











Utilisation de micro-organismes spécialisés dans les Barrières Perméables Réactives (BPR)

Rapport final

BRGM/RP-54774-FR

juin 2006

Étude réalisée dans le cadre du projet BIBA co-financé ADEME (convention 0372 C 0010)

F. Battaglia-Brunet⁽¹⁾, M.C. Dictor⁽¹⁾, A. Esnault-Filet⁽²⁾, S. Darson⁽²⁾, O. Girinski⁽²⁾, I. Ignatiadis⁽¹⁾, C. Michel⁽¹⁾, D. Morin⁽¹⁾ (1) BRGM, (2) Soletanche-Bachy Avec la collaboration de G. Cabot⁽¹⁾, S. Coulon⁽¹⁾, M. Lachambre⁽¹⁾, A. De Las Heras⁽¹⁾

Vérificateur :

Original signé par :

Nom : S. TOUZÉ

Date :

Signature :



Original signé par :

Nom : H. GABORIAU

Date :

Signature :



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





Avertissement

Ce rapport est adressé en recommandé avec accusé de réception, en communication exclusive au demandeur : (mettre le nom du demandeur), en X exemplaires conformément au cahier des charges.

Le tirage initial de ce rapport, en nombre fixé par convention, est diffusé à son commanditaire. Sa communicabilité ultérieure à des tiers est liée à la prise d'une décision administrative formelle à laquelle il concourt, conformément à la loi n° 78-753 du 17 juillet 1978.

Passé ce délai, ce rapport devient communicable à tout tiers extérieur qui en ferait la demande ; le BRGM ne peut plus être tenu comme responsable de l'usage qui pourrait en être fait et des éventuelles conséquences pouvant en résulter.

Mots clés : Bio-barrière, Panneau-drain, Cr(VI), Cyanure, Bioréacteur.

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

Battaglia-Brunet F., Dictor M.C., Esnault-Filet A., Darson S., Grinski O., Ignatiadis I., Michel C., Morin D. avec la collaboration de Cabot G., Coulon S., Lachambre M., De Las Heras A. (2006) – Utilisation de micro-organismes spécialisés dans les Barrières Perméables Réactives (BPR). Rapport final. BRGM/RP-54774-FR, 128 p., 46 fig., 14 tabl., 4 ann.

© BRGM, 2006, ce document ne peut être reproduit en totalité ou en partie sans l'autorisation expresse du BRGM.

Synthèse

L e présent projet, co-financé par l'ADEME (convention 0372 C 0010) avait pour objectif d'évaluer les moyens nécessaires et l'intérêt technico-économique d'utiliser des micro-organismes sélectionnés pour décontaminer *in situ* des nappes souterraines polluées, au sein même des portes filtrantes constitutives des Barrières Perméables Réactives (BPR). Le BRGM, en collaboration avec la société SOLETANCHE BACHY, a mené une étude laboratoire visant à mettre en œuvre des micro-organismes sur des supports poreux pour deux systèmes décontaminants types (Cr et CN⁻), afin de simuler les procédés d'oxydo-réduction et de mener les évaluations technico-économiques de préfaisabilité. La durée de réalisation de l'étude a été de 32 mois, à compter du 15 décembre 2003. Le présent document est le rapport final de ce projet. Il présente le cahier des charges relatif au traitement des eaux souterraines par un système biologique de type PRB – portes filtrantes, un état de l'art, les résultats expérimentaux et une évaluation technico-économique du procédé envisagé.

L'analyse de la bibliographie a révélé une voie potentiellement intéressante pour la réduction biologique in situ du Cr(VI). Le procédé classique de réduction du Cr(VI) par le fer 0-valent (Fe⁰) peut être astucieusement combiné à une réduction biologique. En effet, la corrosion du Fe⁰ génère de l'hydrogène, substrat énergétique utilisable par des bactéries Cr(VI)-réductrices. Un premier système expérimental, constitué d'une colonne remplie de couches successives de laine d'acier (Fe⁰) et de pouzzolane (support bactérien), a été mis en place. Au préalable, la capacité de la laine d'acier à réduire le Cr(VI) en absence de bactéries a été étudiée dans un système non inoculé. Ce premier bioréacteur a fonctionné dans des conditions proches du traitement réel in situ : température 12 °C, milieu très simple constitué d'eau du robinet additionnée de Cr(VI), de sulfate de sodium et de lactate de sodium. Ce dispositif expérimental n'a pas permis d'atteindre l'objectif fixé par le cahier des charges en termes de temps de résidence (4 heures maximum). Pour une concentration en Cr(VI) s'élevant à 15 mg l^{-1} en entrée de colonne, le Cr(VI) n'était pas entièrement réduit lorsque le temps de résidence était inférieur à 10 h. Il semble très probable qu'une réaction directe de l'H₂S avec le fer constituant la laine d'acier a d'une part, amoindri l'efficacité du Fe⁰ vis-à-vis du Cr(VI), et d'autre part, accentué l'effet inhibiteur du Cr(VI) sur les bactéries sulfatoréductrices. Les observations réalisées au microscope électronique suggèrent que le biofilm bactérien ne s'est pas bien développé sur le support, peut-être parce que l'augmentation du débit d'alimentation a été trop rapide.

Deux nouvelles expériences de traitement du Cr(VI) en continu ont été réalisées en 2005 avec des bioréacteurs remplis uniquement de pouzzolane. Le programme expérimental de la première expérience (février-août 2005) a été établi de façon à optimiser le développement d'un biofilm performant. Au cours de cet essai, il a été possible de traiter, avec du lactate, une eau contenant jusqu'à 7,5 mg/l de Cr(VI) en appliquant un temps de résidence égal à 2,75 h. Les performances de ce dispositif sont en accord avec les spécifications du cahier des charges en termes de température, de temps de résidence et de concentration en Cr(VI) en sortie de

bioréacteur. Par contre, la concentration en Cr total est supérieure à la valeur limite imposée par le cahier des charges (0,5 mg/l) : le Cr(III) n'a pas précipité à l'intérieur du bioréacteur. Un colmatage relativement important du lit de pouzzolane par la biomasse a été constaté en fin d'expérience.

La dernière expérience (septembre - décembre 2005) avait trois objectifs :

- déterminer la rapidité à laquelle la conductivité hydraulique du bioréacteur diminue ;
- déterminer le temps nécessaire pour obtenir un bioréacteur efficace à partir d'un lit de pouzzolane propre ;
- tester le HRC© en tant que substrat à la place du lactate.

Après 90 jours de fonctionnement, la conductivité hydraulique du bioréacteur n'a pas diminué de façon significative. Cette expérience a permis de déterminer le temps nécessaire pour mettre en service un bioréacteur à partir d'un lit de pouzzolane fraîche. Enfin, les activités bactériennes de sulfato-réduction et de Cr(VI)-réduction semblent moins élevées avec du HRC© seul qu'en présence d'un milieu complet contenant du lactate libre. Il est possible que la vitesse de dissociation du HRC© en lactate libre soit limitante dans des systèmes fonctionnant à faible temps de résidence, tels que les portes filtrantes étudiées dans le cadre du présent projet.

Les expériences de laboratoire visant au développement d'un procédé de traitement du Cr(VI) ont montré qu'il serait possible de mettre en œuvre des bioréacteurs au sein des portes filtrantes constitutives des Barrières Perméables Réactives (BPR). Ces bio-filtres seraient constitués de pouzzolane inoculée avec des micro-organismes sélectionnés. Ils seraient alimentés en continu avec de l'acide lactique. Les performances de ce type de dispositif seraient en accord avec les spécifications du cahier des charges d'une BPR en termes de température, de temps de résidence et de concentration en Cr(VI) en sortie de bioréacteur. Un système de piégeage du Cr(III) devrait être prévu en aval du biofiltre. Le temps nécessaire pour mettre en service un bioréacteur serait compris entre 15 jours et 1 mois.

Les coûts d'installation d'une porte filtrante pour le traitement du Cr(VI) seraient relativement élevés. Ils seraient cependant compensés par des coûts d'entretien annuel faibles, en raison d'une maintenance ne nécessitant pas d'évacuation des filtres biologiques usagés, nettoyés et ré-utilisés.

Le projet a démontré que les objectifs de traitement, pour le Cr(VI), pouvaient être atteints et que son applicabilité sur site semblait possible au regard de l'évaluation technico-économique.

Pour le traitement biologique du cyanure, des populations bactériennes ont été sélectionnées en 2004. Des problèmes techniques ont été rencontrés lors de la réalisation de cette phase du projet : (1) une instabilité des populations bactériennes au cours des repiquages, (2) la difficulté de maintenir du cyanure libre en solution (HCN ou CN-) à un pH compatible avec la croissance des bactéries. Des solutions sont proposées pour surmonter ces difficultés, afin de pouvoir réaliser des expériences de traitement en continu dans le cadre d'un projet ultérieur.

Sommaire

1.	Introduction	11
2.	Cahier des charges	13
	2.1. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE NAPPES POLLUÉES	13
	2.2. CARACTÉRISTIQUES DES DISPOSITIFS DE FILTRATION	14
3.	Traitement du Cr(VI)	17
	 3.1. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE 3.1.1.Généralités 3.1.2.Les techniques de traitement du Cr(VI) <i>in situ</i> les plus couramment appliquées	17 17 18 21
	 3.2. LE TRAITEMENT DU CR(VI) EN BARRIÈRES PERMÉABLES RÉACTIVES : PARTIE EXPÉRIMENTALE	26 26 41 56
	 3.2.4.Le traitement du Cr(VI) en barrières perméables réactives : conclusion de la partie expérimentale	62
	ÉVALUATION TECHNICO-ÉCONOMIQUE	64 64 66 70 70
4.	Traitement du cyanure	73
	4.1. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE 4.1.1.Les composés cyanurés	73 73

6. Bibliographie	95
5. Conclusion générale	93
4.2.3.Le traitement du cyanure en barrières perméables réactives : conclusion de la partie expérimentale, discussion et solutions proposées	91
4.2.2. Comparaison de l'efficacité de différentes populations	86
4.2.1. Sélection de populations à partir d'échantillons d'un site minier.	77
4.2. SÉLECTION DE POPULATIONS DÉGRADANT LE CYANURE	77

Liste des figures

Figure 1	-	Réduction du Cr(VI) en fioles de 500 ml. HRC® témoin disque orange, HRC® + D. norvegicum carré orange foncé, HRC® + population Métalbio triangle rouge, lactate témoin disque bleu clair, lactate + D. norvegicum carré bleu foncé,lactate + population Métalbio triangle vert. Essais réalisés en triplicat.	. 24
Figure 2	-	Évolution de la concentration en Cr(VI) en sortie de colonnes. (Triangles = 0,5 h de temps de résidence. Carrés = 1 h de temps de résidence). Cercles, 4 h de temps de résidence.	. 28
Figure 3	-	Évolution du TA par la laine d'acier en fonction du temps (triangles = 0,5 h de temps de résidence ; carrés = 1 h de temps de résidence ; cercles = 4 h de temps de résidence).	. 29
Figure 4	-	Évolution du TA par la laine d'acier en fonction du nombre de volumes utiles passés à travers la colonne.	. 29
Figure 5	-	Colonne remplie de laine d'acier soumise à l'action du Cr(VI) : développement de couleur « rouille » à la surface de la laine	. 30
Figure 6	-	Évolution de la concentration en sulfate dans la colonne au cours de la phase batch	. 33
Figure 7	-	Évolution de la concentration en Cr(VI) en entrée et en sortie de colonne pouzzolane/laine d'acier, et temps de résidence	. 34
Figure 8	-	Évolution de la concentration en sulfate en entrée et en sortie de colonne pouzzolane/laine d'acier et de la concentration en Cr(VI) en sortie de colonne	. 35
Figure 9	-	Évolution du potentiel redox et du pH en haut de colonne pouzzolane/laine d'acier	. 35
Figure 10	-	Évolution des vitesses de réduction du sulfate et du Cr(VI) dans la colonne pouzzolane/laine d'acier.	. 36

Figure 11 -	Évolution de la consommation de lactate et de la production d'acétate dans la colonne pouzzolane/laine d'acier	
Figure 12 -	Photos de MEB de la laine d'acier avant introduction dans le réacteur (A), et en fin d'expérimentation (B)	38
Figure 13 -	Étude aux rayons X de la laine d'acier (A) et de la pouzzolane (B) en fin d'expérimentation.	38
Figure 14 -	Photos de MEB de la pouzzolane avant introduction dans le réacteur (A), et en fin d'expérimentation (B)3	
Figure 15 -	Évolution des principaux paramètres opératoires au cours de l'expérience de février-août 2005.	45
Figure 16 -	Évolution des concentrations en sulfate et sulfure au cours de l'expérience de février-août 2005.	46
Figure 17 -	Évolution des concentrations en Cr(VI) et lactate dans le milieu d'alimentation et vitesse de réduction du sulfate au cours de l'expérience de février-août 2005.	46
Figure 18 -	Évolution des concentrations en Cr(VI) dans le milieu d'alimentation et en sortie de bioréacteur au cours de l'expérience de février-août 2005	47
Figure 19 -	Évolution des concentrations en lactate dans le milieu d'alimentation et en sortie de bioréacteur, et actétate en sortie de bioréacteur au cours de l'expérience de février-août 2005.	47
Figure 20 -	Évolution du pH au cours de l'expérience de février-août 2005	49
Figure 21 -	Évolution du temps de résidence et du potentiel redox au cours de l'expérience de septembre-décembre 2005.	53
Figure 22 -	Évolution de la concentration en sulfate et Cr(VI) en entrée et sortie de bioréacteur au cours de l'expérience de septembre-décembre 2005	53
Figure 23 -	Évolution du pH et de la concentration en sulfure en sortie de bioréacteur au cours de l'expérience de septembre-décembre 2005. Carrés oranges : concentration en sulfure, ronds verts : pH	54
Figure 24 -	Évolution des concentrations en acétate et sulfure en sortie de bioréacteur au cours de l'expérience de septembre-décembre 2005	56
Figure 25 -	Spectre d'absorption du HRC© par spectrophotométrie UV	57
Figure 26 -	Schéma expérimental des tests de percolation du HRC©	58
Figure 27 -	Configuration de principe d'une porte filtrante BIBA.	64
Figure 28 -	Vue d'ensemble de la porte filtrante BIBA Solution 1	67
Figure 29 -	Vue d'ensemble porte filtrante BIBA solution 2	68
Figure 30 -	Vue en coupe verticale de la cartouche de biofiltre.	68
Figure 31 -	Vue en coupe horizontale du montage de la cartouche	69
Figure 32 -	Les grandes catégories de réactions chimiques responsables de la dégradation des cyanures et thiocyanates	76
Figure 33 -	Croissance des populations microbiennes pendant une semaine d'incubation à 25 °C. Évolution des concentrations en ammonium, nitrates et nitrites dans les échantillons.	81

Figure 34 -	Croissance des populations bactériennes de l'échantillon E2 sur les différents milieux de culture M1, M2 et M3.	82
Figure 35 -	Croissance des populations bactériennes de l'échantillon E3 sur les différents milieux de culture M1, M2 et M3.	82
Figure 36 -	Croissance des populations bactériennes de l'échantillon E4 sur les différents milieux de culture M1, M2 et M3.	83
Figure 37 -	Évolution des concentrations en cyanures libres, ammonium, nitrates et nitrites après 7 jours d'incubation des échantillons à 25 °C	84
Figure 38 -	Croissance des populations bactériennes E2, E3 et E4 sur le milieu minéral dopé à 20 mg.l ⁻¹ de cyanures libres	85
Figure 39 -	Évolution des concentrations en cyanures libres par les populations bactériennes E2, E3 et E4 à l'aide du test Merck. Les points de valeurs à T0 et T3 jours ont aussi été analysés par la technique de microdiffusion	86
Figure 40 -	Activation des cultures sélectionnées sur milieu M3.	87
Figure 41 -	Concentrations théoriques en solution dans l'eau des différentes formes de l'acide cyanhydrique en fonction du pH.	89
Figure 42 -	Cinétique de diparition abiotique du cyanure dans le milieu M3 incubé à 14 °C	89
Figure 43 -	Solution 1 - Principe de dimensionnement des filtres	116
Figure 44 -	Solution 1 - Sélection de la taille des filtres.	117
Figure 45 -	Solution 2 - Principe de dimensionnement des filtres	118
Figure 46 -	Solution 2 - Sélection de la taille des filtres.	119

Liste des tableaux

Tableau 1-	Essai laine d'acier + pouzzolane + bactéries 2004 - Chronologie de sucession des différentes conditions opératoires	32
Tableau 2 -	Février-août 2005 - Chronologie de sucession des différentes conditions opératoires.	44
Tableau 3 -	Résultats des analyses de Cr(VI) et Cr total les 1 ^{er} et 8 août 2005	49
Tableau 4 -	Septembre-décembre 2005 - Chronologie de sucession des différentes conditions opératoires.	51
Tableau 5 -	Bilan de fixation du HRC©.	59
Tableau 6 -	Composition n° 1 des mélanges réactionels pour l'encapsulation	61
Tableau 7 -	Composition n° 2 des solutions préparées pour l'obtention de billes HRC en diluant au 1/4	61
Tableau 8 -	Composition n° 3 des solutions préparées pour l'obtention de billes HRC© à concentration en calcium élevée	62

Tableau 9 -	Dimensions optimales des filtres solution 1 et solution 2	.65
Tableau 10 -	Origine des échantillons-sources de bactéries dégradant le cyanure	.78
Tableau 11 -	Sélection d'une population dégradant les cyanures, préparation des milieux	.79
Tableau 12 -	Concentration en cyanures libres dans les échantillons bruts	.80
Tableau 13 -	Activation des cultures, analyses du cyanure libre et des espèces azotées inorganiques.	.88
Tableau 14 -	Essai de screening en tubes à essai avec huile minérale à l'interface eau/air. Analyse du CN résiduel (en mg/l) après 15 jours d'incubation.	.91

Liste des annexes

Annexe 1 - Solubilité du Cr(III) en solution aqueuse	
Annexe 2 - Temps de résidence = f([Cr(VI)])	103
Annexe 3 - Principe de dimensionnement des filtres	107
Annexe 4 - Préparation de l'inoculum	121

1. Introduction

Le principe d'une Barrière Perméable Réactive (BPR) est de canaliser les écoulements souterrains vers des zones réactives destinées à traiter chimiquement certains polluants dissous. Ces zones réactives sont constituées par des matériaux perméables dont la propriété est d'éliminer des espèces chimiques en solution par rétention ou par destruction. Des zones localisées de dépollution *in situ*, par filtration sous gradient naturel, sont ainsi formées.

Les barrières réactives sont mises en place selon deux types de configurations :

- Sous forme d'une tranchée drainante continue. Dans ce cas, la partie réactive est constituée par l'ensemble du massif drainant. Cette configuration fut celle retenue à la conception du procédé mais tend à être de moins en moins appliquée en Europe.
- Sous forme d'une paroi « étanche » associée à des portes filtrantes. Cette configuration consiste à canaliser la nappe vers un ou plusieurs filtre(s) placé(s) le long d'une paroi étanche. Cette version est connue sous la dénomination américaine du « funnel-and-gate ».

Dans les deux cas, divers processus chimiques, physico-chimiques ou biologiques décontaminants, peuvent être employés.

L'objectif général de la présente étude est d'évaluer les moyens nécessaires et l'intérêt technico-économique d'utiliser des micro-organismes spécialisés pour décontaminer *in situ* des nappes souterraines polluées, au sein même des portes filtrantes constitutives des Barrières Perméables Réactives (BPR).

Soletanche-Bachy a mis au point et breveté un procédé particulier de construction de porte filtrante dénommé « panneau-drain ». Le principe repose sur la mise en place d'un réacteur constitué de plusieurs filtres destinés à recevoir des cartouches amovibles remplies de matériaux rétenteurs. Le réacteur, préfabriqué en atelier, est descendu dans un panneau excavé sous coulis bentonite-ciment. La mise en communication avec la nappe est assurée par des éléments drainants placés de part et d'autre des filtres, l'ensemble constituant la « porte filtrante ».

2. Cahier des charges

Au laboratoire, des cultures biologiques seront mises en œuvre dans des conditions opératoires caractéristiques des conditions *in situ* de fonctionnement des portes filtrantes des barrières perméables réactives.

2.1. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE NAPPES POLLUÉES

La température de l'eau souterraine est généralement constante et proche de 10 °C. Les systèmes biologiques devront donc fonctionner à cette température.

Deux systèmes seront étudiés :

- l'un en condition réductrice pour fixer du chrome par transformation de Cr(VI) en Cr(III);
- l'autre en condition aérobie pour dégrader du cyanure.

Réglementation

L'arrêté du 2 février 1998, relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation, définit les concentrations maximales suivantes pour les deux polluants étudiés :

- chrome hexavalent et composés, 0,1 mg/l (exprimé en élément Cr) si le rejet dépasse 1 g/j ;
- chrome total et composés 0,5 mg/l (exprimé en élément Cr) si le rejet dépasse 5 g/j ;
- cyanures 0,1 mg/l si le rejet dépasse 1 g/j.

Les eaux destinées à la consommation humaine doivent satisfaire aux exigences de qualité suivantes, d'après les normes européennes de potabilité des eaux CEE (1975) et le décret modifié 89-3 du 3 janvier 1989 : pour les eaux brutes destinées à la consommation humaine, les valeurs maximales admissibles sont égales à 50 μ g/l de cyanure total, et 50 μ g/l de chrome total. Le décret n° 2001-1220 du 20 décembre 2001 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine le seuil limite de chrome total dans ces eaux à 50 μ g/l. Cette valeur est validée par l'UE et l'OMS.

L'INERIS propose les concentrations prévisibles sans effet pour les écosystèmes (PNEC) en eaux douces suivantes :

- 4,1 µg/l pour le Cr(VI) (INERIS, 2005);

- 4,7 µg/l pour le Cr(III) (INERIS, 2005) ;
- 0,114 µg/l pour le cyanure libre (INERIS, 2006).

Les objectifs de dépollution sont généralement fixés en fonction du site de travail (concentrations en amont de la barrière, proximité de zones sensibles à la pollution...). Dans le cadre de la présente étude, il sera nécessaire de respecter au moins les exigences de l'arrêté du 2 février 1998 (installations classées), et si possible les normes relatives aux eaux destinées à la consommation humaine (pour le chrome et le cyanure).

Nappes polluées au Cr(VI)

Les concentrations en Cr(VI) dans les nappes polluées peuvent être très variables, de valeurs légèrement supérieures à la potabilité jusqu'à plusieurs grammes par litre. La population bactérienne Cr(VI)-réductrice, sélectionnée au BRGM, est capable de traiter en continu une eau contenant jusqu'à 100 mg/I de Cr(VI), mais pour des temps de résidence supérieurs ou égaux à 16 h (Battaglia-Brunet *et al.*, 2004). Afin de pouvoir mettre au point un système fonctionnant avec un temps de résidence raisonnable pour une barrière réactive de type « Soletanche-Bachy » (inférieur à 3 h), il est proposé de travailler avec une eau contenant 15 mg/I de Cr(VI), soit une concentration 300 fois supérieure au seuil de potabilité. Le pH de l'eau à traiter sera proche de la neutralité. Sur les trois derniers sites étudiés par Soletanche-Bachy, les concentrations en sulfates étaient les suivantes : site 1, entre 200 et 2 000 mg/I ; des pics à 4 000 mg/I ; site 2, assez constant autour de 600 mg/I ; site 3, de 200 à 700 mg/I. Au cours du présent projet, des concentrations comprises entre 600 et 1 000 mg/I seront choisies.

Nappes polluées au cyanure

Soletanche-Bachy a déjà étudié, avec des systèmes de filtration physico-chimiques, des eaux contenant 100 mg/l de cyanure, sous chacune des trois formes différentes :

- cyanure libre (KCN);
- mélange ferro + ferri-cyanure ;
- cyanure de cuivre.

Dans le cadre de la présente étude, seul le cas du cyanure libre sera traité. En effet, les complexes cyanures-métaux sont très peu bio-dégradables.

2.2. CARACTÉRISTIQUES DES DISPOSITIFS DE FILTRATION

Les spécifications au niveau de la taille et des caractéristiques du bioréacteur de laboratoire doivent être établies en tenant compte des spécificités des portes filtrantes mises en œuvre par Soletanche-Bachy selon le principe du « Panneau-Drain » et des dimensions les plus typiques rencontrées sur sites réels. Les conditions opératoires devront reproduire au mieux les conditions hydrauliques de fonctionnement *in situ*. Les paramètres seront étudiés pour atteindre une efficacité optimale et la simulation du principe devra permettre l'évaluation technique et économique du procédé.

- La géométrie des colonnes : Soletanche-Bachy possède des colonnes de laboratoire dont la hauteur varie entre 50 et 80 cm, et de diamètre variant entre 10 et 20 cm. Le BRGM possède des colonnes pouvant être thermostatées et équipées de capteurs (pH, Eh, pression différentielle). Ces colonnes ont un diamètre de 10 cm, une hauteur de 70 cm, et un volume total (sans remplissage) de 2 litres.
- Le remplissage des colonnes : il peut être choisi par le BRGM en fonction des caractéristiques du traitement. Soletanche-Bachy utilise des matériaux granulaires, de taille comprise entre 2 et 5 mm.
- Le mode d'alimentation : l'alimentation en eau des colonnes doit être ascendant. L'eau est répartie dans les colonnes par des pré-couches de matériau drainant. Il s'agit d'un savoir-faire confidentiel qui ne peut être révélé dans le détail.
- Le temps de résidence de l'eau à travers les cartouches : il est également variable en fonction des sites. Le minimum est 30 min, et le maximum 10 h. Un temps de résidence compris entre 1 et 3 h semble raisonnable, mais l'effet du temps de résidence en dehors de ces limites devra être étudié.
- Il est nécessaire d'équiper les colonnes de capteurs de pression différentielle, afin de suivre l'évolution de la perte de charge. La perte de charge admissible sur les filtres est très variable d'un site à l'autre en fonction des caractéristiques de la nappe. Une fourchette de 10 à 100 mb est assez représentative des situations les plus courantes pour des filtres de 1 à 2 m de hauteur.

