



# Prévention et réduction des phénomènes de colmatage par modification de l'interface

Rapport final

**BRGM/RP-56939-FR**

Décembre 2008

Étude réalisée dans le cadre du projet  
ANR 2006 ECOPLUIES

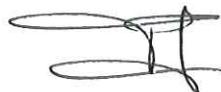
**Alain Seron, Marie-Christine Dictor, Blandine Clozel**  
**BRGM, Service EPI/ECO, Orléans, SGR-RHA, Lyon**  
**Florian Mermillod-Blondin**  
**Université Lyon I, (HBES)**

**Vérificateur :**

Nom : F. GARRIDO

Date : 05/01/2009

Signature :



**Approbateur :**

Nom : H. GABORIAU

Date : 05/02/2009

Signature :



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

**Mots clés** :Biofilms, matériaux, bassin d'infiltration, colmatage

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante : A. Seron, M.C. Dictor, B. Clozel, F. Mermillod-Blondin (2008) : Projet ANR-ECOPLUIES – Prévention et réduction des phénomènes de colmatage par modification de l'interface. Rapport BRGM RP 56939 FR.

# Synthèse

Les recherches sur les rejets urbains en temps de pluie ont montré que les particules en suspension constituent le principal vecteur des polluants (métaux lourds, nutriments et hydrocarbures). Ces sédiments se retrouvent en partie dans les bassins de décantation et infiltration en eaux pluviales où ils vont conduire à deux phénomènes : (1) un colmatage des systèmes d'infiltration par effet mécanique et (2) une pollution des systèmes d'infiltration pouvant conduire en une altération de la qualité des nappes phréatiques sous-jacentes.

L'objectif de la tâche A5 est d'étudier différents moyens de réduction des phénomènes de colmatage à l'interface des ouvrages d'infiltration. Pour cela deux voies sont abordées :

- L'utilisation de **barrières filtrantes** à l'interface des ouvrages d'infiltration afin de piéger les pollutions particulières et de limiter le développement de la biomasse et des films bactériens
- L'utilisation **d'organismes invertébrés** qui pourraient par leurs activités (création de galeries et de tubes, interaction avec le biofilm microbien) maintenir une bonne conductivité hydraulique dans les systèmes d'infiltration.

Dans un premier temps, une étude bibliographique a été réalisée afin de déterminer les caractéristiques physico-chimiques des matériaux susceptibles d'être mis en place à l'interface sol/eaux pluviales dans le bassin d'infiltration du site de Django Reinhardt.

Huit matériaux ont été sélectionnés, sur la base de leur capacité potentielle à limiter ou à favoriser le développement de la biomasse, pour leur mise en œuvre dans des essais en batch. Il s'agit de calcaire, feldspath, granite, pouzzolane, quartz, sable, zéolite et de déchets de verre. Par ailleurs, le sol naturel du bassin Django Reinhardt constitué de fluvioglaciaire a été sélectionné pour constituer le point référence. Lors des essais menés en batch, pendant lesquels des matériaux sélectionnés ont été mis en contact avec l'eau prélevée en entrée du bassin d'infiltration, des dénombrements bactériens ont été réalisés.

Les résultats préliminaires, obtenus suite aux essais en batch, montrent clairement qu'il est possible d'influer de façon marquée sur le développement de la biomasse en modifiant la nature du substrat minéral utilisé. Les dénombrements bactériens réalisés ont permis de montrer que le sol naturel du bassin (fluvioglaciaire) est un substrat particulièrement favorable au développement de la biomasse. Suite à ces essais, un classement en quatre groupes des solides étudiés a pu être réalisé. La zéolite semble comme le sol naturel du bassin très favorable au développement de la biomasse en raison de la libération par celle-ci d'éléments minéraux constituant des sources potentielles de nutriments pour les bactéries. Le groupe 2 est composé par le granite et le feldspath alors que le groupe 3 regroupe la pouzzolane, le quartz, le calcaire ainsi que le sable. Enfin, les déchets de verre représentent la meilleure solution pour limiter

le développement de la biomasse et probablement le colmatage des bassins d'infiltration.

A l'issue de ces expériences préliminaires, trois matériaux (sable roulé, verre, calcaire) ont été sélectionnés pour une étude en conditions dynamiques en colonnes à percolation.

Contrairement à ceux obtenus lors des essais en batch, les résultats relatifs aux essais en colonnes avec un lit drainant, marbre ou sable, placé au dessus du sol de référence, alimentées de façon continue ou discontinue avec de l'eau pluviale ne mettent pas évidence un colmatage des colonnes. Ce comportement est probablement consécutif à la rétention physique des MES sur toute la hauteur du lit de matériau granulaire qui ne se retrouvent pas en quantité suffisante à l'interface matériau granulaire/fluvioglaciaire pour provoquer un colmatage. Par ailleurs, le suivi du nombre de bactéries fixées sur les matériaux à l'interface eau/matériau apparaît constant au cours du temps de même que la quantité d'EPS glucidique et protéique qui sont présents en très faible quantité.

Le granulats de verre qui a présenté, lors des essais en batch, un fort pouvoir de limitation du développement de la biomasse n'a pas confirmé ce comportement lors des essais en colonne. Cette forte différence de comportement du verre entre les deux types d'essais révèle clairement l'importance que peut revêtir le paramètre « rugosité de surface » dans le développement de la biomasse fixée sur solide. En effet, les deux échantillons de verre utilisés différaient en cela que le granulats mis en place dans les colonnes avait subi un traitement mécanique, en vue de limiter son caractère coupant, qui a conduit au développement d'une rugosité de surface.

Les résultats présentés dans le livrable D-A12-1 (non présentés dans ce rapport) concernant le rôle des vers tubificidés sur les phénomènes de colmatage ont montré clairement l'importance des caractéristiques physiques des sédiments urbains sur l'action des vers. Dans le cas des sédiments collectés sur le bassin d'infiltration de l'IUT, les vers produisent de denses réseaux de galeries qui agissent comme des drains à travers la couche colmatée, augmentant du même coup la perméabilité du système (plus de détails sur l'action des vers sont donnés dans Nogaro et al. 2006). Toutefois, les mêmes résultats n'ont pas été observés sur les sédiments collectés sur le bassin de Django-Reinhardt. Il semble que la taille très fine des particules contenues dans les sédiments de Django-Reinhardt limite l'action des vers en créant une couche que les oligochètes ne peuvent traverser. En conséquence, les caractéristiques physiques des sédiments urbains sont importantes afin d'estimer les flux de polluants mais aussi le rôle potentiel des vers tubificidés dans les systèmes d'infiltration. L'absence de résultats de décolmatage par les vers sur le site pilote du projet Ecopluies (Django-Reinhardt) indique qu'il est difficilement envisageable d'utiliser l'action de ces organismes afin de réduire les phénomènes de colmatage dans les bassins d'infiltration.

---

**PRECODD** - Programme ECOtechnologies et Développement Durable



## Programme ECOPLUIES

Techniques alternatives de traitement des eaux pluviales et de leurs sous-produits : vers la maîtrise du fonctionnement des ouvrages d'infiltration urbains

Projet ANR-05-ECOT-006

---

### Délivrable D-A12-2

Prévention et réduction des phénomènes de colmatage par modification de l'interface

Responsable du rendu :

Alain Seron, Marie-Christine Dictor, Blandine Clozel  
BRGM, Service EPI/ECO, Orléans, SGR-RHA, Lyon  
Florian Mermillod-Blondin  
Université Lyon I,  
Laboratoire d'Ecologie des écosystèmes fluviaux (HBES)

**5 décembre 2008**

# SOMMAIRE

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUCTION.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2</b> | <b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>   | <b>4</b>  |
| 2.1      | FORMATION DES BIOFILMS.....   | 4         |
| 2.1.1    | <i>La formation du film conditionnant.....</i>                              | 4         |
| 2.1.2    | <i>Le transport des microorganismes.....</i>                                | 4         |
| 2.1.3    | <i>L'adhésion.....</i>  | 4         |
| 2.1.4    | <i>La colonisation du support.....</i>                                      | 5         |
| 2.2      | FACTEURS INFLUENÇANT LA FORMATION DU BIOFILM.....                           | 6         |
| 2.2.1    | <i>Effet du substratum.....</i>   | 6         |
| 2.2.2    | <i>Effet du pH.....</i>   | 9         |
| 2.2.3    | <i>Bilan des critères de sélection des matériaux à mettre en œuvre.....</i> | 9         |
| 2.3      | PREVENTION DES PHENOMENES DE COLMATAGE.....                                 | 10        |
| 2.3.1    | <i>Prévention des biofilms.....</i>   | 11        |
| 2.3.2    | <i>Prévention des phénomènes de colmatage dus aux MES.....</i>              | 11        |
| <b>3</b> | <b>PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>  | <b>13</b> |
| 3.1      | MATERIEL ET METHODES.....   | 13        |
| 3.1.1    | <i>Matériaux.....</i>   | 13        |
| 3.1.2    | <i>Protocole expérimental, essais en batch.....</i>                         | 13        |
| 3.1.3    | <i>Protocole expérimental, essais en colonnes.....</i>                      | 14        |
| 3.1.4    | <i>Dénombrements bactériens.....</i>  | 17        |
| 3.1.5    | <i>Analyses des EPS.....</i>  | 18        |
| 3.1.6    | <i>Mesure des MES libres.....</i>   | 18        |
| 3.1.7    | <i>Analyses physico-chimiques des matériaux.....</i>                        | 19        |
| 3.2      | RESULTATS.....  | 19        |
| 3.2.1    | <i>Caractérisation des matériaux sélectionnés.....</i>                      | 19        |
| 3.2.2    | <i>Essais préliminaires en batch.....</i>                                   | 23        |
| 3.2.3    | <i>Essais par percolation en colonnes.....</i>                              | 25        |
| 3.3      | DISCUSSION – CONCLUSION.....  | 34        |
| 3.4      | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....  | 37        |
| <b>4</b> | <b>ANNEXE.....</b>  | <b>38</b> |

## 1 Introduction

Les recherches sur les rejets urbains en temps de pluie ont montré que les particules en suspension constituent le principal vecteur des polluants (métaux lourds, nutriments et hydrocarbures). Ces sédiments se retrouvent en partie dans les bassins de décantation et infiltration en eaux pluviales où ils vont conduire à deux phénomènes : (1) un colmatage des systèmes d'infiltration par effet mécanique et (2) une pollution des systèmes d'infiltration pouvant conduire en une altération de la qualité des nappes phréatiques sous-jacentes.

L'objectif de la tâche A5 est d'étudier différents moyens de réduction des phénomènes de colmatage à l'interface des ouvrages d'infiltration. Pour cela deux voies sont abordées :

- L'utilisation de **barrières filtrantes** à l'interface des ouvrages d'infiltration afin de piéger les pollutions particulaires et de limiter le développement de la biomasse et des films bactériens
- L'utilisation d'**organismes invertébrés** qui pourraient par leurs activités (création de galeries et de tubes, interaction avec le biofilm microbien) maintenir une bonne conductivité hydraulique dans les systèmes d'infiltration.

Pour cela, une étude bibliographique a été réalisée afin de déterminer les caractéristiques physico-chimiques des matériaux susceptibles d'être mis en place à l'interface sol/eaux pluviales dans le bassin d'infiltration du site de Django Reinhardt. La capacité d'une dizaine de matériaux, à favoriser ou non la formation d'un biofilm bactérien, est étudiée en condition batch par mise en contact des matériaux et de l'eau prélevée en entrée du bassin d'infiltration.

A l'issue de ces premières expériences, trois matériaux ont été sélectionnés pour une étude en conditions dynamiques en colonnes à percolation durant la dernière année du projet (2008).

Par ailleurs, les travaux menés dans le cadre de l'OTHU depuis 5 ans ont démontré que plusieurs groupes d'invertébrés peuvent pulluler dans les systèmes de collecte en eaux pluviales (vers tubificidés, larves de chironomes, micro-crustacés). Toutefois, le rôle de la faune sur le phénomène de colmatage et ses conséquences sur les flux de polluants n'a été abordé que très récemment (Nogaro et al. 2006). Cette action de recherche avait pour but de définir la potentialité de vers tubificidés à décolmater des systèmes expérimentaux simulant un lit d'infiltration impacté par des sédiments urbains. Dans un but de généralisation de nos résultats, nous avons utilisé deux types de sédiments urbains (issus de deux bassins d'infiltration recevant des rejets différents – bassin de Django Reinhardt en zone industrielle et bassin de l'IUT en zone pavillonnaire).

Dans les systèmes expérimentaux, la mesure de la conductivité hydraulique (perméabilité) ainsi que plusieurs analyses physico-chimiques (oxygène dissous, nitrate, métaux lourds – Pb, Zn, Cu, Cd- et hydrocarbures aromatiques polycycliques) ont été réalisées pour déterminer si une modification de la perméabilité des sédiments par les vers pouvait induire une modification des processus biogéochimiques et un relargage de polluants.

Les résultats présentés dans le livrable D-A12-1 concernant le rôle des vers tubificidés sur les phénomènes de colmatage ont montré clairement l'importance des caractéristiques physiques des sédiments urbains sur l'action des vers. Dans le cas des sédiments collectés sur le bassin d'infiltration de l'IUT, les vers produisent de denses réseaux de galeries qui agissent comme des drains à travers la couche colmatée, augmentant du même coup la perméabilité du système (plus de détails sur l'action des vers sont donnés dans Nogaro et al. 2006). Toutefois, les mêmes résultats n'ont pas été observés sur les sédiments collectés sur le bassin de Django-Reinhardt. Il semble que la taille très fine des particules contenues dans

les sédiments de Django-Reinhardt limite l'action des vers en créant une couche que les oligochètes ne peuvent traverser. En conséquence, les caractéristiques physiques des sédiments urbains sont importantes afin d'estimer les flux de polluants mais aussi le rôle potentiel des vers tubificidés dans les systèmes d'infiltration. L'absence de résultats de décolmatage par les vers sur le site pilote du projet Ecopluiés (Django-Reinhardt) indique qu'il est difficilement envisageable d'utiliser l'action de ces organismes afin de réduire les phénomènes de colmatage dans les bassins d'infiltration.

Ce livrable résume les travaux menés sur l'utilisation d'une barrière filtrante (BRGM) pour limiter les phénomènes de colmatage (l'ensemble des résultats concernant le rôle des vers tubificidés ayant été présenté dans le livrable D-A12-1).

## 2 Etude bibliographique

### 2.1 Formation des biofilms

Un biofilm est un assemblage de cellules microbiennes associées à une surface et emprisonnées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) (Donlan, 2002). La formation d'un biofilm peut se décrire en 4 étapes qui sont : (i) la formation du biofilm conditionnant, (ii) le transport des micro-organismes, (iii) l'adhésion, (iv) la colonisation du support. Une fois le biofilm établi, il faut ajouter les étapes de détachement de matière du biofilm, l'adhésion de nouvelles cellules et le dépôt de particules (Bourion, 2000).

#### 2.1.1 *La formation du film conditionnant*

Une surface placée dans une solution de molécules organiques, ou non, d'origine diverse est modifiée par l'adsorption spontanée de ces dernières diminuant son énergie libre. Du matériel non cellulaire, comme des minéraux cristallisés, des particules organiques, des particules minérales (argiles, limons,...), dépendant du milieu environnant dans lequel va se développer le biofilm, est aussi présent dans la matrice (Donlan, 2002).

#### 2.1.2 *Le transport des microorganismes*

Le transport des microorganismes jusqu'à la surface du support est lié à différents mécanismes tels que la sédimentation, la diffusion, la convection (régime turbulent du fluide), le mouvement propre de certains microorganismes mobiles ou par chimiotactisme.

#### 2.1.3 *L'adhésion*

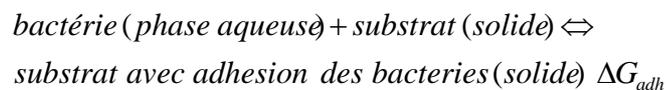
L'adhésion met en jeu des interactions physico-chimiques entre les surfaces du matériau, celles de la bactérie et du milieu environnant. L'adhésion est généralement réalisée en 2 étapes :

- Une **adhésion réversible** : Les microorganismes en suspension sont transportés suffisamment près de la surface pour pouvoir y être adsorbés. Les bactéries peuvent être détachées de leur support par des forces de cisaillement modérées, ... et ont, par ailleurs, encore leur mouvement propre (brownien).
- Une **adhésion irréversible** : Celle-ci n'intervient qu'après un certain temps de latence après lequel les bactéries adhèrent irréversiblement au support avec la production d'EPS.

- Les interactions physico-chimiques sont plus ou moins favorables à l'adhésion, qui existe lorsque la variation d'énergie libre d'interaction entre le microorganisme et la surface est négative.

L'adhésion bactérienne sur les surfaces solides consiste en un mécanisme en deux étapes : (i) une **interaction initiale non spécifique** décrite par la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) avec des interactions électrostatiques répulsives et l'attraction des forces de London - van der Waals suivie (ii) **d'une interaction spécifique** à courte distance.

L'adhésion bactérienne sur des surfaces abiotiques est régie par les variations, dans le système, de l'énergie Gibbs et décrite par la réaction suivante/mécanisme suivant,):



Où  $\Delta G_{adh}$  est la variation d'énergie de Gibbs lorsque les bactéries s'adsorbent sur le substrat à partir de la phase aqueuse. L'adhésion bactérienne est favorable si  $\Delta G_{adh}$  est négative et défavorable si celle-ci est positive (Chen et Zhu, 2005). D'un point de vue thermodynamique, une souche bactérienne sera hydrophile si la variation d'énergie libre entre les bactéries et le substrat immergé dans un liquide (L) ( $\Delta G_{BLB}$ ) est positive et hydrophobe si le  $\Delta G_{BLB} < 0$ .

$$\Delta G_{BLB} = -2\gamma_{BLB}$$

Avec  $\gamma_{BL}$  représentant les tensions de surface interfaciale et  $\Delta G_{BLB}$  étant la variation d'énergie libre entre les bactéries (B) et le substrat immergé dans un liquide (L).

#### 2.1.4 La colonisation du support

Cette phase dépend du métabolisme microbien et correspond à la croissance des microorganismes. Les **polysaccharides** produits peuvent former un feutrage visqueux très hydraté appelée matrice polymérique et peut représenter 50 à 90 % du carbone organique d'une biofilm et 75 à 95 % de son volume (Bourion, 2000).

Les **polymères extracellulaires** jouent un rôle important dans l'établissement et le maintien des biofilms. Ces exopolymères sont composés de polysaccharides, de protéines, de glycoprotéines, de lipopolysaccharides (LPS), de lipides... Les LPS bactériens (LPS), les capsules et les couches de mucus polymériques (slime) contrôlent les interactions entre les surfaces biotiques et abiotiques (Azeredo et Oliviera, 2003). Les polysaccharides constituent les composants principaux des EPS mais les biofilms formés dans les eaux usées et les boues activées méthanogéniques sont prédominant sur les EPS (Moran et Ljungh, 2003).

Les **polysaccharides** sont en majorité **polyanioniques** du fait de la présence de groupements d'acide uronique, certains sont neutres et une faible quantité est polycationique avec des groupements d'amino-sucres (Moran et Ljungh, 2003). Les protéines extracellulaires dans les biofilms contribuent aux propriétés anioniques des EPS avec les groupements basiques des acides aminés.

Les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire ont une influence sur la formation de biofilms. Lorsque les surfaces bactériennes deviennent hydrophobes, l'adhésion cellulaire est augmentée ainsi que leur capacité à l'agrégation (Liu et al., 2003).

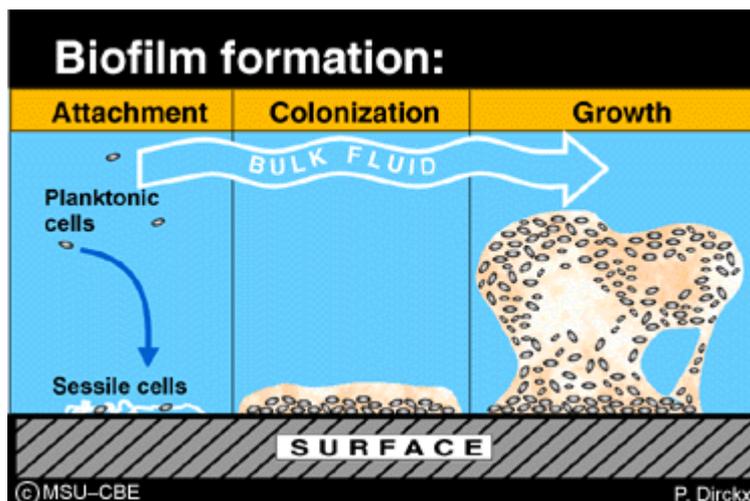


Illustration 1 : Mécanisme de formation des biofilms (d'après P. Dirckx)

## 2.2 Facteurs influençant la formation du biofilm

### 2.2.1 Effet du substratum

La surface des solides, de part ses différentes caractéristiques physico-chimiques, peut influencer sur la biomasse en favorisant ou en limitant la formation du biofilm (Donlan, 2002). Ainsi, la **colonisation du support augmente avec la rugosité du support**. Les forces de cisaillement sont plus faibles et la surface de contact est supérieure sur des surfaces rugueuses. De plus, l'attachement des microorganismes est plus rapide sur des surfaces hydrophobes, non polaires comme le Téflon et autres plastiques que sur des matériaux hydrophiles tels que le verre ou les métaux.

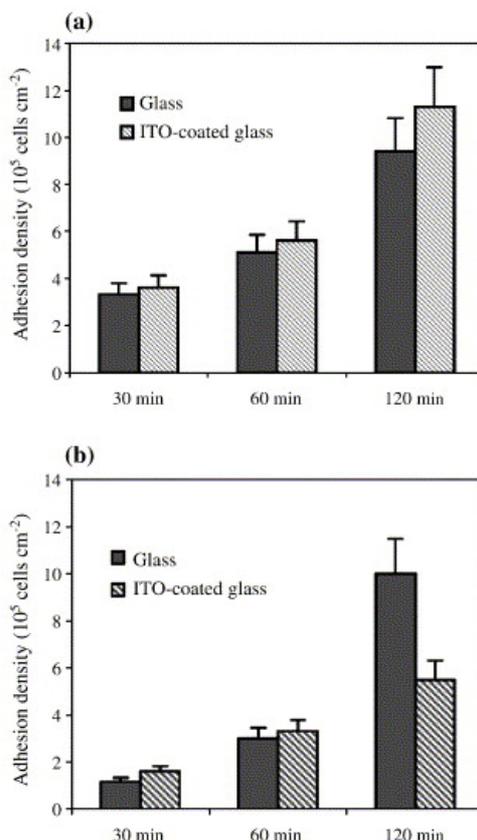
Des études ont été réalisées afin d'identifier des matériaux susceptibles de limiter et même de supprimer la formation du biofilm dans les unités de traitement d'eaux. Indépendamment de la qualité de l'eau, les biofilms se développent sur certains matériaux tels que les peintures bitumineuses, les caoutchoucs chlorés alors que certains matériaux tels que le polyméthylméthacrylate sont exempts de biofilms (Meyer, 2003). Dans la revue bibliographique de Meyer, différents matériaux ont été classés en fonction de la capacité des microorganismes (en particulier *Legionella pneumophila*) à former des biofilms à leur surface (Illustration 2).

| Support de croissance du biofilm | Matériau  |
|----------------------------------|---|
| Faible                           | Verre<br>Acier inoxydable<br>Polypropylène<br>PVC chloré<br>PVC sans plastique<br>Acier<br>Polyéthylène<br>Éthylène-propylène |
| Bon                              | Latex   |

Illustration 2 : Classement de différents matériaux en fonction de leur capacité à former des biofilms (d'après Meyer, 2003).

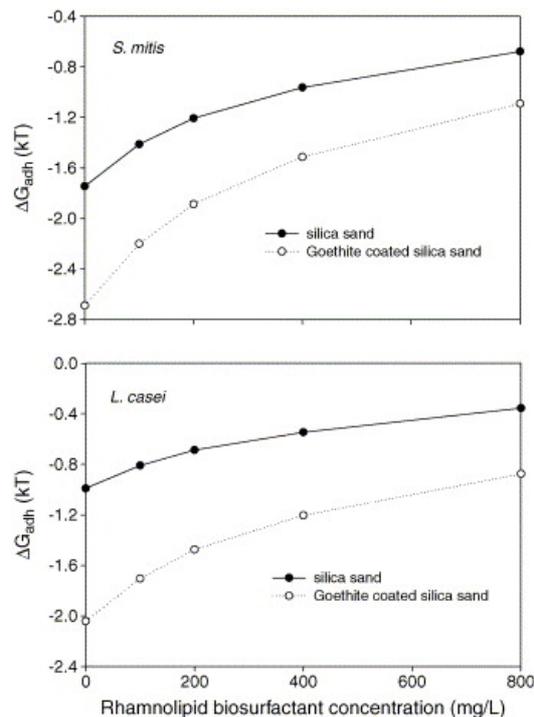
Des essais d'adhésion sur du **verre** (hydrophile) et du **verre recouvert d'une couche d'oxyde d'étain/indium (ITO)** (hydrophobe) en présence de deux types de bactéries *Pseudomonas stutzeri* et *Staphylococcus epidermidis* ont montré que l'adhésion durant la

première heure était supérieure sur la surface ITO à celle observée sur le verre, quel que soit le type de bactéries, mais qu'après 2 heures de contact, l'adhésion sur le verre était supérieure pour *S. epidermidis* (Illustration 3) (Bayouhd *et al.*, 2006). D'après les auteurs, ce résultat s'expliquerait par une influence des propriétés physico-chimiques des surfaces durant les premières étapes de l'adhésion, puis les cellules réagiraient biologiquement afin de produire des fibrilles pour établir le contact avec la surface.



