

Pilote de traitement *in situ* du chrome dans un sol industriel non saturé Procédé d'immobilisation par des bactéries réductrices

Rapport final

BRGM/RP-53163-FR

juin 2004

Étude réalisée dans le cadre des opérations de recherche
en partenariat industriel du BRGM 2001-RPI-110

I. Ignatiadis, F. Battaglia-Brunet, C. Michel, D. Morin



Avertissement

Le tirage initial de ce rapport, en nombre fixé par convention, est diffusé à son commanditaire. Sa communicabilité ultérieure à des tiers liée à la prise d'une décision administrative formelle à laquelle il concourt, conformément à la loi n° 78-753 du 17 juillet 1978. Passé ce délai, ce rapport devient communicable à tout tiers extérieur qui en ferait la demande ; le BRGM ne peut plus être tenu comme responsable de l'usage qui pourrait en être fait et des éventuelles pouvant en résulter.

* * * * *

Mots clés : Chrome, Chromate, Cr(VI), Réduction, Immobilisation *in situ*, Bactéries sulfato-réductrices, Bactéries chromate-réductrices, HRC, Hydrogen Release Compounds, Sol, Traitement, Colonne, Pilote.

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

Ignatiadis I., Battaglia-Brunet F., Michel C. et Morin D. (2004) – Pilote de traitement *in situ* du chrome dans un sol industriel non saturé : procédé d'immobilisation par des bactéries réductrices. BRGM/RP-53163-FR, 45 p., 26 ill.

Synthèse

Depuis longtemps, le chrome est l'un des métaux les plus largement utilisés dans l'industrie (traitement des métaux, des bois, des textiles, tannerie, des cuirs, etc.) et de nombreux sites industriels français connaissent une pollution de leurs sols par le chromate, la forme hexavalente du chrome. Ce polluant métallique soluble et toxique peut affecter la qualité des eaux souterraines.

Le site de Bois-Colombes (92), anciennement exploité par la société HISPANO-SUIZA, est pollué par du chrome sur une zone bien circonscrite non saturée. Le chrome est présent sous deux formes : Cr(VI) (fortement soluble et toxique) et Cr(III) (moins toxique et très peu soluble).

Ce rapport est l'aboutissement technique d'une partie de l'étude, initiée et poursuivie dans le cadre de la convention BRGM-ADEME n° 0172029 du 3 décembre 2001 et du contrat de Recherche en Partenariat Industriel (RPI) n° 110 du 25 octobre 2001 entre le BRGM et HISPANO-SUIZA (groupe SNECMA).

Les destinataires de ce rapport, édité au printemps 2004, sont les trois financeurs du projet, c'est-à-dire l'ADEME, la société HISPANO-SUIZA (groupe Snecma) et le BRGM.

Trois autres rapports (BRGM/RP-52030-FR, 2002 ; BRGM/RC-52274-FR, 2004 et BRGM/RP-53164-FR, 2004) ont déjà été produits à la destination de ce même partenariat. L'ensemble de ces trois rapports, auquel se joint le présent, constitue les livrables de l'étude dans le cadre de la convention et de la RPI précédemment citées.

Pour neutraliser la toxicité du chrome sous sa forme oxydée, le BRGM a proposé de mettre au point un traitement *in situ* qui consiste à réduire le chrome hexavalent en chrome trivalent non lixiviable et à l'immobiliser sur place. Le projet initial avait pour ambition de tester en grandeur nature la bioremédiation du sol *in situ* en injectant des solutions chargées en sulfures, en bactéries sulfato-réductrices et en nutriments. Cependant, du fait de la présence de concentrations très importantes de Cr(VI) et vu les quantités d'eau nécessaires pour maintenir toute la zone polluée en saturation sur une durée compatible à la croissance de micro-organismes, il a alors été envisagé de traiter rapidement la plus grande partie de la pollution par injection de sulfures chimiques, puis de terminer le traitement par injection d'une solution bactérienne. Après des expérimentations au laboratoire avec du Na₂S, rédaction d'un cahier des charges et obtention d'une proposition technique et financière de réalisation sur site, il a été conclu à la non faisabilité de l'opération telle qu'envisagée initialement à la fois pour des raisons de sécurité et à cause d'aspects cinétiques et thermodynamiques (cf. rapport BRGM/RP-52030-FR, 2002).

L'utilisation des sulfures, biogéniques et/ou chimiques ayant été abandonnée, les autres réducteurs chimiques potentiels du chromate ont été passés en revue et le choix final après expérimentations au laboratoire s'est porté sur l'hydrosulfite de sodium. En mars 2003, le BRGM a présenté aux partenaires un cahier de charge de traitement, qui a été accepté. Ce cahier de charges prévoyait le traitement de toute la zone polluée du site de Bois-Colombes par de l'hydrosulfite de sodium (conformément aux résultats présentés dans le rapport RC-52274-FR), excepté une petite parcelle de 2,25 m² dans une zone peu chargée en chromate laquelle serait soumise à un traitement biologique.

L'immobilisation du chromate du site par de l'hydrosulfite de sodium a été effectuée entre août et décembre 2003. Les résultats de ces travaux sont reportés dans le rapport BRGM/RP-53164-FR, 2004.

Le présent rapport présente les résultats de recherche obtenus lors de la mise en œuvre, au laboratoire et sur site d'expériences biologiques pour réduire le chromate dans un sol non saturé.

L'utilisation de ce procédé biologique à base d'inoculum bactérien et des nutriments HRC (Hydrogen Release Compounds) résulte, d'une part de la littérature internationale, d'autre part des résultats très encourageants obtenus lors des expérimentations effectuées aux laboratoires du BRGM dans le cadre notamment d'un projet européen du 5^e PCRD intitulé « METALBIOREDUCTION » actuellement achevé (<http://metalbioreduction.brgm.fr>) et d'un projet interne BRGM intitulé « HYDROGENE ».

Le premier chapitre présente, de manière plus étendue, un rappel du projet de RPI initiale (§ 1.1.) et une synthèse des résultats obtenus jusqu'à maintenant (§ 1.2.), et permet de mieux introduire la réorientation du projet de traitement *in situ* et la nouvelle approche choisie (§ 1.3.) et présentée dans ce rapport.

Le deuxième chapitre apporte quelques éléments des récents travaux du BRGM sur les projets de recherche « METALBIOREDUCTION » et « HYDROGENE » qui permettaient d'entrevoir la possibilité de tester sur de petites parcelles, l'injection d'autres agents réducteurs, tels des bactéries avec ou sans HRC. Les tests sur deux inocula bactériens, alimentés par ce complexe nutritif du commerce, sont présentés dans ce chapitre. Le choix d'inoculum, ainsi que la quantité de nutriments utilisés sur le site, découlent directement de ces travaux.

Le troisième chapitre présente la réalisation et les résultats obtenus par le pilote de bioremédiation *in situ*. L'opération de traitement avait pour but de tester sur une zone limitée la bioremédiation d'un sol non-saturé contaminé par du Cr(VI) dans des conditions favorables à son application, c'est-à-dire celles d'une concentration peu élevée en chrome.

L'opération visait à mettre en évidence l'efficacité d'un mode d'application de la bioremédiation, jugé adapté à cette situation en théorie, et à définir des conditions opératoires applicables à d'autres situations.

Ce test s'est déroulé pendant la phase de traitement à l'hydrosulfite de sodium, sans le perturber, ni l'arrêter, et était piloté par les moyens et les personnels du BRGM.

Les résultats sont intéressants, puisqu'ils démontrent la faisabilité de la bioremédiation entreprise. En fait, le Cr(VI), présent à une teneur de 25 mg/kg de sol dans environ 5 tonnes de sol non saturé, a été réduit en Cr(III), grâce à l'injection d'une solution contenant des bactéries sulfato-réductrices et chromate-réductrices et des nutriments. L'inoculum bactérien additionné d'un produit commercial (HRC) produit les conditions réductrices requises pour réduire le Cr(VI) en chrome (III).

La réalisation d'un système d'isolement du sol, une sorte de cuve étanche autour du sol à traiter, a été nécessaire, afin que la saturation du sol soit rendue possible pendant une période de temps compatible à la croissance bactérienne. Ainsi, cette cuve étanche semble avoir fonctionné et les piézomètres, les tuyaux et la maintenance sont d'un coût faible. Une optimisation de la quantité du produit commercial HRC à injecter serait nécessaire, rendant vraisemblablement ce procédé économiquement viable.

Toutefois, ce pilote de petite échelle ne peut permettre de réaliser une extrapolation du coût d'un traitement à grandeur réelle. Sur un sol de ce type, avec une teneur en chromate ne dépassant pas 100 mg/kg, on estime l'économie réalisée par le choix de cette technologie *in situ* à un facteur 2,5 à 3 pour le volume traité, sans prendre en compte le coût de la production de l'inoculum bactérien.

Quoi qu'il en soit, le développement de techniques biologiques de traitement *in situ*, y compris pour des polluants métalliques, constituent un axe de développement important et compétitif en matière de technologies de dépollution.

Sommaire

1. Contexte et historique.....	11
1.1. RAPPEL DU PROJET INITIAL	11
1.2. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS OBTENUS.....	12
1.2.1. Traitements par des bactéries sulfato-réductrices.....	12
1.2.2. Traitements en colonnes, réduction couplée chimique et bactérienne.....	13
1.3. RÉORIENTATION DU SUJET ET NOUVELLE APPROCHE.....	14
2. Travaux en laboratoire avec deux inocula bactériens et des nutriments du type HRC	17
2.1. INTRODUCTION	17
2.1.1. Rappel bibliographique.....	17
2.1.2. Expérience du BRGM et objectifs de l'étude en laboratoire	17
2.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	19
2.2.1. Préparation des inocula.....	19
2.2.2. Conditions expérimentales	20
2.3. RÉSULTATS.....	21
2.3.1. Consommation de lactate et production d'acétate par les deux inocula	21
2.3.2. Réduction du Cr(VI) par les deux inocula en présence de lactate et de HRC.....	25
2.3.3. Croissance bactérienne.....	26

2.3.4. Production d'hydrogène gaz par les deux inocula en présence de HRC	29
2.4. CONCLUSIONS	29
3. Mise en œuvre probatoire sur un pilote biogénique du traitement d'immobilisation du chromate sur site par des bactéries réductrices.....	31
3.1. OBJECTIF	31
3.2. MISE EN PLACE DU TEST DE BIOREMÉDIATION	31
3.2.1. Définition de l'emplacement à traiter sur site	31
3.2.2. Réalisation du pilote.....	33
3.3. REVUE ET DISCUSSION DES RÉSULTATS DE TRAITEMENT SUR PILOTE.....	42
3.4. CONCLUSIONS	43
4. Bibliographie	45

Liste des illustrations

Illustration 1 - Conditions expérimentales. Au total, 28 fioles ont été préparées.	20
Illustration 2 - Cultures sur lactate, évolution des concentrations en lactate.	22
Illustration 3 - Cultures sur HRC, évolution des concentrations en lactate.	23
Illustration 4 - Cultures sur lactate, évolution des concentrations en sulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplifications.	23
Illustration 5 - Cultures sur HRC, évolution des concentrations en sulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplifications.	24
Illustration 6 - Cultures sur lactate, évolution des concentrations en acétate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplifications.	24
Illustration 7 - Cultures sur HRC, évolution des concentrations en acétate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplifications.	25
Illustration 8 - Évolution des concentrations en Cr(VI). Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplifications.	27
Illustration 9 - Concentration bactérienne après 1 mois de culture. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplifications.	28
Illustration 10 - Concentrations bactériennes après 3 mois de culture. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplifications.	28
Illustration 11 - La réduction du chrome par les deux inocula bactériens dans différentes conditions opératoires.	30
Illustration 12 - Distribution spatiale du Cr(VI) sur toute la zone considérée (x de 0 à 30 m ; y de 0 à 30 m et z de 0 à 15 m). La concentration moyenne, sur 15 m de profondeur, de Cr(VI) (en mg/kg de sol sec) se lit par la couleur de la zone (en rapport avec la palette de couleur) et par la courbe isoteneur (concentration portée sur la courbe).	32
Illustration 13 - Emplacement du pilote biogénique d'immobilisation du chromate sur site. Distribution spatiale du Cr(VI) sur la zone concernée. La concentration moyenne sur 15 m de Cr(VI) (en mg/kg de sol sec) se lit par la couleur de la zone (en rapport avec la palette de couleur) et par la courbe isoteneur (concentration portée sur la courbe).	33
Illustration 14 - Volume poreux du pilote pour différentes valeurs de porosité (entre 30 et 55 %) volumique pour les deux volumes (minimal et maximal)	34
Illustration 15 - Résultats de lixiviation de sol à l'intérieur et l'extérieur du pilote de bio-immobilisation.	35
Illustration 16 - Détail du pilote biogénique équipé des cinq piézomètres avant toute injection.	36
Illustration 17 - Coordonnées des cinq piézomètres dans le parallélépipède (150 cm x 150 cm x 110 cm de profondeur) constituant le pilote biologique.	36
Illustration 18 - Vue du pilote biogénique après la fin des injections d'inoculum additionné de produit HRC et d'imperméabilisation par trois couches de résine. 18c montre l'emplacement du pilote dans le site.	37

Illustration 19 - Analyses chimiques de l'effluent en sortie du bioréacteur.....	38
Illustration 20 - Conditionnements et caractéristiques de la solution d'inoculum amenés sur le site pour l'injection dans le pilote biogénique.....	38
Illustration 21 - Caractéristiques et évolution d'une solution d'un volume de 290 litres auquel il a été additionné 2 kg de produit HRC, puis après ajout de 210 litres supplémentaires d'inoculum, avant injection dans le pilote biologique.....	39
Illustration 22 - Caractéristiques d'une solution d'inoculum d'un volume de 250 litres contenant 1 kg de produit HRC, injectée dans le pilote biologique.	39
Illustration 23 - Vue du pilote biogénique après la fin des injections, mais craquelé sur sa surface à cause de la très forte chaleur.....	40
Illustration 24 - Vue du pilote biogénique après la deuxième couche d'imperméabilisation réalisée le 12 août 2003.....	40
Illustration 25 - Suivi du potentiel d'oxydoréduction (potentiel pris par le métal Platine, par rapport à une électrode de référence Ag-AgCl) par deux sondes installées au fond des deux piézomètres 1 (PZBIO1 au centre) et 4 (PZBIO2 à un coin du carré).....	41
Illustration 26 - Résultats d'analyse du chrome total et du chrome VI dans les échantillons, représentatifs d'intervalles de profondeurs, prélevés suite à un forage carotté au milieu du pilote biogénique réalisée en décembre 2003.	42

1. Contexte et historique

Avant la présentation des résultats techniques relatés dans ce rapport d'avancement, un rappel du projet initial (§ 1.1.) et une synthèse des résultats obtenus jusqu'à maintenant (§ 1.2.) permettent de mieux introduire la réorientation du sujet et la nouvelle approche choisie (§ 1.3.) et de définir le cadre de la présente étude.