3. Traitement du Cr(VI)

3.1. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

3.1.1. Généralités

La contamination de sol et d'eau par du chrome liée aux activités anthropiques résulte principalement de trois origines : la valorisation des minerais de chromite, l'industrie métallurgique des alliages et des traitements de surface et celle du tannage des cuirs. Il est aussi susceptible d'être significativement présent dans les boues de station d'épuration.

En France, la base de données BASOL du MEDD des sites nécessitant un suivi de l'Administration recensait pour la France, en 2000, 231 sites de sols pollués par le chrome nécessitant un suivi ou une intervention. Cela correspond statistiquement à environ 10 % des sites contaminés répertoriés dans la base BASOL (http://basol.environnement.gouv.fr/), ce qui est relativement important pour un polluant inorganique.

Le chrome disséminé dans les sols du fait des activités industrielles est essentiellement sous forme hexavalente, Cr(VI), et trivalente, Cr(III).

L'expression la plus toxique du Cr est le Cr(VI), pouvant être présent en solution sous trois formes d'oxyanions : $HCrO_4^{-}$, $CrO_4^{-2^-}$ (chromate) et $Cr_2O_7^{-2^-}$ (dichromate). Ces composés sont très solubles et donc très mobiles. Il n'y a pas de doute que c'est un polluant inorganique fréquemment rencontré dans les nappes qui fait l'objet d'études, de projets et de mises en œuvre de BPR de façon récurrente.

La dangerosité du Cr(VI) résulte de son caractère corrosif ainsi que de son fort potentiel d'absorption dans les tissus vivants. Il interagit par son pouvoir oxydant avec des macromolécules organiques. Il existe des réactions enzymatiques spécifiques qui le réduisent en Cr(III). L'exposition humaine au Cr(VI) peut donner lieu à des ulcérations de la peau, des yeux, des muqueuses et générer des mutagenèses et des cancers.

Le principal processus employé pour son élimination dans les eaux est de réduire le Cr(VI) qui est la forme la plus toxique et la plus mobile en Cr(III) qui précipite.

Le Cr(III) représente donc la forme la plus stable à laquelle aboutit la transformation du Cr(VI) par réduction en contact avec de la matière organique dans les conditions physico-chimiques des sols. Il est significativement moins dangereux parce que peu mobile et moins absorbé par les matières organiques vivantes. D'une manière générale, pour des pH compris entre 6 et 12, le Cr(III) précipite majoritairement sous

forme de Cr(OH)₃ amorphe et en quantité beaucoup plus faible sous forme cristalline Cr(OH)₃,H₂O. Dans les milieux contenant du fer III et pour lesquels le pH varie entre 4 et 12, le Cr(III) précipiterait sous forme de Cr_{0,5}Fe_{0,75}(OH)₃. La probablilité de remobilisation du Cr(III) est très faible, mais il semblerait que le Cr(III) puisse être oxydé en Cr(VI) en milieu alcalin au contact d'oxyde de manganèse dans les sols. Ces conditions sont très rarement rencontrées.

Le fer 0-valent permet d'obtenir la réduction du Cr(VI) en Cr(III) (voir réaction 1), et la précipitation du chrome comme le montre la réaction 2. C'est la méthode la plus couramment employée.

$$CrO_4^{2-} + FeO + 8H^+ \rightarrow Fe^{3+} + Cr^{3+} + 4H_2O$$
 (1)
(1-x)Fe³⁺ + x Cr³⁺ + 2H₂O \rightarrow Fe(1-x)CrxOOH + 3H⁺ (2)

3.1.2. Les techniques de traitement du Cr(VI) *in situ* les plus couramment appliquées

a) La fixation géochimique

Cette technique est une méthode hybride entre le « pump and treat » et le traitement *in situ*. L'eau polluée est pompée, traitée, additionnée de réactifs destinés à réduire le Cr(VI) *in situ*, puis ré-injectée dans l'aquifère (cette technique ne pourrait pas être appliquée en France car il est interdit de ré-injecter dans la nappe). Cette technique peut permettre de faire chuter la concentration en Cr(VI) au-dessous de la valeur recommandée pour les eaux potables (Technical Resource Guide, EPA 625/R-00/005).

Le succès de cette méthode dépend de l'efficacité du réactif et de la capacité du Cr(III) à se fixer sur la phase solide de l'aquifère. Les réactifs suivants peuvent être utilisés :

- le fer ferreux ;
- le sodium metabisulfite ;
- d'autres composés soufrés tels que le sulfite ou les sulfures (<u>www.reardonisco.com</u> /Chrome%206%20Reduction.htm « Methods of Reduction of Chromium+6 to chromium+3) ». Le polysulfure de calcium est efficace, car il est plus stable dans l'environnement de l'aquifère que d'autres réducteurs comme le dithionite de sodium, ne forme par de précipités insolubles, et ne pose pas d'importants problèmes de sécurité vis-à-vis de son stockage et de sa manipulation *in situ*. Il s'agit d'une solution complexe comprenant divers composés sulfurés tels que CaS₂, CaS₃, CaS₄, CaS₅... Les puits d'extractions d'un système « pump and treat » existant peuvent être ré-utilisés pour mettre en œuvre cette technique.

Des injections de dithionite de sodium (Na₂S₂O₄) ont été utilisées pour créer une barrière perméable réactive (Paul, 2001). Au niveau de l'aquifère, le dithionite de sodium réduit le Cr(VI) mais aussi le Fe(III) présent dans la plupart des sédiments en Fe(II), qui à son tour réduit le Cr(VI) en Cr(III). Le temps de demi-vie du dithionite dans

l'aquifère est de 2 à 3 jours, suffisamment court pour éviter que ce réactif devienne à son tour un contaminant de l'eau souterraine (il s'oxyde en soufre et sulfate).

- Exemples de réalisations sur site (EPA 625/R-00/005)
- Delaware River, U.S. : Sur le site d'une ancienne usine à papier sur la rivière Delaware, la concentration en Cr(VI) atteignait 85 mg/l. Après traitement par réduction et précipitation au sulfate de fer ferreux, la teneur en Cr(VI) a été réduite à moins de 50 µg/l sur la plus grande partie du site. Il s'agit de la première opération commerciale de traitement du Cr(VI) dans les sols et l'eau souterraine avec du fer ferreux. Le réactif a été injecté par l'intermédiaire d'un réseau de galeries d'infiltration et de puits.
- Indiana, U.S. : Un site de traitement du bois possédait quatre zones polluées par du Cr(VI), menaçant des ressources en eau potable. Les panaches de pollution ont été traités par pompage d'eau polluée, mélange de cette eau avec un réactif réducteur, et ré-injection. Dans la zone la plus polluée, la concentration en Cr(VI) a été diminuée au-dessous de 0,1 mg/l en deux mois par l'utilisation de polysulfures de calcium. Les zones moins polluées ont été traitées avec du bisulfite de sodium.
- Central California, U.S.: Du métabisulfite de sodium a été utilisé pour réduire le Cr(VI) issu d'activités de traitement du bois dans la Valley Wood Preserving site de Turlock, en Californie. Une réduction significative des teneurs en Cr(VI) a été obtenue en 2 ans de traitement.

b) Les barrières perméables réactives

La plupart des barrières perméables réactives utilisées pour traiter des nappes polluées au Cr(VI) sont réalisées avec du fer 0-valent (Fe⁰). Le Fe⁰ réduit le Cr(VI) en Cr(III) et s'oxyde en Fe(II) ou Fe(III). Le Cr(III) précipite sous la forme d'un hydroxyde mixte de fer et de chrome. Au cours de divers essais de laboratoire et de terrain, il a été observé que le traitement s'accompagne d'une augmentation de pH de 6,5-8,5 à 9,5, et que le potentiel redox diminue de + 100 à - 300 mV. Les concentrations en Cr(VI) sont généralement réduites à moins de 0,01 mg/l (Blowes *et al.*, 1997; Puls *et al.*, 1999). Un remplissage couramment utilisé est le fer granulaire, peu onéreux et disponible dans des granulométries grossières permettant d'obtenir des densités de compactage inférieures à 50 %. Cependant, l'utilisation de matériaux particulaires dans des tranchées pose un problème de récupération en fin de traitement.

Un matériau mixte composé de céramique poreuse et de Fe^0 a été développé. Il est beaucoup plus facile à manipuler que le Fe granulaire. Les blocs de céramique peuvent être ajustés dans des systèmes facilement installés et déplacés. La densité de la céramique peut être ajustée à la pression exercée par la nappe. La concentration en Fe à la surface de ces céramiques peut atteindre 94 %, et leur surface spécifique 5 m²/g. Le développement de ces matériaux a été centré sur l'augmentation de la surface spécifique, le contenu en fer et l'incorporation possible de matériaux secondaires qui augmenteraient les vitesses d'adsorption et d'immobilisation des métaux. Les zéolites présentent plusieurs caractéristiques qui les rendent attractives pour une utilisation dans des barrières perméables réactives : elles présentent une grande surface spécifique, des capacités d'adsorption élevées, de bonnes propriétés hydrauliques, et un coût modéré. Les zéolites naturelles peuvent être traitées par des surfactants cationiques qui augmentent leur affinité pour le Cr(VI). Elles peuvent aussi être combinées avec du Fe⁰, afin de combiner les phénomènes de réduction et d'adsorption.

- Exemples de réalisation sur site
- Caroline du Nord, U.S. (EPA 625/R-00/005) : Un programme de démonstration pour le traitement du Cr(VI) a été mis en place sur le site d'Elisabeth City, en Caroline du Nord. Il s'agit d'un ancien site de traitement de surface. La mise en place d'une BPR sur ce site s'est déroulée en deux étapes : une phase pilote et une démonstration à grande échelle. Lors de l'essai pilote, deux types de Fe⁰ ont été mélangés avec du sable grossier et de la roche aquifère. À proximité des zones de traitement, la concentration en Cr(VI) a été réduite à moins de 0,01 mg/l. Pour l'essai à grande échelle, une barrière continue, avec un remplissage de Fe⁰, a été réalisée. Les résultats indiquent que le Cr(VI) a été entièrement éliminé au cours des six premiers mois de traitement.
- Haardkrom site, Danemark (Kjelsen and Fuglsang, 2000) : Il s'agit du site d'une ancienne usine de traitement de surface. La nappe est polluée par un mélange de Cr(VI) et de tri-chloro-éthylène. La concentration en Cr(VI) varie entre 8 et 110 mg/l. Une barrière continue constituée d'une tranchée de 45 m, remplie de 200 tonnes de Fe⁰, a été mise en place. Après une année de fonctionnement, l'efficacité de la barrière pour l'élimination du Cr(VI) n'est pas entièrement satisfaisante, probablement en raison de l'hétérogénéité de composition de la nappe : les auteurs supposent que la tranchée doit traiter à certains endroits de trop fortes concentrations en Cr(VI).

c) Les zones réactives

Une zone réactive est une zone du sous-sol au niveau de laquelle des réactifs sont injectés afin de créer des conditions favorables à l'immobilisation ou à la dégradation des polluants. Ces derniers sont interceptés lorsque la nappe souterraine traverse la zone réactive. Il s'agit d'un traitement passif : l'eau n'est ni pompée, ni canalisée vers une barrière réactive. La mise en place d'une zone réactive est plus simple et moins coûteuse que celle d'une barrière, et cette méthode permet de traiter des zones relativement profondes. Cependant, les réactions et l'efficacité du traitement sont plus difficilement contrôlables que dans une barrière.

Pour le traitement du Cr(VI), l'injection de fer ferreux ou de Fe⁰ peut être effectuée. Des injections de matières organiques telles que des molasses ou des poly-lactates peuvent stimuler la réduction biologique du Cr(VI) par les micro-organismes endogènes du sous-sol.

- Exemples de réalisations sur site (EPA 625/R-00/005)
- Hanford, Washington, U.S.: Du dithionite de sodium a été injecté dans un aquifère, créant une zone réactive de 30 m de diamètre dans un panache de pollution au Cr(VI). Des analyses ont montré que, 10 mois après l'injection, la zone réactive était encore réductrice. La teneur en Cr(VI) était inférieure à la limite de détection.
- Midwestern, U.S. : Afin de stimuler la réduction biologique du Cr(VI) sur un site industriel, une solution diluée de mélasse a été introduite dans l'aquifère pollué par trois puits d'injection. Des conditions réductrices ont été rapidement établies dans ces puits, et la concentration en Cr(VI) a diminué de 15 mg/l à moins de 0,2 mg/l en un mois.
- Pennsylvania, U.S. : L'injection de mélasse a été appliquée à grande échelle sur un site industriel. La concentration en Cr(VI) a été réduite de 1,95 mg/l à 0,01 mg/l dans une des zones traitées. Après trois ans de traitement, l'objectif de dépollution a été atteint sur le site dans son ensemble.

d) La phytoremédiation

La phytoremédiation exploite la capacité de certaines plantes à accumuler, dégrader ou modifier l'état d'oxydation des polluants pour traiter les sols ou les nappes. Le Cr(VI) fait partie des substances dont la réduction par phytoremédiation a été étudiée (EPA 625/R-00/005). Cette technique pourrait être avantageuse dans les cas de très grandes zones polluées à faibles concentrations. Des végétaux à racines profondes, tels que les peupliers, peuvent atteindre les polluants dans des nappes peu profondes. À l'heure actuelle, il n'existe pas d'exemples de réalisations.

3.1.3. Perspectives de traitement biologique du Cr(VI) en BPR

a) Réduction biologique du Cr(VI)

De nombreux micro-organismes sont capables de réduire le Cr(VI), en conditions aérobies ou anaérobies (Wang and Chirwa, 1996 ; Turick C.E., Camp C.E. and Apel W.A., 1997 ; Pattanapipitpaisal *et al.*, 2001 ; Pattanapipitpaisal *et al.*, 2002). Les Bactéries Sulfato-Réductrices (BSR) peuvent réduire le Cr(VI) par des processus enzymatiques directs (Lovley and Phillips, 1994 ; Michel *et al.*, 2001) ou par réaction chimique avec le sulfure dissous qu'elles produisent (Fude *et al.*, 1994 ; Kim *et al.*, 2001). Ces deux mécanismes participent probablement simultanément à la réduction du Cr(VI) par les BSR. Plusieurs procédés utilisant l'H₂S produit par les BSR pour réduire le Cr(VI) dans les eaux ou les sols ont été proposés (Lupton *et al.*, 1991 ; Thornton and Amomette, 1999). Le BRGM a travaillé à la mise au point de bioréacteurs inoculés avec une souche bactérienne particulièrement efficace pour la réduction du Cr(VI), *Desulfomicrobium norvegicum* (Michel *et al.*, 2001). Ce dispositif était alimenté avec de l'hydrogène en tant que donneur d'électrons. Un des facteurs étudiés lors de ce projet était la concentration initiale en sulfate dans l'eau traitée

(Battaglia-Brunet *et al.*, 2004). Pour une concentration en Cr(VI) dans l'eau égale à 100 mg/l, le Cr(VI) est toujours réduit quand l'eau ne contient que 250 mg/l de sulfate. Pour des concentrations plus élevées en sulfate, le sulfure dissous est susceptible d'être produit en excès par les bactéries. Le temps de résidence nécessaire pour une réduction complète du polluant, dans des réacteurs alimentés en continu, est compris entre 16 et 19 h. Lorsque l'eau à traiter contient entre 10 et 20 mg/l de Cr(VI), des temps de résidence compris entre 7 et 5 h ont permis de réduire entièrement le Cr(VI).

b) L'apport de substrat

La réduction biologique anaérobie du Cr(VI) implique l'injection de substrat(s) pour les micro-organismes, et en particulier d'un donneur d'électrons. Diverses substances susceptibles de jouer ce rôle ont été testées lors de la mise en œuvre de traitements *in situ* : le lactate, le propionate, le butyrate, l'hydrogène, l'éthanol... Certains sont visqueux et difficiles à manipuler, en particulier en climats froids, et nécessitent l'utilisation de pompes spéciales pour leur injection dans le sous-sol (<u>http://www.envalliance.com/monitor&pubs/summer%202002.pdf</u> "Battelle Conference Technology Overview").

• L'hydrogène

L'hydrogène est un donneur d'électrons efficace pour la réduction biologique du Cr(VI) (Battaglia-Brunet *et al.,* 2004). Un des avantages de l'hydrogène (gaz) est qu'il induit moins de production de biomasse que les substrats organiques, et sa dégradation ne génère pas de sous-produits. Il ne présente aucun risque pour la qualité de l'eau souterraine, et la vitesse de colmatage de la barrière réactive par de la biomasse est limitée. Cependant, l'hydrogène gaz est très peu soluble (environ 1,6 mg/l à 20 °C). Son injection directe (sous forme gaz) sur un site pose des problèmes de sécurité et de gaspillage. Différents types de bactéries peuvent entrer en compétition pour la consommation de l'hydrogène (méthanogènes, sulfato-réductrices, dénitrifiantes, bactéries réductices de polluants chlorés).

Les diverses méthodes permettant de fournir de l'hydrogène aux bactéries *in situ* peuvent être regroupées en deux catégories (Hugues *et al.,* 1997) :

- > Les méthodes qui délivrent directement de l'hydrogène d'une source extérieure.
- > Les méthodes qui génèrent de l'hydrogène in situ.

Méthodes d'injection à partir d'une source extérieure

Afin de limiter le gaspillage du gaz, l'hydrogène peut être injecté à faible débit selon la méthode du « bio-sparging », ou bien récupéré par des pompes en surface afin d'être réinjecté. Des systèmes de distribution lente à travers des membranes perméables au gaz sont actuellement mis au point à l'échelle du laboratoire. Il peut s'agir de membranes à fibres creuses «hollow-fiber membranes» (Fang *et al.,* 2002). L'hydrogène gaz est injecté dans les fibres, et lorsque l'eau souterraine traverse la membrane, l'H₂ se dissout et stimule l'activité bactérienne. Ce type de dispositif

permettrait de contrôler le transfert de gaz, et de limiter très efficacement le gaspillage. La pression de gaz dans les membranes et la surface spécifique peuvent être modifiées afin d'ajuster la vitesse de distribution du gaz. Les membranes sont confectionnées avec des matériaux hydrophobes tels que le polypropylène, le polyéthylène ou le téflon. Le caractère hydrophobe de ces matières, ainsi que le faible diamètre des pores (moins de 0,1 μ m) permet d'éviter le mouillage de leur surface, et d'assurer une perméabilité au gaz élevée. La vitesse de transfert du gaz est limitée par la résistance externe du film de liquide.

Méthodes de génération d'hydrogène in situ

L'hydrogène peut être produit *in situ*, par électrolyse, réaction électrochimique, ou par fermentation (Hugues *et al.*, 1997).

Génération d'hydrogène par fermentation

Un des substrats fermentescibles les plus efficaces pour générer de l'hydrogène *in situ* est le lactate. En conditions anaérobies, la dégradation du lactate en acétate peut libérer deux moles d'H₂ par mole de lactate. Les sous-produits de cette réaction fournissent une source d'énergie (H₂) et une source de carbone (acétate) pour les bactéries Cr(VI)-réductrices. Par ailleurs, le lactate est directement utilisé comme source de carbone et d'énergie par les bactéries sulfato-réductrices (<u>http://www.purac.com/index.html?envelope=47&folder=47</u> « Bioremediation »).

La société *JRW Technologies* commercialise une solution de lactate concentrée, nommée WILCLEAR[™]. La composition de ce produit clair et légèrement visqueux, très pur, respecte les contraintes imposées pour atteindre la qualité de l'eau potable (26. <u>www.jrwbioremediation.com/WILCLEAR.htm"JRW</u> Bioremediation"). JRW Technologies propose également un produit nommé « ChitoRem[™] Chitin Complex ». Il s'agit d'un biopolymère qui se dégrade lentement en libérant des donneurs d'électrons facilitant la biodégradation des solvants chlorés et la réduction des métaux. Il contient également une source d'azote et d'autres nutriments utiles pour la croissance des micro-organismes.

La société PURAC (http://www.purac.com/index.html?envelope=47&folder=47 « Bioremediation ») commercialise les produits suivants :

Sodium Lactate Envirolac 60 : une solution aqueuse de sel de sodium d'acide L(+)lactique, produit par fermentation.

> PURAC : acide L(+)-lactique, produit par fermentation.

> PURASOLV EL/TG : Ethyl lactate, ester d'acide L(+)-lactique. Dans un environnement aqueux, il s'hydrolyse lentement en acide lactique et éthanol, qui peuvent servir de substrat pour les bactéries participant au traitement de l'eau.

La société REGENESIS commercialise un produit nommé **HRC** (Hydrogen Releasing Compound) pour la bioremédiation anaérobie des polluants chlorés et du Cr(VI) (Koenigsberg, 1999, Koenigsberg and Sandefur, 2000). Le HRC® est un ester de polylactate (glycerol-polylactate) qui s'hydrolyse lentement *in situ* en acide lactique et en autres acides organiques dérivés du lactate. Il s'agit d'un produit jaune-marron, visqueux, qui peut être injecté sous pression dans le sous-sol. En fonction des conditions du site, il peut demeurer actif pour la bioremédiation anaérobie pendant 6 mois, un an ou plus longtemps. En présence de HRC®, la population bactérienne du site va réduire tous les accepteurs d'électrons disponibles (oxygène, nitrate, sulfate, fer...), et le potentiel du milieu va être diminué jusqu'à atteindre une valeur suffisamment négative pour la réduction du Cr(VI) :

(www.regenesis.com/library/Technical%20Bulletins/HRC/HRC%20Technical%20Bulletins/HRC%20Bulletins/H

Des essais réalisés au BRGM en 2003 ont comparé l'efficacité du lactate et du HRC pour la réduction du Cr(VI) par deux populations bactériennes : *Desulfomicrobium norvegicum* (souche pure), et la population développée dans le cadre du projet Metalbioreduction (EVK99). Les essais ont été réalisés en batch avec des milieux de cultures liquides. Ces essais ont montré que le Cr(VI) est plus rapidement réduit en présence de HRC qu'avec du lactate (Figure 1). En absence de bactéries, le Cr(VI) est lentement réduit par le HRC®. Ce produit contient donc certainement une substance réductrice qui convertit le Cr(VI) en Cr(III) de façon abiotique. Cependant, les bactéries accélèrent significativement le processus de réduction.



Figure 1 - Réduction du Cr(VI) en fioles de 500 ml. HRC® témoin disque orange, HRC® + D. norvegicum carré orange foncé, HRC® + population Métalbio triangle rouge, lactate témoin disque bleu clair, lactate + D. norvegicum carré bleu foncé,lactate + population Métalbio triangle vert. Essais réalisés en triplicat.

Réactions électrochimiques générant de l'hydrogène

La corrosion du Fe⁰ peut générer de l'hydrogène cathodique. L'hydrogène généré par corrosion du fer peut être utilisé par des bactéries anaérobies qui participent à la réduction du Cr(VI). Il a été montré, par des expériences de laboratoire réalisées en batch, que les bactéries sulfato-réductrices peuvent utiliser l'hydrogène cathodique (Weather *et al.*, 1997).

L'utilisation de Fe⁰ est courante dans les BPR. Une modification prometteuse de cette technologie consisterait à introduire des bactéries anaérobies dans ces systèmes, de façon à combiner les processus abiotiques et biologiques pour l'élimination des substances polluantes (Weather *et al.*, 1996). Cette synergie entre processus biologiques et électrochimiques a été évaluée par plusieurs études de laboratoire (Henny *et al., in press*).

La consommation de l'hydrogène par les bactéries sulfato-réductrices augmente la vitesse de corrosion et la réactivité du Fe⁰, et améliore ainsi la réaction de réduction abiotique du Cr(VI) par le Fe⁰. Les bactéries réduisent également du Cr(VI). Des essais de laboratoire, réalisés avec du Fe⁰ granulaire et de la laine de fer (Henny *et al., in press*) ont montré que le Fe⁰ inoculé avec des BSR et alimenté avec du lactate est deux fois plus efficace pour la réduction du Cr(VI) que le Fe⁰ seul. Les différents systèmes testés présentaient l'efficacité relative suivante :

$$Fe^{0}$$
 seul < Fe^{0} + BSR < Fe^{0} + BSR + lactate

Par ailleurs, il a été observé *in situ* que l'inoculation par des BSR de BPR remplies avec du Fe⁰ améliore l'efficacité du traitement, lorsque l'aquifère contient du sulfate (Weather *et al.,* 1996).

• Les mélasses

Les mélasses sont des sous-produits de l'industrie sucrière, principalement composées de saccharose, mais contenant également diverses substances utiles pour le développement des micro-organismes : azote, phosphore, oligo-éléments. Il s'agit d'un substrat très bon marché. Injecté dans le sous-sol, il est utilisé par les micro-organismes qui consomment les accepteurs d'électrons et font chuter le potentiel du milieu, créant des conditions réductrices favorables à la réduction du Cr(VI) (Dennis, 1998). Les mélasses peuvent être utilisées par les diverses bactéries Cr(VI)-réductrices présentes dans la microflore du sous-sol (Turick *et al.,* 1997).

