zones d'abondance d'eau (coins et espaces inter grains) (a) ; dans les zones potentiel de diffusion et disponibilité des nutriments (b) ; illustré par un schéma de localisation des films d'eau et angle de contact (c) ; et relation entre les potentiel matriciels imposés et les degré de films aqueux et immersion de microorganismes (d) ; cité dans Or et al., 2007.....	36
Figure I.18 : Croissance bactérienne et dynamique des populations sur une surface hétérogène sous différentes conditions d'hydratation statiques, d'après Wang et al., 2013.	39
Figure I.19 : Mécanismes de respiration aérobie et anaérobie. Le sol vivant, Dunod..	42
Figure I.20 : Diversité microbienne observée via l'indice de Simpson en fonction de la présence de microorganismes à différentes profondeurs de sol, en contexte de faibles teneurs en carbone (a) et fortes teneurs en carbonnes (b), d'après Zhou et al., 2002.	43
Figure I.21 : Stratégie d'adaptation des traits de caractères écologiques microbiens en réponse aux stress géochimiques et hydrologiques, d'après Krause et al., 2014.	46

Chapitre II

.Figure II.1 : Organisation des lignes expérimentales avec en entrée les quatre solutions de percolation (1, 2,3 et 4) circulant au travers des colonnes (a, b, c et d), constituant ainsi les quatre modalités expérimentales ; saturées abiotiques (A), saturées biotiques (B), insaturées abiotiques (C) et insaturées biotiques (D).	53
Figure II.2 : Montage des électrodes pH et redox sur la ligne expérimentale avec les cellules de polypropylène fabriquées au laboratoire avec (a) le schéma du montage des électrodes sur le support permettant la connexion des électrodes sur le circuit de circulation de la solution de percolation, (b) la fabrication des cellules et montage des électrodes sur les cellules et enfin (c) le montage final pour le raccordement sur chacune des voies expérimentales.....	55
Figure II.3 : Dé bruitage, simplification des coupes 2D et histogrammes associés pour l'image de base (a), l'image avec diminution du bruit après ouverture-fermeture (b) et l'image final simplifiée par watershed (c).	59
Figure II.4 : Montage expérimental pour l'obtention des courbes de percée au Bleu Brillant (BB) avec (a) mise en place des collecteurs de fraction, (b1) colonne proche de l'état de	

saturation sur la ligne 1, (b2) colonne insaturée sur la ligne 4, (c1) schématisation de l'écoulement dans l'échantillon saturé et (c2) schématisation de l'écoulement dans l'échantillon insaturé.	61
Figure II.5 : Coupe 2D d'échantillon à 20 % obtenue en micro tomographie aux rayons X montrant la présence de deux types de volume poreux : pores résultant de l'assemblage des sables grossiers (1) et pores résultant de l'assemblage des sables fins (2).	63
Figure II.6 : Courbes cumulées de volume poral accessible en fonction du diamètre de pore équivalent (nommés en % de mélange de fractions fines dans la fraction totale) obtenues par mesure en porosimétrie mercure.	64
Figure II.7 : Courbes dérivées de distribution des volumes de pores en fonction du diamètre de pore équivalent par échantillon (nommé en % de mélange de fractions fines dans la fraction totale) obtenues par mesure en porosimétrie mercure.....	65
Figure II.8 : Image de coupe transversales de la répartition des fractions fines (211 μm) et grossières (1,8 mm) dans les colonnes pour les trois mélanges expérimentaux 10 % (a), 20 % (b) et 40 % (c) (en pourcentage de masse g.g-1).....	66
Figure II.9 : Courbes de rétention en eau des échantillons 20% obtenues en cellules pneumatiques.....	69
Figure II.10 : Tendances des courbes théoriques de rétention en eau sur les sols selon les trois grandes classes de texture des sols sableux, limoneux, argileux.....	69
Figure II.11 : Comparaison des courbes de rétention en eau et de la courbe de rétention en eau retrouvée d'après la courbe cumulée de diamètre de volumes de pore équivalent obtenue par porosimétrie au mercure. Les deux courbes sont tracées par rapport aux diamètres obtenus par porosimétrie mercure et calculés à chacune des valeurs de succion d'après la loi de Jurin $r = 1500/h$ avec le rayon de pore équivalent (r) en μm et la succion appliquée (h) en cm.....	70
Figure II.12 : Courbe de percée obtenue sur les échantillons expérimentaux (mélange à 20% de masse) en conditions saturée et insaturée. Les courbes sont obtenues après circulation dans le système d'une solution de traçage de concentration $C = 0.016 \text{ g.l-1}$ de bleu brillant (E133). 72	72
Figure II.13 : Coupes 2D des colonnes a) saturée ($\theta=0,30 \text{ cm}^3.\text{cm}^{-3}$) et b) insaturée ($0,18 \text{ cm}^3.\text{cm}^{-3}$) après acquisition au micro-tomographe. Avec 1) niveaux de gris clairs représentant les fractions siliceuses les plus absorbantes aux rayons X, 2) niveau de gris intermédiaire représentant la fraction liquide moins absorbante aux rayons X et enfin 3) les niveaux de gris les plus foncés (à noir) représentant la fraction gazeuse non absorbante aux rayons X.....	73
Figure II.14 : Schémas d'illustration du comportement hydraulique au sein des milieux poreux sur colonne saturée et insaturée.....	74
Figure II.15 : Représentation 3D d'une colonne contenant un milieu poreux bimodal de sable 20 % saturé en eau après circulation d'eau. Les images de coupe transversale ont été traitées par ouverture –fermeture et watershed. Le volume a été compilé dans VGStudiomax. Le volume (a) a été découpé selon un ROI pour les trois fractions ; solide (b), liquide (c). La porosité est	

totalemment occupée par la fraction liquide. Les rapports des volumes ou nombre de pixel permettent de calculer la proportion des différentes fractions. 77

Figure II.16 : Représentation 3D d'une colonne contenant un milieu poreux bimodal de sable 20 % insaturé, avec une succion de Δh (équivalent $pF = 1,5$) en eau après circulation d'eau. Les images de coupe transversale ont été traitées par ouverture –fermeture et watershed. Le volume a été compilé dans VGStudiomax. Le volume (a) a été découpé en ROI pour les trois fractions ; solide (b), liquide (c) et gazeuse (d). La porosité est partiellement occupée par la fraction liquide. Le rapport des volumes ou nombre de pixel permettent de calculer la proportion des différentes fractions. 77

Chapitre III

Figure III.1 : Vue aérienne du site de prélèvement d'échantillons. Site ADEME et zones de prélèvements d'échantillons. 84

Figure III.2 : Phase d'inoculation des milieux après stérilisation des sables et des colonnes (a), inoculation des colonnes contenant le milieu poreux (b) et phase de macération après fermeture des colonnes (c). 87

Figure III.3 : Présentation des quatre lignes et quatre conditions expérimentales imposées au système poreux sur colonnes; saturé abiotique, saturé biotique, insaturé abiotique et insaturé biotique. 88

Figure III.4 : Séquence expérimentale appliquée à chacune des quatre colonnes et condition expérimentale avec 10 jours de macération, une phase d'équilibration de 5 jours des conditions hydriques en colonnes et 15 jours de circulation de la solution de percolation. Sont représentés en dessous (encadré vert) les pas de temps de prélèvements (T0 à T6), les pas de temps de recharge (R1 à R5), les types d'analyses et les images du banc expérimental et des différentes étapes d'analyses. 89

Figure III.5 : Imagerie de structures biologiques en coupe transversales (μ CT à rayons X) avec a) coupe transversale d'échantillon humide avec identification de formes de filaments biologiques hydratés, en niveau de gris intermédiaire entre l'air (noir) et la fraction solide (blanc), b) coupe transversale du même échantillon après injection de contrastant (chloronaphtalène) ; identification de la structure biologique en niveau de gris proche de celui de l'air (noir) et c) reconstitution 3D de la zone d'intérêt (VGSTUDIO) et d) tentative de seuillage pour extraire les structures biologiques. 94

Figure III.6 : Coupe transversale 2D acquise en μ CT à rayons x après injection de chloronaphtalène dans le milieu poreux et identification de zones particulières sur les coupes

2D de la même colonne (a, b et c) de l'image pouvant être attribuées à la présence de développements biologiques dans la porosité..... 95

