

Oxydation biologique de l'arsenic de l'effluent minier de Loperec

Rapport final

BRGM/RP-53453-FR
novembre 2004

Étude réalisée dans le cadre
du projet de recherche 2002-RESR04

**F. Battaglia-Brunet, C. Crouzet, F. Delorme,
F. Garrido, F. Bourgeois, C. Greffié, Y. Itard**

Vérificateur :

Original signé par : D. ARTIGNAN

Approbateur :

Original signé par : B. LAMOUILLE

Le système de management de la qualité du BRGM est certifié AFAG ISO 9001:2000

Mots clés : Arsenic, Fer, Bactéries, Oxygène, Oxydation, Loperec, Bio-réacteur.

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

Battaglia-Brunet F., Crouzet C., Delorme F., Garrido F., Bourgeois F., Greffié C., Itard Y.
(2004) - Oxydation biologique de l'arsenic de l'effluent minier de Loperec. Rapport final,
BRGM/RP-53453-FR, 94 p., 31 fig., 10 tabl., 4 photos, 2 ann.

© BRGM, 2004, ce document ne peut être reproduit en totalité ou en partie sans l'autorisation expresse du BRGM.

Synthèse

La présente étude a été réalisée dans le cadre du projet Drainages Miniers (02RESR04), et financée par le budget de recherche du BRGM-SA. Au sein de ce projet, les objectifs du module consacré au site de Loperec (Finistère) étaient d'une part, d'élucider les mécanismes de dissémination et de piégeage de l'arsenic dans l'environnement de cette ancienne galerie d'exploration minière, et d'autre part, de proposer et tester un procédé de traitement passif adapté à ce type d'effluent.

L'eau jaillit naturellement de la galerie comblée de Loperec à 12 °C et à un pH proche de la neutralité (pH 6). Elle contient du fer ferreux, et environ 1 mg l⁻¹ d'arsenic, se présentant sous forme As(III) et As(V) en quantités à peu près équivalentes. L'oxydation du fer ferreux, lorsque l'eau s'oxygène au contact de l'air, provoque la co-précipitation d'hydroxydes de fer et d'une partie de l'arsenic. Cependant, ces réactions demeurent incomplètes au point de déversement dans la rivière voisine (la Doufine). Une optimisation des étapes d'oxydation et de précipitation permettrait d'améliorer la qualité de l'eau rejetée. Certains micro-organismes présents sur le site sont susceptibles d'accélérer les processus participant à l'épuration de l'effluent.

Les expériences réalisées entre janvier 2001 et décembre 2003 ont fourni les informations suivantes :

- des bactéries capables d'oxyder l'As(III) sont omniprésentes sur le site ;
- l'oxydation biologique peut être réalisée à 12 °C et sans apport de nutriments ;
- la comparaison de systèmes stériles et non stériles montre que les bactéries jouent un rôle de catalyseur de l'oxydation de l'As(III) non négligeable ;
- un lit fixé de pouzzolane inoculé avec les bactéries du site permet d'oxyder efficacement l'As(III) et le Fe(II) en 4 heures avec seulement 2 mg l⁻¹ d'O₂.

Ces résultats obtenus au laboratoire avec un effluent synthétique, ont été complétés en 2004 par des expériences sur effluent réel. Des temps de séjour d'une heure sont suffisants pour une oxydation efficace de l'arsenic et garantir un rejet inférieur à 100 µg/l d'arsenic. Ces essais sur site ont également montré que 2 semaines étaient nécessaires pour qu'une colonne non inoculée ait le même rendement qu'une colonne préalablement inoculée.

L'ensemble de ces données a permis de concevoir et de pré-dimensionner un système de traitement passif sur site basé sur le principe d'un bio-réacteur. Il devrait permettre de garantir un rejet de moins de 100 µg/l d'arsenic et une quasi absence de fer. Le dimensionnement définitif fera l'objet d'un rapport spécifique.

Sommaire

1. Introduction	11
2. Activité d'oxydation biologique dans des échantillons prélevés sur le site de Loperec	13
2.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES	13
2.1.1. Caractéristiques de l'exhaure.....	13
2.1.2. Points de prélèvement.....	14
2.1.3. Estimation de l'activité As(III)-oxydante	15
2.2. RÉSULTATS.....	16
3. Enrichissements en bactéries As(III)-oxydantes	19
3.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES	19
3.1.1. Dispositif expérimental	19
3.1.2. Préparation de l'effluent synthétique	19
3.1.3. Inoculation.....	21
3.1.4. Suivi des réacteurs.....	21
3.1.5. Sélection et isolement de souches bactériennes	22
3.2. RÉSULTATS.....	22
3.2.1. Concentration initiale en As(III) inférieure à 10 mg l ⁻¹	22
3.2.2. Concentration initiale en As(III) égale à 10 mg l ⁻¹	23
3.2.3. Concentration initiale en As(III) égale à 100 mg l ⁻¹	24
3.2.4. Cinétique	24
3.2.5. Sélection et identification de bactéries As(III)-oxydantes.....	25
3.2.6. Conclusion des essais d'enrichissement et d'isolement de bactéries As(III)-oxydantes	27
4. Oxydation en continu : expériences en colonnes de 20 ml	29
4.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES	29
4.1.1. Dispositif expérimental	29
4.1.2. Préparation de l'effluent synthétique.....	30
4.1.3. Inoculation et suivi des colonnes	30
4.2. RÉSULTATS.....	31

4.2.1. Evolution des concentrations en As(III)	31
4.2.2. Evolution des concentrations en As(V)	31
4.2.3. Oxydation du fer	31
4.2.4. Evolution des concentrations en As total	36
5. Oxydation en continu : expérience en colonne de 2 litres au laboratoire	37
5.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES	37
5.1.1. Dispositif expérimental	37
5.1.2. Préparation de l'effluent synthétique	38
5.1.3. Programme expérimental	39
5.1.4. Suivi analytique	39
5.2. RÉSULTATS	40
5.2.1. Oxydation de l'arsenic	40
5.2.2. Oxydation du fer	41
5.2.3. Evolution de la concentration en O ₂ dissous	42
5.2.4. Evolution du pH	43
5.2.5. Bilan à t = 48 jours	45
5.2.6. Observations au microscope électronique à balayage	46
6. Expérience témoin en colonne de 2 litres au laboratoire	51
6.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES	51
6.2. RÉSULTATS	52
6.2.1. Phase 1 : adsorption sur la pouzzolane en conditions non oxydantes ..	52
6.2.2. Phase 2 : témoin en conditions oxydantes	53
7. Essais à faible temps de séjour, en halle pilote	55
7.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES	55
7.2. RÉSULTATS	56
8. Essai sur site	61
8.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES	61
8.2. RÉSULTATS	61
9. Comparaison de cinétiques	65

10. Dimensionnement d'un procédé de traitement biologique	67
10.1. CONFIGURATION DU RÉACTEUR.....	67
10.2. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....	69
11. Conclusion	71
12. Références	73

Liste des figures

Fig. 1 – Représentation schématique du site avec localisation des points de prélèvement microbiologiques.....	15
Fig. 2 – Activité As(III)-oxydante dans les échantillons prélevés sur le site de Loperec.....	16
Fig. 3 – Schéma du type de réacteur utilisé pour les expériences d'enrichissement en bactéries As(III)-oxydantes.....	21
Fig. 4 – Enrichissement en bactéries As(III)-oxydantes, réacteur 1 : concentration en As(III) inférieure à 10 mg l ⁻¹	23
Fig. 5 – Enrichissement en bactéries As(III)-oxydantes, réacteur 2 : concentration initiale en As(III) égale à 10 mg l ⁻¹	23
Fig. 6 – Enrichissement en bactéries As(III)-oxydantes, réacteur 3 : concentration initiale en As(III) égale à 100 mg l ⁻¹	24
Fig. 7 – Expérience en continu en colonnes de 20 ml – schéma du dispositif expérimental.....	29
Fig. 8 – Expériences en continu en colonnes de 20 ml, évolution de la concentration en As(III). (A) : pH de l'alimentation entre 7 et 7,5 ; (B) pH de l'alimentation entre 6 et 7 ; (C) pH de l'alimentation entre 5 et 6.....	32
Fig. 9 – Expériences en continu en colonnes de 20 ml, évolution de la concentration en As(V). (A) : pH de l'alimentation entre 7 et 7,5 ; (B) pH de l'alimentation entre 6 et 7 ; (C) pH de l'alimentation entre 5 et 6.....	33
Fig. 10 – Expériences en continu en colonnes de 20 ml, évolution de la concentration en Fe(II). (A) : pH de l'alimentation entre 7 et 7,5 ; (B) pH de l'alimentation entre 6 et 7 ; (C) pH de l'alimentation entre 5 et 6.....	34
Fig. 11 – Expériences en continu en colonnes de 20 ml, évolution de la concentration en As total. (A) : pH de l'alimentation entre 7 et 7,5 ; (B) pH de l'alimentation entre 6 et 7 ; (C) pH de l'alimentation entre 5 et 6.....	35
Fig. 12 – Schéma du dispositif expérimental pour l'oxydation en continu dans une colonne de 2 litres.....	38
Fig. 13 – Oxydation en continu en colonne de 2 litres, évolution des concentrations en arsenic et temps de séjour.....	41

Fig. 14 – Oxydation en colonne de 2 litres, évolution des concentrations en Fe(II)	43
Fig. 15 – Oxydation en colonne de 2 litres, évolution de la concentration en O ₂ dissous en haut de colonne.....	44
Fig. 16 – Oxydation en colonne de 2 litres, évolution du pH.....	44
Fig. 17 – Résultats des analyses effectuées à t = 48 jours.	45
Fig. 18 – Spectre EDS de la pouzzolane colonisée par les bactéries et les précipités de fer.	49
Fig. 19 – Spectre EDS de la pouzzolane témoin	49
Fig. 20 – Colonne de 2 litres non inoculée : évolution des concentrations en As(III), As(V) et temps de résidence.....	52
Fig. 21 – Colonne de 2 litres non inoculée : évolution des concentrations en Fe(II), pH et temps de résidence.....	53
Fig. 22 – Concentration en Fe(II) en alimentation et sortie de bioréacteur, et temps de séjour. (A) expérience 1 avec 1 fût d'alimentation contenant tous les composants de l'effluent synthétique ; (B) expérience 2 avec alimentation séparée en Fe(II) et As(III).	57
Fig. 23 – Concentration en As(III) en alimentation et sortie de bioréacteur, et temps de séjour. (A) expérience 1 avec 1 fût d'alimentation contenant tous les composants de l'effluent synthétique ; (B) expérience 2 avec alimentation séparée en Fe(II) et As(III).	58
Fig. 24 – pH mesuré dans l'alimentation et en sortie de bioréacteur, et temps de séjour. (A) expérience 1 avec 1 fût d'alimentation contenant tous les composants de l'effluent synthétique ; (B) expérience 2 avec alimentation séparée en Fe(II) et As(III).	59
Fig. 25 – Arsenic total en sortie de bioréacteur au cours de l'expérience 2 avec alimentation séparée en Fe(II) et As(III).....	60
Fig. 26 – Influence de la concentration en oxygène dans le bioréacteur sur les taux d'oxydation du FeII et de l'AsIII. Résultats obtenus lors de l'expérience 2, à partir du 20 ^e jour de traitement.....	60
Fig. 27 – Expérience sur site, évolution de la concentration en arsenic dans l'exhaure et en sortie des bioréacteurs. A : As(III) ; B : As total.	62
Fig. 28 – Expérience sur site, évolution de la concentration en Fe(II) dans l'exhaure et en sortie des bioréacteurs.....	63
Fig. 29 – Expérience sur site, évolution du potentiel redox (ref. Ag/AgCl) de l'exhaure et en sortie des bioréacteurs.....	63
Fig. 30 – Expérience sur site, évolution du pH de l'exhaure et en sortie des bioréacteurs.....	64
Fig. 31 – Réacteur de bio-oxydation/filtration.....	68

Liste des tableaux

Tabl. 1 – Composition de l'exhaure de Loperec (29 janvier 2001).	14
Tabl. 2 – Compositions de l'effluent réel et de l'effluent synthétique reconstitué.	20
Tabl. 3 – Résultat de l'étape 1 de sélection de souches bactériennes, cultures sur milieu L à 10 mg l ⁻¹ d'As(III)	25
Tabl. 4 – Résultat de l'étape 1 de sélection de souches bactériennes, cultures sur milieu B à 100 mg l ⁻¹ d'As(III)	26
Tabl. 5 – Résultat de l'étape 1 de sélection de souches bactériennes, cultures sur milieu C à 100 mg l ⁻¹ d'As(III)	26
Tabl. 6 – Aspect des colonies obtenues sur milieu solide par étalement des cultures obtenues sur milieu L (Loperec As 10 mg l ⁻¹).	27
Tabl. 7 - Résultat des ensemencements de L4-2 P et L4-2 G sur différents milieux : dosage final de l'As(V).	27
Tabl. 8 - Composants utilisés pour l'effluent synthétique.	39
Tabl. 9 – Elimination du fer et de l'arsenic dans une colonne de pouzzolane de 2 litres dans différentes conditions opératoires.	54
Tabl. 10 – Comparaison de vitesses d'oxydation de l'As(III) obtenues dans différentes conditions expérimentales.	65

Liste des photos

Photo 1 – Observation au MEB de la pouzzolane prélevée dans la colonne de 2 litres en fin d'expérience : tapis bactérien avec bâtonnets.	46
Photo 2 – Observation au MEB de la pouzzolane témoin non soumise au traitement dans la colonne.	47
Photo 3 – Observation au MEB de la pouzzolane prélevée dans la colonne de 2 litres en fin d'expérience : réseau de mucus bactérien.	48
Photo 4 – Bactéries enveloppées dans du mucus à la surface de la pouzzolane colonisée.	48

Annexes

Annexe 1 - Identification de la souche L4.2	75
Annexe 2 - Calculs préliminaires pour le dimensionnement d'un circuit de piégeage de l'arsenic	81

1. Introduction

L'arsenic est un métalloïde toxique fréquemment associé aux sulfures dans les formations géologiques et souvent utilisé de ce fait comme marqueur géochimique de nombreuses minéralisations. Il est donc très souvent présent dans les résidus et les effluents miniers. Le rejet d'eaux chargées en arsenic par de nombreux sites miniers participe à la dispersion de ce métalloïde et à la contamination des eaux souterraines, de surface, et des sédiments. Le présent rapport présente des travaux réalisés par le BRGM dans le cadre du projet de recherche Drainages Miniers (02RESR04) et avec le soutien de BRGM-SA. Cette étude a été focalisée sur le processus d'oxydation de l'As(III) dans l'eau issue de la galerie d'exploration minière de Loperec (Finistère).

Dans la plupart des pays, la concentration maximale autorisée dans les eaux destinées à la consommation humaine a été abaissée à 10-20 $\mu\text{g l}^{-1}$. Les technologies de traitement de l'eau doivent donc être adaptées à ces nouvelles normes. Le coût d'une diminution de la concentration limite à 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ est estimé à 200 millions de dollars par an aux Etats-Unis et à quelques centaines de millions d'Euros en France. Dans ce contexte, la mise au point de procédés simples et peu coûteux pour l'élimination de l'arsenic serait extrêmement utile. Au-delà du problème posé par le traitement des eaux destinées à la consommation humaine, ces technologies permettraient de protéger les ressources en eau dans leur ensemble, en évitant le rejet d'eaux chargées en arsenic issues de sites miniers dont l'exploitation a souvent cessé.

Divers procédés sont disponibles, mais la plupart nécessitent une oxydation préalable de l'As(III) en As(V), forme de l'arsenic plus facilement immobilisée sous forme de déchet solide inerte que l'As(III). L'oxydation chimique de l'As(III) par l'oxygène est très lente, et les oxydants forts généralement utilisés induisent des coûts de traitement élevés. L'oxydation de l'As(III) par l' O_2 peut être catalysée biologiquement. Diverses bactéries possédant une activité enzymatique arsenite-oxydase ont été décrites, isolées d'environnements tels que les sols, les effluents, les déchets ou les drainages miniers. Une activité As(III)-oxydante « annexe » a été mise en évidence dans certains dispositifs de traitement d'eau, mais jusqu'à présent, l'oxydation biologique n'a jamais été prise en compte et optimisée en tant qu'étape à part entière d'un procédé. L'effluent de Loperec contient à la fois de l'arsenic sous forme As(III) et du fer, utile pour l'immobilisation de l'arsenic. L'oxydation de l'As(III) en As(V) devrait permettre d'améliorer l'efficacité du piégeage de l'arsenic par les précipités de fer. Le présent rapport rassemble les résultats des expériences réalisées entre janvier 2001 et décembre 2003, qui avaient pour objectif de mettre en évidence une activité bactérienne As(III)-oxydante sur le site de Loperec, de déterminer si les bactéries sont susceptibles de participer au traitement de l'eau qui s'écoule de l'ancienne galerie d'exploration et d'élaborer à partir de ces résultats un schéma de traitement passif de cet effluent.

2. Activité d'oxydation biologique dans des échantillons prélevés sur le site de Loperec

L'arsenic inorganique peut se trouver sous deux formes dans les eaux, l'As(III) ou l'As(V). L'As(III) est plus mobile et plus toxique que l'As(V). En effet, l'As(V) est une espèce chimique chargée négativement (H_2AsO_4^- ou HAsO_4^{2-}) à pH neutre : elle s'associe efficacement aux particules solides par adsorption ou co-précipitation, en particulier avec les particules de Fe(III). L'As(III) est une forme non chargée pour des pH inférieurs à 8 (H_3AsO_3), beaucoup plus difficile à éliminer de façon complète d'une phase aqueuse. Pour cette raison, la plupart des procédés de traitement des eaux contenant de l'arsenic sous forme As(III) comportent une étape d'oxydation de l'As(III) en As(V).

Une mission sur le site de Loperec a été effectuée en janvier 2001. Des prélèvements et mesures ont été effectués à différents endroits, de la source de l'exhaure jusqu'au point de déversement dans la rivière. Les principales caractéristiques de l'eau ont été relevées, et l'activité biologique d'oxydation de l'arsenic a été recherchée dans divers échantillons.

2.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1.1. Caractéristiques de l'effluent

Le jour où les prélèvements microbiologiques ont été réalisés, les caractéristiques de l'exhaure étaient les suivantes :

- température 11,9 °C,
- pH 5,9,
- potentiel redox -33 mV,
- oxygène dissous, 0,45 mg l⁻¹(4%),
- As total, 1004 µg l⁻¹,
- As(III), 274 µg l⁻¹,
- As(V), 771 µg l⁻¹,
- Fe total 5 mg l⁻¹,
- Fe(II) 5 mg l⁻¹.

Les concentrations en d'autres composants de l'exhaure le 29 janvier 2001 sont donnés par le tableau 1. Cependant, la composition de l'exhaure subit des variations de composition au cours du temps.

2.1.2. Points de prélèvement

A la sortie de l'ancienne galerie, qui est aujourd'hui comblée, l'eau de résurgence est canalisée dans un bassin. A la sortie du bassin, elle s'écoule dans une canalisation enterrée jusqu'à un fossé avant de rejoindre la rivière proche (la Doufine). Un regard cimenté permet de faire des prélèvements en un point situé sur le parcours de la canalisation enterrée. L'effluent subit deux dilutions : une dilution par des eaux de ruissellement, au niveau du regard, et une dilution dans le fossé longeant la route. Les points de prélèvements sont localisés schématiquement sur la figure 1.

Espèce chimique	Concentration
Ca	37,2 mg l ⁻¹
Mg	11,5 mg l ⁻¹
Na	16,7 mg l ⁻¹
K	2,1 mg l ⁻¹
HCO ₃	102 mg l ⁻¹
Cl	19 mg l ⁻¹
NO ₃	1,3 mg l ⁻¹
NO ₂	0,12 mg l ⁻¹
SO ₄	53 mg l ⁻¹
PO ₄	0,1 mg l ⁻¹
F	0,1 mg l ⁻¹
SiO ₂	17,1 mg l ⁻¹
Sr	0,12 mg l ⁻¹
Ni	23 µg l ⁻¹
Zn	18 µg l ⁻¹
Ba	17 µg l ⁻¹
Co	6 µg l ⁻¹

Tabl. 1 – Composition de l'exhaure de Loperec (29 janvier 2001).

Les échantillons d'eau ou de solide suivants ont été prélevés dans des flacons stériles :

- de l'eau de résurgence,
- de l'eau du bassin,
- des dépôts de solide à la surface des blocs rocheux détrempés par la résurgence,
- des sédiments du fond du bassin,
- des dépôts de solide déposés à la surface des plantes aquatiques immergées dans l'eau du bassin,
- de l'eau de l'exhaure prélevée dans le flux à l'intérieur du tuyau,

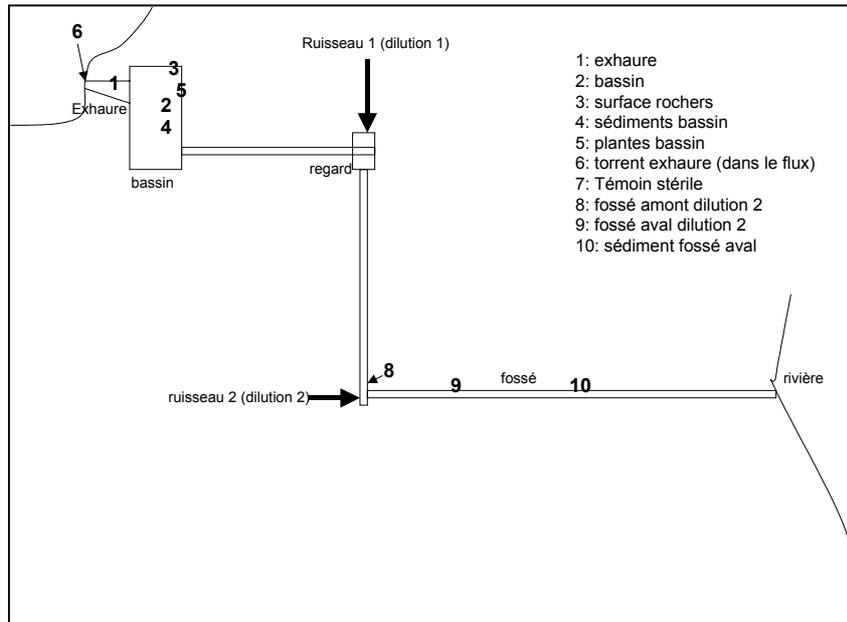


Fig. 1 – Représentation schématique du site avec localisation des points de prélèvement microbiologiques.

- de l'eau du fossé avant dilution avec le ruisseau qui longe la route,
- de l'eau du fossé après dilution avec le ruisseau qui longe la route,
- des sédiments déposés au fond du fossé qui longe la route.

Les échantillons ont été conservés au frais dans une glacière, puis au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation pour les tests d'activité As(III)-oxydante.

2.1.3. Estimation de l'activité As(III)-oxydante

L'activité bactérienne As(III)-oxydante a été évaluée dans chacun des échantillons prélevés sur le site. Chaque erlenmeyer stérile a reçu 90 ml de milieu de culture autotrophe (sans source de carbone ou d'énergie organique) stérile, contenant 100 mg l^{-1} d'As(III). La composition du milieu de culture est détaillée dans Battaglia-Brunet *et al.* (2002) et en annexe 3 de Baranger *et al.* (2003).

Chaque erlenmeyer a été incubé en condition aérobie et sous agitation, à $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Un erlenmeyer témoin non inoculé a été incubé dans les mêmes conditions. Un prélèvement était effectué quotidiennement dans chaque erlenmeyer pour analyser l'As(V) et l'As total. Cette analyse a été réalisée suivant la méthode d'extraction de l'As(III) par la pyrrolidine dithio-carbamate dans le méthyl-isobutyl-cétone, puis analyse de l'As(V) et de l'As total par spectrométrie d'absorption atomique flamme (méthode détaillée dans Battaglia-Brunet *et al.*, 2002).

2.2. RÉSULTATS

L'évolution de la concentration en As(V) dans les erlenmeyers inoculés avec les échantillons de Loperec est donnée par la figure 2. Une activité As(III)-oxydante a été détectée dans tous les échantillons analysés. L'arsenic n'est resté sous forme As(III) que dans l'erlenmeyer témoin non inoculé.

Les échantillons peuvent être classés en 4 groupes suivant la durée de la « phase de latence » de l'activité biologique As(III)-oxydante :

- Groupe 1 : latence 1 jour. Suspension des sédiments (boue rouge) de la surface des rochers proches de l'exhaure, et des sédiments du fond du bassin (prélèvements 3 et 4).
- Groupe 2 : latence 3 jours. Eau du fossé en amont de la dilution 2, et suspension des sédiments (boue rouge) du fond du fossé en aval de la dilution 2 (prélèvements 8 et 10).
- Groupe 3 : latence 4 jours. Eau du bassin, dépôt à la surface des plantes (joncs) du bassin, et eau du fossé en aval de la dilution 2 (prélèvements 2, 5 et 9).
- Groupe 4 : latence 5 jours. Eau de l'exhaure coulant vers le bassin et eau de l'exhaure prélevée dans le flux à la sortie du tuyau (prélèvements 1 et 6).

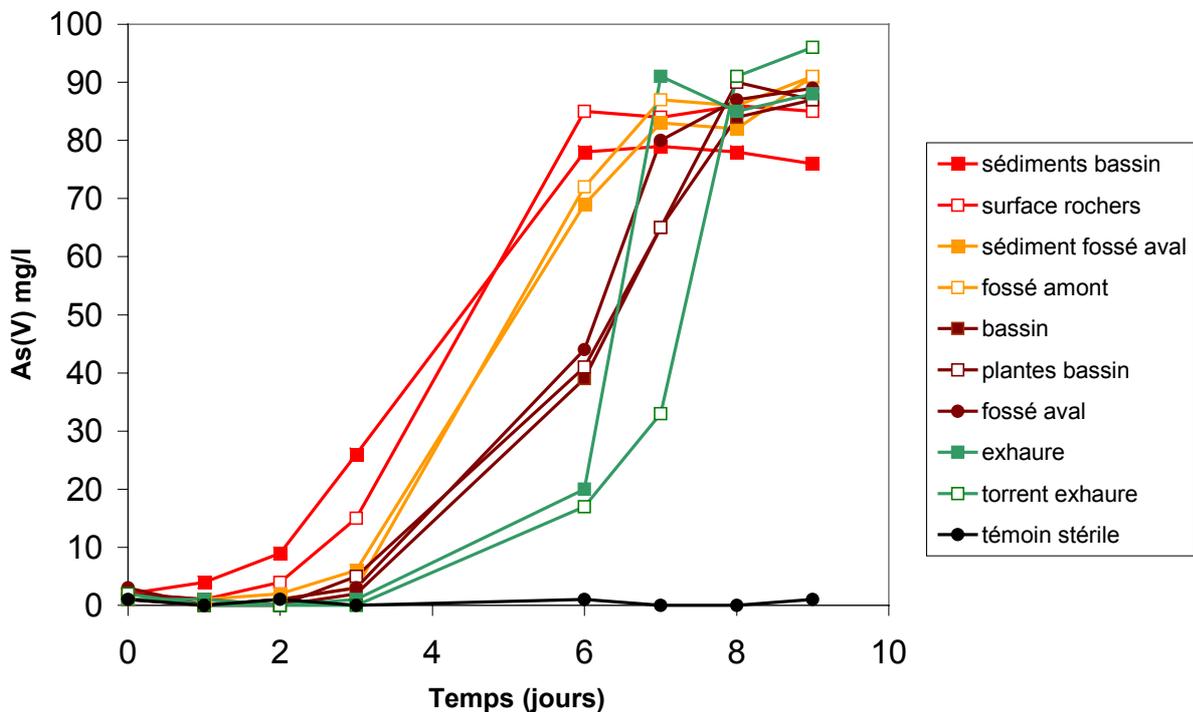


Fig. 2 – Activité As(III)-oxydante dans les échantillons prélevés sur le site de Loperec.

