



# Caractérisation des hot spots de réactivité biogéochimique dans les eaux souterraines

Olivier Bochet

## ► To cite this version:

Olivier Bochet. Caractérisation des hot spots de réactivité biogéochimique dans les eaux souterraines. Sciences de la Terre. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1S066 . tel-01727221

HAL Id: tel-01727221

<https://theses.hal.science/tel-01727221>

Submitted on 9 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*Mention : Sciences de la Terre*  
**Ecole doctorale EGAAL**  
**Olivier Bochet**

Préparée à l'unité de recherche UMR6118 GR  
Géosciences Rennes  
UFR Sciences et Propriété de la Matière

---

**Caractérisation des hot  
spots de réactivité  
biogéochimique dans  
les eaux souterraines**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 8 décembre 2017**

devant le jury composé de :

**Hélène PAUWELS**

Directrice de la Recherche au BRGM (Orléans) /  
*rapporteur*

**Richard MARTEL**

Professeur à l'INRS (Québec, Canada) / *rapporteur*

**Florence ARSENE-PLOETZE**

Maître de conférences à l'université de Strasbourg /  
*examinateur*

**Khalil Hanna**

Professeur à ENSC Rennes / *examinateur*

**Tom Battin**

Professeur à l'EPFL (Lausanne, Suisse) / *examinateur*

**Massimo Rolle**

Professeur associé, DTU Environment (Kongens Lyngby,  
Danemark) / *examinateur*

**Tanguy LE BORGNE**

Physicien, Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*

**Luc AQUILINA**

Professeur, Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*

## Table des matières

<b>Introduction Générale.....</b>	4
Hot spots et hot moments	
Observations sur le terrain	
Etude expérimentale de la réactivité biogéochimique	
Principes des essais de traçage réactifs	
Les traçages réactifs en mode « push-pull »	
"Smart-tracer", des traceurs innovants en hydrologie et hydrogéologie	
Questions abordées dans la thèse	
 <b>Chapitre 1: Analyse et modélisation d'un hot spot d'activité microbienne dans un aquifère fracturé.....</b>	13
1- Introduction	
2- Article: "Fractures sustain dynamic microbial hot spots in the subsurface", soumis à nature geoscience	
3- Conclusions et Perspectives	
 <b>Chapitre 2 - Développement d'un traceur innovant pour la mesure de l'activité microbienne in situ dans les milieux souterrains.....</b>	73
1- Introduction	
2- Principe de fonctionnement et méthode de mesure	
3- Résultats	
4- Modélisation de la cinétique réactionnelle	
5- Utilisation de la FDA pour mesure de l'activité microbiologique des eaux naturelles	
6- Conclusions	
7- Perspectives	

<b>Chapitre 3 - Expériences de traçage réactif pour la mesure de l'activité microbienne <i>in situ</i>.....</b>	101
1- Introduction	
2- Matériels et Méthodes	
3- Résultats	
4- Discussion	
5- Conclusion	
6- Perspectives	
<b>Références.....</b>	122
<b>Annexes.....</b>	130
Annexe 2.1: Preuve mathématique du lien entre k2-2 et la pente "b"	
Annexe 3.1: Calibration du fluorimètre pour la mesure simultanée des concentrations en fluorescéine et sulforhodamine G	
Annexe 3.2: Bactéries ferroxydantes dans l'eau des forages de Beaulieu	
Annexe 4: Hydrogeophysical characterization of transport processes in fractured rock by combining push-pull and single-hole ground penetrating radar experiments, Shakas et al. 2016.	

# Introduction Générale

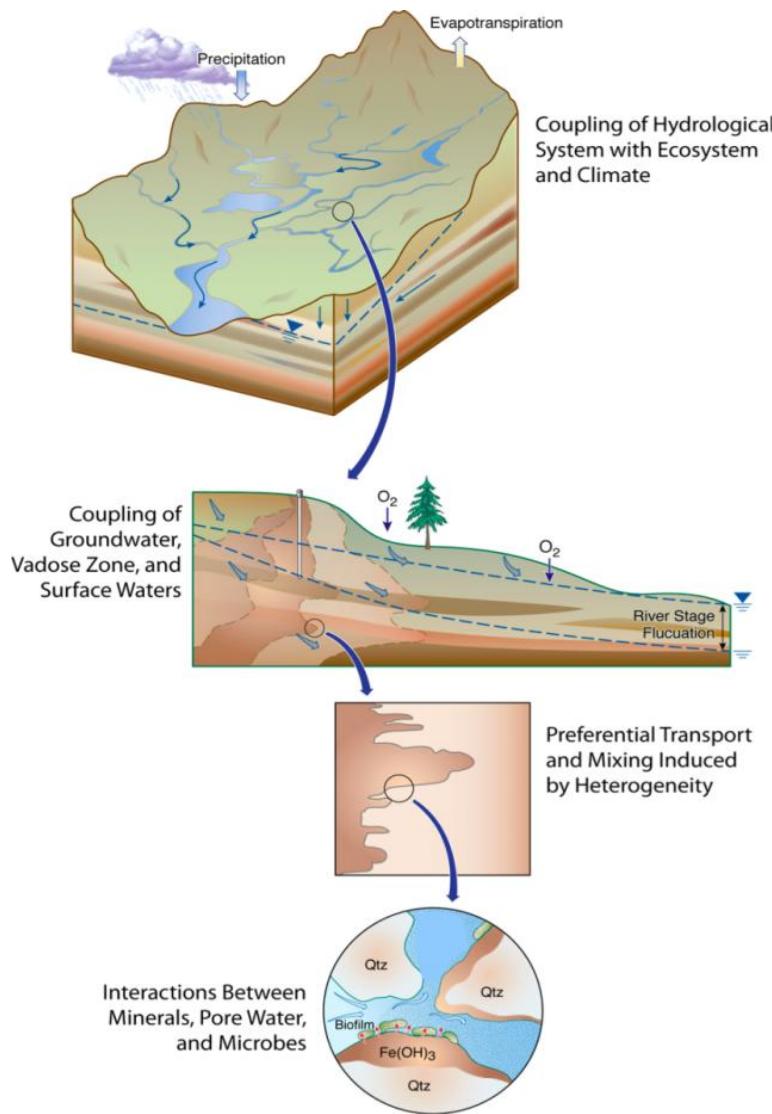
L'eau souterraine représente 30% des réserves en eau douce de la planète (Hurst et al. 2010). Elle n'en est pas moins une ressource vulnérable, sujette à de nombreuses pressions anthropiques. En raison de ses nombreuses utilisations pour les activités humaines, le sous-sol est la cible d'une attention constante. Que l'on veuille:

- solliciter ses ressources (eau, gaz, pétrole, minéraux, charbon...),
- l'utiliser pour produire ou stocker de l'énergie (géothermie),
- y stocker des déchets produits en surface (stockage de déchets nucléaires, séquestration de CO<sub>2</sub>),
- tenter de résorber une pollution l'ayant atteint,
- ou simplement l'étudier,

des phénomènes complexes mêlant physique, chimie et biologie interviennent (Chapelle 2001).

Dans certains cas, ces réactions biogéochimiques sont sources de désagréments ou de dommages. Un puits de pompage ou un doublet géothermique peuvent par exemple être colmatés par la formation de films microbiens, qui ont pour effet de réduire la transmissivité hydraulique des ouvrages et donc de faire baisser leur productivité (Cullimore 2000; Cullimore 2007; Misstear et al. 2006). Dans d'autres cas, l'homme cherche à contrôler ces réactions, afin d'en tirer parti. A titre d'exemple, des microorganismes peuvent être utilisés dans des barrières réactives (Thiruvenkatachari et al. 2008). Ces dispositifs sont mis en place dans le sous-sol afin de résorber un panache de contaminant se déplaçant en profondeur).

Du fait des activités humaines, l'environnement est sujet à de nombreuses contaminations qui affectent les eaux souterraines à des échelles diverses. Qu'elles soient locales lorsque l'impact est visible sur une zone spatialement restreinte (cas d'une contamination aux hydrocarbures) ou plus diffuses (cas des pollutions aux nitrates en Bretagne, du chlordécone aux Antilles ou encore la présence de perturbateurs endocriniens et de résidus médicamenteux dans des bassins versants anthropisés), les espèces chimiques introduites dans le sous-sol interagissent avec le milieu ambiant (figure 0.1). Elles sont advectées, c'est à dire "transportées" par les écoulements souterrains et intègrent des boucles de circulation plus ou moins longues (locales, intermédiaires ou régionales) (Toth, 1963). Lorsqu'il est transporté par les flux ambients, un panache de soluté se disperse dans le milieu, les molécules qui le constituent se retrouvant tantôt dans des zones d'écoulement rapide, tantôt piégées dans la matrice de la roche encaissante ou à l'intérieur d'un biofilm. Durant leur cheminement, elles peuvent réagir avec les surfaces réactives de la roche encaissante (par précipitation avec des minéraux, sorption, échange cationique...), et être transformées par les microorganismes capables d'en tirer profit (Toth 1999; Chapelle 2000). Les processus qui affectent le devenir des contaminants, et plus largement qui contrôlent les flux en éléments (carbone, azote, fer...), sont donc régis par des phénomènes multiples et complexes, à des échelles spatiales et temporelles très variables (Kitanidis & McCarty 2012; Abbott et al. 2016). Afin de mieux comprendre et prédire l'évolution d'une espèce chimique en solution dans l'environnement, il est nécessaire d'identifier les réactions qui l'affectent et les vitesses auxquelles elles se produisent.



*Figure 0.1 : illustration des écoulements et des processus réactifs dans les milieux souterrains (Hubbard and Linde 2011)*

## Hot spots et hot moments

De nombreuses études ont montré que les taux de réaction dans le milieu naturel sont distribués de manière très hétérogène dans l'espace et le temps. Certaines zones, à certaines périodes, présentent des taux de réaction très élevés par rapport à leur entourage, on parle de "hot spots" et de "hot moments" (McClain et al. 2003). Ces "hot spots" correspondent souvent à des zones de mélange, où des fluides aux propriétés physiques, chimiques et biologiques contrastées entrent en contact et induisent un fort potentiel réactif (McMahon 2001, Hagedorn 2010). Parmi elles, on peut citer la zone hyporhéique (zone située dans le fond des rivières, où se mélangent les eaux de surface et les eaux souterraines) qui, du fait de son importance dans la réactivité et le contrôle des flux en éléments, est au cœur de nombreuses études scientifiques ces dernières années (Boano et al. 2014; Bayani Cardenas 2015; Stegen et al. 2016). Les zones humides, zones de décharge de bassins versants et exutoires à des flux de compositions variées, sont considérées comme de véritables réacteurs biogéochimiques (Johnston et al. 1990). Malgré leur rôle reconnu dans le fonctionnement global des écosystèmes et la régulation de la qualité des eaux à grande échelle, elles

restent néanmoins menacées. En France, leur surface a été réduite de 50% de 1963 à 1993 (Bernard 1994). Mieux comprendre le fonctionnement de ces zones de mélange, identifier les réactions y ayant lieu, et mesurer leurs cinétiques de réaction permettra d'organiser la gestion des ressources souterraines et de mieux assurer leur protection.

L'hydrogéologie et les processus qui lui sont associés ont longtemps été pensés comme régis uniquement par des lois physiques et chimiques (Chapelle 2001). Le milieu souterrain, où la lumière ne filtre pas et où les concentrations en nutriments sont minimes, était supposé peu propice à la présence de microorganismes. Cependant, des signatures microbienne ont été enregistrées jusqu'à environ 4 km de profondeur (Inagaki et al. 2015). Certaines études suggèrent même que la biomasse souterraine profonde représenterait une proportion significative de la biomasse terrestre totale (Kallmeyer et al. 2012; McMahon & Parnell 2014).

Dès les années 20, les premières évidences d'une activité microbienne capable de modifier la chimie des eaux souterraines ont été reportées (Rogers 1917; Bastin et al. 1926). Ce n'est que bien plus tard, dans les années 80, que l'influence des microorganismes sur la géochimie des eaux souterraines a été reconnue comme bien plus importante et répandue qu'on ne le pensait initialement (Ehrlich 1982; Wilson et al. 1983; Lovley, D and Chapelle 1995; Ghiorse 1997). Non seulement, les microorganismes sont capables d'accélérer certaines réactions thermodynamiquement favorables, mais ils sont aussi susceptibles, de permettre à des réactions non-spontanées de se produire. A l'instar des réactions ayant lieu à la surface, les processus en jeu dans l'environnement souterrains seront alors vus comme des processus biogéochimiques.

## Observations sur le terrain

La difficulté dans la compréhension des phénomènes qui ont lieu dans le sous-sol ne réside pas seulement dans le fait qu'ils font intervenir conjointement physique, chimie et biologie. Elle est aussi due au fait que l'accès au monde souterrain est très restreint. Il n'est en effet accessible qu'au travers de forages ou plus rarement de tunnels. Des sites expérimentaux tels que celui de Cap Code dans le Massachusetts (USA), où 656 puits ont été forés sur une surface de 300x25 m<sup>2</sup>, ont permis d'étudier conjointement des processus physiques et biogéochimiques *in situ* dans l'optique d'étudier les processus de bioremédiation des masses d'eaux souterraines. D'autres sites d'exception, tel que ceux de Stripa (Stripa Research Mine) ou d'Äspö (Äspö Hard Rock Laboratory) en Suède, ont permis une étude approfondie et pluridisciplinaire des processus souterrains en milieu fracturé. De telles infrastructures sont toutefois exceptionnelles et ne peuvent bien sûr être généralisées.

Dans les sites d'étude les plus communs, le milieu souterrain n'est accessible que par quelques forages, utilisés comme des fenêtres ouvertes sur l'écosystème souterrain (Sorensen et al. 2013). Que l'on souhaite caractériser les propriétés hydrochimiques ou microbiologiques des eaux souterraines, la méthode de prélèvement est importante. L'échantillonnage de l'eau d'un forage ne donne généralement qu'une description partielle de l'environnement souterrain car il ne donne pas accès aux phases minérales réactives, ou encore à la fraction attachée des microorganismes. De plus, l'eau directement présente dans le puits n'est pas toujours représentative de celle de l'aquifère (Korbel et al. 2017) et il existe souvent des variations au sein de la colonne d'eau du forage. En fonction de la question scientifique posée, il faut identifier les paramètres physique, chimiques et biologiques d'intérêt et choisir la méthode de prélèvement la plus adaptée (Lerner & Teutsch 1995).

L'usage d'obturateurs hydrauliques (packers) peut s'avérer utile pour effectuer des prélèvements ciblés au sein un aquifère (Haveman & Pedersen 1999; Nyssönen et al. 2012; Purkamo et al. 2013, Bochet et al. soumis).

## Etude expérimentale de la réactivité biogéochimique

La réactivité biogéochimique au sein des aquifères peut-être étudiée de différentes manières. De nombreux travaux ont été réalisés en laboratoire. Les dispositifs peuvent aller de simples batchs (bouteille contenant de l'eau et des réactifs), à des microcosmes plus complexes faisant intervenir une phase solide, l'eau interstitielle, et les microorganismes. Ces expériences réalisées en environnement contrôlé permettent de mieux identifier les processus en action. Elles ont permis de distinguer des réactions biotiques et abiotiques, d'étudier des effets de toxicité, de prouver la capacité de microorganismes à dégrader une molécule ciblée, de mesurer des cinétiques de réaction, de préciser des mécanismes de réaction en mesurant la concentration d'intermédiaire de réaction dans le temps, etc. (Hurst 2010).

Cependant l'extrapolation des résultats issus des expériences en laboratoire au terrain pose souvent problème. La constitution d'un microcosme entraîne des perturbations par rapport à l'aquifère naturel, une perte de complexité y est souvent associée. Par ailleurs, que l'on veuille représenter des milieux sédimentaires ou fracturés, la distribution des surfaces réactives n'est généralement pas représentative de celle de l'aquifère. Le réarrangement des grains pour imiter les milieux sédimentaires, ou le concassage d'une roche pour représenter les milieux cristallins, ont tendance à surexposer ces surfaces réactives (Istok 2013). De plus, de nombreuses expériences sont réalisées sous conditions de mélange parfait, peu représentatives des conditions de terrain où le mélange est limité par la diffusion et la dispersion. Ces variations entre conditions de terrain et de laboratoire induisent irrémédiablement des changements sur la composition et l'activité microbienne. L'hétérogénéité spatiale des surfaces réactives, le mélange incomplet des espèces chimiques, la complexité des communautés microbiennes ou de la composition chimique des eaux naturelles sont autant de facteurs qui font que les cinétiques mesurées en laboratoire diffèrent, parfois de plusieurs ordres de grandeur, des cinétiques effectives dans le milieu naturel *in situ* (Lovley, D and Chapelle 1995; Meile & Tuncay 2006; Li et al. 2007; Lichtner & Kang 2007).

Afin de pallier ces problèmes de représentativité entre environnement contrôlés en laboratoire et milieu naturel, l'utilisation de microcosmes *in situ* a été développée pour la première fois dans les aquifères par Gillham et al. (1990). Des réactifs spécifiques peuvent y être introduits, et leurs concentrations monitorées dans le temps. Les microorganismes présents dans le microcosme peuvent être échantillonnés à la fin de l'expérience. Ces études basées sur des microcosmes isolant une portion d'aquifère nécessitent une instrumentation complexe, des dispositifs plus simples où les microcosmes *in situ* sont simplement attachés dans un puits ont aussi été utilisés (Griebler et al. 2002). Une critique importante qui peut être faite aux études basées sur des microcosmes (aussi bien *in vitro* qu'*in situ*) concerne la représentativité spatiale. Les hétérogénéités à diverses échelles sont le propre des milieux naturels, elles peuvent difficilement être représentées par des microcosmes de faible volume(Drever & McKee 1980). Bien que des microcosmes de large volume (mésocosmes) aient été construits (Korom et al. 2005), le volume d'aquifère sondé reste faible, notamment lorsqu'il est comparé au volume investigué par un essai de traçage sur le terrain (de l'ordre x100 à 1000 m<sup>3</sup>) (Drever & McKee 1980).

Les premières méthodes utilisées pour mesurer les cinétiques réactionnelles consistent à suivre l'évolution de la concentration d'un réactif (donneur ou accepteur d'électron) le long d'un chemin écoulement des eaux (Barker et al. 1987; MacIntyre et al. 1993; McAllister & Chiang 1994). Cette approche est sujette à de nombreuses incertitudes, notamment parce qu'elle ne permet pas de distinguer les effets de processus réactifs (microbiens ou chimiques) des processus hydrodynamiques (dispersion) (Chapelle & Bradley 1996). Pour faire face à ces difficultés, des méthodes expérimentales *in situ* supposées plus représentatives, ont été développées. Les expériences permettant la mesure de cinétiques réactionnelles sur le terrain sont connues sous nom d'essai de traçages réactifs.

## Principes des essais de traçage

Développés à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les essais de traçage permettaient à l'origine d'établir s'il existait des connexions hydrauliques entre deux points. Le principe consiste à injecter un traceur en un point A et à suivre son passage en un point B (figure 0.2 haut). Un des traçages le plus célèbre a été réalisé de manière accidentelle: suite à l'incendie d'une usine d'absinthe à Pontarlier, près d'un million de litres d'absinthe se déversèrent dans le Doubs. Quelques jours plus tard, à quelques encablures de l'accident, la Loue se tintait d'une couleur jaune et de reflets verts. Il fut alors établi que la Loue était une résurgence du Doubs. Des traceurs plus conventionnels que l'absinthe sont généralement utilisés, les plus répandus sont des traceurs fluorescents ou ioniques (Gombert 2016). Selon Flury & Wai (2003), le traceur idéal est conservatif, très soluble dans l'eau, détectable en faible quantité, peu sensible aux variations physico-chimiques du milieu (pH, température...) et, pas ou peu毒ique pour l'environnement. Si à l'origine les traçages hydrogéologiques servaient à établir l'existence d'une connexion hydraulique entre deux points et à mesurer le temps de transit pour aller de l'un à l'autre, l'étude de la concentration de traceur restituée en fonction du temps (courbe de restitution) a été étudié par la suite pour déduire différentes propriétés sur la capacité de transport d'un milieu (porosité, dispersivité, réactivité...).

Classiquement, les essais de traçages sont effectués entre deux points, en hydrogéologie ce type de traçage porte le nom de traçage puits-à-puits (well-to-well tracer test) (figure 0.2 haut). Des tests de traçage sur puits simple ont également été développés, ils portent le nom de "single-well tracer test" puis plus tardivement de "push-pull test", "push" faisant référence à la phase d'injection du traceur dans le milieu et "pull" à son extraction par le même puits (figure 0.2 bas).

Durant ma thèse j'ai eu l'opportunité de participer à des expériences de traçage push pull avec suivi par GPR (Ground Penetrating Radar) sur le site de Ploemeur. Ces expériences ont permis d'imager la distribution spatiale d'un traceur salin en profondeur dans le réseau de fractures. Ces résultats ont été publié dans un article (Shakas et al. 2016) dont je suis co-auteur (voir annexe 4).