Figure III.7 : Succession d'étapes de débruitage des différentes phases gazeuses, liquides et solide des images obtenues sur un échantillon saturé biotique. Le traitement est réalisé via un outil morpho mathématiques d'ouverture-fermeture sur chacune des phases extraites de l'image..... 97

Figure III.8 : Illustration et limite de la méthode de traitement d'image dans les conditions d'acquisition en micro tomographie à rayons X. En (a) l'image de base traitée par ouverture fermeture, avec (b) seuillage des phases biologiques ; à laquelle la phase solide (c) est extraite pour ne laisser que la phase liquide biologique (d) c'est-à-dire le chloronaphtalène et les biofilms, avec les histogrammes de niveaux de gris correspondants. 98

Figure III.9 : Trois étapes d'identification de la phase biologique sur les images 2D et 3D d'un échantillon. Le passage sous VGstudio max a permis de colorer les différentes phases, pour permettre de mettre en évidence le chloronaphtalène en bleu (a) et isoler le biofilm (b) pour obtenir une visualisation en 3D du biofilm seul au sein de la porosité (c). En encadré rouge sont ciblées des zones particulières de formes de phase biologiques. 100

Figure III.10 : Volume des images de colonne biotique saturée après injection de chloronaphtalène (phase bleue) pour la visualisation de la phase biologique (verte) au sein du milieu poreux, avec en blanc la phase gazeuse. Deux seuillages visuels ont été appliqués (a) et (b) pour tenir compte des observations macroscopiques sur les coupes transversales 2D, avec notamment les limites de phases gazeuses – biologiques visibles sur les parois des pores (encadrés rouges)..... 101

Figure III.11 : Image MEB des milieux en conditions saturées biotiques acquises en fin d'expérimentation des échantillons collectés en tête de colonne. 105

Figure III.12 : Image MEB des milieux en conditions insaturé biotique acquises en fin d'expérimentation des échantillons collectés en tête de colonne 106

Figure III.13 : Observation au MEB environnemental d'échantillons secs de sables collectés en tête de colonnes à trois grossissements avec la colonne de gauche : A) échantillons des milieux biotiques saturés et la colonne de droite ; B) échantillons de milieux biotiques insaturés. ... 108

Figure III.14 : Images obtenues en microscopie électronique à balayage d'un développement de bactéries adhérentes à une matrice sableuse via un réseau filamentaire d'EPS, d'après Tecon et Or 2017..... 109

Figure III.15 : Localisation des points d'analyse EDS sur les images d'échantillons biotiques insaturés obtenues en microscopie électronique à balayage sur MEB environnemental. Les analyses sont présentées sous forme de spectre et une quantification en poids moléculaire . 112

Figure III.16 : Localisation des points d'analyse EDS sur les images d'échantillons biotiques insaturés obtenues en microscopie électronique à balayage sur MEB environnemental. Les analyses sont présentées sous forme de spectre et une quantification en poids moléculaire. 113

Figure III.17 : Localisation des points d'analyse EDS sur les images d'échantillons biotiques saturés obtenues en microscopie électronique à balayage sur MEB environnemental. Les analyses sont présentées sous forme de spectre et une quantification en poids moléculaire et atomique des éléments identifiés sur les spectres. 114

Figure III.18 : Bilan de carbone sur la fraction solide des colonnes biotiques saturées et insaturées. Répartition des valeurs des teneurs en carbone organique et inorganique mesurées sur les sables tamisés en fin d'expérimentation (1 mois) rapportées à 100%. Les données sont présentées par fraction granulométrique, sur les sables fins (F) et grossiers(G)..... 116

Chapitre IV

Figure IV.1 : Données de suivi redox et pH des quatre colonnes au cours de l'expérimentation menée à 25°C et représentation des domaines redox et pH identifiés par modalités hydriques (saturé insaturé) et biologique (biotique, abiotique). 123

Figure IV.2 : Evolution temporelle des concentrations en fer et manganèse au cours de l'expérience en $\mu\text{g.l}^{-1}$ 126

Figure IV.3 : Diagrammes pH-redox : domaines de stabilité de l'eau (a) et domaines caractéristiques des signatures des différentes eaux de surface et profondeur (b). En rouge les conditions redox-pH des expérimentations en laboratoire (Motelica, Université d'Orléans). 128

Figure IV.4 : Projection des conditions Eh-pH expérimentales des colonnes sur le diagramme de stabilité du carbone en solution, à 25°C, d'après Takeno, 2005. 130

Figure IV.5 : Projection des domaines Eh-pH mesurés au cours de l'expérience pour chacune des modalités sur les diagrammes de stabilité des éléments Mn, As, Fe, Pb, Cr et Cu en solution à 25°C. D'après Takeno, 2005. 133

Figure IV.6 : Projection des corrélations des quatre groupes de données sur les axes F1 et F2 expliquant 84,95 % de la variabilité des données. Réalisé sur les données moyennées sur les pas de temps T3 à T6 (après stabilisation des conditions). En vert, la flèche définissant le domaine biotique et en noir la flèche définissant la variabilité de teneur en eau vers le milieu saturé. 135

Figure IV.7 : Analyse en composante principale (ACP) des données expérimentales moyennées par colonne sur les variables stabilisées à partir de T3 au cours de l'expérimentation, pour

chacune des quatre conditions expérimentales. Les axes F1 et F2 expliquent 84,95% de la variabilité des données. Les données quantitatives sont présentées en trait plein noir et les données supplémentaires qualitatives sont présentées en pointillées gris.....	136
FigureIV. 8: Diagramme simplifié de la chimiolithotrophie aérobie.....	138
Figure IV.9 : Projection des corrélations des données biotiques (saturées et insaturées) de données sur les axes F1 et F2 expliquant 53,97 % de la variabilité des données. Réalisé sur les données non moyennées sur les pas de temps T3 à T6 (après stabilisation des conditions). L'ellipse verte avec remplissage représente les variables biotiques saturées et l'ellipse verte simple représente les échantillons biotiques insaturés.	142
Figure IV.10 : Analyse en composante principale (ACP) des données brutes biotiques sur les six pas de temps pour chacune des deux conditions hydriques biotiques expérimentales. Les axes F1 et F2 expliquent 52,97% de la variabilité des données.	143
Figure IV.11 : Schémas conceptuel des processus biogéochimiques de modification des spéciations métalliques dans les systèmes poreux en colonne au cours de l'expérience de percolation, en contexte saturé abiotique (a), saturé biotique (b), insaturé abiotique (c) et insaturé biotique (d).	145

Chapitre V

Figure V.1 : Exemples de géométries utilisées en microfluidique ; Wang et al., 2011; Ittis et al., 2011; Kumar Gunda et al., 2011; Baek et al., 2015 ; Deng et al., 2015.....	150
Figure V.2 : Conception de la géométrie des labo on chip comme analogue sutrcuturax des milieux poreux biomodaux en colonnes (a) modélisés par un algorithme de type Monte Carlo selon les paramètres physiques des systèmes en colonnes (b) avec une ouverture de chemin d'écoulement préférentiels et culs de sacs (c) permettant de créer une connectivité analogue au milieux poreux en colonnes et fabrication du lab on chip en PDMS de 23 μm d'épaisseur fermé par lame de verre (d).	151
Figure V.3 : Montage du banc expérimental connecté en conditions stériles sous hotte (a). le montage est placé sous microscope (b) et l'injection est régulée par montage de la seringue d'alimentation sur un pousse seringue (c) pour un suivi en continue par acquisition d'images (d).	153
Figure V.4 : Acquisition d'images en microscopie inversée (a) et reconstruction du panorama complet du micro modèle (b) par mosaïc d'images (a) (Photoshop).	155
Figure V.5 : Spectre IR caractéristique des réponses d'un échantillon bactérien partiellement hydraté D'après Jamal, 2015.	157

Figure V.6 : Conditions expérimentales des analyses sur les échantillons in situ en eau (a) et sec (b) et sur un système déstructuré avec découpe du polymère (c)..... 158

Figure V.7 : Observation des lignes de courant par modélisation des écoulements au sein du lab on chip par résolution de l'équation de Navier Stokes en condition saturée (COMSOL multiphysics®). Avec v la vitesse d'entrée du système = 10^{-4} m.s⁻¹, avec 1, 2 et 3 : images issus des tests expérimentaux de traçage au sein des lab on chip. **Erreur ! Signet non défini.**