Des bactéries As(III)-oxydantes sont donc présentes à tous les niveaux du trajet de l'eau, entre l'exhaure et le point de rejet. Elles sont déjà détectées dans l'eau à la sortie de la galerie, mais en moins grande concentration que dans les échantillons prélevés en aval. Les échantillons les plus riches en bactéries As(III)-oxydantes actives sont les sédiments d'hydroxydes de fer déposés au niveau du bassin. Les bactéries ont tendance à se fixer sur les particules solides. Il n'est donc pas étonnant que les sédiments déposés à la sortie de l'exhaure, c'est-à-dire à l'endroit où l'As(III) est le plus abondant, présentent une activité biologique As(III)-oxydante élevée.

Cette première expérience a montré que des bactéries susceptibles de faciliter l'élimination de l'arsenic présent dans l'eau, et ne nécessitant pas un apport de substrat organique, sont naturellement présentes sur le site de Loperec. Cependant, les tests d'activité As(III)-oxydante ont été réalisés dans des conditions différentes de celles du site. La concentration en As(III) dans le milieu de culture était 200 fois plus élevée que dans l'exhaure, la température d'incubation était plus élevée que celle de l'exhaure, et des nutriments inorganiques (ammonium, phosphate, potassium, magnésium) étaient apportés en concentrations élevées. Il est nécessaire d'étudier les bactéries dans des conditions plus proches de celles du site, afin de déterminer si ces organismes pourraient jouer un rôle dans un procédé simple de traitement d'eau.

3. Enrichissements en bactéries As(III)-oxydantes

Cette expérience avait deux objectifs :

- vérifier que l'oxydation biologique de l'arsenic peut être réalisée sans ajout de nutriments et à la température du site ;
- isoler des souches bactériennes As(III)-oxydantes issues du site de Loperec.

Des réacteurs contenant une solution synthétique dont la composition était la plus proche possible de l'effluent de Loperec, excepté pour le paramètre « concentration en arsenic », ont été inoculés avec un échantillon d'eau du site. Dans ce système, les bactéries capables d'oxyder l'arsenic dans les conditions du site, et d'utiliser l'As(III) comme source d'énergie, sont susceptibles de se développer préférentiellement aux autres organismes. Trois concentrations en arsenic ont été testées.

3.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1.1. Dispositif expérimental

Des réacteurs de 1 litre en verre, équipés d'une double enveloppe et d'une agitation magnétique, ont été utilisés (fig. 3). Ils étaient thermostatés à 12 °C à l'aide d'un cryostat. L'atmosphère, à l'intérieur des réacteurs, était équilibrée avec l'air ambiant à travers un bouchon de coton stérile. Un tube plongeant permettait de réaliser des prélèvements en conditions stériles, et servait à injecter de l'azote en début d'expérience.

3.1.2. Préparation de l'effluent synthétique

Les compositions de l'effluent réel et de l'effluent reconstitué sont données par le tableau 2. La solution de base comprenait tous les composants du milieu, sauf le carbonate, le fer et l'arsenic, qui ont été préparés et stérilisés séparément. La solution de base a été préparée et stérilisée par autoclavage directement dans le réacteur (790 ml). Le carbonate a été préparé dans un flacon sérum de 100 ml, dégazé à l'azote et autoclavé. Pour le fer ferreux, 10 ml d'eau ont été acidifiés à pH 2 et dégazés à l'azote.

La reconstitution de l'effluent a nécessité la préparation des solutions suivantes :

Solution de base, stérilisée dans le réacteur

- $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$, 105 mg,
- NaCl, 27 mg,

- Solution A, 9 ml,
- Eau déminéralisée qsp 790 ml.

Solution A, utilisée pour préparer la solution de base, par litre

- KCl, 180 mg,
- KNO₃, 190 mg,
- K₂HPO₄, 16 mg,
- KNO₂, 20 mg,
- NaF, 20 mg,
- MnSO₄, H₂O, 280 mg.

Solution B de carbonate, préparée dans 100 ml d'eau dégazée à l'azote

- CaCO₃, 84 mg,
- NaHCO₃, 16 mg,
- Stérilisation par autoclavage.

Solution C de fer ferreux

- FeSO₄, 7 H₂O, 20 mg,
- Qsp 10 ml d'eau acidifiée à pH 2,5 avec H₂SO₄ et dégazée à l'azote,
- Stérilisation par filtration juste avant ajout dans le réacteur.

Composition de l'effluent				
Produits	mg l⁻¹	Composants	synthétique mg l⁻¹	réel mg l⁻¹
CaCO ₃	92,90	Ca	37,2	37,2
MgSO ₄ , 7H ₂ O	116,60	Mg	11,5	11,5
NaCl	30,00	Na	16,82	16,7
NaHCO ₃	17,90	K	2,10	2,1
KCL	2,09	HCO₃	68,48	102
KNO ₃	2,12	Cl	19,22	19,0
K ₂ HPO ₄	0,18	NO₃	1,3	1,3
KNO ₂	0,22	SO₄	54,72	53,0
NaF	0,22	PO₄	0,1	0,1
FeSO ₄ , 7H ₂ O	21,84	NO₂	0,12	0,12
MnSO ₄ , 1H ₂ O	3,11	F	0,1	0,1
		Fe	4,4	5
		Mn	1,011	1,011
		SiO₂	0	17,1

Tabl. 2 – Compositions de l'effluent réel et de l'effluent synthétique reconstitué.

Après autoclavage, 100 ml de solution B stérile ont été ajoutés aux 790 ml de solution de base stérile. L'opération a été effectuée quand les solutions sortent de l'autoclave et sont encore chaudes. De l'azote était injecté dans le réacteur pendant 1 heure, puis la thermostatisation était mise en route. Dès que la température était équilibrée à 12 °C, 10 ml de fer et l'arsenic ont été injectés sous forme de solutions concentrées à 10 g l⁻¹ d'As(III) et As(V). Le pH a été ajusté à 6 avec NaOH 1 M stérile ou H₂SO₄ 0,5 M stérile.

3.1.3. Inoculation

Un échantillon de 1 litre d'eau issue du bassin de Loperec, situé immédiatement en aval de l'exhaure, a été prélevé dans un récipient stérile. Il a été conservé au réfrigérateur (5 °C) jusqu'à utilisation. Chaque réacteur a été inoculé avec 100 ml de cette eau.

3.1.4. Suivi des réacteurs

Un premier prélèvement de 5 ml a été effectué immédiatement après inoculation pour analyser l'arsenic. Par la suite, des prélèvements ont été effectués 2 fois par jour dans les réacteurs pour analyser l'arsenic. Les spéciations As(III)/As(V) ont été effectuées par extraction à la pyrrolidine dithiocarbamate/méthyl-isobutylcétone et analyse en spectrophotométrie d'absorption atomique flamme (Varian Spectra 220Z) pour les concentrations supérieures à 10 mg l⁻¹, et par séparation sur résine anionique (BIORAD AG 1 x 8 – 50-100 mesh) puis absorption atomique four pour les concentrations inférieures à 10 mg l⁻¹.

Des comptages de bactéries ont été effectués au microscope optique (grossissement 400) sur cellule de Thoma.

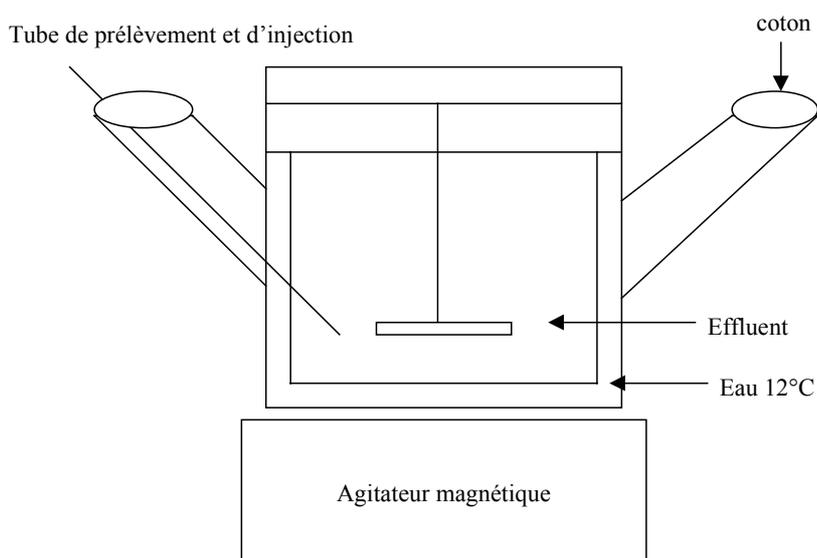


Fig. 3 – Schéma du type de réacteur utilisé pour les expériences d'enrichissement en bactéries As(III)-oxydantes.

3.1.5. Sélection et isolement de souches bactériennes

En fin d'expérience, des étalements sur milieu solide ont été effectués sur le milieu CSM (milieu sélectif pour CAsO1, Battaglia-Brunet *et al.*, 2002), additionné de 15 g l⁻¹ d'agar, 0,2 g l⁻¹ d'extrait de levure, et 1 mM (0,136 g l⁻¹) de thiosulfate de sodium. Les boîtes de Petri ont été incubées 2 semaines à 12 °C.

Les colonies obtenues par cette méthode ont été prélevées et remises en cultures dans les 3 milieux liquides suivants :

- Milieu **L** : « Loperec », c'est-à-dire de l'effluent synthétique de Loperec additionné de 10 mg l⁻¹ d'As(III) ;
- Milieu **B** : CSM additionné de 0,2 g l⁻¹ d'extrait de levure, 1 mM de thiosulfate de sodium, et contenant 100 mg l⁻¹ d'As(III) ;
- Milieu **C** : CSM contenant 100 mg l⁻¹ d'As(III).

Chaque colonie a été dispersée dans 20 ml de milieu liquide stérile. Après deux semaines d'incubation à 12 °C, des prélèvements ont été effectués dans chaque culture pour estimer la capacité des souches à oxyder l'As(III) par une analyse d'As(V).

La seule souche dont l'activité As(III)-oxydante ait été confirmée a été isolée par 4 repiquages successifs dans du milieu B solide (15 g l⁻¹ d'agar) et liquide. Après cette étape de purification, la souche a été envoyée à la DSMZ (banque de souches allemande) pour être identifiée par des tests microbiologiques, biochimiques et par biologie moléculaire.

3.2. RÉSULTATS

3.2.1. Concentration initiale en As(III) inférieure à 10 mg l⁻¹

Le réacteur 1 contenait initialement 3 mg l⁻¹ d'arsenic total, dont 1 mg l⁻¹ d'As(III). Ces concentrations sont 2 à 3 fois supérieures à celles de l'exhaure réel (fig. 4).

La répartition As(III)/As(V) est restée stable pendant les 2 premiers jours, puis la concentration en As(III) a commencé à chuter. A partir du 5^e jour d'expérience, de l'As(III) a été ajouté dans le réacteur à raison de 0,5 mg l⁻¹ par jour. L'oxydation de l'As(III) s'est accélérée après 200 heures d'expérience. Une panne du cryothermostat a entraîné une augmentation de la température du système pendant 10 heures, le douzième jour. Cependant, le développement de l'activité biologique d'oxydation de l'As(III) est antérieur à cet incident. Les bactéries présentes dans l'eau du site sont donc capables d'oxyder l'arsenic à 12 °C et sans ajout de nutriments. Cependant, dans des conditions « batch » et sans aération (simple diffusion de l'air à travers le coton), cette activité bactérienne demeure en état de latence pendant environ 4 jours.

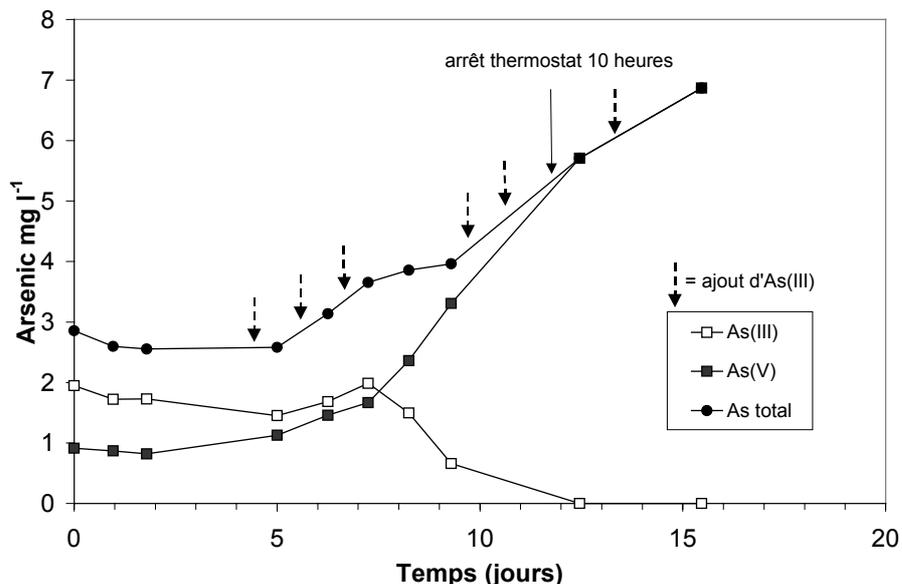


Fig. 4 – Enrichissement en bactéries As(III)-oxydantes, réacteur 1 : concentration en As(III) inférieure à 10 mg l^{-1} .

3.2.2. Concentration initiale en As(III) égale à 10 mg l^{-1}

Le réacteur 2 contenait à $9,5 \text{ mg l}^{-1}$ d'As(III), soit environ 20 fois plus que la concentration de l'exhaure, dès la mise en route de l'expérience (fig. 5). L'oxydation démarre après deux jours de latence, et tout l'arsenic est sous forme As(V) après 300 heures d'incubation à 12°C . Les bactéries du site de Loperec sont donc capables d'oxyder 10 mg l^{-1} d'As(III) sans nutriments ajoutés et à 12°C .

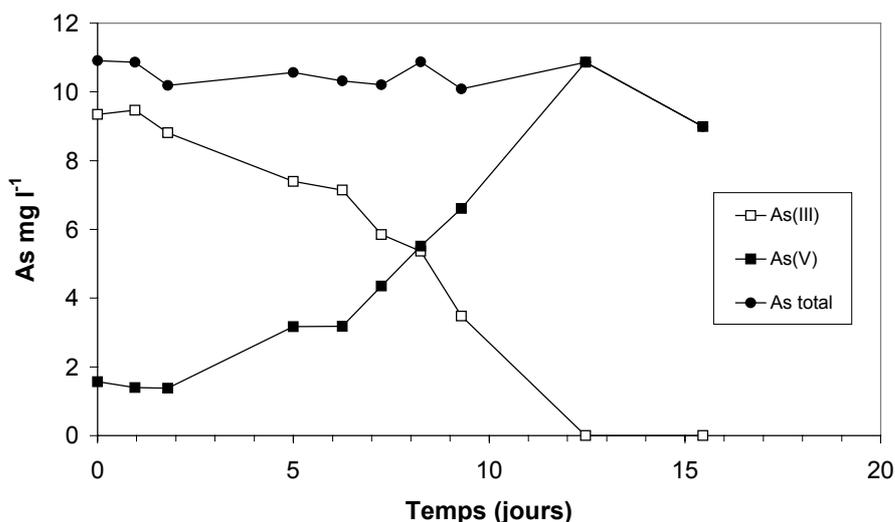


Fig. 5 – Enrichissement en bactéries As(III)-oxydantes, réacteur 2 : concentration initiale en As(III) égale à 10 mg l^{-1} .

3.2.3. Concentration initiale en As(III) égale à 100 mg l⁻¹

Le réacteur 3 contenait initialement 95 mg l⁻¹ d'arsenic sous forme As(III), soit environ 200 fois la concentration de l'exhaure. L'oxydation démarre après 2 jours de latence (fig. 6) et s'accélère après 200 heures (8 jours). Pour une concentration initiale en As(III) équivalente, l'oxydation de l'As(III) est beaucoup plus lente qu'à 25 °C et en présence de nutriments (cf. chapitre 2.2).

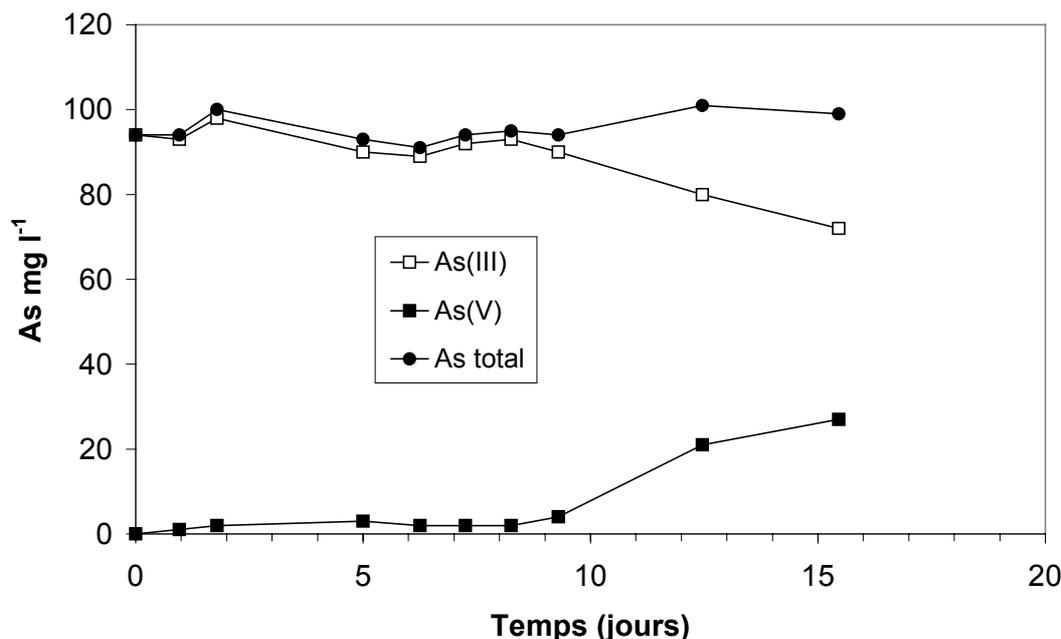


Fig. 6 - Enrichissement en bactéries As(III)-oxydantes, réacteur 3 : concentration initiale en As(III) égale à 100 mg l⁻¹.

3.2.4. Cinétique

Lors des tests d'activités en conditions « optimales », la vitesse d'oxydation de l'As(III) par les bactéries prélevées dans le bassin s'élevait à 1,5 mg l⁻¹ h⁻¹. Dans le réacteur 3, à 12 °C, sans nutriments ajoutés et en condition d'aération limitée, la vitesse atteint 0,12 mg l⁻¹ h⁻¹. Cette valeur est supérieure à celle obtenue dans les réacteurs 1 (0,033 mg l⁻¹ h⁻¹) et 2 (0,045 mg l⁻¹ h⁻¹). En fin d'expérience, la concentration en bactéries libres en suspension (dénombrées au microscope optique) est du même ordre de grandeur dans les réacteurs 1, 2 et 3. Elle est comprise entre 4 et 6 x 10⁶ bactéries par ml.

Les expériences en réacteurs ont montré que les bactéries présentes à Loperec sont capables d'oxyder l'As(III) dans les conditions du site. La vitesse d'oxydation augmente avec la concentration en As(III).

3.2.5. Sélection et identification de bactéries As(III)-oxydantes

En fin d'expérience, des boîtes de milieu gélosé ont été inoculées avec des échantillons prélevés dans chacun des réacteurs. Des colonies de types divers se sont développées sur le milieu solide au cours des 2 semaines d'incubation à 12 °C. Chaque type de colonie a été utilisé pour inoculer trois types de milieux liquides contenant de l'arsenic, et ces cultures ont été elles-mêmes incubées à 12 °C pendant deux semaines. L'As(V) a été analysé en fin d'incubation. Les résultats de cette étape de sélection de souches bactériennes sont récapitulés dans les tableaux 3, 4 et 5. Les cultures ont été nommées de la façon suivante : une lettre, L, B ou C, qui correspond au milieu de culture utilisé (cf. chapitre 3.1.5), un premier chiffre qui correspond au numéro de la colonie prélevée sur milieu solide, et un troisième chiffre qui correspond au N° du réacteur à partir duquel la colonie a été isolée. La culture L1-1 est donc la culture obtenue par repiquage sur milieu L de la première colonie prélevée sur une boîte inoculée avec un échantillon du réacteur 1.

La croissance dans chaque culture a été estimée qualitativement par observation au microscope optique. L'échelle qualitative va de (-), lorsque aucune ou seulement quelques bactéries sont visibles sur un champ du microscope, jusqu'à (+++) pour une culture abondante en bactéries.

Une seule culture, nommée L4-2, a oxydé l'As(III) présent dans le milieu. L'étape de sélection a porté sur 16 colonies en tout. Ce résultat montre qu'une faible proportion des bactéries cultivables, présentes dans la population Loperec, possède une activité As(III)-oxydante. Ce résultat est étonnant, car dans les réacteurs, une pression de sélection destinée à enrichir la population bactérienne en organismes oxydant l'As(III) a été exercée. De plus, la densité bactérienne finale ne semble pas liée à l'oxydation de l'arsenic. En effet, les cultures les plus riches en bactéries en fin d'incubation n'ont pas oxydé l'arsenic. Aucune des colonies obtenues à partir des échantillons issus des réacteurs 1 et 3 n'a oxydé l'arsenic. Cependant, des bactéries As(III)-oxydantes étaient bien présentes dans les réacteurs. Ce résultat suggère que les organismes capables d'oxyder l'As(III) dans la population de Loperec se développent mal ou pas du tout (organismes non cultivables) sur milieu solide, ou bien qu'ils sont peu abondants par rapport aux bactéries qui n'oxydent pas l'arsenic. Dans ce cas, il aurait été nécessaire de tester davantage de colonies pour les détecter.

Cultures	Croissance	As(III) ppm	As(V) ppm	oxydation
L1-1	+	10,22	0,31	-
L2-1	+++	9,21	0,22	-
L3-1	+	9,59	0,25	-
L4-2	+/-	0,00	10,00	100 %
L5-2	-	10,01	0,24	-
L6-2	+++	9,7	0,19	-
L7-2	+/-	9,37	0,23	-
L8-3	-	10,25	0,23	-

Tabl. 3 – Résultat de l'étape 1 de sélection de souches bactériennes, cultures sur milieu L à 10 mg l⁻¹ d'As(III).

Echantillon	Croissance	As(III) ppm	As(V) ppm	oxydation
B1-1	-	111	0	-
B2-2	+	109	0	-
B3-3	-+	109	1	-
B4-3	++	111	1	-

Tabl. 4 – Résultat de l'étape 1 de sélection de souches bactériennes, cultures sur milieu B à 100 mg l^{-1} d'As(III).

Echantillon	Croissance	As(III)	As(V)	oxydation
C1-1	-	109	1	-
C2-2	-	109	0	-
C3-3	-	109	1	-
C4-3	++	108	0	-

Tabl. 5 – Résultat de l'étape 1 de sélection de souches bactériennes, cultures sur milieu C à 100 mg l^{-1} d'As(III).

Afin de vérifier ce résultat, toutes les cultures qui se sont développées dans le milieu L ont été de nouveau étalées sur milieu solide, soit L1-1, L2-1, L3-1, L4-2, L6-2 et L7-2 (L5-2 et L8-3 ont été éliminées car elles n'ont pas poussé du tout). Après deux semaines d'incubation, l'aspect des colonies obtenues a été observé (tabl. 6). Cette étape a montré que la culture L4-2 n'était pas pure, car deux types de colonies se sont développés sur le milieu solide. Toutes les colonies obtenues lors de cette étape ont été remises en suspension dans les milieux L, B et C liquides. Les cultures L1-1, L2-1, L3-1, L6-2 et L7-2 n'ont pas oxydé l'As(III). Les résultats obtenus avec les deux types de colonies de la culture L4-2 sont donnés dans le tableau 7. Seule la souche formant des petites colonies, nommée L4-2 P, oxyde l'arsenic dans tous les milieux de culture testés.

La souche L4-2 P possède la capacité d'oxyder l'arsenic. La souche L4-2 G n'oxyde pas l'arsenic (elle a pourtant bien poussé sur le milieu B). La souche L4-2 P a été purifiée par repiquages successifs sur milieu liquide et solide, puis envoyée à la DSMZ pour identification. Cette bactérie est apparentée à *Variovorax paradoxus*. Les résultats détaillés de cette identification sont donnés en annexe 1. La capacité de cette espèce bactérienne à oxyder l'As(III) n'a pas encore été citée dans la littérature. *V. paradoxus* se trouve généralement dans des sols ou les eaux (Russel *et al.*, 1998 ; Leadbetter et Greenberg, 2000). Diverses souches de *V. paradoxus* sont capables de se développer en autotrophie sur $\text{H}_2 + \text{CO}_2 + \text{O}_2$ (Davis *et al.*, 1969), de dégrader des bio-plastiques (Sumaya *et al.*, 1998), des pesticides (Fisher *et al.*, 1978), ou d'accumuler de l'yttrium (Kamijo *et al.*, 1998).

L1-1	Colonies beiges opaques moyennes
L2-1	Colonies beiges translucides moyennes
L3-1	Colonies blanches opaques grosses
L4-2 P	Colonies beiges translucides très petites avec halo
L4-2 G	Colonies blanches opaques grosses
L6-2	Colonies beiges translucides moyennes
L7-2	Colonies beiges opaques moyennes

Tabl. 6 - Aspect des colonies obtenues sur milieu solide par étalement des cultures obtenues sur milieu L (Loperec As 10 mg l^{-1}).

	L4-2 P, mg l^{-1} d'As(V) et % d'oxydation	L4-2 G, mg l^{-1} d'As(V)
L 10 mg l^{-1} d'As(III)	8 (80%)	0
B 100 mg l^{-1} d'As(III)	106 (100%)	1
C 10 mg l^{-1} d'As(III)	8 (80%)	1
C 100 mg l^{-1} d'As(III)	59 (59%)	0

Tabl. 7 - Résultat des ensemencements de L4-2 P et L4-2 G sur différents milieux : dosage final de l'As(V).

3.2.6. Conclusion des essais d'enrichissement et d'isolement de bactéries As(III)-oxydantes

Les essais d'enrichissement en réacteur ont montré que des bactéries sont capables d'oxyder l'As(III) dans des conditions proches de celles du site. Ces bactéries sont difficilement cultivables sur milieu solide. Elles se développent en population mixte avec des organismes qui n'oxydent pas l'As(III). Un résultat comparable avait été obtenu lors de l'étude de la population mixte As(III)-oxydante CAsO1, issue du site de Cheni (Baranger *et al.*, 2003). L'organisme responsable de l'oxydation de l'As(III) dans la population CAsO1 n'a pu être isolé en tant que souche pure qu'après de nombreuses difficultés, car il se développe lentement sur milieu solide, formant des colonies très petites (Battaglia-Brunet *et al.*, 2002). A partir des réacteurs d'enrichissement inoculés avec l'eau de Loperec, une seule souche pure oxydant l'As(III) a été isolée à $12 \text{ }^\circ\text{C}$. Elle semble mieux oxyder l'arsenic dans un milieu contenant de l'extrait de levure et du thiosulfate que dans un milieu ne contenant que de l'As(III). Il sera intéressant de vérifier si elle est présente sur le site et dans les réacteurs de traitement de l'exhaure, par des méthodes de biologie moléculaire permettant de s'affranchir de l'étape d'isolement sur milieu solide.