**Illustration 3 : Comparaison de l'adhésion de 2 souches bactériennes *P. stutzeri* (a) et *S. epidermidis* (b) sur une surface de verre hydrophile (glass) et sur une surface de verre recouverte de ITO (ITO-coated glass) en fonction du temps de contact (30, 60 et 120 minutes). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type des comptages bactériens (d'après Bayouhd *et al.*, 2006).**

Une autre étude portant sur les capacités d'adhésion de deux bactéries *Streptococcus mitis* et *Lactobacillus casei* sur du **sable siliceux** et sur du **sable siliceux recouvert de goethite** en présence ou non de rhamnolipides (biosurfactant) montre que (i) le pourcentage d'adhésion de *S. mitis* et *L. casei* diminue avec l'augmentation de la concentration en rhamnolipides (Illustration 4), (ii) le pourcentage d'adhésion des 2 bactéries est 1,5 fois supérieur lorsque le sable est recouvert de goethite (Chen et Zhu, 2005).



**Illustration 4 : Variation de l'énergie de Gibbs ( $\Delta G_{adh}$ ) de l'adhésion bactérienne sur le sable siliceux (silica sand) et sur du sable recouvert de goethite (goethite coated silica sand) en fonction de la concentration en rhamnolipide. L'énergie de Gibbs est exprimée en kT où k est la constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ) et T est la température absolue (K). A  $25^\circ\text{C}$ ,  $1 \text{ kT} = 4,11 \times 10^{-21} \text{ J}$ .**

Parmi les effets du substratum, son contenu en éléments susceptibles de jouer le rôle de nutriments ou d'accepteurs d'électrons est à considérer. Rogers *et al.* (1998) ont montré que les microorganismes s'attaquaient plus facilement à des silicates contenant du phosphore (sous forme d'apatite) ou du fer (sous forme d'oxyhydroxydes).

L'attachement selon de nombreux auteurs (Scholl *et al.*, 1990, Roberts, 2004 et références incluses) est, en toute première approche, contrôlé par la charge du solide et celle du microorganisme (à ce titre, l'effet du substratum n'est pas toujours aisément distinguable de l'effet du pH). Les bactéries étant chargées négativement, elles ne peuvent aisément s'attacher à une surface également chargée négativement telle que celle d'un quartz ou d'un feldspath dans les conditions des eaux de surface ( $\text{pH}_{\text{pcn}} = 2-4$ ). Néanmoins, dans les sédiments, les grains de quartz ou de feldspaths sont souvent recouverts d'un encroutement d'argiles et d'oxyhydroxydes de fer dont la charge est positive dans les conditions des eaux de surface ( $\text{pH}_{\text{pcn}} = 8-9$ ), favorisant ainsi le piégeage des bactéries. De plus, la présence de cations dans les eaux ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , etc.) peut tendre à réduire la répulsion électrostatique entre les surfaces minérales et les bactéries, modifiant ainsi cette première approximation.

Néanmoins, de nombreuses expériences de laboratoire confortent l'effet de la composition chimique du substratum. Ainsi Scholl *et al.*, (1990) ont testé le degré d'attachement de bactéries sur des fragments de quartz, muscovite, calcaire et d'oxyhydroxydes de fer en recouvrement sur du quartz et de la muscovite. Ces auteurs montrent que les bactéries sont beaucoup plus présentes sur les trois derniers composés (calcaire, oxyhydroxydes de fer sur quartz ou sur muscovite), chargés positivement, pour un pH proche de 7. Ces résultats sont proches de ceux de Roberts (2004).

Roberts *et al.* (2004) ont réalisé un essai de développement bactérien, en conditions anaérobies, sur une section polie d'une roche riche en feldspaths alcalins avec de la magnétite, biotite, amphibole et apatite en inclusions. Au bout de 12 mois, dans l'eau souterraine, seules les inclusions de magnétite présentaient une colonisation bactérienne significative ( $2 \times 10^3 \text{ cellules.mm}^{-2}$ , à comparer avec  $2 \times 10^2 \text{ cellules.mm}^{-2}$  pour les autres

phases silicatées<sup>1</sup>). D'autres essais du même type, réalisés par Roberts, (2004), ont montré que la présence d'aluminium était un facteur défavorable à la croissance bactérienne que ce soit sur un support de silicate (quartz versus feldspath) ou de verre (verre Si<sub>80%</sub>-Na<sub>20%</sub> ou Si<sub>80%</sub>-Al<sub>20%</sub>). Dans ce cas, l'effet électrostatique ne peut être invoqué (surfaces négatives pour toutes les surfaces testées). Cette inhibition serait significative à partir de teneurs en aluminium aussi basse que 1,2%. Par contre, le corindon (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) s'est révélé très favorable au développement bactérien et à la formation d'un « tissu » de glycocalyx (exopolymères). Notons que dans cette expérience, les différences de densité bactérienne étaient accompagnées de différences portant aussi sur les populations bactériennes et sur un plus ou moins grand développement de glycocalyx. Ainsi, les cellules attachées à la magnétite sont associées à une forte présence de glycocalyx alors que ce dernier est peu ou pas présent sur l'hématite.

### 2.2.2 Effet du pH

Des essais d'adhésion de *Bacillus subtilis* et de *Mycobacterium phlei* sur des minéraux tels que la dolomite et l'apatite montrent une influence du pH sur la capacité d'adhésion des bactéries sur le support (Zheng *et al.*, 2001). Pour la dolomite et l'apatite, la plus forte adhésion bactérienne se situe à des pH de l'ordre de 4,0, ensuite l'adhésion diminue avec l'augmentation du pH jusqu'à pH 6,6. De plus, *B. subtilis* montre une adhésion supérieure sur la dolomite par rapport à l'apatite ou au quartz, ceci s'explique par les propriétés de surface de la bactérie et des minéraux car à pH = 4,0, la dolomite et l'apatite ont des surfaces chargées positivement tandis que *B. subtilis* a une surface chargée négativement (Zheng *et al.*, 2001).

### 2.2.3 Bilan des critères de sélection des matériaux à mettre en œuvre

Pour résumer les différents points évoqués ci-dessus, nous pouvons dire que les matériaux à utiliser pour le traitement du colmatage doivent être choisis de telle manière à :

- **Éviter la présence de Mg<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup> solubles** et de façon plus générale la présence de cations mono, di ou trivalents qui facilitent la formation des biofilms en favorisant leur accrochage ;
  - o Il faut donc choisir une roche dont les minéraux ont des constantes de solubilité très faibles
- **Fournir une surface anionique** de telle manière à défavoriser l'accrochage des polysaccharides qui sont majoritairement des polyanions ;
- **Limitier la rugosité des granulats** qui est favorable à l'accrochage des biofilms et protège les microorganismes du détachement par les forces de cisaillement ;
  - o Il faut donc à priori plutôt choisir des granulats alluvionnaires, naturellement roulés, leurs surfaces se sont émoussées, que des roches extraites en carrières qui doivent faire l'objet d'un broyage pour atteindre la granulométrie recherchée. En contrepartie, ces granulats alluvionnaires peuvent être plus altérés et présenter davantage d'oxyhydroxydes de fer que les roches fraîchement extraites.
- **Utiliser des surfaces hydrophiles** moins favorables à l'accrochage des biofilms ;
  - o C'est à priori le cas de la majorité des roches. Il faut éviter néanmoins les roches contenant des phases bitumineuses ou organiques.

- **Amener le pH du milieu plutôt vers des valeurs alcalines ;**
- En termes de composition chimique, il faut privilégier des **roches à très faible teneur en fer** et au contraire contenant un peu d'aluminium.
  - o Parmi les roches qui ont été envisagées, certaines qui contiennent beaucoup de feldspaths ou monominérale comme les quartzites ont été sélectionnées.

Les matériaux retenus pour réaliser les essais sont donc les suivants :

- **fluvioglaciaire** : il constitue la référence du site puisque le bassin est dans cette formation. Cette formation contient beaucoup de carbonates (jusqu'à 30%) et offre un pH basique. Elle est constituée de galets roulés de compositions très diverses et de particules plus fines, sans doute les plus carbonatées. Lors de la préparation du matériau et de la phase de tamisage probable pour travailler sur une fraction de granulométrie 3 -10 mm, il faudra tenir compte de cette variabilité et ne pas générer artificiellement un biais.
- **Gravier roulé** : pour avoir un matériau avec une surface spécifique réduite en raison de la sphéricité des particules, ainsi qu'à une rugosité moindre en raison du polissage généré par les frottements des galets les uns sur les autres. Outre cet aspect de surface, un choix pourra être fait sur la composition chimique de ce matériau.
- **Pouzzolane** : en gros, l'antithèse du gravier roulé, la pouzzolane présente à la fois une forte surface spécifique et une forte rugosité et, à ce titre, est fréquemment employé comme support de filtre bactérien.
- **Calcaire**: pour avoir un matériau dont deux critères principaux s'opposent et établir lequel à un rôle prépondérant: le calcaire génère un pH basique (pH de 8,2 dans une solution en équilibre avec l'atmosphère selon la loi de Henry) peu favorable au développement bactérien. Néanmoins, les surfaces des minéraux disponibles seront chargées positivement avant que le pH ne s'accorde autour de l'équilibre.
  - o Les aspects de solubilité vont intervenir également avec la présence de Ca, voir Mg en équilibre avec les carbonates. Toutes ces observations en font un matériau à priori peu satisfaisant.
  - o Un calcaire de type « marbre », qui paraissait plus favorable que le calcaire lithographique retenu pour les essais en batch (cristaux de calcite plus grand, rugosité plus faible), a été utilisé pour les essais en colonnes.
- **Déchets de verre** : Ce matériau présente l'avantage d'une surface lisse, d'une tendance à acquérir un pH plutôt basique par échange  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  (et augmentation en relation des  $\text{OH}^-$ ), d'une solubilité faible, d'un peu d'Al dans sa composition... Ce matériau a, pour les essais en colonne, été érodé par traitement à l'aide de sable de Fontainebleau de telle sorte qu'il ne soit plus coupant.

### 2.3 Prévention des phénomènes de colmatage

Deux approches distinctes peuvent être envisagées pour éviter les phénomènes de colmatage des bassins d'infiltration. En effet, ce phénomène intervient comme nous l'avons vu précédemment soit par **formation de biofilms à la surface du bassin** soit par **accumulation des MES** qui viennent obstruer la porosité du fond de bassin. Nous pouvons donc d'une part envisager de contrecarrer la formation des biofilms par l'ajout en fond de bassin d'un lit de matériaux drainant de nature à rendre moins favorables, au développement

de la biomasse microbienne, les conditions physicochimiques locales. Une approche complémentaire consistera à retenir, les particules en suspension, dans le lit drainant et filtrant de façon à limiter leur progression jusqu'au fond du bassin.

### 2.3.1 Prévention des biofilms

La prévention de la formation des biofilms par un lit de matériau peut être envisagée de différentes façons : les matériaux utilisés peuvent de par leur **composition chimique** influencer sur les conditions physicochimiques locales en induisant par exemple une modification de la valeur du **pH** des eaux ou encore en provoquant la **précipitation** de certains composés susceptibles de servir de nutriments à la biomasse.

Ce mode de prévention du développement des biofilms a été retenu pour cette étude mais il apparaît assez délicat à mettre au point dans la mesure où les paramètres conditionnant l'effet des matériaux sur le développement des biofilms apparaissent multiples et antagonistes.

Une autre voie d'inhibition de la formation de biofilms consiste à **incorporer des biocides** à la surface du matériau ou de recouvrir le matériau par une substance biocide, en particulier dans le domaine médical mais ce mode d'action ne peut être envisagé du fait du domaine d'application.

### 2.3.2 Prévention des phénomènes de colmatage dus aux MES

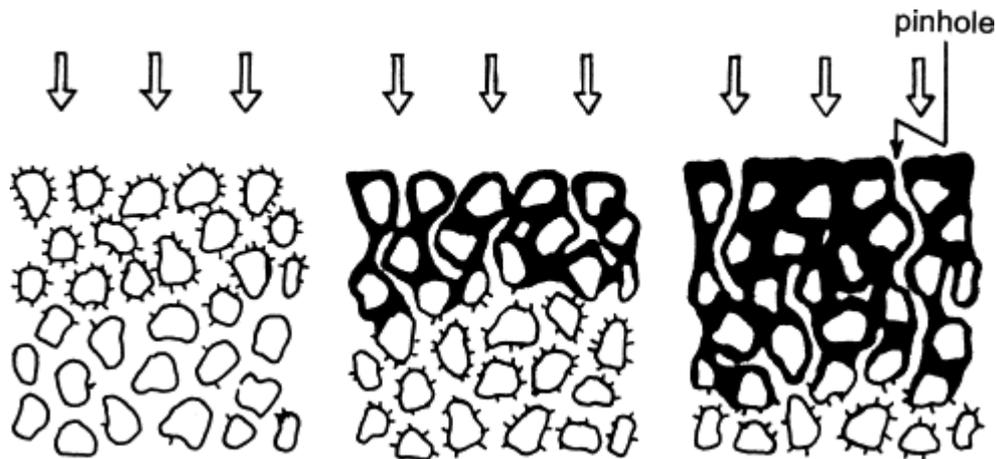
La filtration des eaux sur lit de matériaux drainant est une technique très largement utilisée dans l'industrie pour la filtration des eaux de surface ou de forage ainsi que pour certaines eaux industrielles. Nous nous proposons d'utiliser ce principe pour retenir les particules en suspension dans un lit de matériaux drainant de manière à éviter leur dépôt sur la surface du fond de bassin ce qui, à terme, participe au colmatage de cette surface.

L'idée est bien ici de **ralentir les phénomènes de colmatage dus aux MES** et non pas de les éviter. Pour cela, nous favoriserons l'utilisation de granulats aux caractéristiques morpho-texturales telles que la retenue des MES par la couche drainante se fasse au sein même de cette couche et non à sa surface, ce qui induirait un colmatage rapide de la surface drainante et conduirait à une inefficacité du procédé.

La technologie des filtres à sable conduit à un colmatage progressif plus ou moins rapide du système en fonction de la teneur en MES. En conséquence, ces filtres nécessitent un décolmatage régulier en inversant le flux mais cette pratique ne pourrait s'appliquer dans le cas présent que dans l'hypothèse où cette filtration serait envisagée en amont du bassin de décantation. Il faudra donc envisager de remanier la couche drainante mise en place en fond de bassin dès que le colmatage observé deviendra excessif de telle manière à évacuer la couche des MES piégées en son sein.

En effet, comme le montre bien l'illustration 5 (Rodon *et al*, 2005) la filtration par un lit de matériaux granulaires d'un fluide contenant des matières en suspension conduit à la formation d'un gâteau qui va obstruer la majeure partie des chemins d'infiltration initialement disponibles. Malgré tout, avec un matériau drainant judicieusement choisi la perméabilité du système pourra être partiellement conservée sur des durées prolongées.

Ce type de filtration lente pourrait être favorisé par le fait que les matières en suspension colloïdales pourraient être coagulées par les enzymes sécrétées par les algues et les microorganismes qui se fixent dans le lit drainant.



**Illustration 5 : Illustration du colmatage d'un lit drainant par les matières en suspension (Rodon et al, 2005)**

La technique de filtration sur lit drainant peut être réalisée par l'usage de couches filtrantes uniques ou multiples associant dans ce dernier cas plusieurs couches de matériaux drainant de nature et/ou de granulométrie différentes.

Dans tous les cas, **les caractéristiques** essentielles du ou des milieux poreux à prendre en compte sont **la granulométrie**, **la taille effective** ( $d_{10}$ ), **le coefficient d'uniformité** ( $d_{60}/d_{10}$ ) et **la forme des grains** (anguleux ou ronds).

Pour un filtre en service, la perte de charge, en présence d'une couche de granulats propres, est donnée par la loi de Darcy. Elle est proportionnelle à la hauteur du lit drainant et au débit ainsi qu'à la granulométrie du matériau utilisé. En effet, la granulométrie du matériau drainant conditionne directement la porosité du lit filtrant qui peut être définie comme le rapport entre le volume interstitiel et le volume total. La formule suivante donne l'expression de la porosité :

$$f = \frac{\text{volume interstitiel}}{\text{Volume total}} = 1 - \left( \frac{\text{Masse volumique apparente}}{\text{Masse volumique absolue}} \right)$$

où la **masse volumique apparente** est donnée par le rapport de la masse du matériau filtrant sur le volume apparent du solide en prenant en compte les vides interstitiels présents entre les grains alors que la **masse volumique absolue** est obtenue en divisant la masse du matériau par le volume occupé par le seul solide.

On peut noter par ailleurs, qu'à granulométrie équivalente la perte de charge est plus importante avec des grains ronds que des grains anguleux, l'empilement étant plus compact avec des grains ronds. Autre conséquence de cet empilement plus compact : la qualité de la filtration est bien meilleure.

Le dimensionnement d'un filtre sur couche drainante doit permettre d'atteindre la perte de charge maximale tolérable en un temps inférieur à celui conduisant au dépassement du seuil de turbidité tolérable. Dans ces conditions la qualité de l'eau en sortie du système de filtration reste bonne durant la totalité de la durée de fonctionnement.

Dans le cas d'une couche unique, le choix de la granulométrie sera réalisé en liaison avec la nature des eaux à traitées (plus ou moins chargées) et l'épaisseur de la couche employée. Les granulométries les plus utilisées pour le traitement des eaux peu chargées en vue de leur utilisation industrielle (type de traitement qui pourrait convenir pour atteindre l'objectif recherché) s'étalent entre 0,9 et 1,35 mm. De telles couches drainantes permettent des vitesses de filtration de l'ordre de 15 à 20  $\text{m.h}^{-1}$ . L'épaisseur de la couche doit être adaptée de telle manière à permettre la mise en contact d'une eau de qualité optimale avec la surface drainante du fond de bassin.

Dans le cas d'une couche drainante composite les tailles effectives des matériaux composants les différents étages doivent être dans un certain rapport lui-même fonction de

la nature et de l'étalement granulométrique des particules à retenir ainsi que de la densité des matériaux composant les différents étages. Pour ce type de couche, il est possible d'utiliser des matériaux de taille et densité contrastées de telle manière à éviter leur mélange.

Des études (Herzig *et al.*, 1970) ont montré qu'il existe 2 mécanismes distincts réglant la filtration en profondeur : la filtration mécanique et la filtration physico-chimique. La filtration des particules d'une taille supérieure à 30 $\mu$ m est obtenue par filtration mécanique alors que la filtration physico-chimique règle la filtration des particules d'une taille inférieure à 1  $\mu$ m. Pour les particules de taille intermédiaire (1 $\mu$ m < d < 30 $\mu$ m) les 2 phénomènes interviennent. Le rapport entre le diamètre des particules à filtrer (d) et celui des éléments constitutifs du milieu granulaire (dg) détermine la rétention ou non par ce milieu des matières en suspension. Ghidalia *et al.* (1996) ont montré que, pour d/dg voisin de 0,155, la totalité des particules en suspension se trouve bloquées dans le milieu granulaire, cette valeur étant obtenue pour un milieu poreux constitué de particules mono-disperses. Un blocage irréversible est obtenu dans le cas où d/dg est supérieur à 0,155 (Ghidaglia, 1994), on a alors formation d'un cake. La filtration physico-chimique intervient si d/dg < 10<sup>-3</sup> (Nadji, 1998). Pour obtenir une filtration dans la masse du lit drainant, il est indispensable que les pores du lit filtrant soient de taille supérieure aux dimensions des particules à filtrer de telle manière que ces dernières puissent circuler un temps au sein du lit avant de se fixer.

## 3 Partie expérimentale

### 3.1 Matériel et méthodes

#### 3.1.1 Matériaux

Suite à l'étude bibliographique réalisée, sur les caractéristiques physicochimiques des solides susceptibles d'influer sur le développement de la biomasse, les matériaux suivants ont été retenus pour l'étude : calcaire, feldspath, granite, pouzzolane, quartz, sable, zéolite, déchets de verre. Ces matériaux ont été sélectionnés soit pour leur capacité potentielle à limiter la biomasse (calcaire, feldspath, quartz, granite, sable, déchets de verre) soit comme « référence négative » pour leur aptitude potentielle à favoriser son développement (zéolite, pouzzolane). Enfin, le sol naturel du bassin Django Reinhardt constitué de fluvioglaciaire a été pris pour constituer le point référence.

#### 3.1.2 Protocole expérimental, essais en batch

Des bacs en plastique translucide (Polypropylène) de 354 mm x 325 mm, h 150 mm munis d'un couvercle sont utilisés comme réacteurs. Des pots en plastiques (Polypropylène) sont percés de trous d'un diamètre de 3 mm de telle manière à permettre la circulation du fluide, puis remplis avec le matériau à étudier dont la granulométrie est supérieure à 3 mm. 12 pots sont placés dans chaque bac et submergés avec l'eau prélevée en entrée du bassin d'infiltration du site de Django Reinhardt (Illustration 6).

Les bacs sont incubés à température ambiante et soumis aux variations d'ensoleillement de la période d'étude.

A des temps réguliers, un pot par bac est prélevé pour un dénombrement des bactéries fixées sur le matériau. Ce dispositif nous a permis de réaliser des prélèvements de matériaux sans affecter l'intégrité des lits encore en place, en procédant au prélèvement d'un pot à chaque intervention. Le niveau d'eau dans les bacs est ensuite ajusté au niveau initial par ajout d'eau issue de l'entrée du bassin d'infiltration et les couvercles des bacs sont posés à la surface.



**Illustration 6 : (a) Pots percés contenant le matériau étudié submergé par l'eau collectée en entrée du bassin d'infiltration. (b) Système expérimental de sélection des matériaux susceptibles de défavoriser la colonisation par les bactéries, des eaux pluviales collectées en entrée du bassin d'infiltration du site de Django Reinhardt.**

### **3.1.3 Protocole expérimental, essais en colonnes**

Trois types de matériaux ont été utilisés suite à l'étude en batch : le verre, un calcaire de type marbre, et le sable roulé. L'ensemble de ces matériaux a été mis en œuvre pour une granulométrie comprise entre 3,15 et 10 mm.

Le sol naturel du bassin étant constitué de fluvioglaciaire, ce matériau a été disposé de façon systématique en fond de colonne, de telle manière à reproduire autant que faire se peut la situation rencontrée sur site.

Le dispositif expérimental comprend six colonnes qui se différencient par la nature du matériau granulaire mis en œuvre ou par leur mode d'alimentation (Illustration 7).

Cinq colonnes sont composées d'une couche de 18 cm de fluvioglaciaire, 36 cm de matériau et 11 cm d'eau. La 6<sup>ème</sup> colonne contient uniquement 18 cm de fluvioglaciaire et un tube en plastique afin d'obtenir avec le même volume, la même hauteur d'eau que pour les 5 autres colonnes.

Deux modes d'alimentation des colonnes avec de l'eau prélevée sur le site sont étudiés :

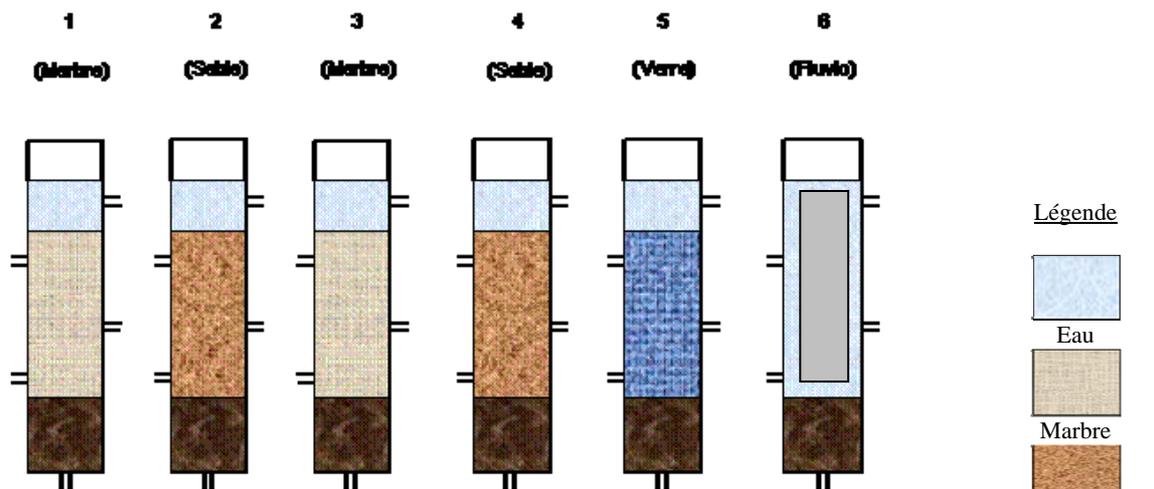
- une alimentation en continu par voie gravitaire, avec un débit est de 44 ml.h<sup>-1</sup>.
- une alimentation discontinue, composée d'un apport d'eau par voie gravitaire jusqu'à l'obtention d'une colonne d'eau de 11 cm au dessus du matériau, suivie d'une période d'immersion d'une 1 semaine et enfin d'une vidange de la colonne, suivie d'une période sèche de 2 semaines puis à nouveau d'une remise en eau par voie gravitaire, et ainsi de suite.

L'eau d'alimentation est homogénéisée par agitation mécanique et thermostatée à 14 °C en amont de l'alimentation des colonnes. Cette température a été choisie afin de limiter le développement bactérien avant l'entrée dans la colonne.

Les colonnes sont thermostatées à 20 °C afin de se placer dans des conditions favorables à un développement microbien. Elles sont enveloppées de papier aluminium pour limiter la formation d'algues. Elles sont alimentées via une pompe péristaltique à un débit de 44 ml.h<sup>-1</sup> par voie gravitaire (illustration 8).