Figure V.8 : Visualisation des gradients de vitesse et des champs de vitesse par modélisation des écoulements au sein du lab on chip par résolution de l'équation de Navier Stokes en condition saturée (COMSOL multiphysics®). Avec v la vitesse d'entrée du système = 10^{-4} m.s⁻¹. 162

Figure V.9 : Visualisation des gradients du nombre de Reynolds par modélisation des écoulements au sein du lab on chip par résolution de l'équation de Navier Stokes en condition saturée (COMSOL multiphysics®). Avec v la vitesse d'entrée du système = 10^{-4} m.s⁻¹. 162

Figure V.10 : Images en microscopie inversée de suspension bactérienne injectées dans le lab on chip en macération avec une suspension de bactéries dans une goutte de solution (a), une concentration de bactéries concentrées à l'interface air-eau(b) et un dépôt de bactérie après évaporation le long de la forme du ménisque d'eau évaporé (c)..... 164

Figure V.11 : Images en microscopie inversée de suspension bactérienne injectées dans le lab on chip en circulation avec des biofilms bactériens structurés dans un canal préférentiel en circulation de solution (a), des biofilms bactériens en contexte de circulation suivant les lignes de courant (b) et un dépôt de biofilms bactériens après circulation en conditions d'évaporation et modification de la forme du ménisque d'eau par la structure dendritique hydratée du biofilm (c). 166

Figure V.12 : Images de fluorescence du biofilms *P. aeruginosa*, d'après Aldeek, 2010..... 167

Figure V.13 : Panoramas du lab on chip au cours de l'expérience de quatre jours de J1 à J4. Avec au premier en J1 les conditions initiales à l'injection de solution dans le lab on chip (a), le panorama à J2 montrant l'installation de dépôt bactériens (b), le développement sur ces dépôts de biofilms bactériens (c) et l'adaptation des biofilms aux conditions d'écoulement dans le système (d). 168

Figure V.14 : Spectre Raman obtenus sur les deux supports ; verre (a) et PDMS (b) et spectre d'un échantillon de suspension bactérienne (c) comparé aux bandes de nombre d'onde des supports (a et b), à un macérât après évaporation (d) et une deuxième solution biologique de test (e)..... 170

Figure V.15 : Figures issues de la littérature illustrant la diversité de signatures biologiques en spectroscopie Raman. Signaux biologiques enregistrés sur un échantillon biologique issu d'eau usées (Wagner et al., 2010). Avec les photographies du développement de biofilms sous deux conditions d'écoulement et de nombre de Reynolds différents scannées pour la spectroscopie Raman (a) et les spectres associés (b) pour les deux points d'analyses sur filament et sur cellules du biofilms (1 et 2). Photographies (c) spectres associés de deux biofilms a différents temps de

croissance (d). Spectres de deux types de constituants des biofilms, polysaccharides et protéines (e)..... 173

Figure V.16 : Spectres Raman à différents temps de culture de culots bactériens partiellement hydratés. D'après Jamal, 2015. 174

Figure V.17 : Spectres Raman des échantillons biologiques analysés sur une zone de biofilms développé de 5 jours, grossissement 20x en système clos (1), sur une seconde zone de biofilm (2), sur le premier support PDMS (3) et sur de la lame de verre (4)..... 175

Figure V.18: Image de biofilms après 5 jours de développement en système clos, grossissement 100x (a) et spectre d'analyse de ce biofilm par spectroscopie confocale cartographique. 176

Table des tableaux

Chapitre II

Tableau II.1 : Composition chimique type des deux sables grossier de diamètre 1,8 mm (Silice HN34) et fin 211 μm (Silice 1/2.5) utilisés en mélange.....	56
Tableau II.2 : Caractéristiques physiques type des deux sables grossier de diamètre 1,8 mm (Silice HN34) et fin 211 μm (Silice 1/2.5) utilisés en mélange.	56
Tableau II.3 : Caractéristiques des colonnes de sable avec A, la section des colonnes, h, la hauteur totale du volume utile des colonnes, h_{sable} , la hauteur de sable dans la colonne correspondant au volume de sable $V_{\text{éch}}$, et à la masse de sable m_s dans le volume totale V_{total} de la colonne.	57
Tableau II.4 : de porosité totales mesurée par porosimétrie au mercure en volume massique (V_{Hg}) ($\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$) et porosité (Φ_{Hg}) (%).	62
Tableau II.5 : Teneurs en eau massiques à saturation W en $\text{g}.\text{g}^{-1}$ des échantillons 20 %, 40 % et 100% obtenues par pesées sèches et humides.	62
Tableau II.6 : Valeurs maximales des distributions de taille de diamètre de pore d'après les mesures de porosimétrie au mercure.	65
Tableau II.7 : Valeurs des vitesses apparentes V_{app} , vitesses réelles $V_{\text{réelle}}$ et temps de séjours (t_s) calculées par intégration des courbes de percée des expérimentations de traçage au BB (bleu brillant) selon l'équation de distribution des temps de séjours à débit constant (cf. chapitre 2, A, II, b).	73
Tableau II.8 : Tableau bilan des valeurs de teneurs en eau moyennes obtenues pour l'échantillons 20 % et calculées via a) les courbes de rétention en eau, à saturation (W_{sat} $\text{g}.\text{g}^{-1}$) et insaturée (W_{insat} $\text{g}.\text{g}^{-1}$) à $pF = 1,5$ équivalent à $\Delta h = 30$ cm, b) les mesures de porosimétrie mercure avec le volume poral total ($V_{\text{Hg sat}}$ (en $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$) et une valeur de porosité totale ($\Phi_{\text{HG sat}}$ %) équivalente c) les pesées des colonnes saturées (W_{sat}) et insaturées (W_{insat}) en fin d'expérimentation hydrodynamiques et d) issus des calculs en volumes 3D en conditions saturée (V_{sat} $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$) et insaturée (V_{insat} $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$) sur un ROI. Les calculs ont été réalisés grâce au volume de voxel de l'eau / volume de voxel du solide rapporté en masse par la densité des sables (2.65) ($V_{\text{gstudiomax}}$).	75
Tableau II.9 : Volumes des différentes fractions solide, liquide et gazeuse de l'échantillon sur le ROI teneurs en eau, porosité totale et résiduelle (influence de la biomasse) calculés en conditions saturées et insaturées d'après le nombre de voxel des différentes fractions présentées en figures 15 et 16.	76

Chapitre III

Tableau III1 : Conditions et modalités expérimentales de contrôle des colonnes ; avec les modalités hydriques (saturées / insaturées) et biologiques (abiotique / biotique), le débit

constant d'entrée $Q_{entrée}$ ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$), la succion imposée au système par la valeur de Δh (cm) et la teneur en eau massique W ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), maintenue constante dans chacune des quatre colonnes.
 89

Tableau III.2 : Valeurs de volumes calculés sur un ROI d'après les images 3D (VGStudiomax) pour chacune des phases gazeuse, liquide et solide, en cm^3 , permettant le calcul des teneurs en eau et de la porosité totale ainsi que la porosité après croissance des biofilms (porosité résiduelle). 102

Tableau III.3 : Valeurs de carbone organiques (%) et inorganiques (%) mesurées sur les fractions granulométrique des sables seche pour les modalité biotiques (satur es et insatur es).
 115

Chapitre IV

Tableau IV.1 : Valeurs des concentrations en COD (carbone organique dissous) obtenues sur les échantillons de recharge en entrée d'expérimentation et moyennes des concentrations des percol ats pr elev es en sortie de colonne en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 127

Tableau IV.2: Moyennes des concentrations en ions majeurs ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) en solution dans les échantillons de sortie de colonnes expérimentales. Seuls les ions mesur es sont pr esent es, les ions NH_4^+ et NO_2^- n'ont pas pu être mesur es. 131

Tableau IV.3: Moyennes des concentrations totales en métaux et m talloides ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) en solution dans les échantillons en sortie de colonnes, mesur es sur des échantillons filtr es à $0,22 \mu\text{m}$ 132