4. Oxydation en continu : expériences en colonnes de 20 ml

Les expériences en erlenmeyer et en réacteurs ont montré que des bactéries As(III)-oxydantes sont présentes sur le site de Loperec. Cependant, il est difficile de déterminer si elles peuvent jouer un rôle dans l'oxydation de l'As(III) sur le site, car la teneur en As(III) de l'exhaure est très faible. Lors des essais batch en réacteurs, la vitesse d'oxydation tendait à diminuer avec la concentration en As(III). La présente expérience avait pour objectif de déterminer si les bactéries, concentrées sous forme d'un biofilm dans un réacteur colonne de type « lit fixe », peuvent participer à l'oxydation de l'As(III) dans les conditions du site.

4.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1.1. Dispositif expérimental

Les réacteurs étaient constitués de deux colonnes en verre de 20 ml, avec double enveloppe (fig. 7).

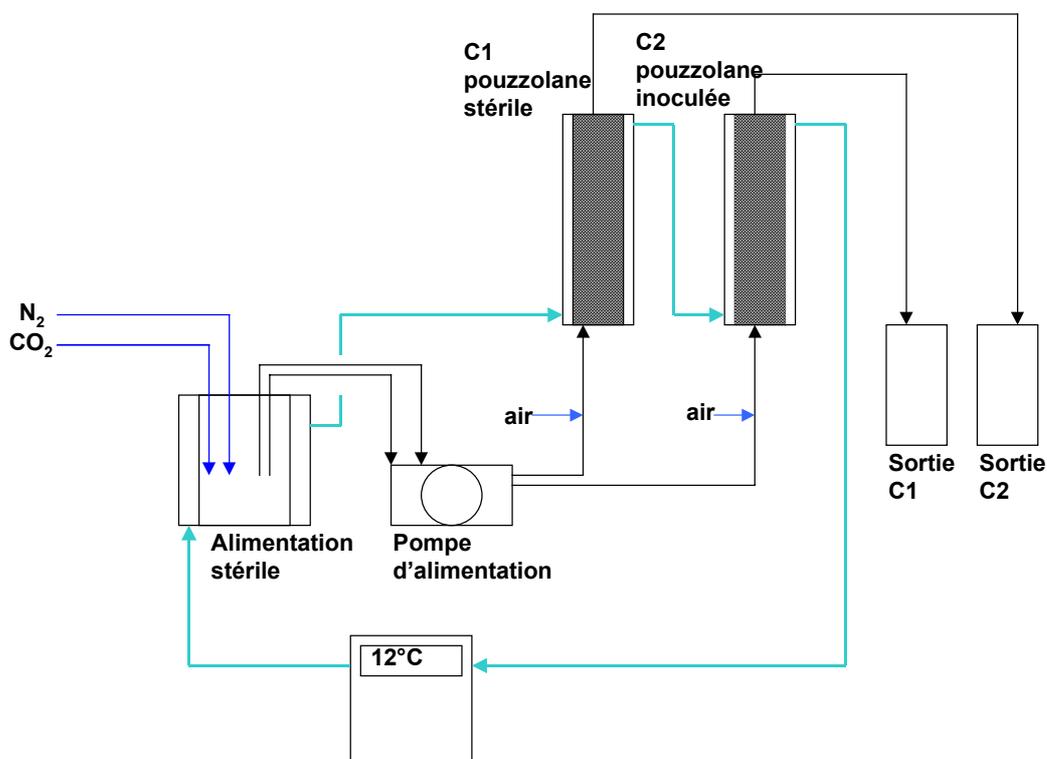


Fig. 7 – Expérience en continu en colonnes de 20 ml – schéma du dispositif expérimental.

Un réacteur a été inoculé, et l'autre, non inoculé, a servi de témoin stérile. Ces deux réacteurs ont été alimentés avec un effluent synthétique dont la composition se rapproche le plus possible de celle de l'effluent réel. Le réacteur d'alimentation ainsi que les deux colonnes étaient thermostatés à 12 °C. Les tuyaux véhiculant l'effluent du réacteur aux colonnes étaient maintenus en contact avec les tuyaux d'eau à 12 °C avec une enveloppe isolante. Chaque colonne a été remplie avec de la pouzzolane, pierre volcanique poreuse, qui est un matériau servant de support pour les bactéries. Les colonnes peuvent être alimentées en air stérile. Des débitmètres (Brooks, à bille) permettent d'injecter à la demande 1,3 l h⁻¹ d'air dans la colonne stérile (C1) et 1,4 l h⁻¹ d'air dans la colonne inoculée (C2).

Le volume utile de chaque colonne a été mesuré :

- volume utile de C1 sans air : 11,7 ml,
- volume utile de C2 sans air : 13,6 ml,
- avec air : volume utile estimé à 10 ml dans C1 et C2.

Tout le matériel en contact avec les fluides (gaz et solutions) a été stérilisé par autoclavage à 120 °C, pendant 20 minutes.

4.1.2. Préparation de l'effluent synthétique

L'effluent synthétique a été préparé de la façon décrite dans le chapitre 3.1.2. Un bullage d'azote permet de maintenir l'effluent synthétique en conditions anoxiques, et un bullage de CO₂ est utilisé pour réguler le pH.

4.1.3. Inoculation et suivi des colonnes

La colonne C2 a été inoculée en faisant percoler de l'effluent de Loperec pendant une nuit afin que les bactéries puissent se déposer sur la pouzzolane. Puis, après avoir mis de l'arsenic dans l'alimentation (50 µl d'As(III) + 50 µl d'As(V)), la colonne C2 a été alimentée pendant 30 minutes à un débit de 24 ml h⁻¹. Au préalable, un prélèvement d'inoculum a été réalisé afin de connaître la concentration en As(III) et As(V) du milieu. La colonne a été laissée en mode « batch », sans alimentation, pendant une nuit. Le lendemain les deux colonnes ont été alimentées en continu par l'exhaure reconstitué à un débit minimum de 4,8 ml h⁻¹. Trois débits ont été testés, 4,8, 16 et 23 ml h⁻¹, correspondant, pour un volume utile de 10 ml, à des temps de séjour de 2 h et 0,5 heure. Trois expériences **en continu** de une semaine chacune ont été menées successivement (avec le même dispositif expérimental en place, la pouzzolane n'a pas été remplacée entre deux expériences). Au cours de la première, le pH de l'effluent synthétique était compris entre 7 et 7,5. La deuxième expérience a été réalisée à pH compris entre 6 et 7, et la troisième à pH compris entre 5 et 6.

4.2. RÉSULTATS

4.2.1. Evolution des concentrations en As(III)

Au cours de la première expérience, une diminution de la concentration en As(III) à la sortie de la colonne inoculée est observée (fig. 8A). Par la suite et quelles que soient les conditions opératoires (fig. 8B et 8C), **la concentration en As(III) a toujours été nettement inférieure en sortie de colonne inoculée que dans l'effluent de la colonne stérile**. Pour un temps de résidence de 0,5 heure et un pH d'alimentation compris entre 6 et 7, la concentration en As(III) en sortie de colonne inoculée est inférieure à $50 \mu\text{g l}^{-1}$ (fig. 8B).

4.2.2. Evolution des concentrations en As(V)

La pouzzolane adsorbe de l'As(V) en début d'expérience : les teneurs en As(V) en sortie des deux colonnes sont très faibles (fig. 9A). Après 4 jours d'alimentation en continu, la concentration en As(V) en sortie de colonne inoculée augmente rapidement et dépasse la concentration en As(V) de l'alimentation. Ce phénomène correspond à l'établissement de l'activité bactérienne As(III)-oxydante, également révélée par la chute de la concentration en As(III) (fig. 8A). Dans l'effluent de la colonne stérile, la concentration en As(V) est équivalente à celle de l'alimentation à la fin de la première semaine d'expérience. Au cours de la seconde expérience (pH [6-7], fig. 9B), la concentration en As(V) chute au-dessous de $150 \mu\text{g l}^{-1}$ en sortie des deux colonnes, probablement à cause de la formation d'un dépôt d'hydroxyde de fer qui adsorbe de l'As(V). Lorsque le pH de l'alimentation est un peu plus faible (pH [5-6], fig. 9C), la concentration en As(V) augmente en sortie des deux colonnes. Ce phénomène pourrait être directement lié au pH, l'As(V) s'adsorbant moins efficacement, mais également à un taux d'oxydation du fer plus faible (fig. 10 C).

4.2.3. Oxydation du fer

L'oxydation du fer ferreux est complète dans les deux colonnes au cours de la première expérience (fig. 10A). **L'oxydation chimique du Fe(II) par l'oxygène est efficace, même en absence de bactéries**. La stérilité de C1 a été vérifiée par des observations au microscope. Au cours de l'expérience à pH [6-7] (fig. 10B), l'oxydation du fer ferreux est totale pour un temps de résidence de 2 heures, mais un peu de Fe(II) apparaît en sortie de colonne non inoculée lorsque le temps de résidence est diminué à 0,5 heure. Pour un pH de l'alimentation compris entre 5 et 6 (fig. 10C) et un temps de séjour de 0,5 heure, l'oxydation du Fe(II) est incomplète dans les deux colonnes. La vitesse de la réaction chimique d'oxydation du fer diminue avec le pH.

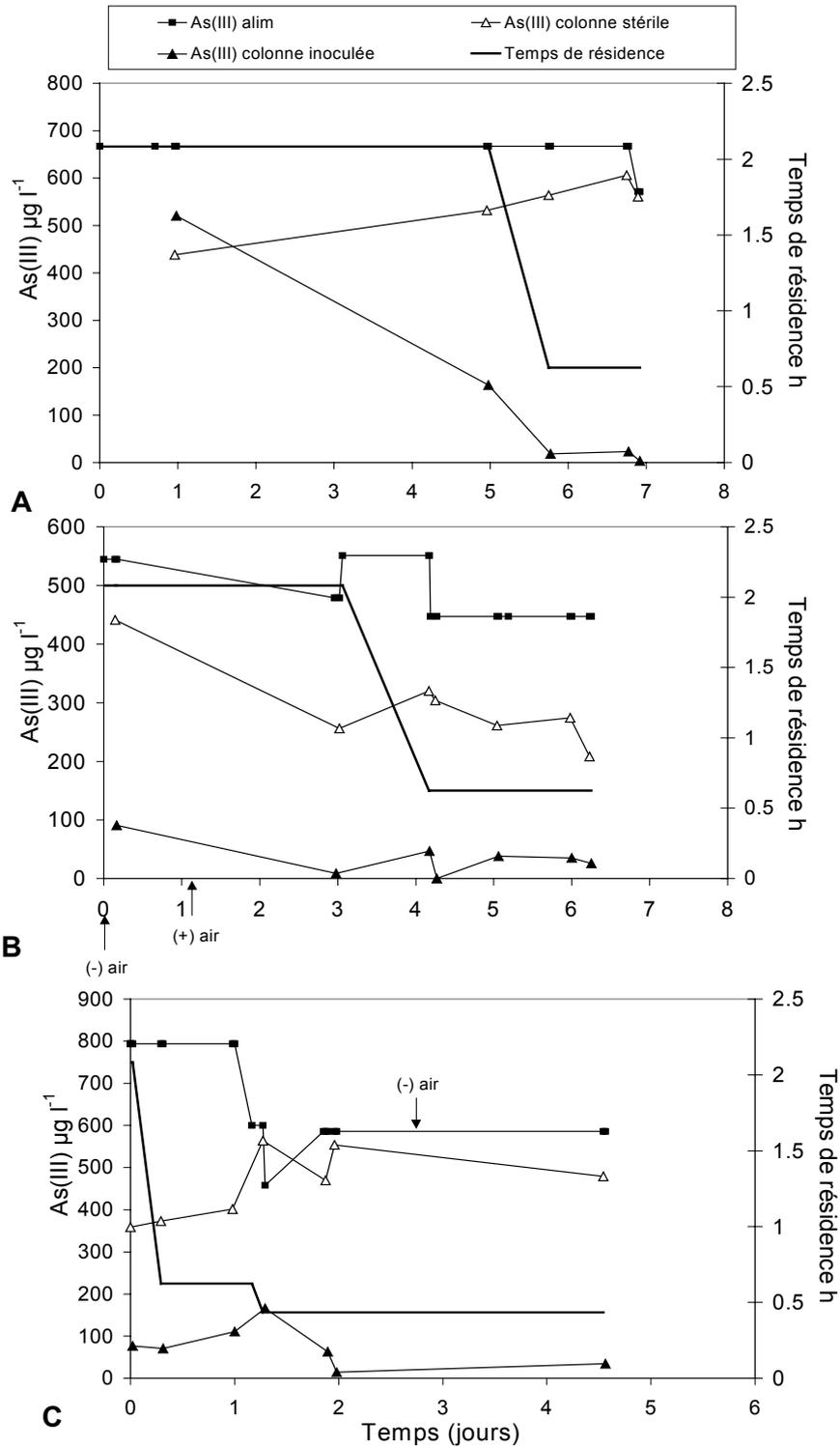


Fig. 8 – Expériences en continu en colonnes de 20 ml, évolution de la concentration en As(III).
 (A) : pH de l'alimentation entre 7 et 7,5 ; (B) pH de l'alimentation entre 6 et 7 ;
 (C) pH de l'alimentation entre 5 et 6.

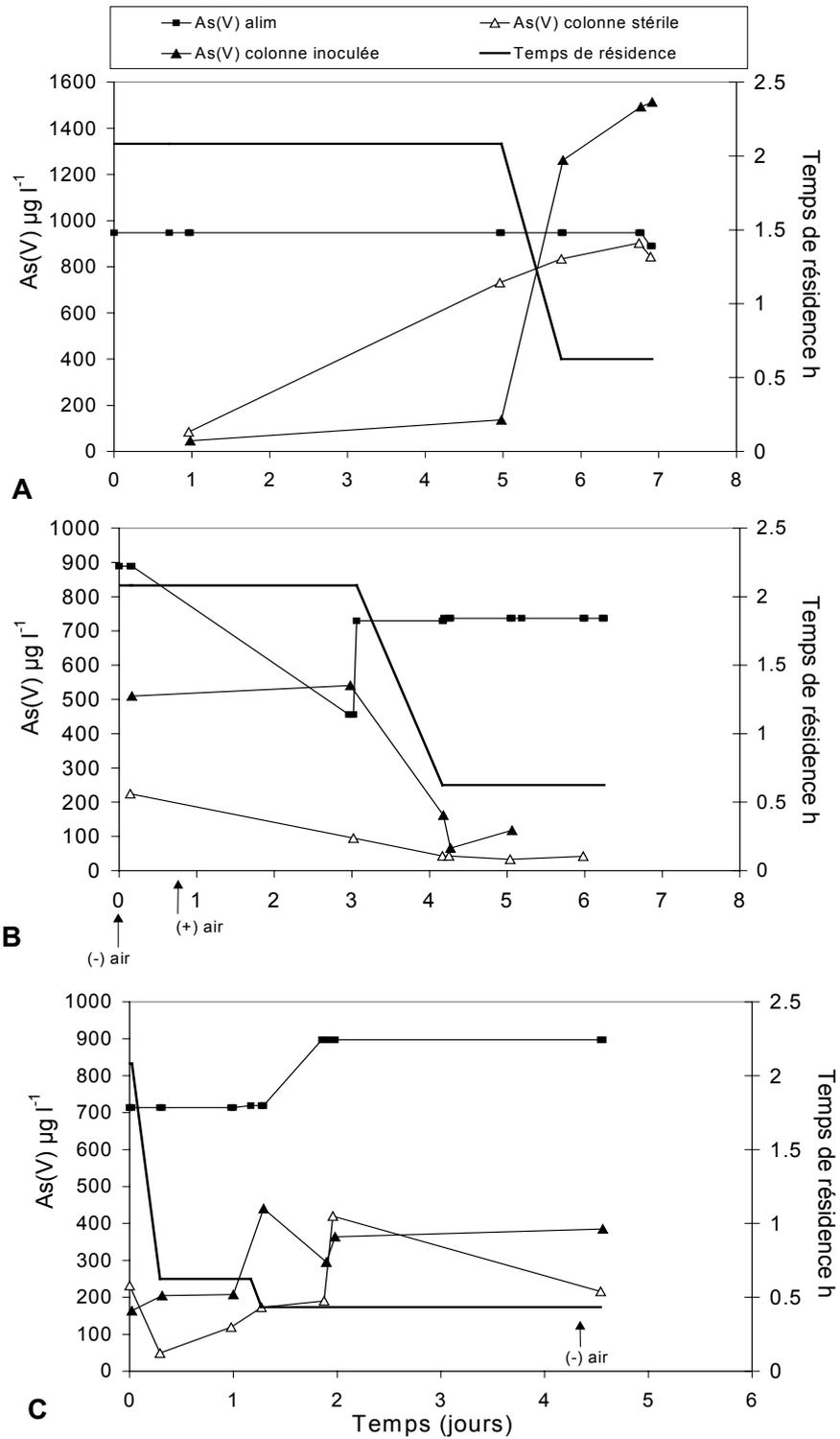


Fig. 9 – Expériences en continu en colonnes de 20 ml, évolution de la concentration en As(V).
 (A) : pH de l'alimentation entre 7 et 7,5 ; (B) pH de l'alimentation entre 6 et 7 ;
 (C) pH de l'alimentation entre 5 et 6.

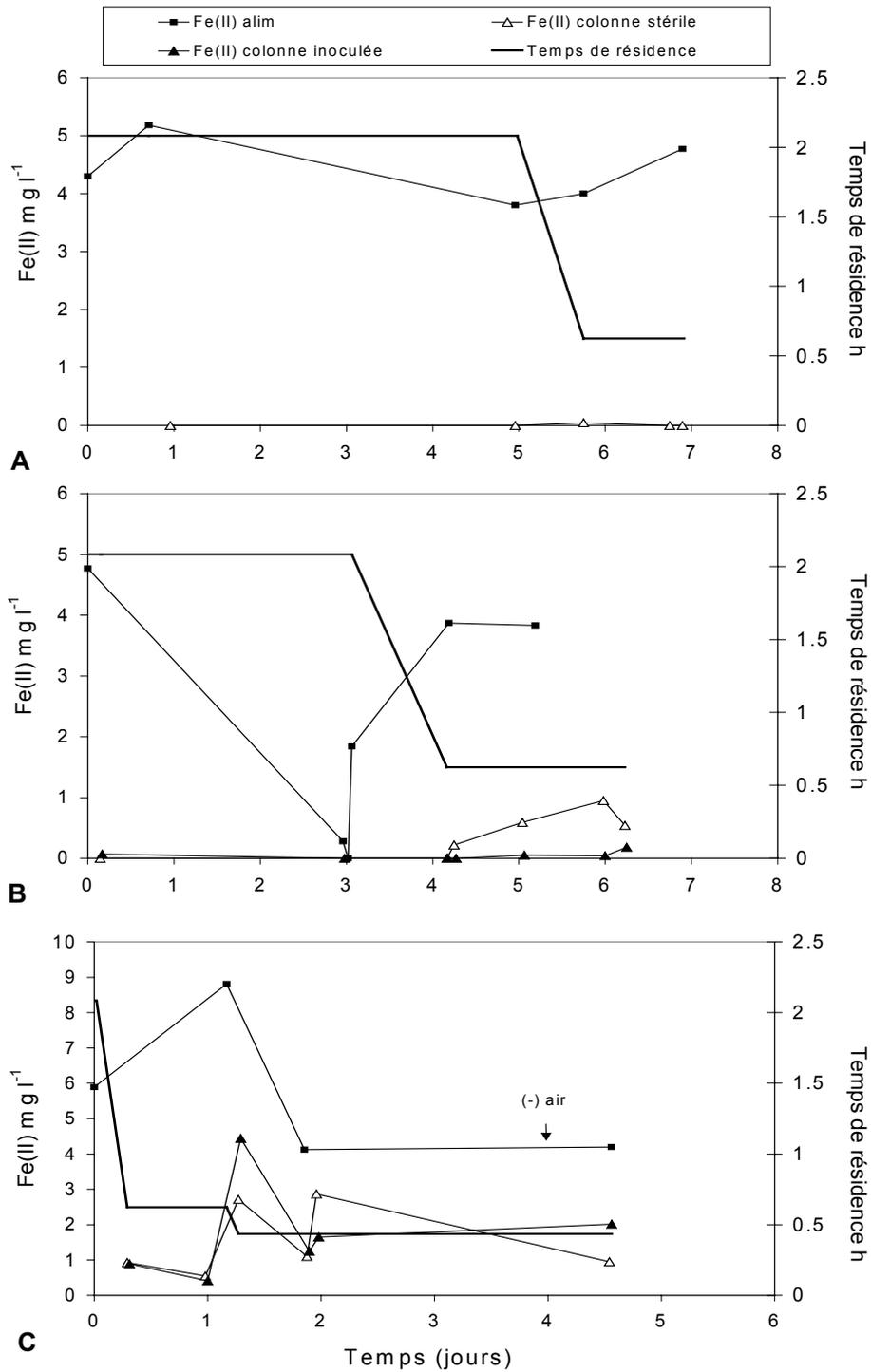


Fig. 10 – Expériences en continu en colonnes de 20 ml, évolution de la concentration en Fe(II).
 (A) : pH de l'alimentation entre 7 et 7,5 ; (B) pH de l'alimentation entre 6 et 7 ;
 (C) pH de l'alimentation entre 5 et 6.

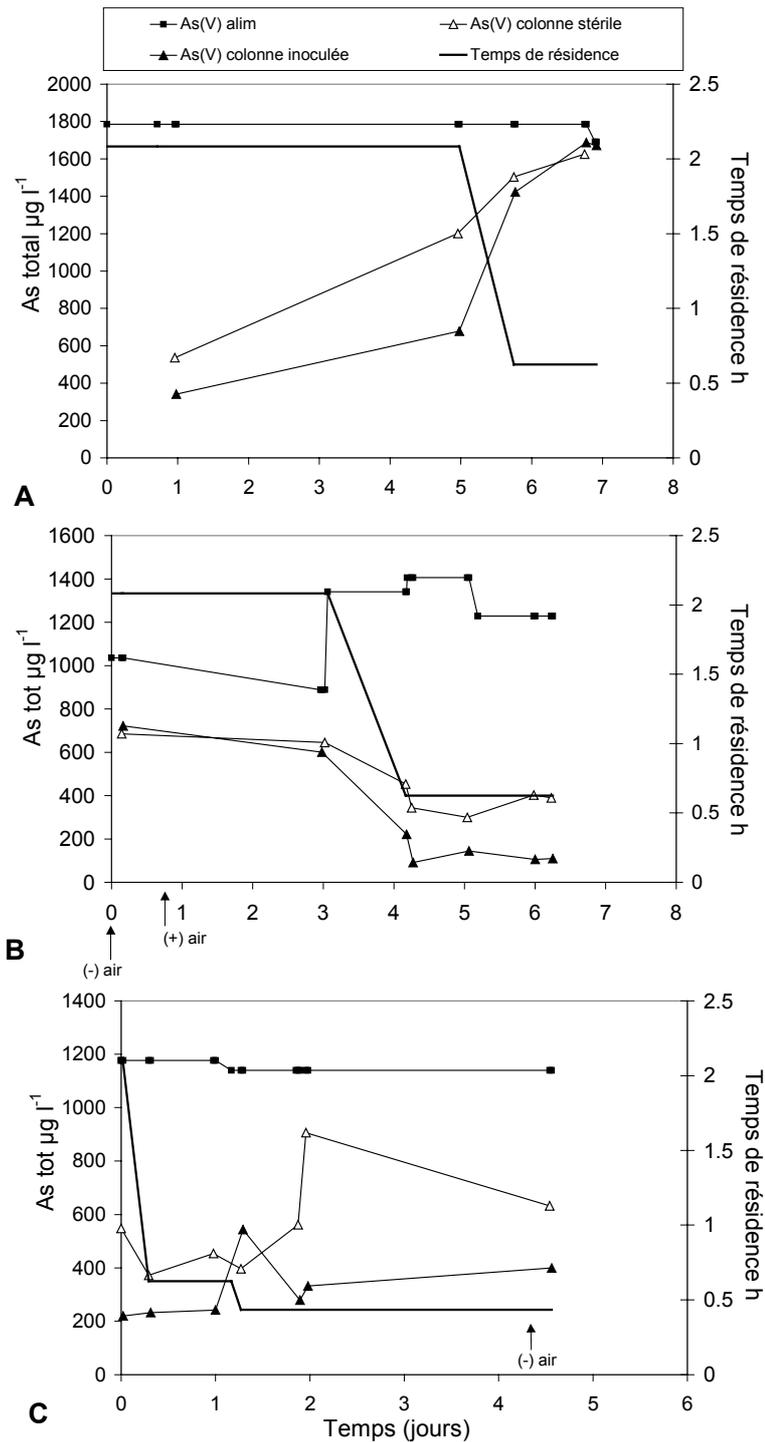


Fig. 11 – Expériences en continu en colonnes de 20 ml, évolution de la concentration en As total. (A) : pH de l'alimentation entre 7 et 7,5 ; (B) pH de l'alimentation entre 6 et 7 ; (C) pH de l'alimentation entre 5 et 6.

A deux reprises, au début de l'expérience à pH [6-7] (fig. 10B) et à la fin de l'expérience à pH [5-6] (fig. 10C), l'injection d'air a été volontairement stoppée. Cette interruption de l'aération forcée n'a pas eu d'effet sur l'oxydation du fer ou de l'As(III). Ce résultat pourrait être lié au piégeage de bulles d'air à l'intérieur des pores de la pouzzolane, et ne peut pas être facilement interprété dans le cadre de cette expérience. En effet, la concentration en oxygène dissous ne pouvait pas être directement mesurée dans les colonnes de 20 ml. L'influence de la concentration en oxygène a été étudiée ultérieurement, de façon plus précise, en réacteur de 2 litres.

4.2.4. Evolution des concentrations en As total

La différence entre l'As total en alimentation et l'As total en sortie de colonnes indique la capacité de rétention d'arsenic du système. En tout début d'expérience (fig. 11A) l'adsorption d'arsenic par la pouzzolane, puis la saturation de ce matériau sont observés. Par la suite, (fig. 11B et 11C), la capacité des colonnes à retenir l'arsenic est liée aux taux d'oxydation de l'arsenic et du fer :

- la teneur en As total est plus faible en sortie de colonne inoculée que dans l'effluent de la colonne stérile,
- la capacité de rétention des colonnes semble moins bonne à pH [5-6], lorsque le fer n'est pas entièrement oxydé, et la charge de surface des hydroxydes de fer est moins favorable à l'adsorption d'As(V).

La meilleure capacité de rétention de l'arsenic a été obtenue avec la colonne inoculée pour un temps de résidence de 0,5 heure, avec une alimentation à pH [6-7] (fig. 11B). Dans ces conditions, la concentration en As total en sortie de colonne est égale à $100 \mu\text{g l}^{-1}$ et le pourcentage de rétention de l'arsenic dans la colonne atteint 91 %.

Les résultats de cette série d'expériences montrent que **l'activité biologique a un impact non négligeable sur l'oxydation de l'As(III) dans les conditions du site**, c'est-à-dire à $12 \text{ }^\circ\text{C}$ et pour des teneurs en As(III) inférieures à 1 mg l^{-1} .

5. Oxydation en continu : expérience en colonne de 2 litres au laboratoire

Il a été montré que :

- un bullage d'air favorise l'élimination d'As(III), As(V) et Fe(II) de l'effluent ;
- des bactéries issues du site accélèrent l'oxydation de l'As(III) à 12 °C, dans les conditions physico-chimiques du terrain ;
- l'oxydation du fer par l'oxygène est spontanée, même en absence de bactéries.