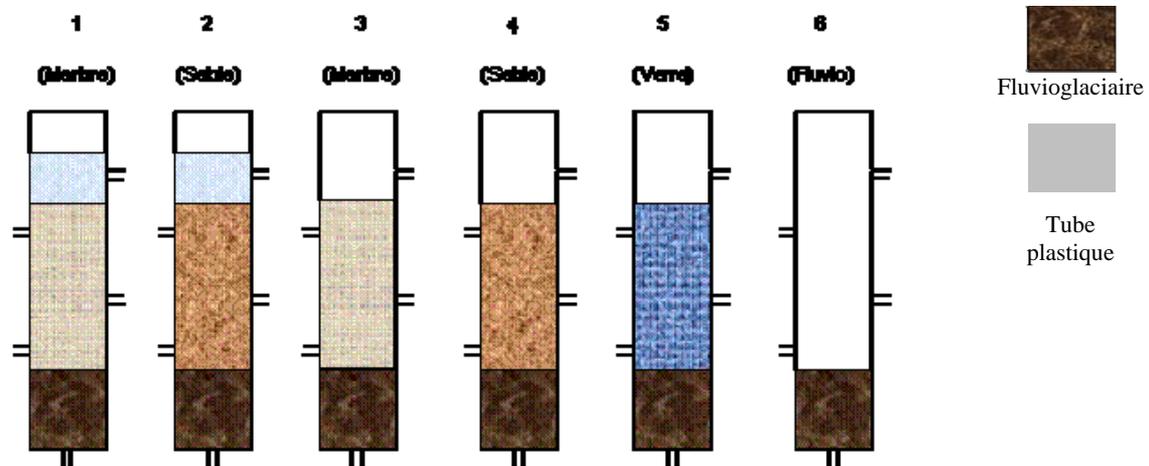
Les colonnes alimentées en continu le sont par un système de goutte à goutte.

Les colonnes alimentées en mode discontinu le sont par un système de vaporisation. De l'air comprimé permet de répartir l'eau d'alimentation sur la totalité de la surface du matériau afin d'éviter la formation de chemins préférentiels.



L'alimentation est réalisée par aspersion jusqu'à obtenir une colonne de 11 cm d'eau au dessus du matériau.

Après la vidange, les colonnes 3 à 6 sont maintenues non immergées pendant deux semaines.

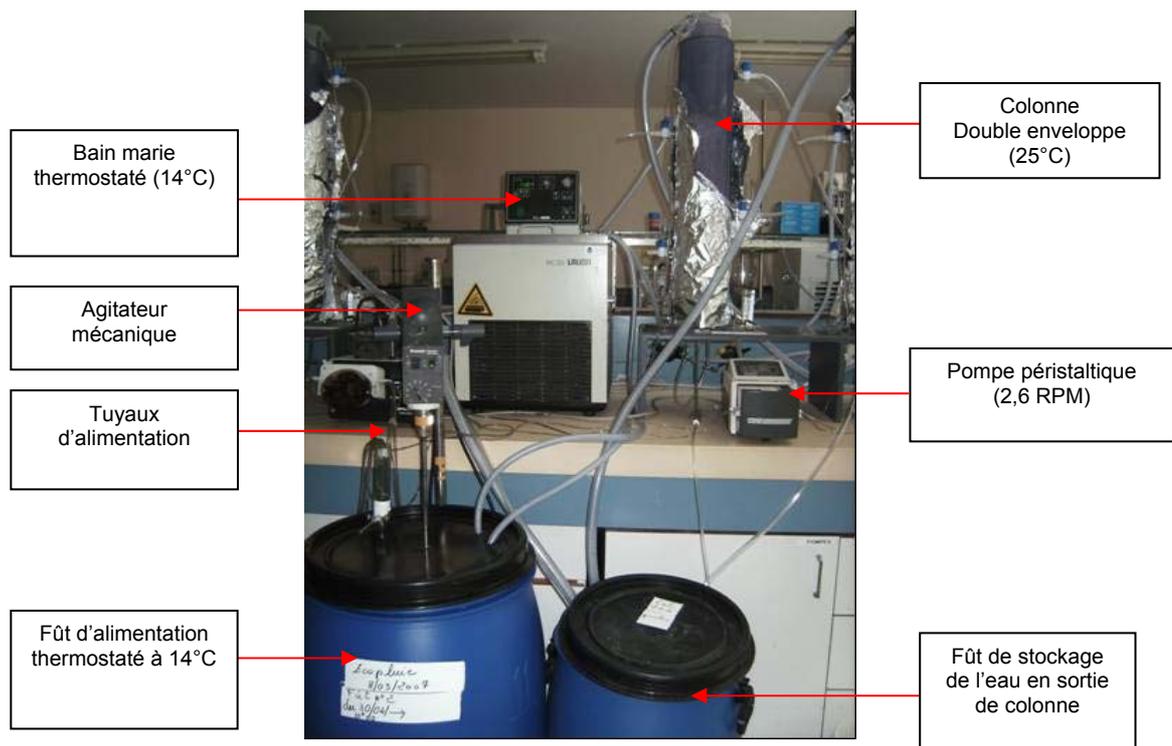


(a)

| Colonne | Matériau       | Mode d'alimentation                                |
|---------|----------------|--|
| 1       | Marbre         | Continu  |
| 2       | Sable          | Continu  |
| 3       | Marbre         | Alterné (1 semaine immergé/2 semaines non immergé) |
| 4       | Sable          | Alterné (1 semaine immergé/2 semaines non immergé) |
| 5       | Verre          | Alterné (1 semaine immergé/2 semaines non immergé) |
| 6       | Fluvioglacière | Alterné (1 semaine immergé/2 semaines non immergé) |

(b)

Illustration 7 : Système expérimental d'étude de la formation du biofilm en colonnes (a). Mode d'alimentation des colonnes (b).



**Illustration 8 : Photo du dispositif expérimental**

Tous les quinze jours, les colonnes 3 à 6 sont à nouveau alimentées par l'eau pluviale jusqu'à l'obtention d'un niveau d'eau équivalent aux colonnes 1 et 2.

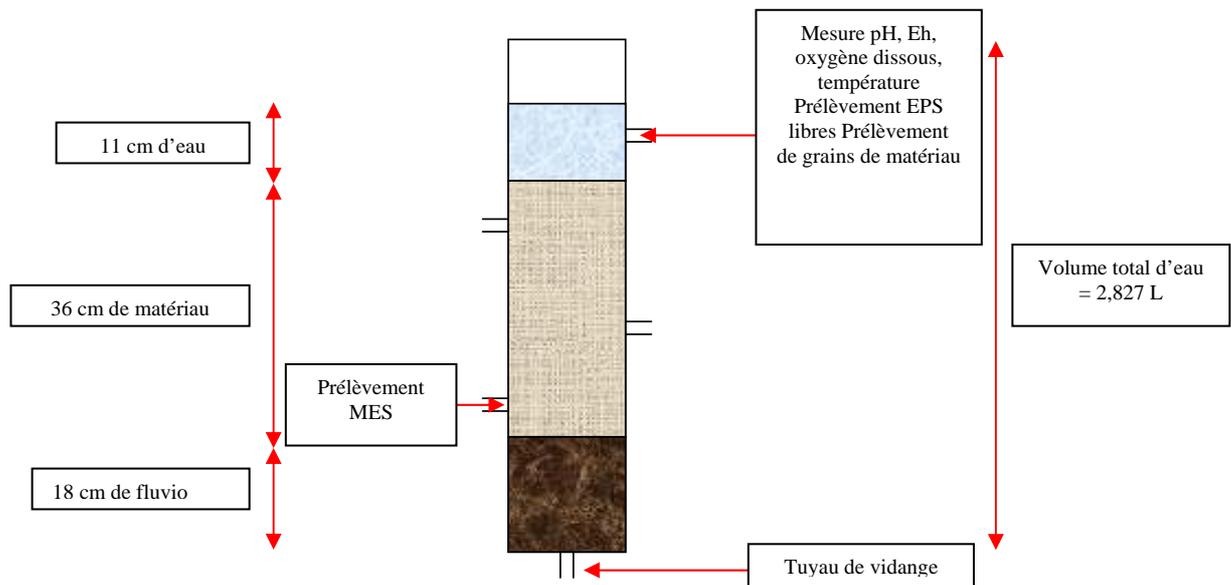
La semaine suivante, une vidange des colonnes 3 à 6 est réalisée.

Elle s'effectue en ouvrant le tuyau du bas de la colonne. La mesure du temps de vidange ainsi que celle du volume d'eau récupéré permettent de déterminer le débit moyen de vidange et donnent donc ainsi une indication indirecte du colmatage.

Un suivi du **débit de sortie** est réalisé sur les colonnes 1 et 2 alimentées en continu. Ce suivi est effectué par pesée des volumes d'eau récupérés en sortie de ces colonnes chaque semaine. Le calcul du débit de sortie donne une indication du phénomène de colmatage (une diminution de ce débit indiquant un début de colmatage par la formation de biofilm ou de précipités ou par le dépôt de Matières En Suspension (MES)).

Une fois par semaine sont réalisés :

- Un suivi des **paramètres physico-chimiques** : pH, température, potentiel redox, oxygène dissous (Illustration 9). Les électrodes sont plongées dans l'eau en entrée de colonne à l'interface eau /matériau ;
- Un prélèvement d'eau à l'interface fluvioglaciaire/matériau afin de mesurer les **MES**. Cette mesure permet d'évaluer le colmatage éventuel de la colonne.
- Un prélèvement d'eau à la surface du matériau afin d'analyser les **EPS libres**.
- Un prélèvement de grains de matériau est réalisé à la surface du matériau afin de dénombrer les **bactéries fixées sur le matériau** par la technique de l'acridine orange. Un prélèvement d'eau dans le fût d'alimentation est réalisé régulièrement afin de dénombrer les bactéries libres par la même technique.



**Illustration 9 : Suivi expérimental réalisé sur les colonnes**

### 3.1.4 Dénombrements bactériens

#### Essais en batch :

Lors des essais en batch les dénombrements des bactéries fixées sur le matériau ont été réalisés. Ces dénombrements ont été effectués sur le matériau présent en surface, au fond et dans la zone intermédiaire dans chacun des pots prélevés.

de chaque prélèvement d'un pot,

Pour cela, dix grammes de matériau sont échantillonnés dans un flacon stérile. Des billes de verre stériles (106  $\mu\text{m}$ ), à raison de 0,9 g, sont ajoutées au matériau ainsi que 10 ml d'une solution de NaCl à 9,5  $\text{g.l}^{-1}$ . Les cellules fixées sont décrochées mécaniquement par agitation au vortex pendant 2 minutes. Le dénombrement des cellules bactériennes de la suspension est alors effectué par comptage des cellules en microscopie optique (grossissement x400).

#### Essais en colonne :

Cinq grains sont prélevés dans chaque colonne à l'interface eau/matériau, à l'aide d'une grande pince. Les 3 grains de taille médiane sont transférés dans un flacon de 40 ml. Deux rinçages sont réalisés avec 10 ml d'eau physiologique à 8,5  $\text{g.l}^{-1}$  pendant 1 minute. Ces rinçages permettent d'éliminer les bactéries faiblement fixées sur les grains. L'eau de rinçage est ensuite éliminée par pipetage. Puis 10 ml d'eau physiologique sont ajoutés dans chaque échantillon. Le flacon est déposé dans un sonicateur. La sonication est réalisée (40kHz) pendant 4 minutes et permet de décrocher les bactéries accrochées aux grains. Cent  $\mu\text{l}$  de surnageant sont alors prélevés puis additionnés de 100  $\mu\text{l}$  d'acridine orange à 1% (v/v). L'acridine orange est un colorant permettant de mettre en évidence tout acide nucléique (ADN, ARN, ...), il permet donc, dans ce cas, de colorer les bactéries totales (vivantes et mortes).

Ces 200  $\mu\text{l}$  sont laissés une heure à l'obscurité. 800  $\mu\text{l}$  d'eau distillée sont ensuite ajoutés. Le ml obtenu est déposé sur un filtre noir. Le filtre est rincé 3 fois avec 10 ml d'eau

déminéralisée. Puis, les bactéries sont comptées au moyen d'un microscope à épifluorescence (filtre FITC). Les séries de trois grains sont, quant à elles, déposées dans l'étuve à 100 °C pendant 24 heures, puis pesées à la balance de précision. Le nombre de bactéries par gramme de matériau peut ainsi être ainsi déterminé.

Le dénombrement des bactéries, après coloration à l'acridine orange, est réalisé à l'aide d'un microscope Zeiss (Axio Imager MAT). L'acridine orange est utilisée car elle traverse facilement les parois. Cette molécule excitée à une longueur d'onde de 525 nm permet l'observation des bactéries à l'aide du microscope à épifluorescence Zeiss. L'observation est réalisée à l'aide d'un objectif 44 FITC à un grossissement  $\times 40$ .

### **3.1.5 Analyses des EPS**

Les EPS, exopolymères bactériens sont les constituants majeurs des biofilms. Il en existe de différents types : protéique, glucidique, lipidique, acides uroniques et débris cellulaires.

Seuls les EPS de type glucidiques et protéiques sont dosés. En effet, les EPS nucléiques, lipidiques et acides uroniques ne sont pas dosés en raison de leur faible quantité.

Dix ml d'échantillon sont prélevés en haut de colonne, puis filtrés à 0,2  $\mu\text{m}$ .

Afin de pouvoir procéder aux différents dosages, les EPS doivent être préalablement concentrés à l'aide d'un concentrateur (Concentrator 5301 Eppendorf) qui est une centrifugeuse sous vide permettant d'éliminer le solvant, ici l'eau.

Tous les dosages effectués au laboratoire sont de nature colorimétrique et ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible Agilent 8453.

#### **Dosage des protéines**

La concentration en protéines totales est déterminée par la méthode de Lowry et utilise le kit DC Protein Assay (Bio- Rad). La gamme étalon, de 0 à 1,48  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , est réalisée à partir d'une solution mère de « Sérum Albumine Bovine » (BSA). Les mesures d'absorbances sont effectuées à 750 nm. Sur la base de la courbe étalon, la concentration en protéines totales de nos échantillons est déterminée.

#### **Dosage des glucides**

La concentration en glucides est déterminée par la méthode phénol-acide sulfurique (Daniels, 1994). Une coloration jaune orangée apparaît résultant d'une réaction entre le phénol et les hydrates de carbone. La gamme étalon est préparée à partir de solutions standards de glucose de 10 à 100  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . La solution mère est composée de 100 mg de glucose dans 100 ml d'eau déminéralisée, et est préparée extemporanément.

### **3.1.6 Mesure des MES libres**

Pour mesurer les MES, un échantillon d'eau de 100 ml est prélevé chaque semaine à l'interface fluvioglaciaire / matériau. Ces 100 ml sont filtrés à 0,2  $\mu\text{m}$  à l'aide d'une pompe à vide. Le filtre, préalablement taré, est déposé 24 h dans une étuve à 100 °C afin d'éliminer toute trace d'eau, puis pesé avec une balance de précision afin de déterminer par différence la quantité de MES.

#### **Mesure des MES liées**

Une mesure des Matières En Suspension (MES) déposées dans les différentes couches de matériaux granulaires séparées lors du démontage des colonnes (3 à 5) a été menée. Cette mesure a été réalisée après séparation des MES du solide granulaire par sonication. Les masses de MES décrochées et des solides granulaires « nettoyés » ont été mesurées, après

séchage à l'étuve à 105°C. L'évolution des masses de MES rapportées à la masse de solide granulaire porteur des MES a été étudiée.

### **3.1.7 Analyses physico-chimiques des matériaux**

Une caractérisation physicochimique des matériaux sélectionnés a été réalisée de façon systématique. Ces analyses sont réalisées de telle manière à définir, pour chacun des matériaux testés, les paramètres susceptibles d'influer sur le développement de la biomasse.

Les échantillons ont été caractérisés par diffraction des rayons X, de telle manière à mettre en évidence les phases cristallines présentes. Les analyses ont été effectuées sur des poudres, dans un diffractomètre Siemens D 5000. Cet appareillage utilise la raie  $K\alpha$  ( $\lambda = 0,17889$  nm) du cobalt. Les mesures ont été réalisées à 40kV et 30mA à température ambiante. Les enregistrements sont effectués de  $4^\circ$  à  $84^\circ$  ( $2\theta$ ) avec un pas de  $0,2^\circ$  et un temps de comptage de 1s par pas.

L'analyse des éléments majeurs a été réalisée pour chacun des échantillons par fluorescence X. Ceci afin de mettre en évidence la possible présence en particulier de calcium, magnésium, fer et aluminium, éléments chimiques susceptibles d'influer sur le développement de la biomasse.

La porosité des matériaux accessible aux bactéries ( $>1\mu\text{m}$ ) a été caractérisée en termes de volume poreux et distribution de la porosité par porosimétrie mercure. L'équipement utilisé comprend une unité MACROPORES 120 et une unité POROSIMETER 2000 de marque CARLO ERBA. Les mesures ont été réalisées dans une gamme de pressions comprises entre 0,15 et 29 bars permettant l'analyse de la porosité entre 50 et  $0,3\mu$  de diamètre.

Des observations par Microscopie Electronique en Balayage ont été réalisées sur les échantillons de verre brut et érodé de telle manière à caractériser l'état de surface des grains. L'appareillage utilisé est un Jeol 6100, les échantillons ont été métallisés au carbone avant observation. La distribution granulométrique des différents matériaux a été déterminée par tamisage, sur la fraction 3-10 mm utilisée dans les essais en batch.

Enfin une valeur du pH d'équilibre a été déterminée pour chacun des matériaux après 50 jours de contact avec l'eau du site, cette valeur pouvant influencer sur le développement bactérien.

## **3.2 Résultats**

### **3.2.1 Caractérisation des matériaux sélectionnés**

Les analyses par diffraction des rayons (Annexe 1) ont révélé la présence des phases cristallines rappelées dans le tableau de l'illustration 8.

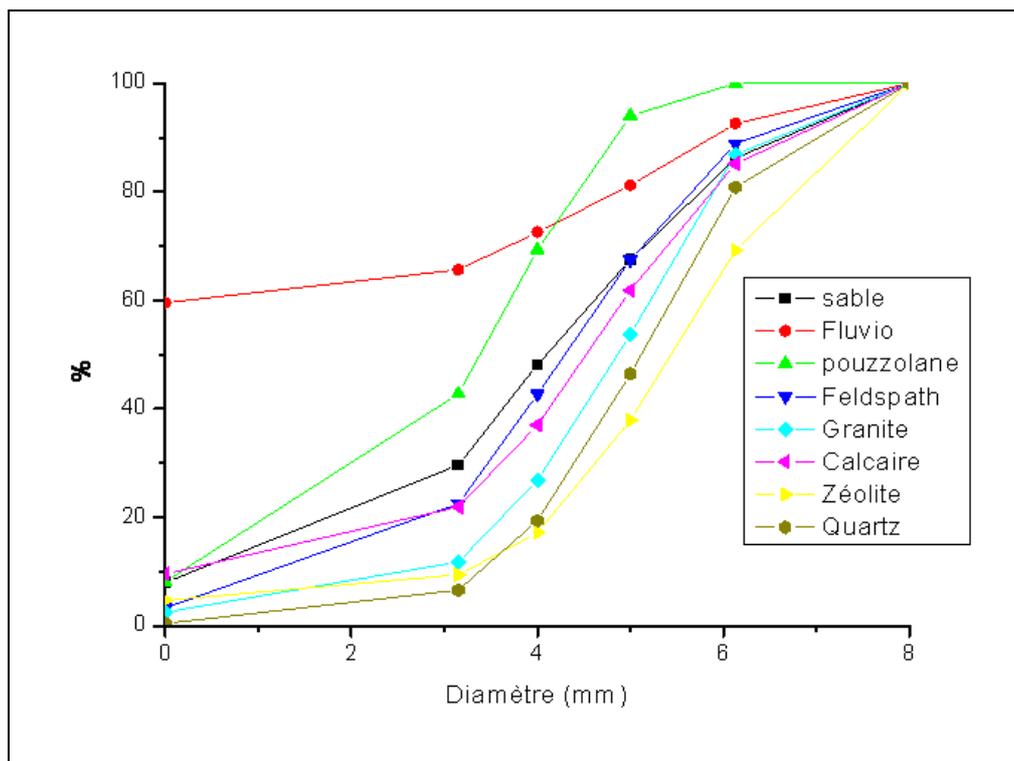
| Matériaux      | Phases cristallines |   | Analyses Chimiques             |      |                                |                  |      |                   |                  |                  |
|----------------|---------------------|---|--------------------------------|------|--------------------------------|------------------|------|-------------------|------------------|------------------|
|                | majoritaires        | minoritaires  | Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | CaO  | Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | K <sub>2</sub> O | MgO  | Na <sub>2</sub> O | SiO <sub>2</sub> | TiO <sub>2</sub> |
| Fluvioglacière | Quartz + Calcite    | Albite + Microcline + Muscovite + Clinocllore           | 4,2                            | 13,7 | 1,47                           | 1,01             | 0,6  | 0,6               | 66,4             | 0,17             |
| Zéolite        | Clinoptilolite      | Quartz + Illite + Microcline                            | 10,8                           | 3,9  | 1                              | 3,04             | 1,2  | 0,3               | 65,2             | 0,05             |
| Granite        | Albite + Quartz     | Muscovite + Microcline + Clinocllore                    | 14,8                           | 1,6  | 2,14                           | 2,93             | 0,9  | 4,2               | 71,6             | 0,27             |
| Feldspath      | Albite              | Quartz  | 18,6                           | 0,8  | 0,18                           | 0,25             | <    | 9,3               | 68,8             | 0,27             |
| Pouzzolane     | Amorphe             | Augite + Hematite + Anorthite + Nepheline + Franklinite | 13,3                           | 10,2 | 11,8                           | 1,51             | 11,2 | 4                 | 43,7             | 2,34             |
| Quartz         | Quartz              |   | 0,2                            | <    | 0,27                           | <                | <    | <                 | 99,4             | <                |
| Sable          | Quartz              | Microcline + Albite + Muscovite                         | 8,6                            | 0,4  | 1,49                           | 3,87             | 0,5  | 1,3               | 82,3             | 0,18             |
| calcaire       | Calcite             |   | <                              | 54,8 | <                              | <                | 0,4  | <                 | <                | <                |
| Verre          | Amorphe             |   | 2                              | 9    |                                |                  |      | 15                | 70               |                  |

**Illustration 10: Caractérisation cristallographique et chimique majeure des matériaux sélectionnés (◆ : teneur > 40%, ◆ : teneur > 10%, ◆ : teneur >1%)**

La présence majoritaire de quartz dans l'échantillon de sable roulé, de quartz et de granite, de calcite dans le calcaire et d'albite dans le feldspath et le granite est mis en évidence. Enfin la zéolite est essentiellement constituée de clinoptilolite. Il est noté par ailleurs que le fluvioglacière est majoritairement composé d'un binaire quartz/calcite ce qui fait qu'il se rapproche en termes de phases cristallines de bon nombre des matériaux sélectionnés par ailleurs. Dans le cas du verre aucune phase cristalline n'a été mise en évidence, le solide étant totalement vitreux.

Les analyses réalisées par fluorescence X (Illustration 8) montrent que, mis à part le calcaire, l'ensemble des matériaux est riche (teneur en SiO<sub>2</sub> >40%) à très riche en silice (teneur en SiO<sub>2</sub> >65%). Le calcaire comme attendu est très riche en calcite (teneur en CaO >50%). Par ailleurs, la zéolite, le granite, le feldspath et la pouzzolane sont assez riches en aluminium (teneur en Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> >10%) alors que seule la pouzzolane est assez riche en fer (teneur en Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> >10%) et en magnésium (teneur en MgO >10%). Le verre se démarque des autres matériaux par la présence assez marquée de sodium (teneur en NaO >10%). Le fluvioglacière, quant à lui, est très riche en silicium, assez riche en calcium (teneur en CaO >10%).

Les répartitions granulométriques déterminées suite aux mesures réalisées par tamisage sont présentées sur l'illustration 9, les valeurs caractéristiques (d<sub>10</sub>, d<sub>50</sub>, d<sub>90</sub>) présentées dans l'illustration 10. Ces données montrent clairement que le sol naturel constitué de fluvioglacière présente une granulométrie beaucoup plus faible que l'ensemble des matériaux sélectionnés même si l'échantillon rentre dans la coupure 3-10 mm. En particulier, on note un diamètre moyen (d<sub>50</sub>) voisin de 2 mm. Parmi ces matériaux, seule la pouzzolane se démarque un peu des autres en présentant un d<sub>50</sub> voisin de 4 alors que tous les autres matériaux ont des d<sub>50</sub> supérieurs à 5mm.



**Illustration 11 : Répartition granulométrique des matériaux sélectionnés ainsi que du fluvioglaciale**

Les mesures concernant la porosité des matériaux, supérieure à  $1\mu\text{m}$ , réalisées par porosimétrie mercure (Illustration 10) ont permis d'évaluer à la fois la porosité intra-granulaire des matériaux mais aussi la porosité inter-granulaire comme le révèlent les valeurs obtenues pour le sable et le quartz, matériaux qui ne peuvent contenir de mésoporosité. La porosité totale apparaît, dans le cadre de cette étude, comme le paramètre pertinent dans la mesure où l'ensemble de cette porosité peut permettre le développement de la biomasse. Les volumes poreux inter-granulaires révélés par les mesures réalisées sur le quartz et le sable demeurent faibles voisins respectivement de  $1$  et  $2\text{ mm}^3\cdot\text{g}^{-1}$  et ceci probablement du fait de la taille et de la forme des grains. Pour la gamme de pores étudiés (diamètre de  $50$  à  $0,3\mu\text{m}$ ), ces mesures révèlent un volume poreux global pour la pouzzolane très important ( $>100\text{mm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ ) avec une taille moyenne de pores voisine de  $8\mu\text{m}$ . Les échantillons de zéolite et de calcaire présentent eux un volume poreux total respectivement de  $19$  et  $29\text{ mm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ , ce qui correspond donc à un volume poreux intra-granulaire (corrigé respectivement des volumes poreux inter-granulaires du quartz et du sable) de  $17$  et  $27\text{ mm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ . Les pores du calcaire apparaissent majoritairement inaccessibles aux bactéries ( $d_{50}<1\mu\text{m}$ ) alors que la majorité des pores de la zéolite sont accessibles aux bactéries ( $d_{50}>1\mu\text{m}$ ). Enfin le feldspath, le granite le quartz et le sable présentent des volumes poreux faibles à très faibles compris entre  $4,3$  et  $1,4\text{ mm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ .

Les mesures de pH réalisées après 50 jours de mise en contact des différents solide avec l'eau du site montrent que l'ensemble des matériaux imposent un pH d'équilibre voisin de  $8$  seul le sol naturel impose un pH un peu plus proche de la neutralité avec une valeur de  $7,5$ .

| Matériaux        | d10             | d50   | d90   | Vporeux (>1µm)     | d50 pores (>1µm) | pH équilibre<br>à 50 jours |
|------------------|-----------------|-------|-------|--------------------|------------------|----------------------------|
|                  | >3,15 <10<br>mm | mm    | mm    | mm <sup>3</sup> /g | µm               |                            |
| Fluvioglaaciaire |                 | env 2 | 7,64  |                    |                  | 7,52                       |
| Zéolite          | 4,22            | 6,88  | 9,27  | 18,58              | 3.04             | 8,3                        |
| Granite          | 3,96            | 5,96  | 8,35  | 3,49               | 13.58            | 8,39                       |
| Feldspath        | 3,54            | 5,20  | 8,39  | 4,23               | 9.98             | 8,2                        |
| Pouzzolane       | 3,18            | 4,24  | 5,98  | 115,23             | 15.7             | 8,14                       |
| Quartz           | 4,34            | 6,34  | 8,78  | 1,43               | 16.92            | 7,85                       |
| Sable            | 3,16            | 5,04  | 8,62  | 2,11               | 4.78             | 7,94                       |
| calcaire         | 3,19            | 5,59  | 8,47  | 28,65              | 1.66             | 8,26                       |
| Verre            | 4,59*           | 6,00* | 7,39* | 5.78               | 21,70            | 8,09 (40 j)                |
| Marbre           | 3,47            | 5,19  | 8,66  |                    |                  |                            |

Illustration 12 : Caractéristiques de la granulométrie et de la porosité des matériaux choisis (\* verre traité), valeur de pH observée à l'équilibre après 50 jours. ( valeur  $\blacklozenge$  : très forte,  $\blacklozenge$  : forte,  $\blacklozenge$  : moyenne,  $\blacklozenge$  : faible)

Dans le cas des échantillons de verre brut et traité par le sable de fontainebleau des clichés (Illustration 13) réalisés par Microscopie Electronique en Balayage (MEB) révèlent les différences fondamentales de rugosité à la surface des ces matériaux. Si le verre brut ne présente que peu de rugosité de surface le verre érodé présente lui une quantité très importante de micro-défauts de surface dont la taille moyenne est proche de quelques microns, et donc de nature à favoriser l'accrochage de la biomasse.

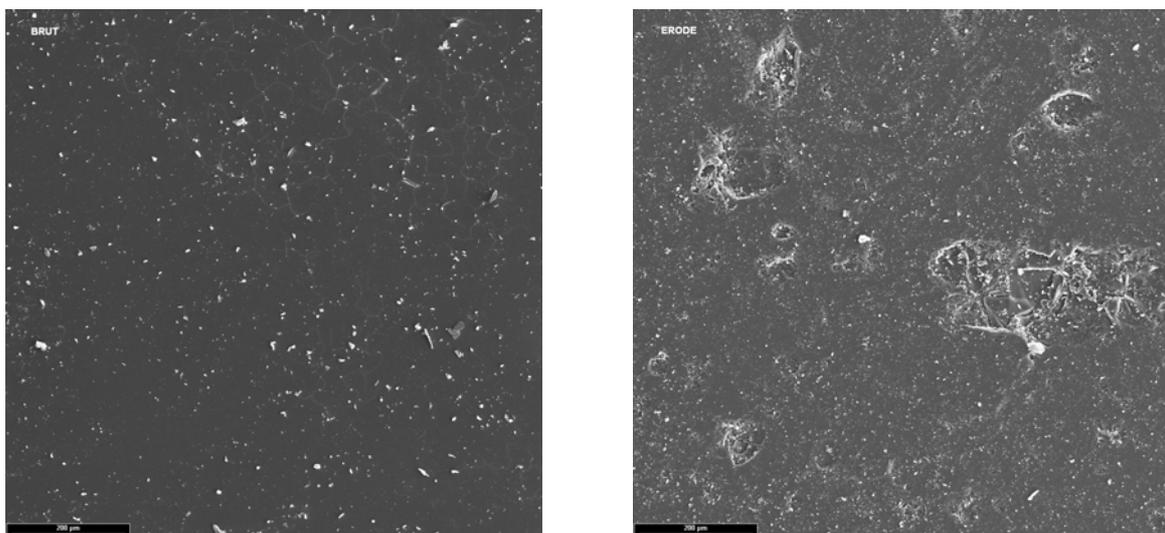


Illustration 13 : Images obtenues en Microscopie Electronique en Balayage des surfaces des échantillons de verre brut et érodé.

### 3.2.2 Essais préliminaires en batch

#### 3.2.2.1 Comptages bactériens

Un dénombrement des bactéries viables en microscopie optique (grossissement x400) a été réalisé dans l'échantillon d'eau prélevée en entrée du bassin d'infiltration et utilisée pour réaliser les expérimentations en batch (Illustration 6).  $6 \cdot 10^7$  bactéries.ml<sup>-1</sup> sont présentes dans cette eau lors du démarrage des expérimentations.

Les dénombrements de bactéries fixées sur les différents supports ont été réalisés à intervalle régulier pendant 4,5 mois.

Le sol du bassin d'infiltration de Django Reinhardt, **fluvioglaciaire**, constitue notre référence. Initialement, de l'ordre de  $2 \cdot 10^{10}$  bactéries.g matériau<sup>-1</sup> sont présentes sur le matériau. Ce nombre reste constant durant les 142 jours d'incubation avec l'eau du site. Il n'est pas possible de faire la part des bactéries initialement présentes dans le sol et celles qui se sont fixées sur le matériau.

Concernant les matériaux sélectionnés, un classement a été établi en prenant pour référence le fluvioglaciaire (illustration 14) :

- 1- **Fluvioglaciaire** :  $10^{10}$  bactéries.g matériau<sup>-1</sup>
- 2- **Zéolite** : Après 7 jours d'incubation avec l'eau du site, de l'ordre de  $10^{10}$  bactéries.g matériau<sup>-1</sup> sont fixées sur le matériau. Une diminution significative du nombre de bactéries fixées est observée après 60 jours d'incubation ( $10^9$  bactéries.g matériau<sup>-1</sup>).
- 3- **Granite, Feldspath, Pouzzolane, Quartz, Calcaire, Sable roulé** :  $10^8$  à  $10^9$  bactéries.g matériau<sup>-1</sup> ont été dénombrées après 7 jours d'incubation. Ce nombre évolue peu durant les 142 jours d'incubation, à l'exception du quartz pour lequel, une diminution du nombre de bactéries fixées est observée après 103 jours.
- 4- **Verre** :  $10^7$  bactéries.g matériau<sup>-1</sup> sont fixées après 7 jours. Ce nombre reste constant durant les 4,5 mois d'incubation.

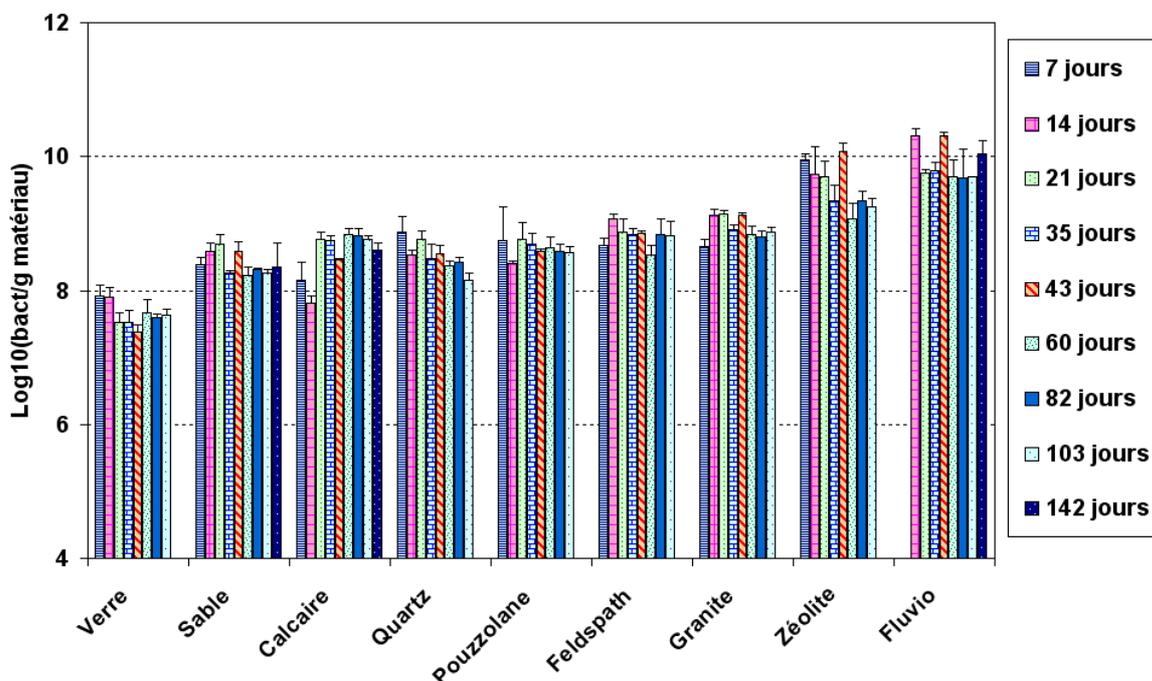


Illustration 14 : Dénombrements de bactéries fixées sur les différents matériaux étudiés en fonction du temps.

### 3.2.2.2 Suivi chimique des eaux

Des analyses chimiques de l'eau du site ainsi que des eaux présentes dans les différents bacs après 14 jours de mise en contact matériau/eau du site pour le verre et après 21 jours pour les autres matériaux ont été réalisées (Illustration 12).

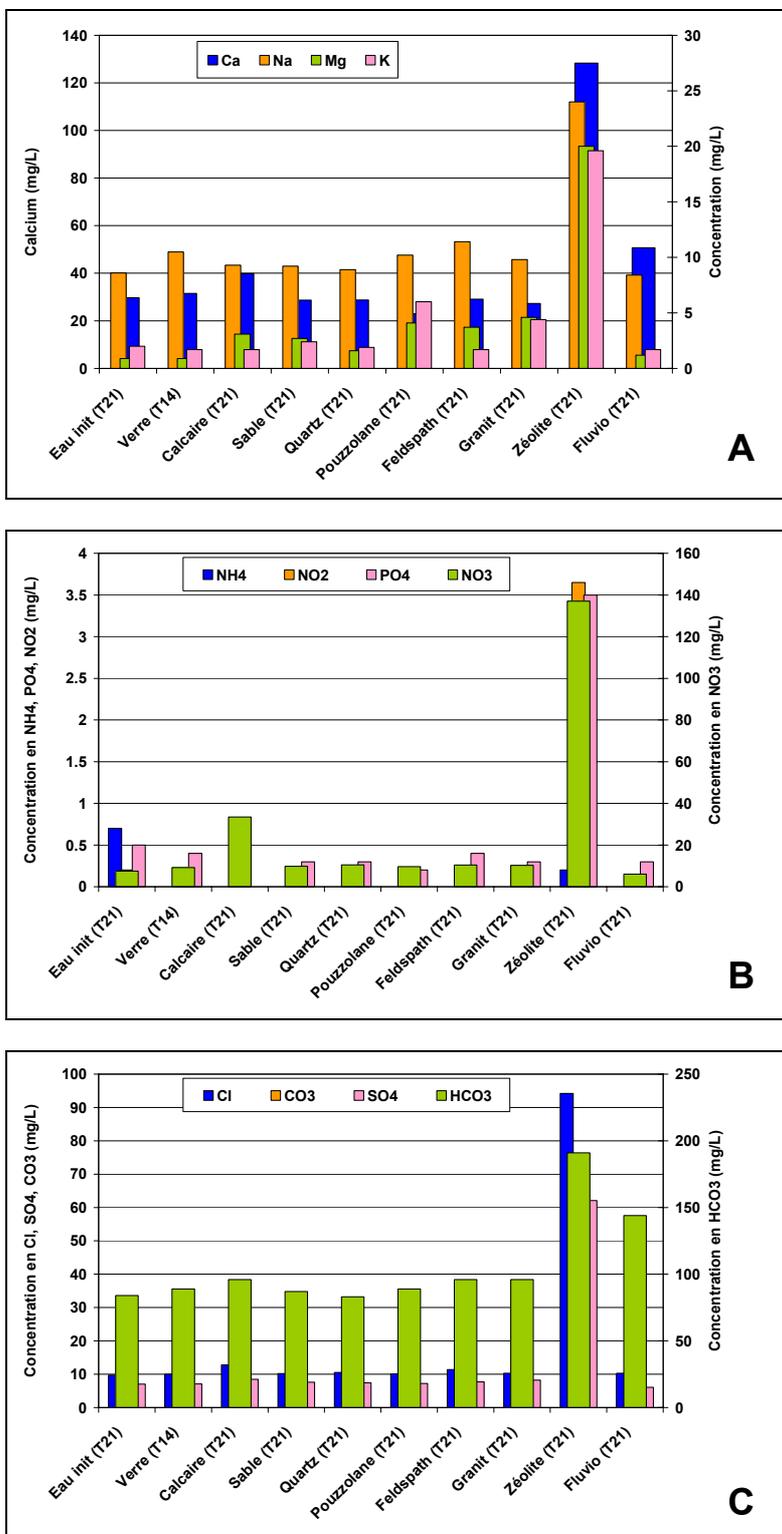


Illustration 15 : Analyses chimiques des eaux prélevées dans les différents bacs après 14 et 21 jours de temps de contact matériau-eau (A), (B), (C).

Dans le bac contenant les pots de zéolite, les analyses révèlent des concentrations de 2 à 9 fois plus élevées de Ca, Na, Mg et K en solution par rapport aux bacs contenant les autres matériaux (Illustration 15A).

Dans le cas des formes azotées, 137 mg.l<sup>-1</sup> de nitrates et 3,6 mg.l<sup>-1</sup> de nitrites sont détectés alors que 3,7 mg.l<sup>-1</sup> de phosphates sont libérés dans le bac en présence de zéolite (Illustration 12B). Dans le cas des autres matériaux, les concentrations en éléments sont similaires à celles observées dans l'eau du site.

Dans ce même bac, les concentrations en chlorures et bicarbonates sont 8 à 9 fois plus importantes que dans l'eau du site et celle des bacs contenant les autres matériaux. Enfin, la concentration en sulfate est 2 fois plus importante dans l'eau du bac de zéolite que dans les autres bacs (illustration 12C).

Les carbonates, les fluorures et le fer n'ont pas été détectés en solution dans aucun des bacs.

### **3.2.3 Essais par percolation en colonnes**

#### **3.2.3.1 Colonnes alimentées en mode continu**

##### *Paramètres physico-chimiques*

Les mesures de pH, de potentiel redox et d'oxygène dissous ont été effectuées à l'interface eau/matériau.

Dans le cas des colonnes contenant le matériau « Sable », alimentée en continu, une chute du pH est observée de 7,7 à 7,0 durant les 15 premiers jours (Illustration 16A). Le pH augmente ensuite progressivement pour atteindre une valeur de 7,5 au bout de 125 jours et reste constant jusqu'à la fin de l'expérience (200 jours). En ce qui concerne la colonne contenant le matériau « Marbre » alimentée en continu, une chute du pH est observée durant les 15 premiers jours pour se stabiliser à une valeur moyenne de 7,0 durant 115 jours. Une augmentation du pH de 0,7 unité est ensuite enregistrée. La valeur du pH reste ensuite stable à 7,5 durant les 100 jours suivants (Illustration 16A).

Le potentiel redox à l'interface eau/Sable ainsi qu'à l'interface eau/Marbre fluctue entre 267 mV et 450 mV au cours du temps (Illustration 16B). Les conditions oxiques sont maintenues durant les 7 mois de l'expérience. Ceci est confirmé par l'évolution de la concentration en oxygène dissous qui est comprise entre 2,5 et 3,5 mgO<sub>2</sub> dissous.l<sup>-1</sup> pour les 2 colonnes (Illustration 16C).

##### *Dénombrements de bactéries fixées*

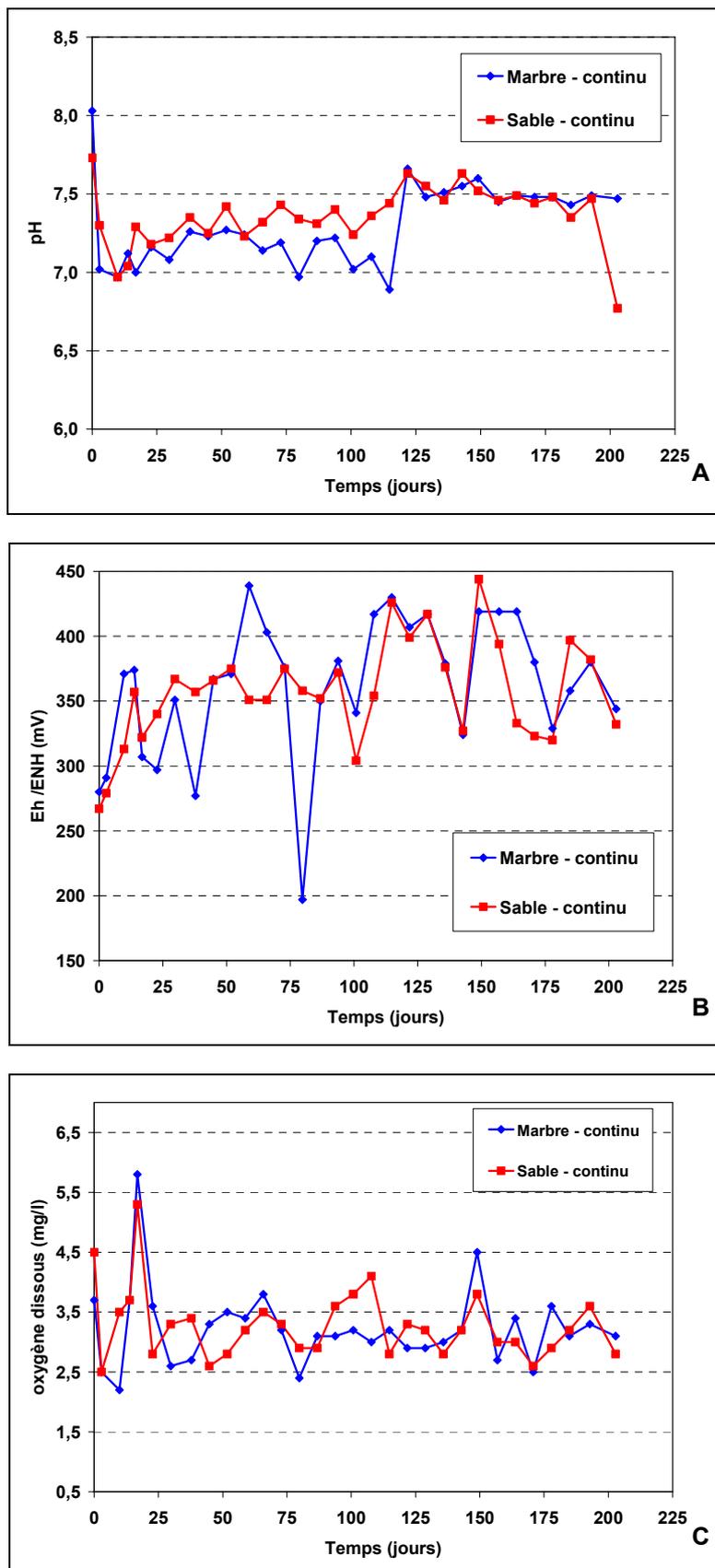
Une augmentation du nombre de bactéries fixées sur le support marbre à l'interface eau/matériau est observé durant les 50 premiers jours : de 10<sup>6</sup> à 10<sup>7</sup> bactéries fixées.g<sup>-1</sup> matériau (illustration 17). Puis une diminution du nombre de bactéries est observée d'une puissance de 10 pour revenir au niveau initial (10<sup>6</sup> bactéries.g<sup>-1</sup> matériau) après 15 jours d'alimentation en continu. Une augmentation du nombre de bactéries fixées est à nouveau observée et atteint 10<sup>7</sup> bactéries.g<sup>-1</sup> matériau (illustration 17).

La même tendance est observée dans le cas de la colonne contenant le sable comme matériau.

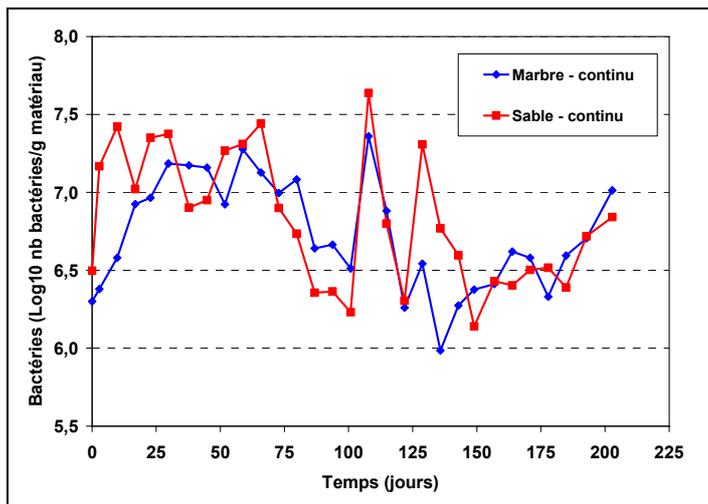
Par ailleurs, un contrôle régulier du nombre de bactéries libres présentes dans l'eau d'alimentation a permis de vérifier que celui restait stable au voisinage de 10<sup>5</sup> bactéries.

##### *Concentrations en EPS*

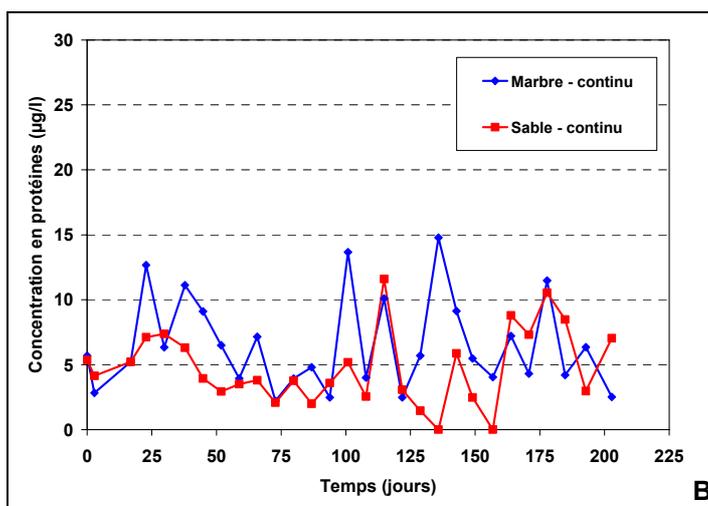
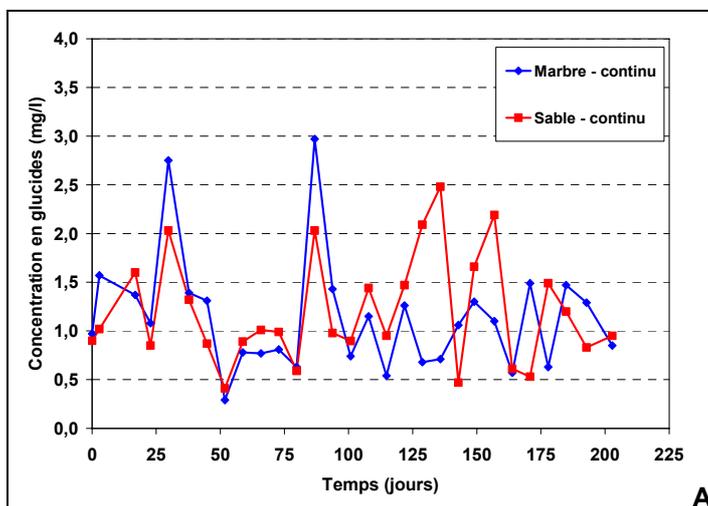
Les concentrations en exopolymères (EPS) libres glucidiques et protéiques sont faibles et proches de la limite de quantification de la méthode utilisée (illustration 18). La concentration en EPS glucidiques est comprise entre 0,5 et 3,0 mg.l<sup>-1</sup> pour les 2 matériaux « Sable » et « Marbre ». La concentration en EPS protéiques est comprise entre 0 et 15 µg.l<sup>-1</sup> pour les 2 types de matériaux. Il n'est pas possible de dégager une évolution des concentrations en EPS glucidiques et protéiques au cours du temps et ceci quel que soit le matériau considéré.



**Illustration 16 : Evolution du pH (A), du potentiel redox (B) et de la concentration en oxygène dissous (C) à l'interface matériau/eau dans les colonnes alimentées en mode continu.**



**Illustration 17 : Dénombrements des bactéries fixées sur le support dans les colonnes alimentées en mode continu.**



**Illustration 18 : Evolution des concentrations en exopolymères libres glucidiques (A) et protéiques (B) à l'interface eau/matériau dans les colonnes alimentées en mode continu.**

### 3.2.3.2 Colonnes alimentées en mode discontinu

#### *Paramètres physico-chimiques*

Le pH, le potentiel redox et la concentration en oxygène dissous ont été mesurés à l'interface eau/matériau durant les périodes d'immersion. Le pH oscille autour d'une valeur moyenne de 7,5 durant les 114 premiers jours quel que soit le type de matériau. Il augmente de 0,5 à 0,7 unités par la suite. Le pH est de 8,0 durant les 100 derniers jours (Illustration 19A).

Dans la colonne contenant le sol de référence, fluvioglaciaire, le pH présente une valeur initiale de 7,2 qui se maintient autour de cette valeur tout au long de l'expérience.

Le potentiel redox augmente au cours du temps de 250mV jusqu'à une valeur comprise entre 350 mV et 400 mV pour les 3 matériaux étudiés (Illustration 19B). L'évolution est la même pour le sol de référence.

L'oxygène dissous se maintient à une valeur moyenne de 4,5 mg O<sub>2</sub> dissous.l<sup>-1</sup> pour les 3 types de matériaux (Illustration 19C). La concentration en O<sub>2</sub> dissous dans le fluvioglaciaire décroît rapidement au cours du temps pour atteindre 1 à 1,5 mg O<sub>2</sub> dissous.l<sup>-1</sup> en fin d'expérience et met en évidence une consommation de l'oxygène par la microflore du sol de référence.