1.1. RAPPEL DU PROJET INITIAL

Le site de Bois-Colombes (Hauts-de-Seine, 92), anciennement exploité par la société HISPANO-SUIZA, est pollué par du chrome sur une partie du sol bien circonscrite non saturée en eau. Cette pollution est la conséquence des fuites de cuves de chromage consécutives à un effondrement du sol. Le chrome détecté se présente sous deux formes : Cr(III) et Cr(VI). Le Cr(VI), fortement soluble et toxique, correspond à l'état initial du chrome, puisque les cuves contenaient des solutions de chromates (CrO_4^{2-}). Le Cr(III), moins toxique et très peu soluble, correspond à la forme réduite du chrome résultant de réactions de réduction *in situ*.

Pour neutraliser la toxicité du chrome sous sa forme oxydée, le BRGM avait proposé de mettre au point un traitement biologique pour immobiliser *in situ* le chrome par réduction de la forme hexavalente soluble en chrome trivalent non lixiviable grâce à l'action d'une population de bactéries sulfato-réductrices entretenue au BRGM. Ce procédé n'ayant jamais été expérimenté en France sur des sols en place, il s'agissait d'une expérience de démonstration. Dans ce cadre, HISPANO-SUIZA apportait la problématique, participait aux réflexions ainsi qu'aux choix scientifiques et aidait à la mise en œuvre de l'opération de démonstration sur site (contrat de Recherche en Partenariat Industriel n° 110 du 25 octobre 2001). En sous traitance du BRGM, ANTEA devait apporter son expertise en matière d'évaluation de la nature de la pollution et sa compétence, en ce qui concerne la mise en place et l'évaluation des performances de procédés de remédiation.

Le projet initial avait pour ambition de tester en grandeur nature la bioremédiation du sol *in situ*, en injectant des solutions chargées en sulfures, en bactéries sulfato-réductrices et en nutriments pour ces dernières.

Le projet initial, d'une durée de quinze mois prévoyait deux tranches :

- une tranche ferme dans laquelle le BRGM s'engageait à réaliser l'étude de faisabilité qui comprenait une étude d'évaluation au laboratoire et une étude d'ingénierie ;
- une tranche conditionnelle sur l'opération sur site dans laquelle le BRGM s'engageait à réaliser l'opération de démonstration si les conditions suivantes étaient obtenues : exécution de la tranche ferme concluant à la faisabilité de l'opération de mise en œuvre du procédé, définition par avenant au contrat initial

des équipements nécessaires à la réalisation de la tranche conditionnelle et prix de leur mise en œuvre.

1.2. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS OBTENUS

La totalité des résultats contenus dans ce paragraphe 1.2. sont décrits dans le rapport BRGM/RP-52030-FR, 2002 (Ignatiadis *et al.*, 2002).

À partir de nombreux forages carottés effectués par ANTEA, traversant totalement la zone contaminée du site, la cartographie de la répartition spatiale des deux espèces du chrome Cr(VI) et Cr(III) a été établie. La zone de pollution s'étend sur un volume d'environ 15 000 m³. Le chrome y est très majoritairement présent sous forme Cr(III). Cependant, des teneurs en Cr(VI) dans le sol (jusqu'à 2 680 mg/kg) sont détectées. Assez tardivement, et ce bien après les premières expérimentations, les quantités totales de chromate ont pu être évaluées par interpolation des données des forages à l'aide du logiciel GDM 5.2 dans plusieurs zones. Les valeurs obtenues sont majorées : la zone considérée d'environ 14 500 m³ (longueur 30 m, largeur 30 m et profondeur 15 m) contiendrait *a priori* 961 kg de Cr(VI) dont 360 kg seraient concentrés dans un noyau d'environ 250 m³ (longueur 7 m, largeur 7 m et profondeur 5 m).

Pour effectuer en laboratoire des essais de traitement, des échantillons de sol représentatifs ont été constitués et caractérisés. Ces échantillons ont été prélevés de carottes réalisées sur le puits BR5 qui contient les plus fortes teneurs en Cr(VI).

1.2.1. Traitements par des bactéries sulfato-réductrices

Des essais en batch de mise en contact d'eau avec le sol reconstitué pour un rapport liquide/solide de 10/1, avec et sans sulfure biogénique, ont conduit à la détermination :

- de la cinétique de dissolution du chromate présent dans le sol (sans sulfure) ;
- du rapport molaire [H₂S]/[Cr(VI)] nécessaire pour la réduction du chromate présent dans ce sol.

Ils conduisent aux conclusions suivantes. Environ 80 % du chrome est lixivié dès la mise en contact du sol avec de l'eau, puis le reste se dissout en plusieurs jours. Seules les expériences, avec un rapport molaire [H₂S]/[Cr(VI)] supérieur ou égal à 2,59, ont permis le développement d'une activité bactérienne. En effet, celle-ci est présente, dans ces conditions et si la saturation en eau est maintenue, après 500 h. Si cette activité bactérienne est inhibée par une concentration en Cr(VI) en solution supérieure à 100 mg/l, elle supporte néanmoins 50 mg/l.

D'autres essais en batch de mise en contact d'eau avec un rapport liquide/solide de 10/1 ont été effectués, afin d'évaluer l'éventuelle production *in situ* de sulfure par des populations endogènes. Avec des nutriments et sans ajout de bactéries exogènes, aucune activité bactérienne endogène n'a été observée. Avec des nutriments et une solution de bactéries sulfato-réductrices contenant du sulfure biogénique, le Cr(VI) est immédiatement éliminé de la phase liquide pour les rapports molaires [H₂S]/[Cr(VI)] 3,

5 et 10. Une sulfato-réduction dont le démarrage est fonction de la concentration initiale en sulfure, est constatée dans la phase liquide pour les rapports molaires ci-dessus mentionnés. Les bactéries sont initialement inhibées par une concentration importante en sulfure. En fait, la sulfato-réduction est d'autant plus retardée que la concentration initiale en sulfure est grande.

Ces premiers essais en batch ont montré que le seul traitement sur site par l'injection de solutions chargées en sulfure biogénique, en bactéries sulfato-réductrices et en nutriments ne pourraient immobiliser la totalité du chromate sous forme de Cr(III) de l'ensemble de la zone polluée. En effet, les concentrations de Cr(VI) dans l'eau lors de l'injection des liquides dans le sol seraient très importantes à la fois parce que la quantité d'eau en contact avec le sol serait restreinte (par rapport aux essais en batch), et que l'écoulement gravitaire par piston concentrerait au fur et à mesure la phase liquide chargée en chromate au front d'imbibition. Pour éviter la dispersion des chromates, il faudrait injecter dès le début une solution contenant tout le sulfure biogénique pour réduire l'ensemble du Cr(VI) de la zone, ce qui, au vu des concentrations, n'est pas possible. De plus, sans maintien de la saturation du sol, il est peu probable qu'une activité bactérienne puisse se développer. C'est pourquoi des essais en colonne ont été orientés vers l'utilisation de fortes concentrations en sulfure chimique avant injection de solutions bactériennes contenant du sulfure biogénique.

1.2.2. Traitements en colonnes, réduction couplée chimique et bactérienne

Des essais en colonne, avec et sans sulfure chimique, ont ainsi été réalisées dans le but de déterminer les conditions opératoires à appliquer sur site. Les essais en colonne avec injection d'eau ont permis d'évaluer le profil de concentration du chromate dans la phase liquide lors de l'écoulement gravitaire, en fonction de la vitesse de la phase liquide en régime transitoire (saturation de la zone), puis en régime permanent (maintien de la zone à saturation). Les essais en colonne avec injection de sulfure (Na_2S dans l'eau à un pH adéquat compris entre 7 et 7,5) ont permis d'ajuster la quantité de sulfure à injecter, au regard du profil de dissolution du chromate. Ainsi, des solutions de sulfure chimique de concentrations décroissantes, en commençant par une très concentrée, ont été injectées et ont permis une réduction importante du chromate.

Du fait de la présence de concentrations très importantes de Cr(VI), et vu les quantités d'eau nécessaires pour maintenir la zone en saturation sur une durée compatible à la croissance de micro-organismes, il a alors été envisagé de traiter rapidement la plus grande partie de la pollution par injection de sulfures chimiques, puis de terminer le traitement par injection d'une solution bactérienne.

Pour une opération sur site, l'utilisation du réactif Na_2S présente deux inconvénients majeurs : le dégagement non négligeable d' H_2S lors de la préparation de solutions très concentrées (toxicité et perte de réactifs) et la présence d'un front de chromate dissous lié notamment à l'impossibilité d'un point de vue thermodynamique de poursuivre la réduction du chrome par les sulfures lorsque le pH est élevé (supérieur à 9). La réduction du chrome par les sulfures est consommatrice de protons, ce qui fait

augmenter le pH de la solution et engendre alors l'arrêt de la réaction, même s'il reste suffisamment de réactif (sulfure) en solution. Néanmoins, un cahier des charges a été fourni à un sous-contractant, VALORIA (filiale d'ANTEA), en vue de l'obtention d'une description technique et financière de l'unité opérationnelle de mise en œuvre sur site. Celui-ci prévoyait l'injection rapide de solutions de concentrations décroissantes en sulfures chimiques dans un premier temps afin de réduire 80 à 90 % du Cr(VI), puis l'injection de solutions bactériennes contenant du sulfure biogénique et le maintien de la zone en saturation pour réduire le reste.

La description technique et financière obtenue a permis de conclure à la non faisabilité de l'opération sur site, telle qu'envisagée dans le cahier des charges, à la fois pour des raisons budgétaires (coût de mise en œuvre et d'investissement très élevés), mais aussi pour des raisons de sécurité. La production de solutions bactériennes avec du sulfure biogénique en grande quantité nécessite un équipement onéreux adapté (cuve inox, thermo-régulation, émanation et récupération de H₂S). Quant à la préparation de solutions acidifiées contenant des sulfures en concentrations importantes, celle-ci est relativement délicate (montée en pression lors de l'acidification à cause du dégagement d'H₂S) et dangereuse (émanation de gaz toxique).

1.3. RÉORIENTATION DU SUJET ET NOUVELLE APPROCHE

Après discussion avec l'ensemble des partenaires (BRGM, ANTEA, HISPANO-SUIZA et ADEME), il a été convenu, en décembre 2002, que l'opération ainsi proposée en § 1.2. ne serait pas mise en œuvre sur site. Il a été proposé et validé par le comité de pilotage du projet (cf compte rendu réunion du 17 décembre 2002) d'engager une série de tests complémentaires sur des voies alternatives aux processus déjà testés en utilisant d'autres réducteurs chimiques des chromates tels que les sulfates de fer (FeSO₄) ou l'hydrosulfite de sodium, (Na₂S₂O₄), etc.

L'utilisation des sulfures ayant été abandonnée, les autres réducteurs chimiques potentiels du chromate dans les conditions de basicité du sol (pH 8.5) ont été passés en revue et le choix final s'est porté sur l'hydrosulfite de sodium (ou dithionite de sodium ou hyposulfite de sodium). Après réalisation d'une revue bibliographique justifiant ce choix, des travaux expérimentaux au laboratoire ont été réalisés avec comme réducteur l'hydrosulfite de sodium.

Les travaux complémentaires réalisés rapidement en début de l'année 2003 ont été concluants en apportant la mise en œuvre, au laboratoire, de l'hydrosulfite de sodium pour réduire le chromate dans un sol non saturé. Ces expériences ont permis de déterminer, à l'échelle du laboratoire, les conditions opératoires à reproduire à l'échelle pilote sur le site et à évaluer les consommations de réactifs.

La totalité des résultats concernant les essais avec l'hydrosulfite de sodium, ainsi que le cahier de charge d'un traitement *in situ* avec ce réducteur, sont décrits dans le rapport BRGM/RC-52274-FR, 2004 (Ignatiadis *et al.*, 2004).

Parallèlement, les récents travaux du BRGM sur les projets de recherche Metalbioreduction (<http://metalbioreduction.brgm.fr>) et Hydrogène, permettaient d'entrevoir la possibilité de tester sur de petites parcelles, l'injection d'autres agents réducteurs, tels des bactéries avec ou sans HRC (Hydrogen releasing compounds). Les tests sur deux inocula bactériens alimentés par ce complexe nutritif du commerce sont présentés au chapitre 2.

En mars 2003, le BRGM a présenté aux partenaires un cahier de charges de traitement, qui a été accepté. Ce cahier de charges prévoyait le traitement de toute la zone polluée du site de Bois-Colombes par de l'hydrosulfite de sodium (conformément aux résultats présentés dans le rapport BRGM/RC-52274-FR, 2004 (Ignatiadis *et al.*, 2004), excepté une petite parcelle de 2,25 m² dans une zone pas très chargée en chromate, laquelle serait soumise à un traitement biologique.

Le chapitre 3 présente la réalisation et les résultats obtenus par ce pilote de bioremédiation *in situ*.

2. Travaux en laboratoire avec deux inocula bactériens et des nutriments du type HRC

2.1. INTRODUCTION

2.1.1. Rappel bibliographique

Si les techniques de traitement des eaux contenant du chromate sont relativement bien développées, il existe en revanche peu de techniques opérationnelles de dépollution du chromate contenu dans les sols. Le chromate, avec peut-être l'arsenic, sont probablement les deux types de polluants métalliques qui permettent d'envisager des approches techniquement et économiquement efficaces de dépollution *in situ* des sols. Le concept de stabilisation consiste non pas à extraire le polluant du sol, mais à le transformer en une espèce insoluble et non toxique (Losi *et al.*, 1994 ; Salunkhe *et al.*, 1998 ; Schmieman *et al.*, 1997). Dans le cas du chrome, il s'agit de réduire *in situ* le chromate en chrome trivalent, à l'aide d'un puissant agent réducteur et à le faire précipiter sous la forme d'espèces minérales insolubles.

En matière d'atténuation naturelle, la présence dans le sol d'agents réducteurs, comme de la matière organique ou des acides organiques, peut entraîner à terme une réduction naturelle du chromate. Cette approche, en matière de gestion de sol, peut être envisageable en complément d'autres mesures, comme le confinement assorti d'un monitoring approprié. Il s'agit toutefois d'un processus très lent.