L'objectif de la présente expérience est de déterminer l'influence de la concentration en oxygène sur la cinétique d'oxydation de l'As(III). Ce paramètre ne peut pas être étudié en colonne de 20 ml car ces réacteurs sont trop petits pour être équipés d'électrodes, et les débits d'air à appliquer seraient si faibles qu'il serait difficile de les régler de façon précise. Une colonne de 2 litres a donc été mise en place pour cette expérience.

5.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

5.1.1. Dispositif expérimental

Le réacteur est constitué d'une colonne PVC de 2 litres, à double enveloppe, remplie avec 1 385 g de pouzzolane de granulométrie 2-5 mm (Carrière de la Denise, Le Puy, France), dont la surface spécifique est $2\,730\text{ m}^2\text{ l}^{-1}$. Le volume utile s'élève à 1 715 ml pour un débit d'air de 0 l h^{-1} , et 1 601 ml pour un débit d'air de 10 l h^{-1} . Le réservoir d'alimentation est constitué d'un réacteur en verre de 10 litres, à double enveloppe. Le réacteur et le réservoir d'alimentation sont thermostatés à 12 °C. Le réservoir est rempli d'un effluent synthétique dont la composition est proche de celle de l'effluent de Loperec. Un bullage d'argon permet d'éviter ou de retarder l'oxydation du Fe(II) et de l'As(III) dans l'alimentation. Le réservoir d'alimentation a été désinfecté avec de l'hypochlorite de sodium avant expérience, et nettoyé à l'HCl concentré en raison du dépôt d'hydroxyde de fer sur les parois, à plusieurs reprises en cours d'expérimentation pour éviter le développement de bactéries dans l'alimentation. Après chaque nettoyage à l'hypochlorite ou à l'HCl, le réservoir a été rincé abondamment à de l'eau du robinet, puis à l'eau déminéralisée.

Le réacteur a été inoculé par injection de 2 272 ml d'effluent réel de Loperec en mode ascendant à travers la pouzzolane. L'alimentation en continu d'effluent synthétique a ensuite été réalisée en mode descendant. La température dans le réacteur a été maintenue à 12°C par circulation d'eau froide dans la double enveloppe. Un bullage d'air est réalisé grâce à un diffuseur situé à la base de la colonne. Le débit d'air est réglé avec un débitmètre à bille (Brooks). Des électrodes permettent de mesurer l'O₂ dissous, le pH et le potentiel redox dans la partie supérieure de la colonne. Un schéma du dispositif expérimental est donné par la figure 12.

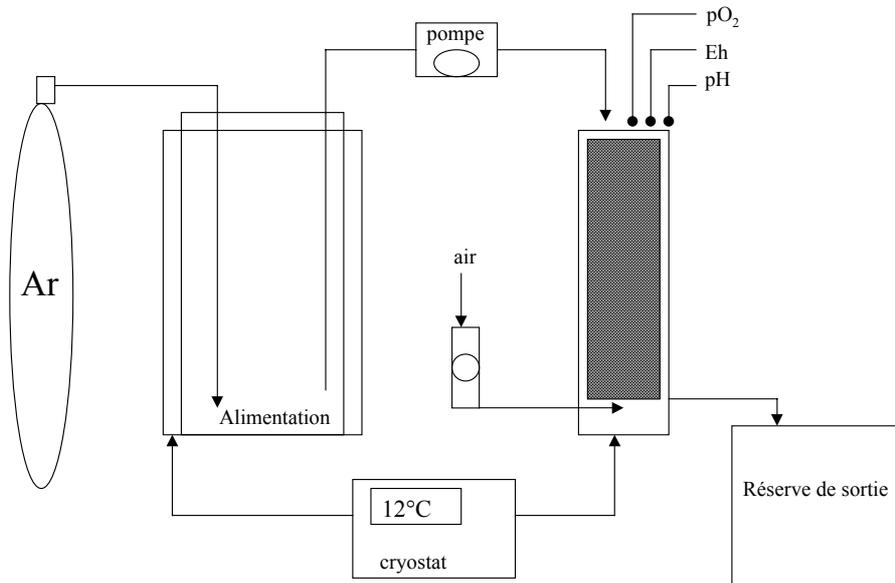


Fig. 12 – Schéma du dispositif expérimental pour l'oxydation en continu dans une colonne de 2 litres.

5.1.2. Préparation de l'effluent synthétique

La composition finale de l'effluent synthétique en éléments majeurs et sa comparaison avec l'effluent réel ont été données par le tableau 2. En début d'expérience, au niveau des composants majeurs, la principale différence entre l'effluent synthétique et l'effluent réel était l'absence de silice dans le synthétique. La difficulté à maintenir le pH stable et le Fe(II) en solution a nécessité l'élimination du carbonate de calcium du milieu synthétique. Il a été remplacé par 103 mg l^{-1} de chlorure de calcium (CaCl_2) afin d'obtenir la concentration finale en calcium de l'effluent réel. Cependant, cette modification a entraîné un excès de chlore dans le milieu synthétique (85 mg l^{-1} dans le synthétique, 19 mg l^{-1} dans le réel). La concentration en CO_2 dissous était difficilement contrôlable, en raison du phénomène de stripping par l'argon, et il a été décidé de ne pas en tenir compte. Au cours de l'expérience, la seule source de carbone pour les bactéries était le CO_2 apporté par l'air injecté dans la colonne ou diffusant à la l'interface eau/air en haut de colonne. Dans le cas du traitement réel, le CO_2 sera apporté par l'effluent lui-même, qui est en sursaturation par rapport à l'atmosphère (Itard *et al.*, 2004).

Méthodologie de préparation de l'effluent synthétique

Dans 10 litres d'eau déminéralisée, les composants dissous sont donnés ci-après.

Composant	Quantité	Unité	Composant	Quantité	Unité
CaCO ₃	929	mg	KNO ₃	21	mg
ou CaCl ₂	1030	mg			
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1166	mg	K ₂ HPO ₄	2	mg
NaCl	300	mg	KNO ₂	2	mg
NaHCO ₃	179	mg	NaF	2	mg

Tabl. 8 – Composants utilisés pour l'effluent synthétique.

Le pH de ce mélange était ajusté à 5,5 – 6 par ajout d'H₂SO₄. Il a été vérifié que cet ajout d'acide sulfurique ne modifiait pas notablement la concentration finale en sulfate de l'effluent synthétique, qui était comprise entre 55 et 65 mg l⁻¹, contre 53 mg l⁻¹ dans l'effluent réel. Le mélange était placé dans le réservoir d'alimentation de 10 litres et thermostaté à 12 °C. L'argon était injecté dans ce système pendant 2 heures afin d'éliminer tout l'oxygène dissous. Ensuite, 220 mg de FeSO₄, 7 H₂O étaient ajoutés, directement sous forme de sels, dans l'alimentation. Après dissolution complète du fer, 0,5 ml d'As(III) à 10 g l⁻¹ et 0,5 ml d'As(V) à 10 g l⁻¹, filtrés à 0,22 µm, étaient injectés dans le réservoir d'alimentation afin d'obtenir une concentration théorique finale de 500 µg l⁻¹ pour chaque forme d'arsenic. Après 15 mn de mélange par bullage d'argon, un prélèvement était effectué pour analyser la concentration en Fe(II) dissous.

5.1.3. Programme expérimental

Trois débits d'air ont été testés : 10 l h⁻¹, 1 l h⁻¹ et absence de bullage d'air. Pour chacune de ces conditions d'aération, trois temps de séjour ont été successivement appliqués : 24 h, 10 h, et 4 h.

5.1.4. Suivi analytique

Les mesures suivantes étaient réalisées au moins une fois par jour :

- relevé de pH et potentiel redox dans l'alimentation (par prise d'échantillon), en haut et en bas de colonne ;
- relevé de la température, de la concentration en O₂ dissous en haut de colonne ;
- analyses du Fe(II) par colorimétrie à la phénantroline dans l'alimentation, en haut et en bas de colonne ;
- analyses de As(V) et As(III), par séparation sur résine et SAA four dans l'alimentation et en bas de colonne.

Des échantillons ont été prélevés ponctuellement en sortie de réacteur pour effectuer des analyses microbiologiques : observation et comptage des bactéries au microscope optique (grossissement x 400) sur cellule de Thoma, étalement sur milieu solide B.

En fin d'expérience, divers échantillons de solides et liquides ont été prélevés pour :

- des analyses ultérieures en biologie moléculaire, via l'extraction d'ADN total. Les échantillons suivants ont été prélevés : 3 x 5 ml en haut de colonne, 3 x 5 ml en bas de colonne, et 5 ml de boue d'hydroxyde (obtenue en agitant fortement quelques grains de pouzzolane prélevés en haut de colonne dans un peu d'eau stérile). Ces échantillons sont conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- des analyses ultérieures par la méthode de biologie moléculaire FISH (hybridation *in-situ*) : 3 x 5 ml en haut de colonne, 3 x 5 ml en bas de colonne, 2 x 5 ml de boue et 2 grains de pouzzolane. Ces échantillons sont conservés en présence de para-formaldéhyde à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- effectuer des observations au microscope électronique à balayage ; une dizaine de grains de pouzzolane collectés en haut de colonne. Ils ont été conservés humides à $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à la préparation pour observation au microscope.

Analyses au microscope électronique à balayage

L'utilisation d'électrons comme particules incidentes implique de travailler sous vide et de disposer d'un échantillon conducteur. Si ce dernier ne l'est pas, on rend sa surface conductrice par le dépôt d'une fine couche conductrice (ici du carbone). Cette opération a été réalisée dans un métalliseur EDWARDS Auto 306.

Les expériences de microscopie électronique ont été réalisées avec un microscope JEOL JSM 6100 couplé à un spectromètre de rayons X en dispersion d'énergie (EDS pour Energy Dispersive Spectrometry) KEVEX Quantum. Toutes les photos ont été réalisées à une tension de 25 kV (sauf les photos Loperec 11 & 12, ainsi que le spectre Loperec 12, qui ont été réalisés à une tension de 10 kV).

5.2. RÉSULTATS

5.2.1. Oxydation de l'arsenic

L'évolution des concentrations en As(III) et As(V) au cours de l'expérience est donnée par la figure 13. Bien que les quantités d'As(III) et d'As(V) introduites dans le réservoir d'alimentation correspondent exactement à $500\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$, les concentrations analysées dans l'alimentation variaient de façon importante, entre 300 et $800\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ pour l'As(III), et entre 200 et $1\,000\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ pour l'As(V). Ces variations correspondaient très probablement à des phénomènes d'adsorption et de désorption d'arsenic sur des précipités de fer qui se forment dans le réservoir d'alimentation. En effet, malgré le bullage d'argon, une partie du fer introduit dans l'effluent synthétique précipitait et des dépôts rouges étaient visibles sur les parois de verre de la réserve. L'effet de la formation de ces dépôts a été particulièrement visible au cours des 10 premiers jours d'expérience, durant lesquels la concentration en As(V) décroissait sensiblement. Par la suite, pour limiter ce phénomène, le réservoir d'alimentation a été régulièrement nettoyé avec de l'HCl concentré. Ce nettoyage évitait également le développement de bactéries dans l'alimentation. Malgré ces précautions, des variations de concentrations en As(III) et As(V) ont été constatées. Les tuyaux d'alimentation, au niveau desquels un dépôt rouge se développait, ont également été régulièrement nettoyés avec de l'HCl concentré.

En sortie de colonne, la concentration en As(III) a toujours été inférieure à $5 \mu\text{g l}^{-1}$. La concentration en As (V) était proche de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ en début d'expérience, puis a diminué pour atteindre $20 \mu\text{g l}^{-1}$ pour un temps de séjour de 10 heures et un débit d'aération de 10 l h^{-1} . Par la suite, lorsque le temps de séjour et/ou le débit d'aération ont été diminués, la concentration en As(V) a toujours été comprise entre 40 et $60 \mu\text{g l}^{-1}$.

L'As(III) étant plus mobile que l'As(V) dans les conditions expérimentales, l'absence d'As(III) et la présence d'As(V) en sortie de colonne signifie que l'As(III) a été oxydé dans le bioréacteur.

Au cours des 10 premiers jours d'expérience, la diminution de la concentration en As(V) en sortie de colonne correspond probablement à une phase de formation de précipités de Fe(III) frais à la surface de la pouzzolane. Un piège à arsenic s'est donc développé dans la colonne. Cependant, ce piège n'était pas suffisant pour retenir tout l'As(V). Le pouvoir de rétention d'As(V) de la colonne a diminué lorsque le débit d'alimentation a été augmenté, et lorsque le débit d'aération a été diminué.

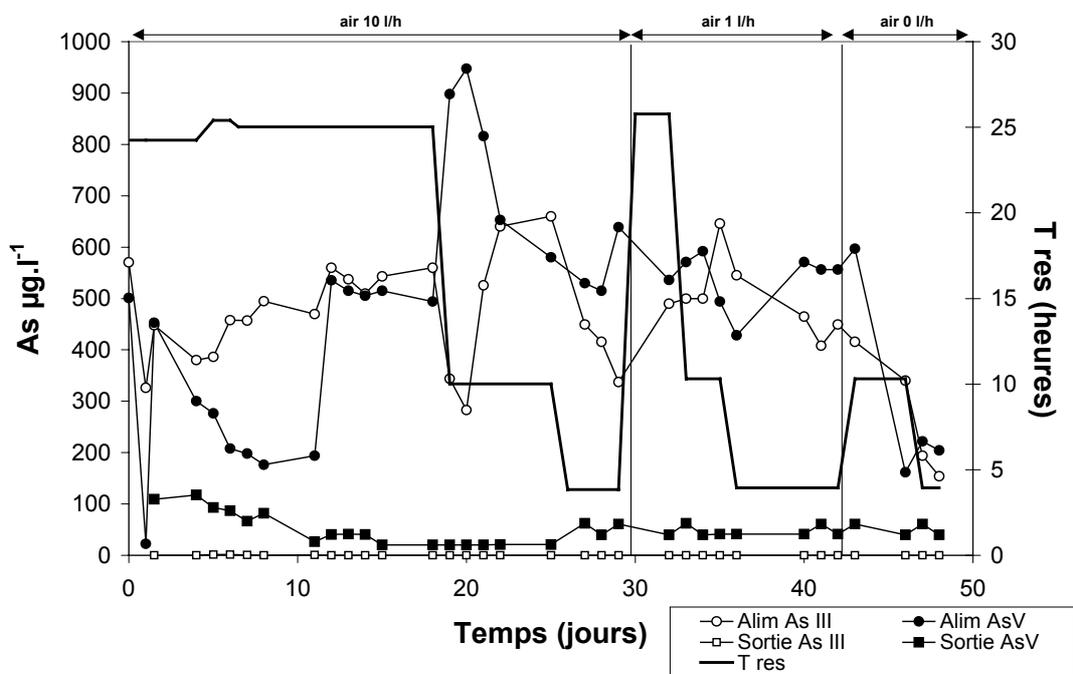


Fig. 13 – Oxydation en continu en colonne de 2 litres, évolution des concentrations en arsenic et temps de séjour.

5.2.2. Oxydation du fer

Les concentrations en Fe(II) ont été analysées dans l'alimentation, en haut et en bas de colonne (fig. 14). Quelques analyses de Fe total ont été effectuées afin de vérifier que la différence entre Fe(II) et Fe total en solution était indétectable par la méthode utilisée : la concentration en Fe(III) en solution était toujours très faible.

Dans l'alimentation, la concentration en Fe(II) était comprise entre 4 et 6 mg l⁻¹. Elle était relativement plus stable que les concentrations en As(III) et As(V) dans l'alimentation, sauf en début d'expérience quand du CaCO₃ était utilisé pour préparer l'effluent synthétique. Au cours de cette première phase, des fluctuations de pH indésirables dans l'alimentation entraînaient des phénomènes de précipitation. Par la suite, lorsque le CaCO₃ a été remplacé par CaCl₂, la concentration en Fe(II) a pu être stabilisée. Cependant, une fraction du Fe(II) introduit dans l'alimentation (probablement 5 à 10 %) s'oxydait toujours à cause de traces d'oxygène résiduel ou d'entrées d'air (lors des prélèvements) dans le réservoir d'alimentation. Cette oxydation provoquait la formation d'un dépôt rouge sur les parois du réservoir et des tuyaux, qui ont été régulièrement nettoyés avec de l'HCl.

En sortie de colonne, la concentration en Fe(II) a toujours été comprise entre 0 et 1 mg l⁻¹, quel que soit le débit d'alimentation ou d'aération. La concentration en Fe(II) en haut de colonne a été plus sensible aux conditions expérimentales. Lorsque le débit d'air était égal à 10 l h⁻¹, la teneur en Fe(II) oscillait entre 0,5 et 2 mg l⁻¹ en haut de colonne. Lorsque le débit d'air a été réduit à 1 l h⁻¹, l'oxydation du Fe(II) en haut de colonne était moins efficace uniquement pour le temps de séjour le plus court (4 h). Des concentrations en Fe(II) supérieures à 3 mg l⁻¹ en haut de colonne ont alors été obtenues. Lorsque l'aération par bullage d'air a été entièrement stoppée, l'oxygénation de l'effluent ne se réalisait plus que par la diffusion à l'interface eau/air en haut de colonne. La concentration en Fe(II) en haut de colonne a alors atteint 4 mg l⁻¹. Ces résultats montrent que le débit d'aération et le temps de séjour ont une influence sensible sur la teneur en Fe(II) en haut de colonne. Cependant, l'efficacité d'oxydation du Fe(II) augmentait au cours du temps. Par exemple, lorsque pour 1 l h⁻¹ d'air, le temps de résidence a été diminué de 10 à 4 h (jour 36), la teneur en Fe(II) en haut de colonne a augmenté brutalement de 0,5 à 3,3 mg l⁻¹. Dans les jours qui ont suivi, bien que les conditions expérimentales ne soient pas modifiées, cette concentration en Fe(II) a chuté à moins de 2 mg l⁻¹. Un phénomène similaire semble s'être produit ensuite pour la condition « 0 aération – 10 heures de temps de séjour ». Ces résultats pourraient être liés au **développement de bactéries Fe(II) oxydantes** dans la colonne et dans la couche d'eau située en haut de colonne.

5.2.3. Evolution de la concentration en O₂ dissous

La concentration en O₂ dissous est restée proche de 10 mg l⁻¹ tant que le débit d'air a été maintenu à 10 l h⁻¹ (fig. 15). Avec 1 l h⁻¹ d'air, une chute de la concentration en O₂ dissous a été observée au temps de résidence minimum (4 heures). Lorsque l'aération a été entièrement stoppée, la concentration en O₂ a diminué jusqu'à 2 mg l⁻¹. Le taux d'oxydation du Fe(II) en haut de colonne (fig. 14) semble donc bien lié à la concentration en O₂ dissous (fig. 15). En bas de colonne, même sans aération forcée, le Fe(II) était presque entièrement oxydé en 4 heures. La réaction d'oxydation du Fe(II) est la suivante :



D'après cette équation, $\frac{1}{4}$ de mole d' O_2 est suffisant pour oxyder 1 mole de Fe. Par conséquent, pour oxyder 5 mg l^{-1} de Fe(II), il suffit de $0,71 \text{ mg l}^{-1}$ d' O_2 . Cependant, la vitesse d'oxydation doit augmenter :

- avec la concentration en O_2 ,
- avec la présence de bactéries Fe(II)-oxydantes qui catalysent la réaction.

Il est très probable que des bactéries Fe(II)-oxydantes se soient développées sur la pouzzolane et aient accéléré l'oxydation du Fe(II). Des procédés de traitement d'eau contenant de l'arsenic, dans un but de potabilisation, mettent en œuvre des bactéries Fe(II)-oxydantes (Katsoyiannis et Zouboulis, 2003). Les auteurs de ces travaux soupçonnent que leurs bactéries Fe(II)-oxydantes réalisent également l'oxydation de l'As(III). D'autre part, des bactéries du genre *Thiomonas*, isolées à partir de différents sites miniers, sont capables d'oxyder à la fois le fer et l'arsenic (Hallberg *et al.*, 2003).

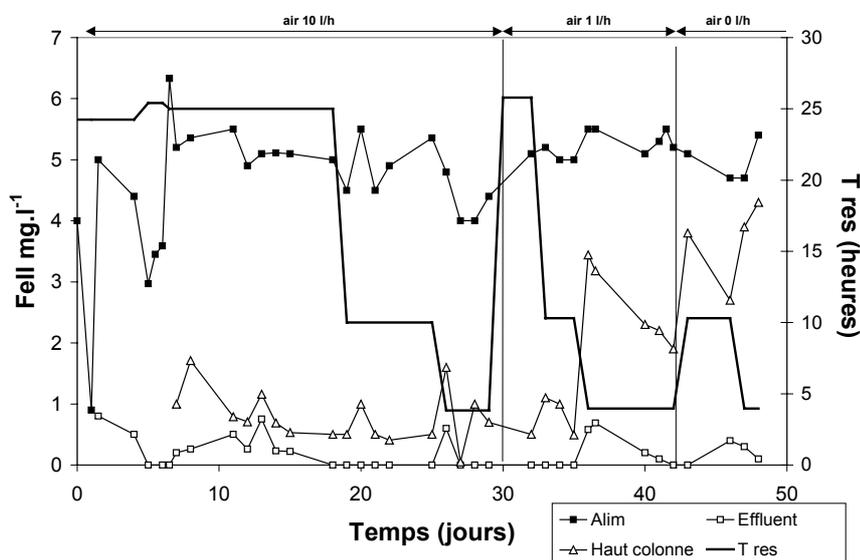


Fig. 14 – Oxydation en colonne de 2 litres, évolution des concentrations en Fe(II).

5.2.4. Evolution du pH

Le pH de l'alimentation a été très variable (fig. 16), ce paramètre étant très difficile à équilibrer et stabiliser. L'objectif était bien sûr de fixer le pH de l'alimentation à une valeur proche de celle du site, c'est-à-dire 5,9. La mesure de pH ne peut pas se faire dans le réacteur d'alimentation, pour éviter de le contaminer. Des échantillons sont donc prélevés, et le pH mesuré sur un échantillon qui s'oxygène (précipitation du fer) est imprécis. En début d'expérience (20 premiers jours), le pH de l'alimentation était ajusté à des valeurs inférieures à celle du site, pour éviter l'oxydation du Fe(II) en amont du réacteur. Par la suite, lorsque l'alimentation a été préparée sans carbonate de calcium, il a été possible d'ajuster le pH de l'effluent synthétique à des valeurs plus proches de celles de l'effluent réel.

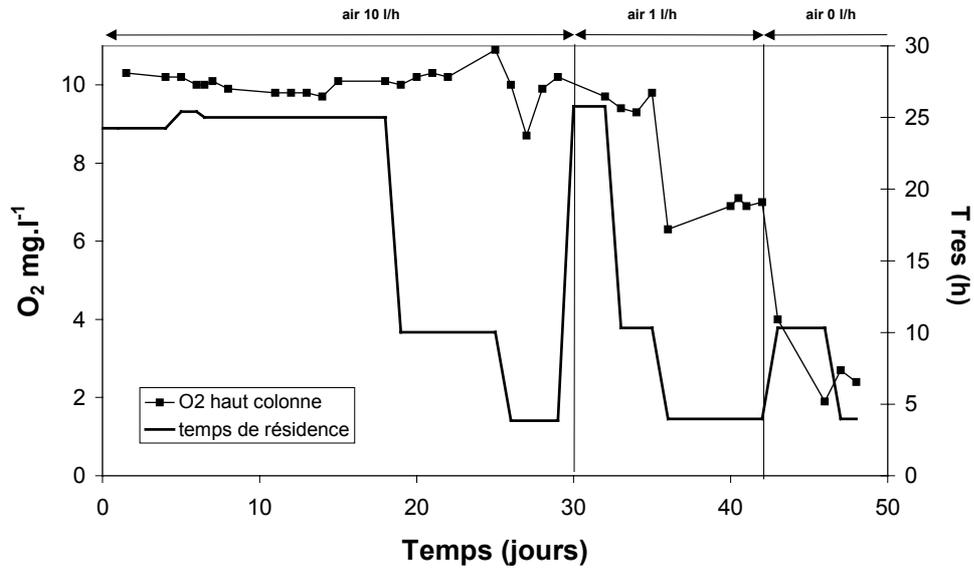


Fig. 15 – Oxydation en colonne de 2 litres, évolution de la concentration en O_2 dissous en haut de colonne.

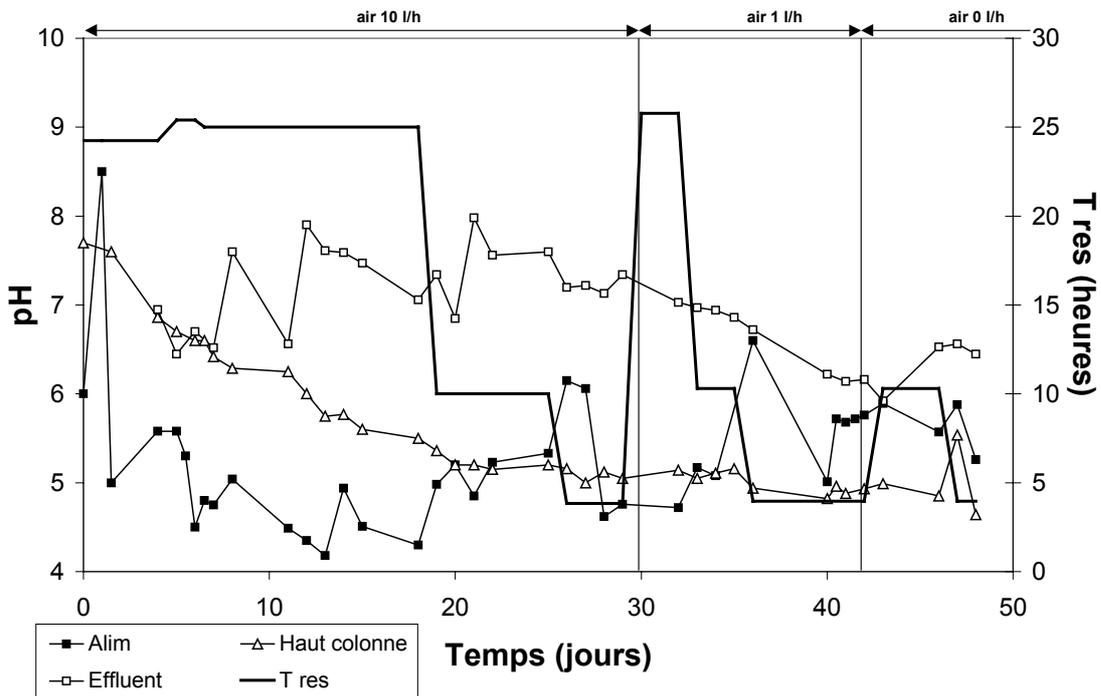


Fig. 16 – Oxydation en colonne de 2 litres, évolution du pH.

Le pH en haut de colonne était supérieur à celui de l'alimentation pendant les 20 premiers jours d'expérience, mais il diminuait pour atteindre des valeurs proches de celles de l'alimentation. Le pH en bas de colonne (effluent) a été égal au pH en haut de

colonne durant la première semaine d'expérience, puis systématiquement supérieur par la suite. Il avait tendance à chuter avec la diminution du régime d'aération et du temps de séjour.

Deux réactions qui ont des effets opposés sur le pH se réalisent dans la colonne :

- l'oxydation du fer ferreux consomme des H^+ ,
- la précipitation de $Fe(OH)_3$ génère des H^+ .

Globalement, le processus complet d'oxydation puis de précipitation devrait générer une acidification de l'effluent. Dans le cas de la présente expérience, une augmentation du pH est constatée. Ce phénomène semble indiquer que la réaction d'oxydation du Fe(II) en Fe(III) est prépondérante (plus rapide ?) que la précipitation du Fe(III). Cependant, il n'a pas été possible de détecter du Fe(III) en solution en sortie de réacteur, et le développement d'un précipité de fer rouge a été observé sur les 10 premiers centimètres de pouzzolane en haut de colonne. Une augmentation de pH a également été obtenue lors des essais de bullage d'air en batch sur effluent réel, par dégazage du CO_2 (Itard *et al.*, 2004).