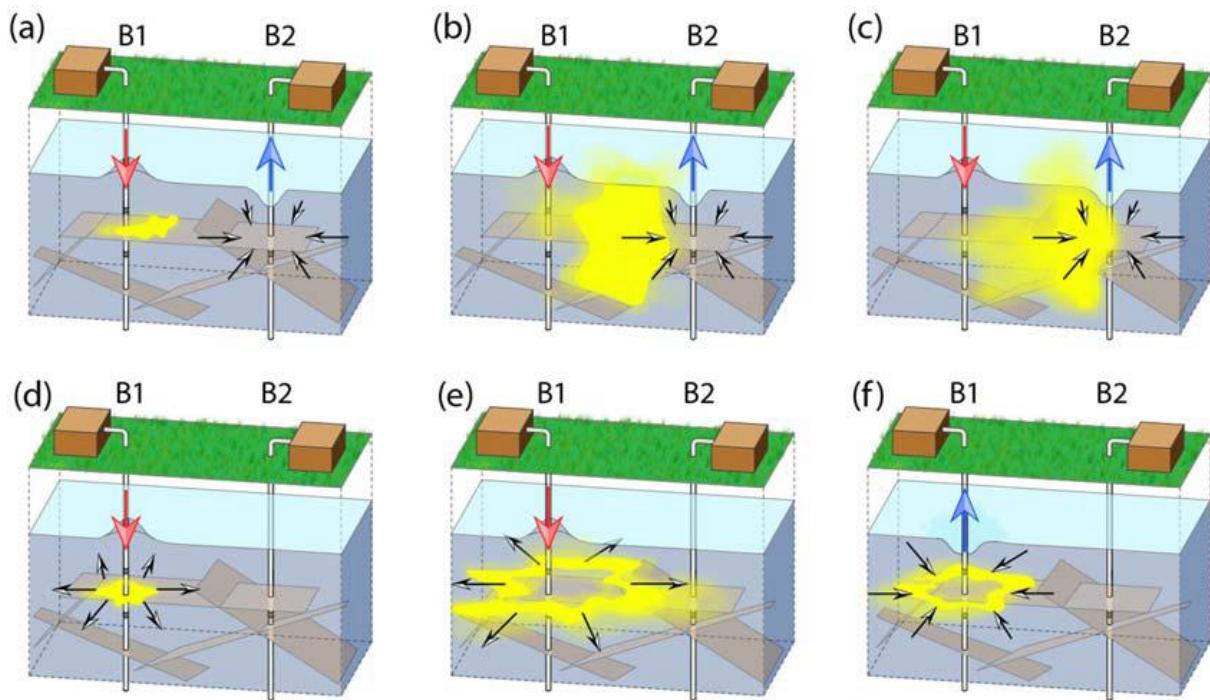


Figure 0.2 : Illustration du principe des traçages entre forage -puits-à-puits- (en haut) et push-pull (en bas), d'après (Kang et al. 2015).

### Les tests de traçage réactifs en mode "push-pull"

La méthode du push-pull présente plusieurs avantages par rapport au test de traçage puits à puits, tout d'abord la possibilité de déterminer les caractéristiques d'un aquifère sur un site ne comportant qu'un seul forage (ou sur un site où les forages ne sont pas connectés), ou encore, la possibilité de déterminer la variabilité des caractéristiques de l'aquifère à l'échelle d'un site (Schroth et al. 1998). Plus tardivement, ces tests de traçages ont été utilisés pour mesurer les cinétiques de réaction d'un milieu donné, on parle alors de test traçages réactifs. Cette méthode répond au besoin de quantifier les cinétiques réactionnelles *in situ*, qui sont souvent jugées plus fiables que les mesures en laboratoire (Istok, 2013).

Le test "push-pull" réactif dérive de l'industrie pétrolière où il était utilisé pour évaluer la quantité de pétrole restant dans un réservoir suite à son exploitation (Tomich et al. 1973). Le principe consiste à injecter (c'est la phase de "push") dans le réservoir une solution contenant de l'acétate d'éthyle ( $C_4H_8O_2$ ), le traceur réactif. Une fois dans le réservoir une partie de l'acétate d'éthyle est hydrolysée en éthanol ( $C_2H_6O$ ). Au contact du pétrole résiduel, l'acétate d'éthyle est retardée par rapport à l'éthanol, ce dernier étant plus soluble. La concentration des deux molécules organiques est mesurée durant la phase d'extraction ("pull"). La quantité de pétrole résiduelle peut-être estimée par la différence entre les temps d'arrivée des deux traceurs.

Par la suite, les tests de push-pull, d'abord utilisés pour déduire des paramètres physiques du sous-sol, deviennent des outils de caractérisation des phénomènes physico-chimiques *in situ*. En 1980, Drever & McKee utilisent les tests de push-pull pour mesurer l'adsorption caractéristique d'une formation. Plus récemment Radloff et al. (2012) utilise le même procédé pour mesurer l'influence de l'adsorption sur la concentration en Arsenic dans un aquifère au Bangladesh. Field et collaborateurs

(2000) réalisent une série de push-pulls pour évaluer la capacité d'échange cationique des surfaces minérales d'un aquifère. Pour ce faire ils injectent une solution contenant des ions  $\text{Na}^+$  et mesurent le relargage d'ion  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  etc.

En 1986, lors d'une étude sur la dénitrification, la méthode du push-pull est couplée pour la première fois à des mesures microbiologiques (Trudell et al. 1986). Dès lors, elle sera largement utilisée pour déterminer des cinétiques de réactions microbiologiques. Istok et collaborateurs (1997) réalisent une série de push-pulls pour quantifier l'activité microbienne en mesurant la respiration aérobie, la dénitrification, la réduction des sulfates et la méthanogenèse dans un aquifère pétrolifère contaminé. Sur ce même site, différents push-pull tests ont été effectués, permettant d'établir qu'il existait une variabilité spatiale des vitesses de consommation de l'oxygène et des nitrates (Schroth et al. 1998). Les cinétiques réactionnelles associées à la consommation de nombreux contaminants ont ainsi été mesurées par cette méthode.

Afin d'évaluer l'efficacité de méthodes de biorémédiation, Reusser et al. (2002) a mesuré les cinétiques de dégradation d'hydrocarbures tels que le benzène, le toluène, l'éthylbenzène ou le xylène (BTEX) dans un aquifère contaminé par ces mêmes substances. Afin de distinguer les molécules injectées (traceurs réactifs) de celles initialement présentes dans l'aquifère, des molécules de carbone marqués ( $^{13}\text{C}$ ) ont été utilisées. Dans une étude publiée en 2005, Urmann et al. utilisent également du  $^{13}\text{C}$  pour confirmer que la consommation du méthane mesurée dans la zone insaturée est bien contrôlée par des microorganismes. En effet, les microorganismes utilisant préférentiellement les isotopes légers, un enrichissement en isotopes lourds de la solution pompée (lors de la phase de "pull") traduit une intervention microbienne. Dans cette dernière étude, la comparaison de push-pulls avec et sans inhibiteur de l'activité microbienne, venait appuyer cette conclusion. Kleikemper et al. (2002) rapporte également l'emploi d'isotopes stables lors d'un test de push-pull effectué dans des aquifères contaminés aux hydrocarbures. Cette étude permet de quantifier la réaction de réduction des sulfates en mesurant simultanément la cinétique de dégradation de molécules organiques et du sulfate (enrichi en  $^{34}\text{S}$ ) injectés. Le fractionnement isotopique des sulfates permet d'attester du caractère biochimique de la réaction. De plus, l'utilisation d'outils de biologie moléculaire, l'Hybridation In Situ en Fluorescence (FISH) et l'électrophorèse sur gel en gradient dénatrant (DGGE), vient confirmer la présence de bactéries sulfato-réductrices et permet de mesurer leur diversité au cours de l'expérience de traçage. Peacock et al. (2004) et Baldwin et al. (2008) s'intéressent à l'effet de la biostimulation (stimulation des microorganismes par injection de solutions choisies) sur la variabilité spatio-temporelle d'une communauté microbienne dans un aquifère pollué à l'uranium et au technétium. Pour ce faire ils couplent la méthode du push-pull à l'utilisation de microcosmes. Plusieurs microcosmes sont ainsi disposés à différentes profondeurs dans les forages, les microorganismes qui s'y développent au cours des push-pulls effectués sont récupérés et analysés conjointement à une analyse physico-chimique de l'eau pompée.

## "Smart-tracer", des traceurs innovants en hydrologie et hydrogéologie

Les études citées précédemment, bien qu'elles soient des études de terrain, nécessitent des analyses chimiques ou microbiologiques réalisées *a posteriori* en laboratoire. Les analyses microbiologiques sont souvent exigeantes techniquement et onéreuses. De plus, ces analyses imposent de multiplier les échantillonnages lors des expériences, conduisant souvent à une résolution temporelle faible de la dynamique des processus. C'est pourquoi des méthodes de traçage *in situ* permettant un suivi en continu de la composante microbienne d'un milieu ont été développées. En 2008, Haggerty et al. propose l'utilisation d'un "smart-tracer", pour mesurer l'activité microbienne dans la zone hyporhéique des rivières (Haggerty et al. 2009; Haggerty et al. 2010; González-Pinzón et al. 2012; González-pinzón et al. 2015). Le traceur présenté est le Raz-Rru (resazurin-resorufin), cette molécule originellement utilisée en biologie a été largement servi pour tester la viabilité du sperme, la contamination microbiologique du lait, en biorémédiation des sols, ou pour mesurer l'activité des boues activées (McNicholl et al. 2007). Le Raz-Rru est une molécule bleue non-fluorescente qui est réduite irréversiblement par des enzymes appelées les reductases en resorufin, une molécule rose fluorescente. Le suivi de cette réaction est ainsi rendu possible par colorimétrie ou fluorimétrie. Le Raz-Rru a permis de mesurer la respiration aérobie dans les rivières (González-Pinzón et al. 2012) ou dans la zone hyrorhéique (González-pinzón et al. 2015), toutefois son utilisation n'est pas adaptée à des milieux anoxiques et ne peut donc être étendue aux eaux souterraines. C'est pourquoi, nous avons choisi de développer un "smart tracer" adapté aux milieux souterrains.

## Questions abordées dans la thèse

Les progrès importants effectués ces dernières années sur i) la mise en évidence de l'importance des processus microbiens dans les processus réactifs souterrains, ii) la compréhension de la variabilité spatiale et temporelle de ces phénomènes, et iii) le développement de méthodes expérimentales de terrain ouvrent de nouveaux champs de recherches et d'applications allant de la remédiation des sous-sols contaminés à la compréhension des grands cycles biogéochimiques naturels. L'objectif de cette thèse est de développer de nouveaux dispositifs expérimentaux de terrain pour étudier la dynamique des processus réactifs microbiens dans leur environnement afin de répondre à des questions à la fois fondamentales et appliquées. Nous posons ainsi deux questions sur les processus et deux questions méthodologiques :

1. Quelles sont les conditions conduisant à la formation de hot spots microbiens, qui malgré leur faible extension spatiale peuvent dominer la réactivité globale des milieux souterrains ?
2. Quelle est la dynamique temporelle des hot spots soumis à une intermittence des apports en nutriments et en éléments dissous ?
3. Comment peut-on mesurer l'activité microbienne *in situ* et en continu dans les milieux souterrains ?
4. L'activité microbienne mesurée *in situ* diffère-t-elle de manière significative des estimations en laboratoire ?

Ce travail a été cofinancé par l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie) pour les applications potentielles pour le suivi de l'activité microbiologique lors de la remédiation des sites contaminés, par le projet CRITEX (equipex pour l'instrumentation des observatoires sur la zone critique) pour les développements instrumentaux, et par le projet européen ReactiveFronts (ERC consolidator grant) pour le développement de connaissances fondamentales sur l'impact des processus de mélange sur les réactions

Les travaux développés ont mêlé à la fois des approches de laboratoire, de terrain et de modélisation. Ils ont permis de traiter des thématiques larges telles que l'impact de l'hétérogénéité du milieu sur les processus réactifs *in situ*, la reproductibilité des expériences entre en conditions *in vitro* et *in situ*, ou encore d'évaluer l'influence des changements d'échelles sur la réactivité biogéochimique, par la comparaison de plusieurs méthodes de terrain.

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous présentons une étude pluridisciplinaire (hydrogéologique, hydrochimique et microbiologique) sur la formation d'un hot spot de réactivité souterraine, située dans une zone mélange dans un aquifère hétérogène fracturé, et marqué par le développement d'un tapis microbien formé par des bactéries ferro-oxydantes.

Dans la deuxième partie de ce manuscrit de thèse, nous présenterons les travaux de mise au point d'un traceur innovant, la FDA, développé dans le but de mesurer en continu l'activité microbienne dans les eaux souterraines. Le chapitre 2 présente le développement de la méthode en laboratoire. Le Chapitre 3, son utilisation dans le milieu souterrain au cours d'expériences de traçage réactif.

# Chapitre 1: Analyse et modélisation d'un hot spot d'activité microbienne dans un aquifère fracturé

## Introduction

Dans ce chapitre, nous étudions la formation d'un hot spot d'activité microbienne en profondeur observé sur l'observatoire de Ploemeur (réseau H+ <http://hplus.ore.fr/ploemeur>, figure 1.1). Les hot spots sont des zones de réactivités élevées qui peuvent avoir un impact très important sur la réactivité biogéochimique globale malgré leur faible extension spatiale. Ils se forment généralement dans des zones où convergent des eaux de compositions chimiques différentes (McClain et al. 2003). Pour comprendre la formation de ces hot spots, il faut tout d'abord s'intéresser à la façon dont l'eau souterraine acquiert sa composition chimique.

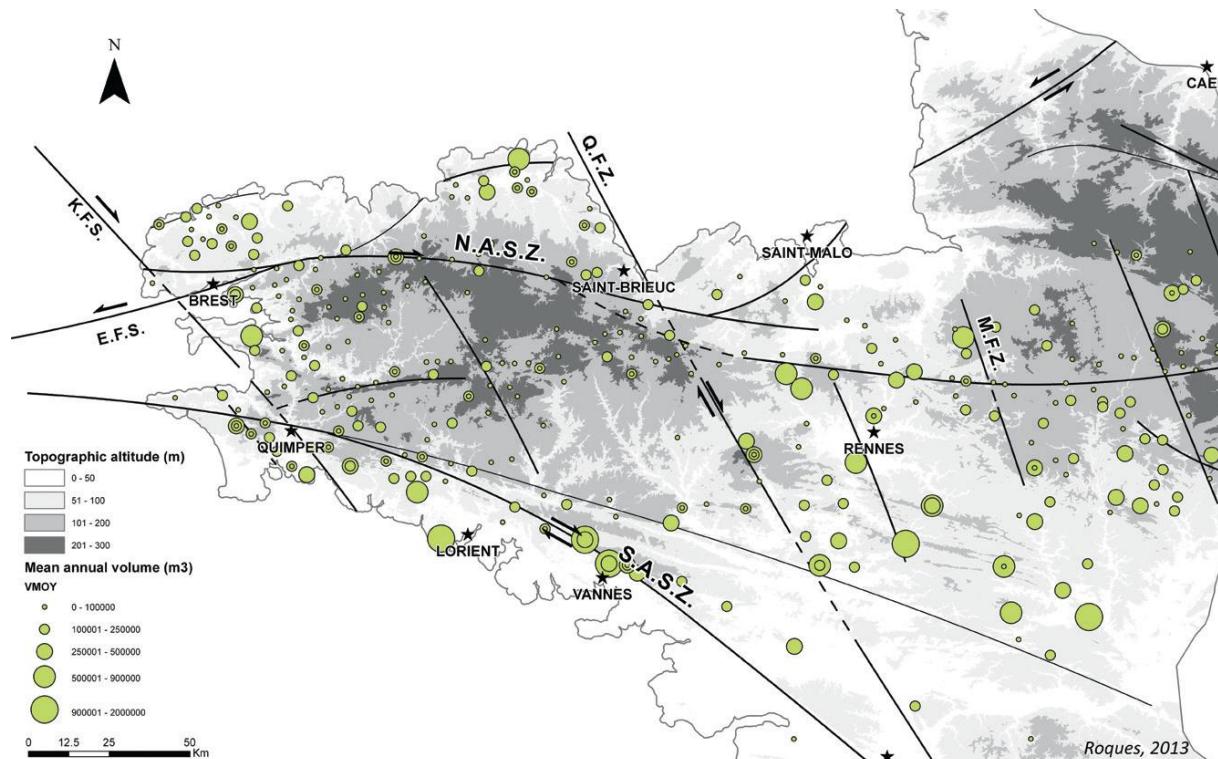
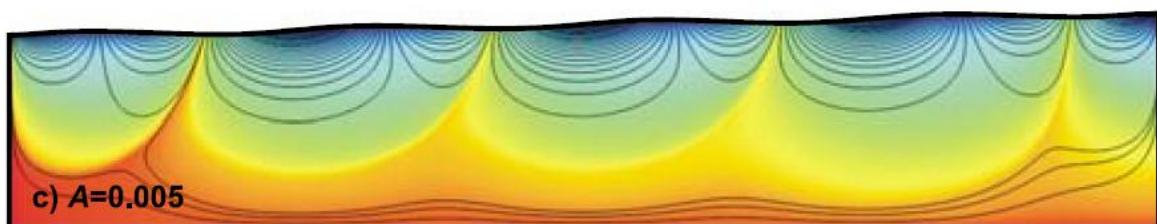


Figure 1.1 : carte indiquant la localisation des principales failles dans le massif armoricain (d'après (Roques et al. 2016). Le site de Ploemeur, situé près de Lorient, en contexte de socle fracturé, est l'un des aquifères les plus productif de la région.

L'eau météorique s'infiltra sous terre dans les zones de recharge en intégrant des "boucles de circulation" souterraines locales, intermédiaires ou régionales jusqu'à atteindre les zones de décharge (Toth 1963). Selon la boucle empruntée, l'eau réside plus ou moins longtemps au sein de l'aquifère: de l'ordre de quelques jours/mois pour l'eau d'une boucle locale ayant circulé rapidement dans des zones perméables proches de la surface, à quelques dizaines de milliers d'année, pour les eaux des boucles régionales qui pénètrent profondément l'aquifère (figure 1.2).

Au cours de ce trajet souterrain, l'eau est marquée par les environnements qu'elle rencontre. Par des processus de mise en équilibre avec la roche encaissante, elle se charge en différents éléments. Une eau ancienne, infiltrée il y a longtemps, présente généralement une conductivité électrique élevée (fonction de la quantité d'ions dissous en solution). Certains éléments dissous sont dits conservatifs, car très peu impliqués dans les processus réactifs (ex:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ), la plupart toutefois, sont réactifs. La grande majorité des réactions ayant lieu dans le sous-sol sont qualifiées de biogéochimique, car elles dépendent à la fois de l'environnement géologique traversé et des microorganismes en présence (Tóth, 1999, Chapelle 2000). En fonction des espèces chimiques dissoutes dans l'eau, le développement de différentes communautés microbiennes - capables de tirer profit des espèces chimiques présentes - peut être favorisé. Il se produit ainsi une évolution chimique et microbiologique conjointe le long des boucles de circulation hydrogéologiques (Lovley, D and Chapelle 1995).



*Figure 1.2 : illustration d'un système de boucles d'écoulement régionales induite par la topographie (d'après (Jiang et al. 2010). L'échelle de couleur représente le temps de résidence des eaux souterraines (bleu : eaux jeunes, rouge : eaux anciennes).*

Dans l'eau souterraine, les microorganismes obtiennent l'énergie nécessaire à leur métabolisme par des réactions d'oxydo-réduction (Chapelle 2001), c'est à dire un transfert d'électron entre un donneur et un accepteur d'électron. Le carbone organique est le donneur d'électron le plus répandu dans l'environnement, toutefois les aquifères de socle en sont souvent dépourvus. Dans ces milieux, les donneurs d'électrons sont souvent des minéraux que les bactéries lithoautotrophes peuvent mobiliser. Les microorganismes sont capables de réduire une grande variété d'accepteurs d'électron. Ceux ci sont consommés selon une séquence allant du plus au moins énergétique  $\text{O}_2 > \text{NO}_3^- > \text{Mn}^{4+} > \text{Fe}^{3+} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CO}_2^-$  (McMahon et al. 2011). En présence de donneurs d'électron, l'oxygène dissous est donc rapidement consommé (Brune et al. 2000), suivi par la réduction des nitrates, la réduction des oxydes de manganèse et de fer (entrant la dissolution d'ions  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$ ), la réduction des sulfates, et la réduction du dioxyde de carbone . Ainsi, en prenant en considération les écoulements décrits par le modèle de Thot, on peut s'attendre à une stratification de cette séquence redox avec la profondeur (McMahon et al. 2011) (figure 1.2).