#### *Dénombrements bactériens*

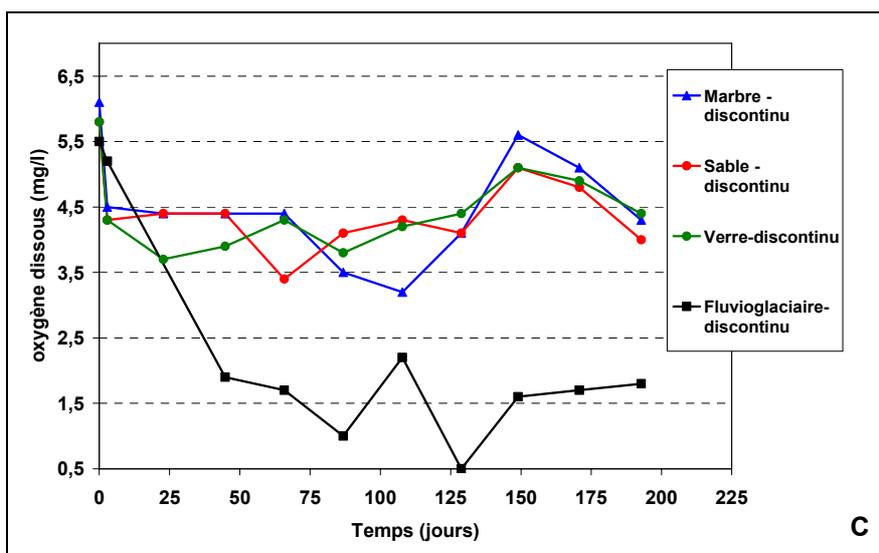
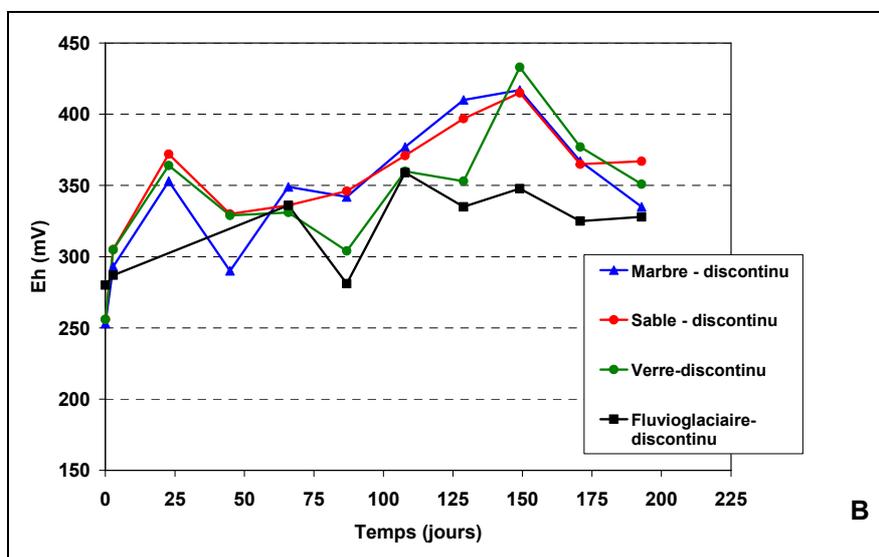
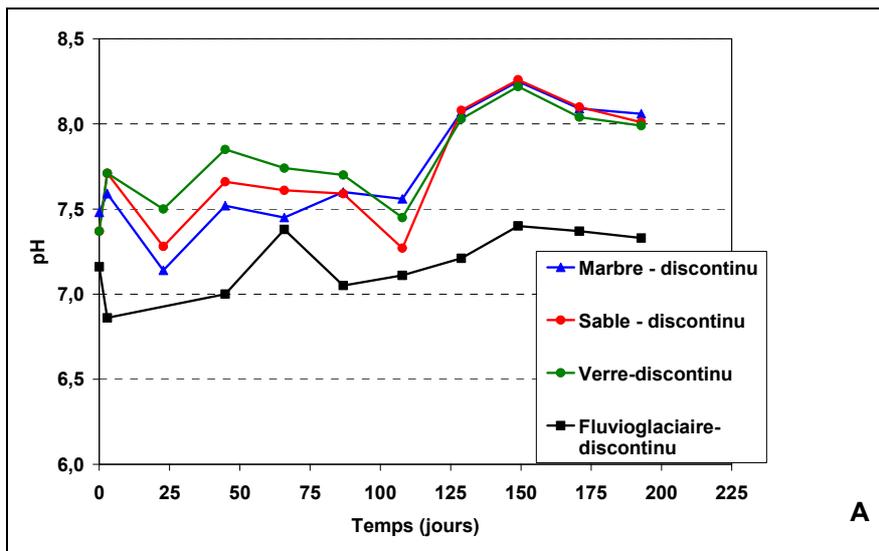
Pour les 3 types de matériaux, le nombre de bactéries fixées sur le support est compris entre 10<sup>6</sup> et 10<sup>7</sup> bactéries.g<sup>-1</sup> matériau (Illustration 20). Contrairement aux essais batch, il n'y a pas de différence entre les matériaux sable, marbre et surtout verre. En effet, le support « Verre » qui semblait limiter la fixation bactérienne lors des essais batch ne présente pas ici de comportement spécifique. Il faut noter que lors des essais colonnes, ce dernier a subi une abrasion afin d'éviter la présence d'angles coupants incompatibles avec une utilisation comme couche drainante sur un bassin d'infiltration. Ceci a eu pour effet de créer des zones d'adhésion favorables à une fixation bactérienne (cf observations MEB).

Dans le cas du sol de référence (fluvioglaciaire), le nombre de bactéries fixées est semblable à celui observé pour les matériaux à l'exception des 2 dernières semaines où une augmentation significative du nombre de bactéries fixées est observée (10<sup>8</sup> bactéries.g<sup>-1</sup> matériau).

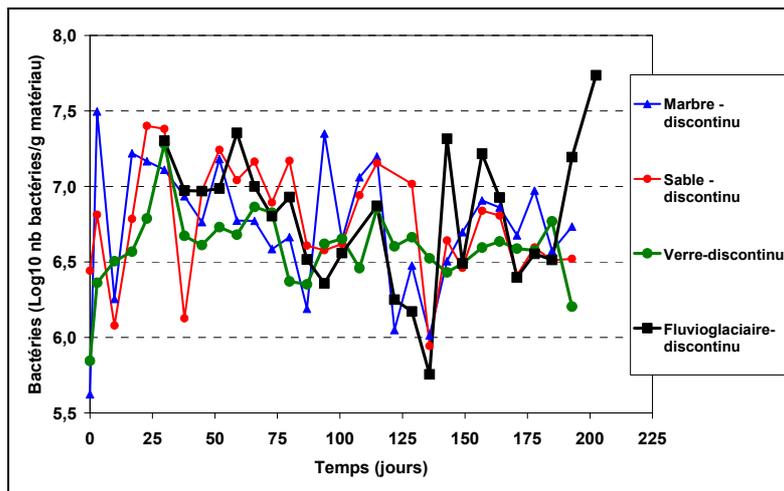
#### *Concentrations en exopolymères*

Dans le cas des matériaux « Sable » et « Marbre », la concentration en EPS glucidique est faible, proche de la limite de quantification et comprise entre 0,5 et 2 mg.l<sup>-1</sup> (Illustration 21A). Il semblerait que la concentration en EPS glucidiques pour le matériau « verre soit plus importante, des concentrations sont mesurées à des valeurs de 2,5 et 4 mg.l<sup>-1</sup>, notamment à partir du 75<sup>ème</sup> jour.

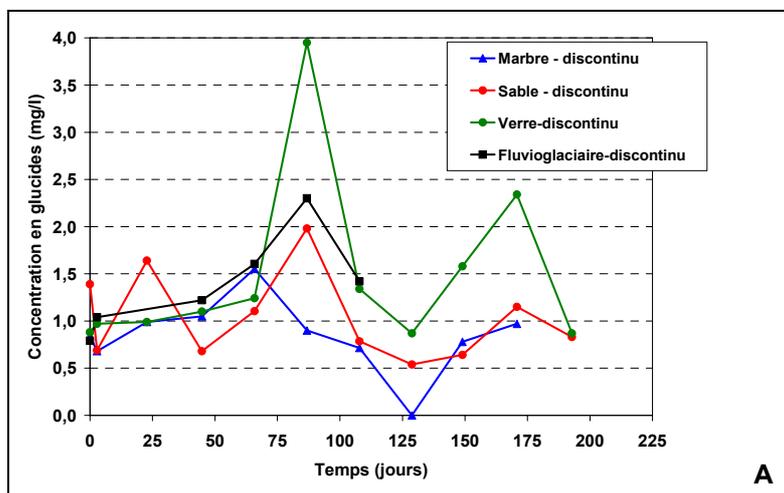
Dans le cas des EPS protéiques, la concentration ne dépasse pas 10 µg.l<sup>-1</sup>, pour les 3 types de matériaux et le sol de référence, valeur proche de la limite de quantification (Illustration 21B). Un pic à 25 µg.l<sup>-1</sup> est observé au 25<sup>ème</sup> jour de fonctionnement mais ne peut pas être considéré comme significatif.



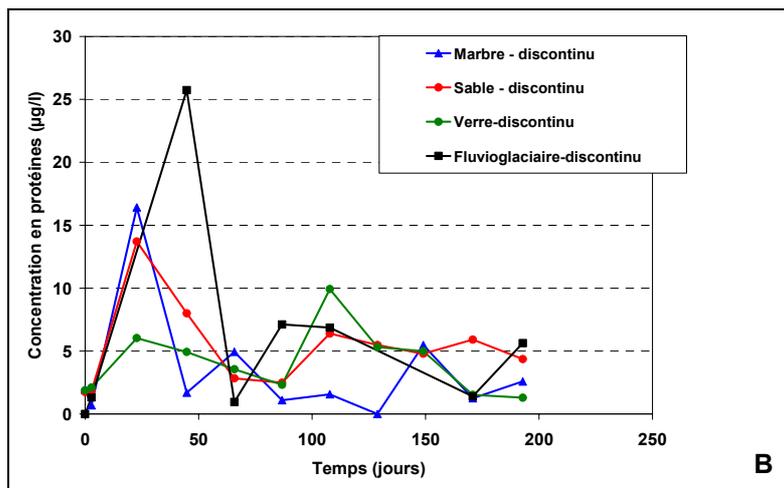
**Illustration 19 : Evolution du pH (A), du potentiel redox (B) et de la concentration en oxygène dissous (C) à l'interface eau/matériau dans les colonnes alimentées en mode discontinu.**



**Illustration 20 : Dénombrements des bactéries fixées sur le support dans les colonnes alimentées en mode discontinu.**



**A**



**B**

**Illustration 21 : Evolution des concentrations en exopolymères libres glucidiques (A) et protéiques (B) à l'interface eau/matériau dans les colonnes alimentées en mode discontinu.**

### 3.2.3.3 Suivi du colmatage

Afin d'évaluer l'impact, sur les écoulements, du lit de matériaux granulaires apporté à la surface de la couche de fluvioglacière, un suivi des débits de sortie a été réalisé sur l'ensemble des colonnes. Dans le cas des colonnes alimentées en continu le suivi a été réalisé sur toute la période d'expérimentation au contraire des colonnes alimentées en alternance pour lesquelles cette mesure a été réalisée lors de la vidange des colonnes, à l'issue de la semaine d'ennoyage et pour lesquelles les temps d'écoulement n'ont été comptabilisés que pendant la période d'écoulement continu.

L'illustration 22 montre l'évolution de la quantité d'effluent cumulée en fonction du temps d'expérimentation pour les colonnes alimentées en continu. On note une progression strictement linéaire de cette grandeur ce qui démontre l'absence de phénomènes de colmatage suffisamment intenses pour limiter la percolation du liquide. Dans ces 2 cas, le débit de sortie du fluide est strictement dépendant du débit d'entrée.

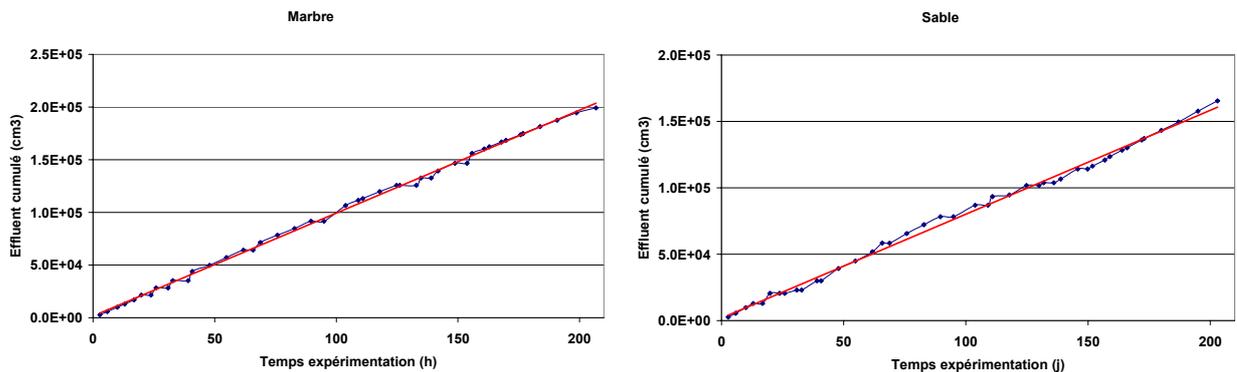


Illustration 22 : Evolution de la quantité d'effluent cumulé en fonction du temps d'expérimentation

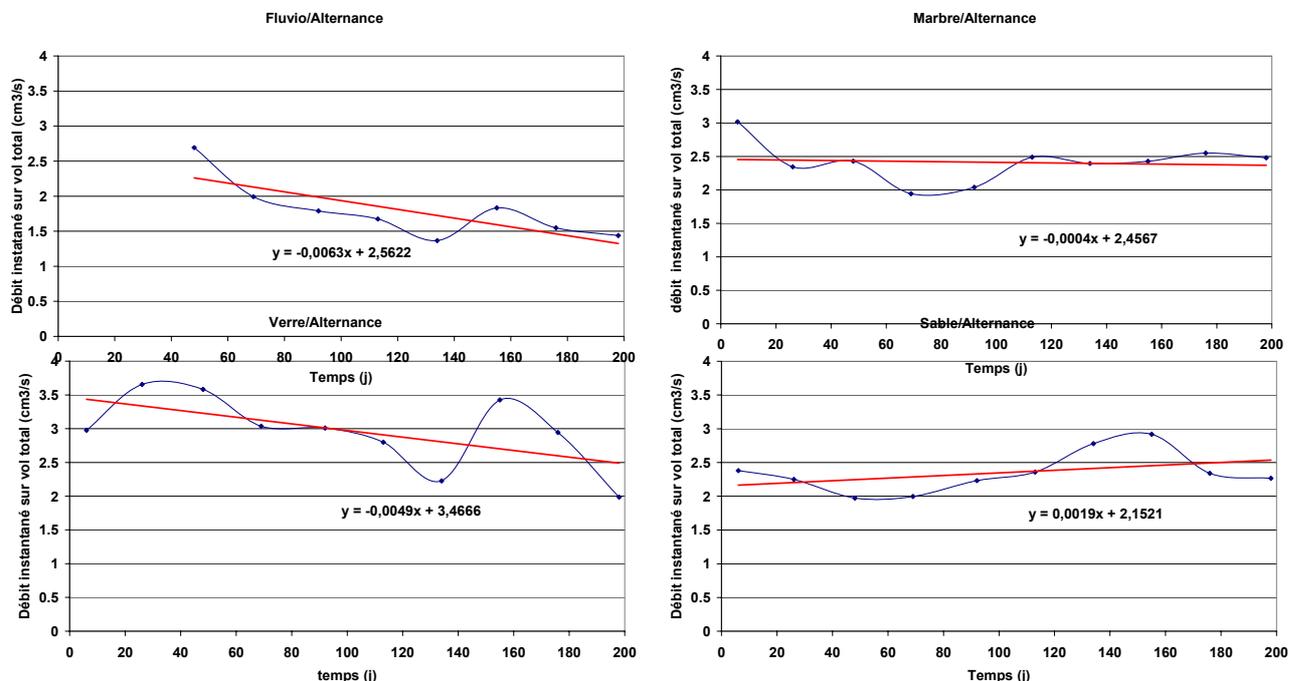


Illustration 23 : Evolution du débit en fonction du temps d'expérimentation, cas du fluvioglacière seul et du fluvioglacière associé au marbre, au sable et au verre.

Dans le cas des colonnes alimentées en mode discontinu, l'évolution du débit mesuré en aval de la colonne (Illustration 23) lors des phases de vidange montre que, dans le cas d'un

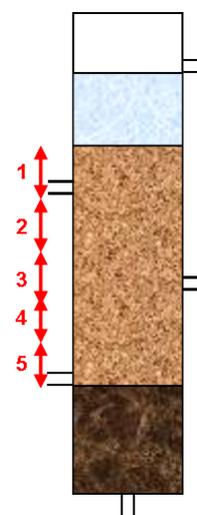
lit de fluvio-glaciaire mis en œuvre sans couche de matériaux granulaires, celui-ci montre une faible limitation au cours du temps.

Dans le cas des lits mixtes fluvio-glaciaire/matériaux granulaires, les mesures de débit réalisées indiquent que celui-ci ne varie pas de façon significative au cours des essais, même après 7 mois d'expérimentation. Il apparaît donc que les lits de matériaux granulaires quelle que soit leur nature retiennent les MES et limitent fortement les phénomènes de colmatage observés dans le cas du lit de fluvio-glaciaire seul.

### 3.2.3.4 Démontage des colonnes alimentées en mode discontinu

En fin d'expérience, les colonnes alimentées en mode discontinu ont été démontées afin d'analyser le matériau sur toute sa hauteur. Le matériau a été divisé en 5 zones et les analyses suivantes ont été effectuées :

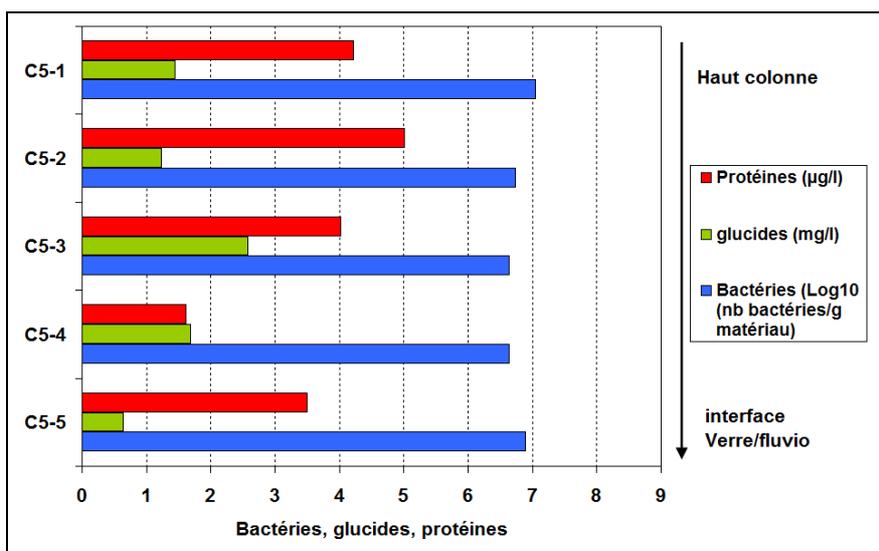
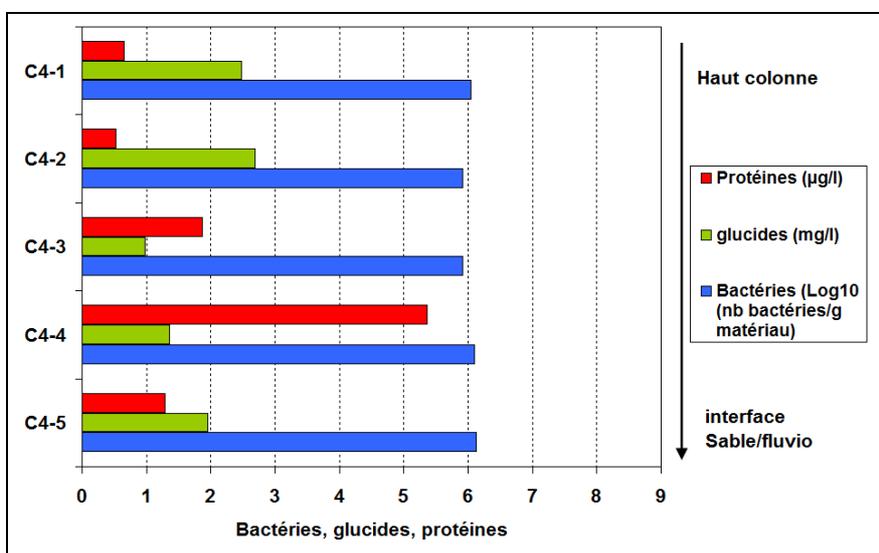
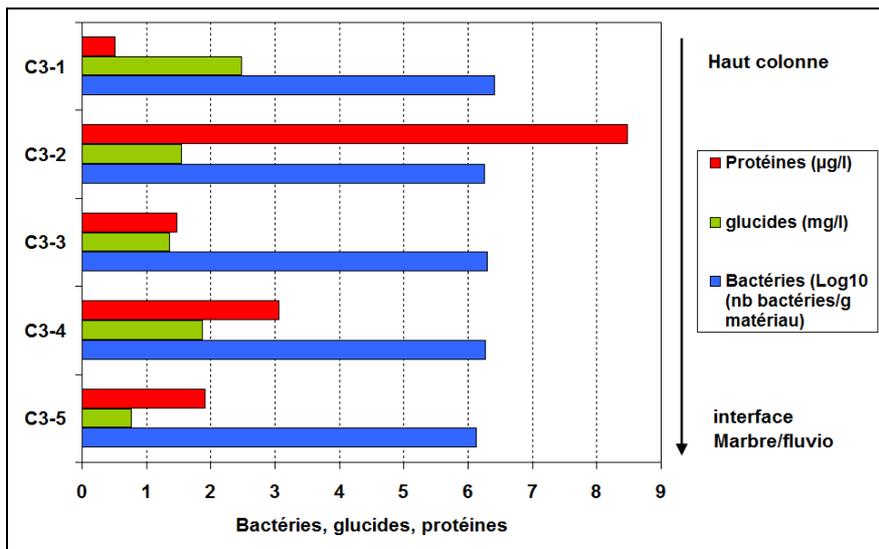
- Dénombrements de **bactéries fixées** sur le matériau après coloration à l'acridine orange
- Dosage des **exopolymères liés au matériau** (glucides, protéines) par dosages colorimétriques
- Mesure des **MES liées au matériau**
- Mesure du **carbone organique du matériau**



Le nombre de bactéries fixées par g de matériau est constant sur la hauteur du matériau et est de  $10^6$  bactéries.g<sup>-1</sup> matériau dans le cas du Marbre et du Sable et de  $10^7$  pour le matériau Verre (Illustration 24). Ce résultat est contradictoire avec les essais batch où le Verre était le matériau le plus défavorable à une adhésion bactérienne. Ceci semble être la conséquence du traitement d'abrasion appliqué au verre afin de supprimer le caractère coupant des arrêtes avant sa mise en œuvre dans les colonnes. En effet les clichés de Microscopie Electronique en Balayage montrent des rayures susceptibles de favoriser l'adhésion des bactéries.

En ce qui concerne l'évolution des concentrations en EPS glucidiques, elle est comprise entre 0,8 et 2,5 mg.l<sup>-1</sup> pour le matériau Marbre, la concentration la plus élevée étant située à l'interface eau/matériau (Illustration 24A). Dans le cas du matériau Sable, les concentrations sont comprises entre 1 et 2,7 mg.l<sup>-1</sup>, les concentrations les plus élevées ne situant en haut de la colonne (Illustration 24B). Les concentrations en EPS glucidiques sont comprises entre 0,6 et 2,5 mg.l<sup>-1</sup> pour le matériau Verre, avec une allure de type Gaussienne où le maximum se situe en milieu de colonne (Illustration 24C).

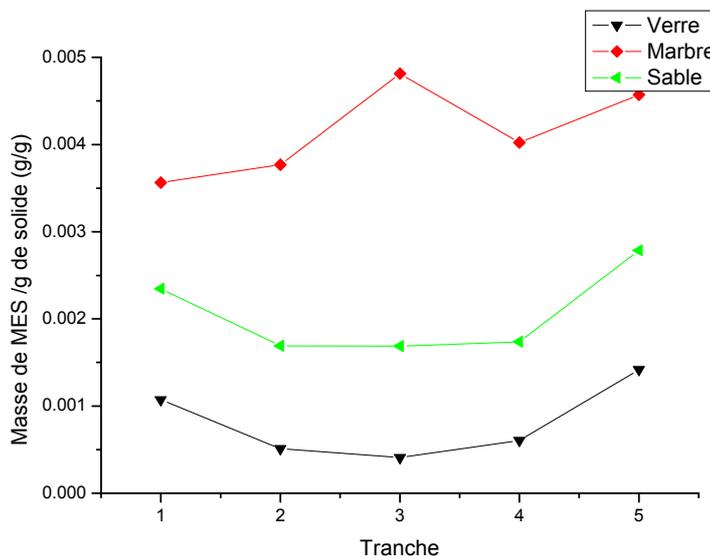
Aucune tendance ne peut être mise en évidence dans le cas de l'évolution des concentrations en EPS protéiques en fonction de la hauteur du matériau. En effet, 8,5 µg.l<sup>-1</sup> d'EPS protéiques est dosé dans la zone C2 pour le matériau Marbre, 5,4 µg.l<sup>-1</sup> dans la zone C4 pour le matériau Sable et une concentration moyenne de l'ordre de 4,5 µg.l<sup>-1</sup> pour le matériau Verre pour les zones de C1 à C3. Pour les autres zones, la concentration est inférieure à 3 µg.l<sup>-1</sup> (Illustration 24).