Chapitre V

Tableau V.1 : Paramètres de l'expérience de cinq jours dans le micro-modèle. 154

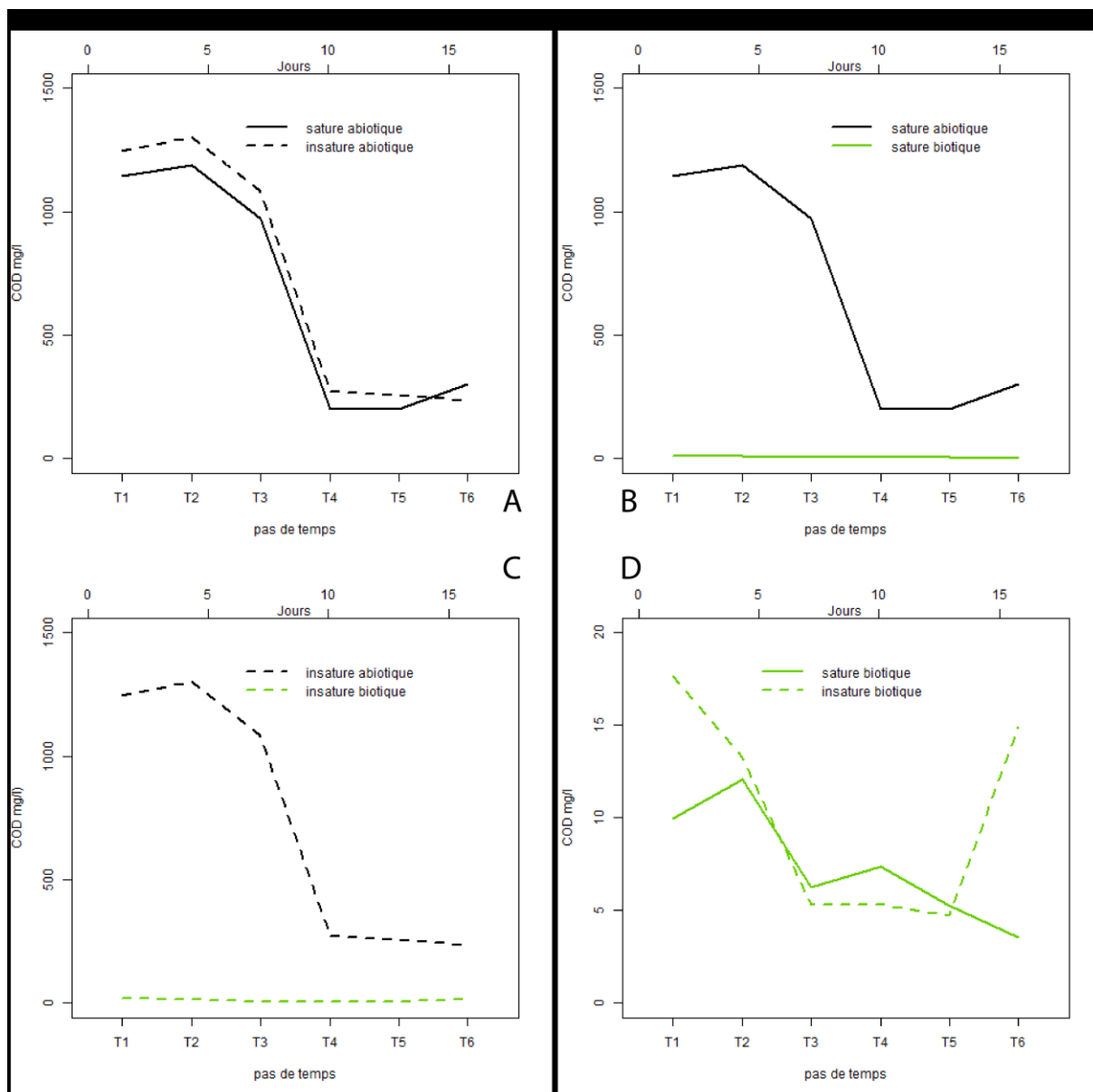
Tableau V.2 : Attributions des bandes de nombre d'onde (cm^{-1}) d'échantillon biologiques sur *E.coli* et *P.fluorescens* tir e de Jamal, 2015 (références incluses) avec les attribution de chacune des bandes aux différents constituants des biofilms (en noir) et données issues de Wagner et al., 2010 (références incluses) et Jamal, 2015, sur un consortium de bactéries issu d'échantillons d'eaux usées. Les différents types de déformation sont repr esent es avec ν la vibration d'élongation, δ la vibration de déformation. (PL les phospholipides, A.G les acides gras, Phe, Tyr, Trp les acides aminés, A, C, T, G et U les acides nucléiques constituant l'ADN (acide désoxyribonucléique) et l'ARN (acide ribonucléique). Ar : aromatique, ep :  paulement, sq : squelettique). 159

Annexes

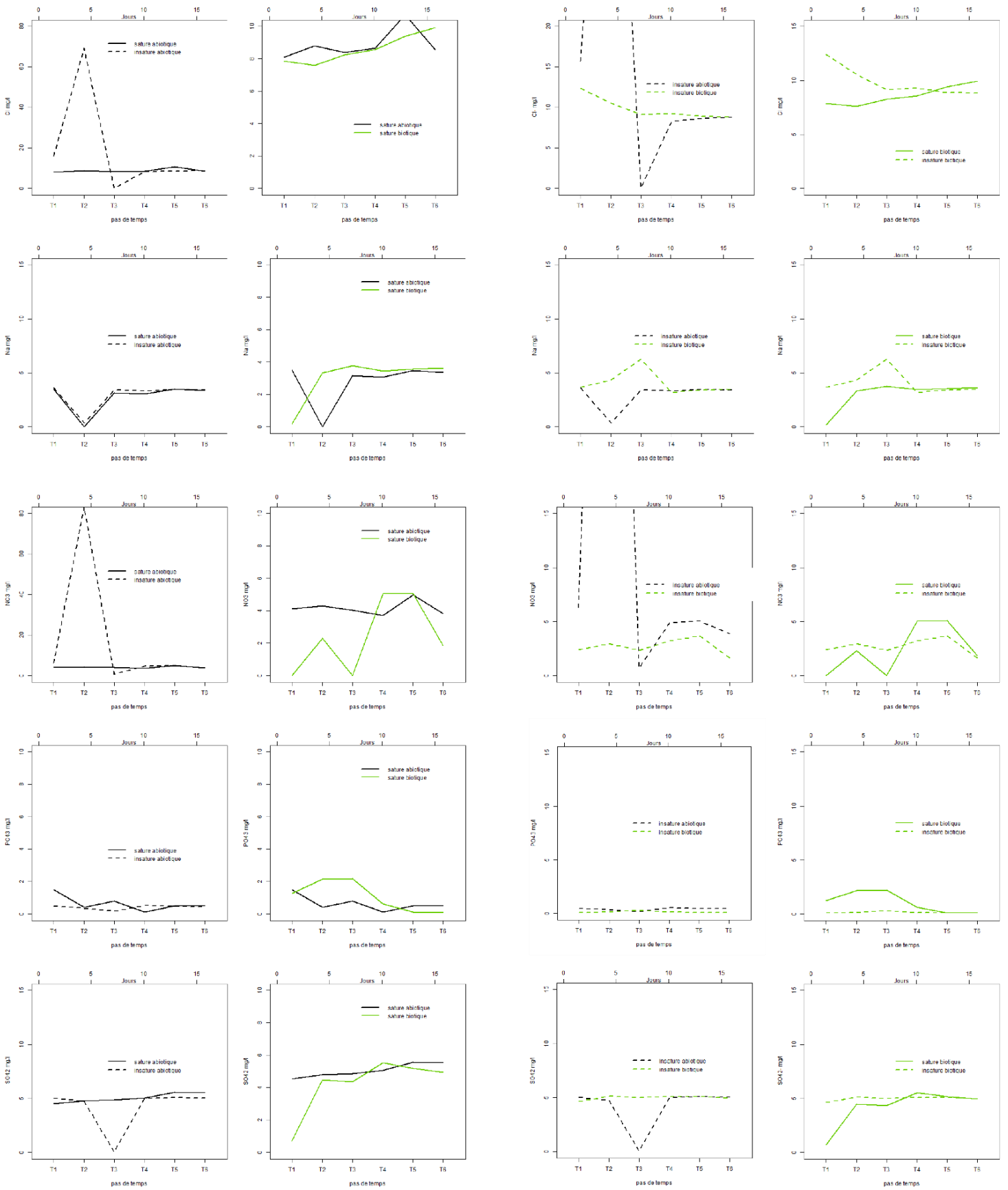
Annexe 1 : tableau récapitulatif des valeurs obtenues pour les différents paramètres mesurés sur les expérimentations. Avec le pas de temps (T1, T2 etc.), les numéros de colonne , les caractéristiques hydriques et biologiques, les temps de séjour (ts) calculés sur les colonnes, les teneurs en eau massiques (W), les conditions redox et pH, les valeurs quantitatives d'azote total (Nt) en mg.l⁻¹, les valeurs des concentrations totales en solution en métaux et métalloïdes en µg.l⁻¹, les teneurs en COD en mg.l⁻¹ et les teneurs en ions majeurs en solution en mg.l⁻¹.