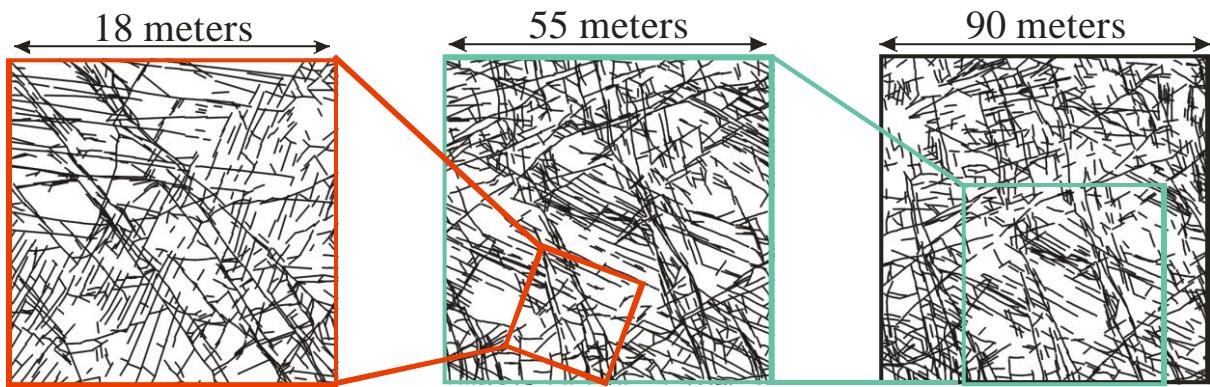


Figure 1.3 : cartographie d'un milieu fracturé à différentes échelles, d'après Bonnet et al. 2001.

Les aquifères sont cependant caractérisés par des hétérogénéités structurelles importantes qui impactent fortement les flux souterrains (Dentz et al. 2011, Bour & Davy 1997) (figure 1.3). La conductivité hydraulique ( $K$ ), paramètre qui contrôle la vitesse des écoulements souterrains, est une grandeur physique variant sur un très grand ordre de grandeur ( $10^{-1}$  pour des graviers à  $10^{-12}$  pour de l'argile faiblement perméable) (figure 1.4). Les aquifères de socle (qui couvrent près d'un tiers de la surface du globe et constituent la grande majorité des aquifères bretons) sont des milieux fracturés, les écoulements y sont particulièrement hétérogènes. De tels écoulements sont susceptibles de mettre en contact des eaux aux propriétés chimiques et microbiologiques différentes (McMahon 2001, Misstear et al. 2006, Pedersen 2014, Stegen et al. 2016), court-circuitant les séquences redox attendues par la création de zones de mélange, potentielles "hot spots" de réactions biogéochimiques. Ces zones de "hot spot" peuvent être très localisées, mais néanmoins primordiales pour la réactivité biogéochimique à grande échelle (Hagedorn et al. 2010, McClain et al. 2003, Frei et al. 2012, McMahon et al. 2011).

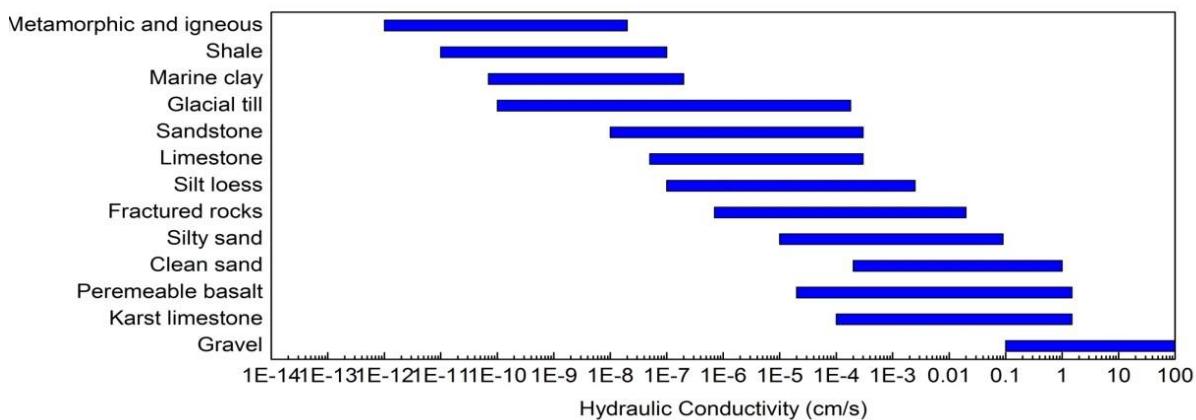


Figure 1.4 : synthèse de mesure de conductivité hydraulique pour différents environnements géologiques (d'après Freeze & Cherry 1979)

Dans un forage artésien, situé sur le site hydrogéologique de Guidel (Observatoire de Ploemeur, réseau H+) en Bretagne, nous avons observé la présence d'un tapis bactérien de couleur rouille, s'étendant de la surface à environ 60 mètres de profondeur. Les bactéries responsables de sa formation sont des bactéries ferroxydantes, qui se développent aux interfaces anoxique-oxiques lorsqu'une eau riche en fer ferreux rencontre des conditions oxydantes (figure 1.5). Afin de caractériser ce tapis bactérien, et d'identifier les raisons de sa formation, nous avons mis en place une campagne de recherche pluridisciplinaire, impliquant des microbiologiste (de l'équipe "Dynamique environnementale et Micro-organisme" du laboratoire Ecobio), des hydrochimistes et des hydrogéologues du laboratoire Géosciences Rennes (équipes "Géochimie des eaux et interfaces" et "Dynamique, Imagerie et Modélisation des Systèmes Environnementaux"). Ces résultats sont présentés dans l'article ci-dessous (Bochet et al. 2017, soumis).

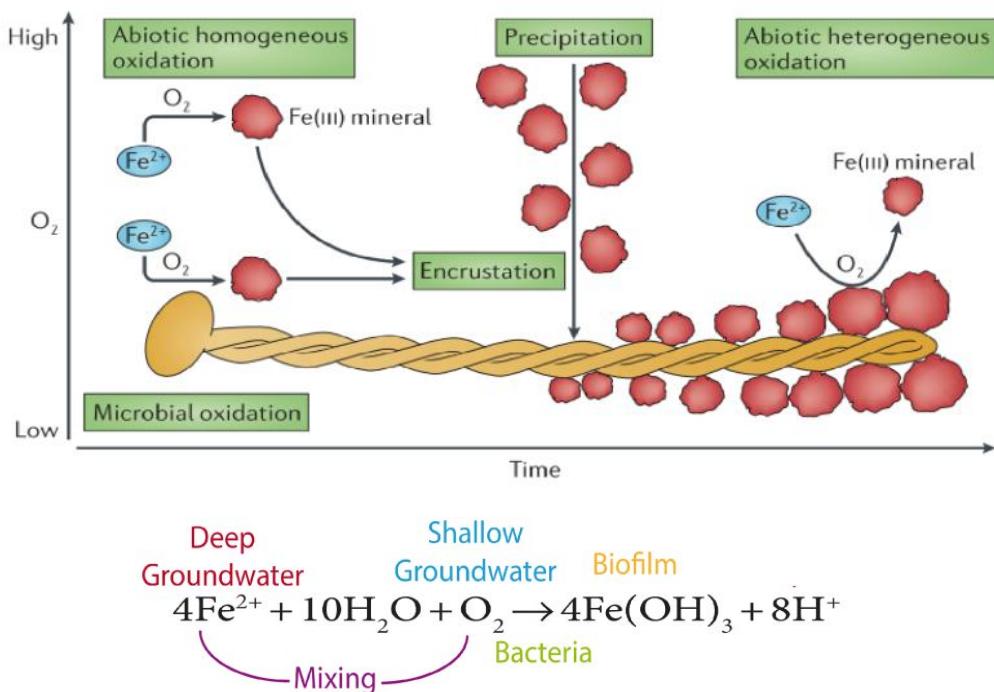


Figure 1.5 : Schéma de principe illustrant l'oxydation chimique et biologique du fer par l'oxygène (d'après Melton et al. 2014).

# **Fractures sustain dynamic microbial hot spots in the sub-surface**

Olivier Bochet<sup>1</sup>, Lorine Bethencourt<sup>2</sup>, Alexis Dufresne<sup>2</sup>, Julien Farasin<sup>1</sup>, Mathieu Pedrot<sup>1</sup>, Thierry Labasque<sup>1</sup>, Eliot Chatton<sup>1</sup>, Nicolas Lavenant<sup>1</sup>, Christophe Petton<sup>1</sup>, Benjamin W. Abbott<sup>2,3</sup>, Luc Aquilina<sup>1</sup> & Tanguy Le Borgne<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Geosciences Rennes laboratory, UMR 6118 CNRS University of Rennes 1, France*

<sup>2</sup>*Ecobio laboratory, UMR 6553 CNRS University of Rennes 1, France*

<sup>3</sup>*Brigham Young University, Department of Plant and Wildlife Sciences, Provo, USA*

**While most freshwater on Earth resides and flows in groundwater systems, these deep subsurface environments are often assumed to have little biogeochemical activity compared to surface environments. Here we report a massive microbial mat of iron-oxidizing bacteria, flourishing 60 meters below the surface, far below the mixing zone where most microbial activity is believed to occur. The abundance of microtubular structures in the mat hinted at the prevalence of Leptothrix ochracea, but metagenomic analysis revealed a diverse consortium of iron-oxidizing bacteria dominated by unknown members of the Gallionellaceae family. This deep biogeochemical hot spot formed at the intersection of bedrock fractures, which maintain redox gradients by mixing water with different residence times and chemical compositions. Using measured fracture properties and hydrological conditions we developed a quantitative model to simulate the reactive zone where such deep hot spots could occur. While seasonal fluctuations are generally thought to decrease with depth, we found that meter-scale**

**changes in water table level moved the depth of the reactive zone hundreds of meters. These results demonstrate that fracture zones can significantly enhance the range of depths over which microbial communities thrive and contribute actively to Earth's biogeochemical cycles.**

Hydrological flow transports nutrients, energy, and waste for mobile and immobile lifeforms, sustaining enhanced reaction rates by delivering missing reactants for fluid-fluid or fluid-mineral reactions <sup>1–3</sup>. Highly reactive hot spots often form at the intersection of hydrological flowpaths, where the confluence of complementary reactants promotes biogeochemical activity that can disproportionately influence ecosystem-level rates of primary and secondary productivity <sup>4–7</sup>. These hot spots or ecosystem control points depend on strong redox and concentration gradients <sup>8–11</sup>, and though they change in space and time, hot spots systematically occur in areas where groundwater mixes with river or seawater, such as hyporheic zones beneath streams <sup>5,12,13</sup>, intertidal mixing zones, and hydrothermal vents <sup>14,15</sup>. While hot spots occurring near the land or sediment surface can be readily identified, their possible development in deep subsurface environments is largely unknown. Despite the large volumes of water and fluxes of dissolved geochemical elements passing through groundwater systems <sup>16,17</sup>, deep reactive mixing hot spots are generally neglected since most biogeochemical models do not predict their occurrence <sup>2,18</sup>.

A common justification for disregarding deep hot spots is that groundwater flow lines are not expected to intersect in homogeneous subsurface domains (Fig. 1 A). In this conventional view, reactive mixing hot spots only form in groundwater discharge areas where flow lines converge

<sup>5</sup>. As water flows along subsurface flowpaths, chemical species are generally consumed in the order of their redox potential, leading to vertical stratification of oxidized species depending on water residence time (Fig. 1 A). This stable redox gradient could slow biogeochemical activity and prevent the development of hot spots in the deep subsurface. Here, we tested this longstanding view using quantitative hydrological and molecular methods. We found that iron-oxidizing hot spots occurred over a large range of depths because of the presence of connected fractures at multiple scales in the subsurface <sup>19,20</sup>. These structural discontinuities produce preferential flowpaths, which can mix water with very different residence times and redox properties <sup>21</sup>. This short circuiting of hydrological flowpaths can produce reactive hot spots at much greater depths than predicted for homogeneous environments (Fig. 1 B). Because these deep hot spots are driven by water flow and fracture geometry, they may sustain steeper concentration gradients compared to diffuse interfaces <sup>4</sup>, potentially extending a temporally-variable reactive zone hundreds of meters below the surface.

Iron-oxidizing bacteria (FeOB) are emblematic of mixing zones where they take advantage of redox gradients from groundwater inflows rich in reduced iron (typically 10-100  $\mu M$  of Fe(II)) encountering oxidizing water bodies. At circumneutral pH, soluble Fe(II) is readily oxidized forming iron oxyhydroxides which immediately precipitate from solution. Neutrophilic FeOB are only able to outcompete this abiotic oxidation in microaerobic (i.e.  $0.1 < O_2 < 1.5 mg.L^{-1}$ ) environments <sup>22,23</sup>, such as in groundwater seeps <sup>24</sup>, stream beds <sup>25,26</sup> or intertidal zones <sup>14</sup>. FeOB are chemoautotrophic, using dissolved CO<sub>2</sub> as the carbon source for the synthesis of organic compounds <sup>27,28</sup>. This primary production in underground ecosystems could be an important organic carbon source fueling other microorganisms. As Fe cycling is coupled with the biogeochemical

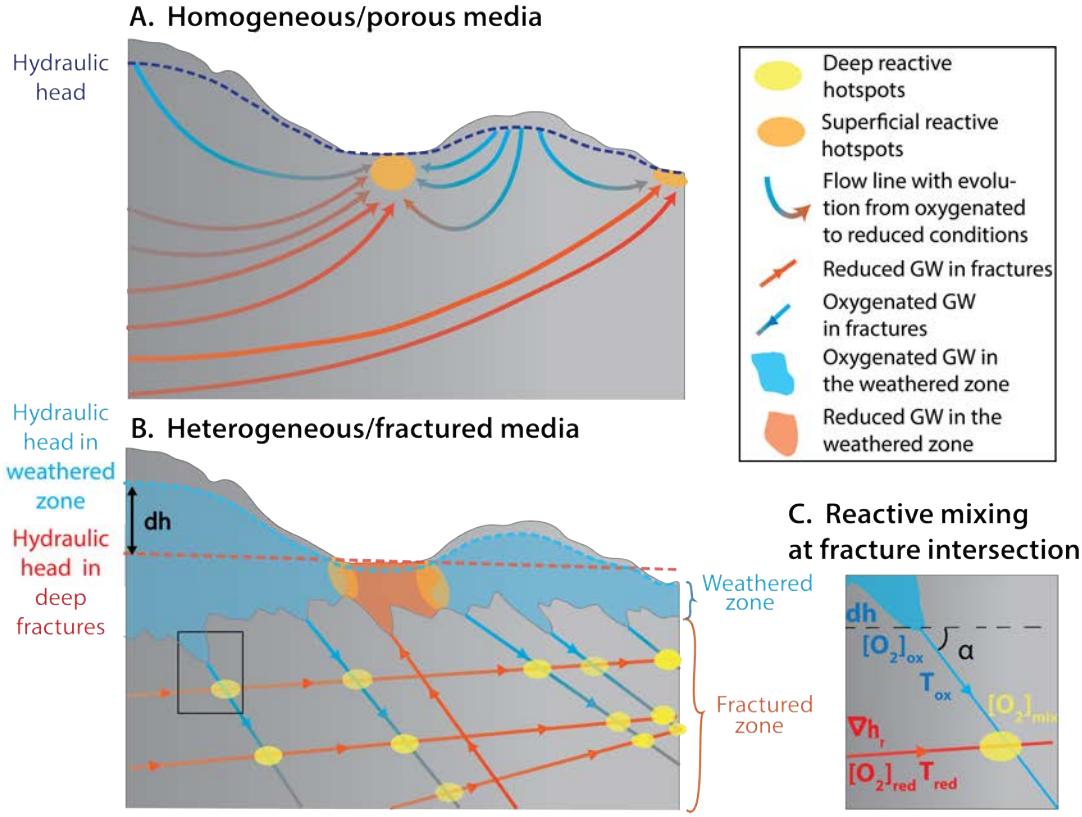


Figure 1: A. Common representation of subsurface flowpaths and reactive hotspot formation in a homogeneous subsurface. As water flows along flowpaths, the redox sequence evolves from oxidizing (blue) to reducing (red) conditions. In such representation, flowpaths carrying water at different redox states intersect only at the outlet, creating localized reactive hot spots at the interface between aquatic and terrestrial environments<sup>5</sup>. B. Conceptual model for the formation of deep reactive hot spots. The sketch represents bedrock, where flow is mainly localized in fracture zones, overlaid by weathered rock, where permeability is generally larger<sup>20</sup>. In recharge areas, where the hydraulic head in the weathered zone is larger than in the deep fractured zone, oxygen-rich water flows through weathered zone down to deep fractures. In discharge areas, deep groundwater flows from the fractures to the weathered zone to feed rivers. Mixing hot spots can thus develop at intersections between oxidized and reduced fractures, hence sustaining a range of deep microbial processes. C. Zoom on the intersection of oxidized and reduced fractures and parameters of the fracture mixing model.

cycles of carbon, nitrogen, and sulfur through both biotic and abiotic reactions<sup>29</sup>, one can therefore expect that autotrophic FeOB exert a major control on groundwater biogeochemistry. Only a few genera of neutrophilic, oxygen-dependent FeOB have been reported in freshwater systems, including the Leptothrix genus (Burkholderiales Genera incertae sedis)<sup>30</sup> and members of the Gallionellaceae family: Gallionella, Sideroxydans and Ferriphaselus<sup>27,28</sup>. Gallionellaceae appear to be dominant in hard-rock aquifers<sup>31</sup> but their likelihood to form hot spots in these environments has not been documented. Where low oxygen and high iron concentrations co-occur, FeOB may produce large quantities of extracellular structures, forming tubular sheets in the case of Leptothrix ochracea, or twisted stalks for some Gallionella and Ferriphaselus strains. Iron oxides precipitate over these structures, creating characteristic rust-colored mats.

We observed a massive rust-colored mat of neutrophilic iron-oxidizers at 60 meters below the surface at the Ploemeur fractured rock observatory in western France (Fig. 2B). We mapped bedrock fractures and quantified water chemistry and flow to identify causes of the mat and performed a metagenomics analysis to characterize the microbial community. We used these observations to develop a quantitative model linking physical and hydrological characteristics to simulate the temporal dynamics and spatial distribution of the reactive zone in the subsurface.

The Ploemeur site is a highly instrumented crystalline rock aquifer in western France, where flow primarily occurs in a network of fractures that extends through granite and micaschist bedrock (see Supplementary Information). Using a borehole camera, we observed a massive rust-colored mat in a 130 m deep, artesian well (Fig. 2A, Supplementary Fig. S2 and Fig. S3, and Supple-

mentary Movie S1). Borehole optical logs and video images (Fig. 2 and Supplementary Fig. S3) showed that the borehole walls were entirely covered from the surface to approximately 59 m depth by the rust-colored mat. Growth was particularly profuse where major fractures intersected the borehole, in places completely clogging the borehole (Supplementary Fig. S3). Below 60 m, only traces of the mat were visible, though there was still evidence of microbial growth at the main fractures. The presence of this deep microbial hot spot could not be explained by the borehole water chemistry, which was relatively uniform, with high iron and manganese concentrations, low oxygen concentration and redox potential, and circumneutral pH. These chemical characteristics are typical of fractured hard-rock aquifers characterized by long water residence times, weak connections with the surface, and slow renewal<sup>32,33</sup>. The borehole water was largely dominated by deep water, which flowed continuously from the deepest highly transmissive fractures to the surface at a rate of 40 L·min<sup>-1</sup> due to the artesian nature of the well (the hydraulic head of the deepest fractures is higher than the local topography). To identify the origin of the deep biogeochemical hot spot, we performed vertically-discrete sampling with an inflatable packer capable of blocking vertical flow (see Supplementary Information). We sampled water from each of the main fractures along the entire length of the borehole<sup>34,35</sup> and analyzed major ions, dissolved gases and microbial diversity (Fig. 2D, Fig. 3 and Supplementary Information).

Flow rates produced by each fracture were quantified with borehole flowmeter logging under pumping and ambient conditions (Fig. 2A and Supplementary table S1). More than half of the flow was produced by a highly permeable zone at the bottom of the borehole (below 94 m) (Fig. 2 and Supplementary table S1). The rest of the flux came from various shallower fractures,

each constituting less than 10% of the total flow. Fracture profiles from optical and acoustic logs (Fig. 2C) indicated that a series of steep fractures occur in the top 60 m of the borehole, coincident with the densest microbial mat presence along borehole walls (Fig. 2A and Supplementary Fig. S3). Iron concentration increased with depth, while oxygen concentration decreased, but there were several anomalies, including high oxygen concentration ( $4 \text{ mg.L}^{-1}$ ) in the F54 fracture intersecting the borehole at 54 m, suggesting connectivity with oxygen-rich surface water (Fig. 2D). This was consistent with the high CFC113 concentration measured at the same depth, which indicates shorter residence-time<sup>32</sup>. Hence, steep fractures above 60 m appear to efficiently transport oxygen-rich surface water to deeper layers. Hot spots of microbial mat formation can then develop at intersections of oxygenated and anoxic fractures, where recent water mixes with older, iron-rich, groundwater (Fig. 1. B). Comparison of borehole oxygen profiles performed during a recharge period (April 2017) and a dry period (July 2017) shows that oxygen delivery at depth by fractures is intermittent (Fig. 2E), which is likely to generate a seasonal microbial mat development.