Des procédés de bioremédiation des sols sont en cours de développement, par le biais notamment d'injection dans le sol de microorganismes pouvant réduire le chrome, mais aucun n'atteint de stade opérationnel. L'inconvénient majeur est lié au maintien en vie des microorganismes dans des conditions environnementales difficiles du fait : a) de la toxicité du chromate ou d'autres polluants dans le sol, b) de la difficulté de maintenir en saturation des sols pendant des temps compatibles avec la croissance de la biomasse chromate-réductrice. Certains travaux récents (Cervantès *et al.*, 2001) décrivent la capacité de certains champignons à réduire le Cr(VI) et suggèrent leur utilisation dans des procédés de bioremédiation de sols.

2.1.2. Expérience du BRGM et objectifs de l'étude en laboratoire

L'unité Biotechnologies du BRGM a pu acquérir une bonne expérience sur la croissance des bactéries sulfato-réductrices (BSR), utilisant de l'hydrogène gaz (H₂), et la connaissance des procédures à respecter pour réaliser des expériences, jusqu'à l'échelle pilote, en présence de ce gaz. L'hydrogène est un substrat propre et très efficace pour diverses bactéries pouvant participer à la décontamination de milieux pollués (eaux, sols...) par des métaux lourds (comme le CrVI).

Cette décontamination se fait par précipitation des métaux sous formes réduites. Les BSR réduisent les métaux en présence de l'hydrogène et de l'hydrogénase (réduction enzymatique), ou par le sulfure d'hydrogène (H₂S) (réduction chimique), ce dernier obtenu à partir du sulfate (SO₄²⁻) par réduction bactérienne.

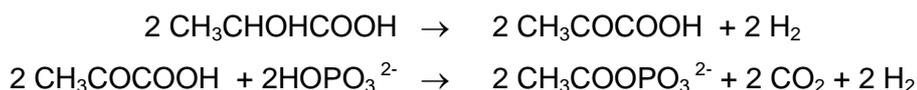
Les objectifs de ce travail étaient d'étudier : (i) la capacité de deux inocula bactériens à utiliser le HRC comme source d'énergie, (ii) la réduction du Cr(VI) en fonction de la souche et en fonction du donneur d'électrons (HRC ou lactate), et (iii) la production d'hydrogène par ces bactéries, notamment en présence d'HRC.

En conséquence, le but ultime de cette étude était d'évaluer la production d'hydrogène, à partir d'un produit commercialisé sous le nom de HRC (Hydrogen Release Compounds), et l'efficacité de ce produit pour la réduction du Cr(VI). Il s'agit d'un produit à base d'ester de poly-lactate et de glycérol, commercialisé par la société Regenesis Bioremediation Products (Koenigsberg, Selected Battelle Conference Papers: 1993-1999. pp.105-109, et pp.119-122). Le HRC est principalement utilisé pour la bioremédiation des sites pollués par des substances organo-chlorées. Injecté dans le sol ou le sous-sol, le HRC libérerait lentement des molécules de lactate CH₃-CHOH-COO⁻. L'acide lactique et les acides organiques issus de sa dégradation peuvent être fermentés par la microflore endogène. De l'hydrogène est produit au cours de ces réactions de fermentation. Le HRC se présente sous la forme d'un sirop marron très épais et présente une très forte odeur insupportable.

Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont des microorganismes anaérobies hétérotrophes, largement répandus dans la nature, puisqu'on les retrouve dans les environnements aquatiques, les sédiments marins, les eaux et le sol. Elles sont capables de réduire le sulfate SO₄²⁻ (qui est utilisé comme accepteur terminal d'électrons, en sulfure S²⁻).

Le sulfure S²⁻ ainsi produit réagit avec les métaux en solution en les réduisant électrochimiquement (selon Mⁿ⁺ + xe⁻ → M^{(n-x)+}) et en s'associant avec eux pour donner des sulfures métalliques insolubles et donc précipitants sous la forme-type M_xS_y (selon xM²⁺ + yS²⁻ ↔ M_xS_y). Ainsi, les BSR jouent un rôle important dans la dépollution de l'environnement en réduisant les métaux toxiques. Les BSR doivent utiliser des substances comme donneurs d'électrons, telles que le lactate, l'acétate ou l'hydrogène. La génération de l'énergie s'effectue par une chaîne de transport d'électrons grâce à des enzymes. Toutes les BSR possèdent des hydrogénases et sont capables de consommer et/ou de produire de l'hydrogène.

Les bactéries sulfato-réductrices sont capables de produire de l'hydrogène par fermentation du pyruvate en absence de sulfate, selon la réaction suivante :



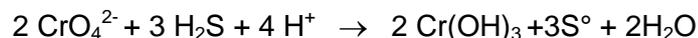
Cultivées sur lactate, et même en présence de sulfate, les bactéries sulfato-réductrices peuvent produire de l'hydrogène (Hatchikian *et al.*, 1977). Cette production d'hydrogène serait liée à une déficience en fer. Le fer présent dans le milieu est

précipité avec le sulfure d'hydrogène provenant de la sulfato-réduction. Cet élément est indispensable pour la production des cytochromes impliqués dans la respiration du sulfate. La respiration serait donc « bridée » par une quantité insuffisante de cytochrome et les électrons excédentaires seraient utilisés pour la production d'H₂.

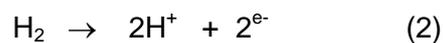
Les produits chimiques à base de chrome sont utilisés depuis des décennies notamment par l'industrie pour le traitement de surface de pièces métalliques, mais également pour le tannage du cuir, le traitement du bois et l'industrie textile. Le chromate ou chrome hexavalent (sous la forme de chromate CrO₄²⁻ ou bichromate Cr₂O₇²⁻) est un polluant métallique relativement soluble et toxique qui peut causer de graves nuisances sur la qualité des eaux souterraines. Sa présence dans les eaux ou les sols provient généralement de rejets industriels ou domestiques. Contrairement au chrome trivalent, le chrome hexavalent forme généralement des espèces très solubles qui, lorsqu'elles sont présentes dans le sol, peuvent être lessivées et atteindre les nappes. Le chromate non dissous par l'eau est progressivement réduit sous forme de chrome trivalent qui précipite alors sous forme de minéraux très stables, en association par exemple avec des oxydes de fer relativement insolubles. Dans des conditions naturelles, la réaction de réduction du chromate dans le sol est très progressive et peut durer plusieurs décennies, voire des siècles.

Il existe deux mécanismes de réduction du Cr(VI) par les bactéries :

- un mécanisme indirect via le sulfure d'hydrogène (H₂S) :



- un mécanisme direct qui fait intervenir des protéines d'oxydo-réduction (mécanisme enzymatique) :



soit la réaction électrochimique globale suivante :



2.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.2.1. Préparation des inocula

Les souches choisies pour cette étude sont :

- la bactérie sulfato-réductrice *Desulfomicrobium norvegicum* (NCIB 8310), souche pure étudiée et sélectionnée en laboratoire pour sa capacité réduire le chromate ;
- la population ici nommée « Métalbioréduction », population mixte contenant *Desulfomicrobium norvegicum*, issue du bioréacteur de traitement d'effluent pollué par du Cr(VI) et ayant opéré durant le projet européen Métalbioréduction) et donc adaptée pour la bioremédiation du Cr(VI).

Desulfomicrobium norvegicum et la population « Métalbioréduction » ont été cultivés à 37 °C sous agitation sur les milieux de Starkey et MIU respectivement (après ensemencement à 10 % v/v) :

Milieu de Starkey (pH 7,2) : NH₄Cl (2 g), MgSO₄ (2 g), Na SO₄ (4 g), K₂HPO₄ (0,5 g), Extrait de levure (1 g), Lactate de sodium (2 g = 3.3 ml de solution à 60 %), Oligo-éléments (1 ml), Na₂S (0,2 g), Eau déminéralisée (qsp1 litre).

Milieu Industriel Urée (pH 7) : Urée (0,21 g), MgCl₂ (0,4 g), Na₂SO₄ (4 g), DAP (0,23 g), KOH (0,25 g), Lactate de sodium (3,3 ml), ou HRC (4,4 g), Oligo-éléments (1 ml), Na₂S (0,2 g), Eau déminéralisée (qsp1 litre).

Remarques :

Afin d'éviter la dépolymérisation du HRC en lactate lors de la stérilisation, le HRC est filtré et ajouté au milieu de culture préalablement stérilisé.

L'ajout de chromate est réalisé après dosage des sulfures dissous, de manière à ajuster la quantité de Cr(VI), en tenant compte de la part de Cr(VI) qui sera réduit et précipité par le sulfure apporté par l'inoculum.

2.2.2. Conditions expérimentales

Afin d'étudier la réduction du chromate et la production d'hydrogène à partir de HRC et de lactate, les douze expériences suivantes, présentées dans l'illustration 1, ont été réalisées :

Expérience	HRC	Lactate	Cr(VI)	Inocula	Réplifications
Blanc 1	+	-	+	-	1
Blanc 2	+	-	-	-	1
Blanc 3	-	+	+	-	1
Blanc 4	-	+	-	-	1
HRC + Cr(VI)	+	-	+	<i>D. norvegicum</i>	3
Série HRC + Cr(VI)	+	-	+	Métalbioréduction	3
HRC	+	-	-	<i>D. norvegicum</i>	3
HRC	+	-	-	Métalbioréduction	3
Lactate + Cr(VI)	-	+	+	<i>D. norvegicum</i>	3
Lactate + Cr(VI)	-	+	+	Métalbioréduction	3
Lactate	-	+	-	<i>D. norvegicum</i>	3
Lactate	-	+	-	Métalbioréduction	3

Illustration 1 - Conditions expérimentales. Au total, 28 fioles ont été préparées.

Les paramètres suivis au cours du temps étaient :

- l'acétate, analysé avec des Kits Diffchamb 1 002 891 (dosage enzymatique colorimétrique) ;

- le lactate, analysé avec des Kits Diffchamb 1 002 811 (dosage enzymatique colorimétrique) ;
- le Cr(VI) (Kit Merck spectroquant® 1.14758.0001 ; dosage colorimétrique) ;
- le sulfate SO_4^{2-} (Kit Merck spectroquant® 1.14548.0001 ; dosage colorimétrique).

Lorsque la méthode de dosage du lactate a été utilisée pour analyser des échantillons issus des fioles contenant de l'HRC, il n'a pas été possible de déterminer si seul le lactate libre était détecté ou si les enzymes utilisées pour le dosage étaient capables de réagir avec le glycérol-ester de lactate.

L' H_2 dans la phase gazeuse (par Chromatographie en Phase Gazeuse sur colonne), a été recherché ponctuellement après prélèvement dans des ampoules de 250 ml.

La croissance bactérienne a été évaluée par deux comptages en cellule de Thoma (microscopie optique, grossissement x 400).

Les essais ont duré trois mois.

2.3. RÉSULTATS

Nous rappelons que les objectifs de ce travail étaient d'étudier : (i) la capacité de *D. norvegicum* et de la population « métalbioréduction » à utiliser le HRC comme source d'énergie, (ii) la réduction du Cr(VI) en fonction de la souche et en fonction du donneur d'électrons (HRC ou lactate), et (iii) la production d'hydrogène par ces bactéries, notamment en présence d'HRC.

2.3.1. Consommation de lactate et production d'acétate par les deux inocula

a) En absence de Cr(VI)

Pour la croissance sur HRC, les résultats obtenus pour *D. norvegicum* (ill. 3) sont semblables à ceux obtenus pour cette même souche avec le lactate (ill. 2) ; *D. norvegicum* est donc capable d'utiliser le HRC pour sa croissance et pour la réduction du sulfate (ill. 4 et 5). Par contre, ces résultats diffèrent dans le cas de la population « métalbioréduction » ; en effet, aucune consommation de lactate, ni de sulfate, n'est observée en présence de HRC (ill. 5). On observe cependant une augmentation de la concentration en acétate (ill. 6 et 7). Ceci suggère qu'au sein de la population mixte « métalbioréduction », ce sont des microorganismes autres que les bactéries sulfato-réductrices, apparemment des organismes acétogènes, qui se sont développés. Ces bactéries ont pu utiliser du lactate issu de l'HRC, mais moins efficacement que *D. norvegicum*. Comme le HRC libère en permanence du lactate « libre », la consommation de lactate par la population « métalbioréduction » n'est pas quantifiable à travers le suivi de la concentration totale en lactate.

Il est également remarquable que la population « métalbioréduction » présente une activité sulfato-réductrice équivalente à celle de *D. norvegicum* sur lactate, et ne réduit pas du tout le sulfate en présence de HRC ; l'activité sulfato-réductrice de la population « métalbioréduction » semble inhibée par le HRC. Le métabolisme global de la population « métalbioréduction » est différent sur lactate seul et sur HRC. Cela est certainement dû à une substance inconnue présente dans le HRC. Le HRC est préférentiellement utilisé par les bactéries non sulfato-réductrices de la population « métalbioréduction ».

Dans les cultures de *D. norvegicum*, une accumulation d'acétate est observée (ill. 6 et 7). L'acétate est un produit de la dégradation du lactate. Avec la population « métalbioréduction », la concentration en acétate augmente pendant 1 à 3 semaines, puis diminue. Ces résultats s'expliquent par le fait que *D. norvegicum* n'utilise pas l'acétate comme source d'énergie, alors que la population « métalbioréduction » contient diverses bactéries, dont certaines capables de consommer l'acétate.

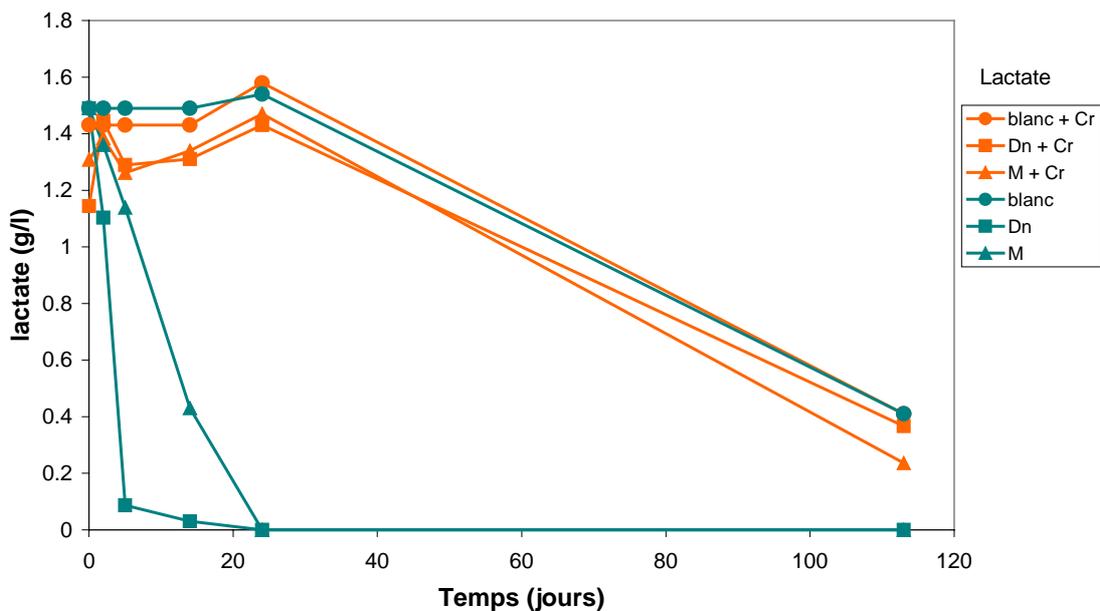


Illustration 2 - Cultures sur lactate, évolution des concentrations en lactate.