pas de temps	colonne	caractéristique hydrique	caractéristique biologique	ts	W	Redox	pH	N _T	Cr	Mn	Fe	Cu	As	Pb	COD	NO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ²⁻	Na ⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Ca ²⁺
T1	1	sature	abiotique	1,450	0,300	395,405	7,719	1,322	9,938	325,851	277,405	35,396	3,152	3,252	1143,500	4,131	8,098	4,527	1,514	3,500	30,940	6,132	31,174
T2	1	sature	abiotique	1,450	0,300	363,633	7,939	1,230	6,009	342,812	256,517	35,987	3,877	11,475	1187,000	4,295	8,813	4,793	0,434	NA	NA	NA	NA
T3	1	sature	abiotique	1,450	0,300	368,390	8,078	3,650	7,081	305,328	266,695	40,456	4,087	15,543	970,500	4,026	8,387	4,852	0,807	3,169	NA	6,166	NA
T4	1	sature	abiotique	1,450	0,300	374,729	8,065	1,422	9,333	163,366	290,250	65,894	2,470	14,956	200,250	3,702	8,665	5,059	0,118	3,057	NA	0,001	NA
T5	1	sature	abiotique	1,450	0,300	375,992	8,131	4,000	6,363	213,069	267,687	28,487	2,731	7,817	198,200	4,975	10,696	5,560	0,521	3,493	NA	6,520	NA
T6	1	sature	abiotique	1,450	0,300	377,304	8,035	0,700	8,503	270,126	282,290	45,873	2,835	16,556	303,600	3,841	8,550	5,542	0,505	3,351	NA	0,001	NA
T2	2	sature	biotique	1,450	0,300	350,300	7,032	1,104	8,715	310,916	259,228	53,846	3,037	6,364	12,085	2,298	7,589	4,479	2,166	3,344	3,138	5,698	27,104
T3	2	sature	biotique	1,450	0,300	358,733	7,234	3,200	8,190	99,932	192,758	13,750	3,235	1,387	6,250	0,001	8,252	4,360	2,202	3,782	NA	NA	NA
T4	2	sature	biotique	1,450	0,300	369,814	7,149	1,221	5,264	216,770	287,046	38,957	2,863	14,741	7,400	5,063	8,564	5,550	0,617	3,459	NA	6,498	NA
T5	2	sature	biotique	1,450	0,300	364,749	7,181	1,300	11,342	22,283	289,433	46,625	2,533	5,793	5,250	5,073	9,394	5,183	0,121	3,565	NA	NA	NA
T6	2	sature	biotique	1,450	0,300	380,096	7,111	0,320	11,147	4,122	272,466	43,476	2,364	3,216	3,580	1,854	9,924	4,940	0,105	3,628	NA	NA	NA
T1	3	insature	abiotique	1,980	0,180	212,902	7,184	1,415	12,627	285,443	257,774	38,380	3,941	10,474	1247,000	6,329	15,741	5,023	0,477	3,623	3,122	6,667	29,189
T2	3	insature	abiotique	1,980	0,180	217,439	7,196	1,282	5,800	335,422	288,988	28,766	3,852	11,803	1300,500	82,999	69,313	4,740	0,374	0,374	3,826	7,093	26,321
T3	3	insature	abiotique	1,980	0,180	218,289	7,158	3,800	4,383	297,191	287,201	28,605	3,589	12,264	1084,000	0,736	0,096	0,055	0,188	3,412	2,498	6,358	49,674
T4	3	insature	abiotique	1,980	0,180	222,919	7,085	1,347	3,681	232,353	297,624	31,458	3,302	13,477	272,750	4,917	8,253	4,992	0,528	3,322	NA	6,542	NA
T5	3	insature	abiotique	1,980	0,180	217,169	7,091	1,550	6,285	222,719	291,517	39,277	3,016	16,964	258,000	5,044	8,655	5,069	0,476	3,440	NA	NA	NA
T6	3	insature	abiotique	1,980	0,180	220,504	7,103	0,750	7,036	263,718	277,493	42,228	2,897	19,327	233,900	3,914	8,804	5,050	0,441	3,399	6,553	6,514	NA
T1	4	insature	biotique	1,980	0,180	341,683	7,454	1,083	9,903	331,151	282,281	40,548	2,725	10,348	17,630	2,409	12,386	4,663	0,119	3,696	3,051	6,212	NA
T2	4	insature	biotique	1,980	0,180	288,420	7,367	0,943	4,933	331,703	237,553	31,332	3,074	8,621	13,260	2,983	10,567	5,115	0,147	4,345	3,042	5,752	NA
T3	4	insature	biotique	1,980	0,180	291,829	7,486	3,100	6,627	286,061	274,189	36,897	2,941	9,545	5,300	2,350	9,138	4,995	0,312	6,280	3,997	7,014	NA
T4	4	insature	biotique	1,980	0,180	288,363	7,237	0,844	14,117	177,461	277,748	53,428	3,024	13,227	5,290	3,223	9,269	5,076	0,152	3,208	NA	NA	NA
T5	4	insature	biotique	1,980	0,180	320,546	7,533	1,100	9,245	158,720	282,589	40,401	2,445	7,173	4,700	3,674	8,893	5,076	0,112	3,422	NA	NA	NA
T6	4	insature	biotique	1,980	0,180	304,836	7,426	1,450	4,239	185,609	268,989	30,256	2,407	3,668	14,900	1,666	8,825	4,958	0,107	3,476	NA	NA	NA