To constrain the rate of mat formation, its microbial composition, and its effect on water chemistry, we performed laboratory incubation experiments (Supplementary Fig. S4 and Supplementary Information). Water from the borehole was incubated in sterile bottles. We observed the development of loose flocs of orange material at the bottom of the bottles after only 40 hours, coincident with a decrease of both iron and oxygen concentration, showing that FeOB are active in the sampled fluid. These results were consistent with biogenic Fe (II) oxidation at circumneutral pH, which leads to the formation of iron oxyhydroxides from the simultaneous consumption of molecular oxygen and ferrous iron in a theoretical molar ratio of 1 to 4<sup>36</sup>. Carbon was provided by

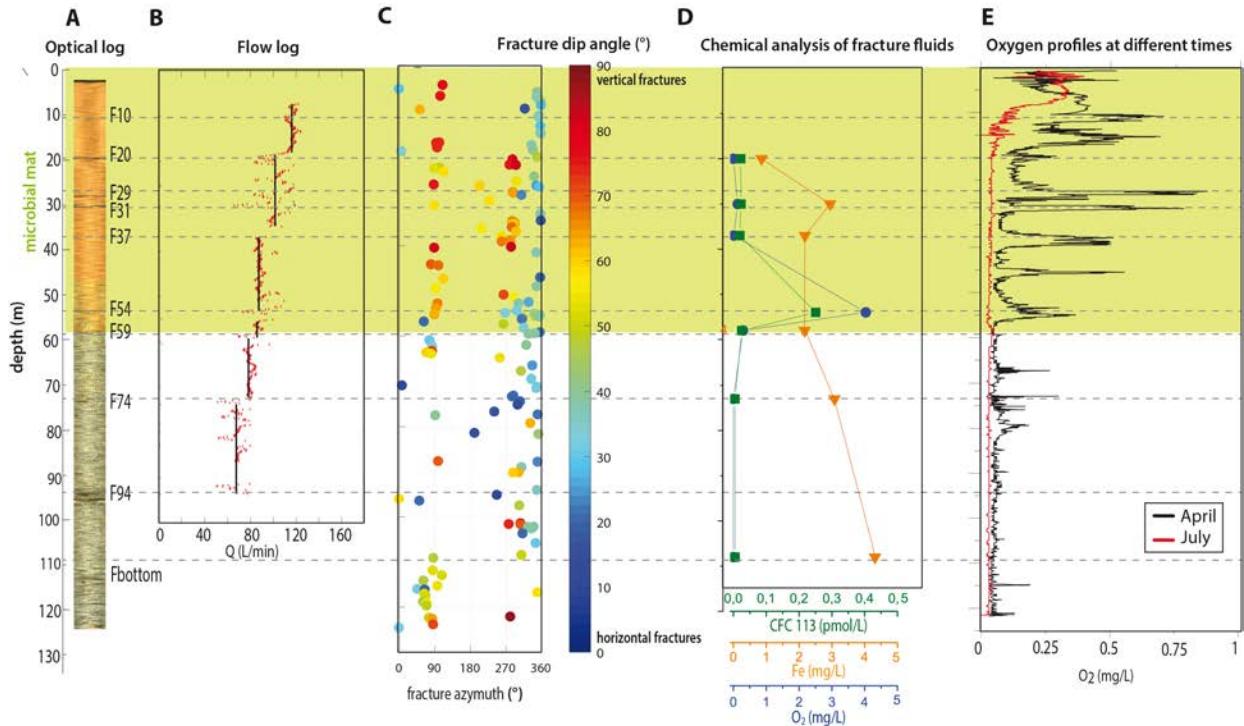


Figure 2: A. Borehole wall images obtained from optical logs and borehole video images (see Supplementary Information and Supplementary Fig. S3). B. Upward flow produced by fractures when pumping the borehole. C. Fractures distribution, orientation and dip measured by optical and acoustic logging along the well. D. Concentrations of dissolved oxygen, dissolved iron, and CFC 113 in fractures at different depths sampled with an inflatable packer (see Supplementary Information)E. Comparison of borehole oxygen profiles performed during a recharge period (April 2017, black curve) and a dry period (July 2017, red curve).

dissolved inorganic carbon, which decreased from 23 mg/L to 19 mg/L during the experiment.

Scanning electron microscope observations performed on mat samples from the borehole showed structures typical of known iron-oxidizing bacteria. The most abundant structures were sheaths (Fig. 3.A), which can be formed by *Leptothrix ochracea*, and twisted stalks (Fig. 3.B), typical of some FeOB from the Gallionellaceae family such as *Gallionella ferruginea*<sup>37</sup> and *Ferrithrix amnicola*<sup>38</sup>. Similar structures were formed during batch experiments (see Supplementary Information), suggesting that the mat formed in bottles of sampled water is similar to the one formed *in situ*.

We performed a metagenomic characterization to assess the diversity and the relative abundance of FeOB from water samples collected in fractures (Fig. 3C, Supplementary Fig. S6). Since iron-rich mat formation and Fe oxidation occur simultaneously in batches, microbial communities growing in batches are likely enriched in FeOB. We thus also produced metagenomes from water incubated in batches to define draft genomes of the main FeOB from assembly and binning of metagenomic sequences. This lead to 9 genomic bins affiliated with the Gallionellaceae family (see Supplementary Table S3). Phylogenomic analyses based on universal protein-coding genes showed that seven bins could be related to the three Gallionellaceae genera already described, while two additional genomic bins (namely Bin12 and Bin17) appeared to constitute new lineages of unknown Gallionellaceae (see Supplementary Fig. S1 and Fig. S4).

The relative abundance of FeOB in water samples collected in fractures was determined with the recruitment of metagenomic reads against 7 available genomes of the principal taxa of

terrestrial microaerophilic FeOB and the 9 genomics bins identified in batches (see Fig. 3C and Supplementary Table S5). The latter yielded orders of magnitude more recruited reads than the 7 reference genomes (see Supplementary Table SI 5), demonstrating how assembly and binning are powerful approaches for retrieving genomes representative of the genuine members of a microbial community. There was a strong increase of Gallionellaceae relative abundance in fractures *F*54/59 which delivered oxygenated water (Fig. 2D). The percentage of recruited reads in this fracture was about an order of magnitude larger than in the fluid sampled below 60 m with 90% of the recruited reads aligning with contigs of Bin12 and Bin17. The total relative abundance of FeOB was highest in *F*37 and decayed progressively towards the surface. The considerable changes in bin relative abundance in fractures suggests that they form distinct habitats harboring different assemblages of FeOB (Fig. 3C).

The observations of deep FeOB hot spots in conjunction with steep fractures delivering oxygen at depth suggests that the spatial and temporal distribution of microbially-mediated processes in fractured media (figure 1A) may be fundamentally different from the conventional homogeneous representation (figure 1B). The proposed mechanism of fracture-induced mixing may be widespread in iron-rich fractured aquifers where Gallionellaceae are dominant<sup>31</sup>. Although abundant microtubular sheets were observed, suggesting the presence of *Leptothrix ochracea*, no bin affiliated to the genus Leptothrix could be retrieved from batches. Furthermore, read recruitment with the genome sequences of *Leptothrix ochracea* and *Leptothrix cholodnii* yielded very few alignments. This is consistent with previous surveys of microbial diversity in similar fractured crystalline aquifers<sup>31</sup>. Therefore it is likely that at least one uncharacterized FeOB species is

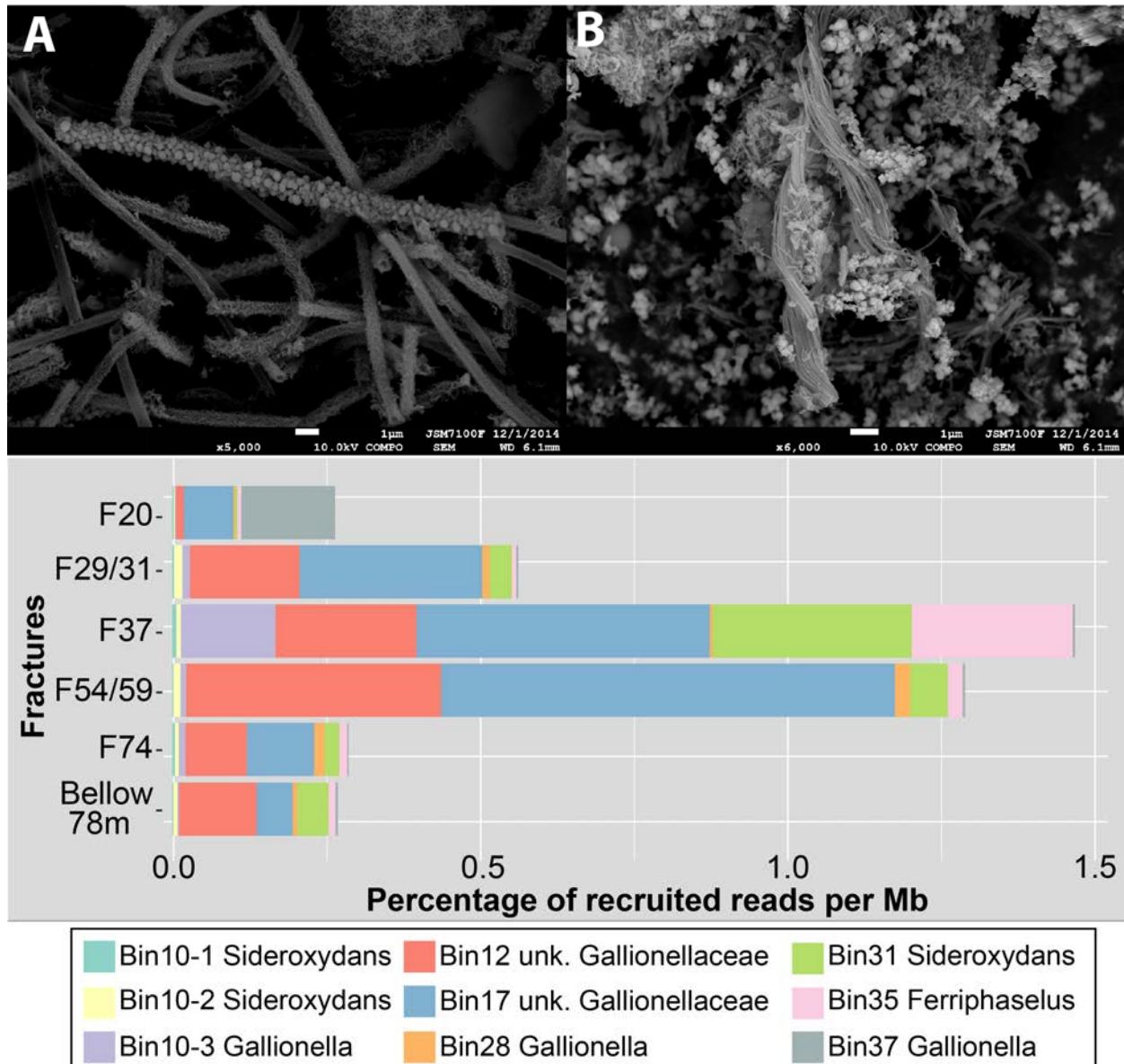


Figure 3: Scanning Electron Microscope observations of the microbial mat: A. tubular structures similar to sheaths formed by *Leptothrix ochracea*, B. Twisted stalks characteristic of some strains of Gallionella and Ferrphaselus. C. Relative abundance of FeOB in water samples collected in fractures expressed as a percentage of metagenomic reads recruited by nine genomic bins of FeOB found in the batch experiment (Fig. 2 and Supplementary Information).

producing the numerous sheaths that form the largest part of the mat. More generally, these observations demonstrate that current knowledge of the diversity of FeOB is far from complete and that a deeper understanding of the link between morphotype and genetic diversity is needed.

We developed a model to predict the formation of FeOB hot spots in subsurface fractures (Fig. 1.C). Specifically the model simulates the range of depths where water flow and biogeochemical reactions create the microaerobic conditions necessary for FeOB<sup>39</sup>. We considered an intersection between two fractures that connected oxidized and reduced flowpaths (Fig. 1.C), characterized respectively by the hydraulic transmissivities  $T_{ox}$  and  $T_{red}$  and the oxygen concentrations  $O_2^{ox} \gg O_2^{red}$ . We assumed that water flow in the oxidized fracture  $Q_{ox}$  was driven by the local hydraulic head difference between the weathered and fractured zones  $dh$  (Fig. 1.B), while flow in the reduced fracture  $Q_{red}$  was driven by a regional hydraulic head gradient  $\nabla h_r$  (Fig. 1.C). Furthermore, we assumed that oxygen consumption followed a first order kinetics as it flows along fractures. The oxygen concentration at fracture intersections was then calculated, assuming complete mixing at fracture intersections, from a flux balance for different depths and hydrologic parameters (see Supplementary Information). Baseline values for all parameters were estimated from observed conditions at the field site (table 1).

Since hydraulic transmissivity values can span orders of magnitude in fractured media<sup>19,40</sup>, we tested the sensitivity of the reactive zone location to this parameter (figure 4A). Other parameters were kept equal to the baseline values. The microbial oxidation zone was defined as the range of depths where  $0.1 < O_2 < 1.5 \text{ mg.L}^{-1}$ <sup>22</sup>. For low transmissivity ratios  $T_{ox}/T_{red} < 10^{-3}$ , the re-

active zone was constrained to shallow depths, but for intermediate ratios  $10^{-2} < T_{ox}/T_{red} < 10^{-1}$ , the reactive zone occurred over a large range of depths (figure 4A). At larger ratios, chemical oxidation became dominant. For the considered baseline parameters (table 1) the transmissivity ratio was  $10^{-2}$ , which corresponds to the transition between shallow and deep reactive zone regimes. In this situation the depths favorable for FeOB development ranged from approximately 450 to 40 meters, which includes the depth of the observed microbial mat formation (60 meters).

Because the flux of water and associated dissolved oxygen is proportional to the local hydraulic head difference  $dh$ , the range of depths favorable for FeOB development is expected to vary seasonally (Fig. 4B) following intermittent oxygen delivery by fractures (Fig. 2D). At the field site, the local hydraulic head varies between the recharge period and the dry season, while the regional hydraulic head gradient is relatively stable (see Supplementary Fig. S2). According to model predictions (Fig 4B), the resulting meter-scale fluctuations of the hydraulic head difference between the shallow and deep compartments  $dh$  can generate hundred-meter-scale fluctuations of the maximum microaerophilic depth. Hence the depth of the reactive zone is highly sensitive to fluctuations in surface water levels. This result challenges the general view that deep subsurface environments respond slowly and weakly to surface changes.

The presented model provides a mechanistic explanation for the observed deep microbial hot spots and allows exploration of the sensitivity of this phenomenon to hydrological flowpath structure and temporal dynamics. This quantitative framework could be used to assess the likelihood of occurrence of different types of biogeochemical reactions besides iron-oxidation and their con-

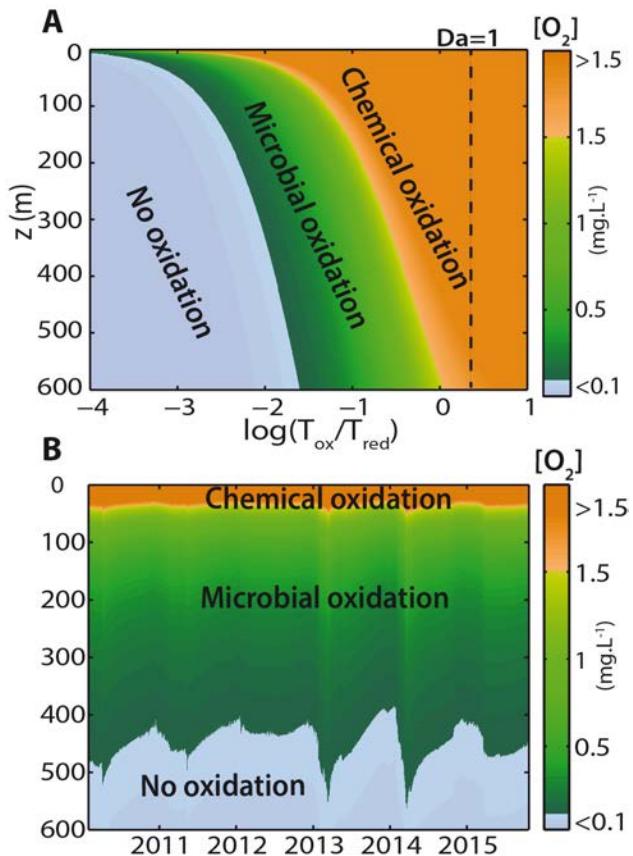


Figure 4: Oxygen concentration at the intersection between the oxidized and reduced fractures A)

as a function of the intersection depth and the transmissivity ratio  $T_{ox}/T_{red}$  all other parameters are taken as the baseline values (table 1) B) as a function of the intersection depth and time, where  $dh$  is taken from the field measurement from 2010 to 2015 and other parameters are taken from the baseline values (table 1).

sequences for the transport and transformation of chemical elements, nutrients, and contaminants in hydrological systems. Although the deep subsurface is usually considered as biogeochemically buffered, because of its supposed isolation from surface hydrological fluctuations, our results suggest that subterranean biogeochemistry may be spatially and temporally dynamic. While large seasonal fluctuations in subterranean biogeochemical productivity have not yet been observed, our simulations suggest that favorable conditions for reactive hot spot development are likely seasonal, creating hot moments for iron oxidation at different depths and different times of the year. Because the subsurface represents considerable volumes of water and fluxes of dissolved elements, the identification of fracture-induced hot spots could be ecosystem control points for landscape-scale biogeochemical reaction cycles. More generally, the presence of large and dynamic subsurface microbial communities has fundamental implications for our understanding of the location and timing of biogeochemical activity in ecosystems. The existence of fractures at multiple scales in the Earth's subsurface suggests that the mechanisms described here may be pervasive and potentially concern a large range of biogeochemical processes, which are driven by mixing of fluids with different residence times and chemical compositions <sup>5</sup>.

## Methods

**Metagenomics sequencing** All water samples were filtered through  $0.22 \mu m$  and flash frozen in liquid nitrogen. DNA was subsequently sequenced with 3 MiSeq runs (Illumina Inc). Metagenomic reads from the batch experiment were assembled and contigs were binned into genomic bins. Metagenomic reads from water sampled in fractures were then mapped against 7 genomes

of reference strains of FeoB and 9 genomic bins which could be affiliated to the Gallionellaceae (see Supplementary Table S3) to assess the relative abundance of FeOB in fractures. Metagenomic reads and genomic assemblies have been submitted to the ENA database under the accession No. PRJEB21768.

**Fracture mixing model** The oxygen concentration resulting from the mixing of the oxidized and reduced fluid at a depth  $z$  can be estimated as:

$$O_2 = O_2^0 \cdot e^{-\frac{z}{z_c}} \left(1 + \frac{z}{z_d}\right)^{-1}, \quad (1)$$

where  $O_2^0$  is the oxygen concentration in the weathered oxidized compartment,  $z_c$  is the characteristic oxygen consumption depth, and  $z_d$  is the characteristic dilution depth (see Supplementary Information). These two characteristic depths quantify the two main processes that affect dissolved oxygen concentration as it is transported along fractures: oxygen consumption by biogeochemical processes and oxygen dilution by mixing with anoxic fractures. The characteristic oxygen consumption depth is the depth at which oxygen concentration has decayed by a factor  $e^{-1}$  due to biogeochemical consumption. It may be estimated as:

$$z_c = v \frac{\sin \alpha}{k} \quad (2)$$

where  $k$  is the oxygen consumption constant,  $v$  is the fracture flow velocity and  $\alpha$  is the fracture dip angle (see Supplementary Information). The characteristic dilution depth  $z_d$  is the depth at which oxygen has been diluted by a factor 2 by mixing at fracture intersections. It may be estimated as:

$$z_d = \frac{T_{ox} \sin \alpha}{T_{red} \nabla h_r} dh \quad (3)$$

where  $T_{ox}$  and  $T_{red}$  are respectively the hydraulic transmissivity of the oxidized and reduced fractures,  $dh$  the difference between the hydraulic head of the oxidized and the reduced compartment ( $dh = h_{ox} - h_{red}$ ), and  $\nabla h_r$  is the regional head gradient (Fig. 1.A). The relative importance of consumption and dilution processes may be quantified with the following Damköhler number:

$$Da = \frac{z_c}{z_d} \quad (4)$$

which is expressed here as a ratio of characteristic depths rather than a ratio of characteristic times as in the conventional Damköhler number definition <sup>1</sup>. For large Damköhler numbers,  $z_d < z_c$ , the depth of oxygen transfer by fracture flow is limited by dilution, while for low Damköhler numbers,  $z_c < z_d$ , it is limited by consumption.