**Illustration 24: Evolution du nombre de bactéries fixées, d'exopolymères glucidiques et protéiques liés sur les grains de matériau sur la hauteur de la colonne : Marbre (A), Sable (B), Verre (C).**

Les résultats ne montrent pas de corrélation entre le nombre de bactéries fixées, les concentrations en EPS glucidiques et protéiques en fonction de la hauteur de la colonne pour les 3 types de matériaux étudiés.

Les résultats de la mesure des Matières En Suspension (MES) déposées dans les différentes couches de matériaux granulaires séparées lors du démontage des colonnes (3 à 5) sont présentés sur l'illustration 25.



**Illustration 25 : Evolution de la concentration en MES rapportée à la masse de solide granulaire en fonction de la position dans la colonne**

L'évolution observée dans le cas des matériaux verre et sable apparaît semblable avec une concentration réduite de MES dans les tranches intermédiaires de la colonne. Une retenue des MES, principalement dans les couches supérieures du matériau granulaire, est mise en évidence qui peut être corrélée avec l'absence de colmatage observée au cours des expérimentations. Dans le cas du marbre les valeurs sont difficilement exploitables car ce matériau contenait une quantité importante de particules fines lors de sa mise en œuvre qui conduit d'une part à une augmentation de la masse de fines particules mesurée et d'autre part à une répartition notablement différente de celle observée pour les 2 autres matériaux.

### 3.3 Discussion – Conclusion

Suite à une étude bibliographique, 8 matériaux ont été sélectionnés, sur la base de leur capacité potentielle à limiter ou à favoriser le développement de la biomasse, pour leur mise en œuvre dans des essais en batch. Il s'agit de calcaire, feldspath, granite, pouzzolane, quartz, sable, zéolite et de déchets de verre. Par ailleurs, le sol naturel du bassin Django Reinhardt constitué de fluvioglacière a été sélectionné pour constituer le point référence. Lors des essais menés en batch, des dénombrements bactériens ont été réalisés.

Les résultats préliminaires, obtenus suite aux essais en batch menés en 2007 pendant 4,5 mois, montrent clairement qu'il est possible d'influer de façon marquée sur le développement de la biomasse en modifiant la nature du substrat minéral utilisé. Les dénombrements bactériens réalisés ont permis de montrer que le sol naturel du bassin (fluvioglacière) est un substrat particulièrement favorable au développement de la biomasse. Suite à ces essais, un

classement en quatre groupes des solides étudiés a pu être réalisé. La zéolite semble comme le sol naturel du bassin très favorable au développement de la biomasse en raison de la libération par celle-ci d'éléments minéraux constituant des sources potentielles de nutriments pour les bactéries. On y dénombre jusqu'à plus de  $10^{10}$  bactéries par gramme de solide. Le groupe 2 est composé par le granite et le feldspath qui présentent jusqu'à  $10^9$  bactéries par gramme de solide à leur surface alors que le groupe 3 regroupe la pouzzolane, le quartz, le calcaire ainsi que le sable avec des densités de populations bactériennes de l'ordre de  $5 \times 10^8$  bactéries par gramme de solide. Enfin, le verre se démarque fortement des autres matériaux puisque la population bactérienne à sa surface ne dépasse pas  $5 \times 10^7$  bactéries par gramme de solide.

Les essais préliminaires indiquent clairement que les déchets de verre représentent la meilleure solution pour limiter le développement de la biomasse et probablement le colmatage des bassins d'infiltration, aussi ce matériau a été utilisé pour la suite de l'étude. Pourtant, du fait de sa nature et de son caractère potentiellement coupant, le verre apparaît difficile à mettre en œuvre, à la surface des bassins, aux responsables de la gestion des bassins d'infiltration, même si un travail de mise en forme permet d'émousser les arêtes vives coupantes, et ceci en regard d'une possible mise en contact avec le public. Aussi, sa mise en œuvre dans les essais colonnes a-t-elle été précédée d'un traitement permettant de limiter son caractère coupant, ce traitement a consisté en une abrasion par un sable fin de Fontainebleu de telle manière à éroder les arêtes coupantes.

Par ailleurs, sur la base des résultats des essais en batch, les essais en percolation ont été menés en utilisant d'une part du sable roulé qui apparaît comme étant, après le verre, le matériau le plus susceptible de limiter le développement de la biomasse et d'autre part un calcaire puisque ce matériau pourrait s'avérer intéressant en termes de dépollution des eaux même si son potentiel de limitation de la biomasse est modéré. En effet, le choix d'un ou plusieurs matériaux portera non seulement sur ces capacités à limiter la fixation des bactéries et à permettre la filtration des Matières En Suspension mais aussi sur ses propriétés à potentiellement réduire la concentration des polluants présents dans les eaux infiltrantes. La caractérisation physico-chimique du calcaire lithographique utilisé pour les essais en batch ayant révélé une porosité importante, le calcaire mis en œuvre dans les essais en colonnes est un marbre dont la taille des cristallites plus importante permet de limiter la porosité.

Les résultats relatifs aux essais en colonnes avec un lit drainant, marbre ou sable, placé au dessus du sol de référence, alimentées en continu avec de l'eau pluviale (MES de l'ordre de  $50 \text{ mg.l}^{-1}$ ) durant 7 mois ne mettent pas évidence un colmatage des colonnes. Ce comportement est probablement consécutif à la rétention physique des MES sur toute la hauteur du lit de matériau granulaire qui ne se retrouvent pas en quantité suffisante à l'interface matériau granulaire/fluvioglaciaire pour provoquer un colmatage. Après 7 mois, l'observation visuelle montre que une partie des MES est retenue par les 2-3 premiers centimètres de matériau. Le suivi du nombre de bactéries fixées sur les matériaux à l'interface eau/matériau apparaît constant au cours du temps de même que la quantité d'EPS glucidique et protéique qui sont présents en très faible quantité.

De la même façon, lors de la succession des phases d'immersion et d'émersion imposées à des colonnes contenant comme matériau drainant du marbre, du sable ou du verre, aucun phénomène de colmatage n'a pu être observé après 7 mois de fonctionnement. Concernant le développement d'un biofilm bactérien, les mêmes conclusions que pour les colonnes alimentées en continu peuvent être tirées. Le granulats de verre qui a présenté, lors des essais en batch, un fort pouvoir de limitation du développement de la biomasse n'a pas confirmé ce comportement lors des essais en colonne. Cette forte différence de comportement du verre entre les deux types d'essais révèle clairement l'importance que peut

revêtir le paramètre « rugosité de surface » dans le développement de la biomasse fixée sur solide. En effet, les deux échantillons de verre utilisés différaient en cela que le granulat mis en place dans les colonnes avait subi un traitement mécanique, en vue de limiter son caractère coupant, qui a conduit au développement d'une rugosité de surface.

Dans le cadre de cette étude, seul l'effet des MES et du développement d'un biofilm bactérien ont été pris en compte dans l'étude du colmatage. Le développement algaire a été volontairement écarté mais il semble que celui-ci puisse être un facteur important pour ces phénomènes. D'après les résultats de notre étude, la présence de MES dans les eaux ainsi que le développement d'un biofilm bactérien ne sont pas les paramètres prépondérants dans le phénomène de colmatage du bassin d'infiltration tel qu'il est observé *in situ*. Il faut malgré tout noter que, au cours de notre étude, l'alimentation des colonnes a été réalisée avec une eau faiblement chargée en MES. Toutefois, parmi les facteurs susceptibles d'avoir un effet sur le développement d'un biofilm bactérien et ainsi entraîner un colmatage du bassin, il apparaît que la rugosité du matériau soit le paramètre principal susceptible de jouer un rôle dans l'adhésion bactérienne. Ceci est mis en évidence par l'étude du matériau Verre qui est clairement apparu comme étant très défavorable à la formation des biofilms lorsqu'il ne présente pas de rugosité de surface (essais en batch) mais perd toute efficacité une fois sa surface dépolie (essais en colonnes). du fait de la création de rugosités de surface favorables à l'accrochage des biofilms bactériens.

D'autre part, les résultats de notre étude démontrent que l'influence des vers sur le phénomène de colmatage par les sédiments urbains dépend clairement des caractéristiques physiques des sédiments urbains. Dans notre cas, il semble que la taille très fine des particules contenues dans les sédiments de Django-Reinhardt limite l'action des vers en créant une couche que les oligochètes ne peuvent traverser. Si les sédiments sont plus grossiers (cas des sédiments urbains de l'IUT), les vers produisent de denses réseaux de galeries qui agissent comme des drains à travers la couche colmatée, augmentant du même coup la perméabilité du système (plus de détails sur l'action des vers sont données dans Nogaro et al. 2006). Cette réduction du colmatage favorise les conditions aérobies dans la matrice sédimentaire, stimulant les processus de dégradation de la matière organique. L'augmentation de la conductivité hydraulique accroît aussi le flux vertical de HAP relargués des sédiments urbains (comme le naphthalène). En conclusion, nos résultats démontrent que l'effet des invertébrés sur la conductivité hydraulique (dans les sédiments de l'IUT) influence le fonctionnement global de la colonne sédimentaire (équilibre entre processus aérobies et anaérobies, interactions entre les flux d'eau et le relarguage de polluants présents sur les sédiments). De plus, la comparaison des systèmes impactés par les deux types de sédiments urbains indique que les flux verticaux de polluants (allant potentiellement vers la nappe phréatique) sont intimement liés à la perméabilité des sédiments urbains déposés (laquelle contrôle le flux vertical en eau). En conséquence, les caractéristiques physiques des sédiments urbains sont importantes afin d'estimer les flux de polluants mais aussi le rôle potentiel des vers tubificidés dans les systèmes d'infiltration.

### 3.4 Références bibliographiques

- AFNOR (1999). *La qualité de l'eau*. Association Française de la normalisation, Paris.
- Azeredo J, Oliviera R. (2003). The role of hydrophobicity and exopolymers in initial adhesion and biofilm formation. *Biofilms in Medecine, Industry and Environmental Biotechnology*. Edited by P. Lens, A.P. Moran, T. Mahony, P. Stoodley and V. O'Flaherty. IWA Publishing, ISBN:1 84339 019 1, 16-31.
- Bayouhd S., Othmane A., Bettaieb F., Bakhrouf A., Ben Ouada H., Ponsonnet L. (2006). Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Materials Science and Engineering C*, 26, 300-305.
- Bourion F. (2000). Les biofilms dans les bio-industries. ASEPT 2<sup>ème</sup> édition. Collection Revue de la littérature. IBSN 2-908428-18-0. p105.
- Chen G., Zhu H. (2005). Bacterial adhesion to silica sand as related to Gibbs energy variations. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44, 41-48.
- Donlan R.M., (2002). Biofilms : Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881-890.
- Ghidaglia, C. (1994). Filtration en profondeur de particules. Thèse Univ. Paris VI.
- Herig J. P., Leclerc D., Le Goff P. (1970). Flow of suspensions through porous media. Application to deep filtration. *Industrial and engineering Chemistry*, vol 62 (5), 8-35.
- Liu Y., Yang S.-F., Liu Q.-S., Tay J.-H. (2003). the role of cell hydrophobicity in the formation of aerobic granules. *Current microbiology*, 46, 270-274.
- Meyer B. (2003). Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Bioremediation & Biodegradation*, 51, 249-253.
- Moran A.P., Ljungh A. (2003). Physico-chemical properties of extracellular polymeric substances. *Biofilms in Medecine, Industry and Environmental Biotechnology*. Edited by P. Lens, A.P. Moran, T. Mahony, P. Stoodley and V. O'Flaherty. IWA Publishing, ISBN:1 84339 019 1, 91-112.
- Nadji D. (1998). Colmatage d'un milieu modèle par une suspension d'argile : application au colmatage des chaussée poreuses. Thèse Ecole nationale des ponts et chaussées.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., François-Carcaillet, F., Gaudet, J.P, Lafont, M. and Gibert, J. (2006). Invertebrate bioturbation can reduce the clogging of sediment: an experimental study using infiltration sediment columns. *Freshwat. Biol.*, 51, 1458-1473.
- Roberts, J.A., (2004) – Inhibition and enhancement of microbial surface colonization: the role of silicate composition. *Chemical Geology*, 212, pp. 313-327.
- Rodon, K.-C. Lee, R. Pfeffer, A.M. Squires and O.K. Sønju (2005). Granular-bed filtration assisted by filter-cake formation: 2. The panel bed gas filter with puffback renewal of gas-entry surfaces. *Powder Technology*, 155, 52-61.
- Rogers, J.R., Bennett, P.C., Choi, W.J., (1998). Feldspars as a source of nutrients for microorganisms. *Am. Mineral.*, 83, 1532 – 1540.
- Scholl M.A., Mills A.L., Herman J.S, Hornberger G.M. (1990) – The influence of mineralogy and solution chemistry on the attachment of bacteria to representative aquifer materials. *Journal of Contaminant Hydrology*, 6 (4), pp.321 – 336.
- Zheng X., Arps P.J., Smith R.W. (2001). Adhesion of two bacteria onto dolomite and apatite: their effect on dolomite depression in anionic flotation. *Int. J. Miner. Process.*, 62, 159-172.

## 4 ANNEXE

---

## 1. Nature de l'essai :

La fraction cristallisée des échantillons est déterminée par diffractométrie des rayons X à partir de leur diagramme de poudre. Cette technique est surtout qualitative et ne peut donner qu'une indication semi-quantitative. Le seuil de détection est de l'ordre de 5%, mais peut largement varier en fonction de la nature des différentes phases.

Une phase dite « amorphe aux rayons X » peut être : une phase non cristallisée ou une phase cryptocristalline.

---

## 2. Appareillage et conditions expérimentales :

Appareillage : Diffractomètre SIEMENS D5000 automatisé

Conditions expérimentales :

- Balayage de 4 à 84°2θ
- Vitesse de balayage de 0,02°2θ/seconde
- Temps de comptage : 1 seconde par pas
- Echantillon tournant
- Tube au Cobalt ( $\lambda$  K $\alpha$ 1  $\approx$  1,789 Å)

Traitement des diagrammes : Logiciel DIFFRAC<sup>plus</sup>

---

## 3. Résultats d'analyse

### Echantillon Feldspath

- plagioclase (albite sur le diagramme) très abondant
- quartz en traces à faible
- micas et/ou illite en traces

### Echantillon Calcaire

- calcite très abondante

### Echantillon Granite

- quartz faible à présent
- plagioclase (albite sur le diagramme) faible à présent
- microcline en traces à faible
- diopside en traces
- micas et/ou illite en traces à faible
- chlorite en traces

### Echantillon Fluvio

- quartz faible à présent
- calcite faible à présente
- plagioclase (albite sur le diagramme) en traces à faible
- microcline en traces à faible
- micas et/ou illite en traces
- chlorite en traces

### Echantillon Sable

- quartz présent
- microcline en traces à faible
- plagioclase (albite sur le diagramme) en traces à faible
- diopside en traces
- illite et/ou micas en traces

### Echantillon Pouzzolane

- augite en traces à faible
- anorthite en traces à faible
- hématite en traces
- cristobalite en traces
- maghémite en traces
- néphéline en traces
- forstérite en traces
- analcime probable en traces
- spinelle type franklinite probable en traces
- silicate de sodium et aluminium (structure proche de la sodalite) probable en traces
- phase amorphe aux rayons X présente

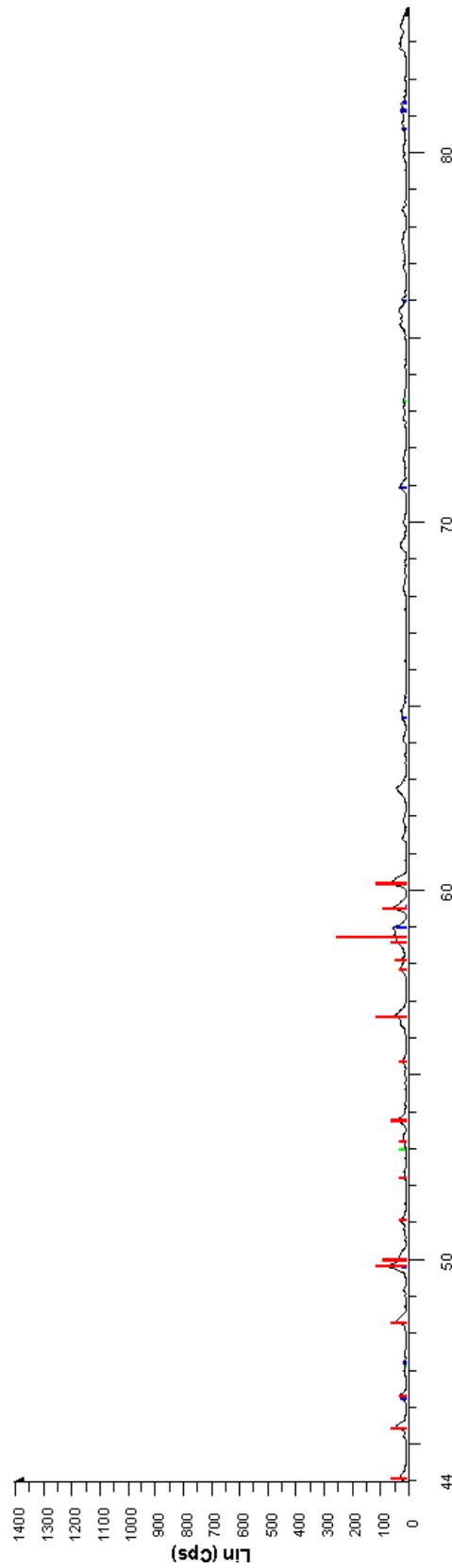
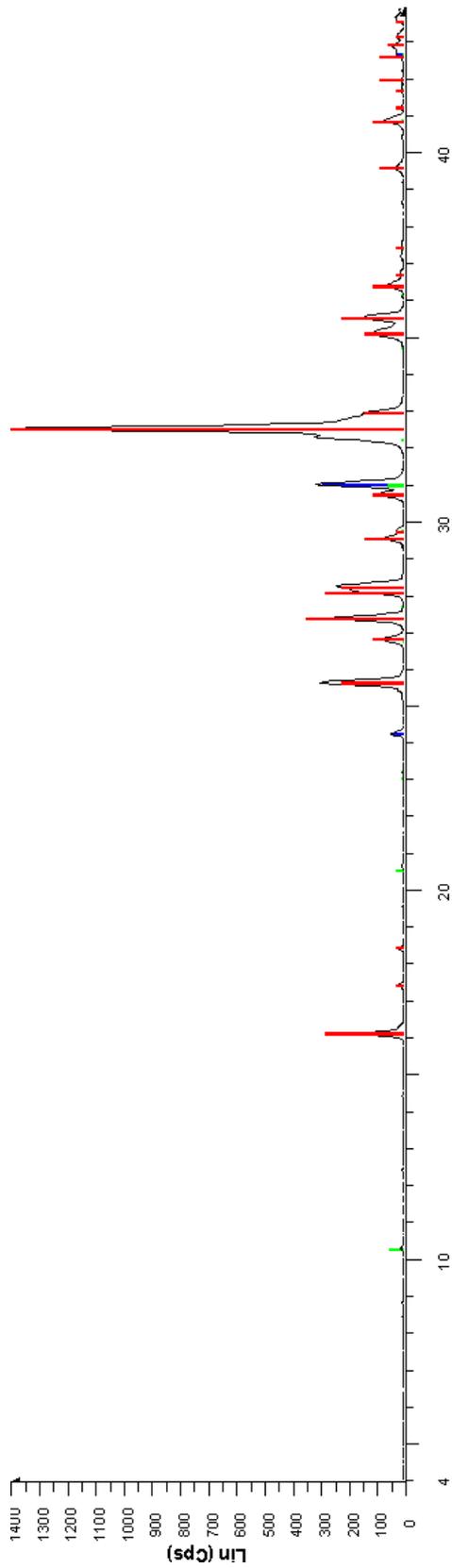
---

## **4. Observations**

Il serait nécessaire d'effectuer des analyses sur lames orientées afin de confirmer les phyllosilicates (chlorite, illite et/ou micas) identifiés dans cette étude.

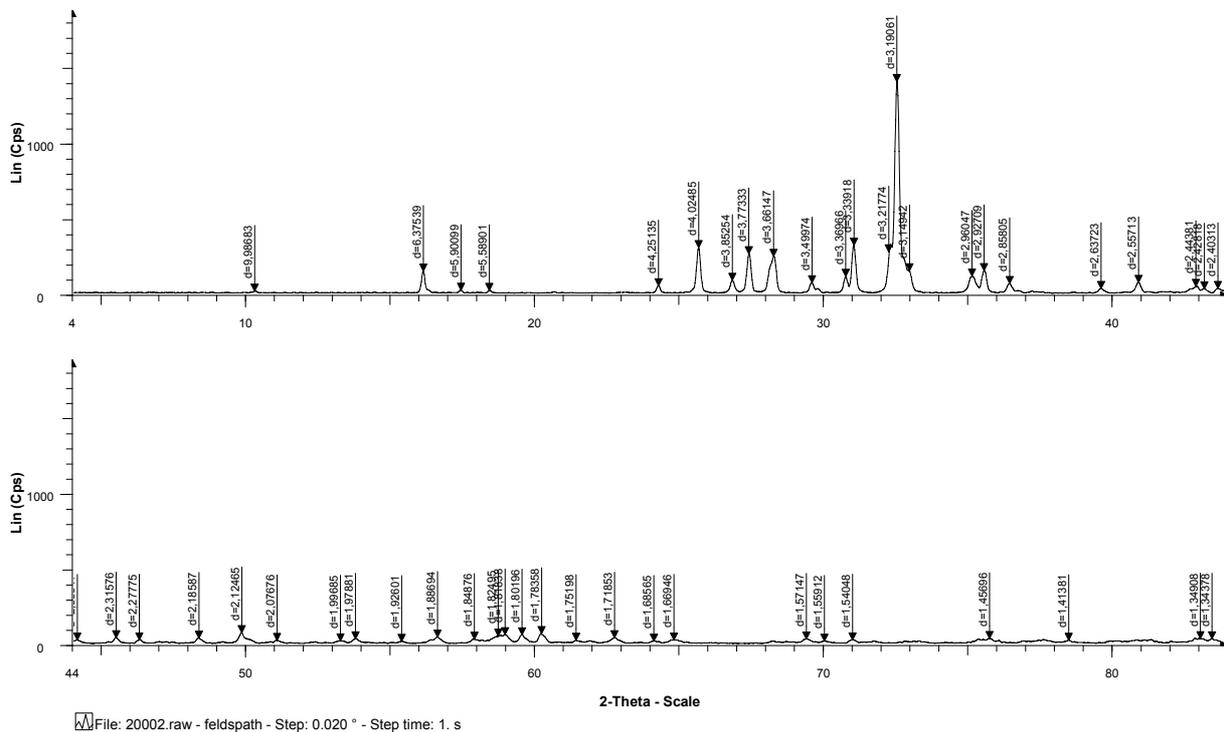
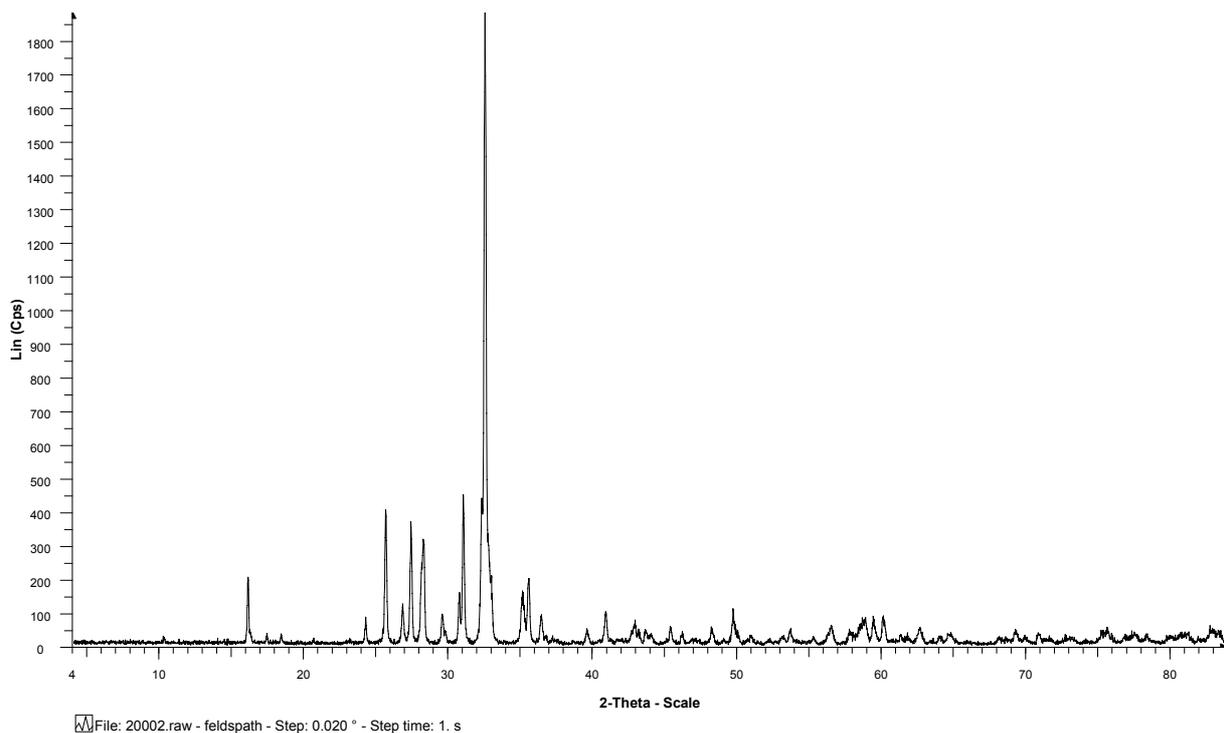
### Pour chaque échantillon :