• Les supports bactériens

Dans une BPR « biologique », le remplissage doit jouer le rôle de support bactérien, c'est-à-dire que les micro-organismes vont se développer sous la forme d'un biofilm à la surface du matériau constitutif de la barrière. D'après la littérature (Battagia *et al.,* 2004), divers supports ont été testés à l'échelle du laboratoire pour la biorémédiation du Cr(VI) par les bactéries sulfato-réductrices : le sable, la pouzzolane, le fer granulaire et la laine de fer, des céramiques poreuses ou frittées contenant du Fe⁰, des zéolithes, des charbons actifs.

Les caractéristiques d'un support optimal seraient de présenter une surface spécifique importante, tout en limitant les phénomènes de colmatage. L'inhibition des bactéries par le Cr(VI) est d'autant plus faible que la surface spécifique est élevée, c'est-à-dire que la densité de biomasse est importante. Pour la bioréduction du Cr(VI) en présence d'hydrogène dans des réacteurs colonnes à lit fixé, la pouzzolane est plus efficace que des supports en PVC à faible surface spécifique (Battaglia-Brunet *et al.,* 2004).

La laine d'acier serait un support bactérien intéressant pour la réduction du Cr(VI) par des bactéries sulfato-réductrices, car sa corrosion génère de l'hydrogène.

3.2. LE TRAITEMENT DU CR(VI) EN BARRIÈRES PERMÉABLES RÉACTIVES : PARTIE EXPÉRIMENTALE

L'objectif du présent programme expérimental est de déterminer les conditions pour lesquelles la population Cr(VI)-réductrice Métalbio, sélectionnée dans le cadre du projet Européen Métalbioréduction (EVK1-CT-1999-00033) est capable de traiter de l'eau polluée au Cr(VI) dans les conditions opératoires imposées par le traitement *in situ* par (bio)barrières.

3.2.1. Utilisation de la laine d'acier comme support bactérien

L'analyse de la bibliographie a montré que le fer 0-valent est la substance la plus couramment utilisée dans des barrières réactives pour réduire le Cr(VI). Un système combinant l'effet du Fe^0 à l'activité des bactéries (bactéries sulfato-réductrices en particulier) pourrait s'avérer plus efficace que le Fe^0 seul. Avec des bactéries seules, il pourrait être difficile de maintenir une réduction totale du Cr(VI) pour des temps de résidence très courts (0,5 à 3 h). Il a donc été décidé de tester un système combinant l'effet du Fe^0 , sous forme de laine d'acier, à celui d'une population de bactéries sulfato-réductrices (BSR).

Deux substrats pour les BSR seront testés au cours de la présente étude : le lactate et le HRC. Ce dernier (ester de glycérol-lactate) s'est révélé très efficace pour la réduction du Cr(VI) lors d'essais réalisés en 2003. Cependant, il semble plus logique de travailler en priorité avec du lactate. En effet, nous ne maîtrisons pas de méthode permettant d'analyser le HRC®, alors que des kits enzymatiques sont disponibles pour le dosage du lactate et de son principal sous-produit, l'acétate. Dans un premier temps, l'apport minimal de lactate nécessaire pour une réduction efficace du Cr(VI) sera déterminé expérimentalement. Ensuite, les données obtenues avec le lactate (monomère) seront utilisées pour élaborer une seconde expérience mettant en œuvre du HRC® (polymère de lactate).

a) Essais avec la laine d'acier seule

• Matériel et méthodes

Des essais préliminaires ont été réalisés dans des petites colonnes de verre remplies de laine d'acier (Ets Jorlin, Ingré, ref. TAM006). Ces essais ont pour objectif de déterminer la cinétique de réduction du Cr(VI) par la laine d'acier en absence de bactéries. Des solutions de Cr(VI) à 15 mg/l et 30 mg/l, préparées avec du chromate de sodium, ont été pompées à travers la laine d'acier dans deux colonnes fonctionnant en parallèle (une colonne pour chaque concentration en Cr(VI), à différents temps de résidence (4 h, 1 h, 0,5 h). La concentration en Cr(VI) a été analysée en sortie de colonne.

Les conditions opératoires de cette expérience sont les suivantes : Volume de colonne, Vtotal = 75,5 cm³, Vutile = 74 cm³, masse de laine d'acier, 2,79 g par colonne, ratio Vtotal Colonne/Masse Laine, R \cong 27 cm³/g, ratio Vtotal Colonne/Volume utile, r \cong 1,02. La vitesse de réduction (en mg/l.h) a été calculée en divisant la différence de concentration en Cr(VI) (mg/l) entre l'entrée et la sortie de la colonne par le temps de résidence (en h).

Analyses

Le Cr(VI) est analysé avec le Kit Merck spectroquant[®] 1.14758.0001 (dosage colorimétrique), le fer ferreux est analysé par la méthode colorimétrique à la phénantroline (complexe rouge FeII-1-6-phenantroline détecté à 510 nm).

• Résultats et Discussion

La concentration en Cr(VI) en sortie de colonnes est donnée par la Figure 2. Quelle que soit la condition opératoire appliquée, du Cr(VI) est détecté en sortie de colonne. Cependant, la réduction du Cr(VI) est effective, car la concentration en Cr(VI) est toujours inférieure en sortie qu'en entrée de colonne.

Concentration en Cr(VI) 15 mg/l

En début d'expérience (nombre de volumes utiles passés à travers la colonne < 10), la concentration en Cr(VI) en sortie de la colonne est d'autant plus faible que le temps de résidence est élevé. À court terme l'efficacité de la laine d'acier est supérieure quand le débit d'alimentation est faible. Cependant, lorsque le nombre de volumes de pores (volumes utiles) est supérieur (entre 20 et 60) la différence s'atténue entre les résultats obtenus à 1 et 4 h de temps de résidence.

Concentration en Cr(VI) 30 mg/l

Comme précédemment, l'efficacité de la laine d'acier en début d'expérience est beaucoup plus grande quand le débit d'alimentation est faible. Cependant, la concentration en Cr(VI) en sortie de colonne augmente rapidement pour le temps de résidence le plus long (4 h), alors qu'elle est assez stable pour les temps de résidence



1 et 0,5 h. À long terme, les différences s'atténuent entre les résultats obtenus à différents temps de résidence.

Figure 2 - Évolution de la concentration en Cr(VI) en sortie de colonnes. (Triangles = 0,5 h de temps de résidence. Carrés = 1 h de temps de résidence). Cercles, 4 h de temps de résidence.

Le taux d'abattement (TA) de la teneur en Cr(VI) est défini par la formule :

TA en mg/l.h = (Cr(VI) entrée – Cr(VI) sortie) / temps de résidence

le TA par le Fe⁰ de la laine d'acier en fonction du temps et en fonction du temps de résidence est donné par les Figures 3 et 4.

Plus le temps de résidence est faible (plus le débit est élevé) plus le TA du chrome hexavalent est élevé. Ce résultat pourrait être lié à un phénomène de transfert par lequel le contact entre les réactifs (Cr(VI) et fer) est amélioré quand la vitesse d'écoulement augmente. D'autre part, il est possible que des chemins préférentiels se forment lorsque l'écoulement de la solution est trop lent (débit faible). Il semble donc que l'efficacité de la laine d'acier augmente avec le débit d'alimentation. Quel que soit le temps de résidence, le TA diminue rapidement en début d'expérience, puis tend à se stabiliser. La concentration en Cr(VI) dans l'alimentation n'a pas d'influence nette sur le TA.



Figure 3 - Évolution du TA par la laine d'acier en fonction du temps (triangles = 0,5 h de temps de résidence ; carrés = 1 h de temps de résidence ; cercles = 4 h de temps de résidence).



Figure 4 - Évolution du TA par la laine d'acier en fonction du nombre de volumes utiles passés à travers la colonne.

La concentration en Fe(II) en sortie des colonnes demeure toujours très faible (inférieure à 1 mg/I). Au bout de quelque temps, l'oxydation de la laine d'acier est

visible par le développement d'une couleur « rouille » dans les colonnes pour toutes les expériences. La couleur « rouille » plus intense dans certaines parties de la colonne semble révéler la formation de quelques chemins préférentiels d'écoulement de la solution (Figure 5).



Figure 5 - Colonne remplie de laine d'acier soumise à l'action du Cr(VI) : développement de couleur « rouille » à la surface de la laine.

Conclusion et préparation de l'essai en présence de bactéries

Les résultats de ces premiers essais fournissent quelques indications concernant la réactivité de la laine d'acier. Cette dernière réduit le Cr(VI), mais de façon incomplète dans les conditions testées (37,7 g de laine par litre utile de colonne). Pour les temps de résidence 1 et 0,5 h, valeurs proches des temps de résidence qui seraient appliqués dans la cartouche de traitement de type Soletanche-Bachy, la vitesse de réduction du Cr(VI) tend vers une valeur proche de 10 mg/l.h. Les vitesses maximales qui avaient été obtenues avec des bactéries consommant de l'hydrogène (projet Metalbioreduction) étaient proches de 5,5 mg/l.h, pour des temps de résidence de 16 à 19 h (Battaglia-Brunet *et al.,* 2004). Un inconvénient majeur du Fe⁰ est que sa corrosion entraîne la formation de précipités de Fe(III), qui participent au colmatage des colonnes. Les effets des bactéries et de la laine d'acier seront combinés dans une

colonne qui sera remplie de couches alternées de pouzzolane et de laine d'acier. La pouzzolane est un support bactérien couramment utilisé dans les bioréacteurs à lit fixé. La densité de laine d'acier par volume utile de colonne est égale à 37,7 g/l. Le volume utile de la colonne qui sera utilisée pour les essais proches des conditions réelles sera environ 2 litres. La masse de laine d'acier placée dans la colonne sera fixée à 60 g, répartie en 3 couches de 20 g de laine alternant avec des couches de pouzzolane. La manière dont le flux de liquide est distribué dans la colonne de l'alimentation à la sortie joue un rôle primordial dans l'efficacité du traitement.

b) Essais avec de la laine d'acier et des bactéries

• Matériel et méthodes

Ces essais sont réalisés dans une colonne de 2 l (volume total) thermostatée et équipée de systèmes pour le suivi de pH, Eh et pression différentielle (Ahlborn, capteur 0-200 mbar, précision 0,5 %).

La colonne est remplie par des couches successives de laine d'acier et de pouzzolane : du bas vers le haut de la colonne, successivement 200 g de pouzzolane, 20 g de laine d'acier, 200 g de pouzzolane, 20 g de laine d'acier, 200 g de pouzzolane ; soit au total 60 g de laine d'acier et 700 g de pouzzolane. La colonne est inoculée avec une population contenant *Desulfomicrobium norvegicum*, souche de bactérie sulfato-réductrice particulièrement efficace pour le réduction du Cr(VI) (Michel *et al.,* 2001). Cette population a été adaptée au Cr(VI) au cours du projet *Metalbioreduction*.

En début d'expérience, la colonne est remplie de milieu de culture MIU (milieu industriel-urée) - lactate dont la composition est la suivante, et utilisé uniquement pour le démarrage de l'expérience :

Urée	0,21 g/l
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	0,4 g/l
Na ₂ SO ₄	7,1 g/l
DAP (engrais)	0,23 g/l
Lactate de sodium	6 g/l
Solution d'oligo-éléments	1 ml/l
Eau du robinet	q.s.p 1 l

Le pH est ajusté à 7 avec H₂SO₄

Composition de la solution d'oligo-éléments

Na_2MoO_4 , 2 H_2O	18 mg
H ₃ BO ₃	0,3 g
CuCl _{2,}	2 mg
CoSO ₄ , 7 H ₂ O,	130 mg

Le milieu de culture est injecté dans la colonne, en mode ascendant, par une pompe. Le volume utile réel de la colonne est ainsi déterminé. Il est égal à 1,81 l. L'inoculum (200 ml de culture) est ensuite pompé dans la colonne alors que le milieu de culture excédentaire déborde par la vanne de sortie placée en haut de colonne. La colonne est thermostatée à 30 °C pour faciliter la croissance bactérienne. Un prélèvement est effectué quotidiennement pour analyser le sulfate. Lorsque la croissance a démarré (le démarrage est révélé par la réduction du sulfate et la production de sulfure), la température de thermostatation est diminuée à 20 °C, puis 12 °C (température des eaux souterraines).

La colonne a ensuite été alimentée en continu avec deux solutions :

- une solution d'eau du robinet (réseau d'eau potable du BRGM) additionnée de 15 mg/l de Cr(VI) + 100 mg/l de sulfate ;
- une solution de lactate de sodium (stérilisée par autoclavage) à 10 g/l.

Le débit de la solution de lactate est égal à 1/10 du débit de solution de Cr(VI). Le temps de résidence initial a été fixé à 24 h, puis le débit est progressivement augmenté. Au cours de l'expérience, Soletanche-Bachy a suggéré d'introduire plus de sulfate dans l'alimentation, afin de se rapprocher des compositions d'eaux réelles. La concentration en sulfate a été élevée à 600 mg/l.

Rappelons la définition du temps de résidence dans une colonne. Il s'agit du rapport entre le volume poreux total de la colonne sur le débit d'alimentation. Ainsi, le temps de résidence est exprimé en dimension de temps (par exemple en heures). Il est par exemple de 10 h pour une colonne de 2 l alimentée avec un débit de 0,2 l/h ou 200 ml/h.

La chronologie du programme expérimental est donnée par le Tableau 1.

Jour 6 - jour 0	Phase batch milieu MIU - 30 °C
Jour 0 - jour 5	Continu avec eau + Cr(VI) 15 mg/l + lactate 1 g/l + sulfate 100 mg/l.
	Diminution de température 30 °C à 12 °C Temps de résidence
	(T. res.) 25 h.
Jour 6 - jour 19	Continu avec eau + Cr(VI) 15 mg/l + lactate 1 g/l + sulfate 100 mg/l.
	12 °C, T. res. 25 h.
Jour 20 - jour 40	Diminution du temps de résidence de 25 à 10 h.
Jour 22	Augmentation de la concentration en sulfate de 100 à 600 mg/l
Jour 46	Introduction de 150 mg/l de NH ₄ Cl dans l'alimentation

Tableau 1 - Essai laine d'acier + pouzzolane + bactéries 2004 - Chronologie de sucession des différentes conditions opératoires.

Analyses

Le Cr(VI) est analysé avec le Kit Merck spectroquant[®] 1.14758.0001 (dosage colorimétrique), l'acétate est analysé avec le Kit Diffchamb 1 002 891 (dosage enzymatique colorimétrique), le lactate avec le Kit Diffchamb 1 002 811 (dosage enzymatique colorimétrique), le sulfate avec le Kit Merck spectroguant 1.14548.0001 (dosage colorimétrique). Le comptage des bactéries est effectué au microscope optique sur cellule de Thoma (grossissement x 400). Le lactate est analysé en entrée et sortie de colonne. La concentration en entrée sera ajustée de façon à ne pas avoir de lactate en sortie (et donc en excès). La production d'acétate est suivie par des analyses en sortie de colonne. L'état de la laine d'acier et de la pouzzolane en début et en fin d'expérimentation a été analysé avec un Microscope Electronique à Balayage (MEB) couplé à un spectromètre de rayons X. Un des principaux objectifs de ces observations était d'évaluer le degré de corrosion de la laine d'acier. Les observations au microscope électronique ont été réalisées avec un MEB JEOL JSM 6100 couplé à un spectromètre de rayons X en dispersion d'énergie (EDS pour Energy Disperive Spectrometry) KEVEX Quantum, en appliquant une tension de 25 kV sur des échantillons préalablement recouverts d'une fine couche de carbone (métalliseur EDWARDS Auto 306).

Résultats

Phase de démarrage en batch

L'évolution de la concentration en sulfate dans la colonne est donnée par la Figure 6. Les bactéries ont consommé tout le sulfate au bout de 6 jours. L'alimentation en continu du système avec les solutions de Cr(VI) est alors mise en route le 1^{er} juin 2004.



Figure 6 - Évolution de la concentration en sulfate dans la colonne au cours de la phase batch.

Traitement en continu

La température du système a été rapidement amenée de 30 à 12 °C, afin de se placer dans les conditions du traitement *in situ*. La colonne n'était alors alimentée qu'avec de l'eau du robinet additionnée de Cr(VI), de sulfate et de lactate de sodium. Lorsque la température a été diminuée, un pic de Cr(VI) a été observé en sortie de colonne (jour 5, Figure 7), puis les bactéries se sont adaptées aux nouvelles conditions opératoires et la concentration en Cr(VI) en sortie de colonne a chuté jusqu'à des valeurs inférieures à 0,5 mg/l (jours 16-18), pour un temps de résidence de 25 heures. Le débit d'alimentation a alors été augmenté de façon à atteindre des temps de résidence de 15, 12 puis 10 heures. Dans ces conditions, la concentration en Cr(VI) en sortie de colonne était toujours très faible (jours 20-40). La concentration en sulfate dans l'alimentation a été augmentée de 100 à 600 mg/l au jour 22 (Figure 8).



Figure 7 - Évolution de la concentration en Cr(VI) en entrée et en sortie de colonne pouzzolane/laine d'acier, et temps de résidence.

À partir du jour 40, du Cr(VI) a été détecté en sortie de colonne, sa concentration étant comprise entre 0,5 et 2,5 mg/l, c'est-à-dire beaucoup plus que la concentration limite définie dans le cahier des charges (0,1 mg/l). Cette chute de l'efficacité du traitement s'accompagne d'une dégradation de l'activité sulfato-réductrice. En effet, au cours de cette période, les concentrations en sulfate en entrée et sortie de colonne sont très proches (Figure 8). Une augmentation du potentiel redox en haut de colonne est également observée (Figure 9). Le potentiel, qui était stable et proche de - 700 mV (Ref. Ag/AgCI) quand le traitement était efficace, devient instable et augmente jusqu'à - 500 mV lorsque du Cr(VI) est détecté en sortie de colonne. Le pH varie entre 6,9 et 8,5.



Figure 8 - Évolution de la concentration en sulfate en entrée et en sortie de colonne pouzzolane/laine d'acier et de la concentration en Cr(VI) en sortie de colonne.



Figure 9 - Évolution du potentiel redox et du pH en haut de colonne pouzzolane/laine d'acier.

L'évolution des vitesses de réduction du sulfate et du Cr(VI) est donnée par la Figure 10. La vitesse de réduction du sulfate est faible en début d'expérience en raison de la faible teneur en sulfate dans l'alimentation. À partir du jour 22, lorsque l'alimentation contient 600 mg/l de sulfate, des vitesses de réduction plus élevées sont obtenues, mais ce paramètre demeure instable, probablement parce que les étapes d'augmentation de débit provoquent des phases successives d'inhibition par le Cr(VI) et d'adaptation à cette espèce chimique toxique. La vitesse de réduction du Cr(VI) atteint des valeurs proches de 2 mg/l h lorsque le débit d'alimentation est augmenté.
Il s'agit de la phase au cours de laquelle la vitesse de réduction du sulfate est maximale. À partir du jour 40, la vitesse de réduction du sulfate décline, l'activité sulfato-réductrice est inhibée. La vitesse de réduction du Cr(VI) diminue jusqu'à 0,9 mg/l h. Cependant, elle n'est pas nulle. Sa valeur est environ équivalente à la moitié de la valeur maximale obtenue au cours de la période de bon fonctionnement du traitement.



Figure 10 - Évolution des vitesses de réduction du sulfate et du Cr(VI) dans la colonne pouzzolane/laine d'acier.

La consommation de lactate diminue avec le temps de résidence (Figure 11). Une consommation moyenne approximative proche de 0,3 g/l peut être calculée sur la période 20-40 jours, au cours de laquelle le traitement était efficace. Il est intéressant de noter que la consommation de lactate n'est pas nulle après 40 jours. D'autres bactéries que les bactéries sulfato-réductrices sont probablement toujours actives. La production d'acétate est très faible, inférieure à 0,1 mg/l. L'acétate est un sous-produit de la dégradation du lactate par certaines bactéries sulfato-réductrices, dont *Desulfomicrobium norvegicum*. Il est probable que d'autres bactéries présentes dans la population mixte dégradent l'acétate en $CO_2 + H_2O$ ou $CO_2 + H_2$. À partir du jour 46, une source d'azote a été introduite dans l'alimentation, à raison de 150 mg/l de NH₄Cl. En effet, il était possible de supposer que la croissance bactérienne, après épuisement de la réserve d'azote apportée lors de la phase batch, était limitée par l'absence de cet élément dans l'eau à traiter. Cependant, cet apport d'azote n'a pas amélioré l'état du système. Il a peut-être été effectué trop tard. La pression différentielle est demeurée très faible (inférieure à 10 mbars) durant toute cette expérience.



Figure 11 - Évolution de la consommation de lactate et de la production d'acétate dans la colonne pouzzolane/laine d'acier.

Observations au MEB

La laine d'acier, lorsqu'elle est introduite dans le réacteur en début d'expérience. se présente comme un enchevêtrement de fibres aplaties d'une largeur comprise entre 10 et 20 µm et d'une épaisseur d'un à deux micromètres (Figure 12A). En fin d'expérimentation, la laine d'acier que l'on extrait de la colonne a perdu son aspect fibreux et se présente, à l'œil nu, comme une bouillie. Les travaux en microscopie électronique confirment l'absence de fibres et donc la corrosion totale de la laine d'acier (Figure 12B). L'analyse EDS montre également la présence de chrome dans les couches de laine d'acier issues du réacteur (Figure 13A). Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'aucune présence de chrome n'a pu être mise en évidence par EDS dans les couches de pouzzolane prélevées en fin d'expérimentation (Figure 13B). Ces résultats suggèrent donc fortement que la réduction du Cr(VI) et la précipitation du Cr(III) se font principalement avec le Fe⁰. Dans la mesure où la laine d'acier semble jouer un rôle important dans la réduction et la précipitation du chrome. le fait que celleci soit rapidement soumise à la corrosion et totalement corrodée après 40 jours de fonctionnement du réacteur peut expliquer en partie pourquoi on observe une diminution de la capacité du réacteur à réduire le Cr(VI). Les observations réalisées en microscopie électronique à balayage sur la pouzzolane ne montrent pas de modifications majeures de la structure de la pouzzolane qui est un support inerte pour la croissance des bactéries (Figure 14). En particulier, on ne note pas de présence de développement important d'un biofilm, ni de réduction de la porosité apparente.



Figure 12 - Photos de MEB de la laine d'acier avant introduction dans le réacteur (A), et en fin d'expérimentation (B).



Figure 13 - Étude aux rayons X de la laine d'acier (A) et de la pouzzolane (B) en fin d'expérimentation.



Figure 14 - Photos de MEB de la pouzzolane avant introduction dans le réacteur (A), et en fin d'expérimentation (B).

Discussion

L'expérience réalisée dans la colonne contenant un remplissage mixte pouzzolane + laine d'acier n'a pas permis d'atteindre l'objectif fixé dans le cahier des charges pour le traitement du Cr(VI), en termes de temps de résidence. En effet, le temps de résidence minimum atteint, pour une élimination efficace du Cr(VI), n'a pas pu être réduit à moins de 10 h. Au cours du projet Métalbioréduction, un temps de résidence plus faible avait été atteint pour une concentration en Cr(VI) équivalente, et à des températures proches de 12 °C (Ignatiadis *et al.*, 2003 ; Battaglia *et al.*, 2005). Les deux principales différences entre le pilote Métalbioréduction et la présente expérience sont les suivantes :

- le substrat énergétique, de l'hydrogène au cours de Metalbioréduction et du lactate dans la présente étude ;
- le remplissage des bioréacteurs, de la pouzzolane seule au cours de Metalbioréduction, et un mélange pouzzolane/laine d'acier dans la présente étude. La présence de laine d'acier était censée améliorer le comportement global du système, et permettre d'atteindre un temps de résidence plus faible. En fait, les résultats ont été moins bons en présence de laine d'acier que lorsque le réacteur était rempli uniquement de pouzzolane.

Une autre différence entre les deux opérations est le temps alloué aux essais. Dans le cas de Métalbioréduction, la durée totale de l'expérience avait été plus importante (5 mois en tout entre l'inoculation et l'obtention de 7 h de temps de résidence). Dans le cas du présent projet, le temps de résidence a, peut-être, été diminué trop rapidement, sans laisser au biofilm le temps de se développer et de s'installer de façon stable. Les

observations au MEB ont révélé que la laine d'acier a été entièrement corrodée avant que le biofilm ait eu le temps de s'installer sur la pouzzolane.