In the dilution limited regime  $Da > 1$ , the maximum depth for FeOB development can be approximated from (1) and (3) as:

$$z_{max} = dh \frac{T_{ox} \sin \alpha}{T_{red} \nabla h_r} \left( \frac{0_2^0}{0_2^{min}} - 1 \right), \quad (5)$$

with  $0_2^{min}$  the minimum concentration of the micro-aerophilic domain.

The estimated model parameters for the field site are given in table 1 (see Supplementary Information).

## References

1. Maher, K. & Chamberlain, C. Hydrologic regulation of chemical weathering and the geologic carbon cycle. *Science* **343**, 1502–1504 (2014).

2. Li, L. *et al.* Expanding the role of reactive transport models in critical zone processes. *Earth-Science Reviews* **165**, 280–301 (2017).
3. Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M. & Packmann, A. I. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 251–263 (2016).
4. McMahon, P. Aquifer/aquitard interfaces: Mixing zones that enhance biogeochemical reactions. *Hydrogeology Journal* **9**, 34–43 (2001).
5. McClain, M. *et al.* Biogeochemical hot spots and hot moments at the interface of terrestrial and aquatic ecosystems. *Ecosystems* **6**, 301–312 (2003).
6. Frei, S., Knorr, K. H., Peiffer, S. & Fleckenstein, J. H. Surface micro-topography causes hot spots of biogeochemical activity in wetland systems: A virtual modeling experiment. *J. of Geophys. Res. : Biogeosciences* **117**, G00N12 (2012).
7. Cardenas, M. B. Hyporheic zone hydrologic science: A historical account of its emergence and a prospectus. *Water Resources Research* **51**, 3601–3616 (2015).
8. Kallmeyer, J. & Wagner, D. *Microbial Life of the Deep Biosphere* (De Gruyter, 2014).
9. Chapelle, F. *Ground-Water Microbiology and Geochemistry* (John Wiley and Sons, 2001).
10. Brune, A., Frenzel, P. & Cypionka, H. Life at the oxic anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 691–710 (2000).
11. Bernhardt, E. S. *et al.* Control points in ecosystems: Moving beyond the hot spot hot moment concept. *Ecosystems* 1–18 (2017).

12. Boano, F. *et al.* Hyporheic flow and transport processes: Mechanisms, models, and biogeochemical implications. *Rev. Geophys.* **52**, 603679 (2014).
13. Stegen, J. C. *et al.* Groundwater-surface water mixing shifts ecological assembly processes and stimulates organic carbon turnover. *Nature Communications* **7**, 11237 (2015).
14. McAllister, S. M. *et al.* Dynamic hydrologic and biogeochemical processes drive microbially enhanced iron and sulfur cycling within the intertidal mixing zone of a beach aquifer. *Limnology and Oceanography* **60**, 329–345 (2015).
15. Chan, C. *et al.* The architecture of iron microbial mats reflects the adaptation of chemolithotrophic iron oxidation in freshwater and marine environments. *Frontiers in Microbiology* **7**, 796 (2016).
16. Gleeson, T., Befus, K. M., Jasechko, S., Luijendijk, E. & Cardenas, M. B. The global volume and distribution of modern groundwater. *Nature Geoscience* **9**, 161–167 (2016).
17. Taylor, R. G. *et al.* Ground water and climate change. *Nature Climate Change* **3**, 322–329 (2013).
18. Long, P., Williams, K., Hubbard, S. & Banfield, J. Microbial metagenomics reveals climate-relevant subsurface biogeochemical processes. *Trends in Microbiology* **24**, 600–610 (2016).
19. Bonnet, E. *et al.* Scaling of fracture systems in geological media. *Rev. Geophys.* **39**, 347 383 (2001).

20. St Clair, J. *et al.* Gophysical imaging reveals topographic stress control of bedrock weathering. *Science* **350**, 534–538 (2015).
21. Martinez-Landa, L. *et al.* Mixing induced reactive transport in fractured crystalline rocks. *Applied geochemistry* **27**, 479–489 (2012).
22. Anderson, C. R. & Pedersen, K. In situ growth of Gallionella biofilms and partitioning of lanthanides and actinides between biological material and ferric oxyhydroxides. *Geobiology* **1**, 169–178 (2003).
23. Weber, K. A., Achenbach, L. A. & Coates, J. D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology* **4**, 752–764 (2006).
24. Emerson, D. & Revsbech, N. P. Investigation of an iron-oxidizing microbial mat community located near aarhus, denmark: field studies. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 4022–4031 (1994).
25. Quaiser, A. *et al.* Unraveling the stratification of an iron-oxidizing microbial mat by metatranscriptomics. *Plos One* **9**, 1–9 (2014).
26. Fleming, E. J., Cetinić, I., Chan, C. S., King, D. W. & Emerson, D. Ecological succession among iron-oxidizing bacteria. *The ISME journal* **8**, 804–815 (2014).
27. Emerson, D. *et al.* Comparative genomics of freshwater Fe-oxidizing bacteria: Implications for physiology, ecology, and systematics. *Frontiers in Microbiology* **4**, 1–17 (2013).

28. Kato, S. *et al.* Comparative genomic insights into ecophysiology of neutrophilic, microaerophilic iron oxidizing bacteria. *Frontiers in Microbiology* **6**, 1–16 (2015).
29. Melton, E. D., Swanner, E., Behrens, S., Schmidt, C. & Kappler, A. The interplay of microbially mediated reactions in the biogeochemical fe cycle. *Nature Reviews Microbiology* **12**, 797–808 (2014).
30. Fleming, E. J. *et al.* What's new is old: Resolving the identity of Leptothrix ochracea using single cell genomics, pyrosequencing and FISH. *PLoS ONE* **6**, 1–10 (2011).
31. Ben Maamar, S. *et al.* Groundwater isolation governs chemistry and microbial community structure along hydrologic flowpaths. *Frontiers in Microbiology* **6**, 1–13 (2015).
32. Ayraud, V. *et al.* Compartmentalization of physical and chemical properties in hard-rock aquifers deduced from chemical and groundwater age analyses. *Applied Geochemistry* **23**, 2686–2707 (2008).
33. Roques, C. *et al.* Groundwater sources and geochemical processes in a crystalline fault aquifer. *Journal of Hydrology* **519**, 3110–3128 (2014).
34. Purkamo, L. *et al.* Dissecting the deep biosphere: Retrieving authentic microbial communities from packer-isolated deep crystalline bedrock fracture zones. *FEMS Microbiology Ecology* **85**, 324–337 (2013).
35. Sorensen, J. P. R. *et al.* Using Boreholes as Windows into Groundwater Ecosystems. *PLoS ONE* **8** (2013).

36. Emerson, D., Fleming, E. J. & McBeth, J. M. Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annual review of microbiology* **64**, 561–583 (2010).
37. Hallbeck, L., Stahl, F. & Pedersen, K. Phylogeny and phenotypic characterization of the stalk-forming and iron-oxidizing bacterium *Gallionella ferruginea*. *Journal of General Microbiology* **139**, 1531–1535 (1993).
38. Kato, S., Krepski, S., Chan, C., Itoh, T. & Ohkuma, M. *Ferriphaselus amnicola* gen. nov., sp. nov., a neutrophilic, stalk-forming, iron-oxidizing bacterium isolated from an iron-rich groundwater seep. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 921–925 (2014).
39. Druschel, G. K., Emerson, D., Sutka, R., Suchecki, P. & Luther, G. W. Low-oxygen and chemical kinetic constraints on the geochemical niche of neutrophilic iron(II) oxidizing microorganisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **72**, 3358–3370 (2008).
40. Le Borgne, T., Bour, O., Paillet, F. L. & Caudal, J. P. Assessment of preferential flow path connectivity and hydraulic properties at single-borehole and cross-borehole scales in a fractured aquifer. *Journal of Hydrology* **328**, 347–359 (2006).

**Acknowledgements** ADEME, Région Bretagne and ANR projects CRITEX (ANR-11-EQPX-0011) and Stock-en-Socle (ANR-13-SEED-0009) are gratefully acknowledged for funding. The dataset was provided by the Ploemeur hydrogeological observatory (H+ network hplus.ore.fr and OZCAR Critical Zone observatory). This project was funded by ERC project ReactiveFronts (648377) and ANR project ANR-14-CE04-0003. We also thank M. Bouhnik-Le-Coz and P. Petitjean for the chemical analysis, CMEBA for the

SEM imaging, the CONDATE EAU platform, M. Chorin and A. Quaisser for the light and fluorescence microscopy. S. Michon-Coudouel and M. Biget for the metagenome sequencing. We finally thank Y. Duclot, S. Ben Maamar, T. Babey, G. Baby, P. Davy and O. Bour for their help and stimulating scientific discussions.

Table 1: Baseline parameters for the fracture mixing model based on the observed field data (see Supplementary Information).

Parameter	Estimated value	Parameter	Estimated value
$z$	50 m	$T_{ox}$	$10^{-5} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$
$\alpha$	60°	$z_c$	850 m
$\nabla h_r$	$3.10^{-3}$	$z_d$	23 m
$dh$	8 m	$O_2^0$	$4.5 \text{ mg.L}^{-1}$
$T_{red}$	$10^{-3} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$	$O_2^{min}$	$0.1 \text{ mg.L}^{-1}$

# **Supporting Information for Fractures sustain dynamic microbial hotspots in the subsurface**

Bochet et al.

## **Ploemeur site characteristics**

The Ploemeur fractured rock site is part of the French network of hydrogeological observatories ( $H^+$  [hplus.ore.fr/en](http://hplus.ore.fr/en)) and the OZCAR Critical Zone observatories. Hydrogeophysical investigations at different scales <sup>1-3</sup> have shown that aquifer recharge occurs through gently-dipping fractures and vertical feeders, which are able to rapidly drain water at depth <sup>4,5</sup>. These observations suggest that the aquifer is partitioned between a superficial weathered zone (which is actively recharged), and a deeper fractured formation (recharged by regional flows) (Fig. 1.B). Hence, boreholes intersecting recharge pathways show large fluctuations of water levels fluctuations (up to 10 meters of amplitude) and high oxygen concentration ranging from 4 to 6 mg.L<sup>-1</sup>, whereas those intersecting deep fractures show small seasonal water level fluctuations (less than 1 m) and very low oxygen concentrations (Fig. S1). Four artesian wells, located in low topography areas intersecting the deep fracture zone, produce flow continuously as their hydraulic head is higher than the local topography.

Piezometric levels are monitored in 12 boreholes (Fig. S1.B) at frequency of one measurement every 10 minutes using STS pressure probes. The borehole depths range from 50 to 150 meters (Fig. S1.C). Their diameter is approximately 16.5 cm. The evolution of piezometric levels

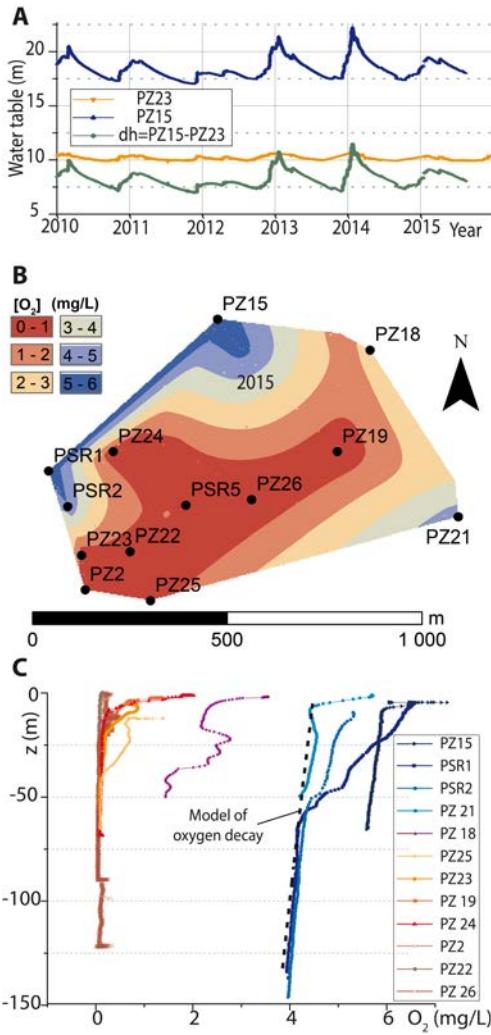


Figure S1: A. Evolution of piezometric levels over time for two boreholes located in high (PZ15) and low (PZ23) topographic zones representative respectively of the weathered and in the deep fractured zones. B. Map of borehole locations and interpolated oxygen distribution at 20 meters depth. C. Oxygen concentration profiles with depth in the 12 boreholes. The boreholes representative of recharge areas are represented in nuances of blue colors, while those representative of discharge areas are represented in nuances of red colors. A model of average oxygen concentration decay by biogeochemical processes ((7)) is fitted from the oxygen evolution with depth observed in the deepest boreholes representative of recharge areas, PSR1 and PSR2 (dashed black line).

in two wells representative of the upper weathered compartment (*PZ15*) and the deep fractured compartment (*PZ23*) are shown in Fig. S1.A. The difference in hydraulic head between the two boreholes  $dh$  fluctuates between 7 and 10 meters as the upper compartment is actively recharged by local precipitations while the deeper fractures are slowly recharged by regional flows<sup>1</sup>. We use this data to evaluate temporal fluctuations in reactive hotspot depth with the fracture mixing model.

Oxygen profiles were measured in the 12 boreholes with a multiparameter probe (Ocean seven 303 CTD Idronaut). While the oxygen concentration generally decreases with depth (Fig. S1.C), two groups may be distinguished. The first group (PSR1, PSR2, PZ15, PZ21, and to a lesser extent PZ18) maintains high oxygen concentration with depth and are representative of active recharge zones located in high topography areas. The second group (PZ19, PZ24, PZ26, PZ2, PZ23, PZ22, and PZ25) has very low oxygen concentration and is representative of deep ground-water upwelling zones in low topography areas. Low oxygen concentrations are thus correlated with higher temperatures.

## Flow and Hydraulic Transmissivity Profiles

Borehole flow profiles (Fig. 2.B) were measured with an impeller flowmeter (GeoVista borehole logging). Under ambient conditions, water flows naturally out of the borehole at a rate of about  $40 \text{ L}.\text{min}^{-1}$  due to the artesian nature of the well. Because both ambient and pumping flow profiles are needed to determine fracture hydraulic properties accurately<sup>6</sup>, a flow log was also performed while pumping the well at a rate of  $160 \text{ L}.\text{min}^{-1}$ . Flow profiles (Fig. 2.B) represent

the cumulative flow provided by each fractures along the borehole. Hence the cumulative flow increases generally from the bottom of the borehole, where only the bottom fractures contribute, to the top of the borehole, where all fractures contribute. The fluctuations observed in flow logs are due to borehole wall irregularities and variations in diameter. The flow profiles show localized increments of flow where fractures intersect the borehole, separated by approximately constant flow zones in the interval between productive fractures. The flow rate produced by each fracture,  $q_i$  can thus be estimated from the difference between the mean flow rate below and above each fracture.

Each fracture is expected to produce a flow rate proportional to its hydraulic transmissivity and to the hydraulic head difference between the fracture and the borehole. By subtracting the ambient flow profile to the pumping flow profile, the effect of fracture head differences may be removed<sup>6</sup> to obtain an incremental flow profile that depends only on the fracture transmissivities and on the pumping rate  $Q$ . Hence, the relative transmissivity  $\frac{T_i}{T^{tot}}$  of each fracture may be estimated as follows:

$$\frac{T_i}{T^{tot}} = \frac{\Delta q_i}{Q} \quad (1)$$

with  $T^{tot}$  the total borehole transmissivity,  $\Delta q_i = q_i^p - q_i^a$ , the incremental flow contribution of each fracture obtained from the difference between  $q_i^p$ , the flow contribution of each fracture under pumping, and  $q_i^a$ , the contribution of each fracture under ambient conditions.

Estimated relative fracture transmissivities are presented in table S1. More than 60 % of the flow is produced by highly transmissive fracture zones below 94 m. The rest of the flux is provided

Fractures	$T_i/T_{tot}$
$F10$	3%
$F20$	4%
$F29 - F31$	9%
$F37$	10%
$F54$	2%
$F59$	4%
$F73$	8%
Below 94 m	61%

Table S1: Relative fractures transmissivities in borehole PZ26 estimated from 1.

by the various shallowest fractures with a contribution lower than 10% for each fracture. The total borehole transmissivity estimated from classical pumping test is approximately  $T_{tot} = 5.10^{-3} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ . This value is close to the transmissivities measured at the nearby groundwater extraction site of Ploemeur, which has a similar geological setting. These relatively high transmissivities result from the good connectivity of the fracture network in which water flows <sup>7</sup>.

### Borehole Imaging of Fractures and Microbial Mats

A detailed imaging of borehole PZ26 was performed from optical and acoustic logs (obtained from OBI40 and ABI40 probes) and with a downhole borehole camera (GeoVISIONTM Nano Camera, Allegheny Instruments). Continuous presence of the rust-colored mat is visible from the top of the borehole down to a depth of about 60 m (Fig. S2). At some depths, the mat completely clogs

the borehole. Fracture depths, orientations, and inclinations are estimated from the intersections of fractures with the borehole wall, which forms typical sinusoidal traces corresponding to the unfolding of an ellipse.

Two fracture groups with different general orientations are identified (Fig. 2.C): the first group is composed of fractures that are approximately oriented North-West ( $280^\circ - 0^\circ$ ) and the second group includes fractures oriented East (orientation  $90^\circ$ ). Fractures with North-West orientation may be separated into two groups. One containing gently dipping fractures ( $35^\circ$ ) with a quite homogeneous orientation (about  $350^\circ$ ) which is almost represented in the entire borehole (from surface to 100 m depth), and another group of large dip fractures ( $\sim 70^\circ$ ), which are visible between 20 and 40 m. Fractures with an Eastern orientation may be separated in two sub-groups: a group of shallow fractures distributed from about 0 to 60 m depth, which are characterized by large dips ( $\sim 60^\circ$ ), and a group of deeper fractures around 120 m depth with intermediate dips ( $\sim 50^\circ$ ).

## Batch Experiments

Batch experiments were performed to characterize the mechanisms of biofilm formation and its effect on water chemistry. Water was sampled in the borehole at 1 m depth in glass bottles previously autoclaved and isolated with a rubber septum to avoid exchanges with atmosphere. Bottles were incubated in dark at  $15^\circ C$  for 170 hours. The formation of biofilm and associated evolution of physicochemical characteristics (pH, Eh, electrical conductivity), iron concentration (measured by ICPMS) was monitored for 7 days (Fig. S3).

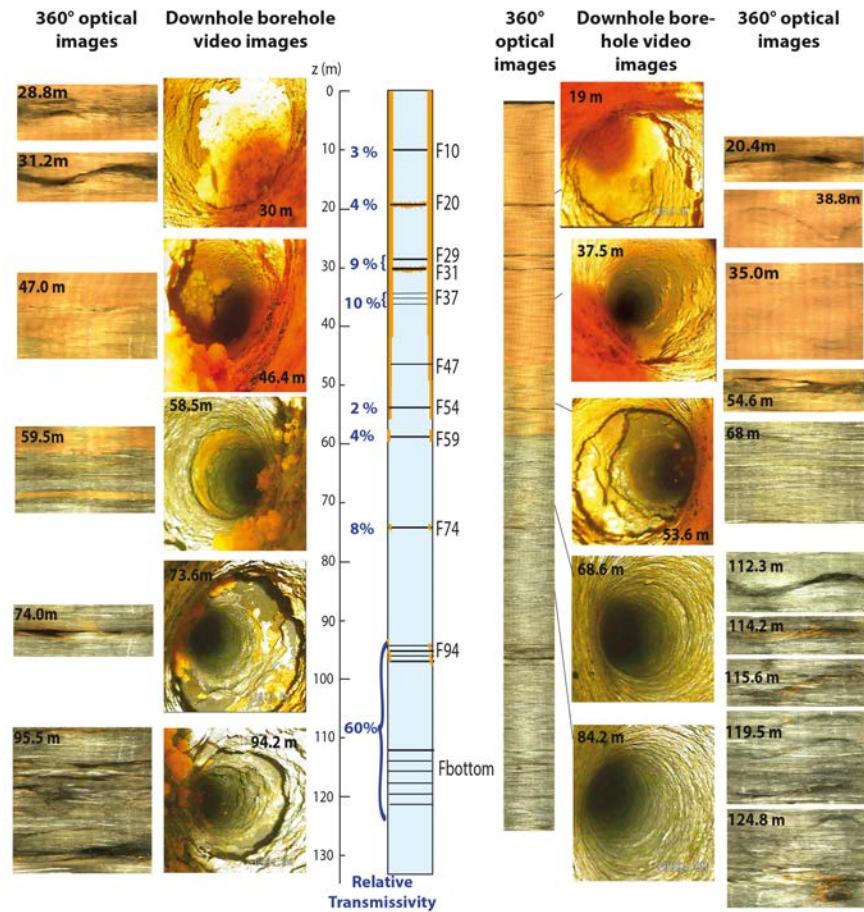


Figure S2: Snapshots of 360° optical images and downhole borehole video images in borehole PZ26.