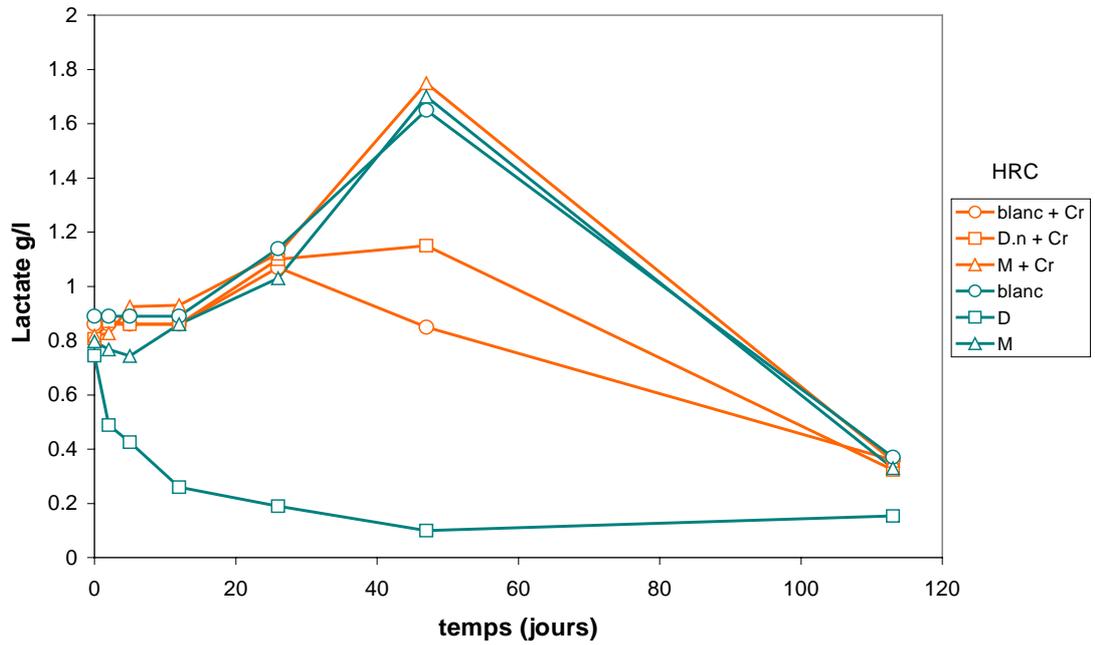


Illustration 3 - Cultures sur HRC, évolution des concentrations en lactate.

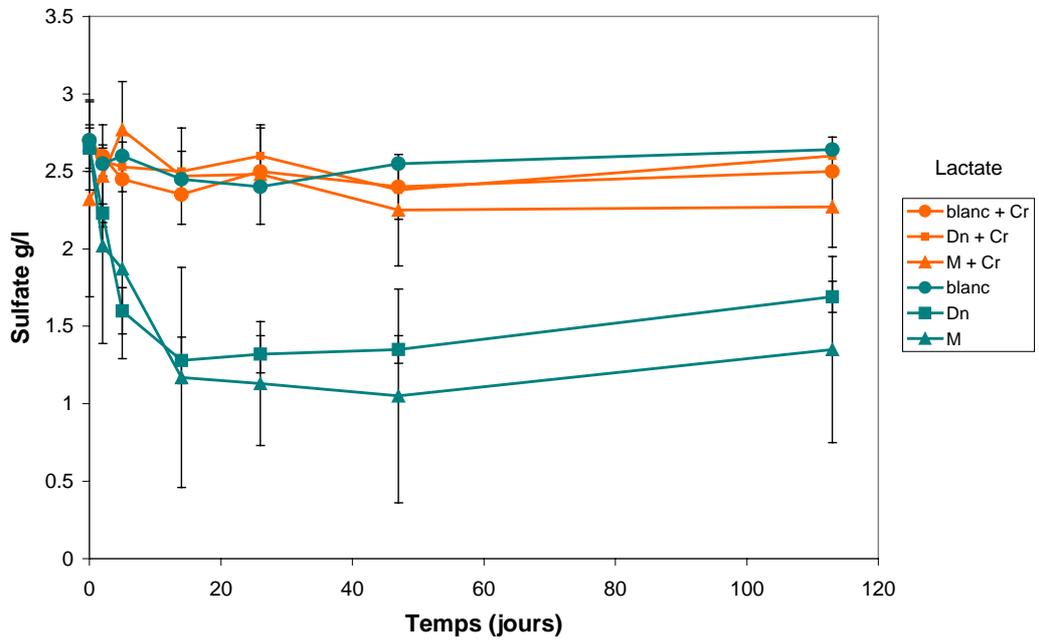


Illustration 4 - Cultures sur lactate, évolution des concentrations en sulfate.
Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 répétitions.

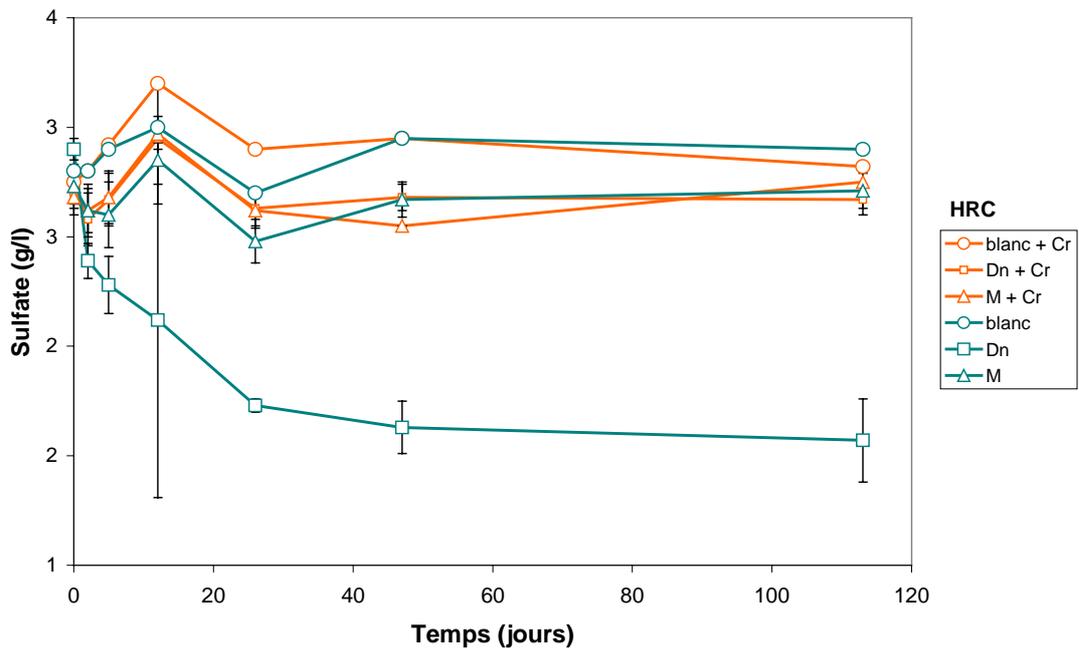


Illustration 5 - Cultures sur HRC, évolution des concentrations en sulfate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 répétitions.

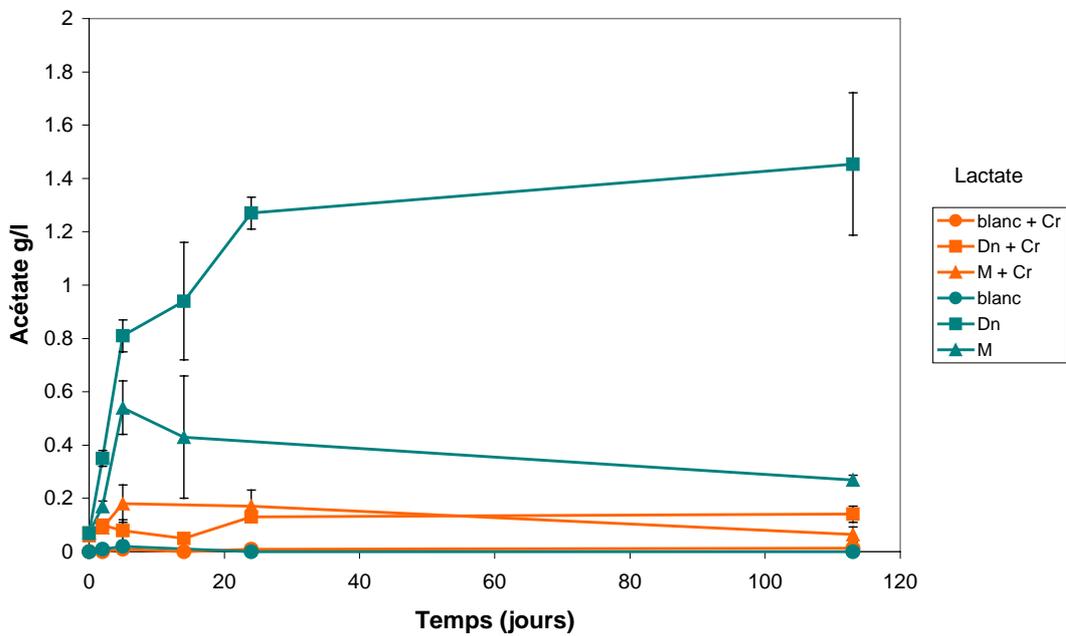


Illustration 6 - Cultures sur lactate, évolution des concentrations en acétate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 répétitions.

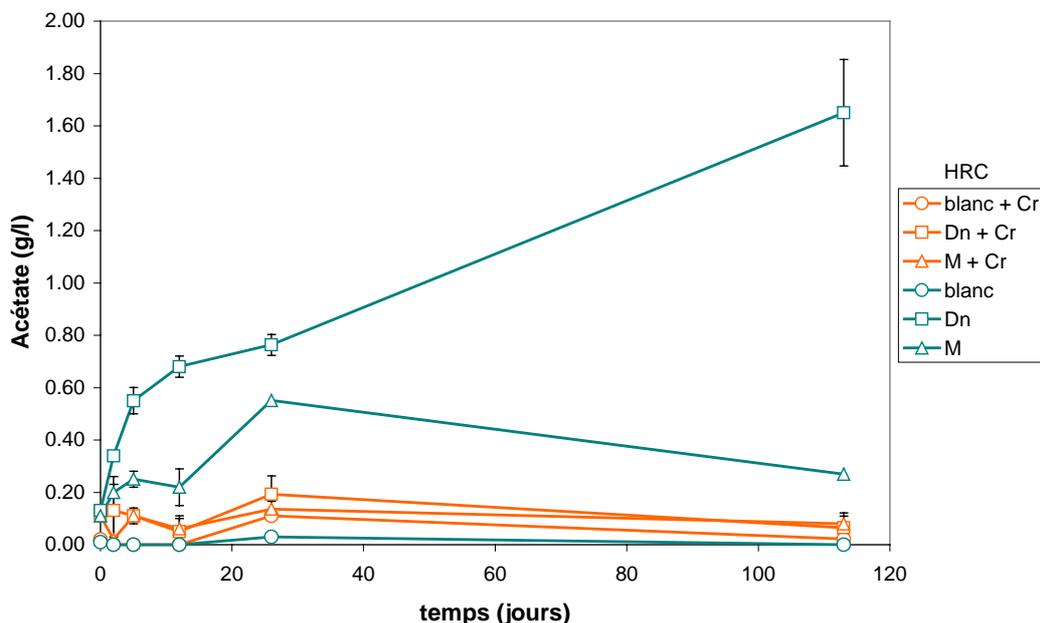


Illustration 7 - Cultures sur HRC, évolution des concentrations en acétate. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplifications.

b) En présence de Cr(VI)

En présence de Cr(VI), les concentrations en lactate et sulfate (ill. 2 à 5) ne diminuent pas de manière significative au cours du temps. Aucune production d'acétate n'est observée (ill. 6 et 7). La présence de Cr(VI) affecte donc le métabolisme énergétique et par conséquent la croissance bactérienne. Les résultats, notamment ceux obtenus par comptage bactérien, montrent toutefois que la population « métalbioréduction » est moins sensible à la présence de Cr(VI) que la souche *D. norvegicum*, ce qui s'explique probablement par le fait que cette population issue d'un réacteur pour la bioremédiation du chromate est adaptée à la présence de Cr(VI), et tolère mieux la présence de ce métal toxique.

2.3.2. Réduction du Cr(VI) par les deux inocula en présence de lactate et de HRC

L'étude de la réduction du Cr(VI) en Cr(III), par les bactéries en présence de lactate ou de HRC, montre tout d'abord une réduction du chromate par le HRC, en absence de bactéries (ill. 8). Ceci s'explique probablement par le fait que le HRC est un produit industriel non pur, qui contient probablement un composé (en faible quantité) qui est capable de réduire le chromate. Ce composé est peut-être ajouté dans la formule du HRC pour faire diminuer volontairement le potentiel redox du milieu. Dans la mesure où la composition exacte du HRC commercialisé n'est pas détaillée, nous ne pouvons pas identifier le composé responsable de cette réduction. Aucune réduction du Cr(VI) par le lactate seul n'est observée.

Cette réduction du chromate par le HRC est cependant lente au cours du temps, et la présence de bactéries permet une réduction plus rapide du métal.

La population « métalbioréduction » a une meilleure activité de réduction du chromate que la souche pure *D. norvegicum* qui n'a jamais été en contact préalable avec le chromate.

Une meilleure réduction du chromate par les deux populations étudiées est observée lorsque le HRC est utilisé comme source d'énergie. En effet, la réduction du chromate en présence de lactate est plus faible pour la population « métalbioréduction », et inexistante pour la souche *D. norvegicum*. Ce résultat est peut-être lié à la présence, dans le HRC, de la substance inconnue qui fait chuter le potentiel redox.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec le comptage bactérien qui a montré une meilleure croissance de la population « métalbioréduction » par rapport à *D. norvegicum*, notamment sur lactate, en présence de Cr(VI).