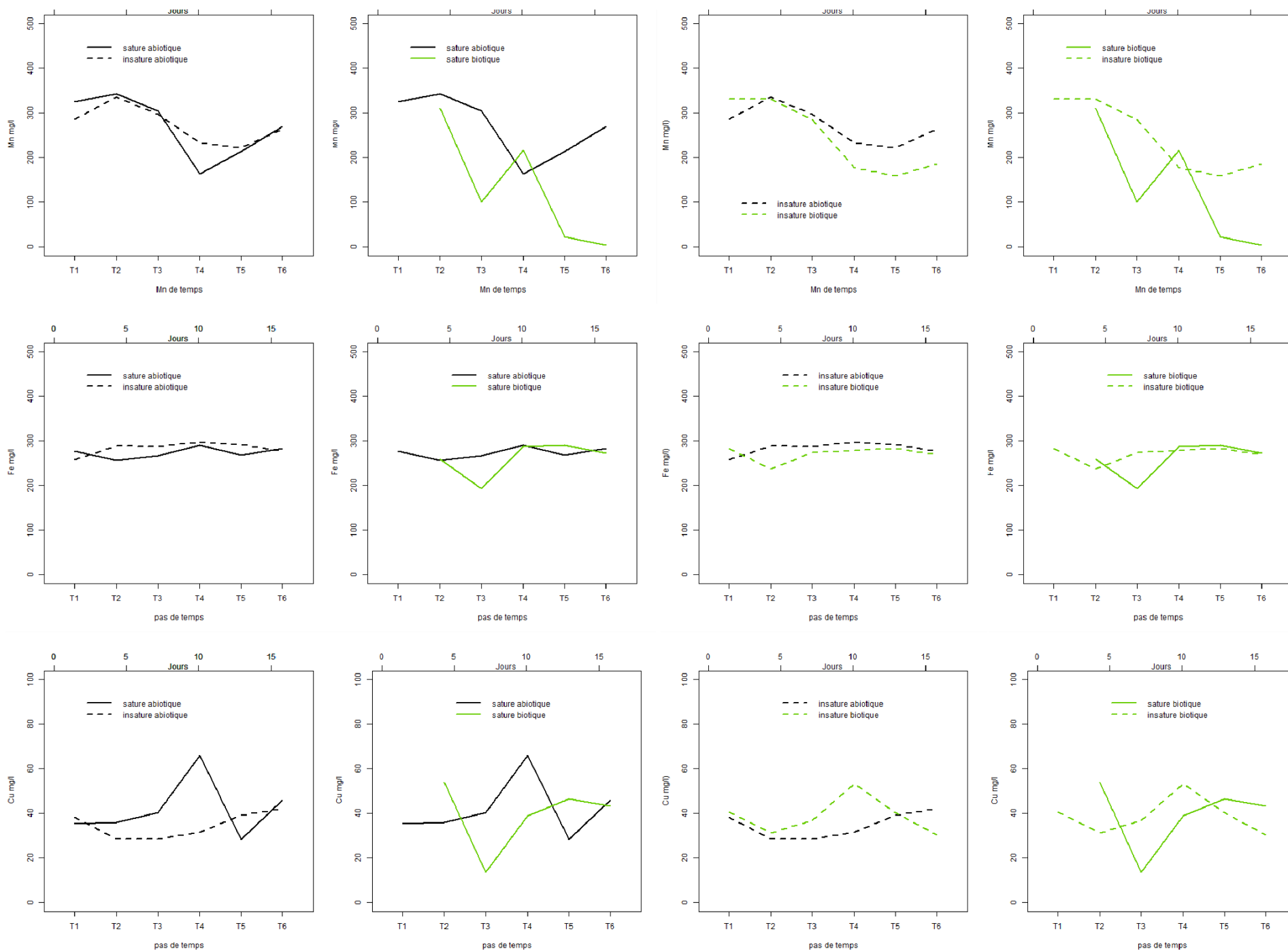
Annexe 2 : Evolution temporelle des concentrations en carbone organique dissous pour les quatre modalités expérimentales représentées par type de conditions (abiotiques, saturé, insaturées, biotiques).

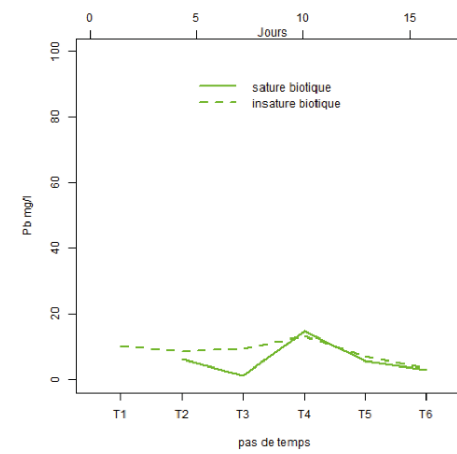
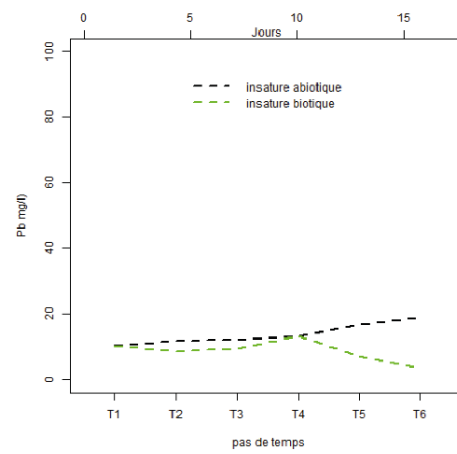
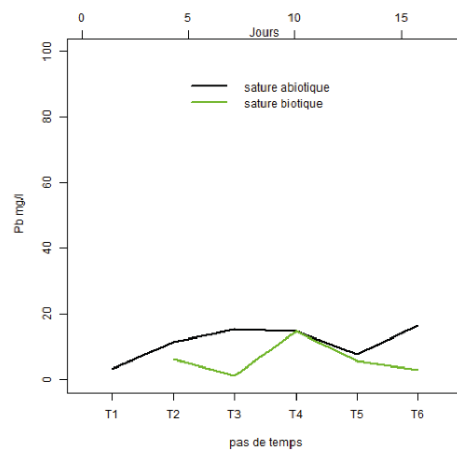
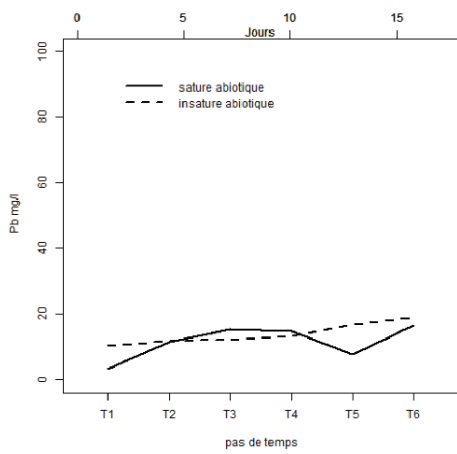
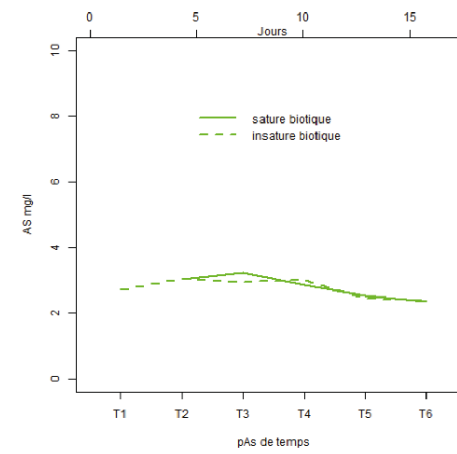
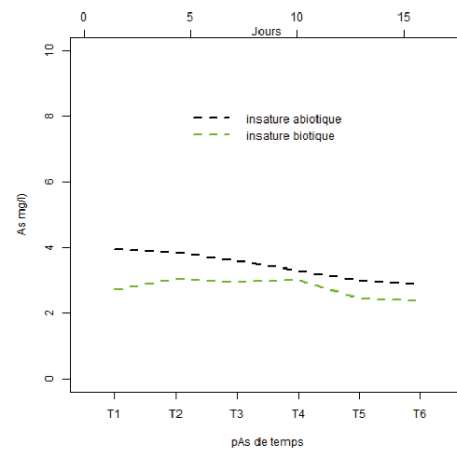
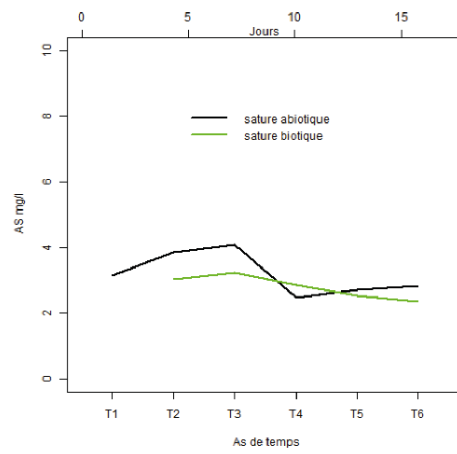
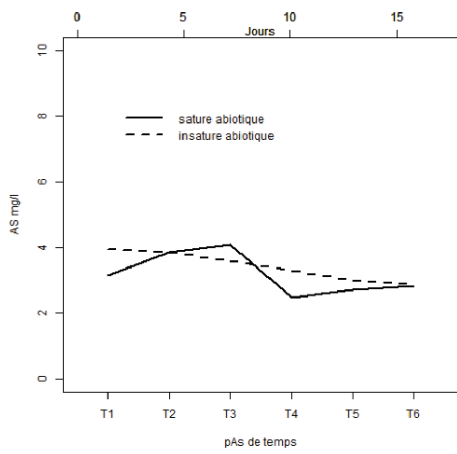
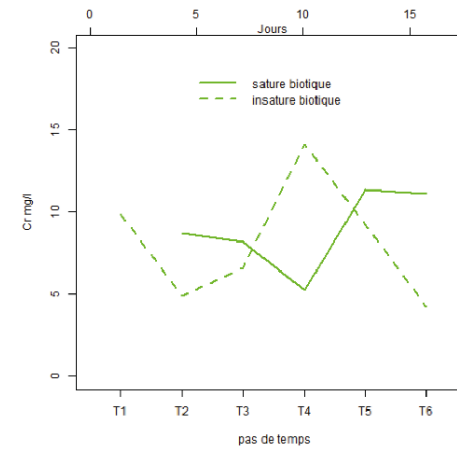
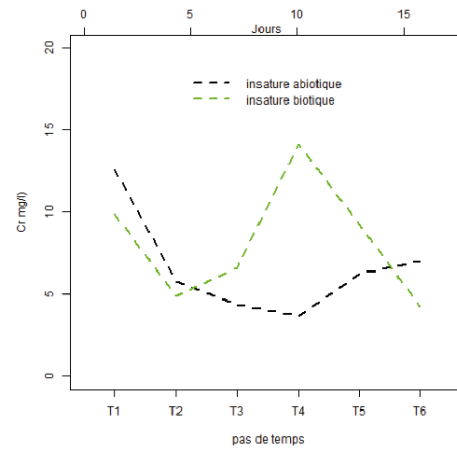
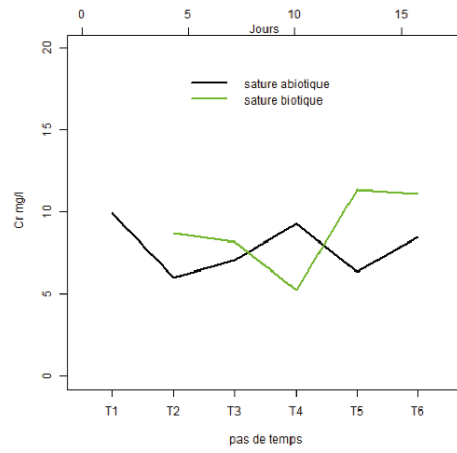
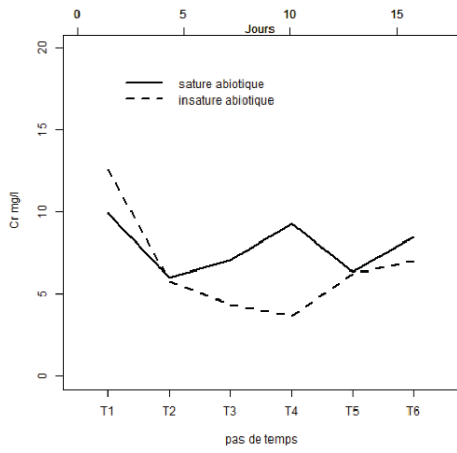