5.2.5. Bilan à t = 48 jours

Les espèces chimiques As(III), As(V), Fe(II) et SO_4^{2-} ont été analysées dans l'alimentation, en haut et en bas de colonne à t = 48 jours. Les conditions opératoires étaient alors les suivantes : 4 heures de temps de séjour, absence de bullage d'air. Les résultats de ce bilan sont donnés par la figure 17.

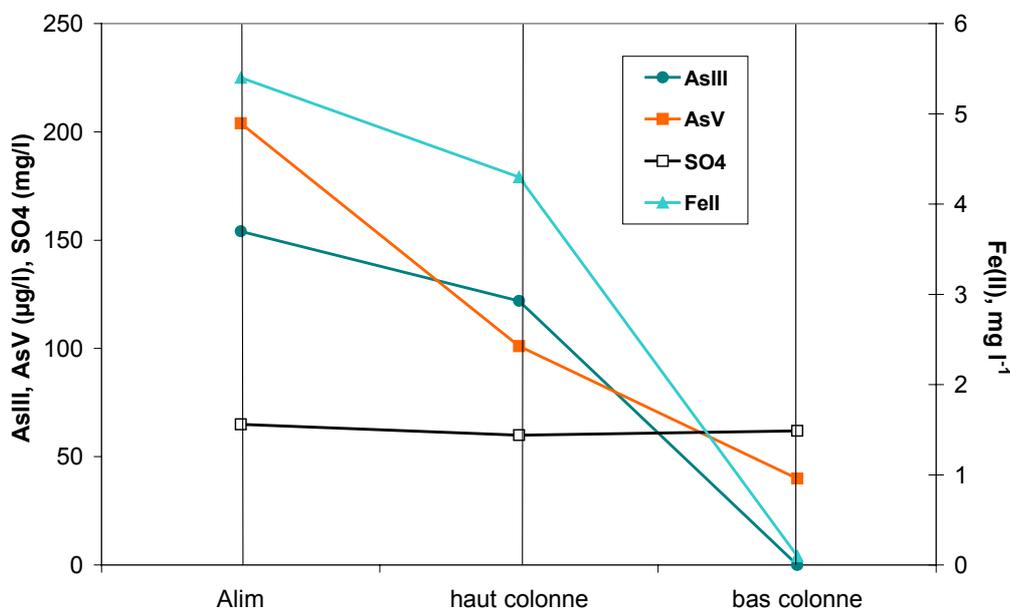


Fig. 17 – Résultats des analyses effectuées à t = 48 jours.

Ce bilan montre que les espèces Fe(II) et As(III) sont principalement oxydées lorsqu'elles traversent la colonne de pouzzolane. Leur oxydation est complète. La concentration en As(V) en haut de colonne est déjà inférieure de 50 % à celle de l'alimentation. La précipitation d'une faible quantité de Fe(II) suffit à éliminer une proportion importante de l'As(V). Cependant, l'As(V) restant est éliminé de façon incomplète à travers la colonne. Ce résultat pourrait être lié à plusieurs facteurs :

- il est possible que l'oxydation de l'As(III) soit encore incomplète quand, dans la pouzzolane, tout le fer a déjà été éliminé ; l'As(V) alors produit ne peut pas se fixer ;
- le rapport initial Fe/As n'est peut-être pas suffisamment élevé pour éliminer entièrement l'arsenic.

Des expériences complémentaires devront être effectuées afin d'élucider ce problème, et de proposer une configuration de réacteur permettant d'éliminer le plus efficacement possible l'As(V).

5.2.6. Observations au microscope électronique à balayage

Des grains de pouzzolane prélevés en haut de colonne, dans la zone colonisée par les précipités d'hydroxydes de fer, ont été observés au microscope électronique à balayage. Ces observations révèlent la présence de nombreuses bactéries à la surface de la pouzzolane, probablement organisées en biofilm. Des bâtonnets mesurant environ 4 μm de long et 1,5 μm de large sont bien discernables sur la photo 1.

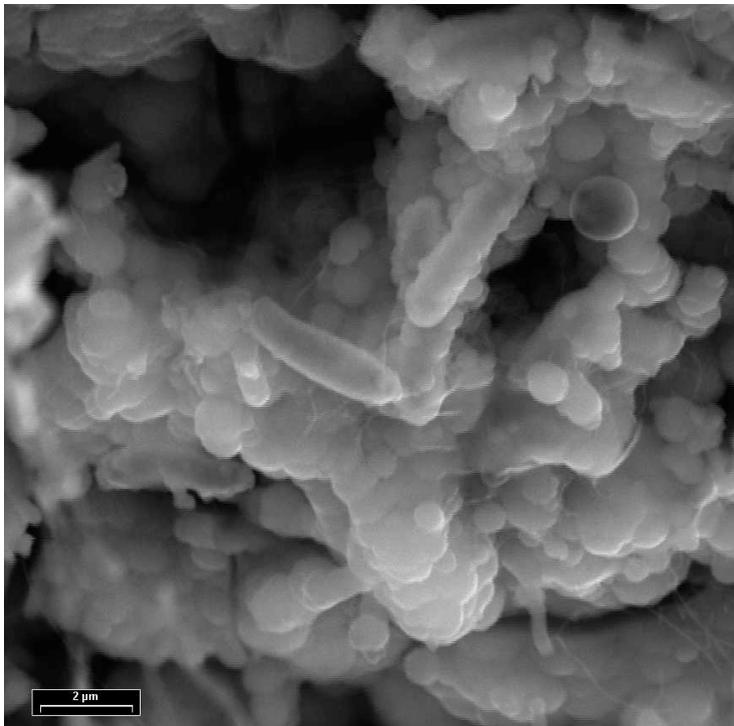


Photo 1 – Observation au MEB de la pouzzolane prélevée dans la colonne de 2 litres en fin d'expérience : tapis bactérien avec bâtonnets.

L'aspect de la pouzzolane brute, telle qu'elle était avant d'être placée dans le bioréacteur, est donné par la photo 2 (même échelle que la photo 1). Les formes globulaires et les bâtonnets visibles sur la photo 1 ne sont pas observés sur la pouzzolane brute.

Un réseau d'exopolymères bactériens a également été observé (photo 3) : de fins filaments dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques dizaines de nanomètres semblent relier les aspérités du grain. La présence de ce « mucus » est très certainement liée au développement d'un biofilm. Des bactéries apparemment enveloppées dans du mucus sont visibles sur la photo 4.

En absence de tout nutriment ajouté dans l'exhaure synthétique, la population bactérienne de Loperec s'est développée aux dépens du CO₂, source de carbone, et de composés tels que l'As(III) et le Fe(II), utilisés en tant que sources d'énergie. Il est très probable que certaines bactéries de cette population soient autotrophes strictes, ne consommant que des substances minérales. D'autres bactéries du biofilm sont peut-être oligotrophes : elles se développeraient en utilisant des traces de substances organiques, qui pourraient être excrétées par les bactéries autotrophes.

Les spectres EDF effectués sur les mêmes échantillons révèlent la présence de fer et d'arsenic sur la pouzzolane colonisée par les bactéries et les hydroxydes de fer (fig. 18). L'arsenic est absent du spectre de la pouzzolane témoin (fig. 19).

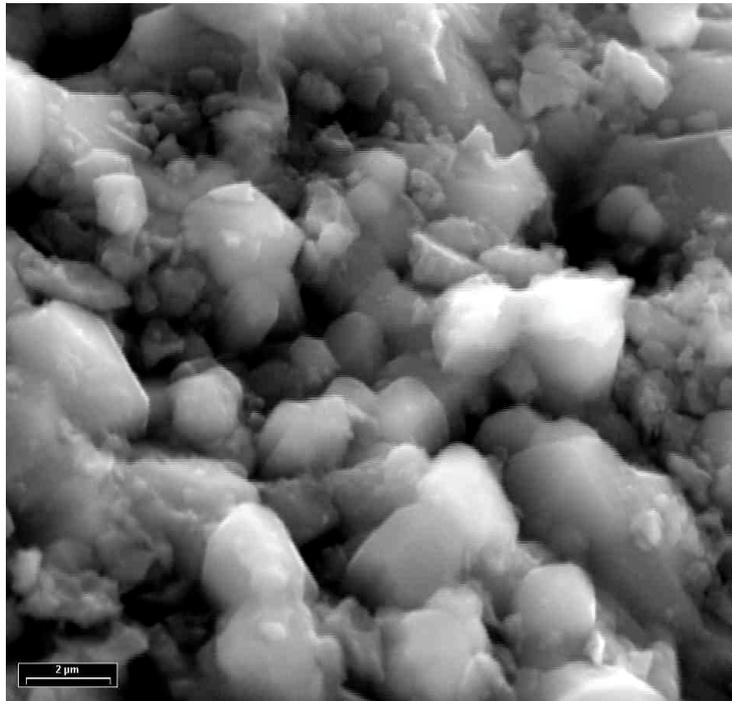


Photo 2 – Observation au MEB de la pouzzolane témoin non soumise au traitement dans la colonne.

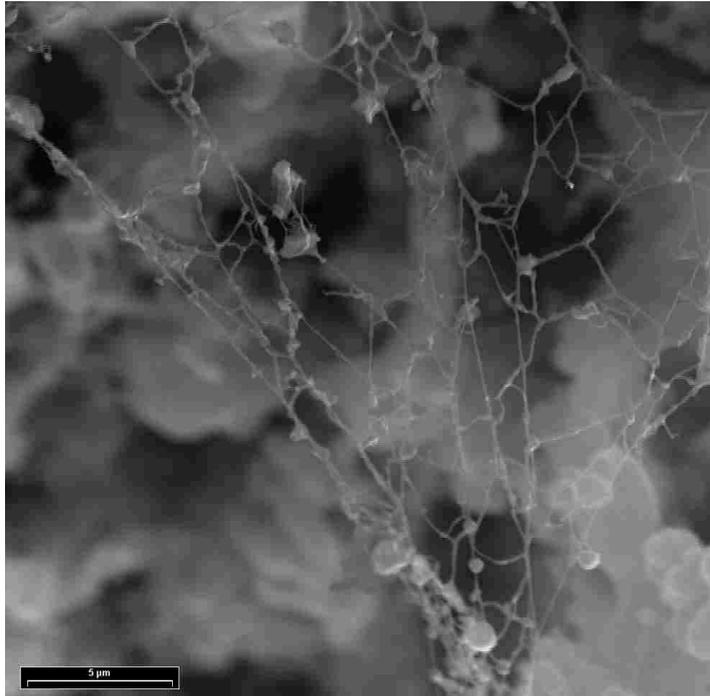


Photo 3 – Observation au MEB de la pouzzolane prélevée dans la colonne de 2 litres en fin d'expérience : réseau de mucus bactérien.



Photo 4 – Bactéries enveloppées dans du mucus à la surface de la pouzzolane colonisée.

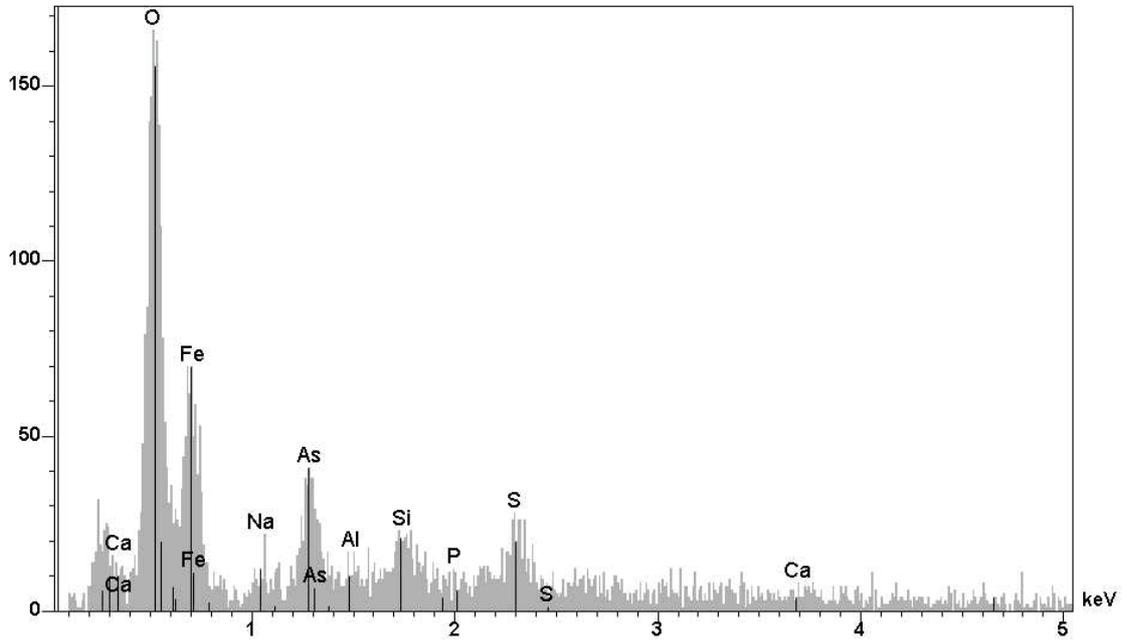


Fig. 18 – Spectre EDS de la pouzzolane colonisée par les bactéries et les précipités de fer.

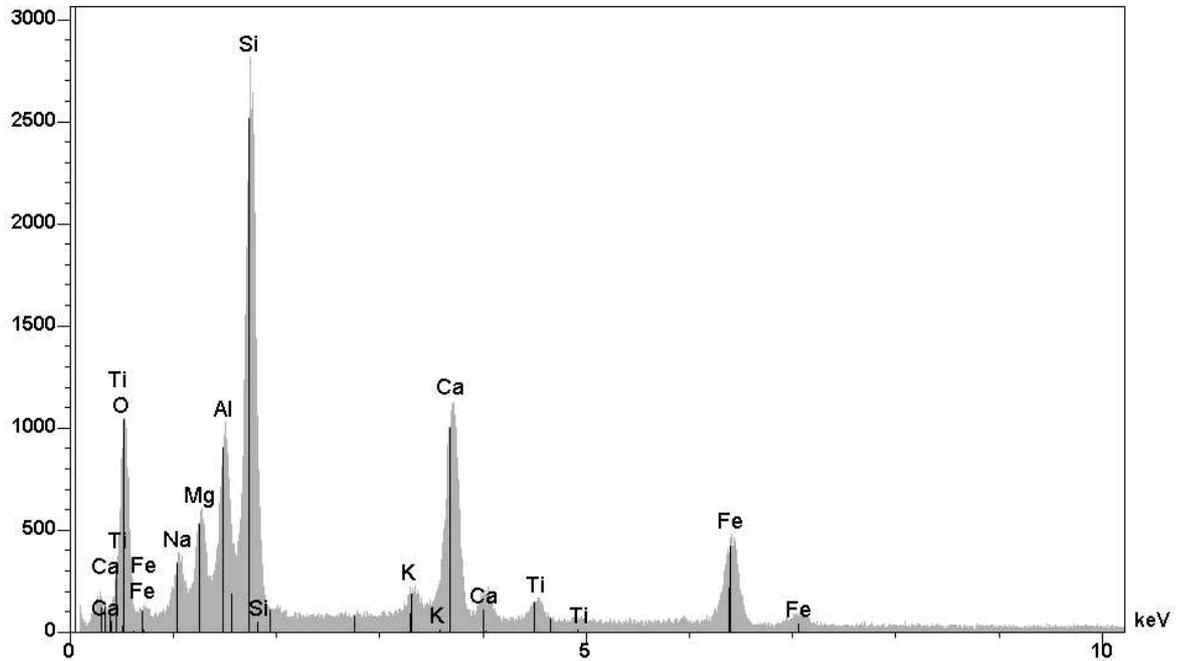


Fig. 19 – Spectre EDS de la pouzzolane témoin.

6. Expérience témoin en colonne de 2 litres au laboratoire

Il a été montré qu'un réacteur colonne rempli de pouzzolane, inoculé avec de l'eau du site de Loperec, permet d'éliminer efficacement l'As(III) présent dans un effluent synthétique de composition proche de celle de l'exhaure de Loperec. Un biofilm bactérien se développe sur la pouzzolane, sans apport de nutriments. Cependant, pour démontrer que les bactéries jouent effectivement un rôle majeur dans le processus d'élimination de l'arsenic, il était nécessaire d'effectuer une expérience témoin en absence de bactéries. En effet, la pouzzolane est susceptible d'adsorber de l'arsenic. Une expérience a donc été réalisée dans un système expérimental identique à celui utilisé pour l'expérience décrite dans le chapitre 5, mais non inoculé.

6.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le réacteur est celui décrit dans le chapitre 5.1, nettoyé avec de l'HCl dilué, rincé, puis désinfecté avec de l'hypochlorite de sodium, et enfin abondamment rincé avec de l'eau chaude. La colonne est remplie avec 1434 g de pouzzolane stérilisée par autoclavage (2 fois à 120 °C pendant 20 min). Le volume utile est 1,6 litre. Le réservoir d'alimentation est constitué d'un réacteur en verre de 25 litres. Le réacteur est thermostaté à 12 °C. Le réservoir est rempli d'un effluent synthétique stérile dont la composition est proche de celle de l'effluent de Loperec (voir chapitre 5.1.2). Un bullage d'argon permet d'éviter ou de retarder l'oxydation de Fe(II) en Fe(III) et d'As(III) en As(V) dans le réservoir d'alimentation. Ce réservoir a été stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 mn avant l'expérience. Le réacteur est alimenté en mode descendant avec l'effluent synthétique. Un bullage d'air ou d'argon est réalisé grâce à un diffuseur situé à la base de la colonne. Le débit de gaz est réglé avec un débit-mètre.

Le programme expérimental a été composé de 2 phases : **(1)** une phase d'évaluation de l'adsorption d'arsenic sur la pouzzolane **en absence d'air**, sans précipitation d'hydroxydes de fer, et **(2) en présence d'air**, quand le Fe(III) précipite. Cette expérience a été effectuée deux fois afin de contrôler la réplicabilité des résultats.

- La première phase a été réalisée à 0,5 h de temps de séjour, et 10 l.h⁻¹ d'argon injecté dans la colonne.
- La seconde phase a été réalisée à 0,5 et 4 h de temps de séjour, et 10 l.h⁻¹ de d'air injecté dans la colonne.

Avant le démarrage de la phase 1, de l'argon a été injecté dans le réacteur pendant une nuit afin de purger complètement l'air présent dans les pores de la pouzzolane. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 mn au cours de la phase 1, et toutes les heures au cours de la phase 2, afin de déterminer les concentrations en As(III), As(V) et Fe(II). Ces espèces chimiques ont été analysées dans l'alimentation en début et en fin de phase 1, et 1 fois toutes les 2 heures au cours de la phase 2.

6.2. RÉSULTATS

6.2.1. Phase 1 : adsorption sur la pouzzolane en conditions non oxydantes

Au cours de la phase 1, le réacteur est maintenu en condition anaérobie par injection d'argon. Après seulement 2,25 heures d'alimentation, la concentration en As(III) en sortie de colonne est égale à la concentration dans l'alimentation (fig. 20). Ce résultat montre que la pouzzolane n'adsorbe pas efficacement l'As(III). La quantité adsorbée peut être grossièrement estimée à 2,5 μg d'As(III) par g de pouzzolane. Il est donc impossible que l'élimination efficace de l'As(III) dans la colonne inoculée soit due à un phénomène d'adsorption sur la pouzzolane. La capacité d'adsorption d'As(V) de la pouzzolane est plus élevée, mais après 3 heures d'alimentation en continu (6 X le temps de séjour), la teneur en As(V) en sortie de colonne atteint 82 % de la teneur dans l'alimentation. La capacité d'adsorption de l'As(V) de la pouzzolane brute, non colonisée par les hydroxydes de fer, est faible.

Pour cette expérience, le pH de l'alimentation était ajusté à 5,5 (fig. 21), valeur comparable à celle appliquée lors de l'essai en présence de bactéries. Le pH en sortie de colonne non inoculée était égal à 5,7 au cours de la phase 1. Le pH de la solution a été peu modifié par la traversée de la pouzzolane en conditions non oxydantes. Par contre, il semble que la pouzzolane adsorbe du Fe(II) (fig. 21), car la concentration en Fe(II) dans l'effluent de sortie n'atteint que 70 % de la concentration d'entrée.

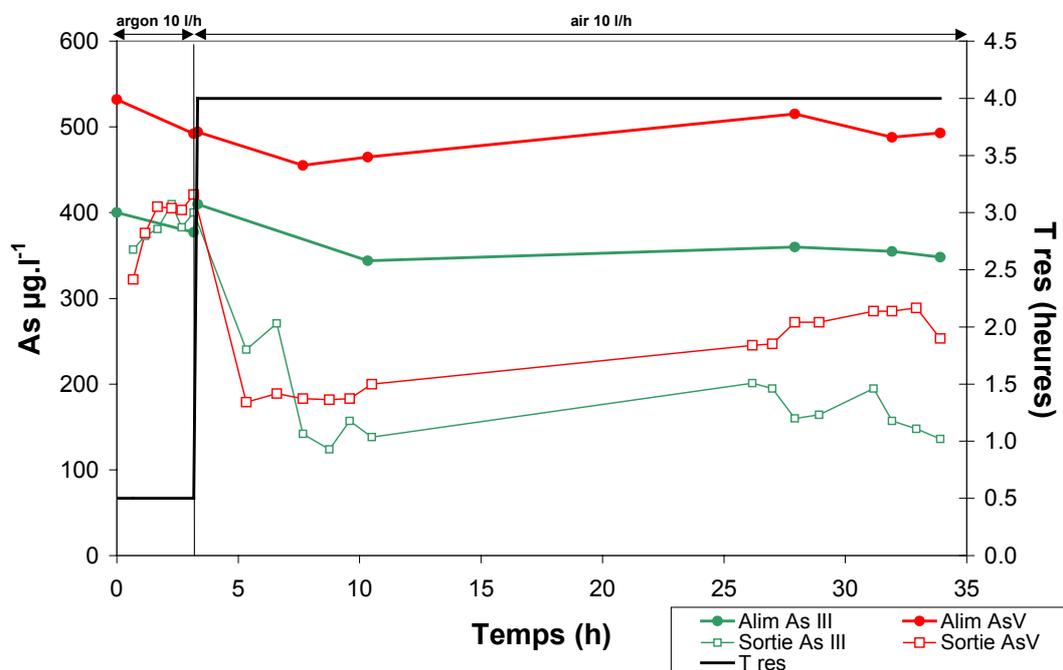


Fig. 20 – Colonne de 2 litres non inoculée : évolution des concentrations en As(III), As(V) et temps de résidence.

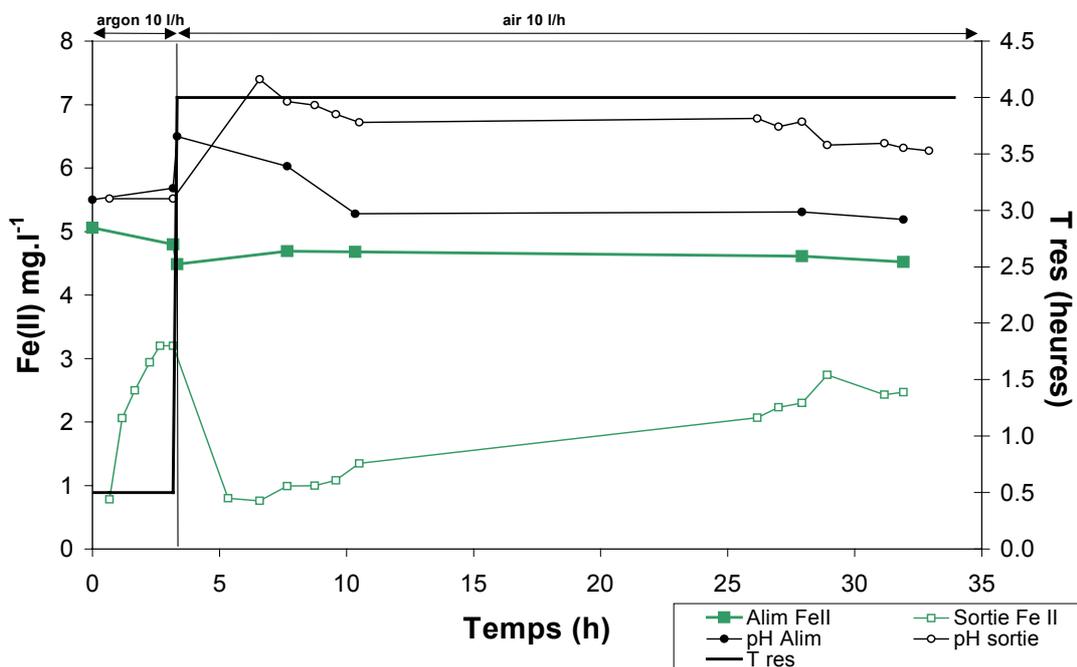


Fig. 21 – Colonne de 2 litres non inoculée : évolution des concentrations en Fe(II), pH et temps de résidence.

6.2.2. Phase 2 : témoin en conditions oxydantes

En présence d'oxygène, Fe(II) est oxydé en Fe(III) et les hydroxydes de fer qui se déposent dans la colonne de pouzzolane peuvent fixer de l'arsenic en absence de bactéries. Effectivement, lorsque de l'air est injecté dans la colonne témoin, une chute rapide des concentrations en As(III), As(V) et Fe(II) en sortie de colonne est constatée (fig. 20 et 21). Cependant, l'oxydation du Fe(II) est moins efficace que dans la colonne inoculée, et les teneurs en As(III) et As(V) en sortie sont toujours supérieures à 100 µg l⁻¹, valeurs nettement plus élevées que lorsque la colonne était colonisée par les bactéries.

Les résultats de la deuxième expérience réalisée dans les mêmes conditions (fig. 22 et 23) sont comparables à ceux de la première expérience. Lors de ce deuxième essai, une condition supplémentaire a été testée : le temps de séjour 0,5 heure en présence d'air. Dans ces conditions, seulement 2 % de l'As(III) et 30 % de l'As(V) sont retenus dans la colonne. Une comparaison des résultats obtenus dans différentes conditions (tabl. 9) montre clairement que les bactéries contribuent à la rétention d'arsenic dans la pouzzolane.

	Colonne témoin sous argon Après 6 temps de séjour	Colonne témoin 10 l h ⁻¹ d'air, temps de séjour 0,5 h, après 8 temps de séjour	Colonne témoin 10 l h ⁻¹ d'air, temps de séjour 4 h, après 6 temps de séjour	Colonne inoculée 10 l h ⁻¹ d'air, temps de séjour 4 h
Pourcentage d'As(III) éliminé	2,5 % +/- 2,5%	2 %	42 % +/- 12%	100 %
Pourcentage d'As(V) éliminé	14 % +/- 4%	31 %	46 % +/- 2%	92 %
Pourcentage de Fe(II) éliminé	26 % +/- 4%	20 %	49 % +/- 12%	100 %

Tabl. 9 – Elimination du fer et de l'arsenic dans une colonne de pouzzolane de 2 litres dans différentes conditions opératoires.

Le pH (fig. 21), qui était équivalent en entrée et sortie de colonne au cours de la phase 1, augmente d'une unité à travers la pouzzolane en présence d'air. Cette augmentation de pH semble donc bien liée à la consommation d'H⁺ au cours de la réaction d'oxydation du fer.