Deux autres hypothèses sont proposées pour expliquer les résultats de la présente expérience :

- Il est possible qu'un problème d'alimentation en lactate ait pu perturber l'activité bactérienne. En effet, le tuyau de la pompe d'alimentation en lactate s'est bouché à plusieurs reprises, et les bactéries ont pu manquer de substrat. Cependant, le fait de ré-alimenter en lactate et d'augmenter le temps de résidence (jusqu'à 15 h) n'a pas eu d'effet positif sur l'efficacité du bioréacteur (peut-être en raison d'une dérive irréversible de l'état de la population bactérienne).
- Contrairement à ce qui était espéré, la laine d'acier placée dans le bioréacteur a pu avoir un effet négatif sur la vitesse globale de réduction du Cr(VI). En effet, il était espéré que les trois réactions suivantes se réaliseraient en synergie :
- (1) $CrO_4^{2-} + Fe^0 + 8H^+ = > Fe^{3+} + Cr^{3+} + 4H_2O$: réduction du Cr(VI) par le Fe⁰.
- (2) 2 CrO_4^{2-} +10 H⁺ + 3 H₂ => 2 Cr^{3+} + 8 H₂O : réduction enzymatique directe du Cr(VI).
- (3) $2 \operatorname{CrO}_4^{2^-} + 3 \operatorname{H}_2 S + 4 \operatorname{H}^+ = 2 \operatorname{Cr}(OH)_3 + 3 \operatorname{S}^\circ + 2 \operatorname{H}_2 O$: réduction indirecte du $\operatorname{Cr}(VI)$ par l'H₂S d'origine bactérienne.

Dans le bioréacteur, une couleur noire caractéristique des précipités de sulfure de fer amorphe FeS s'est développée dès les premiers jours suivant l'inoculation. D'autre part, l'odeur caractéristique de l'H₂S, détectable à très faible concentration, n'a jamais été détectée en sortie de colonne. Il est donc presque certain que tout l'H₂S produit par les bactéries sulfato-réductrices a été consommé par du fer issu de la laine d'acier pour sa propre corrosion en Fe²⁺ et puis sa précipitation en FeS. Les réactions suivantes se sont produites :

- (4) $Fe^0 + 2 H^+ \rightarrow Fe^{2+} + H_2$: corrosion du Fe^0 .
- (5) $Fe^{2+} + HS^{-} \rightarrow FeS + H^{+}$: consommation des sulfures par le fer ferreux. le pKs de FeS est proche de 3,6.

Donc, les deux agents chimiques (Fe²⁺ et HS⁻) susceptibles de participer à la réduction du Cr(VI) ont réagi entre eux, affaiblissant ainsi l'importance des réactions 1 et 3. Le sulfure joue habituellement un rôle protecteur pour les bactéries sulfato-réductrices visà-vis du Cr(VI). Cet effet étant amoindri, les bactéries sulfato-réductrices ont pu être plus facilement inhibées, pour un temps de résidence supérieur à celui qui avait été atteint lors du projet Métalbioréduction.

Il est important de mentionner aussi que la vitesse de réduction du Cr(VI) obtenue dans le bioréacteur est moins élevée que lors des essais abiotiques réalisés au laboratoire (cf. rapport intermédiaire n° 1), pour une quantité équivalente de laine d'acier par volume de colonne. Cette moins bonne efficacité de la laine d'acier confirme bien l'effet négatif de la réaction (5) sur la vitesse globale de réduction du Cr(VI).

Les résultats de la présente expérience semblent indiquer que les effets du Fe^0 ne peuvent pas être combinés de façon coopérative dans un même bioréacteur, du moins pas dans la configuration testée (couches alternées de pouzzolane et de laine d'acier). Nos résultats semblent donc contredire ceux de Henny *et al., in press.*, qui avaient mis en évidence un effet de synergie. Il est possible que dans le cadre du présent projet, la laine d'acier utilisée ait eu un diamètre de fibres trop faible, entraînant une vitesse de corrosion par l'H₂S trop élevée. Quoi qu'il en soit, le principe consistant à combiner la réduction biologique et la réduction par le Fe⁰ dans un seul réacteur ne semble pas donner de très bons résultats, puisque la vitesse globale peut être inférieure à celle qui est obtenue avec la laine d'acier seule.

3.2.2. Utilisation de la pouzzolane seule comme support bactérien

a) Expérience de février-août 2005

• Contexte et programme expérimental

D'après l'analyse de la littérature, il semblait intéressant de tester une configuration de réacteur combinant le fer 0-valent et l'activité de bactéries sulfato-réductrices pour réduire le Cr(VI). Un essai en continu a été réalisé en 2004 avec une colonne remplie de couches alternées de laine d'acier et de pouzzolane. Ce dispositif n'a pas permis d'atteindre l'objectif fixé par le cahier des charges en termes de temps de résidence.

Pour la suite du programme expérimental, il a donc été proposé d'utiliser un bioréacteur rempli **uniquement de pouzzolane**, inoculé avec les bactéries sulfato- et Cr(VI)-réductrices. Une seconde colonne pourra être placée en aval de ce bioréacteur, afin de diminuer la concentration en Cr(VI) résiduel à moins de 0,1 mg/l (objectif du cahier des charges). Cette seconde colonne sera remplie non pas avec la laine de fer utilisée dans les premiers essais, mais avec de la grenaille de fer fournie au BRGM par Soletanche-Bachy.

Il est également proposé de démarrer avec une concentration en Cr(VI) plus faible, d'atteindre le temps de résidence voulu (entre 1 et 4 heures), puis d'augmenter très progressivement la teneur en Cr(VI). En effet, jusqu'à présent, aucune expérience réalisée au BRGM avec les bactéries sulfato-réductrices n'a permis d'atteindre un temps de résidence compris dans cet intervalle. L'alimentation étant réalisée avec une eau contenant de l'oxygène dissous du robinet (réseau d'eau potable alimentant le BRGM), l'apport en oxygène, toxique pour les bactéries anaérobies, augmente lorsque le temps de résidence diminue. La limite inférieure de temps de résidence applicable dans un tel système peut être repoussée si le biofilm fixé sur la pouzzolane est très actif, et que le débit est augmenté très progressivement. Ensuite, lorsqu'un temps de résidence acceptable pour le traitement en PRB aura été atteint, la concentration en Cr(VI) sera augmentée. Cette stratégie permettra de savoir pour quelle concentration maximale en Cr(VI) dans la nappe souterraine le système défini par le cahier des charges sera applicable.

L'expérience de 2004 a été réalisée en essayant d'atteindre le plus rapidement possible les objectifs fixés par le cahier des charges. Cette stratégie « rapide » a eu pour conséquence un mauvais développement du biofilm, et une perte de l'activité bactérienne avant que le temps de résidence fixé dans le cahier des charges ait été atteint. Le programme expérimental se focalise en 2005 sur l'optimisation du développement du biofilm, et l'obtention d'un temps de résidence inférieur ou égal à 4 heures.

• Matériel et méthodes

Dispositif expérimental

Le bioréacteur mis en œuvre en février 2005 est une colonne comparable à celle qui avait été utilisée en 2004, mais légèrement modifiée de façon à pouvoir placer des sondes pH et Eh dans la partie basse du dispositif. Le volume utile de cette colonne est 2 390 ml. La colonne a été remplie uniquement avec de la pouzzolane fraîche, identique à celle utilisée lors des essais précédents (2004).

Inoculation et milieu de démarrage

L'inoculum est identique à celui qui avait été utilisé en 2004 (population issue du projet européen Métalbioréduction, 2000-2003). Le milieu de Starkey, assez riche par la présence d'extrait de levure, a été utilisé en début d'expérience, afin de favoriser la production d'une biomasse abondante.

Composition du milieu de Starkey :

K ₂ HPO ₄	0,5 g
NH₄CI	2 g
Na ₂ SO ₄	4 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	2 g
Lactate de sodium 60 %	5 ml
Extrait de levure	1 g
Oligo-éléments	1 ml

Eau déminéralisée, qsp 1 l, pH ajusté à 7,2 avec NaOH.

Une phase batch a été réalisée à 35 °C pendant 18 jours. Des prélèvements ont été effectués quotidiennement en injectant 100 ml de milieu de Starkey en bas de colonne, et en recueillant l'effluent en haut de colonne. Des dosages de sulfure et de sulfate étaient effectués sur cet échantillon.

Alimentation en continu

La chronologie de succession des différentes conditions opératoires est donnée dans le Tableau 2. Afin de favoriser une colonisation efficace de la pouzzolane par la population bactérienne, la colonne a été alimentée en continu avec du milieu de Starkey pendant 2 semaines, à un temps de résidence de 48 h (50 ml par heure). Ensuite, la colonne a été alimentée en continu avec un milieu industriel dont la composition est la suivante :

Urée	0,21 g
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	0,4 g
Na ₂ SO ₄	7,1 g
DAP (engrais)	0,23 g
Lactate de sodium 60 %	5 ml
Solution d'oligo-éléments	1 ml
Eau du robinet	q.s.p 1 l

Le pH est ajusté à 7 avec H_2SO_4 . Le DAP est le di-ammonium phosphate, soit $(NH_4)_2HPO_4$. C'est un engrais qui fixe (lorsqu'il est seul dans l'eau) le pH vers 7,9.

Composition de la solution d'oligo-éléments

Par litre d'eau déminéralisée :

EDTA 3 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O 1,1g
MnSO ₄ , H ₂ O 65 mg
ZnSO ₄ , 7H ₂ O 89 mg
NiCl ₂ , 6 H ₂ O 24 mg
Na ₂ MoO4, 2 H ₂ O18 mg
H ₃ BO ₃ 0,3 g
CuCl ₂ 2 mg
CoSO ₄ 7 H ₂ O 130 mg

La température a été progressivement diminuée, en une semaine, de 35 à 12 °C, les conditions opératoires précédentes étant maintenues (milieu industriel, lactate, 48 h).

Ensuite, le Cr(VI) a été introduit dans l'alimentation, à raison de 1 mg/l, le débit étant maintenu à 50 ml/h.

Puis, tout en maintenant la concentration en Cr(VI) à 1 mg/l, le débit d'alimentation a été augmenté par palier de 25 ml/h soit : 75, 100, 125 ml/h... Chaque débit a été maintenu constant pendant 48 h, de façon à diminuer le temps de résidence de 48 h à 2,7 h. Enfin, la concentration en lactate de sodium dans l'alimentation a été diminuée (de 4 à 0,5 g/l) lorsque le temps de résidence était égal à 2,7 h.

Jour 0 – jour 20	Phase batch milieu de Starkey - 35 °C
Jour 20 – jour 34	Alimentation en continu avec milieu de Starkey - 35 °C
	Temps de résidence 48 h
Jour 34 – jour 40	Continu milieu industriel lactate - 35 °C
Jour 40 – jour 47	Diminution de température 35 °C à 12 °C
Jour 49	Introduction du Cr(VI)
Jour 60 – jour 155	Diminution du temps de résidence de 48 h à 2,7 h
Jour 130 – jour 158	Augmentation de la [Cr(VI)] de 1 mg/l à 7,5 mg/l
Jour 151 – jour 172	Diminution des concentrations dans l'alimentation, lactate
	de 4 g/l à 1 g/l et sulfate de 2,5 à 1,5 g/l

Tableau 2 - Février-août 2005 - Chronologie de sucession des différentes conditions opératoires.

Analyses

Le Cr(VI) a été analysé avec le Kit Merck spectroquant[®] 1.14758.0001 (dosage colorimétrique), l'acétate est analysé avec le Kit Diffchamb 1 002 891 (dosage enzymatique colorimétrique), le lactate avec le Kit Diffchamb 1 002 811 (dosage enzymatique colorimétrique), le sulfate avec le Kit Merck spectroquant[®] 1.14548.0001 (dosage colorimétrique). Le comptage des bactéries a été effectué au microscope optique sur cellule de Thoma (grossissement x 400).

Le lactate a été régulièrement analysé en entrée et sortie de colonne. La concentration en entrée sera ajustée de façon à ne pas avoir de lactate en sortie (et donc en excès). La production d'acétate est suivie par des analyses en sortie de colonne.

Le sulfure dissous a été régulièrement analysé par titration potentiométrique, avec une électrode spécifique au sulfure (Ag/Ag₂S). Le sulfure dissous (sous forme S²⁻ en milieu basique) est régulièrement titré avec une solution de nitrate mercurique HgNO₃ 5×10^{-4} M avec un titrimètre Tacussel TIM 900 Titralab.

Le chrome total a été analysé par ICP/MS au service Métrologie, Monitoring et Analyse (MMA) du BRGM.

• Résultats

Au cours des 20 premiers jours d'expérience, la colonne a été maintenue en conditions de batch puis de fed-batch (ajouts ponctuels de milieu neuf). Ensuite, le réacteur a fonctionné en continu avec du milieu de Starkey (jours 20 à 24), puis avec du milieu industriel contenant 5 g/l de sulfate (jours 25 à 49).

La Figure 15 montre l'évolution des principaux paramètres opératoires au cours de cette expérience. La température a été diminuée de 35 à 12 °C en une semaine. Ensuite, la concentration en sulfate a été diminuée à 2,7 g/l (car une grande partie du sulfate n'était pas utilisée) et 1 mg/l de Cr(VI) a été introduit dans le milieu d'alimentation (jour 50). Ensuite, le débit d'alimentation a été progressivement augmenté à partir du jour 60, de façon à réduire le temps de résidence de 52 h à 2,75 h. La concentration en Cr(VI) dans le milieu d'alimentation a été augmentée à



partir du jour 130 pour atteindre un maximum égal à 7,5 mg/l, puis de nouveau diminuée car un effet inhibiteur a été constaté.

Figure 15 - Évolution des principaux paramètres opératoires au cours de l'expérience de février-août 2005.

La Figure 16 montre que la concentration en sulfate s'est stabilisée autour de 1 g/l en sortie de colonne à partir du jour 60, malgré l'augmentation du débit d'alimentation. Ainsi, la vitesse de réduction du sulfate a augmenté avec le débit d'alimentation, pour atteindre des valeurs proches de 500 mg/l.h (Figure 17).

La concentration en Cr(VI) est toujours inférieure à 0,1 mg/l en sortie de colonne, pour un temps de résidence inférieur à 3 h (Figure 18).

Cependant, la Figure 17 montre que la vitesse de réduction du sulfate chute lorsque la concentration en Cr(VI) dans le milieu d'alimentation dépasse 4 mg/l. L'effet inhibiteur du Cr(VI) sur l'activité de sulfato-réduction, dans les conditions de la présente expérience, est donc sensible au-dessus de 4 mg/l pour un temps de résidence inférieur à 3 h. Cependant, bien que l'activité de sulfato-réduction soit inhibée, la réduction du Cr(VI) est toujours efficace. L'objectif du présent projet n'est pas de maintenir les bactéries sulfato-réductrices dans leurs conditions d'activité optimales. Dans cette perspective, et comme le coût du lactate aura un impact majeur sur la faisabilité économique du procédé, la concentration en lactate dans le milieu d'alimentation a été diminuée à partir du jour 155 (Figures 17 et 19).



Figure 16 - Évolution des concentrations en sulfate et sulfure au cours de l'expérience de février-août 2005.



Figure 17 - Évolution des concentrations en Cr(VI) et lactate dans le milieu d'alimentation et vitesse de réduction du sulfate au cours de l'expérience de février-août 2005.



Figure 18 - Évolution des concentrations en Cr(VI) dans le milieu d'alimentation et en sortie de bioréacteur au cours de l'expérience de février-août 2005.



Figure 19 - Évolution des concentrations en lactate dans le milieu d'alimentation et en sortie de bioréacteur, et actétate en sortie de bioréacteur au cours de l'expérience de février-août 2005.

Ainsi, la diminution de la vitesse de réduction du sulfate à partir de cette date n'est plus seulement liée à l'inhibition par le Cr(VI), mais également à la réduction de l'apport en substrat énergétique. En fin d'expérience, la concentration en lactate dans le milieu d'alimentation était égale à 0,6 g/l, soit 5 fois moins que dans les conditions optimales de fonctionnement. La Figure 5 montre que le lactate n'est que partiellement utilisé : la concentration de cet acide organique en sortie de bioréacteur oscille entre 0,1 et 1 g/l. Le lactate est partiellement oxydé en acétate par les bactéries. La concentration en acétate dans l'effluent en sortie de colonne demeurait proche de 1,5 g/l lorsque l'activité de sulfato-réduction était optimale (jours 70-130). Ensuite, lorsque l'activité des bactéries était inhibée par le Cr(VI) et limitée par un apport en substrat moins important, la concentration en acétate a diminué pour atteindre des valeurs inférieures à 0,5 g/l. Il serait souhaitable de limiter la production d'acétate, bien que ce sous-produit soit non toxique.

Dans la colonne, l'acétate est peu consommé par les bactéries. En effet, la concentration en acétate analysée en sortie de colonne est proche de la concentration théorique calculée en fonction de la consommation de lactate, en considérant que l'acétate n'est pas du tout consommé (Figure 19). Ainsi, la teneur en acétate analysée en sortie est généralement comprise entre 1,5 et 2 g/l, sauf à partir de 140 h où elle chute autour de 1 g/l puis autour de 0,5 g/l.

La concentration en sulfure en sortie de colonne oscille autour de 350 mg/l (+/- 100 mg/l, Figure 16) pendant la période d'activité de sulfato-réduction optimale (entre les jours 25 et 50). Ensuite, lorsque la sulfato-réduction est inhibée par le Cr(VI) et/ou limitée par l'apport de substrat, la concentration en sulfure chute pour atteindre des valeurs proches de 60 mg/l. Le sulfure est également un produit dérivé de l'activité bactérienne dont il est souhaitable de limiter la production.

Le pH en sortie de colonne est légèrement supérieur au pH en bas de colonne (Figure 20). Le potentiel redox demeure dans l'intervalle - 350/- 450 mV (/ref. Ag/AgCl) pendant toute la durée de l'expérience. Rappelons que le potentiel standard de réduction du couple CrO_4^2 -/ Cr^{3^+} est égal à - 110 mV/ENH et du couple CrO_4^2 -/ CrO_2^- est égal à - 120 mV/ENH (d'après Rochaix, 1996).

Cette expérience de traitement biologique du Cr(VI) en continu a été réalisée dans des conditions qui minimisaient les risques d'inhibition des bactéries par le Cr(VI) et favorisaient le développement du biofilm. Cette démarche a permis de réduire le temps de résidence tout en conservant une activité bactérienne élevée.

Les bactéries n'ont pas du tout été affectées par la diminution de température de 35 à 12 °C. Le temps de résidence a pu être diminué jusqu'à moins de 4 h (valeur limite supérieure citée dans le cahier des charges), sans que l'activité bactérienne ne semble affectée. La concentration en Cr(VI) en sortie de colonne a toujours été inférieure à 0,1 mg/I, valeur limite citée dans le cahier des charges. Par contre, la concentration en chrome total en sortie de bioréacteur est proche de la concentration en Cr(VI) dans le milieu d'alimentation (Tableau 3). Il y a un phénomène nouveau qui maintient le Cr(III) soluble, bien que le pH soit neutre (de 7 à 7,5) et le potentiel redox suffisamment négatif.



Figure 20 - Évolution du pH au cours de l'expérience de février-août 2005.

Date	Jour	Cr(VI) alim	Cr(VI) sortie	Cr total sortie
01/08/2005	165	7,08 mg/l	0,018 mg/l	7,38 mg/l
08/08/2005	172	5,12 mg/l	0,012 mg/l	4,3 mg/l

Tableau 3 - Résultats des analyses de Cr(VI) et Cr total les 1^{er} et 8 août 2005.

Le Cr(III) est normalement peu soluble dans ce domaine de pH (voir Annexe 1 la solubilité de Cr(III) dans l'eau), et lors des précédentes expériences, il avait toujours été constaté que le Cr(III) était retenu au sein des bioréacteurs à lit fixé, sous forme de $Cr(OH)_3$ et en présence de phosphate sous forme de $CrPO_4$ (Battaglia-Brunet *et al.,* 2004). Cependant, le temps de résidence était alors plus élevé, compris entre 7 et 19 h, le potentiel redox était plus négatif, le pH était plutôt autour de 8 et très probablement les teneurs en acétate et lactate n'étaient pas aussi élevées. Tous les paramètres précédemment cités influent sur la solubilité du Cr(III). Dans le cas présent, les analyses de Cr total ont été effectuées lorsque le temps de résidence était inférieur à 3 h. Il est possible que le Cr(III) n'ait pas eu le temps de précipiter (faible temps de contact dans la colonne pour la germination) et/ou que les autres paramètres influent également comme par exemple les teneurs en acétate et lactate et lactate.

En injectant les données des paramètres physicochimiques régnant le jour 165 de l'expérience (pH = 7,5; Eh = - 400 mV/Ag-AgCl; Cr(III) = 7,38; acétate théorique = 1,5 g/l, acétate sortie = 0,0 g/l; lactate entrée = 2,25 g/l; lactate sortie = 0,6 g/l, sulfate sortie 1250 mg/l et sulfure sortie = 100 mg/l)) dans le logiciel « PHREEQC » avec la base de données thermodynamiques « MINTEQ.V4 » l'hypothèse précédente est confirmée. Les anions d'acide carboxylique sont des complexants de Cr(III) sous les formes $Cr(CH_3COO)^{2+}$, $Cr(Lactate)^{2+}$ et $Cr(CH_3COO)_3$ et $Cr(lactate)_3$, et leur présence influe sur la solubilité de Cr(III) et donc sur sa non-précipitation, puisque

l'indice de saturation de l'hydroxyde de Cr(III) diminue. Dans le cahier des charges, il est indiqué que la concentration en Cr total en sortie du dispositif de traitement doit être inférieure à 0,5 mg/l. Il sera peut-être nécessaire de prévoir un dispositif de post-traitement pour retenir le Cr(III) sous forme de Cr(OH)₃, par exemple par une remontée du pH vers 8-9 sur un lit de calcaire.

Un essai de perméabilité a été réalisé à la fin de cette expérience. L'évolution de la pression différentielle n'a pas pu être suivie au cours de l'expérience en raison d'un mauvais branchement du capteur. La conductivité hydraulique du bioréacteur, mesurée le 2 août 2005 (jour 166) était égale à 0,014 cm/s. Cette valeur révèle un colmatage relativement élevé du dispositif.

b) Expérience de septembre-décembre 2005

• Matériel et méthodes

Dispositif expérimental

Le bioréacteur mis en œuvre en septembre 2005 est une colonne comparable à celle qui avait été utilisée en 2004. Son volume utile est 2 390 ml. La colonne a été remplie avec de la pouzzolane fraîche uniquement. Une deuxième colonne, en verre et plus petite, a été remplie avec 200 ml de granules de fer zéro-valent, soit 1 kg de Fe⁰. Cette colonne a été connectée à la sortie du bioréacteur lorsque ce dernier n'est pas capable de réduire entièrement le Cr(VI).

Inoculation

Le bioréacteur qui avait fonctionné en continu de février à août 2005 a été de nouveau remis en fonctionnement début septembre 2005 (composition du milieu d'alimentation donnée ci-après). La sortie (effluent) de ce bioréacteur a été branchée sur l'entrée du nouveau réacteur contenant de la pouzzolane fraîche. Ce fonctionnement en « série » a été maintenu pendant 10 jours. Dès qu'une activité de sulfato-réduction a été détectée dans le nouveau bioréacteur (concentration en sulfate inférieure en sortie qu'en entrée), le nouveau dispositif a été débranché de l'ancienne colonne et alimenté directement avec du milieu de culture.

Composition des milieux d'alimentation

Lors de la mise en route de cette expérience, la composition du milieu de culture servant d'alimentation était la suivante :

urée	0,21 g
Na ₂ SO ₄	2,22 g
DAP (engrais)	0,23 g
Lactate de sodium 60 %	2,4 ml
Solution d'oligo-éléments	1 ml
Eau du robinet	q.s.p 1 l

Par rapport à la composition de la fin de la précédente expérience, le chlorure de magnésium a été supprimé (on considère que l'eau du robinet apporte suffisamment de Mg²⁺ et Cl⁻ aux bactéries).

Après 56 jours de fonctionnement avec ce milieu d'alimentation, le lactate a été remplacé par du HRC©, à raison de 3,2 g par litre de milieu.

Onze jours plus tard (jour 67), la composition du milieu d'alimentation a été simplifiée. La nouvelle composition du milieu est la suivante :

Na ₂ SO ₄	2,22 g
HRC©	3,2 g
Solution d'oligo-éléments	1 ml
Eau du robinet	q.s.p 1 l

Programme expérimental

La chronologie de succession des différentes conditions opératoires est donnée dans le Tableau 4. La température a toujours été maintenue à 12 °C.

Jours	Milieu d'alimentation	Temps de résidence	Cr(VI) alimentation
Jour 0 – jour 9	Lactate – sortie	6 h	0
lour 10 jour 18		0 h	0
Jour 10 – Jour 18			0
Jour 18 – Jour 24	Lactate – alim directe	Diminution de 9 a	0
		2,8 h	
Jour 25 – jour 36	Lactate – alim directe	3,6 h	0
Jour 37 – jour 56	Lactate – alim directe	3,6 h	1 mg/l
Jour 57 – jour 67	HRC complet – alim	3 h	1 mg/l
-	directe		U
Jour 68 – jour 78	HRC minimum – alim	3,6 h	1,5 mg/l
	directe		
Jour 79 – jour 82	HRC minimum – alim	19 h	2 mg/l
-	directe		_
Jour 83 – jour 90	HRC minimum – alim	7 h	2 mg/l
-	directe		_
Jour 91 – jour 95	HRC complet – alim	7 h	2 mg/l
-	directe		

Tableau 4 - Septembre-décembre 2005 - Chronologie de sucession des différentes conditions opératoires.

Analyses

Les méthodes d'analyses du Cr(VI), Cr total, sulfate, sulfure dissous, lactate et acétate utilisées pour la précédente expérience (cf. § 2.1.4.) ont été appliquées au cours de la présente expérience.