Annexe 3 : Evolution temporelle des données de teneurs en ions (en mg.l⁻¹) dans les percolâts en sortie de colonne aux différents pas de temps T1 à T6.



Annexe 4 : Evolution temporelle des données de teneurs en métaux et métalloïdes (en $\mu\text{g.l}^{-1}$) dans les percolâts en sortie de colonne aux différents pas de temps T1 à T6.





Note : L'évolution temporelle des concentrations totales en métaux et métalloïdes montre une forte diminution des concentrations en Mn au cours de l'expérimentation, et ceci en conditions abiotiques (Figure 11a). Cette diminution est plus importante en conditions biotiques, si l'on compare les courbes des conditions biotiques et abiotiques (Figure 11a et b). Si l'on compare les conditions biotiques entre elles (Figure 11b), la diminution semble plus importante pour la modalité « saturée biotique » par rapport à la modalité « insaturée biotique ».

On a par conséquent un appauvrissement de la solution en Mn d'autant plus important que l'on se place en conditions biotiques et que l'on sature en eau le système poreux. Les concentrations en fer présentent en revanche des valeurs stables au cours de l'expérience (Figure 11c et d).

Les concentrations en cuivre présentent globalement des concentrations stables malgré quelques fluctuations en cours d'expérimentation (Figure 11e et f).

Le chrome présente une diminution des concentrations en conditions abiotiques (Figure 12a) pour les deux conditions saturées et insaturées. On observe une augmentation des concentrations en milieu biotique (Figure 12b). Enfin, si l'on compare les conditions biotiques saturées et insaturées (Figure 12b), on constate une augmentation plus importante en condition saturée par rapport à la condition insaturée.

Les concentrations en arsenic total présentent une diminution tout au long de l'expérience (Figure 12c et d).

Enfin, le plomb présente une tendance à l'augmentation en conditions abiotiques (Figure 12e). Les échantillons biotiques (Figure 12f) présentent, quant à eux, une tendance inverse avec une diminution des concentrations au cours du temps.

Table des matières

Chapitre I Synthèse bibliographique	7
I. Teneurs, spéciations et mobilité des éléments traces	11
I.A. Contamination des sols par les apports anthropiques en éléments traces.....	12
I.A.1 Enjeux de la contamination des sols par des éléments traces	12
I.A.2. Spéciation des éléments traces et paramètres physico chimiques du sol	14
I.A.3. Interaction avec les constituants du sol	16
I.A.4. Les éléments traces en solution.....	18
I.B. Spéciation et mobilité des éléments traces dans les sols.....	18
I.B.1. Le cuivre et le plomb.....	18
I.B.2. Le chrome.....	20
I.B.3. L'arsenic.....	23
I.B.4. Interaction des cycles géochimiques des métaux et métalloïdes : impact du fer et du manganèse en contexte contaminé	26
II. - Distribution de l'activité microbienne dans les sols	27
II.A. La fonction biologique des sols : importance de la distribution spatiale des micro-habitats	27
II.A.1. Définition et fonctionnement d'un biofilm.....	27
II.A.2. Observation et localisation des biofilms dans les sols ; fonctionnement des micro-habitats.....	29
II.B. - Interactions des microorganismes et leur microenvironnement.....	31
II.C. Interactions biophysiques	34
II. D. Interactions biogéochimiques.....	40
II.D.1. Microorganismes et conditions géochimiques.....	41
II.D.2. Localisation microorganismes et matière organique	42
II.D.3. Interfaces biofilms-cycle géochimiques des éléments traces	44
II.D.4. Adaptation des biofilms à leur micro-habitat	44
 Chapitre II Structure et fonctionnement hydrique des systèmes poreux présents dans les colonnes du banc expérimental.	 49
I. Introduction	51

II. Matériel et méthodes.....	51
II.A. Le dispositif expérimental	51
II.B. Le milieu poreux contenu par les colonnes	55
II.C. Porosimétrie au mercure	57
II.D. Micro-tomographie à rayons X	57
II.E. Analyses numériques des images.....	58
II.F. Propriétés de rétention en eau des massifs poreux.....	59
II.G. Caractérisation hydrodynamique des massifs poreux par traçage de bleu brillant ..	60
III. Résultats et discussion	62
III.A. Porosité des mélanges sableux dans les colonnes	62
III.B. Distribution des volumes poraux en fonction de leur accessibilité	63
III.C. Images 2D des systèmes poreux.....	66
III.C.1. Les massifs poreux à 10 % de sable fin.....	67
III.C.2. Les massifs poreux à 20 % de sable fin.....	67
III.C.3. Les massifs poreux à 40 % de sable fin.....	68
III.D. Propriétés de rétention en eau	68
III.E. Vitesse des écoulements dans colonnes saturées et insaturées	71
III.F. Propriétés de transfert et images 3D des massifs poreux dans les colonnes	75
IV. Conclusion.....	79
Chapitre III Développement de biofilms et analyse de leur localisation sur les milieux poreux des colonnes du banc expérimental	81
I. Introduction.....	83
II. Matériel et méthodes.....	83
II.A. La solution de percolation.....	83
II.B. Préparation de la suspension bactérienne permettant d'inoculer un consortium de micro-organismes dans les massifs poreux sur colonnes	85
II.C. Inoculation des milieux poreux.....	85
II.C. Conditions expérimentales de développement des biofilms sur colonnes.....	87
II.D. Observations par microscopie électronique à balayage (MEB).....	90
II.E. Analyse en micro tomographie à rayon X et traitement d'images.....	90
II.F. Introduction d'un agent contrastant pour les biofilms présents dans le massif poreux.	90
II.G. Mesure des teneurs en carbone sur la fraction solide des milieux poreux.....	92
III. Résultats et discussion.....	93