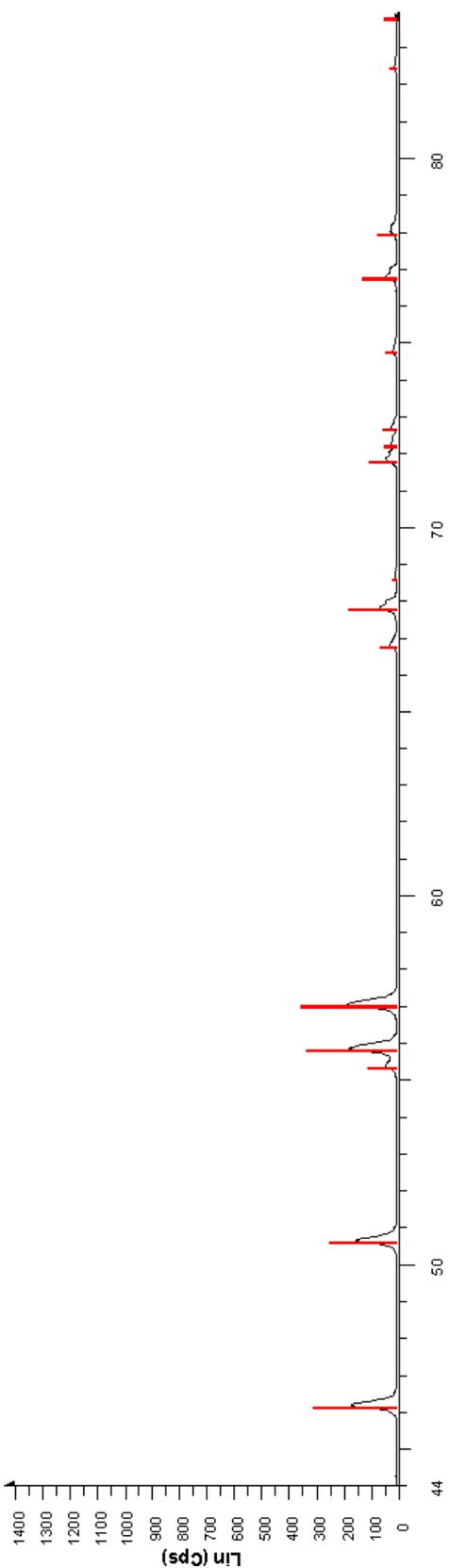
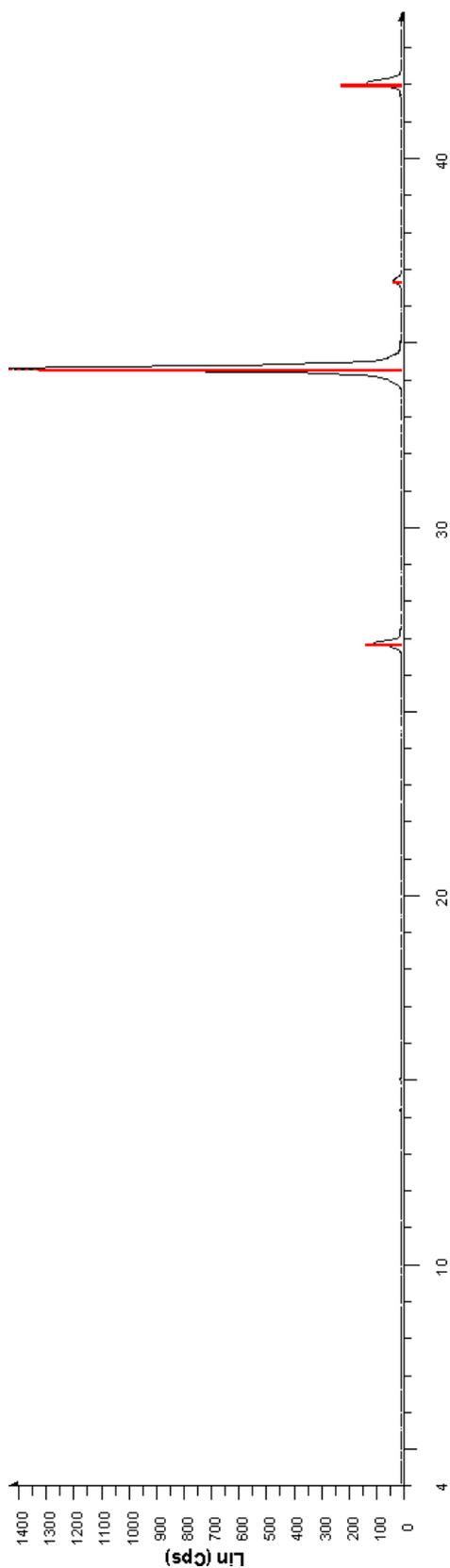
- Le diffractogramme interprété avec les références internationales J.C.P.D.S. (mise à jour de la base 2003)
- Le diagramme brut
- Le diffractogramme avec les valeurs (en Å) attribuées à chaque pic



2-Theta - Scale

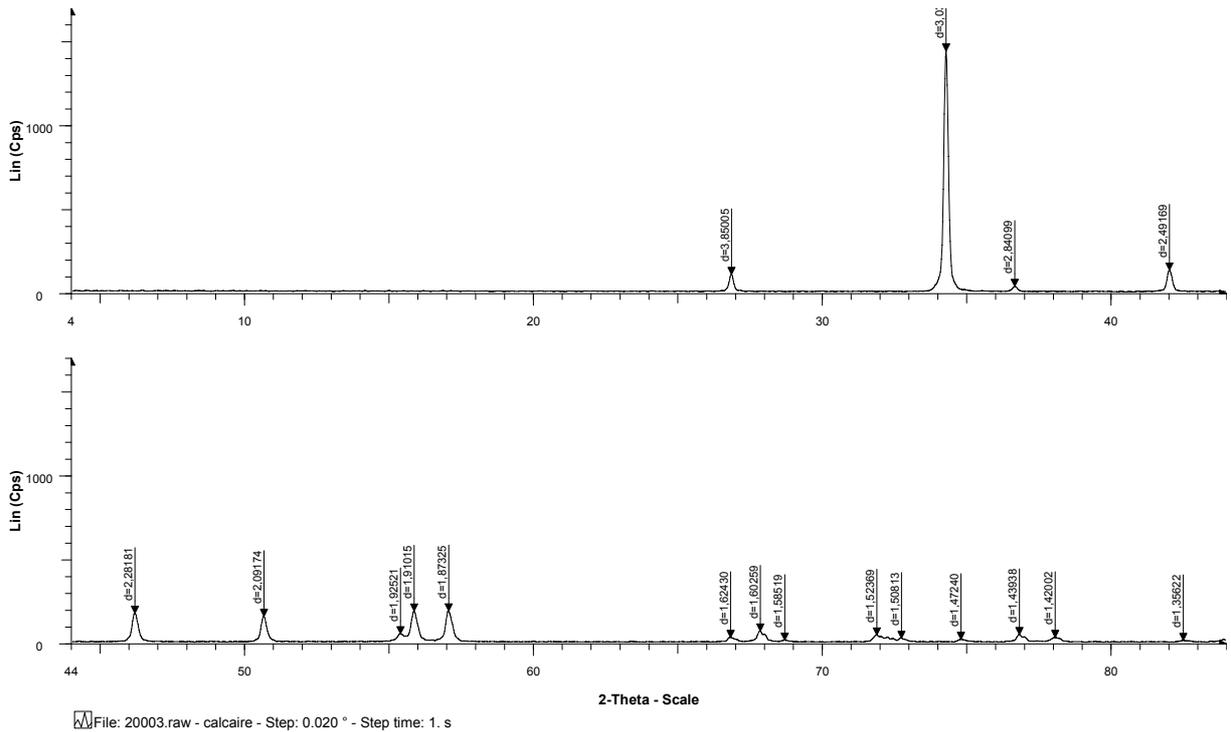
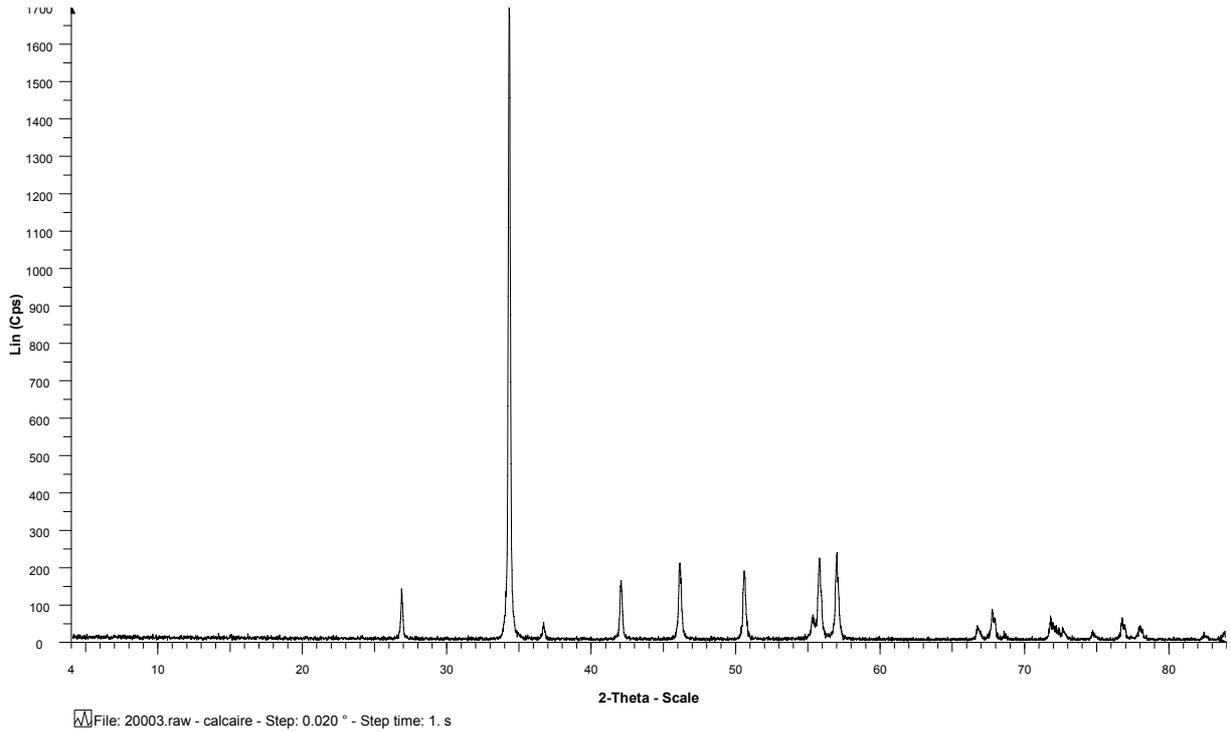
File: 20002.raw - feldspath - Step: 0.020 ° - Step time: 1. s  
 00-009-0466 (\*) - Albite, ordered - NaAlSi3O8  
 00-046-1045 (\*) - Quartz, syn - SiO2  
 00-026-0911 () - Illite-2M1 [NR] - (K,H3O)Al2Si3AlO10(OH)2

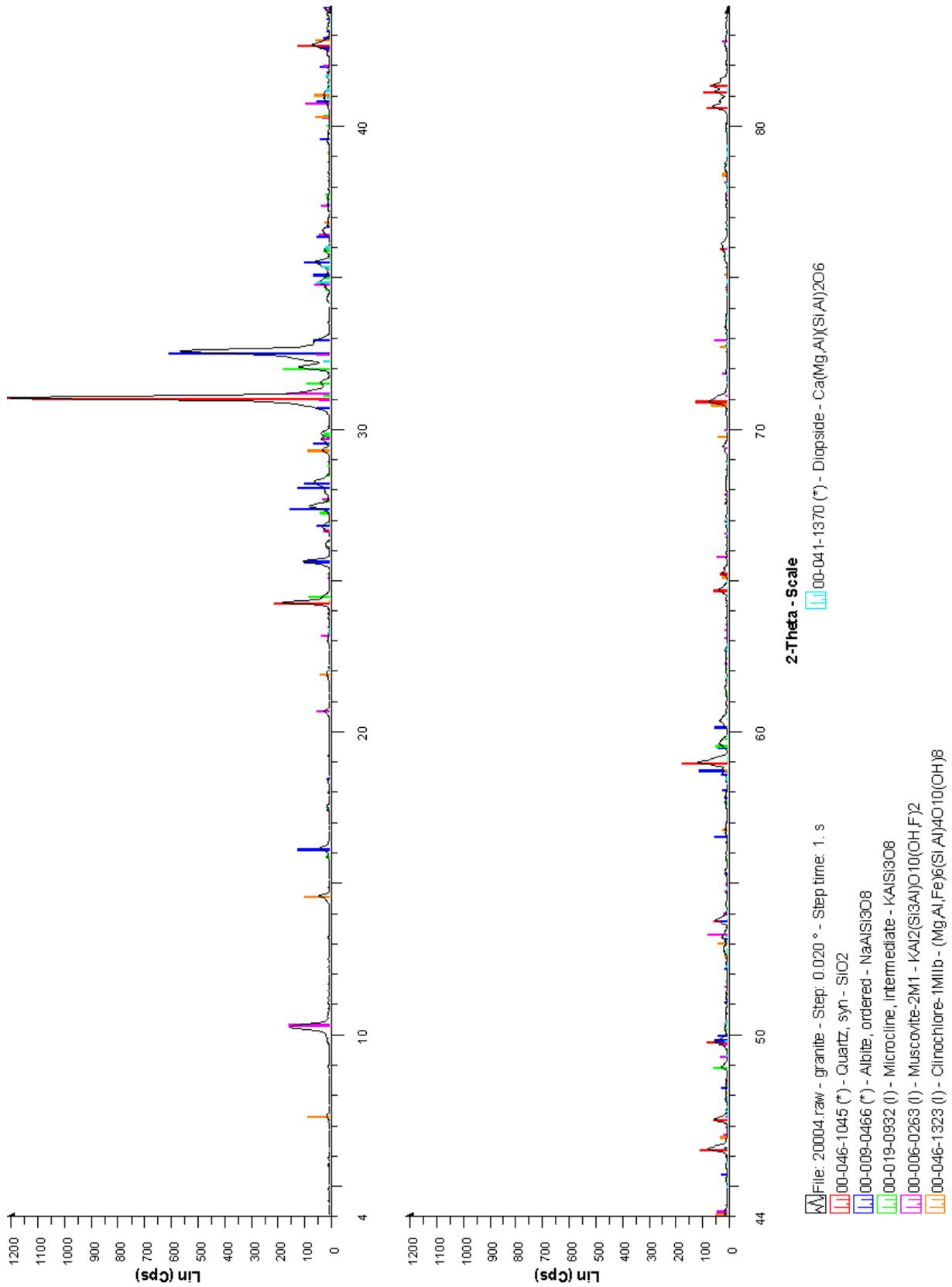


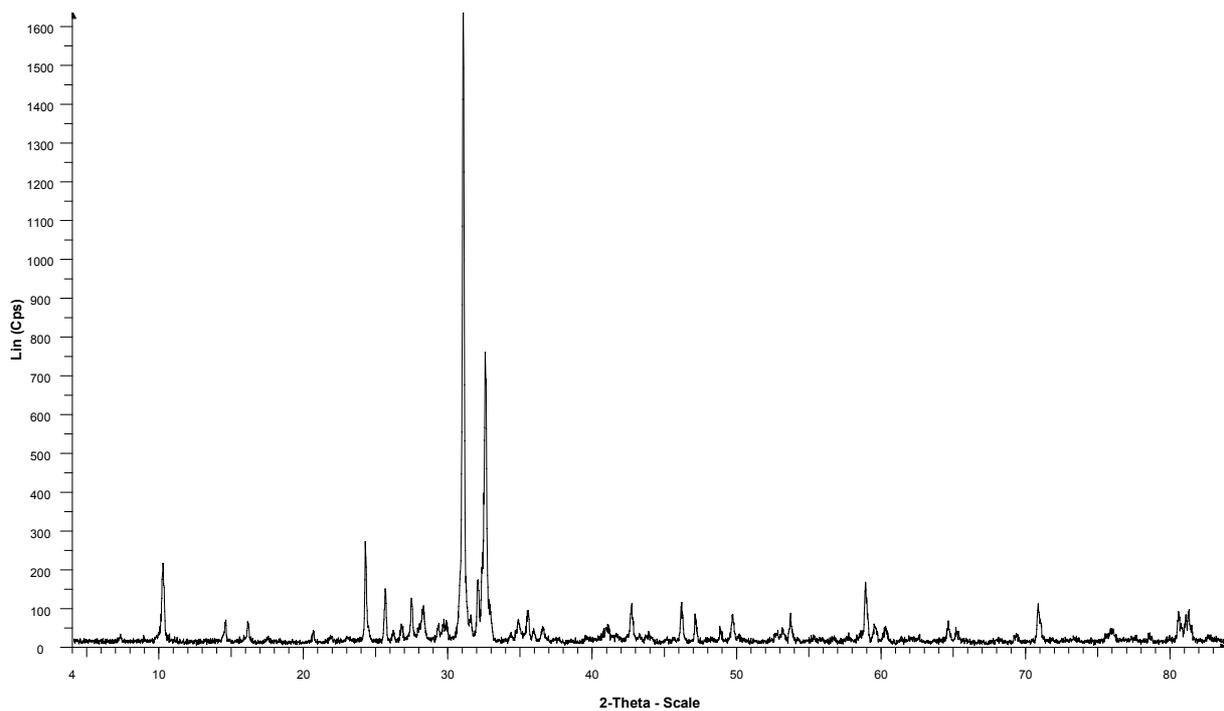


2-Theta - Scale

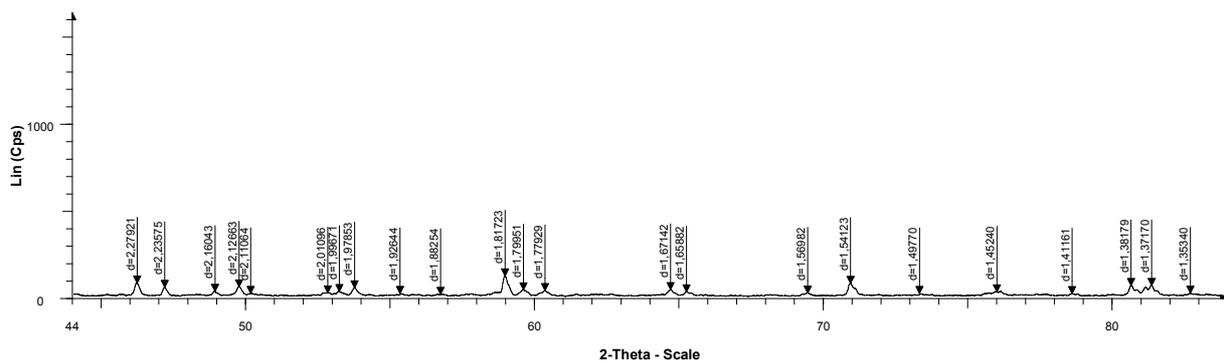
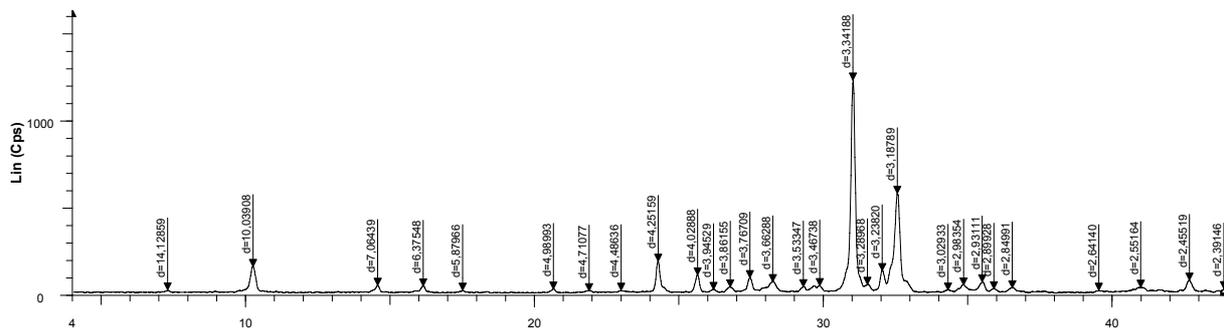
File: 20003.raw - calcaire - Step: 0.020 ° - Step time: 1. s  
00-047-1743 (C) - Calcite - CaCO3



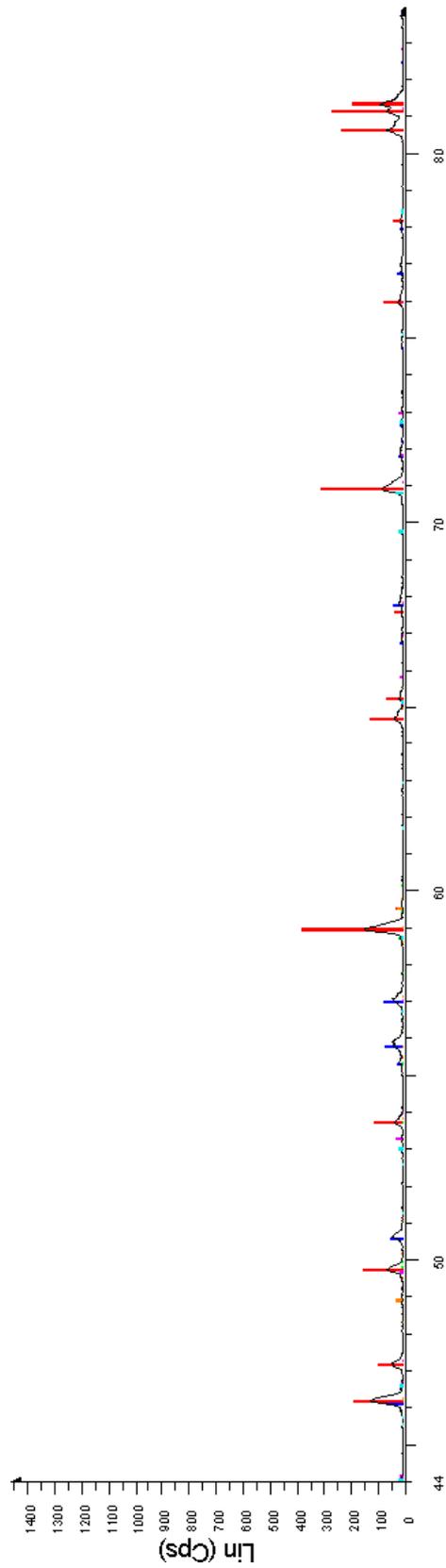
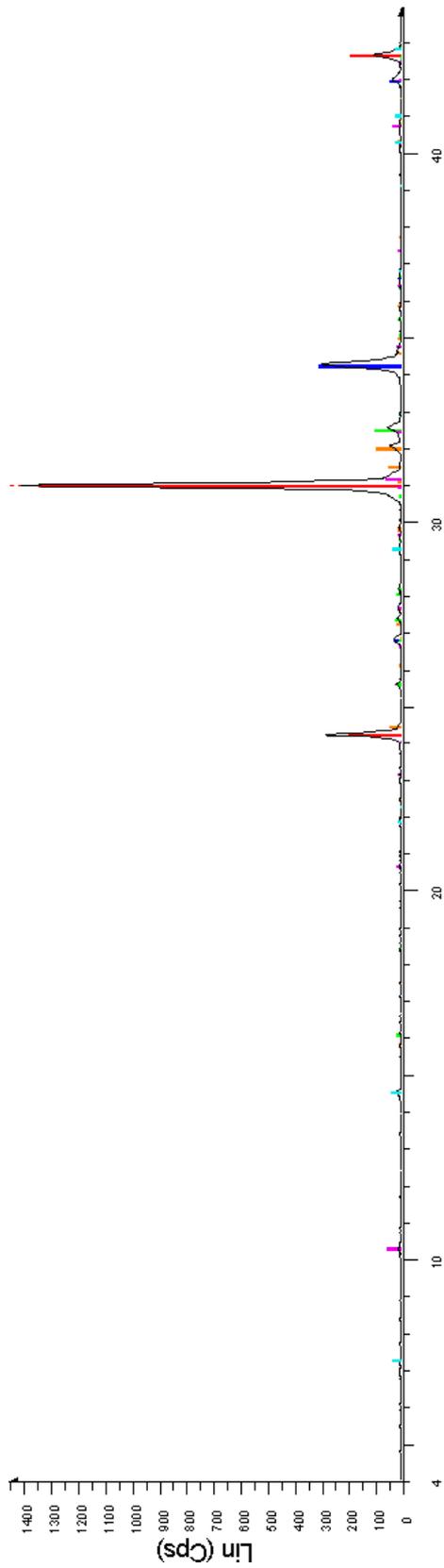