7. Essais à faible temps de séjour, en halle pilote

Au laboratoire, il n'a pas été possible de tester des temps de séjour inférieurs à 4 heures, en raison des volumes d'effluent à gérer pour des temps de séjour plus faibles. Cependant, il a été montré que l'oxydation est complète pour 4 heures de résidence dans le bioréacteur. Pour définir les paramètres d'un procédé applicable sur site, il est nécessaire de tester des temps de séjour plus faibles. Le dispositif décrit au chapitre 5 a donc été transféré dans une halle pilote, et le mode d'alimentation de la colonne a pu être adapté de façon à réduire le temps de séjour jusqu'à 0,5 h.

7.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expériences ont été réalisées dans un bioréacteur colonne identique à celui qui est décrit en 4.1. Le lit de pouzzolane a été inoculé avec des bactéries du site de Loperec de la façon suivante : de la boue (principalement composée d'hydroxydes de fer), déposée dans le bassin présent en aval de l'exhaure, a été prélevée. Après décantation de cette boue, 10 l de surnageant ont été pompés en mode ascendant dans le bioréacteur. Les bactéries en suspension dans le surnageant ont ainsi pu se fixer, se déposer ou s'adsorber sur la pouzzolane. Ensuite, le bioréacteur a été alimenté en continu avec une solution dont la composition était la plus proche possible de celle de l'eau du site. Le mode d'alimentation était descendant, et le lit de pouzzolane était maintenu noyé, avec une lame d'eau d'environ 5 cm d'épaisseur au-dessus du remplissage. Les substances utilisées pour préparer l'effluent synthétique étaient les suivantes : CaCl_2 ; CaCO_3 ; NaHCO_3 ; $\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$; NaCl ; KCl ; KNO_3 ; K_2HPO_4 ; KNO_2 ; NaF ; $\text{MnSO}_4, 1 \text{ H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$ (FeII), Na_2AsO_4 (AsV), As_2O_3 (AsIII). Cet effluent synthétique a été préparé de deux façons différentes. Pour une première expérience, tous les composants étaient dissous dans de l'eau déminéralisée et placés dans un unique fût, dans lequel du gaz N_2 ou Ar était injecté afin d'éviter l'oxydation du Fe(II) et de l'As(III). Une deuxième expérience a été réalisée en séparant d'une part le fer et l'arsenic, préparés en solution concentrée, et d'autre part tous les autres composants de l'effluent, stockés dans un fût. Le gaz inerte permettant d'éliminer l'oxygène était alors injecté uniquement dans la bouteille contenant le Fe(II) et l'As(III). Le pH de l'effluent synthétique était ajusté avec de l' H_2SO_4 . Trois débits d'air injecté dans le bioréacteur ont été appliqués : 10, 5 et $2,5 \text{ l h}^{-1}$. Le temps de séjour de l'effluent dans le bioréacteur a été progressivement diminué de 10 à 0,5 h. Deux fois par jour, les paramètres physico-chimiques (pH, Eh, température) étaient relevés et des échantillons étaient prélevés pour analyser le Fe(II), l'As(III) et l'As(V). De façon moins systématique, des analyses de fer total et de carbonate dissous ont été effectuées. Les carbonates ont été analysés par la méthode de Gran.

7.2. RÉSULTATS

Lors de la première expérience, tous les composants de l'effluent synthétique étaient mélangés dans un même fût, dans lequel un bullage de gaz inerte permettait d'éviter l'oxydation du Fe(II) et de l'As(III). Dans ces conditions, des activités bactériennes d'oxydation du Fe(II) et de l'As(III) médiocres et instables ont été obtenues (fig. 22A et 23A). Cette mauvaise efficacité d'oxydation pourrait être liée à la perte des ions carbonate et bicarbonate, qui ont été éliminés de l'effluent synthétique sous forme de CO₂ à cause du bullage de gaz inerte. En effet, le bullage réalisé à la halle, dans un fût de 100 l opaque, est beaucoup moins contrôlable que le bullage qui était réalisé au laboratoire dans la réserve d'alimentation. Par ce processus de dégazage, l'effluent synthétique perdrait le pouvoir tampon des carbonates que possède l'effluent réel. Une acidification de l'effluent à travers le bioréacteur est effectivement constatée (fig. 24A). Cette chute de pH est liée à la précipitation du Fe(III), issu de l'oxydation du Fe(II), sous forme Fe(OH)₃. La formation de l'hydroxyde de Fe(III) consomme des ions OH⁻. L'activité des bactéries As(III)-oxydantes semble être perturbée par la diminution du pH. Une seconde expérience a donc été mise en route.

De la pouzzolane neuve a été fraîchement inoculée, puis alimentée avec un nouvel effluent synthétique. Ce dernier est constitué de deux solutions pompées séparément, mais se mélangeant dans le tuyau d'alimentation avant d'être injectées dans le bioréacteur. Le bullage de gaz inerte n'a été réalisé que dans le récipient contenant de Fe(II) et l'As(III), et pas dans le fût contenant tous les autres composants de l'effluent, dont les carbonates. Des dosages de carbonates dissous ont confirmé l'absence de carbonates résiduels dans l'effluent synthétique préparé suivant la première méthode, et la présence de carbonates dans l'effluent reconstitué suivant la seconde méthode. Au cours de la deuxième expérience, l'oxydation du Fe(II) dans le bioréacteur est toujours complète (fig. 22B) lorsque le temps de séjour est diminué jusqu'à 0,5 h. Ce résultat suggère que la population bactérienne participe à l'oxydation du Fe(II), car le temps nécessaire pour l'oxydation chimique totale du Fe(II) au pH de l'expérience devrait être supérieur à 0,5 h (Note technique sur l'oxydation du fer et du manganèse dans les eaux minérales, Mars 1999). L'oxydation de l'As(III) est efficace après 7 jours d'alimentation en continu (fig. 23B). Il s'agit probablement du temps nécessaire pour l'établissement des réactions d'oxydation bactériennes. Par la suite, l'oxydation de l'As(III) est complète, et stable pour des temps de séjour supérieurs ou égaux à 1 heure. Lorsque le temps de séjour est diminué de 1 à 0,5 h, l'oxydation est un peu moins stable et complète, bien qu'encore très efficace. Le pH en sortie de bioréacteur est supérieur à celui de l'alimentation, sauf pour le temps de séjour le plus faible (fig. 24B). La consommation d'OH⁻ induite par la formation de Fe(OH)₃ est compensée par l'effet tampon des carbonates. L'augmentation de pH dans le bioréacteur pourrait être liée au dégazage du CO₂ dissous. Ce dégazage n'aurait pas le temps d'être réalisé de façon complète au temps de séjour le plus faible (0,5 h), et dans cette condition particulière, le pH de sortie est un peu plus faible que dans l'alimentation.

Après 10 jours de fonctionnement, la concentration As total en sortie de bioréacteur est inférieure à 100 µg l⁻¹, et se maintient au-dessous de cette valeur lorsque le temps de séjour est diminué jusqu'à 0,5 h (fig. 25). La concentration en As(V) produit par l'oxydation de l'As(III) est donc efficacement fixée par les hydroxydes de Fe(III) formés

au cours du traitement. Lorsque l'activité bactérienne est bien établie, à partir du 20^e jour d'expérience, la concentration en O_2 , entre 2 et 8 $mg\ l^{-1}$, a peu d'influence sur le taux d'oxydation du Fe(II) et de l'As(III) (fig. 26). Le Fe(II) est toujours oxydé à 100 %, et le taux d'oxydation de l'As(III) est supérieur à 90 %.

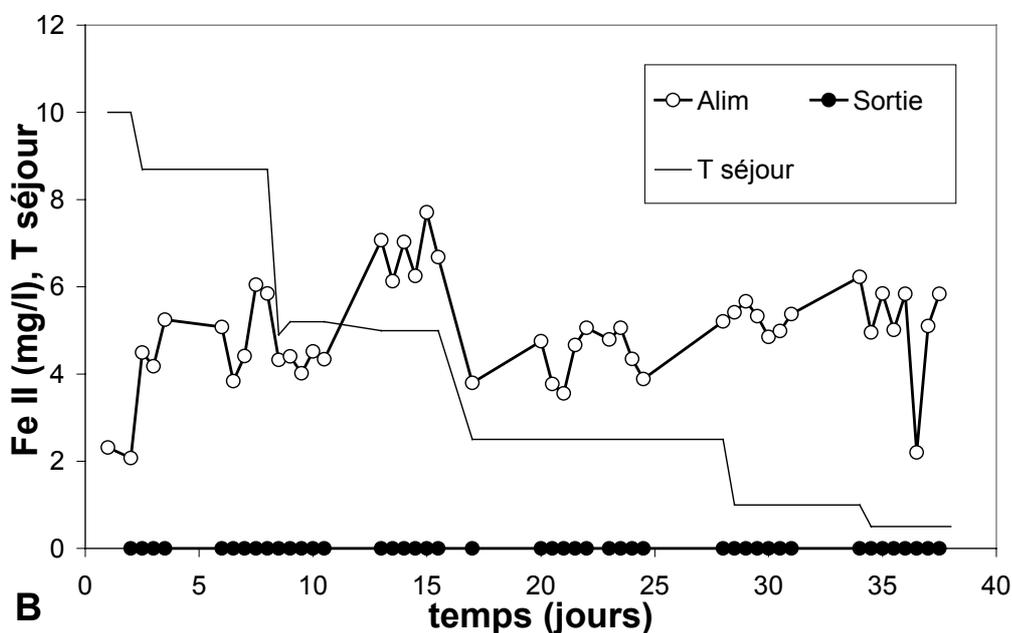
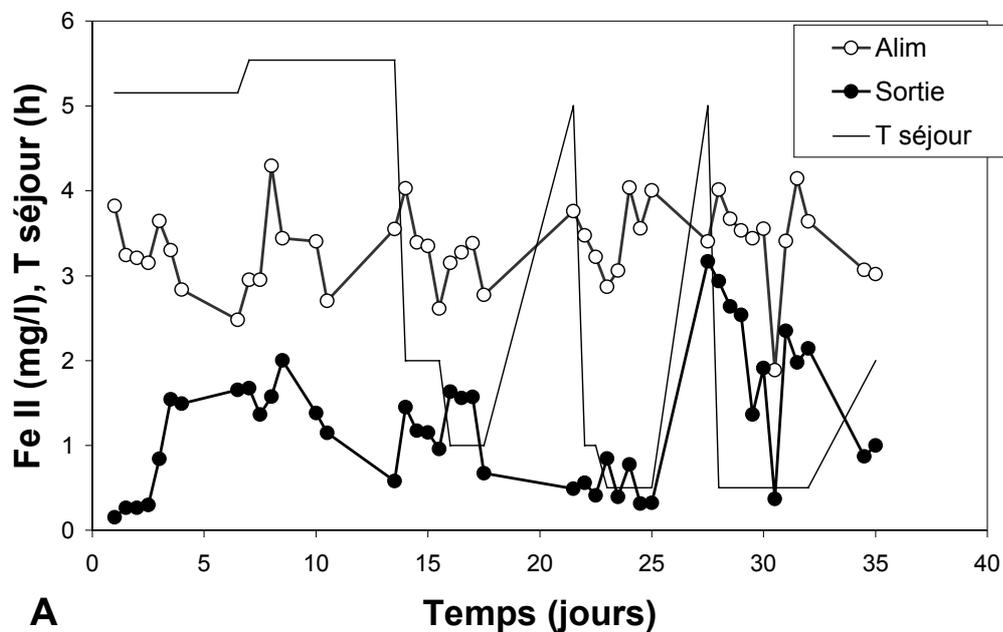


Fig. 22 – Concentration en Fe(II) en alimentation et sortie de bioréacteur, et temps de séjour. (A) expérience 1 avec 1 fût d'alimentation contenant tous les composants de l'effluent synthétique ; (B) expérience 2 avec alimentation séparée en Fe(II) et As(III).

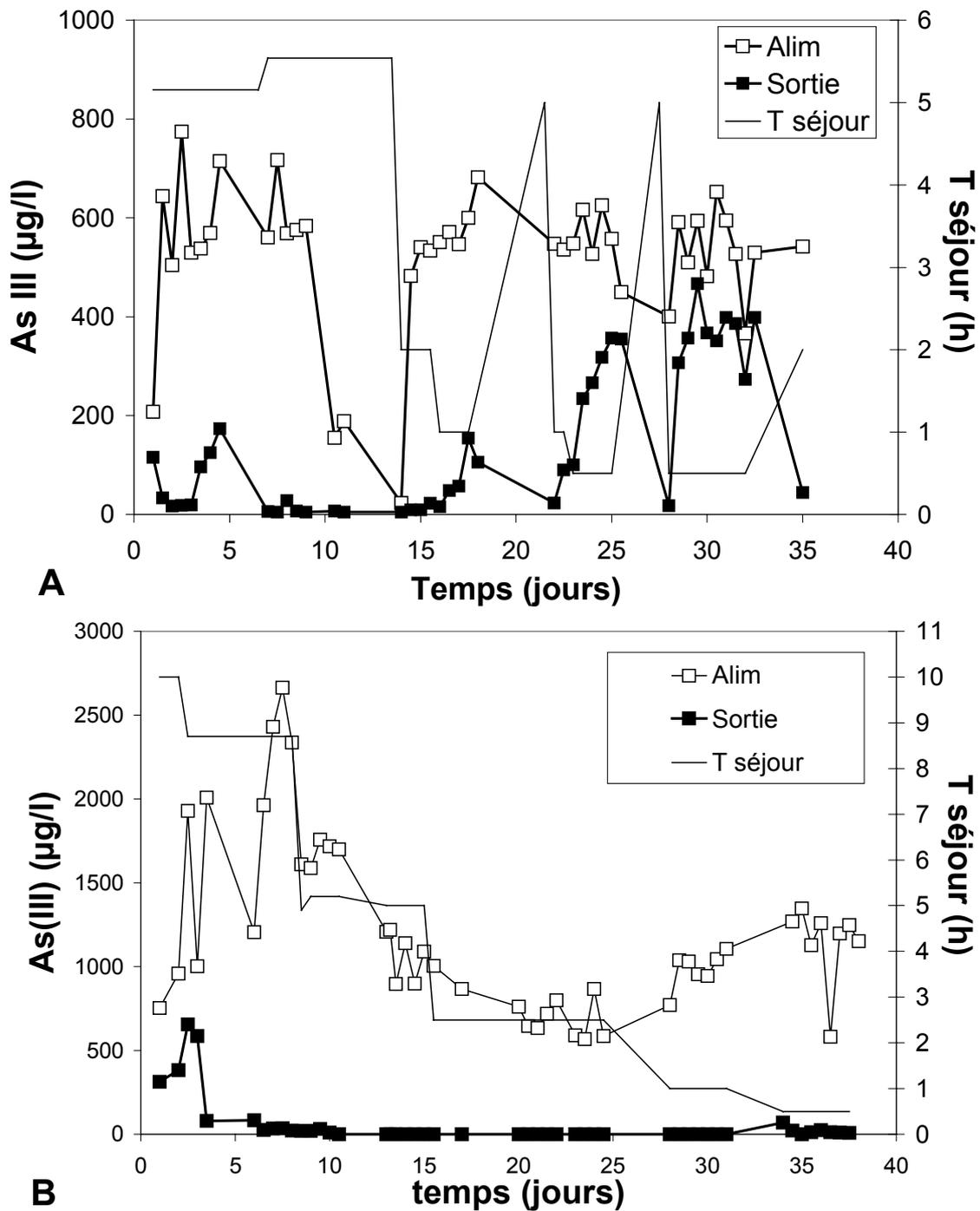


Fig. 23 – Concentration en As(III) en alimentation et sortie de bioréacteur, et temps de séjour. (A) expérience 1 avec 1 fût d'alimentation contenant tous les composants de l'effluent synthétique ; (B) expérience 2 avec alimentation séparée en Fe(II) et As(III).

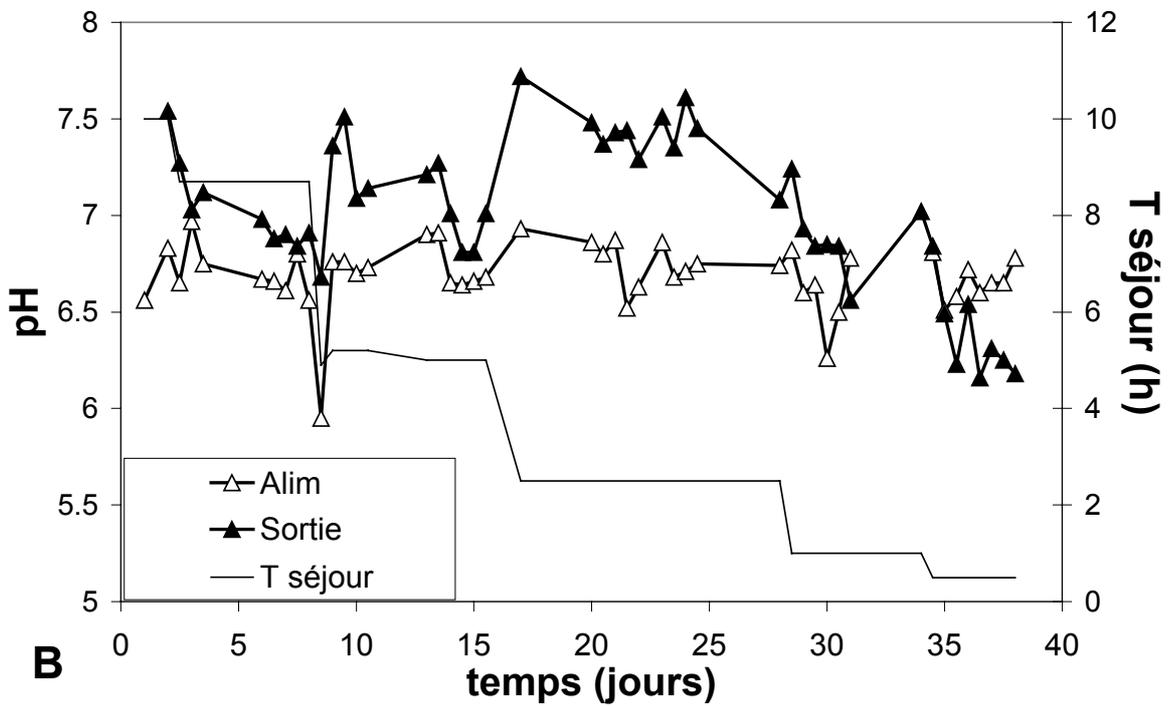
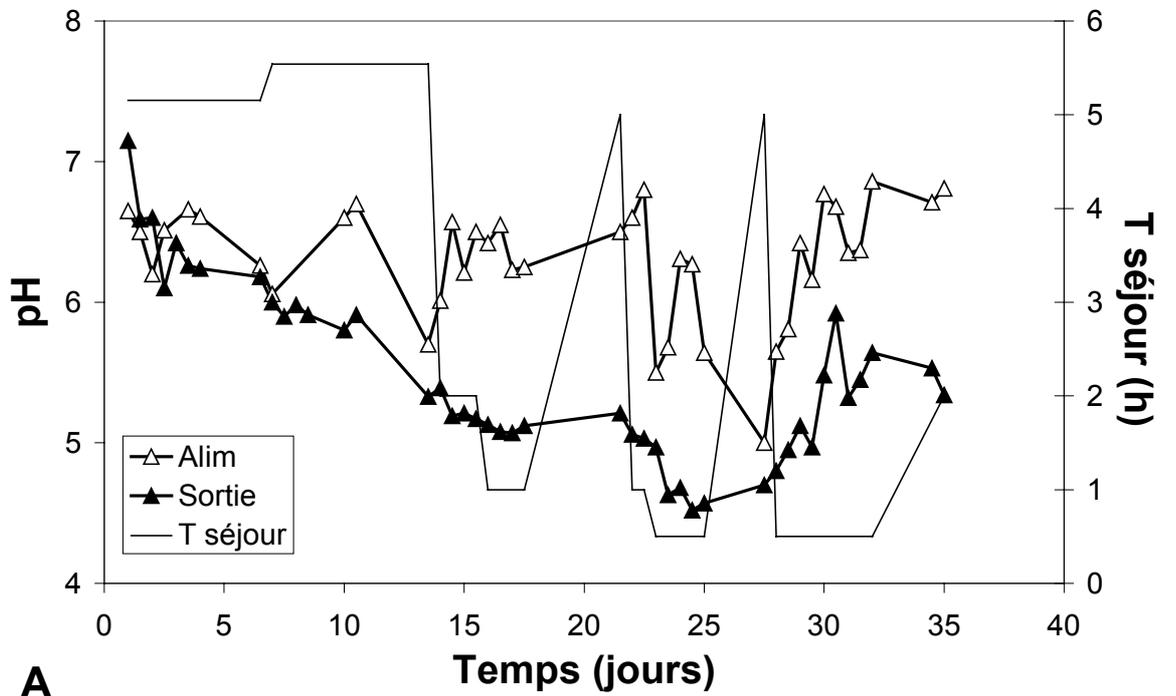


Fig. 24 – pH mesuré dans l'alimentation et en sortie de bioréacteur, et temps de séjour. (A) expérience 1 avec 1 fût d'alimentation contenant tous les composants de l'effluent synthétique ; (B) expérience 2 avec alimentation séparée en Fe(II) et As(III).

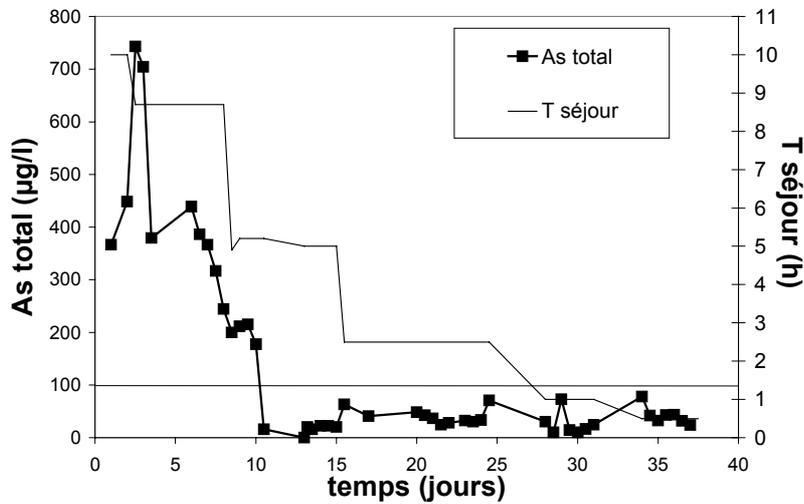


Fig. 25 – Arsenic total en sortie de bioréacteur au cours de l'expérience 2 avec alimentation séparée en Fe(II) et As(III).

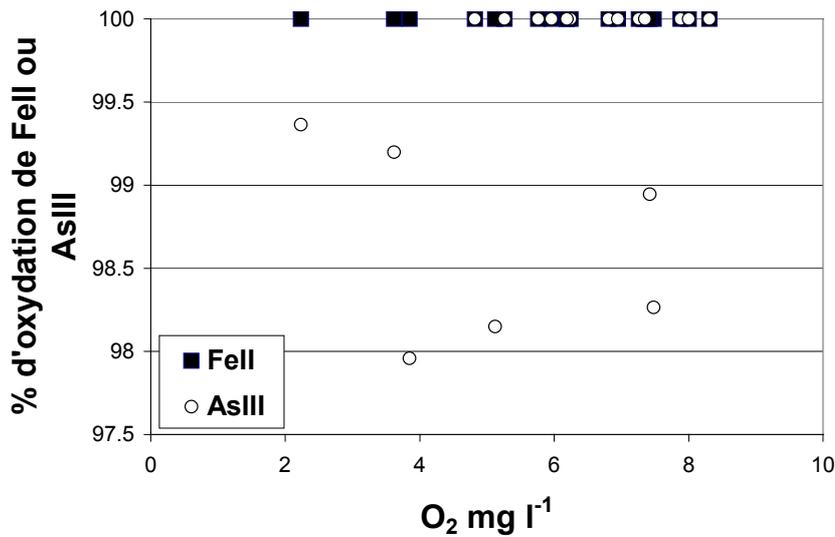


Fig. 26 – Influence de la concentration en oxygène dans le bioréacteur sur les taux d'oxydation du Fe(II) et de l'As(III). Résultats obtenus lors de l'expérience 2, à partir du 20^e jour de traitement.

Les résultats des expériences réalisées en halle pilote confirment et complètent ceux qui avaient été obtenus au laboratoire : une oxydation complète de l'As(III) et du Fe(II) est bien réalisée par des bactéries présentes sur le site de Loperec, pour un temps de séjour supérieur ou égal à 0,5 h, à condition que les carbonates dissous soient conservés dans l'effluent synthétique. Une concentration en O₂ dissous égale à 2 mg l⁻¹ est suffisante pour assurer l'efficacité du traitement.

8. Essai sur site

Après avoir défini au laboratoire et à la halle pilote l'influence des principaux paramètres opératoires sur l'efficacité du traitement, il est nécessaire de démontrer que le dispositif étudié est aussi efficace avec l'effluent réel de Loperec qu'avec un effluent synthétique.

8.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le bioréacteur inoculé correspondant à la deuxième expérience en halle pilote, ayant fonctionné 40 jours avec de l'effluent synthétique, a été transporté sur le site. Un deuxième bioréacteur, identique au premier, rempli de pouzzolane mais non inoculé, a été installé sur le site et alimenté avec de l'effluent réel en parallèle avec le bioréacteur inoculé au BRGM. Le temps de séjour était fixé à 1 h et le débit d'air injecté à 5 l h^{-1} .

Les objectifs de cette expérience étaient les suivants : (1) vérifier que les performances obtenues avec un effluent synthétique peuvent être au moins égales avec l'effluent réel, et (2) évaluer le temps nécessaire pour qu'un lit de pouzzolane neuve soit colonisé par les bactéries présentes dans l'eau du site.

Les prélèvements et relevés des paramètres sur site ont été effectués quotidiennement en début d'essai, puis une fois par semaine.

8.2. RÉSULTATS

Lors de la mise en route de cette expérience, l'exhaure réel contient entre 300 et $450 \mu\text{g l}^{-1}$ d'As(III) et environ $100 \mu\text{g l}^{-1}$ d'As(V). Le bioréacteur inoculé au laboratoire permet d'oxyder efficacement l'As(III) dès le premier jour de fonctionnement sur site (fig. 27A). L'eau traitée dans ce dispositif contient moins de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ d'As total (fig. 27B). A la sortie du bioréacteur non inoculé, la concentration en As(III) est proche de $200 \mu\text{g l}^{-1}$ au début de l'expérience, puis diminue pour atteindre des valeurs inférieures à $10 \mu\text{g l}^{-1}$ après 15 jours de fonctionnement (fig. 26A). Parallèlement à cette mise en place de l'activité bactérienne As(III)-oxydante, la concentration en As total chute de 300 à moins de $10 \mu\text{g l}^{-1}$. La concentration en fer ferreux dans l'exhaure est comprise entre 6 et 8 mg l^{-1} (fig. 28). Comme pour l'arsenic, une oxydation totale est immédiatement réalisée dans le réacteur inoculé au laboratoire, et 15 jours sont nécessaires pour obtenir le même résultat avec le réacteur contenant de la pouzzolane fraîche. Ce résultat confirme sans ambiguïté la participation des bactéries à l'oxydation du Fe(II) : toutes conditions égales par ailleurs, l'injection d'air n'oxyde pas le fer aussi efficacement dans le réacteur non inoculé que dans le réacteur inoculé. Il faut également 2 semaines pour que le potentiel redox en sortie des deux réacteurs soit équivalent (fig. 29). Environ 15 jours sont donc nécessaires pour installer sur de la pouzzolane fraîche un biofilm efficace, formé avec des bactéries apportées par l'exhaure. Le pH en sortie de réacteurs est un peu plus élevé que le pH de l'exhaure

(fig. 30). Ce résultat est proche de celui qui a été obtenu avec l'effluent synthétique préparé au cours de l'expérience de laboratoire n° 2, dans lequel les carbonates dissous étaient conservés. La présence de carbonate dissous dans l'exhaure permet d'éviter l'acidification de l'eau par la précipitation des hydroxydes de fer. La concentration en oxygène dissous dans l'exhaure est inférieure à la limite de détection de l'appareil de mesure ($0,1 \text{ mg l}^{-1}$). L'injection d'air dans les colonnes permet d'obtenir entre 2 et 3 mg l^{-1} d'oxygène dissous, quantité suffisante pour oxyder totalement le Fe(II) et l'As(III).