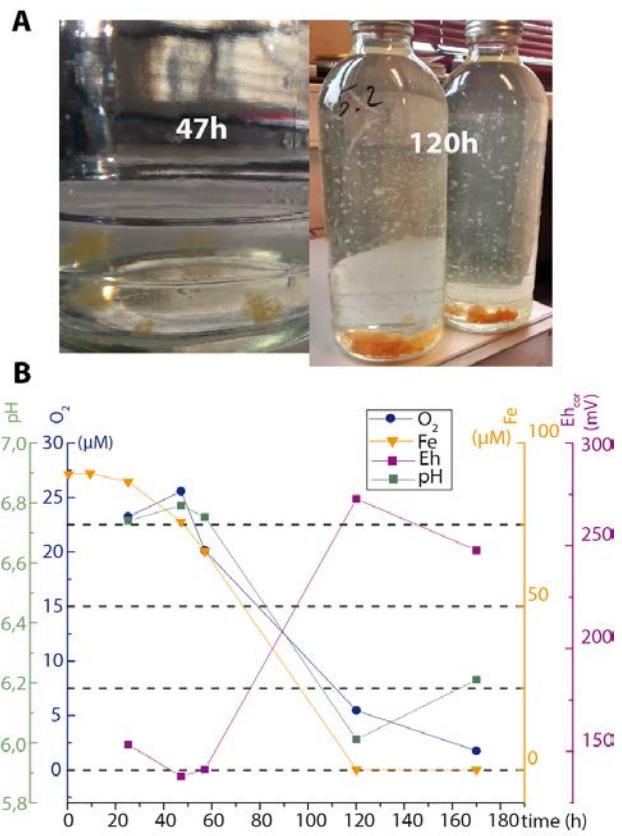
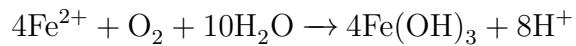


Figure S3: Batch experiments for monitoring the kinetics of iron oxidation and oxygen consumption during mat formation. A. Formation of the microbial mat in the sampling bottles. B. Evolution of dissolved oxygen (red) and iron (orange) concentration, pH (green) and redox potential (purple) as a function of time.

After sampling water from the PZ26 borehole, the development of loose flocs of orange material was observed at the bottom of the bottles after approximately 40 hours, indicating that FeOB were active in the sampled fluid (Fig. S3.B). Simultaneously to the mat formation, a decrease of both iron and oxygen concentration was observed. Ferrous iron and oxygen concentrations decreased from 5 and  $0.8 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectively, to almost 0. Simultaneously, redox potential rose from approximately 150 to 265 mV while pH decreased from 6.75 to 6.20 (Fig. S3). These results were consistent with the formation of iron oxyhydroxides resulting from biogenic Fe (II) oxidation at circumneutral pH <sup>8</sup>:



Carbon was provided from dissolved inorganic carbon, which decreased from  $23 \text{ mg.L}^{-1}$  to  $19 \text{ mg.L}^{-1}$  during the formation of the mat. Concentrations in dissolved organic carbon in the borehole are very low.

### **Measurement of Physicochemical Properties and Iron Speciation**

Physicochemical properties were measured by *in situ* probes for both field campaign and batch experiments. Conductivity was measured with a Intellical<sup>TM</sup> CDC 401 probe (with a range of  $0.01 \mu\text{S.cm}^{-1}$  to  $200 \text{ mS.cm}^{-1}$ ). Dissolved oxygen was measured with a LDO101 probe (accuracy of  $\pm 0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ ). pH was measured with a combined Mettler InLab<sup>®</sup> electrode (accuracy  $\pm 0.05 \text{ pH}$

units) calibrated with WTW standard solutions ( $\text{pH} = 4.01$  and  $7.00$  at  $25^\circ\text{C}$ ). Eh was measured using a combined Pt electrode (Fisher scientific Bioblock). The Eh values are presented in millivolts (mV) relative to the standard hydrogen electrode. Major- and trace-element concentrations were determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)(Agilent Technologies France, 7700x). Typical uncertainties, including all sources of error, were between 2% and 5%. ChloroFluoroCarbons (CFCs) and sulfur hexafluoride (SF6) concentrations were sampled in steel bottles and analyzed by gas-chromatography with an electron capture detector (ECD) detector with an uncertainty of about 3%<sup>9</sup>. Dissolved Fe ( $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$ ) concentrations were measured by the 1,10 phenanthroline colorimetric method, AFNOR NF T90-017 (AFNOR, 1997), using a UV-visible spectrophotometer (see table S2).

Sampled zone	$\text{Fe}_{tot}(\mu\text{M})$	$\text{Fe}(II)/\text{Fe}(tot)\%$
	ICPMS	Spectrophotometer
Top of borehole (0 m)	73.4	94%
<i>F</i> 20	15.3	97%
<i>F</i> 30	52.8	93%
<i>F</i> 37	39.0	96%
<i>F</i> 54	38.9	93%
<i>F</i> 59	55.2	93%
Bottom	77.3	98%

Table S2: iron speciation in each sampled zone.

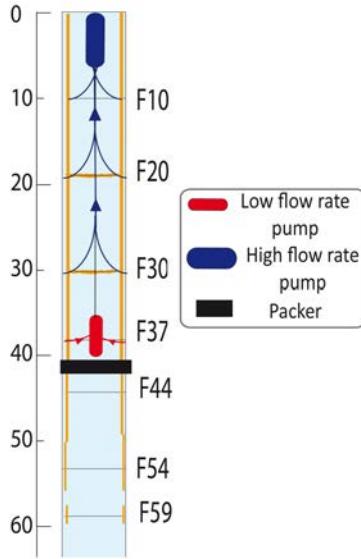


Figure S4: Sketch of the packer sampling method.

### Packer Method for Fracture Fluid Sampling

To precisely analyze the chemical and microbiological composition of fracture fluids, a hydraulic inflatable packer was placed below each fracture to isolate it from the upwards flow coming from deeper fractures. To ensure that only water coming from the targeted fracture was collected, two pumps were placed in the well. One close to the surface, pumping at a rate of  $35\text{ L}/\text{min}$  in order to constrain flow coming from the upper fractures upward. The second one was placed in front of the targeted fracture to sample water from this fracture only at a rate of  $4\text{ L}/\text{min}$  (Fig. S4).

### Scanning Electron Microscope imaging

Scanning Electron Microscop (SEM) and visible light microscop (Olympus BX40, with zoom X40, X60 and a X100 objective with oil immersion) allowed identification of bacterial characteristic

structures. Several samples of microbial biofilm were washed 5 times with ethanol in microtubes (6000 x g, 10 min), dried out at the critical point (Balzers Instruments, CPD010) and observed by SEM. The samples were observed with and without coating with Au-Pd nanoparticles by cathodic deposition with a JEOL JSM-7100F Field Emission Gun Scanning Electron Microscope operated at 5, 7 or 9 kV. These analyses were performed at the CMEBA Analytical Facility at the University of Rennes 1.

### **Metagenomics: materials and methods**

Samples collected in the borehole and samples incubated in batches were filtered to  $0.22\mu m$  with Durapore Membrane Filters, flash frozen in liquid nitrogen and stored in a  $-80^{\circ}C$  freezer awaiting further analyses. For DNA extraction, filters were placed in sterile tubes with 7 ml of lysis buffer with cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) and polyvinylpyrrolidone (PVP), to remove organic contaminants such as humic acids. Filters were incubated at  $-65^{\circ}C$  for 30 min (vortexing every 5 min during 20s). One volume of chloroform-isoamylalcohol (24:1) was added and tubes were vortexed and incubated at room temperature for 10 minutes, and centrifuged at 4,000 rpm for 30 minutes at  $15^{\circ}C$ . The aqueous phase was removed and the NucleoSpin gDNA Clean-up kit (Macherey-Nagel) was used for the last steps of the extraction, following the instructions of the manufacturer. The DNA was further purified with Illustra MicroSpin S-400 HR columns (GE Healthcare) and fragmented with the M220 Focused-ultrasonicator<sup>TM</sup> (Covaris, Inc). All libraries of metagenomics DNA were prepared with the NEBNext<sup>R</sup> UltraDNA Library Prep Kit for Illumina and the NEBNext<sup>R</sup> Multiplex Oligos for Illumina Index (New England Biolabs, Inc) and pooled

after DNA quantification with Quantifluor (Promega). Pooled libraries were sequenced with three paired-end MiSeq runs (Illumina INC) at the Human and Environmental Genomics facility of the university of Rennes 1 (two 2 x 150 bp and one 2 x 250 bp). Read quality was analyzed with FastQC-v0.11.5 ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc)).

Reads were quality filtered and trimmed with FastQ QC-Trimmer (Galaxy tool shed) ([https://toolshed.g2.bx.psu.edu/repository?repository\\_id=ef54ec2068e06fbe](https://toolshed.g2.bx.psu.edu/repository?repository_id=ef54ec2068e06fbe)). After the filtering step, metagenomic reads were compared to the NCBI NR database with DIAMOND-BLASTx v0.7.9<sup>10</sup>. Blastx results were analyzed with MEGAN community Edition v6.4<sup>11</sup> to obtain taxonomic profiles for each sample. All batch samples displayed significant percentage of reads affiliated to the family Gallionellaceae since about 36% and 52% of the reads with a classification at the family level were assigned to this family in shallow and deep samples respectively. Thus, taxonomic profiles based on short-reads data confirmed successful FeOB enrichment in water samples incubated in batchs. Percentage of reads assigned to other known genera of microaerophilic FeOB such as Leptothrix and Mariprofundus measured to be as low as 0.3% and 0.1% respectively.

Paired-end reads resulting from the batch experiment were assembled into contigs SPAdes 3.7.0<sup>12</sup>. The mean coverage of contigs (i.e. the differential distribution of contigs) across all samples (fracture fluids and batchs) were determined by aligning metagenomic reads against contig sequences with BBMap-v36.62 (<https://github.com/BioInfoTools/BBMap>). Contigs were subsequently binned into genomic bins. These bins correspond to clusters of contigs which are grouped together based on their shared characteristics such as contig nucleotide composition and

contig coverage across samples. This approach, which has received increasing attention in the recent years allows extraction of draft genomes representing microbial cell populations from complex microbial communities<sup>13</sup>.

To obtain high-quality genomic bins, we used the Anvi'o analysis platform v2.1.0<sup>14</sup> and followed instructions described in the “Anvi'o User Tutorial for Metagenomic Workflow” (<http://merenlab.org/2016/06/22/anvio-tutorial-v2/>). During the processing of contigs with Anvi'o, Open Reading Frames (ORF) were predicted with Prodigal<sup>15</sup> and sequences translated in amino-acids were exported from the contigs database and compared against protein sequences of the NCBI NR database with the Diamond-BLASTp v0.7.9<sup>10</sup>. Comparison results produced by Diamond were analyzed with MEGAN to obtain a taxonomic assignment for each ORF. Taxonomic assignments were imported into the anvi'o contigs database to yield a consensus taxonomy for each contig. Genomic Bins were automatically delineated with the CONCOCT algorithm<sup>16</sup> and the percentages of completion and redundancy of each bin were calculated from the number of universal marker protein-coding genes detected in contigs. Bins were then manually refined to reduce the percentage of redundancy while retaining a high completion percentage. Using this approach allowed identifying 9 genomics bins that could be linked to the family Gallionellaceae. Statistics of the curated Gallionellaceae-related bins are given in table S3.

Universal single-copy phylogenetic Marker Genes were searched with FetchMG (<http://www.bork.embl.de/software/mOTU/fetchMG.html>) in genomic bins and in the genomes of references strains of Betaproteobacteria. Marker genes shared by the genomics bins and refer-

Name	Total size (Mb)	No. of Contigs	N50 (bp)	% of completion	% of redundancy	GC %	Taxonomy
<i>Bin10 – 1</i>	3.13	70	59.537	95.68	0.72	55.54	Sideroxydans
<i>Bin10 – 2</i>	3.28	145	30.154	63.31	1.44	56.17	Sideroxydans
<i>Bin10 – 3</i>	3.3	55	107.357	71.22	3.6	52.34	Gallionella
<i>Bin12</i>	4.22	117	14.115	91.37	7.91	54.68	Unknown
							Gallionellaceae
<i>Bin17</i>	2.61	369	8.762	60.43	2.16	55.43	Unknown
							Gallionellaceae
<i>Bin28</i>	3.1	212	21.888	97.84	2.16	49.77	Gallionella
<i>Bin31</i>	3.44	111	65.145	99.28	2.88	54.13	Sideroxydans
<i>Bin35</i>	2.81	79	80.495	94.96	1.44	55.2	Ferriphaselus
<i>Bin37</i>	2.24	71	47.124	98.56	7.91	59.6	Gallionella

Table S3: Characteristics of the 9 genomics bins of FeOB isolated from the batch experiment. Percentages of completion and redundancy of the bins were calculated from the number of universal marker protein-coding genes with the Anvi’o software.

ence strains were aligned against the corresponding HMM with the HMMAlign algorithm from the HMMER v3.1b2 software. Alignments were cured with Gblocks v0.91b and concatenated. The resulting alignments were used for phylogenetic reconstruction using PhyML v3.1 and MrBayes v3.2.3 with the Phylogeny.fr web server<sup>17</sup>. Since the genomic bins correspond to draft genome assemblies with varying degree of completion (e.g. see column % of completion in table S3), only a small subset of marker genes (7 out of 41) were shared by the 9 genomic bins and the reference strain genomes. Hence, we reconstructed phylogenetic trees with different combinations of genomic bins and reference strains to increase the number of marker genes used for the alignments and the amount of evolutionary information in the trees. Six combinations of three to five genomics bins were made to maximize the number of markers genes. For each combination, marker genes amino-acid sequences were aligned and concatenated and the resulting alignments were cured as aforesaid.

Maximum-likelihood trees were computed with Fasttree v2.1.10<sup>18</sup> with the JTT model of sequence evolution and SH-like local support values. The six trees are depicted in Fig. S5. Reads were mapped on 7 reference genomes of FeOB and on the 9 genomic bins (table S4) with BBMap-v36.62 with default parameters and a filtering step to eliminate alignments with more than three substitutions. The proportions of recruited reads were normalized by dividing percentage values by the total contig size for genomic bins or by genome size for reference genome table S4. Homologs of the outer membrane cytochrome c protein-coding gene (cyc2) found in Mariprofundus ferrooxidans PV-1<sup>19</sup> and Gallionellaceae genomes<sup>20</sup> were searched in all genomic bins. Likewise, homologs found in Proteobacteria and Chlorobi were retrieved from the Gen-

bank database. Amino-acid sequences were aligned with Muscle and the alignment was cured with Gblocks 0.91. A maximum-likelihood tree was made with Fasttree v2.1.10<sup>18</sup> with the JTT model of sequence evolution. The reliability of the maximum-likelihood tree was evaluated by bootstrapping. 100 random alignments were created by bootstrap resampling with PhyloP's Seqboot<sup>21</sup> and were used to compute 100 maximum-likelihood trees with Fasttree. The original tree and the 100 random trees were compared with the CompareToBootstrap.pl script (available at <http://www.microbesonline.org/fasttree/treecmp.html>) to obtain node support values.

### **Metagenomics: extracting the genome of FeOB growing in the incubations**

Incubation of water samples in batches coupled to metagenome sequencing, assembling and binning allowed the delineation of 67 genomic bins out of which 9 were assigned to Gallionellaceae and used in this study. We applied phylogenomic reconstructions to precisely define the evolutionary relationships between the genomics bins and the known strains of Gallionellaceae. Universal protein-coding genes (i.e. marker genes) defined in FetchMG were searched in genomic bins (see SI file *List\_Marker\_Genes\_FetchMG\_FeOB\_bins.xlsx*). Seven marker genes were shared by all genomic bins. A phylogenomic tree based on this set of genes showed that seven of the nine bins could be assigned down to the genus-level (Fig. S6) with three bins affiliated to Gallionella (Bin10–3, Bin28 and Bin37), three other bins affiliated to Sideroxydans (Bin10–1, Bin10–2 and Bin31), and one bin to Ferriphaselus (Bin35). Two additional bins (Bin12 and Bin17) branched outside the Gallionellaceae family and could not be related to any genus (Fig. S6). Six additional trees with different combinations of genomic bins were also constructed to increase the number