Dans les conditions expérimentales que nous avons choisies, nous observons donc une réduction du Cr(VI), malgré le fait qu'aucune consommation de lactate ou de HRC (donneurs d'électrons) n'ait été observée. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ceci. La première est qu'il y a probablement un pool d'électrons dans les cellulesensemencées. La deuxième est que la réduction d'une faible concentration de Cr(VI) nécessite la consommation d'une faible quantité de lactate non détectable par le test enzymatique que nous avons utilisé pour le dosage des acides organiques. En effet, la concentration en Cr(VI) est de 0,4 mM pour une concentration en lactate de 17 mM. La variation de la concentration en lactate due à la consommation d'une partie du lactate pour la réduction du Cr(VI) est donc très faible.

2.3.3. Croissance bactérienne

La croissance des deux populations choisies pour cette étude a été suivie en fonction de la source d'énergie fournie aux bactéries (lactate et HRC).

Deux comptages bactériens ont été effectués, un premier après un mois d'incubation (cf. ill. 2), et un second après trois mois d'incubation.

Après un mois de culture (cf. ill. 9), les concentrations bactériennes les plus élevées sont obtenues en présence de lactate et en absence de Cr(VI). Sur HRC et sans Cr(VI), les concentrations bactériennes sont plus faibles pour les deux populations. En présence de Cr(VI), les concentrations bactériennes sont globalement plus faibles qu'en absence de Cr(VI). La croissance de la population « métalbioréduction » est moins inhibée que celle de *D. norvegicum*.

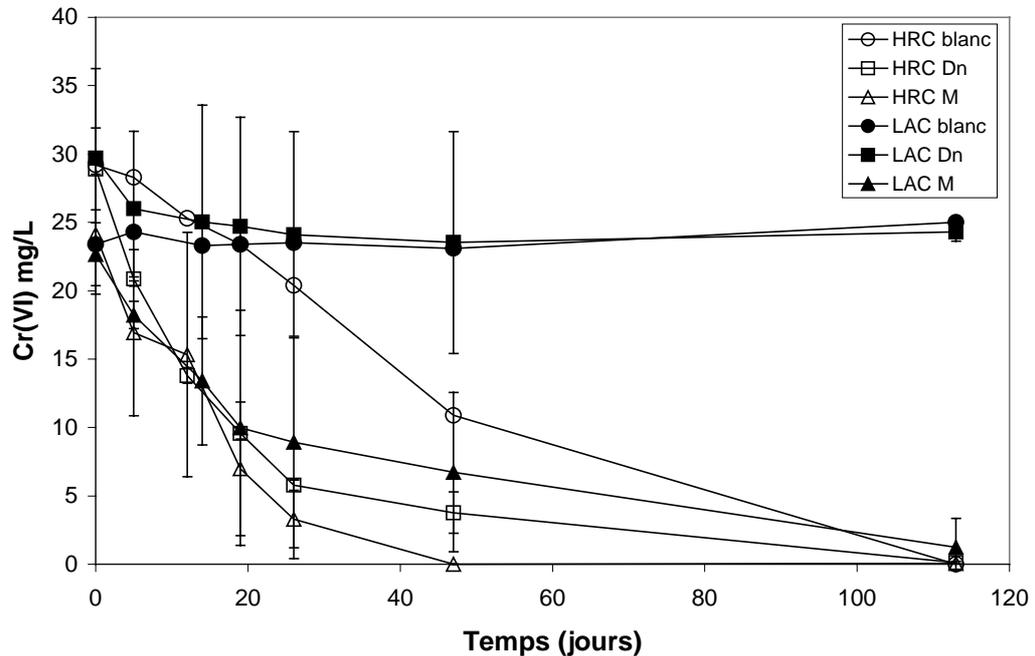


Illustration 8 - Évolution des concentrations en Cr(VI). Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 répétitions.

Après trois mois de culture (ill. 9), les concentrations bactériennes ont beaucoup diminué dans les fioles ne contenant pas de Cr(VI). Ce phénomène est certainement lié à la lyse des cellules en phase stationnaire de croissance : le nombre de cellules diminue lorsque tout le lactate a été consommé, après trois mois de culture.

En présence de Cr(VI), les concentrations bactériennes sont plus élevées qu'après un mois de culture, sauf dans le cas de *D. norvegicum* + lactate, qui est la seule condition dans laquelle le chrome n'a pas été réduit par les bactéries. Ces résultats semblent montrer que la présence de Cr(VI) a retardé la croissance des bactéries.

On observe ainsi sur les différents graphes une bonne corrélation entre la diminution des concentrations en lactate total (L- + D-lactate) et en sulfate, et l'augmentation de la concentration en acétate. Ceci est caractéristique du métabolisme des bactéries sulfato-réductrices, et en particulier de *D. norvegicum* qui n'utilise pas l'acétate comme source d'énergie.

La comparaison de l'ensemble des résultats obtenus avec les deux populations suggère qu'en absence de chromate, *D. norvegicum* a une croissance plus rapide que la population « métalbioréduction », aussi bien sur lactate que sur HRC (cf. comptage bactérien à $t = 26$ jours). Les résultats indiquent également que la croissance des deux populations étudiées est plus rapide en présence de lactate que sur HRC. Le lactate permet aussi d'obtenir une concentration bactérienne plus importante, ce qui peut s'expliquer par le fait que ce substrat est immédiatement utilisable, contrairement au HRC qui doit être dépolymérisé pour être utilisé.

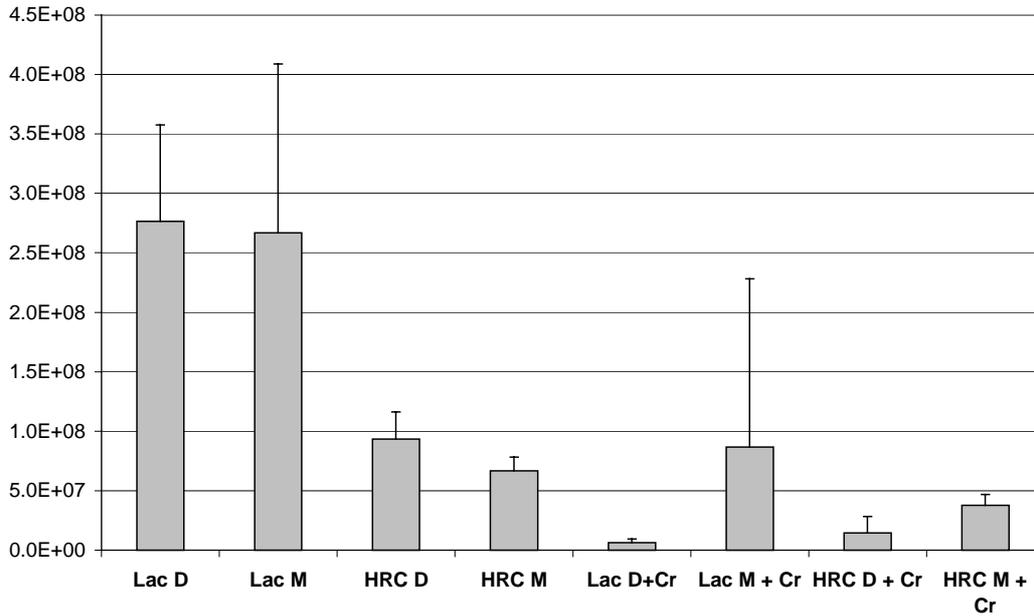


Illustration 9 - Concentration bactérienne après 1 mois de culture. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplifications.

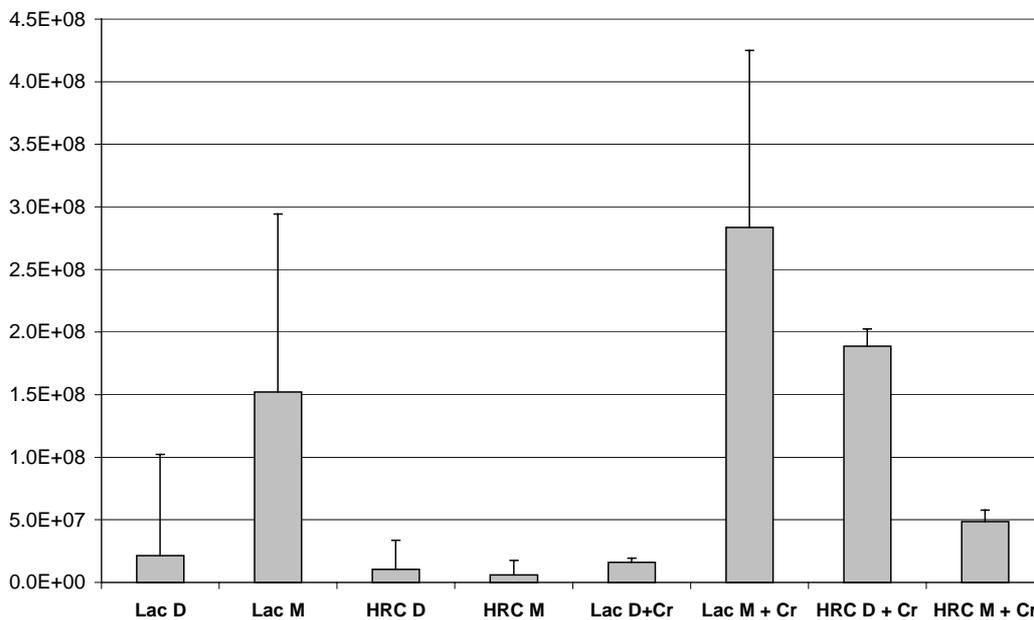


Illustration 10 - Concentrations bactériennes après 3 mois de culture. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé pour 3 réplifications.

2.3.4. Production d'hydrogène gaz par les deux inocula en présence de HRC

Les bactéries sulfato-réductrices, parce qu'elles possèdent des hydrogénases capables de réaliser l'oxydation réversible de l'hydrogène, peuvent produire ou consommer de l'hydrogène en fonction des conditions expérimentales. Nous pouvons donc nous attendre, notamment en présence de HRC, à observer une production d'hydrogène.

Les dosages réalisés par CPG ne permettent pas de détecter la présence d'H₂, sauf dans les trois fioles contenant de l'HRC et la population « métalbioréduction » dans lesquelles 0,55 % d'hydrogène ($\pm 0,37$ %) a été détecté dans la phase gaz. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'absence d'hydrogène dans les échantillons :

- il n'y a pas de production d'hydrogène par les bactéries dans les conditions expérimentales que nous avons choisies ;
- l'hydrogène produit par les bactéries est directement réutilisé par celles-ci comme source d'énergie pour la réduction du sulfate ;
- le système de prélèvement de gaz que nous avons utilisé (ampoule de verre) n'est pas adapté (volume de l'ampoule trop gros par rapport au volume des fioles notamment, et dilution dans de l'azote injecté pour purger le système).

Il est remarquable que la seule condition expérimentale ayant conduit à une production détectable d'hydrogène est la culture de la population « métalbioréduction » en présence d'HRC, qui n'a pas réduit le sulfate. Les bactéries ont adopté un métabolisme fermentaire, avec production d'hydrogène dans cette condition précise.

2.4. CONCLUSIONS

Ces travaux ont démontré que la source d'énergie, HRC ou lactate, a une influence sur la croissance bactérienne, la réduction du Cr(VI) et la production d'hydrogène. Ainsi, le HRC permet la croissance des bactéries sulfato-réductrices, puisque *D. norvegicum* est capable de réduire le sulfate en présence d'HRC. Cependant, une population mixte contenant des BSR au départ peut adopter un métabolisme différent de la sulfato-réduction en présence d'HRC. Le HRC pourrait favoriser davantage le métabolisme fermentaire de certaines bactéries de la population mixte que l'activité de sulfato-réduction. L'utilisation de HRC comme source d'énergie pour la réduction du Cr(VI) donne de meilleurs résultats que l'utilisation de lactate, probablement en raison de la présence d'une substance réductrice dans la formulation du produit commercial HRC.

L'illustration 11 présente les flacons qui initialement contenaient du chromate (de couleur jaune) et après inoculations sous différentes conditions opératoires la réduction du chromate a donné lieu au Cr³⁺ (solution verdâtre).

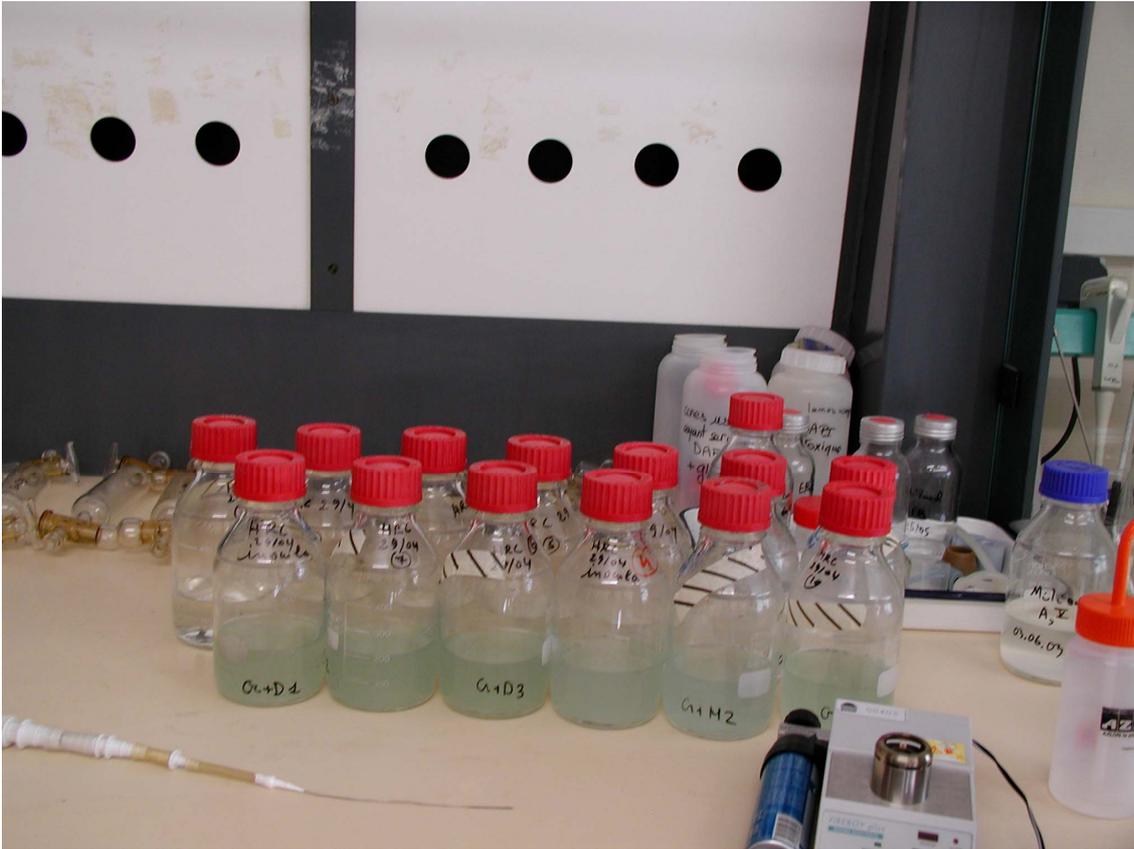


Illustration 11 - La réduction du chrome par les deux inocula bactériens dans différentes conditions opératoires.