File: 20004.raw - granite - Step: 0.020 ° - Step time: 1. s

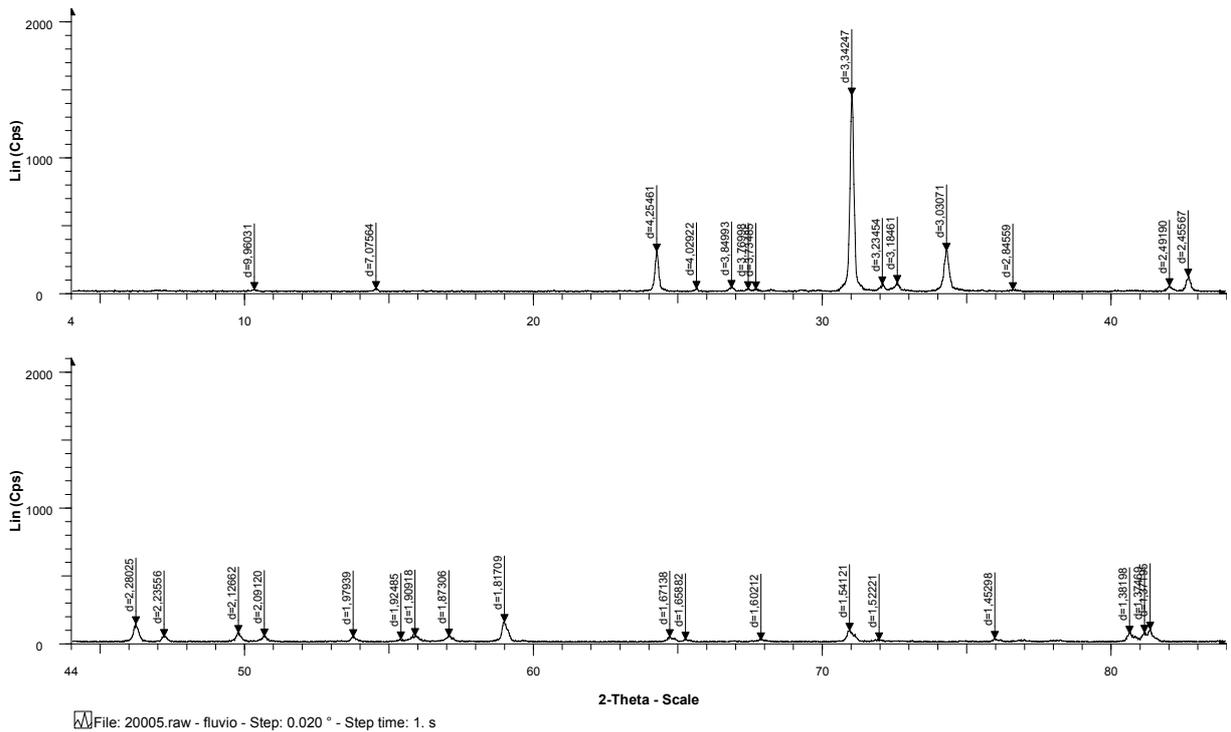
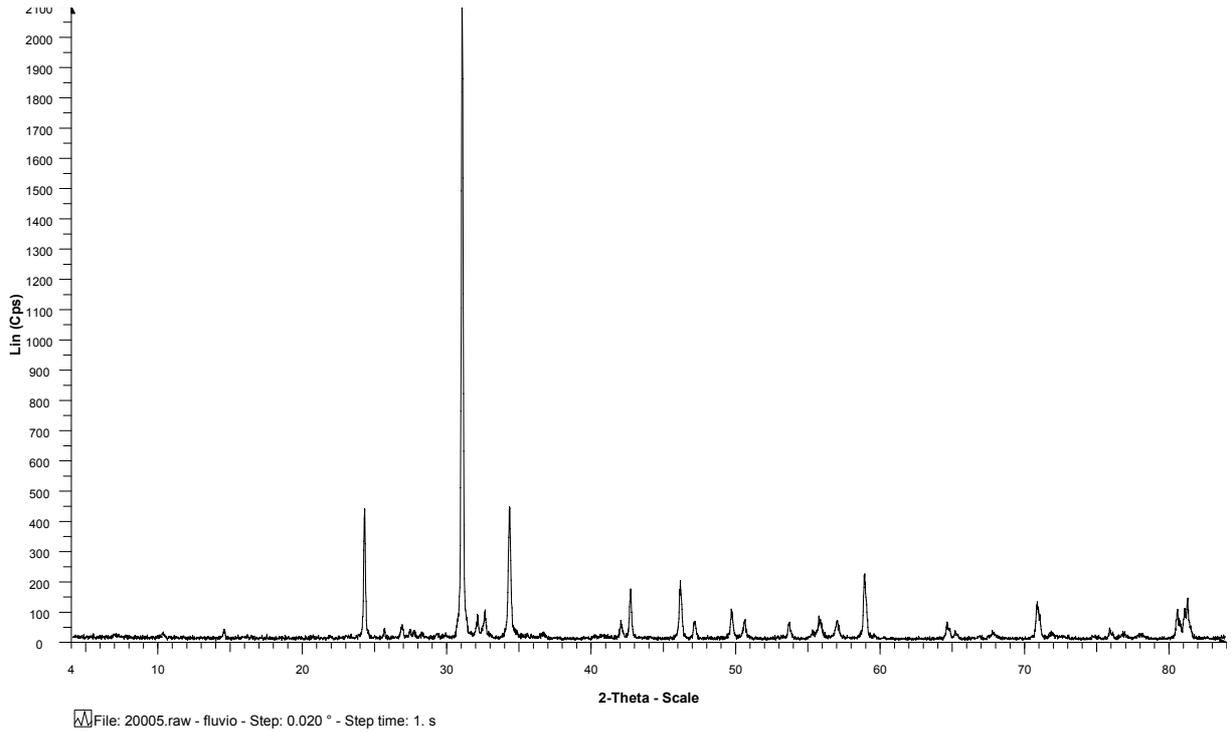


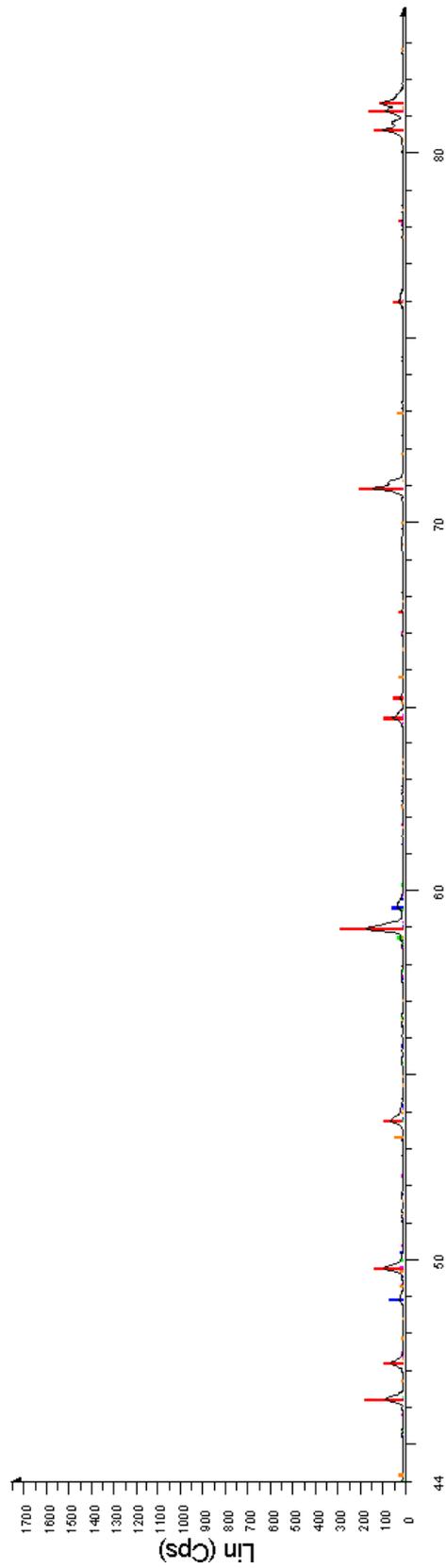
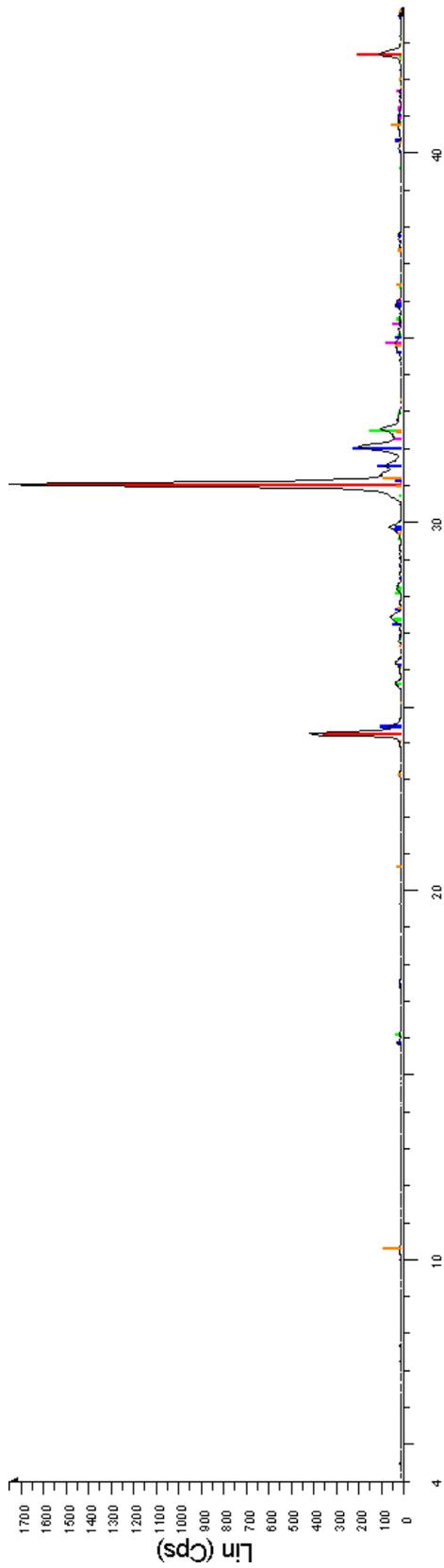
File: 20004.raw - granite - Step: 0.020 ° - Step time: 1. s



**2-Theta - Scale**

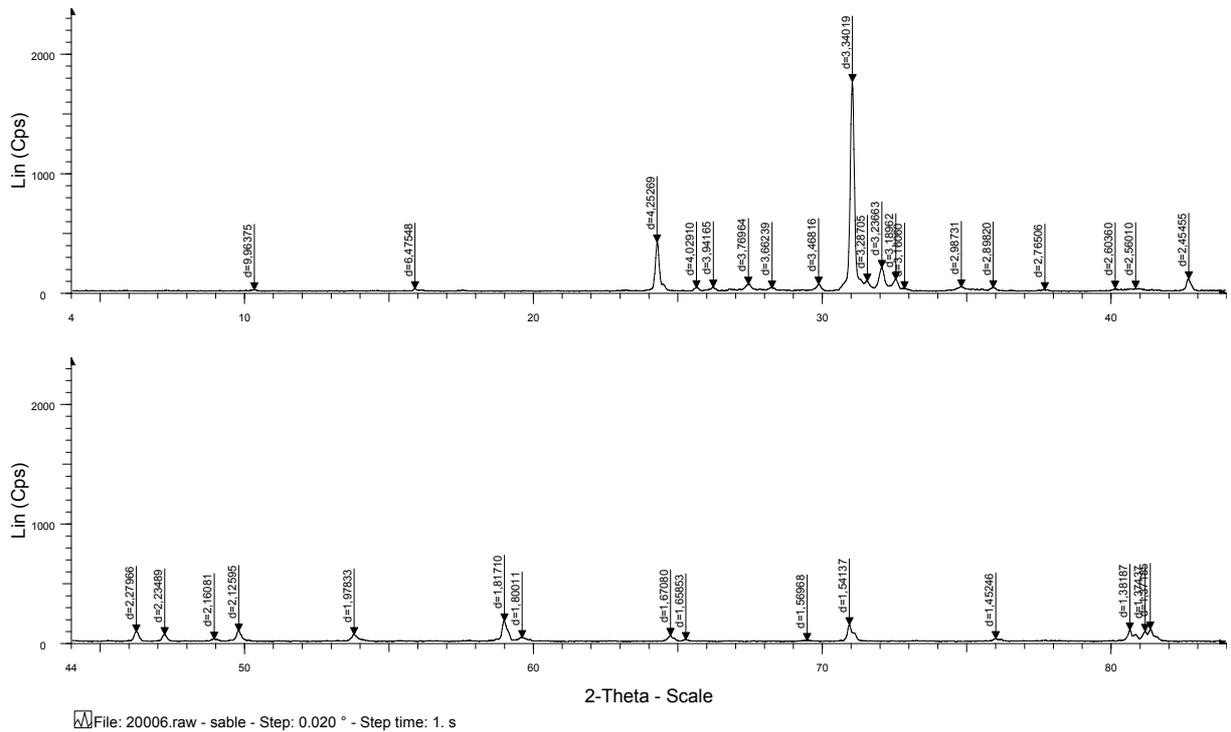
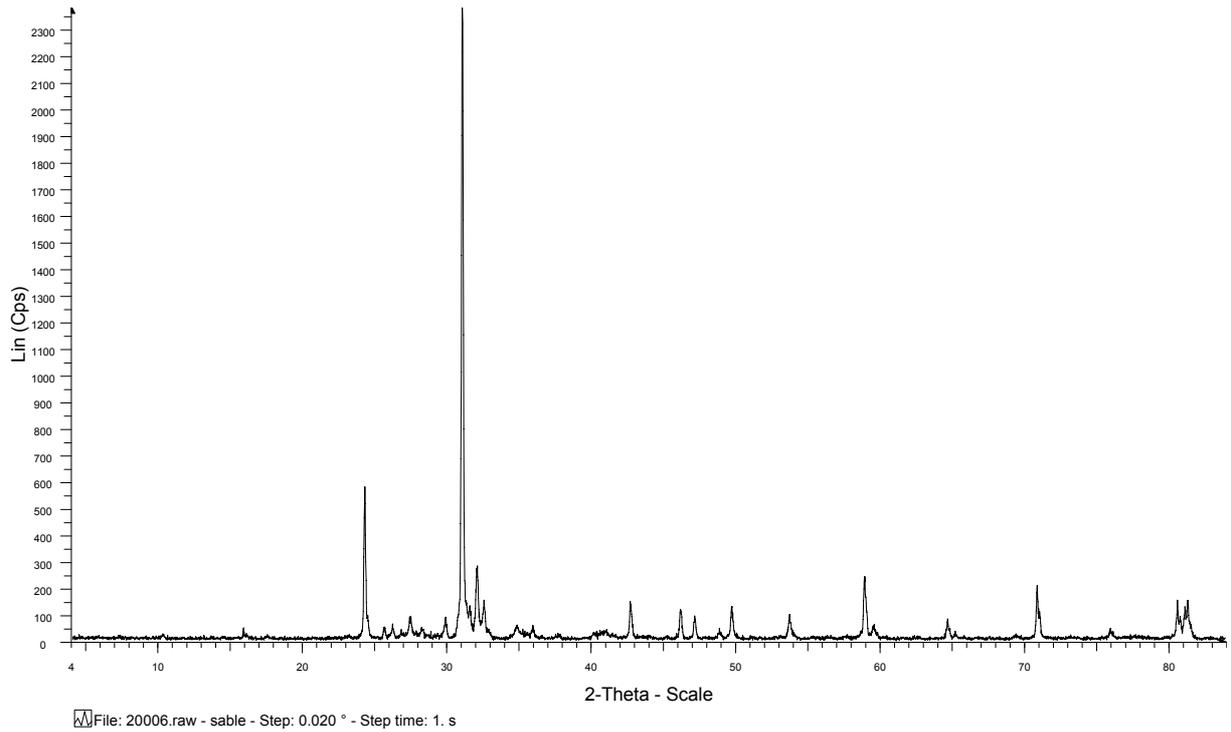
- File: 20005.raw - fluxio - Step: 0.020 ° - Step time: 1. s
- 00-046-1045 (\*) - Quartz, syn - SiO2
- 00-047-1743 (C) - Calcite - CaCO3
- 00-009-0466 (\*) - Albite, ordered - NaAlSi3O8
- 00-019-0932 (I) - Microcline, intermediate - KAlSi3O8
- 00-006-0263 (I) - Muscovite-2M1 - KA12(Si3Al)O10(OH,F)2

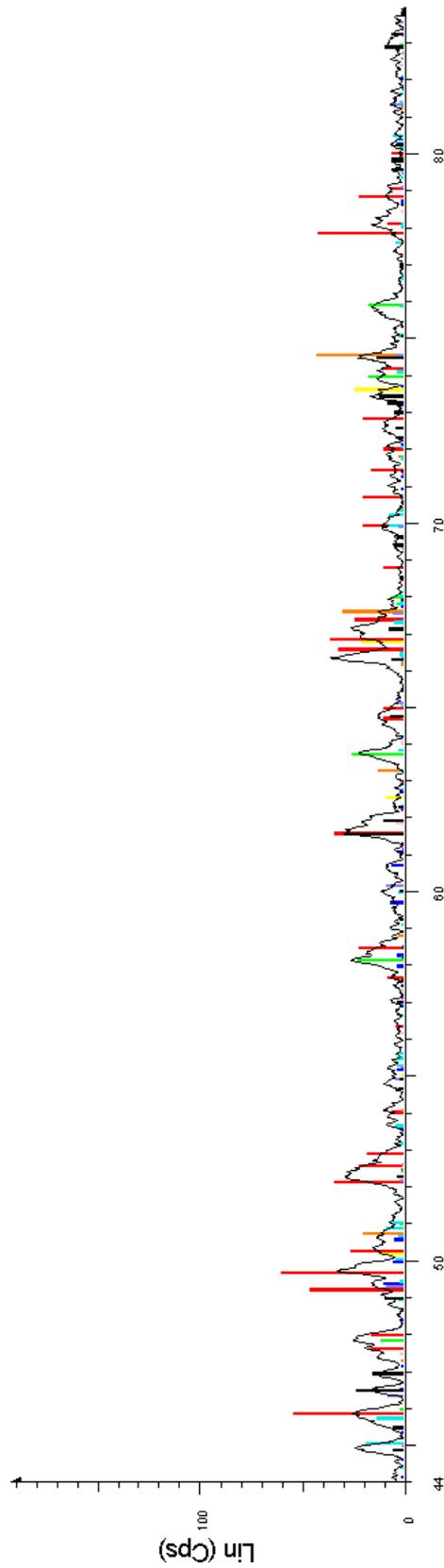
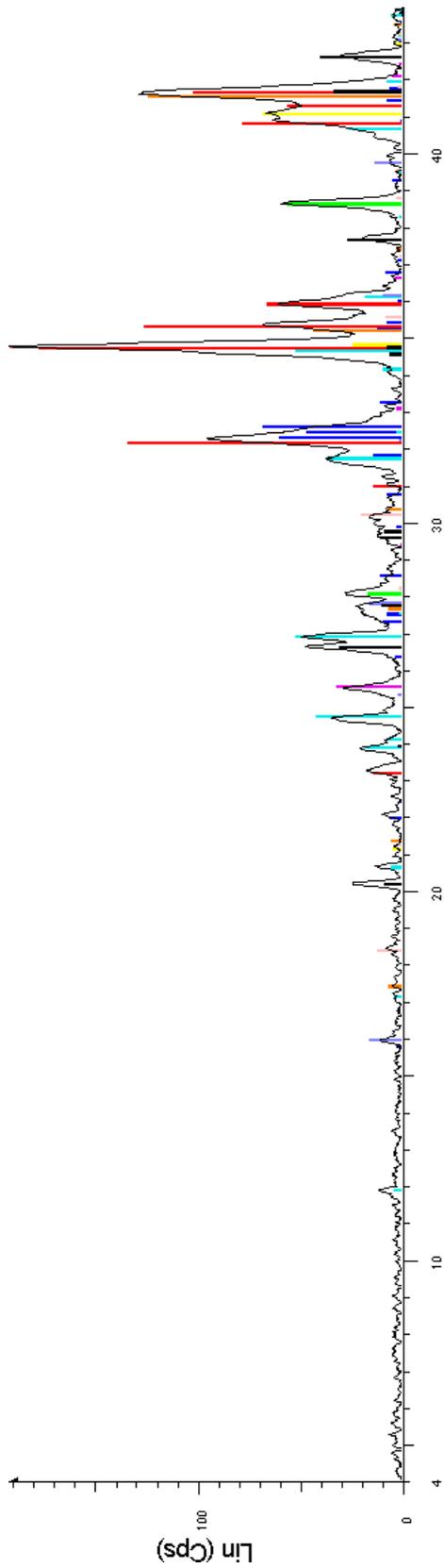




2-Theta - Scale

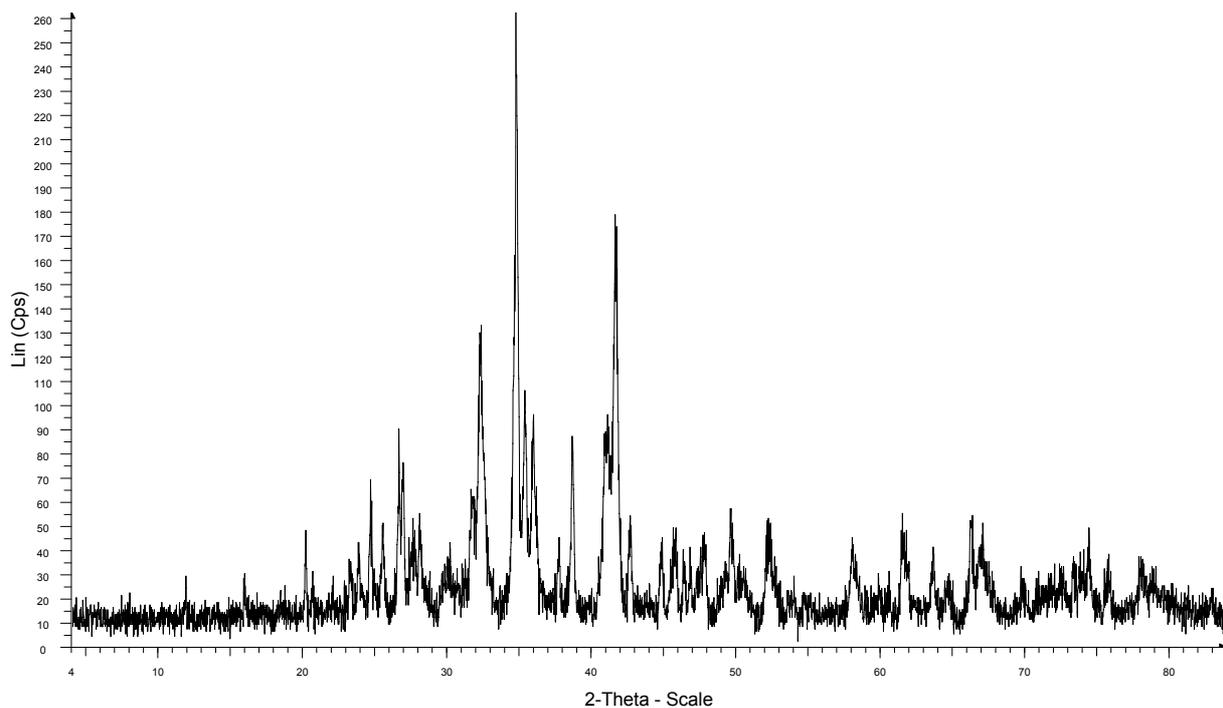
- File: 20006.raw - sable - Step: 0.020 ° - Step time: 1. s
- 00-046-1045 (\*) - Quartz, syn - SiO2
- 00-019-0932 () - Microcline, intermediate - KAlSi3O8
- 00-009-0466 (\*) - Albite, ordered - NaAlSi3O8
- 00-041-1370 (\*) - Diopside - Ca(Mg,Al)(Si,Al)2O6
- 00-006-0263 () - Muscovite-2M1 - KAl2(Si3Al)O10(OH,F)2



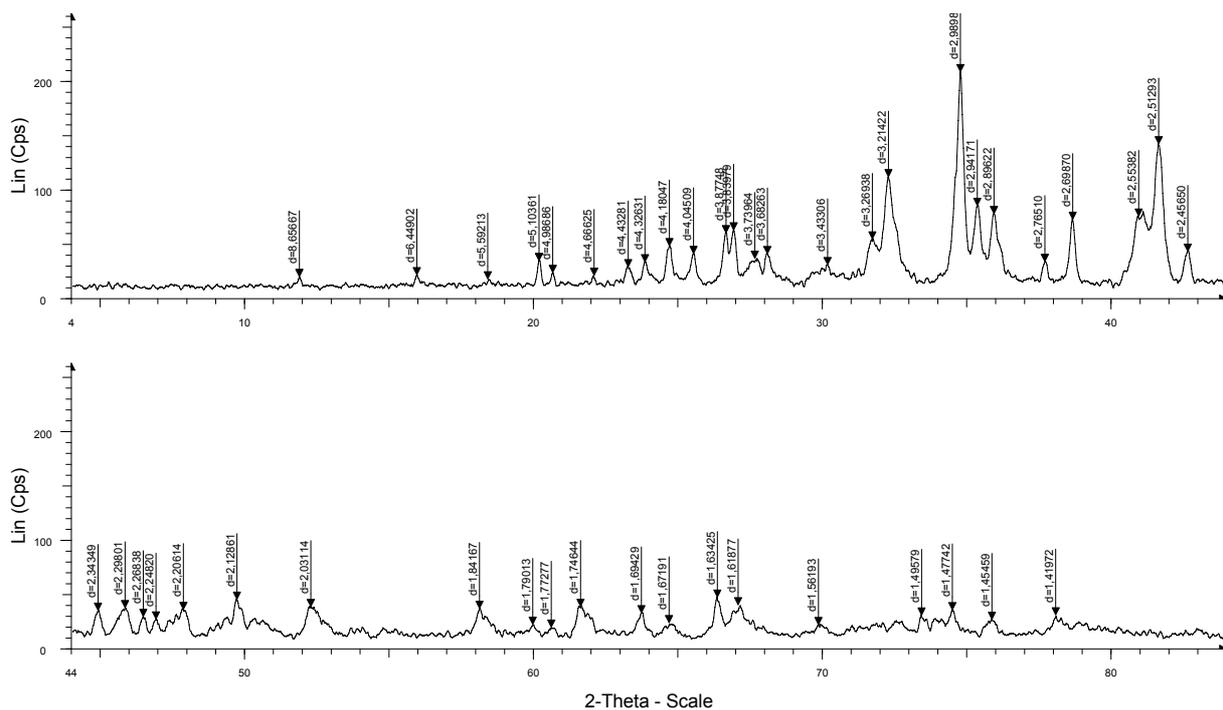


**2-Theta - Scale**

- File: 20007.raw - pouzzolane - Step: 0.020 ° - Step time: 1. s
- 00-041-1483 (I) - Augite, aluminian - Ca(Mg,Fe,Al)(Si,Al)2O6
- 00-041-1486 (\*) - Anorthite, ordered - CaAl2Si2O8
- 00-033-0664 (\*) - Hematite, syn - Fe2O3
- 00-039-1425 (\*) - Cristobalite, syn - SiO2
- 00-039-1346 (\*) - Maghemite-C, syn - Fe2O3
- 00-035-0424 (\*) - Nepheline, syn - NaAlSiO4
- 00-034-0189 (\*) - Forsterite, syn - Mg2SiO4
- 00-041-1478 (\*) - Analcime-C - Na(Si2Al)O6.H2O
- 00-022-1012 (I) - Franklinite, syn - ZnFe2O4
- 00-042-0217 (I) - Sodium Aluminum Silicate - Na6[AlSiO4]6



File: 20007.raw - pouzzolane - Step: 0.020 ° - Step time: 1. s



File: 20007.raw - pouzzolane - Step: 0.020 ° - Step time: 1. s