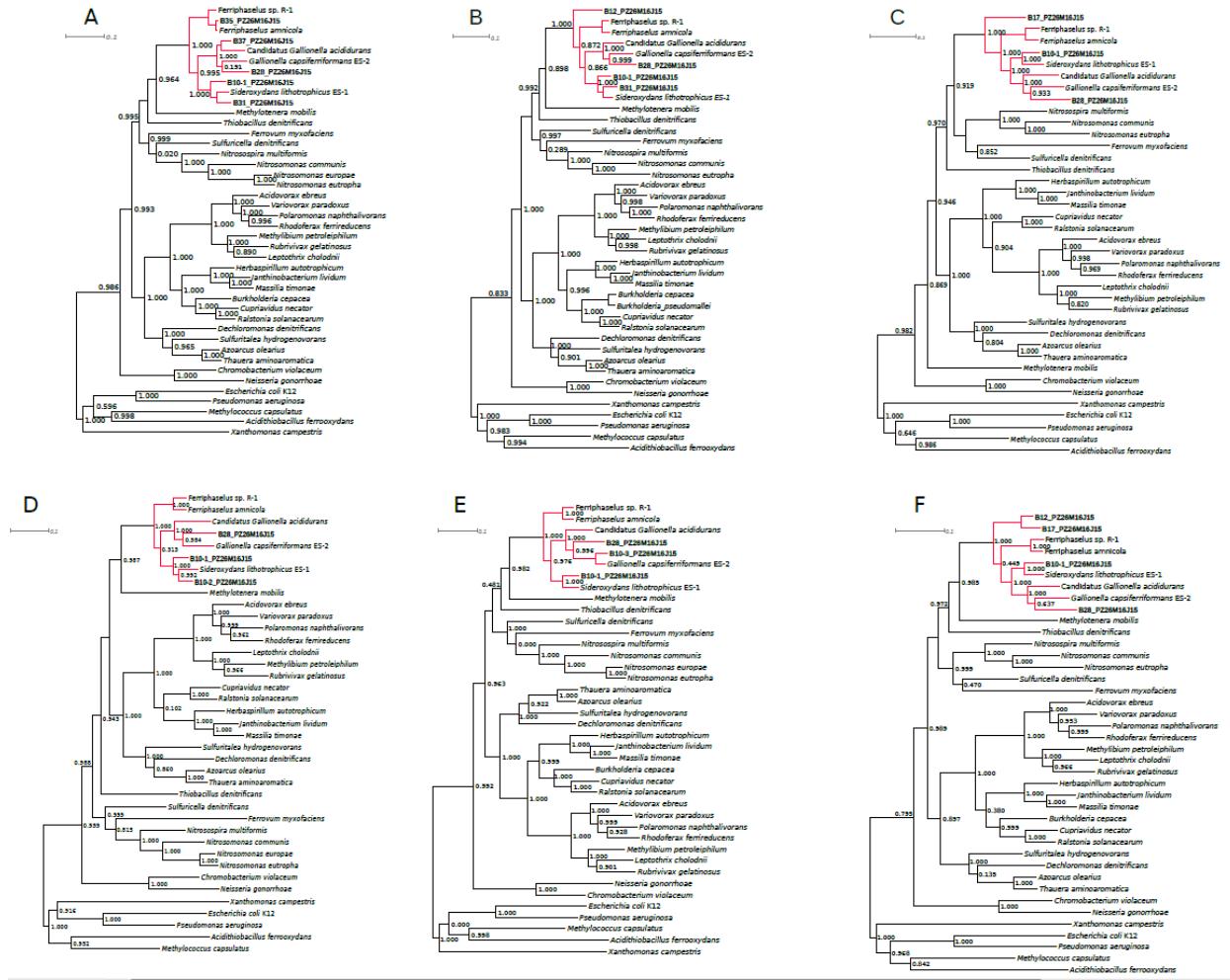


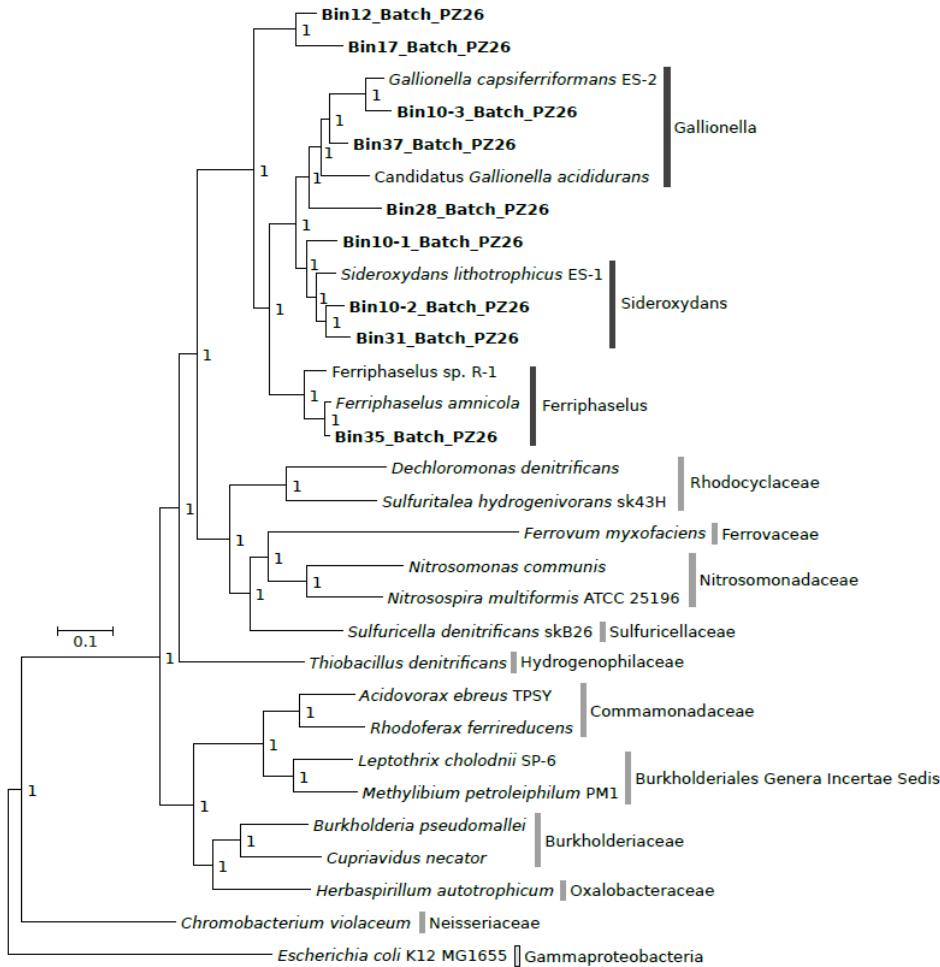
Figure S5: Maximum-likelihood phylogenetic trees based on alignments of concatenated amino-acid sequences of universal phylogenetic marker genes shared in six different combinations of genomics bins (shown in boldface in the tree) and reference strains. Strains of Gammaproteobacteria (*E. coli* K12, *P. aeruginosa*, *X. campestris*, *A. ferrooxydans*, *M. capsulatus*) were used as outgroups to root the tree. Numbers at nodes indicate SH-like local support values. The family Gallionellaceae is highlighted by red thickened branches. The number of marker genes (MG) used for the trees and the size (no. of positions) of the corresponding alignments are as follow : A) 36 MG / 7980 positions; B) 29 MG / 6864 positions; C) 17 MG / 5520 positions; D) 15 MG / 4465 positions; E) 20 MG / 5225 positions; F) 15 MG / 4500 positions

Strain or genomic bin	Below 78m	F74	F54/59	F37	F30	F20
<i>Ferriphaselus amnicola</i>	0.00100	0.00045	0.00044	0.01118	0.00032	0.00041
Ferriphaselus sp. R-1	0.00011	0.00001	0.00005	0.00031	0.00007	0.00020
<i>Leptothrix ochracea</i>	0.00007	0.00069	0.00046	0.00000	0.00059	0.00039
<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6	0.00000	0.00001	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
<i>Sideroxydans lithotrophicus</i> ES-1	0.00009	0.00002	0.00005	0.00025	0.00008	0.00015
<i>Gallionella capsiferriformans</i> ES-2	0.00017	0.00010	0.00012	0.00150	0.00014	0.00031
<i>Candidatus Gallionella acididurans</i>	0.00202	0.00000	0.00000	0.00491	0.00000	0.00000
Average percentage for known FeOB	0.00043	0.00016	0.00014	0.00227	0.00015	0.00018
<i>Bin</i> 10 – 1	0.00185	0.00447	0.00192	0.00674	0.00300	0.00240
<i>Bin</i> 10 – 2	0.00662	0.00607	0.01159	0.00720	0.01354	0.00177
<i>Bin</i> 10 – 3	0.00264	0.01100	0.00903	0.15397	0.01218	0.00194
<i>Bin</i> 12	0.12635	0.09998	0.41500	0.22960	0.17865	0.01270
<i>Bin</i> 17	0.05866	0.10950	0.73893	0.47774	0.29720	0.08096
<i>Bin</i> 28	0.00777	0.01697	0.02481	0.00474	0.01248	0.00306
<i>Bin</i> 31	0.05076	0.02419	0.06163	0.32384	0.03593	0.00340
<i>Bin</i> 35	0.01107	0.01260	0.02377	0.26214	0.00712	0.00616
<i>Bin</i> 37	0.00379	0.00205	0.00384	0.00362	0.00330	0.15254
Average percentage for genomic bins	0.02995	0.03187	0.14339	0.16329	0.06260	0.02944

Table S4: Percentage metagenomic reads (from water collected in fractures) recruited by genomes of reference FeOB strains and genomic bins. Percentage values are expressed by Mb of genome or contig sequence

of marker genes (Fig. S5). Bin12 and Bin17 always branched outside the cluster containing both reference strains of Gallionellaceae and the 7 genomics bins (Fig. S5.B, S5.C and S5.F), strengthening the hypothesis that the two bins belong to new lineages of unknown Gallionellaceae. Characteristics of the 9 bins, including their phylogenetic affiliation, are shown in table S3.

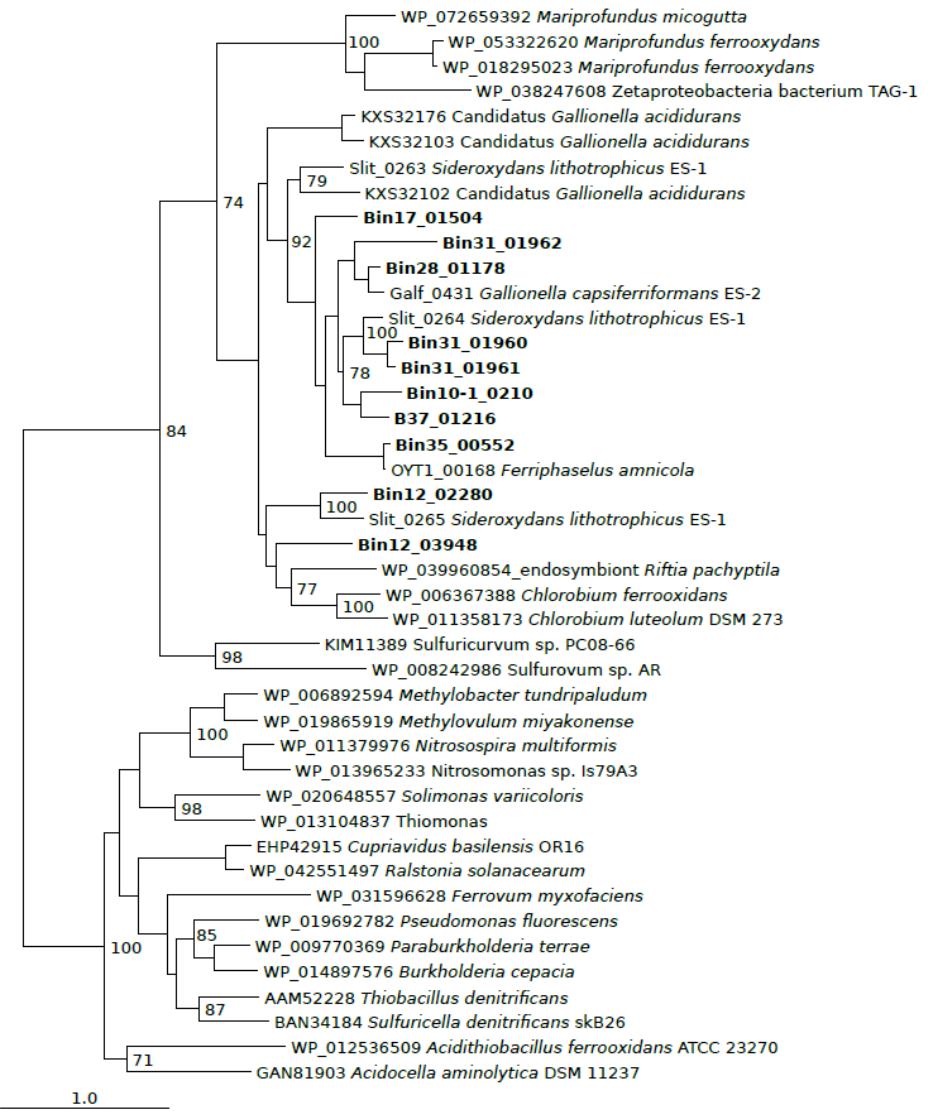
The phylogenetic affiliation of seven of the nine genomic bins attributable to the three genera of Gallionellaceae strongly suggests that bacteria corresponding to these bins have the same iron-oxidizing metabolism as known strains of *Gallionella*, *Sideroxydans*, and *Ferriphaselus*. However, inferring the metabolism for Bin12 and Bin17 is more difficult, given their position outside the Gallionellaceae clade in phylogenomic trees (Fig. S6 and Fig. S5). To obtain insights into the energy metabolism of these bins, we searched for homologs of the Cyc2 protein in the protein sets encoded by each genomic bin. The Cyc2 protein has been predicted to be a c-type cytochrome responsible for Fe oxidation in *Mariprofundus ferrooxidans* PV-1<sup>19</sup>. Cyc2 is shared by all microaerophilic FeOB genomes sequenced so far with the exception of the Leptothrix genomes and phylogenetic analyses based on Cyc2 protein sequences indicated that lithotrophic (Gallionellaceae and *Mariprofundus* spp.) and phototrophic FeOB (*Chlorobium* spp.) group together and apart from other bacteria<sup>20</sup>. All genomic bins encode at least one copy of this protein and the phylogenetic tree confirms that Cyc2 sequences encoded in the genomic bins are closely related to sequences of known Gallionellaceae strains except for one of the two sequences encoded in Bin12 which appeared more related to Cyc2 homologs in *Chlorobium* spp. (Fig. S7). These findings support the hypothesis that iron-oxidation is the common energy metabolism for all genomic bins identified in this study.



**Figure S6: Phylogenetic tree concatenated sequences of proteins.** Bayesian phylogenetic tree based on an alignment (2,595 positions) of concatenated amino-acid sequences of 7 universal phylogenetic marker genes shared by the nine genomics bins (shown in boldface in the tree). Homologs of these genes were retrieved in genomes of representative strains of the family Gallionellaceae as well as the main families of Betaproteobacteria. Strain *Escherichia coli* K12 was used as an outgroup to root the tree. Numbers at nodes indicate Bayesian posterior probabilities. Protein families used in the tree are : COG0012 (gtp-binding protein), COG0018 (arginyl-tRNA synthetase), COG0124 (Histidyl-tRNA synthetase), COG0172 (SerS), COG0525 (ValS), COG0533 (GCP), COG0552 (RpsD)

Strain or genomic bin	References	Database Identifier
Candidatus <i>Gallionella acididurans</i>	<sup>22</sup>	<i>PRJNA309053</i>
<i>Ferriphaselus amnicola</i>	<sup>20</sup>	<i>NZ_BBTH00000000.1</i>
Ferriphaselus sp. R-1	<sup>20</sup>	<i>NZ_JQKP00000000.1</i>
<i>Gallionella capsiferriformans</i> ES-2	<sup>23</sup>	<i>NC_014394.1</i>
<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6	Unpublished	<i>NC_010524.1</i>
<i>Leptothrix ochracea</i>	Unpublished	<i>NZ_AJUC00000000.1</i>
<i>Sideroxydans lithotrophicus</i> ES-1 L12	<sup>23</sup>	<i>NC_013959.1</i>
<i>Bin10 – 1</i>	This study	
<i>Bin10 – 2</i>	This study	
<i>Bin10 – 3</i>	This study	
<i>Bin12</i>	This study	
<i>Bin17</i>	This study	
<i>Bin28</i>	This study	
<i>Bin31</i>	This study	
<i>Bin37</i>	This study	

Table S5: list of reference FeOB strains and genomic bins used for genomic read recruitment.



**Figure S7: Phylogenetic tree Cyc2.** Maximum likelihood phylogenetic tree of amino-acid sequences of Cyc2 proteins. Homologs of Cyc2 found in genomic bins (shown in boldface in the tree) as well as in lithotrophic (Gallionellaceae and Mariprofundus spp.) and phototrophic (Chlorobium spp.) FeOB cluster together in the tree. Numbers at nodes indicate bootstrap values  $\geq 70$  (100 replications).

## Fracture Mixing Model

The model developed from field observations quantifies mixing at the intersection of an oxidizing fracture (providing a flow  $Q_{ox}$  with an oxygen concentration  $O_2^{ox}$ ) and a reducing fracture (providing a flow  $Q_{red}$  with an oxygen concentration  $O_2^{red}$ ). Assuming complete mixing at the fracture intersection, this results in a flow  $Q_{mix} = Q_{ox} + Q_{red}$  with an oxygen concentration  $O_2$ :

$$O_2(Q_{ox} + Q_{red}) = O_2^{red}Q_{red} + O_2^{ox}Q_{ox} \quad (2)$$

Since  $O_2^{red} \ll O_2^{ox}$ , (2) may be simplified as:

$$O_2 = O_2^{ox} \frac{Q_{ox}}{Q_{ox} + Q_{red}} \quad (3)$$

Assuming that the flow coming from the oxidizing compartment is driven by a local hydraulic head difference  $dh$  between the shallow and deep compartments (Fig.1 and Fig. S1.A), the oxidizing fracture flow may be estimated by Darcy's law as follows:

$$Q_{ox} = T_{ox}L \frac{dh}{l} \quad (4)$$

where  $T_{ox}$  is the oxidizing fracture transmissivity,  $L$  is the length of the intersection between the fractures, and  $l$  is the length of the oxidizing fracture from the surface to the intersection,  $l = \frac{z}{\sin \alpha}$ , where  $z$  is the depth of the mixing point and  $\alpha$  is the fracture dip angle. Conversely, assuming that the flow in the deep reducing fracture is driven by a regional head gradient  $\nabla h_r$  (see Fig.1), we have:

$$Q_{red} = T_{red}L \nabla h_r \quad (5)$$

where  $T_{red}$  is the reducing fracture transmissivity.

Inserting (4) and (5) in (3), we obtain the following estimate for the oxygen concentration at the mixing point:

$$O_2 = O_2^{ox} \left(1 + \frac{T_{red} \nabla h_r}{T_{ox} dh \sin \alpha} z\right)^{-1} \quad (6)$$

Oxygen is expected to decay with depth along the oxidizing fracture as it is consumed by different biogeochemical processes. Assuming a first order decay, we have,

$$O_2^{ox} = O_2^0 e^{-kt} = O_2^0 e^{-\frac{k.z}{v \cdot \sin \alpha}} \quad (7)$$

where  $k (s^{-1})$  is the oxygen decay constant and  $v$  is the mean flow velocity in the fracture. Inserting (7) into (6) we get,

$$O_2 = O_2^0 e^{-\frac{k.z}{v \cdot \sin \alpha}} \left(1 + \frac{T_{red} \nabla h_r}{T_{ox} dh \sin \alpha} z\right)^{-1} \quad (8)$$

This expression may be rewritten as,

$$O_2 = O_2^0 e^{-\frac{z}{z_c}} \left(1 + \frac{z}{z_d}\right)^{-1} \quad (9)$$

by identifying the two characteristic scales of oxygen consumption and dilution: the characteristic consumption scale,

$$z_c = \frac{v \cdot \sin \alpha}{k} \quad (10)$$

and  $z_d$ , the characteristic dilution scale,

$$z_d = \frac{T_{ox} dh \sin \alpha}{T_{red} \nabla h_r}. \quad (11)$$

The estimated model parameters for the field site are given in table 1. The depth of the fracture intersection  $z$  was estimated from the depth of the detected oxygen flow (Fig.2.D). The mean dip of the oxidizing fractures  $\alpha$  was measured from the optical borehole log (Fig.2.A and Fig.2.C). The regional hydraulic head gradient  $\nabla h_r$  was estimated from the regional topography gradient. The mean hydraulic head difference between the oxidizing and reducing compartments  $dh$  was estimated from measured hydraulic heads in two boreholes representative of these compartments (Fig. S1.A). The oxidizing fracture transmissivity  $T_{ox}$  was estimated from the transmissivity of F54 (Fig. S2 and table S1). The reducing fracture transmissivity  $T_{red}$  was taken as the mean transmissivity of the deep fractures on the site <sup>7</sup>. The characteristic consumption scale  $z_c$  was estimated from the concentration decay with depth observed in the two 150 m boreholes located in recharge areas, PSR1 and PSR2, which gave  $z_c = 850$  m (Fig. S1.C). This large value reflects the small decrease of oxygen with depth observed for the boreholes located in recharge areas (Fig. S1.B). A characteristic dilution scale of  $z_d = 23$  m was estimated from the fracture transmissivities and dip angles, and the vertical and regional hydraulic head gradients measured at the site. Since the Damköhler number,  $Da = z_c/z_d$  (Eq. 4), is much larger than one, the depth of oxygen delivery appears to be limited by dilution rather than consumption. The oxygen concentration representa-

tive of the oxidized compartment  $O_2^0$  was estimated by the intersection of the oxygen model decay curve with the surface (Fig. S1.C). The minimum oxygen concentration for microaerophilic FeOB was taken from <sup>24</sup>.

The sensitivity of abiotic and biotic oxidation zone depths to the oxidizing to reducing fracture transmissivity ratios,  $T_{ox}/T_{red}$ , is presented in Fig. S8.A for different characteristic oxygen degradation rates. For small and intermediate degradation rates, i.e. respectively infinite and intermediate  $z_c$  (Fig. S8.A.1 and S8.A.2), oxidation was triggered at around  $T_{ox}/T_{red} \sim 10^{-3}$ , which corresponds to dilution rates allowing the microaerophilic zone to develop. For larger  $T_{ox}/T_{red}$ , the reactive zone broadened and deepened sharply reaching hundreds of meters in depth. For even larger  $T_{ox}/T_{red}$ , oxygen concentrations became favorable to abiotic chemical oxidation. For larger degradation rates, i.e. smaller  $z_c$  (Fig. S8.A.3), the availability of oxygen at depth was reduced and the range of depths for microbial hotspot development was limited. However, for a consumption scale ten times smaller than that estimated for the considered site, microbial hotspots could still reach up to 300 m depth. For large oxidizing to reducing fracture transmissivity ratios,  $T_{ox}/T_{red}$ , the Damköhler number became larger than one. In this regime, the depth of the reactive zone was limited by the consumption rate rather than the dilution rate. Hence, the maximum depth of the reactive zone became independent of the transmissivity ratio  $T_{ox}/T_{red}$ .