3. Mise en œuvre probatoire sur un pilote biogénique du traitement d'immobilisation du chromate sur site par des bactéries réductrices

3.1. OBJECTIF

L'opération de traitement a pour but de tester sur une zone limitée du sol du site de Bois-Colombes, la bioremédiation d'un sol non-saturé, contaminé par du Cr(VI), dans des conditions favorables à son application, c'est-à-dire celles d'une concentration peu élevée en chrome.

L'opération vise à mettre en évidence l'efficacité d'un mode d'application de la bioremédiation, jugé adapté à cette situation en théorie, et à définir des conditions opératoires applicables à d'autres situations.

Ce procédé de bioremédiation pourra être ultérieurement soit complémentaire du lessivage chimique (qui a été appliqué aux zones de fortes concentrations), soit directement employé pour traiter des contaminations plus diffuses.

3.2. MISE EN PLACE DU TEST DE BIOREMÉDIATION

3.2.1. Définition de l'emplacement à traiter sur site

Comme il a été rappelé dans l'introduction de ce rapport, lors d'un travail réalisé en laboratoire, présenté dans un précédent rapport (Ignatiadis *et al.*, 2002, rapport BRGM/RP-52030-FR), l'utilisation des bactéries sulfato-réductrices ne peut être efficace pour le traitement d'un sol que si le sol ne contient pas plus de 100 mg/kg de chromate.

Pour tester le procédé de bio-immobilisation sur un pilote sur site, une petite parcelle contenant environ 30 mg/kg de chromate dans le sol, a été sélectionnée dans la zone polluée du site de HISPANO-SUIZA à Bois-Colombes. Elle se situe en bordure de la zone de traitement chimique par hydrosulfite de sodium. Ce choix est fait à partir de l'interpolation réalisée par le BRGM avec les données de forages carottés (présentée dans le rapport BRGM/RP-52030-FR, Ignatiadis *et al.*, 2002), mais également dans l'objectif de la moindre gêne de deux techniques l'une par rapport à l'autre.

L'illustration 12 présente la cartographie du chromate sur toute la zone, alors que l'illustration 13 présente uniquement la zone concernée par le pilote de bioremédiation (en carré le pilote).

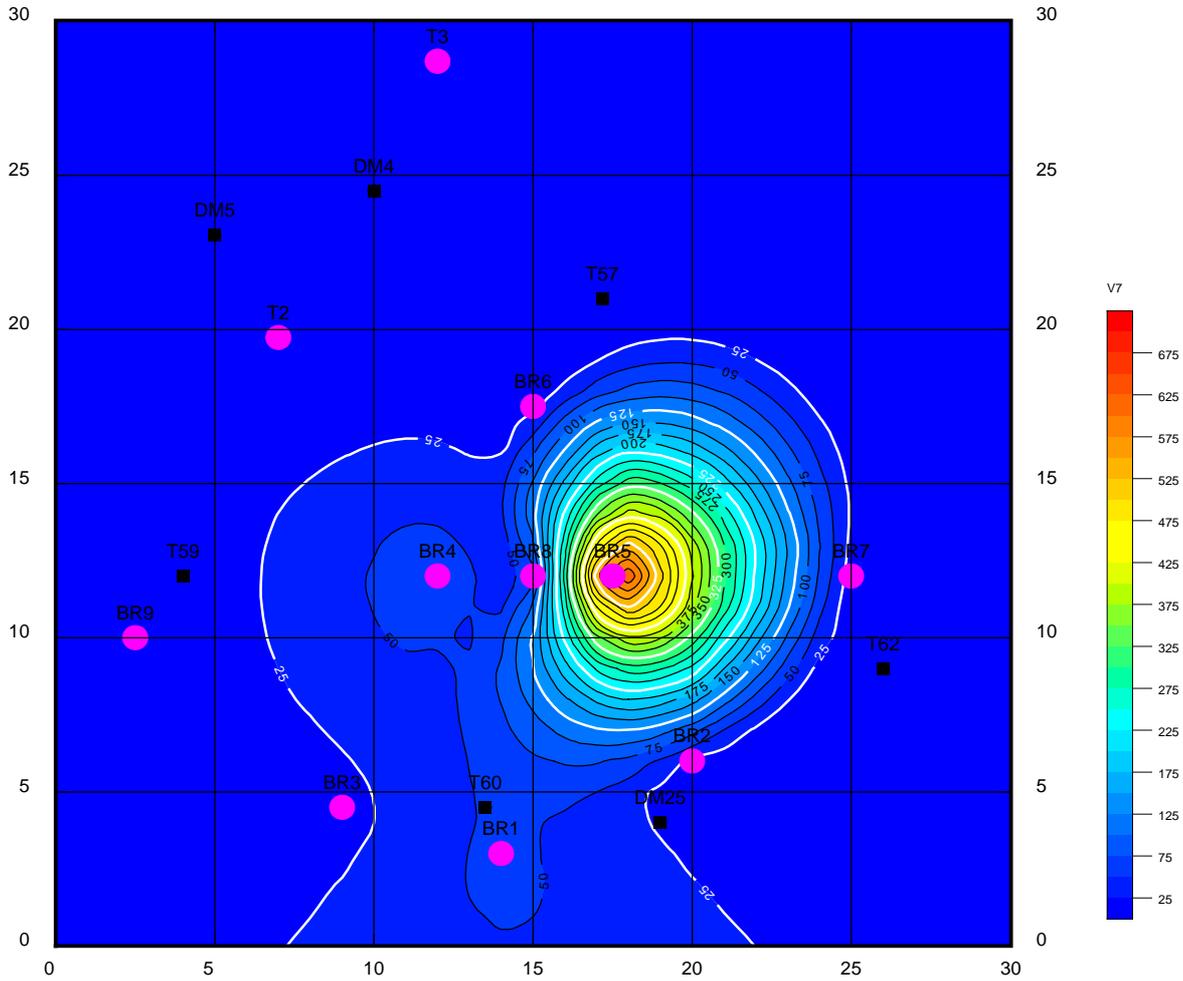


Illustration 12 - Distribution spatiale du Cr(VI) sur toute la zone considérée (x de 0 à 30 m ; y de 0 à 30 m et z de 0 à 15 m). La concentration moyenne, sur 15 m de profondeur, de Cr(VI) (en mg/kg de sol sec) se lit par la couleur de la zone (en rapport avec la palette de couleur) et par la courbe isoteneur (concentration portée sur la courbe).

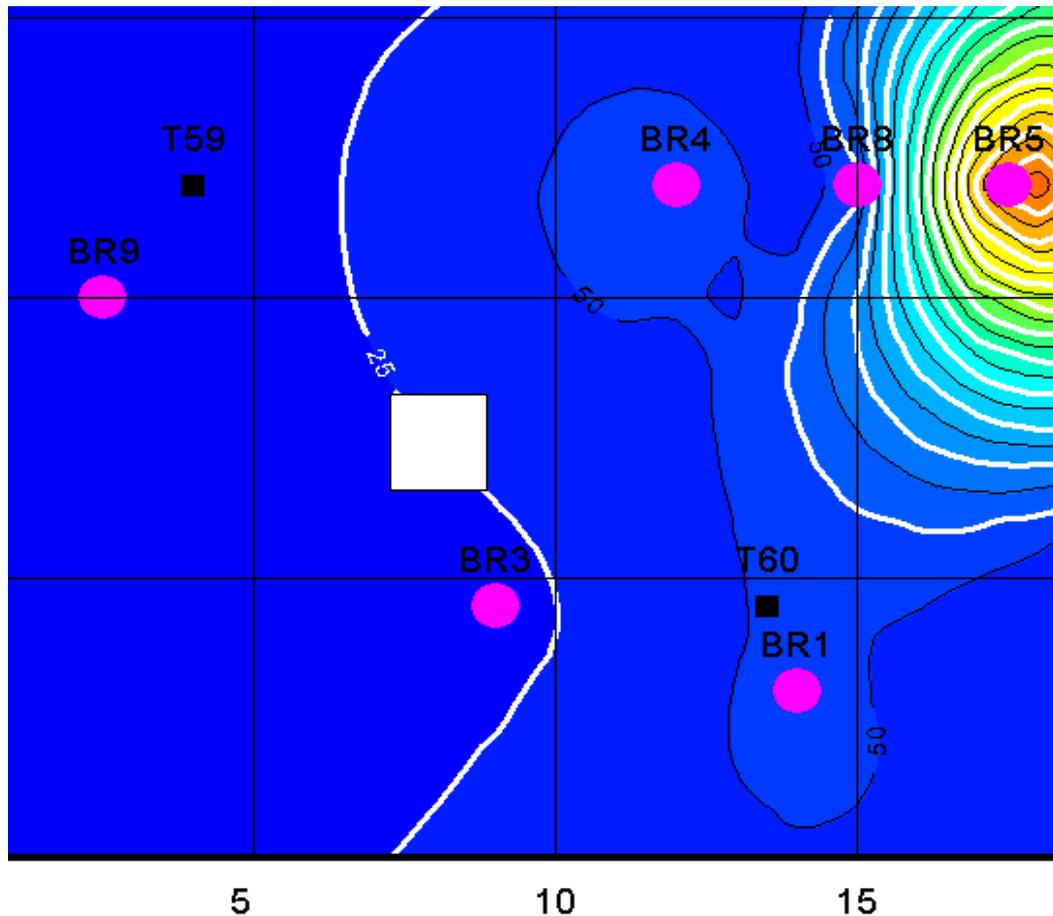


Illustration 13 - Emplacement du pilote biogénique d'immobilisation du chromate sur site. Distribution spatiale du Cr(VI) sur la zone concernée. La concentration moyenne sur 15 m de Cr(VI) (en mg/kg de sol sec) se lit par la couleur de la zone (en rapport avec la palette de couleur) et par la courbe isoteneur (concentration portée sur la courbe).

3.2.2. Réalisation du pilote

Après établissement du dossier de consultation des entreprises sous-traitantes, le dépouillement des offres et le choix de l'entreprise, la réalisation du pilote, conformément au nouveau cahier des charges rédigé par le BRGM, a été confiée à l'entreprise retenue TVD. TVD a confié une partie de son intervention à l'entreprise ETIQ.

Un carré de 1,5 m de côté a été dessiné au sol dans la zone où le chromate (en Cr(VI)) ne dépasse pas 100 mg/kg, comme il a été indiqué dans le paragraphe précédent. Autour de ce carré des tranchées de 40 cm de largeur et 120 cm de profondeur ont été ouvertes.

À partir de ces tranchées, des forages horizontaux (diamètre 2 cm) ont été réalisés tous les 10 cm et des tiges métalliques perforées ont été introduites dans le plancher

du parallélépipède. Ces tiges métalliques perforées ont servi à injecter de la résine à base acrylamide pour réaliser un plancher étanche. Par la suite, les murs du parallélépipède ont été réalisés par le remplissage des tranchées avec de couches successives de terre imprégnées de résine à base acrylamide.

Ainsi, un parallélépipède de terre contaminée a été matérialisé sur le sol du site et a été isolé, de sorte à pouvoir servir, avec une couverture étanche adéquate, de cuve étanche pouvant contenir le sol du site saturé en eau lors des injections. Le volume de ce parallélépipède est au minimum $1,5 \text{ m} \times 1,5 \text{ m} \times 1,0 \text{ m} = 2,25 \text{ m}^3$ et au maximum $1,5 \text{ m} \times 1,5 \text{ m} \times 1,1 \text{ m} = 2,475 \text{ m}^3$. Par la suite, pour tous les calculs mettant en jeu le volume du pilote, nous prendrons ces deux volumes minimum et maximum.

Si l'on suppose que le volume du pilote est $2,25 \text{ m}^3$ et la porosité du sol est de 30 %, alors le volume poreux du pilote serait de $0,675 \text{ m}^3$. L'illustration 14 présente le volume poreux pour différentes hypothèses de porosité, pour les deux volumes (minimal $2,25 \text{ m}^3$ et maximal $2,475 \text{ m}^3$) du pilote.

Hypothèse de porosité (% volume)	30	35	40	45	50	55
Volume poreux pour un volume total de $2,25 \text{ m}^3$ (m^3)	0,675	0,787	0,900	1,012	1,125	1,237
Volume poreux pour un volume total de $2,7425 \text{ m}^3$ (m^3)	0,742	0,866	0,990	1,114	1,237	1,3612

Illustration 14 - Volume poreux du pilote pour différentes valeurs de porosité (entre 30 et 55 %) volumique pour les deux volumes (minimal et maximal)

La densité de sol du site a été mesurée en laboratoire à plusieurs reprises, lors d'une étude précédente (Ignatiadis *et al.*, 2002, rapport BRGM/RP-52030-FR) sur un sol broyé et séché. Elle était de l'ordre de $2,30 \text{ g/cm}^3$. Dans la même étude précédemment citée, l'humidité d'une cinquantaine d'échantillons de sol a été mesurée. Elle est comprise entre 9 et 20 %. L'humidité moyenne était établie autour de 12-15 %. Compte tenu de ces considérations, il conviendrait de prendre une densité inférieure pour un sol non remanié, ni broyé. Ainsi, les deux valeurs extrêmes de densités choisies sont 1,5 et 2. Si l'on prend ces valeurs de densité du sol (1,5 et 2), le poids de sol dans le pilote serait de $1,5 \times 2,25 = 3\,375 \text{ kg}$ ou de $2 \times 2,25 = 4\,500 \text{ kg}$ dans le cas du volume minimal ($2,25 \text{ m}^3$). Dans le cas du volume maximal de $2,7425 \text{ m}^3$, le poids de sol du pilote serait compris entre $1,5 \times 2,7425 = 3\,712,5 \text{ kg}$ et $2 \times 2,7425 = 4\,950 \text{ kg}$.

a) Analyse du sol avant traitement et évaluation de la masse de sol et de chromate dans le pilote.