III.A. Identification des biofilms en micro tomographie à rayon X.....	93
III.B. Présentation des images obtenues en microscopie électronique à balayage (MEB).	104
III.C. Données des analyses réalisées à l'aide du détecteur dispersif en énergie (EDS)	108
III.D. Bilan de carbone et activité bactérienne	115
IV. Conclusion	116
Chapitre IV Composition chimique des percolats et géochimie du système	119
I. Introduction	121
II. Matériel et méthode	122
II.A. Les analyses au cours de l'expérimentation	122
III. Résultats et discussion	122
III.A. Les conditions Redox (Eh) –pH.....	123
III.B. Evolution du carbone organique dissout (COD) dans les percolats.....	127
III.C. Evolution de la concentration en ions majeurs.....	130
III.D. Evolution des concentrations et spéciations des métaux et métalloïdes présents dans les percolats.....	131
III.E. Analyse statistique des données géochimiques mesurées en sortie de colonnes...	134
IV. Conclusion.....	144
Chapitre V Développement de biofilms au sein d'un dispositif de type « laboratoire sur puce » Apports de la micro fluidique.....	146
I. Introduction.....	148
II. Matériel et méthodes.....	148
II.A. Conception des GLoCs	148
II.B. Fabrication des GLoCs	151
II.C. Inoculation des GLoCs	153
II.D. Modélisation des écoulements dans les GLoCs.....	155
II.E. Analyse en spectroscopie Raman.....	156
III. Résultats et discussions	160
III.A. Structure du milieu poreux bimodal analogue à celui présent dans les colonnes	160
III.B. Modélisation des écoulements dans les GLoCs.....	161
III.C. Installation et développement biologiques dans les GLoCs.....	163
III.C.1. Suspension bactérienne en conditions statiques	163

III.C.2. Suspension bactérienne en conditions dynamiques	165
III.C.3. Devenir des biofilms en conditions dynamiques de percolation de solution analogue à l'expérience sur colonnes	167
III.D. Caractérisation de l'échantillon biologique par spectrométrie et micro-spectrométrie confocale Raman pour le suivi in situ des biofilms au sein des micro-modèles.	168
IV. conclusion	178
Synthèse.....	181
Conclusion générale.....	190

Chloé CAUREL

Etude expérimentale de la mobilité d'éléments traces (Cr, Cu, Pb, As) à l'échelle d'un système poral bimodal : importance et localisation de l'activité microbienne

De nombreuses questions demeurent quant au rôle de l'activité microbienne dans la mobilité des éléments traces dans les sols. Ces questions concernent tout autant la localisation de cette activité au sein de la porosité que la façon dont elle est affectée par les conditions de saturation ou de non saturation de la porosité, ou encore la façon dont elle affecte différemment les éléments traces. Les méthodes directes et non destructives pour l'observation de la macro- à la micro-échelle sont encore peu appliquées, de même que le suivi de l'activité des communautés microbiennes à différentes échelles dans le sol. Des techniques non invasives telles que la micro-tomographie à rayons X sont de plus en plus fréquemment utilisées pour la caractérisation du sol mais l'observation de biofilms nécessite un traitement plus complexe de l'image. La compréhension du développement des biofilms et de leur activité *in situ* reste limitée mais de nouvelles capacités d'expérimentation et d'observation apparaissent grâce au développement de dispositif micro fluidique de type « lab on chip » ou geological lab on chips « GLoCs ». L'objectif de la présente thèse est de mieux comprendre la mise en place des habitats microbiens «hotspot» dans les milieux poreux hétérogènes, saturés ou non, et leurs effets sur leur microenvironnement ainsi que sur la mobilité des éléments traces dans un sol contaminé. Deux dispositifs expérimentaux ont été utilisés sur la base d'une configuration d'échelles complémentaires : des petites colonnes de dimension centimétrique et des « laboratoires sur puce » de dimension sub-centimétrique, les deux dispositifs présentant une structure poreuse bimodale simplifiée, de propriétés mimant la structure d'un sol naturel hétérogène. Des expériences de circulation d'eau en conditions biotiques et abiotiques ont été réalisées afin d'observer l'impact de la microflore sur la bio-géochimie des milieux à petite échelle sous des conditions hydriques saturées et non saturées.

L'ensemble des paramètres géochimiques suivis sur le système expérimental définit quatre environnements géochimiques cohérents avec des conditions de percolation d'eaux naturelles. Le suivi du potentiel redox, peu suivi sur ce type de système expérimental, a permis de mettre en avant l'importance de l'activité biologique sur les microenvironnements géochimiques. Contrairement aux sols naturels contenant plus de matière organique que les friches industrielles, l'évolution du potentiel redox est contrôlé par l'activité biologique vis-à-vis du Fe et du Mn et non par l'oxydation de la matière organique et la disponibilité en oxygène. Le paramètre hydrique régit l'installation des biofilms et semble entraîner indirectement une différenciation ou une sélection des populations en présence dans le consortium microbien. L'activité biologique apparaît plus élevée dans les conditions saturées, et les processus semblent plus actifs dans des zones de transition en termes de taille de pores, comme observé en microscopie électronique à balayage, en micro-tomographie à rayons X, via les observations sur lab-on-chip et via les concentrations en carbone dans différentes fractions granulométriques. Sous les deux conditions hydriques distinctes, les biofilms contrôlent le système géochimique et le potentiel redox conduisant à l'immobilisation du Cu, du Pb et d'As mais aussi à la libération de Cr sous sa forme la plus toxique. La simplification du système par percolation sur sables a permis de reproduire des conditions proches des technosols de friches industrielles généralement peu organiques.

Mots-clés: sol, biofilms, hotspot, micro-tomographie à rayons X, microscopie Raman, biofilm, lab on chip, GLoCs

Experimental monitoring of trace elements (Cr, Cu, Pb, As) mobility at a bimodal porous media scale: microbial activity impact and location

Many questions remain about the role of microbial activity in the mobility of trace elements in soils. These questions concern both the location of this activity within the porosity and the way it is affected by the saturation or unsaturation conditions of the porosity, or the way in which it affects differently trace elements. Direct and non-destructive methods for macro-microscopic observation are still not widely applied, as is the monitoring of the activity of microbial communities at different scales in the soil. Non-invasive techniques such as X-ray micro-tomography are increasingly used for soil characterization, but biofilm viewing requires more complex image processing. Understanding the development of biofilms and their *in situ* activity remains limited, but new experimental and observation capacities are emerging thanks to the development of micro fluidic devices such as "lab on chip" or geological lab on chips « GLoCs ».

The objective of the present PhD is to better understand the conditions of establishment of microbial "hotspot" habitats in heterogeneous porous media, saturated or not, and their effects on their micro-environment as well as on the mobility of trace elements in contaminated soils. Two experimental devices were used on the basis of a configuration of complementary scales: small centimetric-sized columns and "lab-on-a-chip" sub-centimeter dimensions, the two devices having a simplified bimodal porous structure, properties mimicking the structure of a heterogeneous natural soil. Water transfer experiments in biotic and abiotic conditions were carried out to observe the impact of biofilms on the bio-geochemistry of small-scale environments under saturated and unsaturated water conditions, similar to the conditions of a real soil.

The set of geochemical parameters monitored on the experimental system defines four geochemical environments, consistent with natural water percolation conditions. The monitoring of the redox potential, not often monitored on this type of experimental system, has made it possible to highlight the importance of biological activity on their geochemical microenvironments. Unlike natural soils containing more organic matter than technosols of industrial sites, the evolution of the redox potential is governed by the biological activity with respect to Fe and Mn and not by the oxidation of the organic matter and the availability in oxygen. The hydric parameter governs the installation of biofilms and seems to lead indirectly to a differentiation or selection of the populations present in the microbial consortium. The biological activity was higher under saturated conditions, and the processes appear to be more active in transition zones in terms of pore size, as observed by scanning electron microscopy, X-ray micro-tomography, via observations on lab-on-chip and via carbon concentrations in different particle size fractions. Under the two distinct hydric conditions, biofilms control the geochemical system and the redox potential leading to the immobilization of Cu, Pb and As, but also to the release of Cr in its most toxic form. The simplification of the system by percolation on sands made it possible to reproduce conditions close to technosols of industrial sites, which are generally poor in organic matter.

Keywords : unsaturated porous media, hotspot, X-ray micro-tomography, Raman microscopy, biofilms, lab on chip, GLoCs