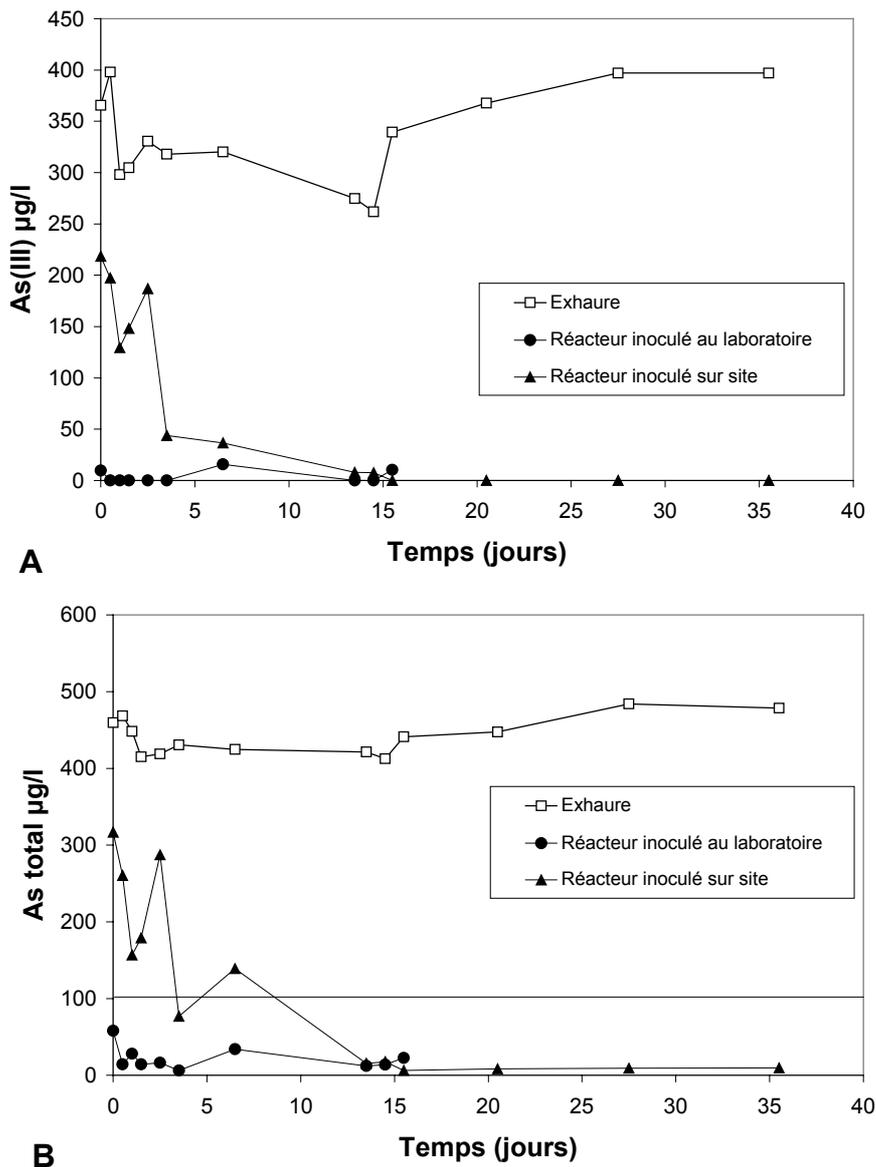


Fig. 27 – Expérience sur site, évolution de la concentration en arsenic dans l'exhaure et en sortie des bioréacteurs. A : As(III) ; B : As total.

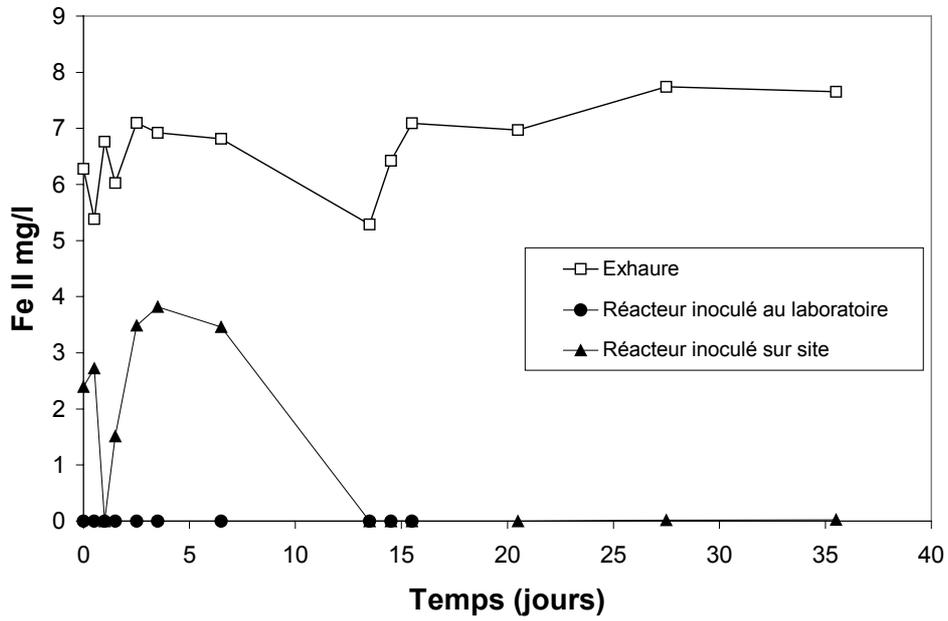


Fig. 28 – Expérience sur site, évolution de la concentration en Fe(II) dans l'exhaure et en sortie des bioréacteurs.

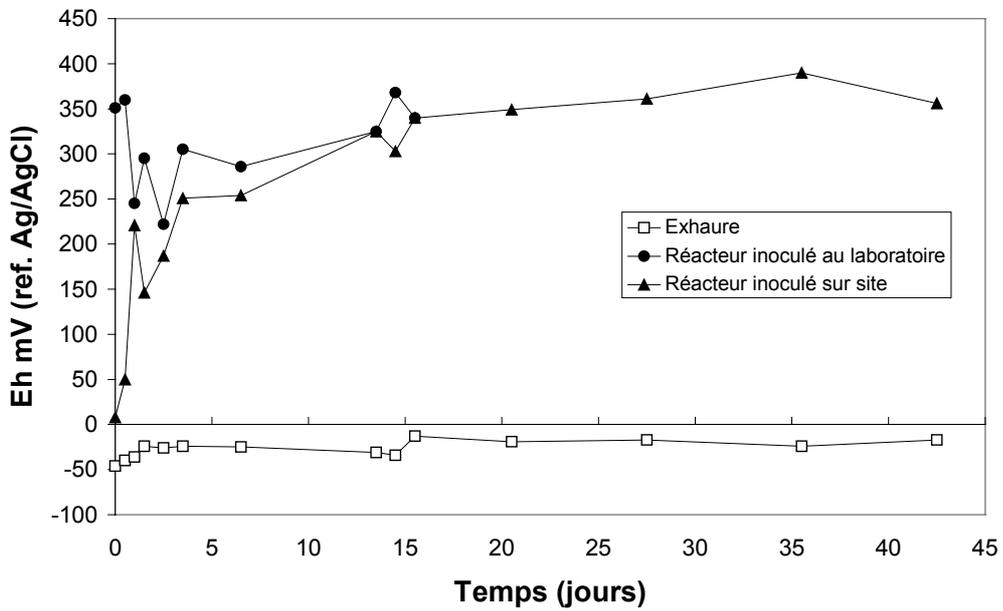


Fig. 29 – Expérience sur site, évolution du potentiel redox (ref. Ag/AgCl) de l'exhaure et en sortie des bioréacteurs.

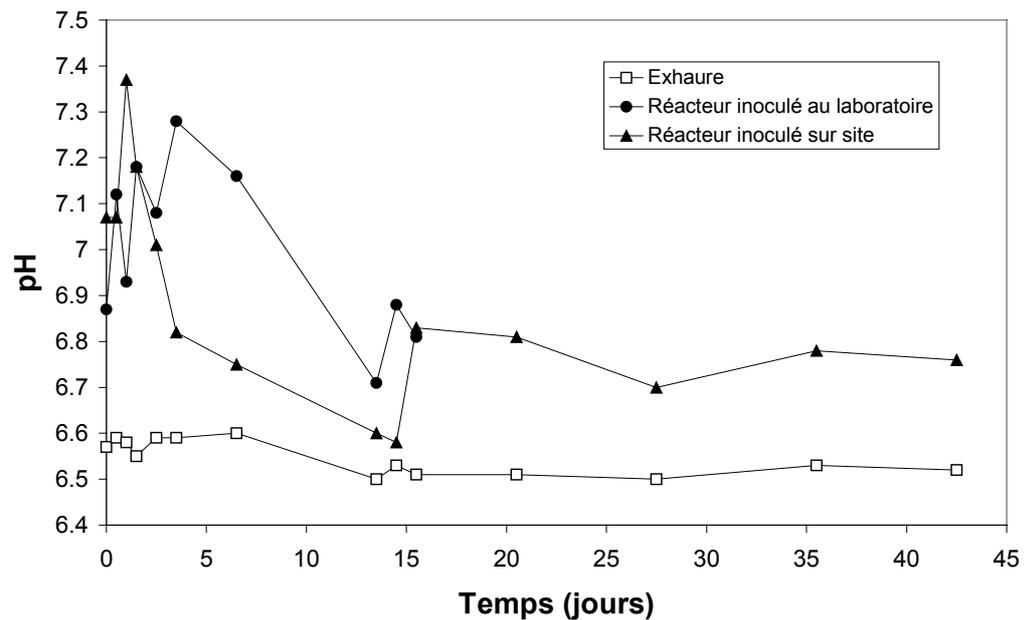


Fig. 30 – Expérience sur site, évolution du pH de l'exhaure et en sortie des bioréacteurs.

9. Comparaison de cinétiques

Les vitesses d'oxydation d'As(III) par les bactéries du site de Loperec, obtenues dans différentes conditions, sont comparées dans le tableau 10.

Conditions expérimentales	Vitesse d'oxydation de l'As(III) $\mu\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$
Batch, milieu CSM, 25°C, 100 mg l ⁻¹ d'As(III)	1500
Batch, réacteur d'enrichissement < 10 mg l ⁻¹ d'As(III)	33
Batch, réacteur d'enrichissement = 10 mg l ⁻¹ d'As(III)	45
Batch, réacteur d'enrichissement = 100 mg l ⁻¹ d'As(III)	120
Continu, colonne de 20 ml inoculée, T résidence 0,5 h	1200
Continu, colonne de 2 litres inoculée, laboratoire, T résidence 4 h	117
Continu, colonne de 2 litres inoculée, halle pilote, T résidence 0,5 h	1900
Continu, colonne de 2 litres inoculée, halle pilote, T résidence 1 h	980
Continu, colonne de 2 litres inoculée, sur site, T résidence 1 h	288

Tabl. 10 – Comparaison de vitesses d'oxydation de l'As(III) obtenues dans différentes conditions expérimentales.

La comparaison des vitesses obtenues dans différentes conditions expérimentales montre qu'il est possible d'atteindre une vitesse d'oxydation de l'As(III) supérieure à 1000 $\mu\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$, à 12 °C et sans nutriments ajoutés.

Une vitesse égale à 1 200 $\mu\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ a été obtenue dans la colonne de 20 ml, à 0,5 h de temps de séjour. Il s'agit d'une vitesse « vraie », car de l'As(III) était détecté en sortie de colonne.

La vitesse la plus élevée, 1 900 $\mu\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$, a été obtenue lors de l'expérience en colonne de 2 L réalisée à la halle pilote (expérience n° 2). Le bioréacteur était alors alimenté avec un effluent synthétique contenant 1 000 $\mu\text{g l}^{-1}$ d'As(III), et fonctionnait à 0,5 h de temps de séjour. Cette vitesse est du même ordre de grandeur que celle qui avait été obtenue en début de projet, dans des conditions de batch, à 25 °C, avec un milieu de culture de laboratoire (CSM) contenant 100 mg l⁻¹ d'As(III).

Sur site, la vitesse d'oxydation est plus faible car l'effluent réel ne contient « que » 300 $\mu\text{g l}^{-1}$ d'As(III). Il est possible que le réacteur fonctionne en sous-régime, et qu'il soit possible de travailler à un temps de séjour inférieur à 1 heure. Cependant, une marge de sécurité au niveau du temps de séjour « théorique » pourrait être conservée afin que les objectifs de traitement soient bien atteints de façon stable. En effet, le débit de l'exhaure et la concentration en As(III) sur site sont des paramètres variables au cours du temps.

10. Dimensionnement d'un procédé de traitement biologique

10.1. CONFIGURATION DU RÉACTEUR

Durant ce travail, plusieurs configurations ont été envisagées, avec des alimentations par le bas, horizontales et par le haut. Des configurations différentes ont aussi été considérées pour la bio-oxydation de l'arsenic et le piégeage des précipités de ferrihydrite. Au final, compte tenu des inconnues sur la cinétique de formation et d'adsorption des ferrihydrites, l'idée est née de dimensionner un réacteur générique, facile de mise en oeuvre, utilisable pour la bio-oxydation et le piégeage de la ferrihydrite. La mise en série d'un nombre donné de réacteurs permet d'obtenir l'épuration souhaitée de l'effluent.

Le réacteur représenté à la figure 31 comporte plusieurs zones distinctes :

- un pot de détente pour assurer une alimentation uniforme du flux vers le lit ainsi qu'une oxygénation au minimum à 2 mg/l O₂ ;
- un compartiment dit de traitement d'une surface effective de 20 m², soit 4,5 m × 4,5 m¹. Ce compartiment comprend un lit filtrant et bio-oxydant de 30 cm d'épaisseur posé sur une sous-couche drainante de 30 cm. La sous-couche drainante a une granulométrie de 5 x 10 mm. La sous-couche drainante s'écoule à travers une grille de 2 mm ;
- un ouvrage de sortie d'une hauteur qui garantisse l'ennoyage du compartiment filtrant et permette une chute de l'effluent pour une bonne oxygénation.

Le volume du lit filtrant est $0,3 \text{ m} \times 20 \text{ m}^2 = 6 \text{ m}^3$. Avec la couche drainante, cela fait un volume total de 12 m³. Pour un débit maximum de 20 m³ h⁻¹, le temps de séjour dans un réacteur est 36 minutes, ce qui est conforme à la base de calcul de 30 minutes. Il est possible d'augmenter l'épaisseur de la couche traitante pour rallonger le temps de séjour par réacteur.

Les calculs (cf. ann. 1) ont indiqué la nécessité de disposer de 27 m³ pour la bio-oxydation et 23 m³ pour le piégeage des ferrihydrites. Les derniers résultats des expériences conduites sur site montrent que l'oxydation de l'As et la précipitation des ferrihydrites ont lieu dans le temps de séjour de 30 minutes. Ce résultat n'était pas attendu au début de l'étude, puisqu'on envisageait des processus consécutifs. Compte tenu du fait que ces processus ont lieu dans le même lit de pouzzolane, il suffira d'un volume total de réacteur de 27 m³. Cela correspondrait à peu de choses près à 2 réacteurs de 12 m³ chacun en parallèle.

¹ Le ratio longueur / largeur du réacteur est modifiable dans la mesure où le produit longueur × largeur reste supérieur à 20 m².

Le calcul montre que la perte de charge des lits est négligeable, même pour les moins grenus. De plus, la perte de charge due au géotextile et à la grille placée à la sous-verse du lit est aussi millimétrique. On ne peut donc pas compter sur ces pertes de charges pour assurer l'ennoyage du lit. De ce fait, l'ouvrage de sortie est positionné à une hauteur supérieure de la surface du lit de pouzzolane, de manière à maintenir une hauteur d'eau au-dessus du lit filtrant. Cela permettra de maintenir une vitesse de filtration uniforme sur la surface du lit filtrant/bio-oxydant et évitera le phénomène de bulles d'air dans le lit.

L'ouvrage de sortie comprendra une vanne guillotine pour pouvoir vidanger les réacteurs.

Le réacteur sera recouvert d'une grille de 10 mm pour éviter que des objets grossiers (ex. feuilles) ne tombent dans le réacteur et que les animaux ne s'y abreuvent. Par sécurité, un dégrillage est prévu à l'amont du lit.

Comme ces filtres sont voués à se colmater progressivement, le mur à l'aval du filtre est de faible hauteur au-dessus du lit de manière à permettre le débordement en cas de colmatage complet du lit de sable. La montée de la charge hydraulique au-dessus du lit sera un indicateur de colmatage du lit, et son suivi déclenchera le curage du réacteur.

Une conduite de by-pass, avec une valve manuelle, est incluse pour permettre d'isoler un réacteur qui nécessite de la maintenance.

Le suivi du procédé se fera aux points (A) et (B) pour chaque réacteur.

10.2. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

L'analyse préliminaire indique que le traitement de l'exhaure de Lopérec par un couplage de bio-oxydation de l'arsenic et adsorption de l'arsenic sur des précipités de ferrihydrite formés à partir du seul fer de l'effluent génère environ 1 tonne de ferrihydrite par an.

Au total, il est nécessaire de disposer d'un volume de 27 m³ pour la bio-oxydation et de 23 m³ pour le piégeage des précipités de ferrihydrite.

Compte tenu de l'impossibilité de séparer la bio-oxydation de l'arsenic de la formation des précipités de ferrihydrite, une configuration d'un réacteur générique de bio-oxydation / filtration est proposée. Ce réacteur d'une surface effective de traitement de 20 m² (4,5 m × 4,5 m) comprend un lit de traitement et une sous-couche drainante de 30 cm d'épaisseur chacun. La sous-couche drainante fait aussi office de lit traitant.

Le calcul suggère 2 réacteurs en parallèle. Ce chiffre considère un volume poreux 10 fois supérieur au volume strictement nécessaire au stockage des précipités de fer,

ce qui devrait permettre d'isoler un réacteur colmaté pour maintenance sans affecter la performance du circuit global. La configuration des réacteurs est telle qu'il est aisé de prélever des échantillons amont-aval de manière à effectuer un suivi du circuit. Chaque réacteur nécessite environ 8 tonnes de pouzzolane.

Enfin, il n'est pas impossible qu'une partie du fer de l'effluent puisse précipiter avant que l'oxydation de l'arsenic ne soit terminée. Dans ce cas, le système pourrait être en manque de fer pour assurer le piégeage de l'arsenic. Pour pallier cette éventualité, il est envisageable de placer des tournures de fer doux ou autres copeaux de fer dans le pot de détente des réacteurs pour l'ajout passif de Fe^{3+} au système.

Des travaux complémentaires de dimensionnement et d'ingénierie sont en cours de réalisation par BRGM-SA, avant une installation du procédé sur le site.

11. Conclusion

L'effluent minier de Loperec contient du fer ferreux et de l'arsenic, présent sous forme As(III) et As(V). Sur le site tel qu'il se présente actuellement (en décembre 2003), le fer et l'arsenic sont partiellement oxydés avant que l'effluent soit fortement dilué dans la rivière. Les réactions d'oxydation sont incomplètes, et des précipités de fer se déposent sur tout le trajet de l'effluent en amont du point de rejet. L'optimisation des processus d'oxydation et de co-précipitation du fer et de l'arsenic permettrait de stopper la dissémination de ces deux éléments dans l'environnement du site.

Les expériences réalisées entre janvier 2001 et décembre 2003 ont fourni les informations suivantes :

- des bactéries capables d'oxyder l'As(III) sont omniprésentes sur le site ;
- l'oxydation biologique peut être réalisée à 12 °C et sans apport de nutriments ;
- la comparaison de systèmes stériles et non stériles montre que les bactéries jouent un rôle de catalyseur de l'oxydation de l'As(III) non négligeable ;
- un lit fixé de pouzzolane inoculé avec les bactéries du site permet d'oxyder efficacement l'As(III) et le Fe(II) en 0,5 heure avec seulement 2 mg l⁻¹ d'O₂.

Les essais réalisés à la halle pilote, avec un effluent synthétique, ont montré qu'un temps de séjour de 30 mn permet d'oxyder totalement l'As(III) et le Fe(II). Cependant, le dispositif fonctionne de façon plus stable lorsqu'un temps de résidence d'une heure est appliqué. L'efficacité et la stabilité du procédé sont liées à la présence de carbonates dissous dans l'effluent réel. En effet, leur pouvoir tampon compense l'acidification induite par la précipitation des hydroxydes de fer. Une chute de pH ralentirait le processus d'oxydation du fer, et pourrait inhiber l'oxydation de l'arsenic.

Une expérience mise en place sur site a confirmé la validité des résultats obtenus au laboratoire. Un bioréacteur contenant de la pouzzolane fraîche a été colonisé par les bactéries présentes dans l'effluent réel, et la mise en place d'une activité bactérienne efficace a été réalisée en 15 jours. L'As(V) se fixe sur les hydroxydes de fer formés au cours du traitement, et la concentration résiduelle en As total est nettement inférieure à 100 µg l⁻¹. Le dispositif proposé permettrait donc d'atteindre les objectifs fixés pour un rejet de l'effluent dans le milieu naturel. Les expériences réalisées au laboratoire, à la halle pilote et sur site ont donc démontré, à l'échelle du réacteur de 2 litres, la faisabilité technique d'un procédé de traitement passif pour l'élimination de l'arsenic et du fer dans l'effluent minier de Loperec. Un premier schéma de procédé opérationnel a ainsi pu être ébauché et devrait être prochainement finalisé.

Cependant, certains points restent à éclaircir au plan scientifique. Les bactéries responsables de l'oxydation de l'arsenic sont difficilement cultivables « in vitro ». Une seule souche As-oxydante a pu être isolée, et il est certain que d'autres organismes participent à l'oxydation de l'As(III). Des méthodes de biologie moléculaire vont être appliquées sur les échantillons de l'expérience en colonne de 2 litres et sur des échantillons du site afin d'élucider ce problème.

12. Références

Baranger Ph., Amraoui N., Azaroual M., Baltassat J.M., Battaglia-Brunet F., Bodénan F., Dictor M.C., Kervévan C., Lassin A., Piantone P. (2003) – Analyse du transfert de l'arsenic sur un ancien site minier (site de Chéni) : approche bi-hydrogéochimique. BRGM/RP-52504-FR, 191 p.

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, characterisation, and performance in reactors. *J. appl. Microbiol.*, n° 93, p. 656-667.

Coupland K., Battaglia-Brunet F., Hallberg K. B., Dictor M. C., Garrido F., Johnson D.B. (2003) - Oxidation of iron, sulfur and arsenic in mine waters and mine wastes: an important role for novel *Thiomonas*, spp.. International Biohydrometallurgy Symposium, Athens 13-15 sept.

Davis D.H., Doudoroff M., Stanier R., Mandel M. (1969) - Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas* : taxonomic implications. *Internation. J. Syst. Bacteriol.*, 19, p. 375-390.

Division Nationale des Eaux Minérales et Thermales, Bureau de Recherche Géologiques et Minières. Le traitement du fer et du manganèse dans les eaux minérales. Note technique n°14, mars 1999, 18 p.

Fisher P.R., Appleton J., Pemberton J.M. (1978) - Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid pJP1 from *Alcaligenes paradoxus*. *J. Bacteriol.*, U.S.A., p. 798-804.

Itard Y., Crouzet C., Greffié C. (2004) - Tests de précipitation du fer et de l'arsenic par bullage d'air sur l'effluent minier de Loperec. BRGM/RP-53419-FR, 57 p.

Kamijo M., Suzuki T., Kawai K., Murase H. (1998) - Accumulation of yttrium by *Variovorax paradoxus*. *J. Ferment. Bioeng.*, 86, p. 564-568.

Kattsoyiannis I.A., Zouboulis A.I. (2003) - Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwater. *Wat. Res.*, In press.

Leadbetter J.R., Greenberg E.P. (2000) - Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.*, 182, p. 6921-6926.

Russel A., Thomas P., Lawlor K., Bailey M., Macaskie L.E. (1998) - Biodegradation of Metal-EDTA complexes by an enriched microbial population. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, p. 1319-1322.

Suyama T., Hosoya H., Tokiwa Y. (1998) - Bacterial isolates degrading aliphatic polycarbonates. *FEMS Microbiol. Lett.*, 161, p. 255-261.

Annexe 1

Identification de la souche L4.2



DSMZ Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig

BRGM
Dr. Fabienne Battaglia-Brunet
B.P. 6009.
3 Av. Claude Guillemin
F-45060 Orleans Cedex 2

Ihr Zeichen / Your ref.

Unser Zeichen / Our ref.

Tel.
0531/2616-
231

Datum / Date

1st September 2003

DSMZ-IDENTIFICATION SERVICE

Dear Madam,

we have now completed the studies for the identification of your strain

L 4.2 - ID 03-978

For the result please see the report attached.

According to the present taxonomy the above mentioned strain can be affiliated to the genus and species mentioned in the protocol.

Pathogenity was not tested.

Yours sincerely,

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Susanne Verberg'.

Dr. Susanne Verberg

Encl.: identification report

Geschäftsführer:
Prof. Dr. Erko Stackebrandt
Aufsichtsratsvorsitzender:
MR Dr. Axel Kohlatschny

Bankkonten:
NORD/LB Braunschweig, Kto.-Nr. 2 039 220 (BLZ 250 500 00)
SWIFT: NOLADE 2H
Postbank Hannover, Kto.-Nr. 1060 79 - 304 (BLZ 250 100 30)

Registergericht:
Amtsgericht Braunschweig
HRB 2570

DSMZ - Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig - Germany
Telefon: 0531/2616-0
Telefax: 0531/2616-418
E-mail: help@dsmz.de
URL: http://www.dsmz.de

DSMZ

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH



Identification of strain L 4.2
(DSM ID 03-978)

1.9.2003

Variovorax paradoxus

Properties of the strain

Shape of cells rods
width µm 0.5-0.7
length µm 1.5-3.0

Result: strain L 4.2
= *Variovorax paradoxus*

Gram reaction -
Lysis by 3% KOH +
Aminopeptidase (Cerny) +

The partial sequence of the 16SrDNA shows similarities of 99.5% to 99.8% to different strains of *Variovorax paradoxus*. Other similarities are lower.

Oxidase +
Catalase +

The profile of the cellular fatty acids show the characteristic components.

Pigmentation yellow

The physiological test results almost confirm this identification.

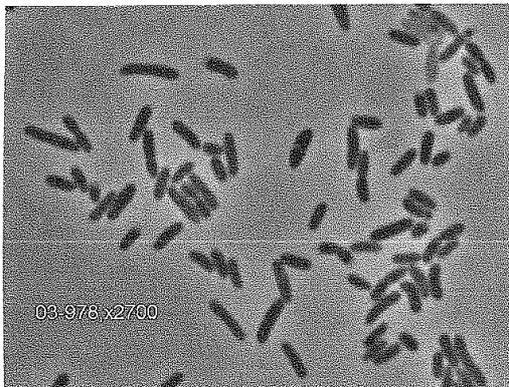
ADH -

Urease +

Magnification: ~ 2700 x

Hydrolysis of gelatine -

Utilization of
glucose +
phenylacetat +
citrat -
malat +
arabinose +
gluconat +
adipat -
mannitol +
D-xylose -
pimelat -
acetat -
D-fructose -
sebacinat -



Hydrolysis of esculine -

Autotrophic growth -

Nitratereduction -

Denitrification -

E037174.14A [5539] UN-V-03-978-L4/2-BRGM(R2A,1d)

Page 1

Volume: DATA File: E037174.14A Seq Counter: 9 ID Number: 5539
 Type: Samp Bottle: 30 Method: TSBA40
 Created: 7/17/2003 1:23:24 PM
 Sample ID: UN-V-03-978-L4/2-BRGM(R2A,1d)

Profile: PERCENT NAMED IS LESS THAN 85.00. CHECK FOR CONTAMINATION.