• Résultats

Les objectifs de cette nouvelle expérience étaient les suivants :

- déterminer le temps minimum nécessaire pour qu'un bioréacteur « neuf » soit efficace après son inoculation ;
- obtenir des données sur la vitesse de colmatage en redémarrant avec une colonne remplie de pouzzolane propre ;
- tester l'utilisation du HRC en tant que source d'énergie à la place du lactate.

Le bioréacteur a fonctionné rapidement en conditions de sulfato-réduction à un temps de résidence relativement faible (par rapport à la précédente expérience). Dès qu'il a été alimenté directement avec du milieu frais (jour 10), un temps de résidence égal à 9,1 h a été imposé. Ce temps de résidence a été maintenu constant pendant 10 jours (Figure 21). Durant cette période (jours 10-20) la concentration en sulfate a chuté en sortie de colonne (Figure 22) tandis que la concentration en sulfure a augmenté de 36 à 160 mg/l (Figure 23). L'évolution de ces deux paramètres indiquait une augmentation de l'activité sulfato-réductrice. Le temps de résidence a donc été rapidement diminué à partir du jour 21 (Figure 21) pour atteindre une valeur inférieure à 4 h au jour 23. Cette diminution rapide a eu un effet négatif sur l'activité de sulfato-réduction, et le bioréacteur a été maintenu dans ces conditions une dizaine de jours en attendant que l'activité bactérienne se rétablisse, avant l'introduction du Cr(VI) dans le milieu d'alimentation (jour 36, Figure 22). Ces résultats montrent qu'il faut entre 15 jours et 1 mois pour obtenir un bioréacteur actif à partir d'un support de pouzzolane non inoculé.

Pendant les 20 jours suivants, la colonne a été maintenue dans les conditions opératoires suivantes : temps de résidence 3,6 h, alimentation contenant 1 g/l de lactate et 1 mg/l de Cr(VI). Le Cr(VI) est efficacement réduit (Figure 22), et l'activité de sulfato-réduction est modérée mais détectable. La concentration en sulfure en sortie de bioréacteur varie entre 10 et 80 mg/l (Figure 23). Entre le démarrage de l'expérience et la fin de cette phase (jour 57), la conductivité hydraulique de la colonne a été mesurée 7 fois, et demeure comprise entre 1 et 2 cm/s. La colonne ne s'est donc pas colmatée significativement sur cette période. Ce résultat est probablement lié à la diminution de la concentration en lactate (de plus de 3 g/l à 1 g/l) dans le milieu d'alimentation.

À partir du jour 57, le lactate a été remplacé par du HRC© dans le milieu d'alimentation. Ce changement de conditions opératoires a eu pour effet une diminution de l'activité de sulfato-réduction. La concentration en sulfate en sortie de colonne est très proche de la concentration en entrée de colonne, et la production de sulfure devient presque indétectable. Le HRC tend également à faire chuter le pH du milieu. Malgré des tentatives répétées pour ajuster le pH du milieu d'alimentation à 7,5, ce dernier chute progressivement jusqu'à une valeur proche de 6,5. En parallèle, le pH chute également en sortie de bioréacteur pour atteindre des valeurs comprises entre 5,5 et 6. Au cours de cette période (jours 57- 67), le Cr(VI) est toujours efficacement réduit et le potentiel redox demeure inférieur à - 300 mV (Ag/AgCI, Figure 21).



Figure 21 - Évolution du temps de résidence et du potentiel redox au cours de l'expérience de septembre-décembre 2005.



Figure 22 - Évolution de la concentration en sulfate et Cr(VI) en entrée et sortie de bioréacteur au cours de l'expérience de septembre-décembre 2005.



Figure 23 - Évolution du pH et de la concentration en sulfure en sortie de bioréacteur au cours de l'expérience de septembre-décembre 2005. Carrés oranges : concentration en sulfure, ronds verts : pH.

À partir du jour 67, le milieu HRC© « complet », c'est-à-dire contenant de l'urée et du DAP comme sources d'azote et de phosphore, a été remplacé par du milieu HRC© « minimum ». Ce milieu minimum ne contient que du HRC©, du sulfate et des oligoéléments. Le HRC© étant un produit commercial de composition inconnue, il peut être supposé qu'il contient, en plus du polymère de lactate et de glycérol, des sources d'azote et de phosphore.

L'utilisation du milieu HRC© minimum a eu pour effet immédiat une augmentation du potentiel redox en sortie de bioréacteur (Figure 21). Malgré cette modification des conditions redox, le Cr(VI) était encore efficacement réduit au jour 70, avec un milieu d'alimentation contenant 1 mg/l de Cr(VI) et pour un temps de résidence égal à 3 h (Figures 22 et 23). À partir du jour 71, la concentration en Cr(VI) en entrée de bioréacteur a été augmentée. La réduction du Cr(VI) par le bioréacteur n'était alors plus complète, et des teneurs en Cr(VI) en sortie de colonne supérieures à 0,1 mg/l ont été obtenues (jours 71-79, Figure 22). Afin de rétablir l'activité bactérienne supposée inhibée par le Cr(VI), le temps de résidence a été augmenté de 3 à 19 h pendant 3 jours (jours 79-82, Figure 21). Durant cette courte période, le potentiel redox a chuté iusqu'à - 230 mV et le Cr(VI) était entièrement réduit. Cependant, dès que le temps de résidence a été de nouveau diminué (de 19 h à 7 h), le potentiel redox a augmenté jusqu'à des valeurs proches de - 50 mV, et du Cr(VI) a été détecté en sortie de bioréacteur, la concentration en Cr(VI) dans le milieu d'alimentation étant proche de 2,5 mg/l. Il a été décidé de brancher la petite colonne remplie de granules de fer zérovalent à la sortie du bioréacteur (jour 80). La concentration en Cr(VI) à la sortie de la colonne de fer zérovalent a toujours été indétectable.

Afin de déterminer si la chute des performances du bioréacteur étaient liées à l'utilisation d'un milieu minimum, le DAP et l'urée ont été ré-introduits dans l'alimentation du bioréacteur (jour 91). Cette modification des conditions opératoires a

eu pour effet une diminution très nette du potentiel redox à temps de résidence constant (Figure 21). En parallèle, le pH en sortie de colonne a augmenté (Figure 23) et la concentration en Cr(VI) en sortie de bioréacteur a de nouveau chuté jusqu'à devenir indétectable (jour 93, Figure 22). Il semble donc que les nutriments secondaires améliorent nettement l'efficacité du système. Deux interprétations possibles de ce résultat peuvent être proposées :

- soit les bactéries ont réellement besoin de quantités d'azote et de phosphore importantes, et le HRC© seul n'apporte pas suffisamment de ces nutriments ;
- soit le DAP (di-ammonium phosphate) joue le rôle d'un tampon de pH (à 7,9), et ramène ce paramètre dans une zone optimale pour les bactéries.

L'utilisation du HRC© à la place du lactate a donc eu les conséquences suivantes :

- Dans un premier temps, de réduire l'activité de sulfato-réduction à un niveau indétectable. La sulfato-réduction semblait très dépendante de la concentration en lactate. Lorsque du HRC© est utilisé, le lactate est progressivement libéré dans le milieu par dépolymérisation de l'ester de glycérol-lactate. Il est probable que la compétition entre groupes bactériens pour la faible quantité de lactate libre est défavorable aux bactéries sulfato-réductrices.
- Dans un second temps, et de façon beaucoup plus gênante, de provoquer une augmentation du potentiel redox et d'affecter l'activité de réduction du Cr(VI) lorsque le milieu HRC© « complet » a été remplacé par le milieu HRC© « minimum ». Le potentiel redox diminue nettement lorsque le milieu minimum est remplacé par du milieu complet.

Les dernières conditions opératoires testées avec du milieu HRC© complet, correspondant à un temps de résidence de 7 h et une concentration en Cr(VI) égale à 2 mg/l en entrée de bioréacteur, permettaient d'éliminer efficacement le Cr(VI). Il n'a pas été possible (faute de temps) de diminuer le temps de résidence et de tester l'effet d'une augmentation de la concentration en Cr(VI) avec le milieu HRC complet. L'utilisation du HRC© dans des conditions de temps de résidence limité pourrait entraîner une diminution globale des performances du bioréacteur. En effet, le HRC© est généralement employé comme réactif injecté directement dans un aquifère pollué, et agit en libérant lentement du lactate dans un flux de liquide, lui-même assez lent. Dans un bioréacteur fonctionnant à temps de résidence limité, il est possible que le HRC© n'ait pas le temps de se dépolymériser et d'être utilisé par les bactéries. Des expériences complémentaires permettraient de mieux maîtriser l'utilisation du HRC© dans les dispositifs de type panneau-drain considérés dans le cadre de la présente étude.

La chute des performances du bioréacteur, lorsqu'il a été alimenté avec du milieu HRC© minimum, a permis de tester une configuration couplant le bioréacteur à une petite colonne remplie de granules de fer. Cette petite colonne a permis de réduire efficacement le Cr(VI) résiduel. Cependant, après seulement 15 jours de fonctionnement, ce dispositif a fait chuter la conductivité hydraulique du système à 0,03 cm/s. Lorsque la colonne de granules de fer est déconnectée, la conductivité hydraulique du bioréacteur seul remonte à 1 cm/s. Le bioréacteur-colonne rempli de

pouzzolane est peut-être un peu moins efficace que la colonne de granules de fer pour la réduction du Cr(VI), mais après 94 jours de fonctionnement, son degré de colmatage demeure très faible.

La Figure 24 montre l'évolution des concentrations en acétate et sulfure dissous (les deux principaux sous-produits de la réaction biologique) en sortie de bioréacteur.

La concentration en sulfure a chuté brutalement et définitivement, dès que le lactate a été remplacé par du HRC©. Ce phénomène résulte de l'amoindrissement significatif de l'activité de sulfato-réduction. La concentration en acétate, sous-produit de la dégradation du lactate, est proche de 0,5 g/l lorsque la sulfato-réduction est optimale, avec une alimentation contenant 1 g/l de lactate. En présence de Cr(VI), lorsque la sulfato-réduction est partiellement inhibée, la concentration en acétate en sortie de bioréacteur est proche de 0,3 g/l. Lorsque le milieu HRC© complet est utilisé, la concentration en acétate chute à 0,2 g/l. Elle atteint des valeurs inférieures à 0,1 g/l (mais jamais nulles) avec le milieu HRC© minimum. Ces résultats montrent que l'utilisation du HRC© permettrait de limiter la production de sulfure et d'acétate, deux sous-produits indésirables des réactions biologiques participant à la réduction du Cr(VI).



Figure 24 - Évolution des concentrations en acétate et sulfure en sortie de bioréacteur au cours de l'expérience de septembre-décembre 2005.

3.2.3. Essais de mise au point d'un support bactérien à diffusion lente de substrat

Dans le cadre de la mise en œuvre d'un biotraitement *in situ* en barrière perméable réactive dans un dispositif de type panneau-drain, il serait très utile de mettre au point un système permettant de distribuer passivement des subtrats aux bactéries. Un tel procédé maintiendrait active l'activité bactérienne tout en évitant l'utilisation d'une

pompe d'injection. Le traitement serait ainsi plus facile à mettre en œuvre et moins coûteux en énergie. Les travaux relatifs à cet aspect du projet ont été réalisés par Soletanche-Bachy.

a) Mise au point d'une méthode spectrophotométrique pour analyser le HRC©

Le HRC© est un polymère complexe pour lequel on ne disposait pas de méthode d'analyse au début du projet. Des spectres réalisés au spectrophotomètre UV-visible montrent que le HRC© absorbe les rayons UV avec un pic aux alentours de 275 nm (Figure 25). Cette absorption sera utilisée comme principe d'analyse pour quantifier le HRC©.



Figure 25 - Spectre d'absorption du HRC© par spectrophotométrie UV.

b) Essais d'imprégnation de matériaux avec du HRC©

Le but de ces expériences est de réaliser une colonne de pré-traitement avant le passage de la solution polluée au Cr(VI) sur le filtre contenant les bactéries sulfato-réductrices.

Le HRC© étant très visqueux (comme du miel), il est très difficile de le dissoudre, donc l'idée est de la fixer sur un support qui l'immobiliserait mais qui maintiendrait en même temps une porosité ouverte afin que des fluides puissent percoler à travers.

• Principe de l'essai

Des entonnoirs en porcelaine avec une grille incorporée serviront de contenant au matériau fixateur d'HRC©. Ce matériau sera de la pouzzolane ou du sable calibré 0/1 (Figure 26).



Figure 26 - Schéma expérimental des tests de percolation du HRC©.

Le HRC© est ensuite versé sur le matériau. Après écoulement complet de l'HRC©, on mesure la prise de poids du matériau. Un témoin est réalisé afin de quantifier la quantité d'HRC© qui reste collée sur les parois de l'entonnoir du fait de sa forte viscosité. Dans un second temps, les échantillons ainsi préparés sont percolés par de l'eau (4*100ml) afin d'évaluer la perte d'HRC©.

• Résultats de fixation du HRC©

Témoin sans matériau rétenteur

Poids entonnoir ① vide = 143,90 g. Poids entonnoir ① après percolation HRC© = 148,13 g. Reste 4,23 g de HRC© collés aux parois de l'entonnoir.

Rq : Le HRC© a du mal à s'écouler à travers la grille en porcelaine (\emptyset trous = 1mm).

Essai pouzzolane

Poids entonnoir ② vide = 146,23 g. Poids pouzzolane = 49,15 g (raz-bord de l'entonnoir).

Le HRC© est mis à raz-bord de l'entonnoir en le bouchant, puis on le laisse s'écouler jusqu'à stabilisation. HRC© passe facilement entre la pouzzolane.

Poids entonnoir ② rempli pouzzolane après écoulement HRC = 213,91 g. Poids HRC© immobilisé = 213,91 - (146,23 + 49,15 + 4,23) = **14,30 g soit 29 %** W pouzzolane.

Après 16 h d'attente

Poids entonnoir ② + pouzzolane + HRC© = 211,46 g. On perd 2,45 g de HRC par écoulement, il reste **11,85 g soit 24 % W pouzzolane**

Essai sable calibré

Poids entonnoir ③ vide = 150,82 g. Poids sable = 95,00 g (raz-bord de l'entonnoir). Filtre synthétique = 0,34 g.

Le HRC© est mis à raz-bord de l'entonnoir en le bouchant, puis on le laisse s'écouler jusqu'à stabilisation. Le HRC© passe très difficilement à travers le sable. Il faut au moins 30 min avant que tout passe.

Poids entonnoir ③ rempli sable après écoulement HRC© = 266,21 g Poids HRC© immobilisé = 266,21 - (150,82 + 95,00 + 0,34 + 4,23) = **15,82 g soit 16,5 % W sable.**

Après 16 h d'attente

Poids entonnoir ③ + sable + HRC© = 257,60 g. On perd 8,61 g de HRC© par écoulement, il reste **7,21 g soit 7,5 % W sable.**

Essai litière chat

Poids entonnoir ③ vide = 150,82 g. Poids sable = 60,63 g (4 mm sous bord entonnoir). Filtre synthétique = 0,34 g.

Le HRC© ne passe pas à travers la litière. Il faut mélanger à la spatule pour obtenir un mélange homogène. Attente 16 h avant pesage.

Poids entonnoir ③ rempli litière après écoulement HRC© = 237,13 g.

Poids HRC© immobilisé = 237,13 - (150,82 + 60,63 + 0,34 + 4,23) = **21,11 g soit 35 %** W litière.

Les résultats de fixation sont rassemblés dans le Tableau 5.

	Après 1 h	Après 16 h
Pouzzolane	29 %	24 %
Sable	16,5 %	7,5 %
Litière		35 %

Tableau 5 - Bilan de fixation du HRC©.

• Percolation d'eau

On fait percoler 4 x 100 ml d'eau de ville à travers l'entonnoir rempli de matériau ayant fixé l'HRC© (voir ci-dessus).

On chronomètre le temps de passage des premiers 100 ml d'eau en bouchant la base de l'entonnoir et en le remplissant à raz-bord, puis on déclenche le décompte, on maintien le niveau d'eau au sommet de l'entonnoir jusqu'à ce que les 100 ml soient passés et on arrête le chrono quand toute l'eau a percolé.

On pèse ensuite l'entonnoir percolé 4 fois afin de déterminer sa perte de HRC©.

• Résultats des essais de percolation d'eau

Essai pouzzolane

Temps écoulement = 8,68 s (automatique sans retenue). Perte HRC© = 208,31 - 211,46 = - 3,15 g soit perte 26,5 % HRC©.

Après 16 h séchage Perte HRC© = 206,86 - 211,46 = - 4,6 g soit perte 38,8 % HRC©.

Essai sable

Temps écoulement = 21,02 s (temps d'attente avant écoulement). Perte HRC© = 258,80 - 257,60 = **+ 1,20 g soit gain 16,5 % d'eau.**

Après 16 h séchage Perte HRC© = 255,86 - 257,60 = - 1,74 g soit perte 24,1 % HRC©.

Essai litière

Temps écoulement = ∞ (gonflement des grains en surface et colmatage). => Ce matériau ne peut pas être utilisé en percolation d'eau.

e) Réalisation d'une enveloppe fine d'alginate-Ca1

Les essais d'imprégnation du HRC© dans des supports ayant échoué, il semblait intéressant de tester l'encapsulation de ce substrat dans des billes d'alginate.

• Détermination d'une concentration en alginate pour la formation de billes d'HRC©

Protocole

La réalisation de billes d'alginate pour un milieu nécessite :

- de l'alginate en concentration de 3-12 % W/V ;
- une solution de $CaCl_2$ de 0,2 M.

L'alginate est mélangé au milieu puis introduit dans une seringue. Le milieu est expulsé de la seringue au-dessus d'une solution de HRC© avec une faible agitation.

La composition n° 1 des mélanges réactionnels pour l'encapsulation est donnée dans le Tableau 6.

ALIGINATE % W/V	0	3	6	10	15	30
HRC© 100 % 20 mL	20	20	20	20	20	20
[CaCl ₂] M	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
RÉSULTATS	-	-	-	-	-	-+

Tableau 6 - Composition n° 1 des mélanges réactionels pour l'encapsulation.

La nature de l'HRC© ne permet pas de réaliser des billes d'alginate d'après ce test. Le HRC© avec ou sans alignate dans la solution de calcium se dissout très rapidement. On observe une plus faible dissolution avec une forte concentration en alginate.

Solutions : diminuer l'effet de dissolution de HRC© dans une solution de calcium pour permettre la formation de bille d'alginate de HRC©.

Deux stratégies sont proposées :

- 1. Diluer le HRC© pour diminuer l'effet dispersif du HRC©. On utilisera une solution de NaOH pour favoriser la précipitation dans le solution de calcium.
- 2. Augmenter la concentration de la solution de calcium.

La composition n° 2 des mélanges réactionnels pour l'encapsulation est donnée dans le Tableau 7.

ALIGINATE % W/V	0	3	6	10	15	30
HRC© 20 mL	15	15	15	15	15	15
H ₂ O/NaOH mL volume total 5 mL	3/2	3/2	3/2	3/2	3/2	3/2
[CaCl₂] M	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
RÉSULTATS	-	-	-	-	-+	+-

Tableau 7 - Composition n° 2 des solutions préparées pour l'obtention de billes HRCen diluant au 1/4.

Rq : On ne peut pas trop diluer le HRC©, car il faut garder une certaine viscosité.

Une faible dissolution apparaît avec les milieux les plus concentrés. On cherche par la suite à augmenter la concentration en calcium pour accentuer ce phénomène.

La composition n° 3 des mélanges réactionnels pour l'encapsulation est donnée dans le Tableau 8.

ALIGINATE % W/V	30	30	30	30	30	30
HRC© 20 mL	15	15	15	15	15	15
H ₂ O/NaOH mL volume total 5 mL	3/2	3/2	3/2	3/2	3/2	3/2
[CaCl₂] M	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	0,1
RESULTATS	-+	-+	-+	-+	-++	+-+

Tableau 8 - Composition n° 3 des solutions préparées pour l'obtention de billes HRC©à concentration en calcium élevée.

Le HRC© est difficilement retenu dans la pouzzolane, et les essais d'encapsulation de ce substrat n'ont pas abouti à un résultat satisfaisant. Cependant, étant donné que le HRC© ne semble pas être un composé adapté pour le traitement *in situ* en portes filtrantes, il ne serait pas utile de poursuivre les essais avec ce substrat. Par contre, la mise au point de supports bactériens à libération lente de substrat demeure une piste intéressante pour l'amélioration des procédés de traitement en bio-barrières.

3.2.4. Le traitement du Cr(VI) en barrières perméables réactives : conclusion de la partie expérimentale

Pour la mise en œuvre d'un traitement d'eau polluée par du Cr(VI), il paraissait intéressant de tester une configuration de réacteur combinant le fer zérovalent et l'activité de bactéries sulfato-réductrices. Un essai en continu a été réalisé en 2004, pendant 2 mois, avec une colonne remplie de couches successives de laine d'acier et de pouzzolane. Ce bioréacteur a fonctionné dans des conditions proches du traitement réel in situ: température 12 °C, milieu très simple constitué d'eau du robinet additionnée de Cr(VI), sulfate de sodium et lactate de sodium. Ce dispositif n'a pas permis d'atteindre un temps de résidence inférieur à 4 h, valeur limite fixée par le cahier des charges. Pour une concentration en Cr(VI) s'élevant à 15 mg/l en entrée de colonne, le temps de résidence minimum qui a pu être appliqué est égal à 10 h. Il semble très probable qu'une réaction directe de l'H₂S avec le fer issu de la laine d'acier a d'une part, amoindri l'efficacité du Fe zéro-valent vis-à-vis du Cr(VI), et d'autre part, accentué l'effet inhibiteur du Cr(VI) sur les bactéries sulfato-réductrices. Les observations réalisées au microscope électronique suggèraient que le biofilm bactérien ne s'est pas bien développé sur le support, peut-être parce que l'augmentation du débit d'alimentation a été trop rapide.

En 2005, deux nouvelles expériences de traitement du Cr(VI) en continu ont été réalisées, avec des bioréacteurs ne contenant que de la pouzzolane.

Le programme expérimental de la première expérience (février-août 2005) a été établi de façon à optimiser le développement d'un biofilm performant. Au cours de cet essai, il a été possible de traiter, avec du lactate, une eau contenant jusqu'à 7,5 mg/l de Cr(VI) en appliquant un temps de résidence égal à 2,75 h. Les performances de ce dispositif sont donc en accord avec les exigences du cahier des charges en termes de température, de temps de résidence et de concentration en Cr(VI) en sortie de bioréacteur. Notons aussi que la teneur en Cr total dissous (essentiellement Cr(III) non précipité et/ou complexé) ne satisfait pas, *a priori*, le cahier de charges. Cependant, un colmatage relativement important du lit de pouzzolane a été constaté en fin d'expérience.

La dernière expérience (septembre-décembre 2005) a été réalisée afin de déterminer la rapidité à laquelle diminue la conductivité hydraulique du bioréacteur, le temps nécessaire pour obtenir un bioréacteur efficace à partir d'un lit de pouzzolane propre, et de tester le HRC© en tant que substrat à la place du lactate. Après 95 jours de fonctionnement, la conductivité hydraulique du bioréacteur n'a pas diminué de façon significative. Le temps nécessaire pour mettre en service un bioréacteur à partir d'un lit de pouzzolane fraîche est compris entre 15 jours et 1 mois. Enfin, les activités bactériennes de sulfato-réduction et de Cr(VI)-réduction semblent moins élevées avec du HRC© seul qu'en présence d'un milieu complet contenant du lactate libre. Il est possible que la vitesse de dissociation du HRC© en lactate libre soit limitante dans un système fonctionnant à faible temps de résidence, tel qu'une porte filtrante étudiée dans le cadre du présent projet. De meilleurs résultats ont été obtenus avec un milieu de culture plus complet, contenant du HRC© et des nutriments complémentaires (urée et engrais).

Des essais complémentaires ont été réalisés afin de tester la faisabilité d'une encapsulation du HRC© et/ou d'autres substrats. Ces expériences avaient pour objectif de tester la possibilité de mettre au point un système de distribution passif des substrats en amont, ou à l'intérieur même du bioréacteur. Ces premières expériences n'ont pas donné de résultats très satisfaisants : le HRC© n'est pas retenu de façon efficace par la pouzzolane ou le sable imprégnés de cette substance.

Par ailleurs, les essais d'encapsulation du HRC© n'ont pas permis d'obtenir des particules aux propriétés satisfaisantes. Cependant, le HRC© n'est sans doute pas le substrat le plus adapté pour des traitements en barrières de type panneau-drain, comme l'ont démontré les résultats du dernier essai en bioréacteur. Par ailleurs, l'acidité du HRC© est un obstacle à son encapsulation dans des billes d'alginate. Il sera donc particulièrement intéressant, dans le cadre d'un futur projet, de poursuivre les travaux entrepris pour la mise au point de supports bactériens à diffusion lente de substrats.

3.3. TRAITEMENT DU CR(VI) EN BARRIÈRES PERMÉABLES RÉACTIVES : ÉVALUATION TECHNICO-ÉCONOMIQUE

Les travaux relatifs à cet aspect du projet ont été réalisés par Soletanche-Bachy.

3.3.1. Données de base

À l'issue des tests en laboratoire, une configuration de principe du système de porte filtrante a été déterminée. Elle est basée sur la mise en place de deux filtres biologiques associés à une unité physico-chimique de post-traitement (Figure 27).

Les deux filtres biologiques sont constitués de pouzzolanes qui servent de media de support du biofilm ; ils sont placés en série mais seul le premier filtre est préalablement ensemencé par les bactéries. Au moment de la mise en service du système, le filtre l est alimenté *in situ* en continu par du lactate et des nutriments injectés à l'aide d'une pompe.