Après la réalisation de cette cuve de terre, deux prélèvements d'échantillons de terre ont eu lieu (le 5 août 2003), en surface et en profondeur (jusqu'à 15 cm) : un échantillon représentatif du sol de l'intérieur des murs et un autre représentatif du sol à l'extérieur des murs, mais à proximité du pilote. Ces prélèvements dans le périmètre de sol isolé avaient comme objectif de définir le contenu initial en chromate du sol.

Chacun des échantillons a été soumis à une lixiviation (100 g de sol dans 1 000 ml d'eau déminéralisée, avec agitation discontinue) en duplicata. Ces tests rapides faits sur place sont toutefois fiables et donnent une précision assez proche de celle du laboratoire.

Les résultats de la lixiviation du sol représentatif de l'intérieur du pilote sont présentés l'illustration 15. Il y apparaît que la concentration moyenne en Cr(VI) est de 24,95 mg/kg de sol brut.

Date et heure	pH	Température (°C)	Eh (mV/Ag-AgCl)	Cr(VI) (mg/l)	Sulfate (mg/l)
Échantillon représentatif du sol à l'intérieur du pilote					
5/8/2003 à 15h00	-	-	-	-	-
8/8/2003 à 15h00	7,23	31,4	250	15,25	1 473
12/8/2003 à 10h00	7,09	29,7	158	24,95	1 608
Échantillon représentatif du sol à l'extérieur du pilote					
5/8/2003 à 15h00	-	-	-	-	-
8/8/2003 à 15h30	7,65	31,2	255	12,47	955
12/8/2003 10h00	7,17	29,7	157	19,40	1 132

Illustration 15 - Résultats de lixiviation de sol à l'intérieur et l'extérieur du pilote de bio-immobilisation.

Les poids de sol, évalués dans la rubrique précédente, permettent d'évaluer la quantité de chrome VI présente dans le pilote. Cette quantité serait comprise entre $(24,95 \text{ mg/kg}) \times 3\,375 \text{ kg} = 84\,206,25 \text{ mg}$, soit 84,2 g et $(24,95 \text{ mg/kg}) \times 4\,950 \text{ kg} = 123\,502,5 \text{ mg}$ soit 123,5 g de Cr(VI).

Les résultats de la lixiviation du sol représentatif de la proximité extérieure du pilote sont présentés dans l'illustration 15. Il y apparaît que la concentration moyenne en Cr(VI) est de 19,40 mg/kg de sol brut.

b) Équipement en piézomètres

Par la suite, le pilote a été équipé de cinq piézomètres (crépinés en fente de 1 mm). Cinq forages à la tarière ont été réalisés sur 75 cm de profondeur et disposés comme il est indiqué dans les illustrations 16a et b et 17. Les piézomètres de 100 cm de longueur ont été placés dans ces forages et présentant une plage crépinée dans le sol de 70 cm.

Le pilote biogénique a été connecté à une cuve de 1 m³ de volume, à l'aide de cinq tuyaux alimentant chacun un piézomètre et munis chacun d'une vanne individuelle (ill. 18).

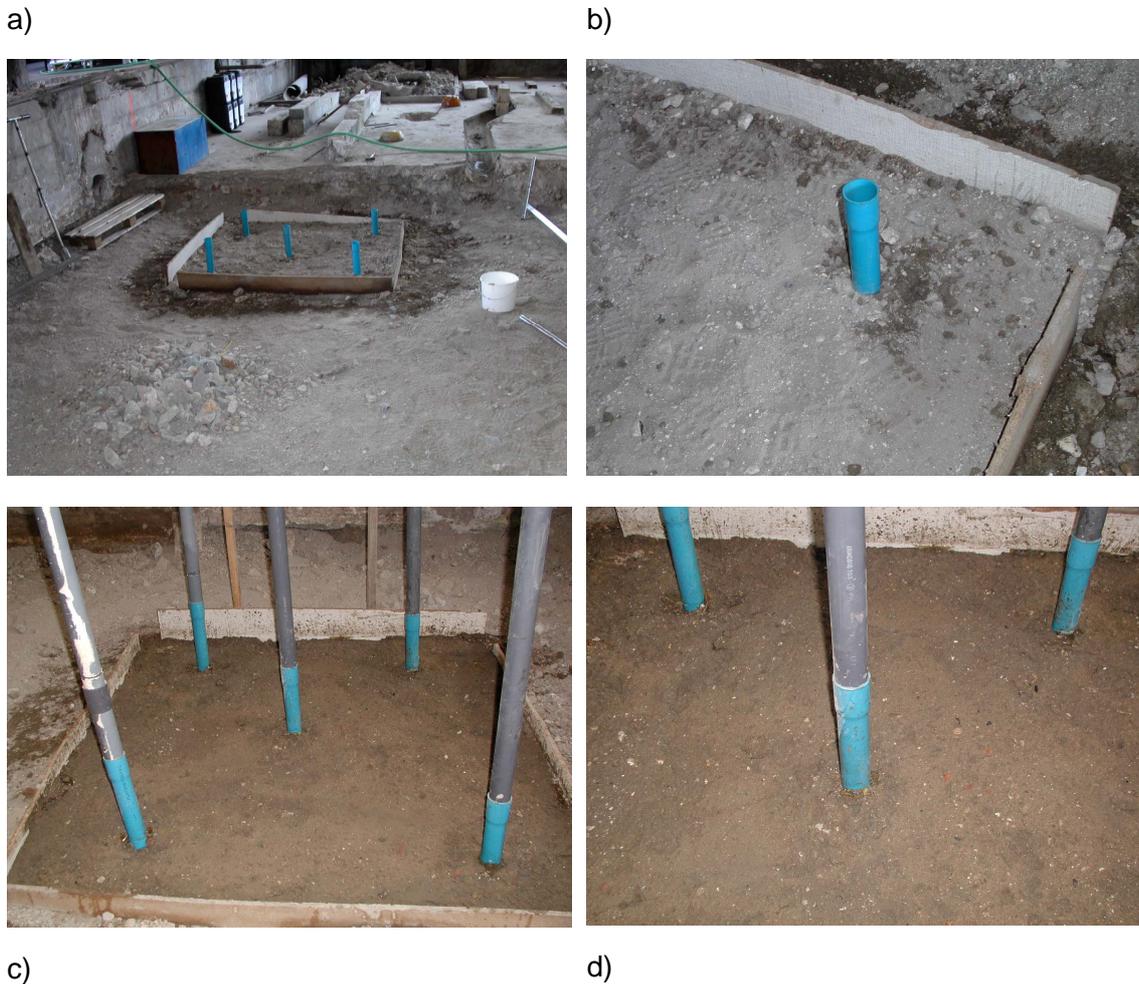


Illustration 16 - Détail du pilote biogénique équipé des cinq piézomètres avant toute injection.

Piézomètre	X (cm)	Y (cm)	Z (cm)	Remarques
Piézomètre 1	75	75	de +30 à -70	Au centre du carré, équipé d'une sonde de potentiel redox
Piézomètre 2	30	30	de +30 à -70	
Piézomètre 3	120	30	de +30 à -70	
Piézomètre 4	120	120	de +30 à -70	Equipé d'une sonde de potentiel redox
Piézomètre 5	30	120	de +30 à -70	

Illustration 17 - Coordonnées des cinq piézomètres dans le parallélépipède (150 cm x 150 cm x 110 cm de profondeur) constituant le pilote biologique.

a)



b)



c)

Illustration 18 - Vue du pilote biogénique après la fin des injections d'inoculum additionné de produit HRC et d'imperméabilisation par trois couches de résine. 18c montre l'emplacement du pilote dans le site.

c) Injections dans le pilote biologique sur site et suivi du traitement

Le 7 août 2003, 850 litres d'inoculum bactérien, auquel il a été additionné 3 kg de produit HRC, ont été injecté sous atmosphère inerte (sous azote) dans le pilote biologique à l'aide de la cuve de 1 m³. Cette injection correspondrait au volume poreux du pilote, si son volume total était de 2,7425 m³ et si la porosité de son sol était de 35 % (cf. ill. 14).

L'inoculum bactérien est une solution collectée dans sept containers à la sortie d'un pilote (d'un volume utile de 200 litres) de traitement d'eau souterraine polluée au chromate, à l'aide de bactéries réductrices. Le pilote était en fonctionnement permanent durant tout l'été et une partie de l'automne 2003. La solution-inoculum contient des souches bactériennes acclimatées au chromate provenant du pilote, mais ne contient pas de chromate. La composition chimique de cet inoculum est donnée dans l'illustration 19.

	Container de 1 à 6	Container 7
COD (mg l ⁻¹)	117	88 mg l ⁻¹
COT(mg l ⁻¹)	118	90
Demande Biologique en O ₂ 5 jours (DBO5) (mg l ⁻¹)	253	188
Demande chimique en O ₂ , DCO (mg l ⁻¹)	393	283
Acétate (mg l ⁻¹)	290	200
solides en suspension (mg l ⁻¹)	< 2	< 2
N Total (mg l ⁻¹)	24,3	25,9
NH ₄ ⁺ (mg l ⁻¹)	30,9	32,6
NO ₃ ⁻ (mg l ⁻¹)	< 0,1	< 0,1
NO ₂ (mg l ⁻¹)	< 0,01	< 0,01
P Total (mg l ⁻¹)	4,4	5,2
Mg (mg l ⁻¹)	9,4	10,1
K (mg l ⁻¹)	17,9	19,5
S Total (mg l ⁻¹)	19	< 3
Sulfate (mg l ⁻¹)	5	3
Sulfure dissous (mg l ⁻¹)	50	40
Chromate (en Cr) (mg l ⁻¹)	0,00	0,00
Chrome Total (mg l ⁻¹)	0,15	0,24
pH	8,2	7,9
Eh (Ag-AgCl) (mV)	-450	-400
Température (°C)	22	13

Illustration 19 - Analyses chimiques de l'effluent en sortie du bioréacteur.

La solution a été amenée sur site par transport routier en essayant de la préserver de l'oxydation par l'air (containers sous atmosphère d'azote) et l'exposition à la lumière du soleil. Les caractéristiques de cette solution dans les différents conditionnements présents sur le site sont données dans l'illustration 20.

	Volume (litres)	Température (°C)	pH	Eh (mV/Ag-AgCl)
Container 1	50	30,2	7,44	-405,1
Container 2	50	30,1	7,67	-380,5
Container 3	50	30,3	7,30	-117,6
Container 4	50	30,4	7,78	-218,4
Container 5	45	29,7	7,24	-88,5
Container 6	45	30,4	7,30	-99,5
Total de 1 à 6	290	29,3	8,65	-173,8
Container 7	560	29,3	8,65	-173,8
Total	850			

Illustration 20 - Conditionnements et caractéristiques de la solution d'inoculum amenés sur le site pour l'injection dans le pilote biogénique.

Le volume total d'inoculum disponible était de 850 litres. En fait, nous pensons que la porosité était de l'ordre de 30 % et que ce volume suffirait à la remplir (cf. ill. 14).

Toutes les opérations de manipulation d'inoculum sur site pour son injection ont été faites sous atmosphère d'azote, pour limiter le transfert d'oxygène dans le milieu en cours de traitement.

Le contenu de six premiers containers (290 litres) est versé dans la cuve d'injection du pilote où il a été additionné 2 kg de produit HRC. Les caractéristiques et l'évolution en température, pH et potentiel redox de ce mélange, sont données dans l'illustration 21.

Un volume de 210 litres provenant du container n° 7 a été ajouté aux 290 litres dans la cuve d'injection du pilote. Les caractéristiques de la solution résultant d'un volume de 500 litres sont présentées dans l'illustration 21. Cette solution est injectée dans le pilote biologique. L'injection se produit assez rapidement sans émergence d'eau en surface. La quantité de HRC ajoutée était de 2 kg pour 500 litres d'inoculum.

Date et heure	Volume (litres)	Température (°C)	pH	Eh (mV/Ag-AgCl)
<i>290 litres d'inoculum + 2 kg de produit HRC</i>				
10 h 30	290	29,8	4,52	10
10 h 35	290	29,8	4,51	15,1
12 h 38	290	29,8	4,49	75,2
<i>Ajout de 210 litres d'inoculum</i>				
13 h 00	500	29,8	5,17	-49,2

Illustration 21 - Caractéristiques et évolution d'une solution d'un volume de 290 litres auquel il a été additionné 2 kg de produit HRC, puis après ajout de 210 litres supplémentaires d'inoculum, avant injection dans le pilote biologique

Avec 100 litres de la solution restant dans le container 7, on prépare un mélange avec 1 kg de produit HRC. Les caractéristiques de cette solution de 100 litres sont données dans l'illustration 22. On y ajoute dans la cuve d'injection 150 litres supplémentaires provenant du container 7. Les caractéristiques de la solution de la cuve sont données dans l'illustration 22. Cette solution de 250 litres est injectée dans le pilote biologique vers 16 h 30.

Date et heure	Volume (litres)	Température (°C)	pH	Eh (mV/Ag-AgCl)
<i>100 litres de la solution du container 7 additionnée de 1 kg de HRC</i>				
14h30	100	30,4	5,56	-54,7
<i>Ajout de 150 litres supplémentaires du container 7</i>				
15h00	250	31,6	6,17	-90,3

Illustration 22 - Caractéristiques d'une solution d'inoculum d'un volume de 250 litres contenant 1 kg de produit HRC, injectée dans le pilote biologique.

Finalement, 100 litres restant dans le container 7 sont injectés seuls, sans addition de HRC.

En tout, il a été injecté dans le pilote biogénique 850 litres d'inoculum, auquel on a additionné 3 kg de HRC. Tout le liquide n'a pas été immédiatement adsorbé par le sol du pilote. Il y a eu mouillage du sol par l'intérieur, mais également par la surface, parce que le fluide est remonté le long des piézomètres. Il a été nécessaire de fermer et d'ouvrir les vannes alimentant chacun des piézomètres, pour répartir la solution sans débordement important.

Vers 17 h 30, une première couche d'imperméabilisation de la surface du pilote a été réalisée avec de la résine à base acrylamide.

Le suivi de ce pilote a commencé, via les deux sondes de mesure du potentiel d'oxydoréduction (potentiel pris par le métal Platine par rapport à une électrode de référence Ag-AgCl), installées au fond des deux piézomètres 1 (PZBIO1 au centre) et 4 (PZBIO2 à un coin du carré).

Le lendemain 8 août 2003 à 10 h 00, une autre couche d'imperméabilisation de la surface du pilote a été effectuée. Finalement, vers 18 h 00 une troisième et dernière couche a été réalisée, établissant ainsi un pilote biologique parfaitement étanche et anaérobie. L'illustration 18 présentait le pilote dans son état à la fin de ces opérations.