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.652	2.112E+8	0.022	----	6.993	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.756	646	0.021	----	7.186		----	< min rt	
1.780	1087	0.030	----	7.232		----	< min rt	
1.940	910	0.024	----	7.529		----	< min rt	
4.400	1683	0.028	1.130	11.420	10:0 3OH	5.51	ECL deviates -0.002	
4.963	1785	0.031	1.099	12.000	12:0	5.68	ECL deviates 0.000	Reference -0.013
9.527	1658	0.042	0.964	15.206	14:0 2OH	4.63	ECL deviates -0.003	
10.574	13268	0.041	0.945	15.820	Sum In Feature 3	36.29	ECL deviates -0.002	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.881	8696	0.040	0.940	16.000	16:0	23.65	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
12.447	1389	0.049	0.916	16.888	17:0 CYCLO	3.68	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
12.729	1028	0.042	0.912	17.047	16:1 2OH	2.71	ECL deviates -0.001	
14.110	6890	0.045	0.895	17.821	18:1 w7c	17.85	ECL deviates -0.002	
15.141	8774	0.156	----	18.409		----	> max ar/ht	
16.016	6151	0.146	0.875	18.904	19:0 CYCLO w8c	----	> max ar/ht	
18.536	772	0.073	----	20.350		----	> max rt	
18.773	614	0.053	----	20.486		----	> max rt	
19.491	14523	0.046	----	20.899		----	> max rt	
19.565	2470	0.049	----	20.941		----	> max rt	
19.693	4351	0.048	----	21.015		----	> max rt	
19.759	969	0.041	----	21.053		----	> max rt	
19.856	501	0.044	----	21.109		----	> max rt	
----	13268	----	----	----	Summed Feature 3	36.29	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0.002 Reference ECL Shift: 0.008 Number Reference Peaks: 3

Total Response: 51322

Total Named: 36397

Percent Named: 70.92%

Total Amount: 39929

Profile: PERCENT NAMED IS LESS THAN 85.00. CHECK FOR CONTAMINATION.

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA40 4.10	0.246	Variovorax-paradoxus-GC subgroup B (Alcaligenes paradoxus)
	0.128	Pseudomonas-fluorescens-biotype F

Annexe 2

Calculs préliminaires pour le dimensionnement d'un circuit de piégeage de l'arsenic

INTRODUCTION

L'exhaure minier du site de Lopérec nécessite un circuit de traitement passif pour l'élimination de l'arsenic et du fer contenus avant déversement dans le milieu. L'objectif de ce rapport est de proposer et de dimensionner un schéma de traitement passif de l'exhaure. Le principe du traitement passif repose sur 2 processus principaux :

- l'oxydation de l'arsenic As(III) en As(V) par bio-oxydation ;
- précipitation du fer contenu dans l'effluent sous la forme de ferrihydrite et adsorption de l'As(V) sur la ferrihydrite.

BASES DE CALCUL

Les contraintes choisies pour l'analyse et les calculs préliminaires de dimensionnement du circuit sont présentés ci-après.

CONTRAINTES DE DIMENSIONNEMENT

Alimentation

- Débit max : $Q_{\max} = 20 \text{ m}^3/\text{h} = 5.6 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}$
- Débit moyen : $Q_{\text{moy}} = 10 \text{ m}^3/\text{h} = 2.8 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}$

Bio-oxydation de l'arsenic

- Temps de séjour minimum dans le lit de pouzzolane : $T_s, \text{ min} = 30 \text{ mn}$
- Granulométrie de la pouzzolane : $5 \times 10 \text{ mm}$

AUTRES HYPOTHESES

Ci-dessous la synthèse des hypothèses utilisées pour les calculs, certaines étant le résultat de mesures.

Alimentation

- Teneurs moyennes : Fe : 6,3 mg/l ; As : 0,5 mg/l (cf. fig. (2))
- Ratio moyen Fe/As = 24,4 (cf. fig. (1))

Bio-oxydation de l'arsenic

- Porosité en vrac de la pouzzolane $5 \times 10 \text{ mm}$ est: $\Phi_{\text{pouzzolane}} (5 \times 10 \text{ mm}) = 0,37$

Piégeage de l'arsenic par adsorption sur les ferrihydrites

- Formule approximative de la ferrihydrite : $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$
- Densité en vrac des précipités de ferrihydrite : $1\,132 \text{ kg}/\text{m}^3$
- Densité des précipités de ferrihydrite : $1\,187 \text{ kg}/\text{m}^3$

- Porosité inter-précipités : 35 %

Autres

- Pente de tuyaux d'exhaure : 3 ‰ (Pour mémoire, pas utilisé dans ce rapport).

CALCULS PRELIMINAIRES AU DIMENSIONNEMENT

Bio-oxydation de l'arsenic

Le lit bactérien est constitué de pouzzolane de granulométrie 5 × 10 mm. On fait l'hypothèse que la porosité en vrac utile de la pouzzolane 5 × 10 mm est : $\Phi_{\text{pouzzolane}}(5 \times 10 \text{ mm}) = 0,37$. Cette valeur est équivalente à celle d'un sable de même granulométrie et de coefficient d'uniformité $C_u = D_{60}/D_{10} \approx 3$. Elle est conservatrice dans la mesure où une porosité totale de 0,66 a été mesurée antérieurement sur un échantillon de pouzzolane. Le ratio volumétrique correspondant pore:pouzzolane est 1:2.7.

Le volume minimum du lit bactérien = $Q_{\text{max}} \times T_{\text{s,min}} \div \Phi_{\text{pouzzolane}}(5 \times 10 \text{ mm}) = 10 \text{ m}^3 \div 0,37 = 27 \text{ m}^3$. Ainsi, le volume de pouzzolane strictement nécessaire à l'écoulement de l'exhaure est 27 m^3 .

Ce calcul ne prend pas en compte la possibilité que la ferrihydrite se dépose et colmate de lit de pouzzolane. Cette hypothèse ne peut pas être relaxée sans données expérimentales sur la cinétique de formation de la ferrihydrite et de déposition sur la pouzzolane. Cela est vraisemblablement loin d'être négligeable puisque même si le dimensionnement est basé sur 30 mn de temps de séjour pour un débit de $20 \text{ m}^3/\text{h}$, cela équivaut à un temps de séjour de 1 heure pour $10 \text{ m}^3/\text{h}$ et 2 heures pour $5 \text{ m}^3/\text{h}$. Au final, il n'apparaît pas possible d'un point de vue pratique de séparer les deux processus principaux du traitement proposé.

Le bassin ou réacteur devra donc permettre de gérer bio-oxydation et filtration.

Précipitation des oxydes de fer

La figure (1) présente le rapport molaire Fe/As établi à partir des prélèvements ponctuels effectués à Lopérec.

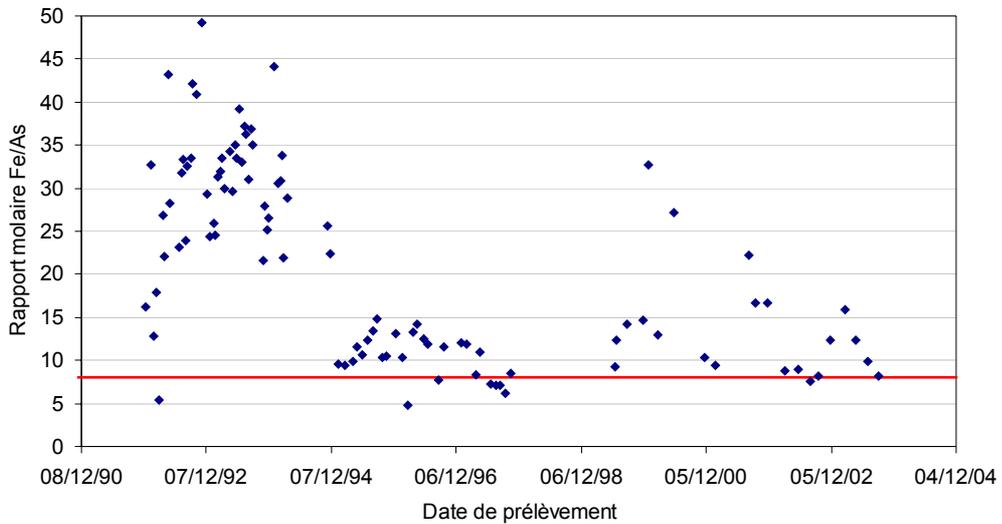


Fig. 1 - Rapport molaire Fe/As établi à partir des prélèvements ponctuels.

Il apparaît que ce rapport, de valeur moyenne 24,4, est très majoritairement supérieur à 8. Cette valeur est la valeur seuil au-dessus de laquelle il est admis que la quantité de Fe est suffisante pour la mise en œuvre d'un procédé de piégeage de l'As(V) par les oxy-hydroxydes de fer. On conclut qu'il n'apparaît pas nécessaire d'ajouter du Fer à l'effluent naturel de Lopérec pour utiliser les oxy-hydroxydes de fer pour piéger l'As.*

La figure (2) montre la quantité de fer présente dans l'effluent.

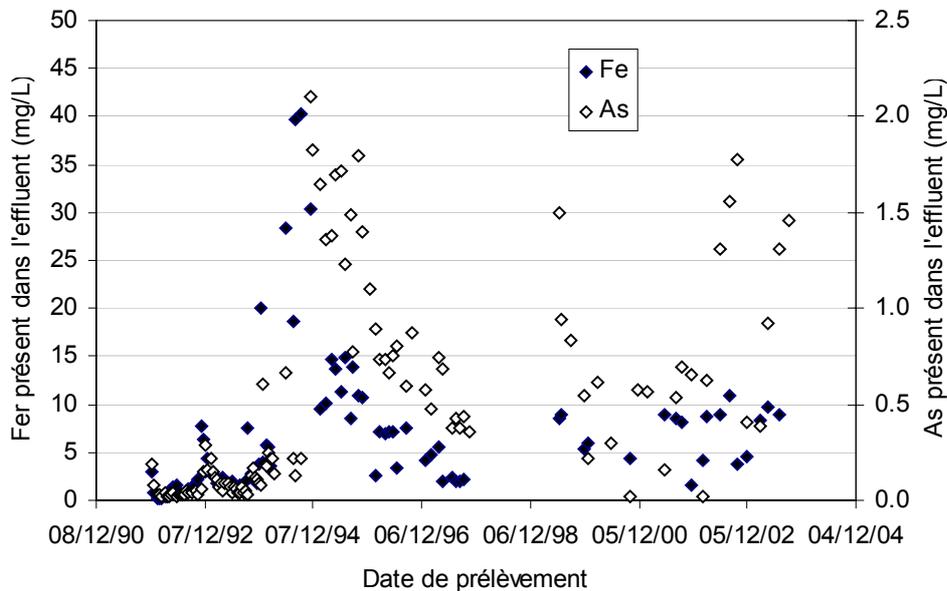


Fig. 2 – Relevés des teneurs en Fer et Arsenic de l'effluent.

Les teneurs moyennes calculées à partir de la figure (2) sont :

- moyenne en Fe : 6,3 mg/l,
- moyenne en As : 0,5 mg/l.

La quantité de précipités d'hydroxyde de fer à gérer n'est pas aisément quantifiable. En présence d'O₂, le Fe(II) s'oxyde en Fe(III) qui précipite sous la forme de ferrihydrite dont la formule approximative est : 5Fe₂O₃.9H₂O² (Twidell *et al.*, 1999). Le ratio massique ferrihydrite/Fe correspondant est 1,72. La quantité annuelle de fer contenue dans l'effluent est : 10 m³/h × 8760 h/an × 0.0063 kg/m³ = 552 kg/an. Sur cette base, un dépôt annuel de ferrihydrite de 950 kg/an est prévu³.

Compte tenu de la faible concentration en précipités de l'effluent, il est proposé d'utiliser un système de capture des précipités par adsorption dans des filtres à pouzzolane, et non pas par sédimentation. Il eut été possible d'utiliser du sable au lieu de pouzzolane pour la filtration, mais le faible coût de la pouzzolane (9 €/t) couplé à sa capacité de support bactérien font qu'il est préférable de n'utiliser que de la pouzzolane pour la bio-oxydation et la filtration. Cette option est aussi intéressante pour la mise en œuvre, puisque le procédé n'utilisera au final qu'un seul type de matériau granulaire.

La question est d'estimer la masse volumique des précipités pour déduire leur volume total et ainsi estimer le volume nécessaire des lits de sable. Pour cela, un échantillon recueilli à Lopérec a été placé à décanter dans un bécher, et des mesures de masse et volume du sédiment prises sur une période de 8 jours. L'évolution de la densité du sédiment a permis d'obtenir les valeurs suivantes :

- densité en vrac des précipités de ferrihydrite : 1 132 kg/m³ ;
- densité des précipités de ferrihydrite : 1 187 kg/m³ ;
- porosité inter-précipités : 35 %.

Au final, le volume total de précipités est estimé à 948 kg/an ÷ 1 132 kg/m³ = 0,84 m³/an. Le volume de sable strictement nécessaire pour contenir ce volume est 2,7 x 0,84 m³ = 2,3 m³. Mais ce volume n'est pas suffisant. Il faut en effet prévoir du volume supplémentaire pour le transport de l'effluent à travers le lit de sable. Pour assurer ce transport, on fait l'hypothèse que le volume de sable nécessaire pour assurer le transport de l'effluent est 10 fois celui nécessaire au seul piégeage des précipités. De ce fait, il faut un volume total de lits filtrants de 23 m³.

² Cette formule correspond stoechiométriquement à FeO_{2.4}H_{1.8}, ce qui diffère de la formule classique Fe(OH)₃ au plan de l'hydratation.

³ A basse concentration d'As(V) et forte concentration de Fe(III), l'As(V) s'adsorbe sur la ferrihydrite pour former un « arséniate ferrique » de formule générale FeAsO₄.xFe(OH)₃.

MESURE DU COLMATAGE DE LA COLONNE EXPERIMENTALE DE LOPEREC

Après réception de la colonne, le montage de la figure 3 a été réalisé pour estimer le degré de colmatage de la colonne après 3 mois de fonctionnement sur le site de Loperec.

Dans l'ordre d'exécution, des mesures de débit sous charge hydraulique constante ont été réalisées d'abord avec la colonne remplie de pouzzolane colmatée, puis avec la colonne vide, et enfin avec la colonne remplie de pouzzolane propre.

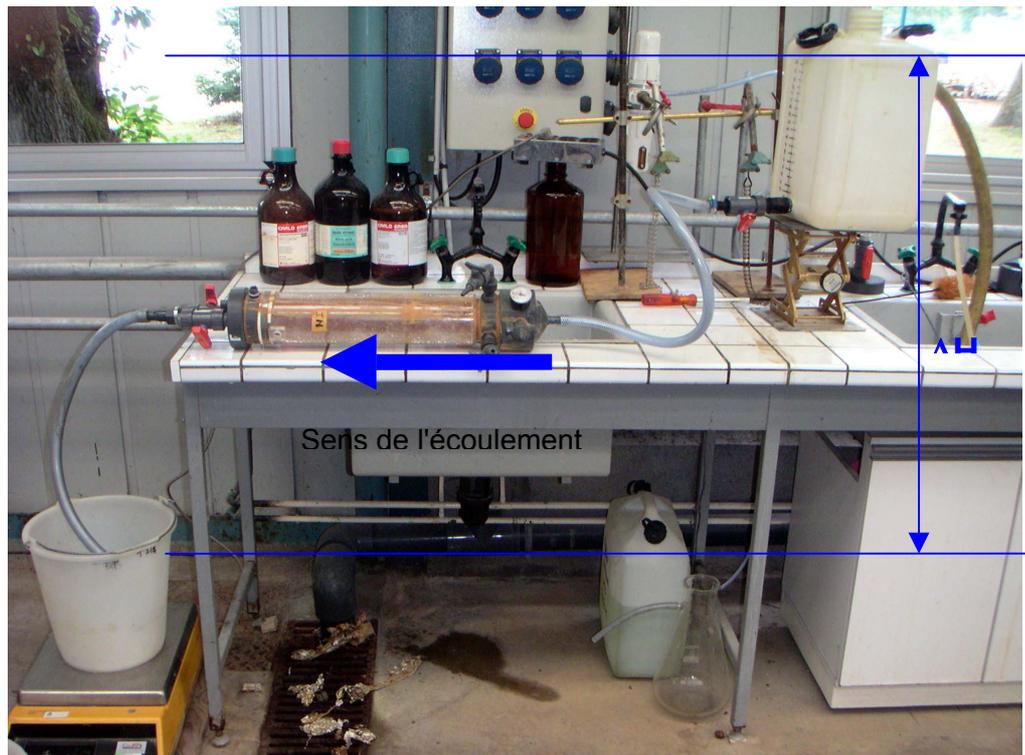


Fig. 3 - Schéma du montage réalisé.

Le tableau (1) donne les mesures obtenues.

	ΔH (cm)	Masse (g)	t (s)	Q (L/s)	Q (cm/s)	Re _{Darcy}
Colonne vide	72	2678	16.17	0.166	4.068	288
	85	2679	15.05	0.178	4.372	309
	97	3276	17.31	0.189	4.648	329
Colonne avec pouzzolane propre	72	2116	16.19	0.131	3.210	227
	85	2287	16.10	0.142	3.489	247
	97	2967	19.93	0.149	3.656	259
Colonne avec pouzzolane colmatée	72	1703	15.97	0.107	2.619	185
	85	2138	17.84	0.120	2.943	208
	97	2432	16.55	0.147	3.609	255

Tabl. 1 - Mesures expérimentales.

Appliquée à l'essai mis en œuvre, la conservation de l'énergie du système donne :

$$-\bar{u}_{out}^2 + 2g \Delta H = \sum K_L \bar{v}^2 \quad (1)$$

où :

- \bar{u}_{out} est la vitesse moyenne à la sortie du montage (tuyau de D.I. = 15 mm) ;
- ΔH est la charge hydraulique totale ;
- \bar{v} est la vitesse moyenne de l'eau dans la colonne ;
- K_L est le coefficient de perte de charge.

La figure (4) représente la variation du terme de gauche de l'équation (1) en fonction du carré de la vitesse moyenne d'écoulement dans la colonne. Nous vérifions que les données expérimentales s'alignent sur une droite passant par l'origine dont la pente est égale à la somme des coefficients de perte de charge du circuit.

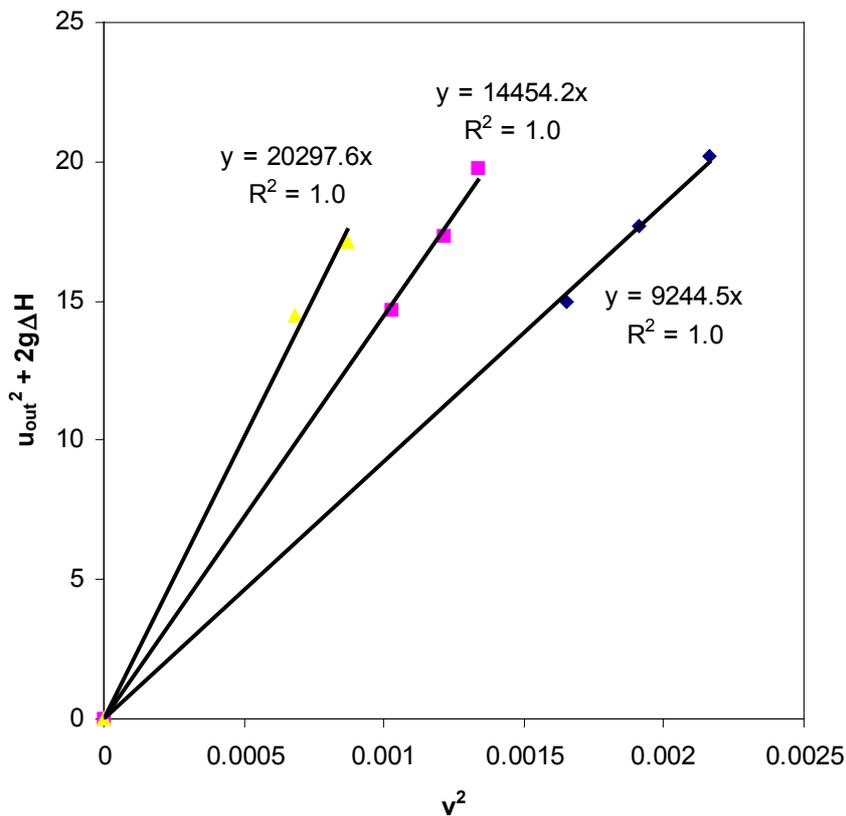


Fig. 4 – Application de l'éq. (1) aux données du tabl. (1).

De la figure (4), nous déduisons :

	K_L (ad.)
<i>Circuit avec colonne vide</i>	9244.5
Circuit avec colonne de pouzzolane propre	14454.2
Circuit avec colonne de pouzzolane colmatée	20297.6

Par soustraction du coefficient de perte de charge du circuit sans pouzzolane, nous obtenons :

	K_L (ad.)
<i>Colonne de pouzzolane propre</i>	5209.7
Colonne de pouzzolane colmatée	11053.1

Ces coefficients montrent une augmentation de 112 % du coefficient de perte de charge de la colonne de pouzzolane après 3 mois de mise en service. Ces valeurs sont directement utilisables pour réaliser des calculs hydrauliques et répondent précisément à la question du degré de colmatage de la colonne. La perte de charge h_L (unité: m) de la colonne de pouzzolane se calcule selon :

$$h_L = K_L \frac{\bar{v}^2}{2g} \quad (2)$$

Cette méthode de calcul de la perte de charge induite par le colmatage de la pouzzolane n'est pas entachée des limitations d'un traitement classique des données par le modèle de Darcy. En effet, le modèle de Darcy n'est applicable que pour $Re_{Darcy} < 10^4$, ce qui n'est pas le cas des essais réalisés (cf. tabl. (1)).

Même si l'équation (2) prédit une variation linéaire entre Q et $\sqrt{\Delta P}$ (et non pas ΔP comme dans la loi de Darcy), soit :

$$Q = A \sqrt{\frac{2 \Delta P}{\rho K_L}} \quad (3)$$

⁴ $Re_{Darcy} = \frac{V_{lit} \times d}{\nu}$ où V_{lit} est la vitesse de l'écoulement à travers le lit, d le diamètre des grains, et ν la viscosité cinématique du liquide ($=10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'eau).

On peut approximer cette relation pour des valeurs faibles de ΔP par une droite dont la pente donne accès au coefficient de perméabilité K_D (alt. conductivité hydraulique K_S) de la loi de Darcy. Par régression, nous obtenons les résultats suivants :

	K_D (m ²)	K_S (m/s)	K_S (cm/s)
Colonne de pouzzolane propre	14.8×10^{-9}	0.145	14.5
Colonne de pouzzolane colmatée	10.2×10^{-9}	0.100	10.0

Ces résultats révèlent une réduction de conductivité hydraulique de 31 % après mise en service de la colonne pendant 3 mois.

Pour valider ces calculs, nous pouvons en première approximation, utiliser la relation de Darcy pour estimer la conductivité hydraulique de la colonne de pouzzolane. Cette relation qui relie le débit d'infiltration au gradient de charge hydraulique s'écrit comme suit :

$$Q = K_s \frac{\Delta H}{L} \quad (4)$$

où

Q : Débit (L.T⁻¹)

K_s : conductivité hydraulique à saturation (L.T⁻¹)

ΔH : charge hydraulique totale (L)

L : Longueur du lit (L)

La figure (5) confirme que les données expérimentales ne suivent pas la linéarité du modèle de Darcy.

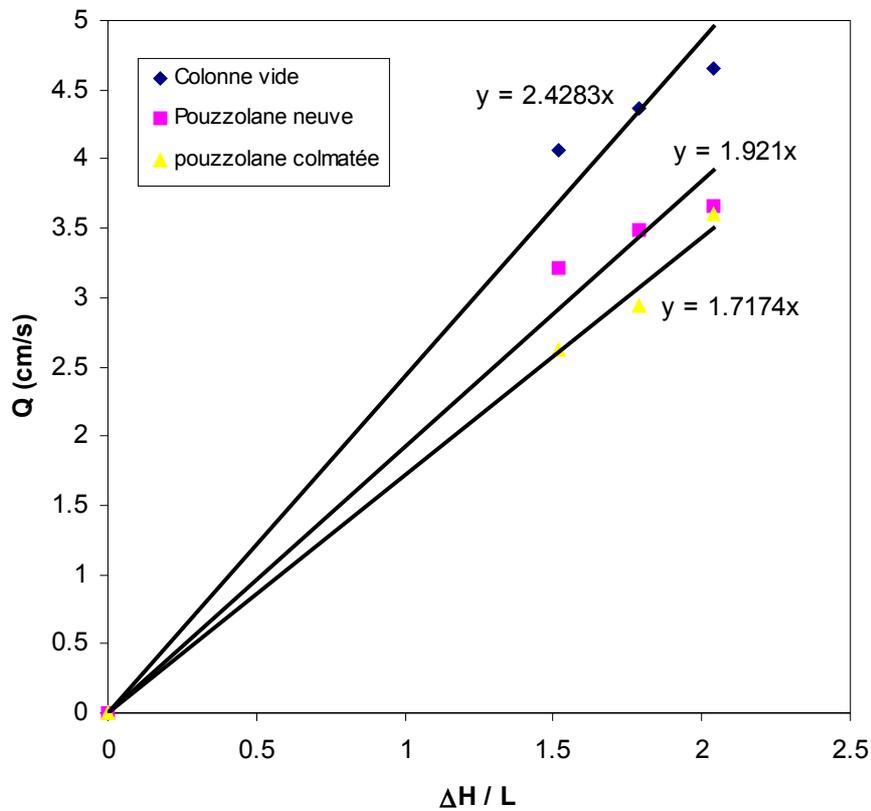


Fig. 5 – Application de l'éq. (4) aux données du tabl. (1)

Par régression linéaire directe (cf. fig. 5), nous obtenons les résultats suivants :

	K_s (cm/s)
Colonne vide	2.4
Colonne de pouzzolane propre	2.0
Colonne de pouzzolane colmatée	1.7

En supposant les perméabilités composées en série pour la colonne et les autres composants du circuit (soit $\frac{1}{K_s} = \sum \frac{1}{K_{s,i}}$), on déduit les conductivités hydrauliques et perméabilités suivantes :

	K_s (cm/s)	K_D (m²)
Colonne de pouzzolane propre	9.4	9.6 × 10 ⁻⁹
Colonne de pouzzolane colmatée	5.6	5.7 × 10 ⁻⁹

Ce second mode de calcul donne une diminution de la conductivité hydraulique de la colonne de 40 % après 3 mois de mise en service, donc proche de la valeur de 31 % calculée par la méthode précédente.

En bilan, l'augmentation de la perte de charge n'est pas suffisamment importante pour remettre en cause le calcul de dimensionnement précédent, qui était basé sur un volume de pores du lit 10 fois supérieur à celui nécessaire au stricte piégeage des précipités d'oxydes de fer.



Géosciences pour une Terre durable

brgm

**Centre scientifique et technique
Service ressources minérales**

3, avenue Claude-Guillemin
BP 6009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 02 38 64 34 34