L'ensemencement du deuxième filtre par les bactéries se fait naturellement au cours de la percolation. Lorsque le filtre I est colmaté, il est remplacé par le filtre II et les bactéries sont alors activées par le lactate et les nutriments. Un nouveau filtre de pouzzolane est alors mis à la place du filtre II et le cycle peut reprendre.

Le filtre IIII de post-traitement est constitué de granules d'oxyde de Mg pour remonter le pH de sortie, précipiter le Cr(III) et diminuer la teneur en chrome total.



Figure 27 - Configuration de principe d'une porte filtrante BIBA.

Le dimensionnement à l'échelle industrielle nécessite de déterminer la taille critique des trois filtres pouvant être opérationnels dans des gammes de débits et de concentrations rencontrées sur sites réels.

Les capacités d'abattement du Cr(VI) dans le filtre biologique pouvant être considérées comme « infinies » (contrairement à un filtre physico-chimique dont les sites vont progressivement se saturer, la capacité de traitement des bactéries est « infinie » tant qu'elles sont en vie, le paramètre limitant sera le degré de colmatage), c'est le temps de résidence dans le bioréacteur qui est le paramètre dimensionnant pour déterminer les concentrations pouvant être traitées.

Dans un premier temps, les données de laboratoire ont donc été extrapolées pour déterminer le temps de résidence minimum nécessaire au traitement biologique. Cette extrapolation, présentée en Annexe 2, a été réalisée par le BRGM à partir des données acquises dans le projet BIBA mais aussi au cours d'autres projets.

On a ainsi retenu deux cas typiques d'utilisation :

- en borne supérieure, un temps de résidence de 10 h, correspondant à un traitement d'une concentration comprise entre 30 et - 60 mg/l;
- en borne inférieure, un temps de résidence de 4 h, correspondant à un traitement d'une concentration comprise entre 5 et 10 mg/l.

La taille optimale des filtres (hauteur-rayon) a ensuite été déterminée, pour un débit donné, à partir d'un compromis entre le temps de résidence désiré et le niveau admissible de pertes de charges. Ces pertes de charges admissibles, indicatrices du taux de colmatage du filtre, détermineront la durée de fonctionnement du filtre et sa fréquence de renouvellement. Cette partie d'étude a été réalisée à l'aide d'un outil de calcul développé sous Excel, présenté en Annexe 3. Une perméabilité moyenne du biofiltre de 10⁻² m par seconde a été considérée dans les calculs ; elle correspond à la valeur mesurée en laboratoire par le BRGM pendant les essais de filtration.

Le dimensionnement des filtres pour les deux cas d'application décrits précédemment a été effectué pour des débits moyens de percolation de 300 l/h, des pertes de charges admissibles sur l'ensemble de la porte de 30 cm et un temps de contact dans le filtre III de 1 h. Ces conditions de fonctionnement sont en effet assez typiques des conditions réelles de fonctionnement sur sites.

	Filtres biologiques I et II	Filtre post-traitement III
Solution 1 Tr 10 h	Longueur 5 m ; rayon 0,8 m	Longueur 2 m ; rayon 0,38 m
Solution 2 Tr 4 h	Longueur 2,5 m ; rayon 0,70 m	Longueur 2 m ; rayon 0,38 m

Les résultats sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 - Dimensions optimales des filtres solution 1 et solution 2.

L'évaluation technico-économique a été effectuée avec ces données de base.

3.3.2. Conception des filtres et de la porte filtrante

a) Préparation de l'inoculum et ensemencement du filtre

Le principe de préparation de l'inoculum pour l'ensemencement des biofiltres est présenté en Annexe 4.

Il est nécessaire de préparer respectivement environ 700 et 250 l d'inoculum pour ensemencer les biofiltres des solutions 1 et 2.

Deux options ont été étudiées :

- une préparation de l'inoculum et un ensemencement dans la Halle Biotechnologies du BRGM ;
- une préparation de l'inoculum dans la Halle Biotechnologies du BRGM et un ensemencement du biofiltre *in situ*.

Dans les deux cas, le temps de préparation est de l'ordre de 60 jours.

b) Conception du système de filtration

Le système complet comprend :

- la porte filtrante (cf. système « panneau-drain ») ;
- les cartouches de filtration qui constituent le réceptacle des matériaux de filtration, équipées dans le cas des biofiltres de leur système d'alimentation en nutriments.

Un plan d'ensemble a été réalisé pour les deux configurations envisagées. Différents détails de construction sont donnés dans les figures ci-après (Figures 28 à 31).

La cartouche du biofiltre est équipée d'un système d'injection en trois points de nutriments et de lactate. Des détails de montage sont présentés Figures 30 et 31.

Les nutriments et le lactate sont alimentés par deux voies différentes, le mélange s'effectue à l'entrée de la cartouche et sa répartition à l'intérieur du biofiltre est assurée par des conduites de distribution réparties en périphérie.



Figure 28 - Vue d'ensemble de la porte filtrante BIBA Solution 1.



Figure 29 - Vue d'ensemble porte filtrante BIBA solution 2.



Figure 30 - Vue en coupe verticale de la cartouche de biofiltre.



Figure 31 - Vue en coupe horizontale du montage de la cartouche.

3.3.3. Évaluation économique du système

L'évaluation économique telle que présentée ci-après est donnée à titre d'information, elle n'a pas de valeur commerciale ni contractuelle.

- Solution 1 (Cr 60 mg/l, temps résidence 10 h, débit 300 l/h) ;
 - · préparation de l'inoculum : 39 500 €,
 - · porte filtrante : 90 500 €.

Soit un coût total estimé à : 130 000 €.

- Solution 2 (Cr 10 mg/l, temps résidence 4 h, débit 300 l/h ;
 - · préparation de l'inoculum : 34 000 €,
 - · porte filtrante : 70 000 €.

Soit un coût total estimé à : 104 000 €.

- Les coûts annuels pour l'entretien de la porte se décomposent ainsi :
 - · nutriments/lactate : 1 600 €,
 - · recharge MgO : 1 200 €,
 - · recharges pouzzolanes : 600 €,
 - · déplacements site entretien : 8 000 €,
 - · divers location pelles, chargeurs, etc. : 3 000 €.

Soit un coût total annuel estimé à : 14 400 €.

On peut estimer que le coût moyen d'entretien annuel serait compris entre 3 et $6 \notin m^3$ d'eau traité. Le coût de mise en décharge du Mg0 n'a pas été pris en compte car difficilement chiffrable, il ne devrait pas dépasser de l'ordre de 1 000 \notin par an. La pouzzolane pourra être ré-utilisable après nettoyage.

3.3.4. Conclusion

Les procédés de traitement biologiques offrent de nouvelles possibilités dans le domaine du traitement des eaux souterraines par Barrière Perméable Réactive.

Les coûts d'installation d'une porte filtrante sont relativement élevés. Ils sont cependant compensés par des coûts d'entretien annuel faibles. Les faibles coûts de maintenance sont en grande partie liés à l'option d'ensemencement naturel du deuxième filtre. Cette option serait cependant à valider en laboratoire.

Les conditions d'utilisation des biofiltres sont limitées par le temps de résidence qu'il est nécessaire de respecter pour la précipitation biologique du chrome. Les spécifications de traitement initialement prises en compte dans le cadre du projet BIBA portaient sur des concentrations et des temps de contact correspondant à la borne inférieure considérée dans l'étude technico-économique (solution 2).

Le projet a démontré que les objectifs de traitement pouvaient être atteints et que son applicabilité sur site semblait possible au regard de l'évaluation technico-économique.

La borne supérieure de 10 h considérée dans cette étude est probablement maximaliste ; elle reflète cependant la taille maximale des filtres qu'il semble possible d'envisager, à la fois pour des raisons techniques d'installation et d'économie du procédé. La concentration en Cr(VI) correspondant à ce temps de résidence, 60 mg/l, serait probablement à affiner.

Une optimisation des coûts de la porte filtrante semble possible, par exemple en faisant re-circuler l'eau à traiter à l'intérieur du bioréacteur, ou encore en pratiquant l'inoculation du biofiltre sur site.

Il serait intéressant de tester ces options à l'occasion d'essais-pilotes sur site.
4. Traitement du cyanure

4.1. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

4.1.1. Les composés cyanurés

a) Présence de composés cyanurés dans l'environnement

Le cyanure est à la fois un composé naturel, produit par de nombreux organismes (bactéries, algues, champignons et plantes) dans un but défensif, d'invasion ou comme produit secondaire du métabolisme. Il s'agit également d'un polluant d'origine industrielle, que les sols peuvent receler en quantités importantes sous forme très concentrée du fait des activités humaines. Ses effets nocifs se font sentir à partir de 0,1 mg.L⁻¹ seulement.

Le cyanure est très utilisé en industrie à cause de sa propriété à former des complexes métalliques très stables (extraction de l'or sous forme de $Au(CN)_2^-$ par exemple). Les industries minières (métaux rares, charbon), du traitement des métaux... en sont de grandes consommatrices. Les complexes fer-cyanure sont des polluants relativement répandus sur les sites des anciennes usines à gaz, du fait de leur utilisation pour le lavage des gaz par de l'oxyde de fer et de la chaux afin d'éliminer H₂S et HCN. Les thiocyanates et cyanures sont les deux principaux produits présents dans les eaux usées des industries minières et des cokeries. Les cyanures peuvent se trouver dans les matrices environnementales sous différentes formes : simples (HCN, CN-, NaCN), complexes métal-cyanure, cyanates et nitriles (Dictor M.C. *et al.*, 1997 ; Luque-Almagro V.M. *et al.*, 2005 ; Ebbs S., 2004).

b) Chimie du cyanure et de ses dérivés

NaCN et KCN, deux sels couramment utilisés comme sources de cyanure libre, s'hydrolysent lentement et partiellement au contact de l'eau, avec émission d'acide cyanhydrique HCN, gaz inflammable et très toxique. L'hydrolyse dépend du pH : le dégagement d'HCN est important en milieu acide.

Ces deux espèces sont des réducteurs énergiques (réaction avec les chlorates, les nitrites, l'acide nitrique, le fluor...) solubles dans l'eau (NaCN soluble à 48 % en poids à 10 °C, KCN soluble à 71,6 % en poids à 25 °C).

HCN est un acide faible, partiellement dissocié dans l'eau :

$HCN \Leftrightarrow H^+ + CN^-$ pKa = 9.21 <u>+</u> 0.02 (25 °C)

Sa pression de vapeur saturante est élevée (760 mmHg à 25.9 °C). On considère donc qu'à pH neutre ou acide il n'y a pas de cyanure libre en solution, HCN se volatilisant complètement à la surface de la solution en conditions ambiantes. Il s'oxyde en cyanate en présence d'O₂ (ou d'un agent oxydant fort/de conditions accélératrices pour que la réaction soit significative : UV, chaleur, micro-organismes, catalyseurs) :

$4\text{HCN} + 3\text{O}_2 \Leftrightarrow 4\text{CNO}^- + 2\text{H}_2\text{O}$

$3CN^{-} + 2O_2 + 2H_2O \Leftrightarrow 3CNO^{-} + 2OH^{-}$

Le cyanure forme des complexes avec des métaux, selon la réaction générale (Dictor M.C. *et al.*, 1997) :

$M^{x+} + yCN^{-} \Leftrightarrow M(CN)_{v}^{(y-x)-}$

Le cyanure peut réagir avec des alhéhydes et des cétones (réaction de Kiliani-Fischer). Il faut donc prendre le phénomène en compte lors de la formulation des milieux de culture bactériens. Les complexes métal-cyanure peuvent être divisés en WAD (weak acid dissociable, complexes du nickel, zinc, cuivre et cadmium) et complexes forts (avec le fer et le cobalt). La stabilité des complexes dépend du pH. Ils sont généralement plus stables quand le pH augmente. Dans les complexes WAD, le cyanure est libéré lorsque le pH est abaissé entre 4,5 et 6 (Luque-Almagro V.M. *et al.,* 2005).

c) Toxicité du cyanure et de ses dérivés

La toxicité des cyanures alcalins est comparable à celle de HCN. CN⁻ est un poison cellulaire. Il se lie à certains ions métalliques (dont le Fe³⁺ de l'enzyme cytochrome oxydase) et bloque ainsi la respiration cellulaire. Les tissus les plus touchés sont ceux riches en cytochrome oxydase (rétine et cerveau).

Le seuil de perception olfactive est inférieur à 1 ppm chez les sujets attentifs, sains et non habitués. La perception de l'odeur est de plus un trait génétique : statistiquement, jusqu'à 40 % de la population ne détecte pas l'acide cyanhydrique.

Des taux atmosphériques d'HCN supérieurs à 50 ppm et respirés pendant plus d'une demi-heure représentent un risque important. Des taux de 200 à 400 ppm ou plus pendant quelques minutes sont susceptibles d'être mortels immédiatement. La VME (Valeur Maximale d'Exposition) en milieu professionnel est de 2 mg/m³ (INRS, 1992).

Les cyanures WAD sont considérés généralement comme la meilleure mesure possible pour évaluer la toxicité sur l'homme et l'animal. En effet, les complexes forts sont moins toxiques du fait de leur stabilité (Luque-Almagro V.M. *et al.*, 2005).

Le cyanure inhibe une grande variété d'enzymes, principalement des hémoprotéines ou autres oxydases et oxygénases contenant du métal. À des concentrations de l'ordre de 10⁻⁴ M ou moins, il inhibe fortement la cytochrome oxydase, mais a peu d'effets sur

les autres enzymes qui nécessitent des concentrations en cyanure de 10⁻⁴ M à 10⁻² M pour être significativement inhibées (Knowles C.J., 1976).

d) Dégradation bactérienne du cyanure et de ses dérivés

Les méthodes chimiques conventionnelles d'élimination des déchets cyanurés sont problématiques, car elles nécessitent l'utilisation de produits chimiques comme le chlore, dont les déchets doivent être eux-mêmes retraités. De plus, ces méthodes sont généralement assez chères. C'est pourquoi, de nombreuses études sont et ont été réalisées sur la dégradation bactérienne du cyanure et de ses dérivés.

L'assimilation biologique du cyanure par les bactéries nécessite l'existence de trois processus simultanés :

- un mécanisme de résistance au cyanure, du fait de sa toxicité importante. Certaines bactéries possèdent ainsi des cytochromes oxydases insensibles au cyanure;
- un système de récupération des métaux, le cyanure provoquant une rarification des métaux essentiels aux organismes en formant avec eux des complexes très stables. Les bactéries produisent ainsi des sidérophores, composés organiques qui lient très fortement le fer et permettent son transport dans la cellule et son assimilation;
- une **voie métabolique d'assimilation du cyanure**, capable de convertir le cyanure en ammonium.

Selon les connaissances actuelles, tous les micro-organismes aérobies capables d'assimiler le cyanure l'utilisent uniquement comme source d'azote. Une source de carbone autre est nécessaire pour leur croissance (Luque-Almagro V.M. *et al.*, 2005).

La plupart des bactéries identifiées dégradant le cyanure sont hétérotrophes aérobies et utilisent le cyanure comme source d'azote en produisant CO_2 et NH₃. Les conditions de croissance optimales de ces micro-organismes consistent en une concentration en cyanures de 40 mg.L⁻¹ environ, un pH compris entre 7,5 et 9 et une température inférieure à 35 °C. L'efficacité du métabolisme des cyanures et cyanates est accrue en présence d'une source carbonée. Le facteur déterminant dans la biodégradation du cyanure est la stabilité chimique de la forme prédominante sous laquelle se trouvent les complexes du cyanure en solution. Les complexes du fer sont ainsi considérés comme non biodégradables (Dictor M.C., 1997).

Il existe quatre voies métaboliques générales de biodégradation des cyanures : hydrolyse, oxydation, réduction et substitution/transfert. La Figure 32 détaille ces différentes voies. Certains organismes peuvent utiliser plus d'une voie. La voie prépondérante dépend des conditions environnementales (pression d'O₂, pH, concentration, biodisponibilité et solubilité du cyanure...) (Ebbs S., 2004).



Figure 32 - Les grandes catégories de réactions chimiques responsables de la dégradation des cyanures et thiocyanates.

Pour la réaction d'hydrolyse impliquant des nitriles, R représente un groupe aliphatique ou aromatique. La réaction de substitution/transfert catalysée par la cyanoalanine synthase peut aussi utiliser de l'O-acétylserine comme substrat. Le cyanate formé par la cyanure monooxygénase est converti en NH_4^+ et CO_2 par la même voie que le cyanate provenant du thiocyanate. La voie de réduction est dérivée de l'action de la nitrogénase et des produits résultant du transfert d'une paire d'électrons.

La principale voie de biodégradation des cyanures libres et complexés en carbonates et ammonium est la suivante :

$$M_x CN_y + 4H_2O + O_2 \rightarrow M - biofilm + 2HCO_3^- + 2NH_3^-$$

Il est nécessaire ensuite d'oxyder l'ammonium via le processus de nitrification :

$$NH_{4}^{+} \frac{3}{2}O_{2} \rightarrow NO_{2}^{-} + 2H^{+} + H_{2}O$$
$$NO_{2}^{-} \frac{1}{2}O_{2} \rightarrow NO_{3}^{-}$$

L'ammonium est oxydé en nitrates via la formation de nitrites. Pour une dégradation des cyanures, il est nécessaire que ces 3 populations (cyanures oxydantes, *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*) soient présentes. Ensuite, les nitrates produits pourront être réduits en azote gazeux *via* le processus de dénitrification. Une limitation du procédé biologique de destruction des cyanures jusqu'au stade nitrates et carbonates est que la réaction biologique d'oxydation des nitrites en nitrates est plus lente que celle d'oxydation des cyanures (une concentration trop importante en nitrites va inhiber leur conversion en nitrates).

Donc dans un procédé de biodégradation des cyanures, il faudra veiller à avoir un bon équilibre entre les différentes populations bactériennes impliquées (Dictor *et al.*, 1997).

L'objectif de l'essai est de sélectionner la population bactérienne capable d'oxyder les cyanures comme seule source de carbone et d'énergie.

À partir d'échantillons d'eaux prélevées sur le site d'une ancienne mine d'or, les populations vont être sélectionnées à partir de différents milieux de culture :

- croissance sur milieu minéral supplémenté en glucose et cyanure afin de mettre en évidence les populations bactériennes qui vont utiliser le cyanure comme source d'azote;
- croissance sur milieu minéral supplémenté en ammonium et cyanure afin de sélectionner les populations bactériennes capables d'utiliser le cyanure comme source de carbone;
- croissance sur milieu minéral supplémenté avec du cyanure pour la sélection des populations bactériennes aptes à utiliser le cyanure comme source de carbone et d'azote.

4.2. SÉLECTION DE POPULATIONS DÉGRADANT LE CYANURE

4.2.1. Sélection de populations à partir d'échantillons d'un site minier

a) Prélèvements d'échantillons susceptibles de contenir des bactéries dégradant le cyanure

Les échantillons d'eaux suivants ont été prélevés et fournis par les Mines d'Or de Salsigne (MOS) le 24 février 2004. Leur origine est détaillée dans le Tableau 10.

Les prélèvements ont été effectués dans l'après-midi du 24 février, avec le soleil, une température d'environ 10 °C.

Identification	Origine
E 1	Eau stagnante + sédiments du bassin de la Caunette (ancien bassin de rejet des concentrés que l'on retraite aujourd'hui)
E 2	Eau surnageante du bassin de Montredon (bassin de rejet des concentrés utilisés en ce moment, il y a sûrement du cyanure résiduel, total et wad)
Е 3	Eau + sédiment du bassin de Montredon (mêmes remarques que n° 2, mais un côté un peu plus stagnant)
E4	Eau plage supérieure de l'Artus + sédiment (plage de rejets de stériles utilisée uniquement pour le rinçage des tuyauteries)
E5	Eau + sédiments bassin de retour de l'Artus (récupération de l'eau et des fines de stériles avant recyclage de l'eau vers le process)

Tableau 10 - Origine des échantillons-sources de bactéries dégradant le cyanure.

c) Composition des milieux de culture

• Composition du milieu minéral

La composition du milieu minéral est la suivante.

NaCl	5
KH₂PO₄	0,225
Na ₂ HPO ₄	5,64
Oligo-éléments	10 ml
Eau déminéralisée	1 000 ml
pH 7,5.	

Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

• Préparation de la solution de cyanure

Une solution concentrée de cyanure est préparée de la façon suivante : 200 ml d'eau déminéralisée est amenée à pH 10 par ajout de soude. 230 mg de KCN sont ensuite ajoutés à cette solution.

La concentration théorique est de 1 150 mg de KCN. I^{-1} ce qui correspond à une concentration de 459,3 mg CN. I^{-1} .

La solution est stérilisée par filtration à 0,2 µm puis stockée dans une fiole stérile.

Solution de Glucose						
Glucose	5,4 g					
Eau déminéralisée	200 ml					

La solution est stérilisée par filtration à 0,2 µm, puis stockée dans une fiole stérile.

Solution d'ammonium					
(NH4) ₂ SO ₄	4 g				
Eau déminéralisée	100 ml				

La solution est stérilisée par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

• Préparation des milieux finaux

Les milieux sont préparés suivant les compositions données par le Tableau 11.

	Volume des solutions (ml)							
Milieu	Milieu minéral	KCN	Glucose	Ammonium				
M 1	500	20	0	2				
M 2	500	20	1	0				
М 3	500	20	0	0				

Tableau 11 - Sélection d'une population dégradant les cyanures, préparation des milieux.

c) Sélection des populations bactériennes

• Dénombrement en microplaques

À partir des 5 prélèvements effectués sur le site de la MOS (E 1 à E 5), la présence d'une population bactérienne dégradant les cyanures sera mise en évidence sur tests en microplaques (méthode de Boucabeille, 1993). Dans chaque puits sont ajoutés 200 µl de milieu de culture + 50 µl de chacun des échantillons E1 à E5. Les microplaques sont placées à l'étuve à 25 °C pendant 1 semaine. La croissance microbienne est visualisée par l'apparition d'un trouble bactérien.

• Dénombrement en erlenmeyers

Dans des erlenmeyers stériles de 50 ml en verre, 10 ml des milieux de cultures M1, M2 ou M3 ont été ajoutés. Ces erlenmeyers ont été ensemencés avec 1 ml des échantillons E2, E3 et E4. Au total, 12 erlenmeyers ont été préparés. Les erlenmeyers sont ensuite placés dans une chambre thermostatée à 25 °C. Un suivi de la croissance microbienne est réalisé tous les 2 jours. Un prélèvement après 1 semaine a été réalisé afin de dénombrer la densité bactérienne et d'analyser les concentrations en cyanures libres, en ammonium, nitrates et nitrites.

d) Analyses

• Analyse des cyanures libres

Les cyanures libres sont analysés à l'aide des tests kit Merck (références 1.09701.0001 et 1.179.43.0001) et par la technique en microdiffusion (service **Analyses et caractérisation Minérale du BRGM**).

• Analyse des espèces azotées

Des tests kit Merck sont utilisés pour doser l'ammonium (ref. 1.16899.0001), les nitrates (ref. 1.16995.0001) et les nitrites (ref. 1.16973.0001).

• Comptages bactériens

La densité bactérienne est mesurée par comptage au microscope optique (cellule de Thoma, grossissement x 400).

e) Résultats et discussion

• Échantillons

Le pH et la concentration en cyanures libres ont été mesurés dans chaque échantillon prélevé (Tableau 12). La concentration en cyanures libres a été analysée à l'aide de tests Merck.

Échantillon	рН	Concentration en CN ⁻ (mg.l ⁻¹)				
E1	7,32	3,26				
E 2	8,49	3,91				
E 3	8,16	4,03				
E 4	8,44	2,83				
E 5	7,47	2,31				

Tableau 12 - Concentration en cyanures libres dans les échantillons bruts.

f) Croissance sur microplaque

La microplaque a été mise dans une étuve thermostatée à 25 °C pendant une semaine. La croissance microbienne à l'intérieur des puits a été mise en évidence par une mesure de Densité Optique (DO) à 600 nm. Les valeurs de DO ont été obtenues après déduction de la DO du milieu de culture seul et de l'échantillon seul.

Une analyse des concentrations en ammonium, nitrates et nitrites a été réalisée pour chaque puits à l'aide des bandelettes Merck.

Les résultats sont reportés dans la Figure 33. Une croissance microbienne est observée dans les puits ensemencés avec les échantillons E1, E2, E3 et E4. Le cyanure est décomposé en ammonium et carbonate. La présence d'ammonium est détectée dans les essais E3 et E4, quel que soit le milieu de culture utilisé. Par contre, de l'ammonium n'est détecté, avec l'échantillon E2, qu'en présence des milieux de culture M2 et M3. Une concentration en nitrates de l'ordre de 1 à 2 mg.l⁻¹ est mise en évidence dans tous les échantillons.

À l'issue de ces premiers résultats, une sélection des échantillons a été réalisée. Une population se développant sur le milieu de culture M3, qui ne contient que du cyanure comme source de carbone et d'azote, serait plus intéressante que des cultures obtenues sur les autres milieux. Par suite les études se sont focalisées sur les échantillons E2, E3 et E4 et leur croissance sur les milieux M1, M2 et M3 a été étudiée.

g) Croissance en erlenmeyers

La croissance des populations bactériennes provenant des échantillons E2, E3 et E4 est montrée par les Figures 33, 34 et 35.