Quelques jours après sa réalisation, le 11 août 2003 matin, un incident a été constaté : à cause de très fortes chaleurs en cette période (canicule de l'été 2003), la couche superficielle s'est trouvée craquelée (ill. 23). Vers 11 h 00 du matin, la couche a été remplacée par une première couche fraîche, puis une deuxième couche plus épaisse vers 13 h 00 (ill. 24). Depuis aucun craquelage, ni signe de déficience de la couche d'imperméabilisation n'ont été observés. Seulement un vieillissement de la couverture qui a perdu son aspect lisse.



Illustration 23 - Vue du pilote biogénique après la fin des injections, mais craquelé sur sa surface à cause de la très forte chaleur



Illustration 24 - Vue du pilote biogénique après la deuxième couche d'imperméabilisation réalisée le 12 août 2003

Le pilote est resté ainsi sans autre injection jusqu'au jeudi 4 septembre 2003, où une tentative de prélèvement d'eau dans les piézomètres s'est avérée infructueuse : il n'y avait pas d'eau, mais seulement une humidité importante. Ce constat nous a fait penser à une éventuelle fuite du pilote : le plancher ne serait-il pas étanche ? Ainsi, le lundi 8 septembre 2003, un volume de 1 m³ d'inoculum frais a été amené sur le site par transport routier et injecté dans le sol du pilote sans grande difficulté dans la nuit du 8 au 9 septembre, sans aucune addition de HRC. Cette injection de 1 m³ démontrait en quelque sorte le manque de saturation en eau au moment du prélèvement et donnait la certitude de la non-étanchéité du pilote, du moins au bout d'un mois.

Depuis, le pilote n'a pas été sérieusement perturbé, jusqu'à la fin du chantier et la réalisation d'un forage carotté en son centre.

Toutefois, notons que l'évolution de la composition de l'eau interstitielle du sol a été suivie par les moyens de terrain du BRGM. Des prélèvements d'eau dans les piézomètres ont été réalisés deux fois, et l'analyse a montré l'absence de chromate. Le suivi avec les deux électrodes d'oxydoréduction immergées l'une au centre, l'autre dans un coin (ill. 25) a été réalisé jusqu'à la mi-octobre 2003. Ce suivi montre que l'eau interstitielle du pilote n'a rarement été en véritable anaérobiose. Il montre également que les extrémités du pilote ont eu une anaérobiose mieux protégée que le centre du pilote. Un prélèvement de sol, par carottage à la tarière, a également été effectué le 5 octobre 2003. Le sol mouillé, mais non saturé en eau, a été soumis à une lixiviation. Le dosage de Cr(VI) effectué le 8/10/2003 a donné une concentration de Cr(VI) de 0,75 mg/kg de sol brut.

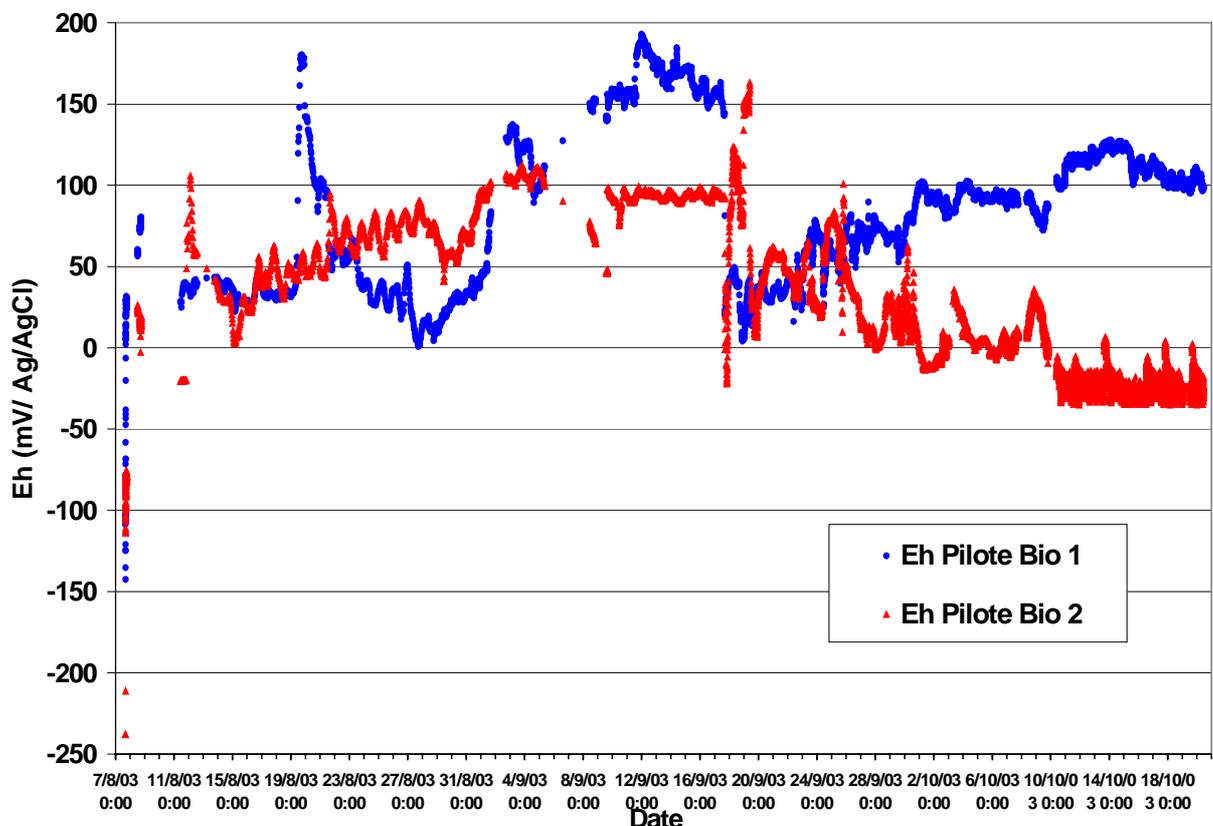


Illustration 25 - Suivi du potentiel d'oxydoréduction (potentiel pris par le métal Platine, par rapport à une électrode de référence Ag-AgCl) par deux sondes installées au fond des deux piézomètres 1 (PZBIO1 au centre) et 4 (PZBIO2 à un coin du carré).

d) Analyse du sol du pilote biologique à la fin du traitement

À la mi-décembre 2003, un forage carotté (le n° 24) a été effectué à l'emplacement du pilote biogénique (il l'a complètement traversé) de -1,20 à -12,4 m. La profondeur -1,20 m correspond à la surface du pilote par rapport au référentiel sol du site. Des carottes de 80 cm ont été réalisées, puis huit échantillons représentatifs d'un intervalle

de profondeur ont été constitués pour l'analyse. Les résultats de ces analyses sont présentés dans l'illustration 26. Les résultats qui concernent directement le pilote biologique sont donc l'échantillon SOL 24-1 HSBA entièrement représentatif du pilote et l'échantillon SOL 24-2 HSBA, partiellement représentatif du pilote, puisque seulement 30 cm sur les 80 cm de la carotte proviennent du pilote. Notons que le chromate du sol, sous le pilote et sur toute la profondeur, a été traité chimiquement par un produit réducteur du chromate, l'hydrosulfite de sodium. Ces travaux sont relatés dans un rapport (Ignatiadis *et al.*, 2004, Rapport BRGM/RP-53164-FR). En fait, seul le sol du pilote a été traité par les bactéries, alors que son entourage a été traité par l'hydrosulfite de sodium.

Intervalle de profondeur (début fin) (m)	Echantillon	Cr total (mg/kg)	Cr(VI) (mg/kg)
1,2 - 2,0	SOL 24-1 HSBA	524	1,0
2,0 - 2,8	SOL 24-2 HSBA	2 214	0,6
2,8 - 3,6	SOL 24-3 HSBA	4 084	0,2
3,6 - 4,4	SOL 24-4 HSBA	2 286	0,1
4,4 - 5,2	SOL 24-5 HSBA	1 421	0,2
5,2 - 6,0	SOL 24-6 HSBA	1 167	0,3
6,0 - 8,4	SOL 24-7 HSBA	621	24,7
8,4 - 10,8	SOL 24-8 HSBA	196	0,1
10,8 - 12,4	SOL 24-9 HSBA	588	0,2
	Somme --->	15 323,0	77,2
	Moyenne --->	1 094,5	5,5
		% Cr réduit	% Cr(VI)/CrTotal
		99,5	0,50

Illustration 26 - Résultats d'analyse du chrome total et du chrome VI dans les échantillons, représentatifs d'intervalles de profondeurs, prélevés suite à un forage carotté au milieu du pilote biogénique réalisée en décembre 2003.

3.3. REVUE ET DISCUSSION DES RÉSULTATS DE TRAITEMENT SUR PILOTE

Après la phase d'injection, la zone traitée a été laissée au repos pendant environ quatre mois, mais sous saturation effective probablement uniquement pendant un mois (du 7 août au 4 septembre 2003).

Un carottage de contrôle a été réalisé afin d'évaluer l'efficacité du procédé. Après traitement, la concentration de Cr(VI) résiduelle dans le sol du pilote est inférieure à 1 mg/kg. En fait, après traitement, la quantité de Cr(VI) serait comprise entre (1 mg/kg) x 3 375 kg = 3 375,25 mg, soit 3,37 g et (1 mg/kg) x 4 950 kg = 4 950 mg, soit 4,95 g de Cr(VI).

Or, le sol à l'intérieur du pilote contenait initialement une quantité de Cr(VI) comprise entre 84,2 g et 123,5 g de Cr(VI). Cette différence permet d'évaluer les performances de l'opération. L'immobilisation du Cr(VI) en Cr(III) a été efficace à 96 %, puisque le Cr(VI) est passé de 24,95 mg/kg à moins de 1 mg/kg.

À ce stade, le chromate ne représente plus que 0,20 % de la masse de chrome total présent dans le sol. Le chromate résiduel devrait continuer à se réduire progressivement en chrome trivalent. La présence de très fortes teneurs en Cr(III) dans le sol témoigne d'un environnement déjà réduit dans le passé et apparemment stable pour le futur.

Le procédé de traitement *in situ* par *inoculum* bactérien additionné d'un produit commercial, l'HRC, a permis de réduire à plus de 96 % le chromate présent dans un sol industriel non saturé. Il a fallu imaginer un système permettant de mettre le sol sous saturation aqueuse et sous conditions anaérobie. Toutefois, ce système n'a pas fonctionné comme prévu, puisqu'il n'a pas été étanche.

La technique d'immobilisation mise au point par le BRGM consiste à transformer par réduction électrochimique le chrome hexavalent en chrome trivalent au moyen, soit d'un composé chimique réducteur très réactif, le sulfure d'hydrogène, produit par les bactéries (réduction indirecte), soit directement par les bactéries. Le chrome trivalent ainsi produit précipite alors essentiellement sous forme d'hydroxyde de chrome ou de fer.

3.4. CONCLUSIONS

L'inoculum bactérien additionné de produit HRC produit les conditions réductrices requises pour réduire le Cr(VI) en Cr(III).

La lente fourniture (libération) d'hydrogène à partir de HRC fournit des conditions réductrices pour une longue période, permettant ainsi une réduction du Chromate en Cr(III) et une précipitation du Cr(III) sous forme d'hydroxyde ou d'oxydes mixtes Fer-Chrome.

Trois kilogrammes de produit HRC pour environ 1 000 kg d'inoculum était une quantité surestimée. Toutefois, le traitement de presque 5 tonnes de sol a été effectué, démontrant qu'une optimisation ultérieure de la quantité à l'injection de ce produit pourrait s'avérer économique.

Le système d'isolement d'un sol, pour réaliser une cuve étanche, semble, malgré son manque d'étanchéité, avoir fonctionné et les piézomètres, les tuyaux et la maintenance sont d'un coût faible.

Toutefois, ce pilote de petite échelle ne peut permettre de réaliser une extrapolation du coût d'un traitement à grandeur réelle. Sur un sol de ce type, avec une teneur en chromate ne dépassant pas 100 mg/kg, on estime l'économie réalisée par le choix de cette technologie *in situ* à un facteur 2,5 à 3 pour le volume traité, sans prendre en compte le coût de production de l'inoculum bactérien.

Quoi qu'il en soit, le développement de techniques biologiques de traitement *in situ*, y compris pour des polluants métalliques, constitue un axe de développement important et compétitif en matière de technologies de dépollution.

4. Bibliographie

Cervantès C., Campos-Garcia J., Devars S., et al. (2001) - Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001, 25, 3, pp. 335-347.

Hatchikian E.C., Chaigneau M., Legall J. (1977) - Analysis of Gas Production by Growing Culture of Three Species of Sulfate-reducing Bacteria. *In: Conf. Microbiol. pro. util. gases*, p. 109-117.

Ignatiadis I., Foucher S., Salmon A. et al. (2002) - Mise au point d'un procédé biologique d'immobilisation *in situ* du chrome contenu dans un sol industriel. BRGM/RP-52030-FR, 139 p.

Ignatiadis I., Foucher S., Morin D. (2004) - Mise au point d'un procédé d'immobilisation du chrome hexavalent contenu dans un sol par l'hydrosulfite de sodium. BRGM/RC-52274-FR, 48 p.

Ignatiadis I., Castagné S., Morin D. (2004) - Traitement *in situ* du chrome hexavalent contenu dans un sol industriel non saturé : procédé d'immobilisation par l'hydrosulfite de sodium. BRGM/RP-53164-FR, 90 p., 50 ill. (à paraître).

Losi M.E., Amrhein C., Frankenberger Jr W.T. (1994) - Factors affecting chemical and biological reduction of hexavalent chromium in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1994, 13, 11, p. 1727-1735.

Salunkhe P.B., Dhakephalkar P.K., Paknikar K.M. (1998) - Bioremediation of hexavalent chromium in soil microcosms. *Biotechnology Letters*, 20, 8, p. 749-751.

Schmieman E.A., Petersen J.N., Yonge D.R. et al. (1997) - Bacterial Reduction of Chromium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1997, Vol. 63-65.

Koenigsberg S.S., Norrs, R.D. (1999) - Accelerated Bioremediation Using slow release compounds. Selected Battelle Conference Papers: 1993-1999. p.105-109, et p.119-122.

<http://www.cnrs.fr/SDV/biolfontecilla.htm1>: - Bases structurales de la biocatalyse de l'hydrogène moléculaire.



Géosciences pour une Terre durable

brgm

**Centre scientifique et technique
Service environnement et procédés industriels**

3, avenue Claude-Guillemin

BP 6009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 33 (0)2 38 64 34 34