Figure 33 - Croissance des populations microbiennes pendant une semaine d'incubation à 25 °C. Évolution des concentrations en ammonium, nitrates et nitrites dans les échantillons.



Figure 34 - Croissance des populations bactériennes de l'échantillon E2 sur les différents milieux de culture M1, M2 et M3.



Figure 35 - Croissance des populations bactériennes de l'échantillon E3 sur les différents milieux de culture M1, M2 et M3.

Dans le cas de l'échantillon E2, après une phase de latence de 3 jours, une croissance bactérienne est mise en évidence et semblable quel que soit le milieu de culture (Figure 34).

Dans le cas de l'échantillon E3, une chute du nombre de bactéries est observé quel que soit le milieu de culture, mais est plus prononcée en présence du milieu de culture M3. Après 3 jours d'incubation, une croissance est notée et atteint la valeur d'inoculation. Il semble que la croissance sur les milieux de culture M1 et M2 ne soit pas terminée au bout de 7 jours (Figure 35).

Dans le cas de l'échantillon E4, une légère croissance bactérienne est observée après 3 jours d'incubation. Il semble que le milieu M2, contenant du glucose et du cyanure, soit plus favorable à leur croissance (Figure 36).

La concentration théorique en cyanure libre dans les milieux de culture est de 20,2 mg CN⁻.l⁻¹. L'analyse de la concentration en cyanures libres à l'aide du test Merck donne des valeurs comprises entre 8 et 9,7 mg CN⁻.L⁻¹. La concentration en cyanures libres est sous-estimée par l'analyse des cyanures avec le test Merck. Néanmoins, il est possible de suivre une diminution des cyanures libres dans le milieu de culture en présence des bactéries. L'analyse par les kits Merck nous donne une mesure qualitative.

Les concentrations en cyanures libres présents dans les milieux de culture M1, M2 et M3 par la technique de microdiffusion sont respectivement de 17,9, 18,5 et 18,0 mg $CN^{-}L^{-1}$. Ces valeurs sont proches de la concentration théorique de 20,2 mg $CN^{-}.I^{-1}$.



Figure 36 - Croissance des populations bactériennes de l'échantillon E4 sur les différents milieux de culture M1, M2 et M3.

La Figure 37 met en évidence une dégradation des cyanures présents dans le milieu, de l'ordre de 50 % après 7 jours d'incubation et ceci quel que soit le milieu de culture considéré.

La présence d'ammonium est observée dans certains échantillons (E2 M1, E2 M2, E2 M3, E4 M1). De plus, des nitrates ont aussi été quantifiés dans les échantillons E2 M1, E2 M2, E2 M3, E3 M2, E3M3, E4 M1, E4 M2. La présence de nitrates suggère une transformation de l'ammonium en nitrates.

La présence de nitrites n'a pas été détectée, ce qui laisse penser que les nitrates ne sont ou n'ont pas encore été transformés.

À l'issue de ces derniers résultats, les échantillons E2 M3, E3 M3 et E4 M3 ont été conservés pour un repiquage en erlenmeyers contenant 100 mL de milieu M3.



Figure 37 - Évolution des concentrations en cyanures libres, ammonium, nitrates et nitrites après 7 jours d'incubation des échantillons à 25 °C.

h) Croissance en erlenmeyers de 100 mL

Les populations E2, E3 et E4 ont été repiquées sur le milieu minéral supplémenté avec 20 mg CN⁻.l⁻¹. Une croissance bactérienne est mise en évidence et il semble que la population E4 se développe plus lentement que les deux autres (Figure 38).

La concentration en cyanures libres dans le milieu de culture a été suivie et les deux méthodes d'analyses (kit Merck et technique de microdiffusion) ont été comparées (Figure 39). Les cyanures libres sont dégradés par les populations E2, E3 et E4 en 2 à 3 jours.

Les expériences futures vont conduire à une augmentation progressive de la concentration initiale en cyanures libres jusqu'à atteindre une concentration de 100 à 150 mg.l⁻¹.



Figure 38 - Croissance des populations bactériennes E2, E3 et E4 sur le milieu minéral dopé à 20 mg.1¹ de cyanures libres.



Figure 39 - Évolution des concentrations en cyanures libres par les populations bactériennes E2, E3 et E4 à l'aide du test Merck. Les points de valeurs à T0 et T3 jours ont aussi été analysés par la technique de microdiffusion.

4.2.2. Comparaison de l'efficacité de différentes populations

a) Reprise des cultures sélectionnées en 2004

Les cultures sélectionnées en 2004 étaient restées en dormance pendant plus d'un mois. Les populations P2, P3 et P4 ont été repiquées dans du milieu frais contenant 50 mg/l de cyanure et dont le pH a été ajusté à pH 8,5.

En parallèle, du milieu frais contenant 10 mg/l de cyanure a été inoculé avec les échantillons de sédiments qui avaient été initialement utilisés pour sélectionner les populations bactériennes. Ces cultures sont incubées à 25 °C. Des fioles témoins non inoculées sont incubées en même temps que les cultures.

La croissance de ces différentes cultures a été évaluée par dénombrement des bactéries au microscope optique. Une croissance des populations P3 et P4 est observée au cours des 5 premiers jours d'expérience (Figure 40). La culture issue de l'échantillon E4 commence à se développer à partir du 5^e jour d'incubation.



Figure 40 - Activation des cultures sélectionnées sur milieu M3.

Des analyses de cyanure ont été réalisées en début et en fin d'expérience (Tableau 13). Le cyanure a été éliminé aussi bien dans les milieux inoculés que dans les fioles témoins. Le cyanure disparaît donc du milieu de façon abiotique. Les analyses des formes inorganiques azotées révèlent l'absence de production d'ammonium, nitrate ou nitrite par les populations P2, P3 et P4. En fin d'expérience, les cultures inoculées avec les échantillons initiaux (E2, E3 et E4) contiennent beaucoup d'ammonium et un peu de nitrate. Ces espèces chimiques sont probablement libérées par le sédiment.

Cette expérience n'a donc pas pu démontrer qu'une des populations bactériennes disponibles a effectivement dégradé le cyanure.

b) Comportement du cyanure dans le milieu de culture

La disparition du cyanure libre dans le milieu est liée à l'échappement du cyanure protoné HCN au pH de l'expérience. En effet, le pK de l'acide cyanhydrique HCN est proche de 9. Il augmente avec la force ionique et diminue quand la température croît (Verhoeven *et al.,* 1990). Au pH de l'expérience (8,5), la forme HCN dissoute est majoritaire, et s'échappe sous forme gazeuse. Le cyanure perdu par échappement en phase gazeuse n'est pas disponible pour les bactéries. Si la croissance bactérienne n'est pas très rapide, les bactéries ne pourront pas se développer aux dépens du cyanure.

	P2	P3	P4	Témoin Pop.	E2	E3	E4	Témoin Ech.
CN libre T0 mg l ⁻¹	49.8	48.3	52.1	60	4,4	6,5	5,6	12
CN libre 6 jours mg l ⁻¹	0,12	0,09	0,08	< 0,01	n.d	1,6	2,1	0,01
NH₄ T0 mg l ^{⁻1}	< 0,1	0,3	0,2	< 0,1	1,1	0,9	1,1	0,4
NH₄ 6 jours mg l⁻¹	1,3	1,2	1,1	2,1	48,2	72,8	21,8	2,1
NO ₂ 6 jours mg l ⁻¹	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
NO ₃ 6 jours mg l ⁻¹	< 1	< 1	< 1	< 1	4,4	4,7	3,7	<1

Tableau 13 - Activation des cultures, analyses du cyanure libre et des espèces azotées inorganiques.

Les principaux facteurs susceptibles d'influencer la vitesse de dégagement du cyanure en phase gazeuse sont les suivants : le pH, la température, la composition du milieu, la superficie de l'interface eau/air. Des essais ont montré que lorsque le milieu est placé sous azote, dans des fioles hermétiquement fermées, le cyanure se dégage plus lentement (notamment du fait que la pression totale du gaz du récipient fermé se stabilise, stabilisant ainsi l'échappement de l'HCN qui contribue à la pression totale avec sa pression partielle).

L'influence du pH a été étudiée avec du milieu de culture stérile M3 contenant initialement 50 mg/l de cyanure libre. Après trois jours d'incubation à 25 °C, le milieu dont le pH initial avait été ajusté à 9 ne contient plus que 0,44 mg/l de cyanure, et son pH a diminué jusqu'à 8,44. Le milieu dont le pH initial avait été ajusté à 10 contient 6,59 mg/l de cyanure, et son pH final est 8,94. La diminution du pH semble liée au passage du cyanure libre dans la phase gazeuse.

Les concentrations théoriques des différentes formes de l'acide cyanhydrique à l'équilibre sont données par la Figure 41. Pour conserver 50 mg/l de cyanure en solution, il serait nécessaire de maintenir le pH du milieu à 10,5.

Une cinétique de disparition du cyanure libre dissous a été réalisée à 14 °C dans du milieu M3 dont le pH initial était ajusté à 9,5. Le cyanure est entièrement dégagé dans la phase gazeuse **en trois jours**, et sa vitesse de dégagement est constante (Figure 42).



Figure 41 - Concentrations théoriques en solution dans l'eau des différentes formes de l'acide cyanhydrique en fonction du pH.



Figure 42 - Cinétique de diparition abiotique du cyanure dans le milieu M3 incubé à 14 °C.

c) Mise en évidence d'une biodégradation des cyanures par une population bactérienne issue d'une boue de station d'épuration

Certains paramètres ont été modifiés pour essayer d'optimiser les conditions de croissance. Après plusieurs essais à différents pH (jusqu'à pH 9), le pH du milieu M3 (avant ajout de cyanure, qui alcalinise temporairement la solution) est fixé à 7,5. La température est finalement remontée à 25 °C, plus favorable à la croissance bactérienne.

De l'extrait de levure (0,2 g/L) est ajouté dans une série de cultures, dont une est ensemencée avec des boues activées de la station d'épuration d'Orléans-La Source. Malgré cet enrichissement du milieu, sensé favoriser la croissance bactérienne, aucun résultat significatif n'est obtenu. Toutefois, la culture issue des boues de STEP se développe beaucoup mieux que les autres et dès le début. Cela signifie que les bactéries se multiplient en présence de cyanure, donc qu'elles possèdent des mécanismes de résistance au cyanure efficace.

Le fait qu'aucune biodégradation de cyanure ne soit observée peut simplement découler de la présence d'une source d'azote plus facilement biodégradable que le cyanure dans l'extrait de levure. Un essai est donc réalisé sans ce dernier, sans résultat. Du glucose à 0,5 g/L est ensuite ajouté dans cette culture, afin d'apporter une source de carbone aux bactéries, qui, selon la littérature, utilisent généralement le cyanure comme source d'azote uniquement. Les résultats de cette dernière expérience ne sont pas plus encourageants que les précédents. De plus, l'utilisation de glucose comme source de carbone n'est pas forcément indiquée, du fait de sa réactivité potentielle avec le cyanure (réaction de Kiliani-Fischer ; Luque-Almagro V.M., 2005).

Un screening est finalement mis en place pour augmenter les chances de trouver une population dégradant le cyanure. Divers inocula susceptibles de contenir des bactéries dégradant le cyanure sont utilisés : populations précédemment sélectionnées (STEP, P3bis, P4bis et E4'), eaux de Salsigne (S1 à S5), boues de STEP fraîches (STEP 05/07) et terres de forêt et de culture prélevées sur le site du BRGM (TF et TC).

Ces inocula sont mis en culture dans deux milieux différents, à base de milieu M3, complémenté avec 50 mg/l de CN⁻, contenant ou non 0,5 g/L de lactate comme source de carbone. Deux témoins abiotiques sont aussi réalisés. Les cultures en tube à essai sont recouvertes d'une couche d'huile minérale pour éviter toute volatilisation de cyanure et mises à incuber deux semaines à 25 °C, à l'obscurité, sans agitation. Les résultats de cette expérience sont donnés par le Tableau 14. Les meilleurs résultats en terme de biodégradation sont obtenus avec l'échantillon de boue de station d'épuration Step 2.

Inoc	témoin	Step1	Step 2	P3	P4	E4	S1	S2	S3	S4	S5	Ter F	Ter C
- lac	48	28	18	33	31	37	34	26	30	31	32	26	23
+ lac	34	32	20	32	-	36	33	30	35	44	34	43	39

Tableau 14 - Essai de screening en tubes à essai avec huile minérale à l'interface eau/air.Analyse du CN résiduel (en mg/l) après 15 jours d'incubation.

4.2.3. Le traitement du cyanure en barrières perméables réactives : conclusion de la partie expérimentale, discussion et solutions proposées

Au sein de la barrière perméable réactive, le cyanure devra disparaître en moins de 4 h à 12 °C (cf. cahier des charges). Cette vitesse est supérieure à la vitesse de dégagement du cyanure libre dans la phase gazeuse. L'activité des micro-organismes devrait donc accélérer notablement la disparition du cyanure. Cependant, pour démarrer une expérience en continu, il est nécessaire de disposer d'une culture active en batch. Pour obtenir une culture active en batch, il est possible de rajouter du cyanure régulièrement dans les flacons de façon à compenser les pertes en phase gazeuse. Cette stratégie a déjà été appliquée par Ingvorsen *et al.* (1991) pour la culture d'une souche bactérienne dégradant le cyanure dans un milieu de culture à pH 7,5. Il est également possible de placer de l'huile minérale à l'interface eau/air. Cette stratégie a permis de mettre en évidence la biodégradation du cyanure par des bactéries issues d'une boue de station d'épuration.

Afin de mettre en œuvre l'expérience fonctionnant en continu, il serait nécessaire d'alimenter le bioréacteur avec une solution contenant une concentration stable en cyanure. Deux stratégies sont envisagées pour résoudre ce problème technique :

- soit pomper séparément, avec deux pompes, du milieu de culture (tamponné au pH désiré pour le mélange) sans cyanure, et une solution de cyanure concentrée dont le pH serait ajusté à une valeur élevée (pH 12 par exemple);
- soit maintenir le cyanure en solution en disposant un film d'huile minérale insoluble à la surface du milieu d'alimentation.

La première option nécessite l'utilisation de deux pompes précises aux faibles débits appliqués pour le démarrage de l'expérience. Si la seconde option était choisie, il faudrait s'assurer que de l'huile minérale ne soit pas injectée dans le bioréacteur.

La phase expérimentale de l'opération BIBA, concernant la biodégradation des cyanures, a été stoppée à ce stade car la mise en œuvre de l'essai en continu, complexe au niveau technique, aurait nécessité des moyens budgétaires supérieurs à ceux qui étaient disponibles pour achever le projet.

5. Conclusion générale

Dour la mise en œuvre d'un traitement d'eau polluée par du Cr(VI), il paraissait intéressant de tester une configuration de réacteur combinant le fer 0-valent et l'activité de bactéries sulfato-réductrices. Un essai en continu a été réalisé en 2004, pendant 2 mois, avec une colonne remplie de couches alternées de laine d'acier et de pouzzolane. Ce bioréacteur a fonctionné dans des conditions proches du traitement réel in situ: température 12 °C, milieu très simple constitué d'eau du robinet additionnée de Cr(VI), sulfate de sodium et lactate de sodium. Ce dispositif n'a pas permis d'atteindre un temps de résidence inférieur à 4 h, valeur limite fixée par le cahier des charges. Pour une concentration en Cr(VI) s'élevant à 15 mg/l en entrée de colonne, le temps de résidence minimum qui a pu être appliqué est égal à 10 h. Il semble très probable qu'une réaction directe de l'H₂S avec le fer constituant la laine d'acier a d'une part, amoindri l'efficacité du Fe⁰ vis-à-vis du Cr(VI), et d'autre part, accentué l'effet inhibiteur du Cr(VI) sur les bactéries sulfato-réductrices. Les observations réalisées au microscope électronique suggèrent que le biofilm bactérien ne s'est pas bien développé sur le support, peut-être parce que l'augmentation du débit d'alimentation a été trop rapide.

En 2005, deux nouvelles expériences de traitement du Cr(VI) en continu ont été réalisées, avec des bioréacteurs ne contenant que de la pouzzolane.

Le programme expérimental de la première expérience (février-août 2005) a été établi de façon à optimiser le développement d'un biofilm performant. Au cours de cet essai, il a été possible de traiter, avec du lactate, une eau contenant jusqu'à 7,5 mg/l de Cr(VI) en appliquant un temps de résidence égal à 2,75 h. Les performances de ce dispositif sont donc en accord avec les exigences du cahier des charges en termes de température, de temps de résidence et de concentration en Cr(VI) en sortie de bioréacteur. Notons aussi que la teneur en Cr total dissous (essentiellement Cr(III) non précipité et/ou complexé) ne satisfait pas, *a priori*, le cahier des charges. Un colmatage relativement important du lit de pouzzolane a été constaté en fin d'expérience.

La dernière expérience (septembre-décembre 2005) a été réalisée afin de déterminer la rapidité à laquelle diminue la conductivité hydraulique du bioréacteur, le temps nécessaire pour obtenir un bioréacteur efficace à partir d'un lit de pouzzolane propre, et de tester le HRC© en tant que substrat à la place du lactate. Après 95 jours de fonctionnement, la conductivité hydraulique du bioréacteur n'a pas diminué de façon significative. Le temps nécessaire pour mettre en service un bioréacteur à partir d'un lit de pouzzolane fraîche est compris entre 15 jours et 1 mois. Enfin, les activités bactériennes de sulfato-réduction et de Cr(VI)-réduction semblent moins élevées avec du HRC© seul qu'en présence d'un milieu complet contenant du lactate libre. Il est possible que la vitesse de dissociation du HRC© en lactate libre soit limitante dans un système fonctionnant à faible temps de résidence, tel qu'une porte filtrante étudiée dans le cadre du présent projet. De meilleurs résultats ont été obtenus avec un milieu

de culture plus complet, contenant du HRC© et des nutriments complémentaires (urée et engrais).

Des essais ont été réalisés afin de tester la faisabilité d'une encapsulation du HRC© et/ou d'autres substrats. Ces expériences avaient pour objectif de tester la possibilité de mettre au point un système de distribution passif des substrats en amont, ou à l'intérieur même du bioréacteur. Ces premières expériences n'ont pas donné de résultats très satisfaisants : le HRC© n'est pas retenu de façon efficace par la pouzzolane ou le sable imprégnés de cette substance. Par ailleurs, les essais d'encapsulation du HRC© n'est sans doute pas le substrat le plus adapté pour des traitements en barrières de type panneau-drain, comme l'ont démontré les résultats du dernier essai en bioréacteur. Par ailleurs, l'acidité du HRC© est un obstacle à son encapsulation dans des billes d'alginate. Il sera donc particulièrement intéressant, dans le cadre d'un futur projet, de poursuivre les travaux entrepris pour la mise au point de supports bactériens à diffusion lente de substrats.

Les coûts d'installation d'une porte filtrante pour le traitement du Cr(VI) sont relativement élevés. Ils sont cependant compensés par des coûts d'entretien annuel faibles, en raison d'une maintenance ne nécessitant pas d'évacuation des filtres biologiques usagés qui seront nettoyés et ré-utilisés. Les faibles coûts de maintenance sont aussi en grande partie liés à l'option d'ensemencement naturel du deuxième filtre. Cette option serait cependant à valider en laboratoire. Les conditions d'utilisation des biofiltres sont limitées par le temps de résidence qu'il est nécessaire de respecter pour la précipitation biologique du chrome. Les spécifications de traitement initialement prises en compte dans le cadre du projet BIBA portaient sur des concentrations et des temps de contact correspondant à la borne inférieure considérée dans l'étude technico-économique (solution 2).

Le projet a démontré que les objectifs de traitement, pour le Cr(VI), pouvaient être atteints et que son applicabilité sur site semblait possible au regard de l'évaluation technico-économique.

Pour le traitement biologique du cyanure, des problèmes techniques ont été rencontrés : (1) une instabilité des populations bactériennes au cours des repiquages, (2) la difficulté de maintenir du cyanure libre en solution à un pH compatible avec la croissance des bactéries. Des solutions ont été proposées pour surmonter ces difficultés, afin de pouvoir réaliser des expériences de traitement en continu dans le cadre d'un futur projet. Cependant, le programme expérimental concernant la biodégradation des cyanures a été stoppé à ce stade car la mise en œuvre de l'essai en continu, complexe au niveau technique, aurait nécessité des moyens budgétaires supérieurs à ceux qui étaient disponibles pour achever le projet.

6. Bibliographie

Battaglia-Brunet F., Foucher S., Denamur A. *et al.* (2004) - Chromate reduction at low sulphate concentration in hydrogen-fed bioreactors. *Env. Technol*, 25, p. 101-109.

Blowes D.W., Ptacek C.J. and Jambor J.L. (1997) - In-situ remediation of chromate contaminated groundwater using permeable reactive walls. *Environ. Sci. Technol.,* 31, p. 153-160.

Boucabeille C. (1993) - Biodégradation des cyanures métalliques et du thiocyanate par des cultures bactériennes. Étude d'un effluent minier. Thèse n° 733.

Dennis E. (1998) - Microbial Precipitation of Dissolved Metals Using Molasses. Ground Water Currents. EPA 542-N-98-010) Issue no. 30.

Dictor M.C., Battaglia-Brunet F., Morin D. *et al.* (1997) - Biological treatment of gold ore cyanidation wastewater in fixed bed reactors. *Environmental Pollution*, 97, p. 287-294.

Ebbs S. (2004) - Biological degradation of cyanide compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15, p. 231-236.

Fang Y., Hozalski R.M., Clapp L.W. *et al.* (2002) - Passive dissolution of hydrogen gas into groundwate using hollow_fiber membranes. *Water Research*, 36, p. 3533-3542.

Fude L., Harris B., Urrutia M.M. *et al.* - (1994) - Reduction of Cr(VI) by a consortium of sulphate-reducing bacteria (SRB III). *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, p. 1525-1531.

Henny C., Weathers L.E., Katz L.E., MacRae J.D. (in press) - Abiotic and biotic Cr(VI) reduction in a laboratory-scale permeable reactive barrier. In: Leeson A, Alleman BC, Alvarez PJ, Magar VS (eds). Bioaugmentation, Biobarriers, and Biogeochemistry, Batelle Press, 6, p. 139.

Henny C., Weathers L.J., Katz L.E., MacRea J.D. (in press) - Cr(VI) Reduction and Immobilization under Sulfate Reducing Conditions in the presence of Iron Metal. Water Research.

Hughes J.B., Newell C.J., Fisher R.T. (1997) - Process for in-situ biodegradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by surface hydrogen injection. U.S. Patent 5602296.

Hughes J.B., Newell C.J., Fisher R.T. (1997) - Fact Sheet: Subsurface Hydrogen Injection For the In-situ Bioremediation of Chlorinated Solvents. (U.S. Patent 5602296, Feb. 17, Groundwater Services, Inc.

INERIS (2005-2006) - Fiches des données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, www.ineris.fr

Kim C., Zhou Q.H., Deng B., Thornton E.C. *et al.* (2001) - Chromium(VI) reduction by hydrogen sulfide in aqueous media: stoichiometry and kinetics. *Environ. Sci. Technol.,* 35, p. 2219-2225.

Kjeldsen P. and Fuglsang I.A. (2000) Demonstration program on reactive barrier technologies using zero-valent iron. Proceedings of the 2000 Sixteenth Annual Conference on Contaminated Soils, held at the University of Massachusetts at Amherst. Eds. Paul T. Kostecki, Edward J. Calabrese, and James Dragun. The Association for Environmental Health and Sciences (AEHS), p. 943-950.

Knowles C.J. (1976) - Microorganisms and cyanide. Bacteriol Rev., 40, p. 652–680.

Koenigsberg S.S. (1999) - Hydrogen Release Compound (HRCR): A Novel Technology for the Bioremediation of Chlorinated Hydrocarbons. Proceedings of the 1999 Conference on Hazardous Waste Research.

Koenigsberg S.S., Sandefur C.A. (2000) - The Use of Hydrogen Release Compound for the Accelerated Bioremediation of Anaerobically Degradable Contaminants: The Advent of Time-Release Electron Donors. Remediation J. 10, p. 31-53.

Lovley D.R. and Phillips E.J.P. (1994) - Reduction of chromate by Desulfovibrio vulgaris and its c3 cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, p. 726-728.

Luque-Almagro V.M., Huertas M.-J., Martinez-Luque M. *et al.* (2005) - Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, p. 940-947.

Lupton F.S., De Filippi L.J. and Goodman J.R. (1991) - Bioremediation of chromium (VI) contaminated aqueous systems by sulphate reducing bacteria. US patent n° 5, p. 062, 956.

Michel C., Brugna M., Aubert C. *et al.* (2001) - Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulphate-reducing bacteria. Key role of polyheme cytochromes c and hydrogenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, p. 95-100.

Pattanapipitpaisal A.N., Mabbett A.N., Finlay J.A. *et al.* (2002) - Reduction of Cr(VI) and bioaccumulation of chromium by Gram positive and Gram negative microorganisms not previously exposed to Cr-stress. *Environ. Technol.*, 23, p. 731-747.

Pattanapipitpaisal P., Brown N.L. and Macaskie L.E. (2001) - Chromate reduction by Microbacterium liquefaciens immobilised in polyvinyl alcohol. *Biotechnol. Lett.*, 23, p. 61-65.

Paul C.J. (2001) - Sodium Dithionite Injections Used for Chromium Reduction. Ground Water Currents, U.S. EPA/ 542-N-01-008.

Puls R.W., Paul C. and Powell R.M. (1999) - The application of in-situ permeable reactive (zero-valent iron) barrier technology for the remediation of chromate-contaminated groundwater : a field test. *Appl. Geochem.*, 14, p. 989-1000.

Thornton E.C. and Amomette J.E. (1999) - Hydrogen sulfide gas treatment of Cr(VI)contaminated sediment samples from a plating-waste disposal site: implications for insitu remediation. *Environ. Sci. Technol.*, 33, p. 4096-4101.

Turick C.E., Camp C.E. and Apel W.A. (1997) - Reduction of Cr(6+) to Cr(3+) in a packed-bed bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63-65, p. 871-877.

Turick C.E. and Apel W.A. (1997) - Method for in situ or ex situ bioremediation of hexavalent chromium contaminated soils and/or groundwater. US Patent n° 5, p. 681, 739.

U.S.Environmental Protection Agency (Center for Environmental Research Information) (2000) - In Situ Treatment of Soil and Groundwater Contaminated with Chromium, Technical Resource Guide, EPA 625/R-00/005.

Wang Y.T. and Chirwa E.M.N. (1996) - Bioremediation of chromium by packed-bed bioreactors. In: Proc. of the 28th Mid-Atlantic Ind. and Hazard. Waste Conf., Weber A.S. (ed.), Technomic Publishers, Lancaster, p. 381-388.

Weathers L.J., Parkin G.F., Alvarez P.J. (1997) - Utilization od Cathodic Hydrogen as Electron Donor for Chloroform Cometabolism by a Mixed, Methanogenic Culture. *Environ. Sci. Technol.*, 31, p. 880-885.

Weathers L.J. and coll. - Reduction and immobilization of radionuclides ant toxic metals using combined zero valent iron and anaerobic bacteria. Final report, U.S. Department of Energy. Project number 55071 (9/96-5/01).

Zagury G.J., Oudjehani K., Deschênes L. (2004) - Characterization and availability of cyanide in solid mine tailings from gold extraction plants. *The Science of total Environment*, 320, p. 211-224.

Annexe 1

Solubilité du Cr(III) en solution aqueuse

Le Cr(III) est fortement hydrolysé en solution aqueuse et sa forme prédominante de pH 6,5 à 10,5 est Cr(OH)_{3.} Voici les réactions d'hydrolyse de l'ion Cr(III), Cr^{3+} .

$$Cr^{3+} + H_2O \longrightarrow CrOH^{2+} + H^+$$
 K₁ (1)

$$Cr^{3+} + 2H_2O \longrightarrow Cr(OH)_2^+ + 2H^+$$
 K₂ (2)

$$Cr^{3+} + 3H_2O \longrightarrow Cr(OH)_{3(aq)} + 3H^+ \qquad K_3$$
(3)

$$Cr^{3+} + 4H_2O \longrightarrow Cr(OH)_4^- + 4H^+ \qquad K_4$$
(4)

La concentration de Cr(III) dissous est représentée par le chrome total : Cr_{TOTAL}

$$Cr_{total} = [Cr^{3+}] + [CrOH^{2+}] + [Cr(OH)_{2}^{+}] + [Cr(OH)_{3}] + [Cr(OH)_{4}^{-}]$$
(5)

La réaction de précipitation du chrome s'écrit :

$$Cr^{3+} + 3H_2O \longrightarrow Cr(OH)_{3(s)} + 3H^+ \qquad K_0$$
 (6)

Si on considère les équilibres (1, 2, 3, 4, 5, 6), on obtient l'équation (7) :

$$Cr(III)_{TOTAL} = \frac{[H^+]^3 + K_1[H^+]^2 + K_2[H^+] + K_3 + \frac{K_4}{[H^+]}}{K_0}$$
(7)

Deux valeurs de K_0 , appelées aussi produits de solubilité K_s , ont été trouvées dans la littérature :

- $K_s(Cr(OH)_3) = 6.3.10^{-31}$ [http://chemistry.csudh.edu/oliver/chemdata/data-ksp.htm]
- $K_s(Cr(OH)_3) = 1,0.10^{-30}$ [Charlot G., 1983]

Connaissant également les valeurs des constantes d'hydrolyse K_i [*Hiroishi D., 1998*], présentées dans l'illustration 1, on peut calculer la concentration en Cr(III)_{TOTAL}, et tracer la courbe [Cr(III)_{TOTAL}] = f(pH). (illustration 2).

K ₁	K ₂	K ₃	K ₄
2 10 ⁻⁴	4 10 ⁻¹⁰	5 10 ⁻¹⁷	6 10 ⁻²⁸

Illustration 1 - Constantes d'hydrolyse du Cr(III) à T = 25 °C, selon Hiroishi D. et al. (1998).

On remarque que dans les deux cas, la courbe représente une parabole. La $[Cr(III)_{TOTAL}]$ est environ égale à 2 mg/l, pour un pH allant de 7 à 11.



Illustration 2 - Solubilité de Cr(III) dans l'eau en absence de complexants.

Références

Charlot G. (1983) - Les réactions chimiques en solution aqueuse et caractérisation des ions, Masson 7^e édition refondue, 1983.

Hiroishi D., Matsuura C. and Ishigure K. (1998) - Hydrolysis of chromium(III) ion and solubility of chromium(III) oxide in high temperature water, *Mineralogical Magazine*, vol. 62A, p. 69-70.

Annexe 2

Temps Sejour = F (Cr(VI))

EXTRAPOLATION DES DONNÉES SUR LE TEMPS DE SÉJOUR

L'évaluation du temps de résidence nécessaire au traitement de différentes concentrations en Cr(VI) a été réalisée à partir des données présentées ci-après.



Corrélation concentration Cr(VI) - temps de résidence



Evolution du temps de séjour minimum en fonction de la concentration en Cr(VI) en entrée

Evolution du temps de résidence en fonction de la concentration en Cr(VI)

Les temps de résidence les plus compatibles avec le procédé de portes filtrantes sont de l'ordre de quelques heures. On considère qu'un temps de résidence de 10 h, correspondant au traitement d'une concentration de l'ordre de 60 mg/l, est la limite supérieure envisageable pour une application de type biobarrière en réacteur.

On a donc été retenu deux cas typiques pour procéder au dimensionnement :

- en borne supérieure, celui du traitement d'une concentration de l'ordre de - 60 mg/l nécessitant un temps de résidence de 10 h ;
- en borne inférieure, celui du traitement d'une concentration de l'ordre de 10 mg/l nécessitant un temps de résidence de 4 h.

Annexe 3

Principe de dimensionnement des filtres

Les travaux présentés dans cette annexe ont été réalisés par Soletanche-Bachy.
DÉTERMINATION DE LA TAILLE OPTIMALE DES FILTRES

1 - Principe de dimensionnement des filtres

Le dimensionnement des filtres doit prendre en compte les paramètres suivants :

- Q = débit dans la porte filtrante (m^3/s) ;
- ΔH_m = Perte de charge admissible dans la porte filtrante (m) ;
- T = Temps de résidence minimal dans les filtres.

Cas n° 1 : Porte composée d'un seul filtre



On peut considérer que les pertes de charges dans les canalisations sont négligeables.

On note *k* la conductivité hydraulique du filtre (m/s) et Δ sa porosité.

En appliquant la loi de Darcy, la condition de perte de charge maximale donne :

$$Q = k \cdot \frac{\Delta H_m}{L} \cdot \pi \cdot R^2 \tag{1}$$

Par ailleurs, la condition de temps de résidence minimal donne :

$$T = \frac{L}{v_{r\acute{e}elle}} = \Phi \cdot \frac{L}{v_{Darcy}} = \Phi \cdot \frac{L \cdot \pi \cdot R^2}{Q}$$
(2)



Sur un graphique L = f(R), les solutions des équations (1) et (2) se visualisent de la manière suivante :

Figure 1 - Représentation graphique des équations (1) et (2).

Les longueurs de filtres données par le domaine sous la courbe représentant l'équation (1) engendrent des pertes de charges inférieures à ΔH_m ; elles sont donc solution du problème hydraulique. De même, les longueurs dans le domaine au-dessus de la courbe représentant l'équation (2) induisent des temps de résidence supérieurs à T et sont donc solution du problème de réaction. L'intersection entre les deux domaines nous donne ainsi les solutions des deux contraintes.

Par ailleurs, la partie de la courbe « Equation (2) », se situant à droite du point I (représentée en pointillés rouges), nous donne les solutions du problème correspondant à l'optimum économique. En effet, elle représente la solution du problème qui possède le moins de matériau réactif. En combinant les équations (1) et (2), nous obtenons les coordonnées du point I:

$$L = \sqrt{\frac{T \cdot k \cdot \Delta H_m}{\Phi}}$$
$$R = \sqrt{\frac{Q \cdot T}{\pi \cdot L \cdot \Phi}}$$

(3)

Précisons que plus l'on s'éloigne du point *I* sur la courbe en pointillés rouges, plus on est sécuritaire sur le plan hydraulique. En effet, la perte de charge induite par les points se situant à droite du point *I* est décroissante lorsque l'on s'éloigne de ce dernier. Le choix des dimensions du filtre devra donc se faire judicieusement sur cette courbe en pointillés (à condition d'être sûr du temps de résidence minimum ; pour plus de sécurité vis-à-vis de ce paramètre, on peut prendre un point au-dessus de la courbe en pointillés rouges).

Cas n° 2 : Porte composée de trois filtres en série

Dans le cadre du projet BIBA, il est envisagé de réaliser les portes filtrantes selon la configuration suivante :



Les filtres I et II sont identiques. Au moment de la mise en service du système, le I contiendra de la pouzzolane ensemencée en bactéries et sera le seul filtre alimenté en nutriments. Le filtre II contiendra, quant à lui, uniquement de la pouzzolane. Durant la filtration de l'eau polluée, le filtre II va progressivement se charger en bactéries. Lorsque le I sera saturé, il sera évacué et remplacé par le II, qui contiendra alors des bactéries prêtes à être alimentées en nutriments. Un nouveau filtre de pouzzolane sera alors mis à la place du filtre II.

Comme ils sont interchangeables, les pertes de charges et les temps de résidence dans les filtres I et II sont identiques ($\Delta H_1 = \Delta H_2$ et $T_1 = T_2$). De plus, les porosités et conductivités hydrauliques sont les mêmes ($k_1 = k_2$ et $\Delta_1 = \Delta_2$).

Par ailleurs, en négligeant les pertes de charge dans les canalisations, nous pouvons écrire :

$$2 \cdot \Delta H_1 + \Delta H_3 = \Delta H_m \tag{4}$$

Pour dimensionner les filtres, nous pouvons faire varier ΔH_1 entre 0 et $0.5^*\Delta H_m$ et trouver toutes les solutions (L₁, R₁, L₃, R₃).

Ces solutions peuvent alors être représentées sur deux graphiques $L_1 = f(R_1)$ et $L_2 = f(R_2)$ similaires à celui du cas n° 1. Les équations à prendre en compte sont alors :

$$Q = k_1 \cdot \frac{\Delta H_1}{L_1} \cdot \pi \cdot R_1^2 \qquad \qquad Q = k_3 \cdot \frac{(\Delta H_m - 2 \cdot \Delta H_1)}{L_3} \cdot \pi \cdot R_3^2$$

$$T_1 = \Phi_1 \frac{L_1 \cdot \pi \cdot R_1^2}{Q} \qquad \qquad T_3 = \Phi_3 \frac{L_3 \cdot \pi \cdot R_3^2}{Q}$$
(5)

L'ensemble des intersections entre les courbes est représenté par les couples suivants :

$$L_{1} = \sqrt{\frac{T_{1} \cdot k_{1} \cdot \Delta H_{1}}{\Phi_{1}}} \quad \text{et} \quad L_{3} = \sqrt{\frac{T_{3} \cdot k_{3} \cdot (\Delta H_{m} - 2\Delta H_{1})}{\Phi_{3}}} \quad (6)$$

$$R_{1} = \sqrt{\frac{Q \cdot T_{1}}{\pi \cdot L_{1} \cdot \Phi_{1}}} \quad R_{3} = \sqrt{\frac{Q \cdot T_{3}}{\pi \cdot L_{3} \cdot \Phi_{3}}}$$

Deux fichiers EXCEL ont donc été réalisés de manière à dimensionner les filtres de BPR. Le premier « dimension 1 filtre.xls » permet de représenter le domaine des solutions et les coordonnées du point d'intersection des deux courbes (équations (1) et (2)) en fonction des conditions de débit, de temps de résidence et des caractéristiques du matériau filtrant.

L'image ci-après représente une capture d'écran du fichier « dimension 1 filtre.xls ». L'ensemble des solutions du problème est représenté par le domaine hachuré en rouge.



Le second fichier « dimension 3 filtres.xls » permet de dimensionner les portes selon le procédé envisagé dans BIBA. La première feuille donne les coordonnées du point *I* pour une perte de charge dans le premier filtre ΔH_1 que l'on choisit arbitrairement entre 0 et $0.5^*\Delta H_m$. Pour cela, il suffit de tracer une ligne verticale et de lire les valeurs L₁, L₃ sur l'axe de gauche et R₁, R₃ sur celui de droite. Cette démarche nous donne le rayon minimal de chaque filtre et la longueur maximale si l'on souhaite rester sur la courbe de l'optimum économique (Pointillés rouges sur la figure 1). On pourra ensuite affiner le choix des dimensions en utilisant la feuille 2.



La deuxième feuille nous permet de représenter les domaines solutions pour un ΔH_1 fixé arbitrairement (cette valeur peut varier à l'aide du curseur sur la feuille 2). Nous pouvons alors choisir les couples (longueur, rayon) dans les domaines hachurés en rouge, sachant que l'optimum économique se situe sur la frontière inférieure. Les autres points consomment plus de matériau réactif mais permettent, en augmentant le temps de résidence, de s'affranchir de certaines incertitudes relatives à ce dernier.



2 - Dimensionnement des filtres BIBA

Les résultats pour les deux cas typiques retenus sont montrés dans les deux tableaux ci-après.

Les deux solutions ont été étudiées pour des débits de 300 l/h et des pertes de charges admissibles sur l'ensemble de la porte de 30 cm et un temps de contact sur le post-filtre de 1 h.

La solution 1 (Figure 43) correspond au temps de résidence de 10 h pour le traitement d'une concentration d'entrée de 50 mg/l.



Figure 43 - Solution 1 - Principe de dimensionnement des filtres.



Figure 44 - Solution 1 - Sélection de la taille des filtres.

Les dimensions optimales suivantes ont été déterminées (Figure 44) :

- filtres biologiques : longueur 5 m, rayon 0,80 m ;
- filtre post traitement : longueur 2 m, rayon 0,38 m.

La solution 2 (Figure 45) correspond au temps de résidence de 4 h pour le traitement d'une concentration d'entrée de 10 mg/l.



Figure 45 - Solution 2 - Principe de dimensionnement des filtres.



Figure 46 - Solution 2 - Sélection de la taille des filtres.

Les dimensions optimales suivantes ont été sélectionnées (Figure 46) :

- filtres biologiques : longueur 2,5 m, rayon 0,70 m ;
- filtre post traitement : longueur 2 m, rayon 0,38 m.

Annexe 4

Préparation de l'Inoculum

Évaluation technico-économique du procédé BIBA-Cr (sans valeur commerciale, ni contractuelle)

Préparation de l'inoculum

Géométrie du filtre n° 1 : rayon 0,7 m, longueur 2,5 m (solution 2)

Volume de filtre : 3 848 litres.

Volume occupé par la pouzzolane = 0,33 x 3 848 = 1 270 litres.

Volume utile du filtre : 25 78 litres.

• Option 1 : inoculation du filtre Soletanche-Bachy au BRGM (Halle biotechnologies)

Volume utile d'une cartouche Soletanche-Bachy : 2 578 litres.

- Activation d'une culture. Une culture conservée au réfrigérateur est utilisée pour inoculer 100 ml de milieu riche (Starkey). La culture est incubée 2 semaines à 30 °C.
- Préparation de 2 litre de culture. La culture active préparée en (1) est utilisée pour inoculer 2 bouteilles contenant chacune 1 litre de milieu riche, ensuite incubées à 30 °C pendant 4 jours.
- 3. *Préparation de 25 litres de culture*. Le litre de culture est utilisé pour inoculer 5 bouteilles de 5 litres contenant du milieu riche, ensuite incubées à 30 °C.
- Inoculation d'un réacteur de 250 litres. Les 25 litres de cultures sont utilisés pour inoculer un réacteur de 250 litres contenant du milieu riche, ensuite incubé à température ambiante pendant 10 jours.
- Inoculation de la colonne. La colonne de 2 578 I de Soletanche-Bachy est transportée dans la halle Biotechnologies du BRGM, équipée de pompes et de sondes pH/Eh, remplie de pouzzolane et de milieu riche, inoculée avec les 250 litres de culture préparés en (4).
- Suivi du développement de l'activité dans la colonne. L'évolution des paramètres dans la colonne est suivie par un mode d'alimentation en fed-batch, puis en continu avec un milieu simplifié (milieu utilisé pour l'expérience de févrieraoût 2005).

7. Transport sur site et vérification de l'activité. Lorsque la sulfato-réduction est bien active, la colonne est transportée sur site. Elle est d'abord alimentée avec de l'eau du site récupérée par pompage « on-site », puis installée dans la barrière. Les performances du biofiltre sont vérifiées par un suivi des eaux en entrée et sortie (sulfate, pH, potentiel redox, Cr(VI)) pendant quelques jours.

Estimation du coût et de la durée de l'opération (valeurs minimales si aucun problème technique ne retarde les opérations)

	durée	Coût personnel K€	Frais de missions + consommable K€
Tâche 1	15 jours	0,6	
Tâche 2	4 jours	0,7	
Tâche 3	4 jours	0,7	
Tâche 4	10 jours	2,7	2,5
Tâche 5	2 jours	4	1
Tâche 6	21 jours	14	0,5
Tâche 7	4 jours	5	2
Total	60 jours	27,7	6

• Option 2 : inoculation du filtre Soletanche-Bachy in situ

- Activation d'une culture. Une culture conservée au réfrigérateur est utilisée pour inoculer 100 ml de milieu riche (Starkey). La culture est incubée 2 semaines à 30 °C.
- Préparation de 2 litres de culture. La culture active préparée en (1) est utilisée pour inoculer 2 bouteilles contenant chacune 1 litre de milieu riche, ensuite incubées à 30 °C pendant 4 jours.
- Préparation de 25 litres de culture. Le litre de culture est utilisé pour inoculer 2 bouteilles de 5 litres contenant du milieu riche, ensuite incubées à 30 °C.
- **4.** *Inoculation d'un réacteur de 250 litres*. Les 25 litres de cultures sont utilisés pour inoculer un réacteur de 250 litres contenant du milieu riche, ensuite incubé à température ambiante pendant 10 jours.

- 5. Inoculation de la colonne de 2 578 litres in situ. La colonne de 2578 l de Soletanche-Bachy est équipée de pompes et de sondes pH/Eh, remplie de pouzzolane, remplie de milieu riche, placée dans la barrière. Les 100 litres de culture préparés en (4) sont injectés en 3 points dans la colonne. Ensuite, l'injection de nutriments et de lactate en 3 points est mise en route. Le lactate sera injecté en excès pendant la période de mise en place de l'activité.
- 6. Suivi du développement de l'activité dans la colonne sur site. Les performances du biofiltre sont vérifiées par un suivi des eaux en entrée et sortie (sulfate, pH, potentiel redox, Cr(VI)) pendant 3 semaines. Le débit de lactate est progressivement diminué lorsque la sulfato-réduction est bien active.

Estimation du coût et de la durée de l'opération (valeurs minimales si aucun problème technique ne retarde les opérations)

	durée	Coût personnel	Frais de missions + consommable
Tâche 1	15 jours	0,6	
Tâche 2	4 jours	0,7	
Tâche 3	4 jours	0,7	
Tâche 4	10 jours	2,7	2,5
Tâche 5	2 jours	3	1,5
Tâche 6	21 jours	10,5	2,5
Total	56 jours	18,2	6,5

L'option 2 est moins coûteuse que l'option 1, mais est plus risquée du point de vue technique. Le risque pourrait être réduit si on pouvait maîtriser le débit circulant dans la cartouche Bio pendant la phase de développement de l'activité bactérienne (par pompage ?).

Géométrie du filtre n° 2 : rayon 0,8 m, longueur 5 m (solution 1)

Volume de filtre : 10 053 litres.

Volume occupé par la pouzzolane = 0,33 x 10 053 = 3 317 litres.

Volume utile du filtre : 6 735 litres.

• Option 1 : inoculation du filtre Soletanche-Bachy au BRGM (Halle biotechnologies)

Volume utile d'une cartouche Soletanche-Bachy : 6 735 litres.

- Activation d'une culture. Une culture conservée au réfrigérateur est utilisée pour inoculer 500 ml de milieu riche (Starkey). La culture est incubée 2 semaines à 30 °C.
- Préparation de 7 litres de culture. La culture active préparée en (1) est utilisée pour inoculer 7 bouteilles contenant chacune 1 litre de milieu riche, ensuite incubées à 30 °C pendant 4 jours.
- Préparation de 70 litres de culture. Les 2 litres de culture sont utilisés pour inoculer un réacteur de 70 litres contenant du milieu riche, ensuite incubées à 30 °C.
- 4. Inoculation d'un réacteur de 700 litres. Les 20 litres de cultures sont utilisés pour inoculer un réacteur de 700 litres contenant du milieu riche, ensuite incubé à température ambiante pendant 10 jours.
- **5.** *Inoculation de la colonne.* La colonne de 6 735 l de Soletanche-Bachy est transportée dans la halle Biotechnologies du BRGM, équipée de pompes et de sondes pH/Eh, remplie de pouzzolane et de milieu riche, inoculée avec les 700 litres de culture préparés en (4).
- 6. Suivi du développement de l'activité dans la colonne. L'évolution des paramètres dans la colonne est suivie par un mode d'alimentation en fed-batch, puis en continu avec un milieu simplifié (milieu utilisé pour l'expérience de février-août 2005).
- 7. Transport sur site et vérification de l'activité. Lorsque la sulfato-réduction est bien active, la colonne est transportée sur site. Elle est d'abord alimentée avec de l'eau du site récupérée par pompage « on-site », puis installée dans la barrière. Les performances du biofiltre sont vérifiées par un suivi des eaux en entrée et sortie (sulfate, pH, potentiel redox, Cr(VI)) pendant quelques jours.

Estimation du coût et de la durée de l'opération (valeurs minimales si aucun problème technique ne retarde les opérations)

	durée	Coût personnel K€	Frais de missions + consommable K€
Tâche 1	15 jours	0,6	
Tâche 2	4 jours	0,7	
Tâche 3	4 jours	1,4	1
Tâche 4	10 jours	3,4	3
Tâche 5	2 jours	4	3
Tâche 6	21 jours	14	0,5
Tâche 7	4 jours	5	2
Total	60 jours	29,1	9,5

• Option 2 : inoculation du filtre Soletanche-Bachy in situ

- Activation d'une culture. Une culture conservée au réfrigérateur est utilisée pour inoculer 500 ml de milieu riche (Starkey). La culture est incubée 2 semaines à 30 °C.
- Préparation de 2 litres de culture. La culture active préparée en (1) est utilisée pour inoculer 7 bouteilles contenant chacune 1 litre de milieu riche, ensuite incubées à 30 °C pendant 4 jours.
- 3. Préparation de 70 litres de culture. Les 7 litres de culture sont utilisés pour inoculer un réacteur de 70 litres contenant du milieu riche, ensuite incubées à 30 °C.
- 4. Inoculation d'un réacteur de 700 litres. Les 70 litres de cultures sont utilisés pour inoculer un réacteur de 700 litres contenant du milieu riche, ensuite incubé à température ambiante pendant 10 jours.
- 5. Inoculation de la colonne de 6 735 litres in situ. La colonne de 6 735 l de Soletanche-Bachy est équipée de pompes et de sondes pH/Eh, remplie de pouzzolane, remplie de milieu riche, placée dans la barrière. Les 700 litres de culture préparés en (4) sont injectés en 3 points dans la colonne. Ensuite,

l'injection de nutriments et de lactate en 3 points est mise en route. Le lactate sera injecté en excès pendant la période de mise en place de l'activité.

6. Suivi du développement de l'activité dans la colonne sur site. Les performances du biofiltre sont vérifiées par un suivi des eaux en entrée et sortie (sulfate, pH, potentiel redox, Cr(VI)) pendant 3 semaines. Le débit de lactate est progressivement diminué lorsque la sulfato-réduction est bien active.

Estimation du coût et de la durée de l'opération (valeurs minimales si aucun problème technique ne retarde les opérations)

	durée	Coût personnel	Frais de missions + consommable
Tâche 1	15 jours	0,6	
Tâche 2	4 jours	0,7	
Tâche 3	4 jours	1,4	1
Tâche 4	10 jours	3,4	3
Tâche 5	2 jours	4	3
Tâche 6	21 jours	10,5	2,5
Total	56 jours	20,6	9,5

L'option 2 est moins coûteuse que l'option 1, mais est plus risquée du point de vue technique. Le risque pourrait être réduit si on pouvait maîtriser le débit circulant dans la cartouche Bio pendant la phase de développement de l'activité bactérienne (par pompage ?).



Centre scientifique et technique Service environnement et procédés industriels 3, avenue Claude-Guillemin BP 36009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 02 38 64 34 34