As the hydraulic head difference between the oxidizing and reducing compartments  $dh$  follows a seasonal evolution (Fig. S1.A), the mixing rates, and therefore the oxygen concentration at the fracture intersection, are also expected to change in time. Inserting the measured hydraulic

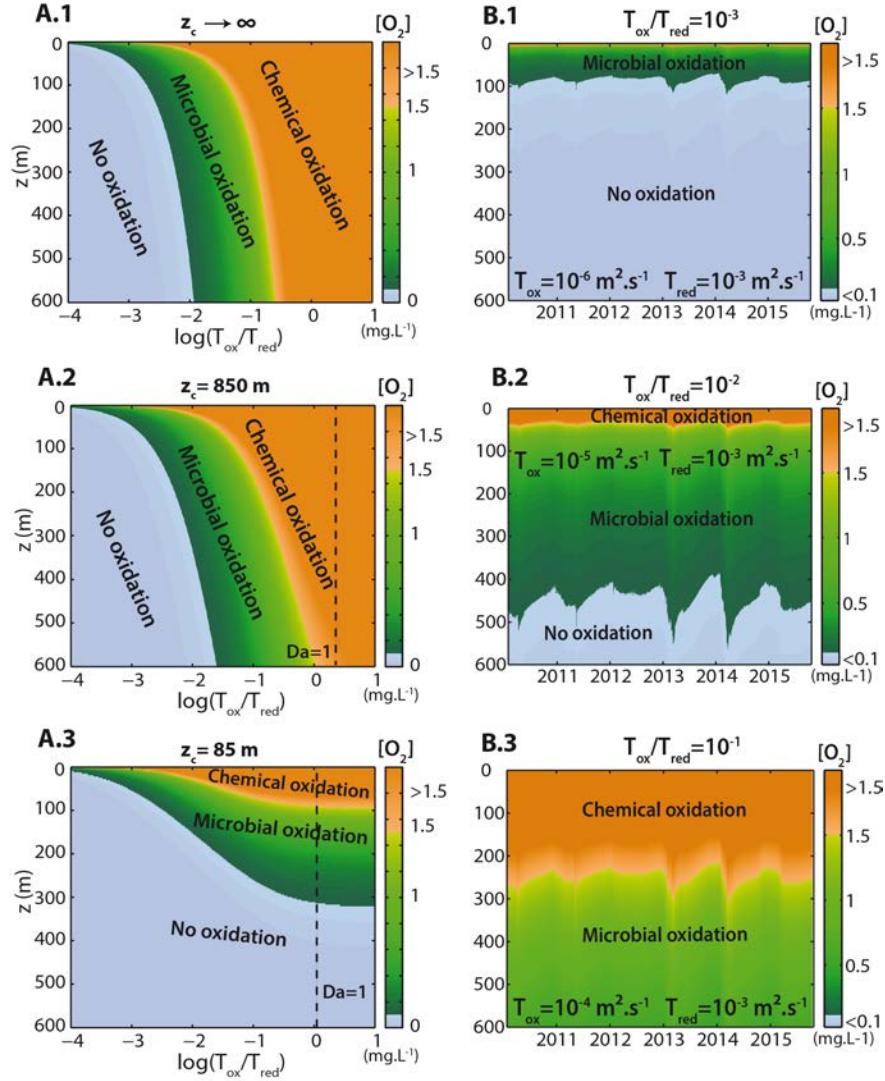


Figure S8: A: Distribution of oxygen concentration at fracture mixing hotspots as a function of depth and transmissivity ratio  $T_{\text{ox}}/T_{\text{red}}$ , for A.1  $z_c \rightarrow \infty$  (i.e. no oxygen consumption), A.2  $z_c = 850 \text{ m}$  and A.3  $z_c = 85 \text{ m}$ . The other parameters are kept equal to the baseline parameters (Table 1). B: Temporal fluctuations in the oxygen distribution at mixing hotspots for different transmissivity ratios B.1  $T_{\text{ox}}/T_{\text{red}} = 10^{-3}$ , B.2  $T_{\text{ox}}/T_{\text{red}} = 10^{-2}$ , B.3  $T_{\text{ox}}/T_{\text{red}} = 10^{-1}$ . The local hydraulic head difference  $dh$  is taken equal to that measured in the field in PZ 15 (Fig. S1.A)

head difference  $dh$  between wells PZ15 and PZ23 in equation (8) as representative of the hydraulic head difference between the oxidized and reducing compartments, we have simulated the depth-time distribution of oxygen concentration at the fracture intersection (Fig. S8.B) for different transmissivity ratios  $T_{ox}/T_{red}$ . For small transmissivity ratios (Fig. S8.B.1), the reactive zone, mostly driven by microbiological activity, was confined between 0 and 100 m and its lower depth fluctuated moderately. For intermediate transmissivity ratios (Fig. S8.B.2) the biotic oxidation zone spanned a large range of depths. Its maximum depth experienced rapid fluctuations with amplitudes that could be larger than 100 m. Meter scale fluctuations of hydraulic head in the shallow subsurface were thus amplified at depth to produce hundred meter scale changes in the deep reactive front location. For large transmissivity ratios (Fig. S8.B.3), both microbiological and chemical oxidation were well developed over the simulated range of depth as oxygen was delivered in the subsurface with small dilution rates.

1. Jimenez-Martinez, J. *et al.* Temporal and spatial scaling of hydraulic response to recharge in fractured aquifers: Insights from a frequency domain analysis. *Water Resources Research* **49**, 3007–3023 (2013).
2. Kang, P. K., Le Borgne, T., Dentz, M., Bour, O. & Juanes, R. Impact of velocity correlation and distribution on transport in fractured media: Field evidence and theoretical model. *Water Resources Research* **51**, 940–959 (2015).
3. Shakas, A. *et al.* Hydrogeophysical characterization of transport processes in fractured rock by combining push-pull and single-hole ground penetrating radar experiments. *Water Resources*

*Research* (2016).

4. Ruelleu, S., Moreau, F., Bour, O., Gapais, D. & Martelet, G. Impact of gently dipping discontinuities on basement aquifer recharge: An example from Ploemeur (Brittany, France). *Journal of Applied Geophysics* **70**, 161–168 (2010).
5. Roques, C. *et al.* Hydrological behavior of a deep sub-vertical fault in crystalline basement and relationships with surrounding reservoirs. *Journal of Hydrology* **509**, 42–54 (2014).
6. Paillet, F. L. A Field Technic For Estimating Aquifer Transmissivity with Flow log Data (2000).
7. Le Borgne, T., Bour, O., Paillet, F. L. & Caudal, J. P. Assessment of preferential flow path connectivity and hydraulic properties at single-borehole and cross-borehole scales in a fractured aquifer. *Journal of Hydrology* **328**, 347–359 (2006).
8. Emerson, D., Fleming, E. J. & McBeth, J. M. Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annual review of microbiology* **64**, 561–583 (2010).
9. Ayraud, V. *et al.* Compartmentalization of physical and chemical properties in hard-rock aquifers deduced from chemical and groundwater age analyses. *Applied Geochemistry* **23**, 2686–2707 (2008).
10. Buchfink, B., Xie, C. & Huson, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods* **12**, 59–60 (2015).

11. Huson, D. H. *et al.* MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLoS Computational Biology* **12**, 1–12 (2016).
12. Bankevich, A. *et al.* SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* **19**, 455–477 (2012).
13. Sangwan, N., Xia, F. & Gilbert, J. A. Recovering complete and draft population genomes from metagenome datasets. *Microbiome* **4**, 8 (2016).
14. Eren, A. M. *et al.* Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for ‘omics data. *PeerJ* **3**, e1319 (2015).
15. Hyatt, D. *et al.* Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**, 119 (2010).
16. Alneberg, J. *et al.* Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nature Methods* **11**, 1144–1146 (2014).
17. Dereeper, A. *et al.* Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research* **36**, 465–469 (2008).
18. Price, M. N., Dehal, P. S. & Arkin, A. P. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* **5** (2010).
19. Barco, R. A. *et al.* New insight into microbial iron oxidation as revealed by the proteomic profile of an obligate iron-oxidizing chemolithoautotroph. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 5927–5937 (2015).

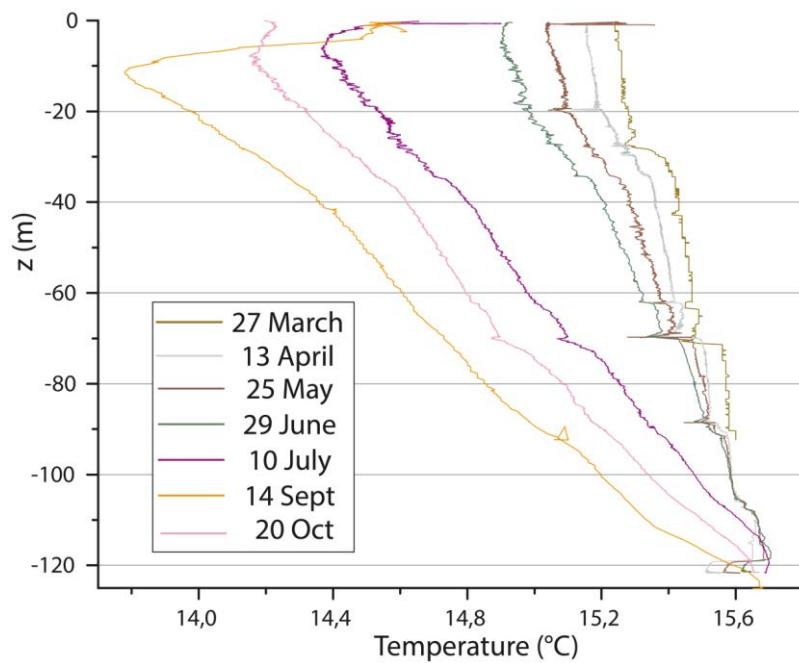
20. Kato, S. *et al.* Comparative genomic insights into ecophysiology of neutrophilic, microaerophilic iron oxidizing bacteria. *Frontiers in Microbiology* **6**, 1–16 (2015).
21. Felsenstein, J. Phylip (phylogeny inference package), version 3.5 c (1993).
22. Muhling, M. *et al.* Reconstruction of the metabolic potential of acidophilic sideroxydans strains from the metagenome of an microaerophilic enrichment culture of acidophilic iron-oxidizing bacteria from a pilot plant for the treatment of acid mine drainage reveals metabolic versatility and adaptation to life at low pH. *Frontiers in Microbiology* **7**, 1–16 (2016).
23. Emerson, D. *et al.* Comparative genomics of freshwater Fe-oxidizing bacteria: Implications for physiology, ecology, and systematics. *Frontiers in Microbiology* **4**, 1–17 (2013).
24. Anderson, C. R. & Pedersen, K. In situ growth of Gallionella biofilms and partitioning of lanthanides and actinides between biological material and ferric oxyhydroxides. *Geobiology* **1**, 169–178 (2003).

## Conclusions et perspectives

Cette étude de terrain sur le développement d'un tapis microbien en forage a permis de mettre en exergue l'existence de zones de mélange, marquées par la formation de hot spots d'oxydation microbienne du fer, dans les milieux fracturés. L'approche pluridisciplinaire et la diversité des méthodes utilisées (échantillonnage entre packers, analyses hydrochimiques, séquençages, diagrphies multiparamètres, expériences de batchs...) ont permis de faire le lien entre la structure géologique (et l'importance de la fracturation de la zone), les écoulements souterrains et la composition hydrochimique des eaux transportées, à la diversité microbiologique, afin d'acquérir une vision globale du fonctionnement du système.

Le modèle développé, bien que basé sur des hypothèses simples, suggère l'existence d'une variabilité saisonnière de l'oxydation microbienne du fer contrôlée par les cycles de recharge-décharge jusqu'à des profondeurs importantes. Cette idée s'oppose à la vision communément établie d'un milieu souterrain aux propriétés biogéochimiques stables dans le temps et isolé de la surface. Les mécanismes qui contrôlent l'oxydation du fer dans cet aquifère fracturé pourraient être étendu à une large gamme de processus biogéochimiques contrôlés par des mélanges entre fluides aux propriétés physico-chimiques variées. L'eau souterraine représentant des volumes d'eau et des flux en éléments dissous considérables, et les fractures étant omniprésentes dans les milieux souterrains, l'existence de hot spots de réactivité biogéochimiques induis par la fracturation pourrait être un mécanisme de contrôle important des cycles biogéochimiques à grande échelle.

Afin d'identifier sur le terrain les effets de cette dynamique saisonnière, et d'en mesurer les effets, une campagne de caractérisation mensuelle a débuté au printemps 2017. Les premiers résultats sont très prometteurs et indiquent des variations saisonnières importantes, notamment dans la température et l'oxygène, confortant ainsi les hypothèses du modèle proposé (Bochet et al., en révision). On y observe des variations saisonnières de température importantes et corrélées avec des variations de l'apport en oxygène par les fractures (figure 1.6). Les diagrphies de température pourraient être utilisées pour estimer les variations de flux verticaux dans le forage au long d'une année hydrologique (Klepikova et al. 2011).



*Figure 1.6: Evolution de la température en fonction de la profondeur dans le forage "PZ 26 (Suivi annuel 2017)*

Par ailleurs, la fluorescéine diacétate (chapitres 2 et 3) pourrait être utilisée comme traceur afin de mieux quantifier l'impact de ces variations saisonnières sur l'activité microbienne globale. Des push-pulls réactifs entre packers pourraient ainsi être effectués dans différentes fractures du forage, et à différentes périodes de l'année. Ces traçages pourraient aussi être effectués sur différents forages du site de Guidel, afin de mieux comprendre le fonctionnement global du site. Les informations recueillies grâce à ces différentes études s'avéreront utiles lors de la mise en pompage du site de Guidel, prévue dans un futur proche.

Des travaux sont également en cours sur les propriétés chimiques du tapis bactériens. Les analyses chimiques effectuées sur le biofilm montrent un enrichissement du biofilm en certains éléments chimiques (en terres-rares et autres éléments traces) (Heim et al. 2015). En raison de leur toxicité, certains de ces éléments (dont par exemple l'arsenic), peuvent impacter la qualité de l'eau. Ces problèmes sont à prendre en considération, d'autant plus que la mise en pompage d'un site peut provoquer des mélanges d'eau, perturber les équilibres redox, et mener à la solubilisation de ces éléments (Ayotte et al. 2011).

# **Chapitre 2 - Développement d'un traceur innovant pour la mesure simplifiée de l'activité microbienne *in situ* dans les milieux souterrains**

## **1- Introduction**

L'eau souterraine réagit continuellement avec l'environnement qui l'entoure. Les réactions ont lieu entre l'eau, les espèces chimiques qui y sont contenues, la roche encaissante et les organismes vivants qui s'y trouvent (Chapelle 2001). Comme il a été expliqué précédemment, les microorganismes influent fortement sur les réactions géochimiques en profondeur. Il est donc indispensable de les prendre en compte lorsqu'on s'intéresse aux cinétiques de réactions dans les milieux naturels. Toutefois, en raison de la difficulté à reproduire en laboratoire les conditions de terrain et de la difficulté d'accès au milieu souterrain, l'influence des microorganismes sur les réactions *in situ*, bien que reconnue comme déterminante, reste difficile à quantifier (Long et al. 2016). Les analyses microbiologiques (comme les séquençages, pour identifier les communautés en présence, ou les comptages, pour suivre l'évolution du nombre de microorganismes) sont généralement onéreuses, chronophages ou difficiles à mettre en place. De plus ces méthodes ne renseignent pas forcément sur "l'état" des microorganismes, c'est à dire qu'elles ne permettent pas de savoir si les microorganismes observés sont actifs, en dormance, ou morts. Pour obtenir des informations sur la dynamique d'une communauté microbienne, il est néanmoins possible de mesurer son activité.

### **1.1 Qu'est-ce que l'activité microbienne**

L'activité microbienne est, comme son nom l'indique, une manière de quantifier le degré d'activité des microbes dans un environnement donné. Le principe de mesure se base généralement sur la mesure de la cinétique d'une réaction choisie, ce qui nécessite de suivre l'évolution temporelle de la concentration d'un réactif A et/ou d'un produit B. Si l'on fait l'hypothèse que la réaction est effectuée uniquement par les microorganismes (ou que l'on puisse soustraire ou négliger les réactions abiotiques), la vitesse à laquelle se produit la réaction renseigne sur la capacité de la communauté microbienne à effectuer la réaction. On parlera d'activité "spécifique" si la réaction fait appel à une fonction ciblée, présente uniquement chez certains microorganismes. Au contraire, l'activité sera dite "globale", si l'on s'attend à ce que la réaction soit réalisée par l'ensemble de la communauté microbienne.

### **1.2 Mesure de l'activité microbienne au cours de traçages hydrogéologiques**

Comme expliqué en introduction, les expériences de traçage apportent des informations sur la manière dont un soluté est transporté dans le sous-sol. Lorsqu'on ajoute à un traceur conservatif une molécule réactive, on peut alors obtenir des informations sur la capacité du milieu à réaliser une réaction ciblée. Si le traceur réactif utilisé est une molécule dont la transformation est réalisée par des micro-organismes, on peut alors mesurer localement une activité microbienne. En 2008, Haggerty et collaborateurs ont développé un "smart tracer" nommé Raz-Rue (Resazurin-Resorufin)

qui permet de mettre en évidence une activité microbiologique dans les eaux naturelles. Le resazurin, un traceur faiblement fluorescent, se transforme irréversiblement en resorufin en présence de micro-organismes. Ce traceur a été utilisé avec succès en rivière, cependant les conditions anaérobiques des eaux souterraines ne permettent pas son utilisation. L'objectif de ce travail a donc été de développer un "smart tracer" utilisable dans le milieu sous-terrain.

### **1.3 La Fluorescéine DiAcétate (FDA) comme "smart" traceur pour mesurer l'activité microbiologique dans les eaux souterraines**

Parmi les nombreuses méthodes de mesures de l'activité microbiologique la Fluorescéine Diacétate (FDA) présente plusieurs avantages. Tout d'abord, la molécule de FDA est dégradée par une réaction d'hydrolyse pouvant être réalisée par diverses enzymes de la classe des hydrolases (estérases, lipases, protéases) (Guilbault & Kramer 1964; Schnurer & Rosswall 1982). La fonction d'hydrolyse étant très commune chez les microorganismes, la FDA peut être utilisée pour mesurer une activité globale (Stubberfield & Shaw 1990; Adam & Duncan 2001). La FDA a été utilisée sur des cellules vivantes très variées: des cellules de mammifères (Rotman & Papermaster 1966), des bactéries et des algues (Medzon & Brady 1969), des champignons (Söderström 1977; P Breeuwer et al. 1995; Gaspar et al. 2001), ou encore du phytoplancton (Jochem 1999). Elle a également été utilisée pour mesurer l'activité de milieux très diversifiés: des solution enzymatiques (Guilbault & Kramer 1964), des sols (Schnurer & Rosswall 1982; Federle et al. 1986; Adam & Duncan 2001; Green et al. 2006; Sánchez-Monedero et al. 2008), des sédiments (Gumprecht et al. 1995), des eaux usées et des boues activées (Fontvieille et al. 1992; Jørgensen et al. 1992), des eaux de surface ou souterraines (Chrzanowski et al. 1984a; Obst 1985; Obst et al. 1988; Garnier 2012), des biofilms (Battin 1997; De Rosa et al. 1998; Peeters et al. 2008)... De plus, la FDA présente l'avantage de pouvoir être dégradée aussi bien dans des conditions aérobies qu'anaérobies (Obst 1985). Enfin, son produit de dégradation est la fluorescéine, bien connue des hydrogéologues. La réaction pourra ainsi être suivie à l'aide d'un spectrophotomètre ou d'un fluorimètre, en continu et sur une large gamme de mesure. Malgré ces avantages, la FDA n'a pas à ce jour été utilisé dans le cadre d'expériences de traçage dans les milieux souterrains.

Dans la suite de ce chapitre nous présenterons les travaux réalisés en laboratoire pour permettre l'utilisation de la FDA comme traceur innovant dans le milieu souterrain. Les expériences ont été réalisées dans un premier temps en utilisant des solutions enzymatiques de différentes concentrations dans le but de calibrer le traceur. Après la présentation des résultats expérimentaux, un modèle numérique, capable d'approcher ces données sera proposé. Dans un deuxième temps, nous présenterons les résultats des tests effectués sur des eaux naturelles.

## 2- Principe de fonctionnement et méthode de mesure

L'activité microbiologique peut être mesurée grâce à la FDA en suivant au cours du temps la concentration en fluorescéine produite par l'hydrolyse de la fluorescéine diacétate (incolore) (voir figure 2.1). Cette transformation est dite non-spécifique, car elle peut être menée à bien par une large gamme d'enzymes. L'activité hydrolytique FDA peut-être considérée comme étant une activité globale.

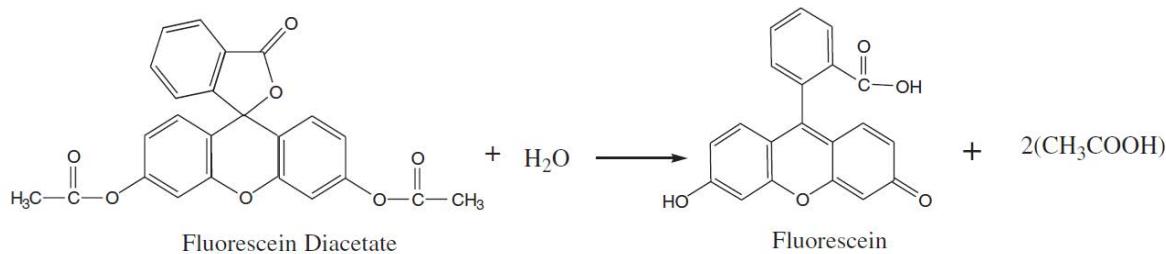


Figure 2.1: La fluorescéine diacétate (FDA), incolore, est transformée en fluorescéine, qui peut-être dosée par un spectrophotomètre ou un fluorimètre. (d'après Green et al. 2006)

Classiquement, la mesure de l'activité hydrolytique FDA d'un échantillon se fait par une mesure de fluorescence suite à une incubation durant un temps défini (Ecology 2016; Gumprecht et al. 1995; Garnier 2012). Dans la bibliographie, bon nombre d'études présentent l'évolution de la concentration de fluorescéine en fonction du temps, avec des fréquences d'échantillonnage plus ou moins élevées: de l'ordre d'une mesure par heure (Jørgensen et al. 1992; Battin 1997), d'une mesure par x10 min (Schnurer & Rosswall 1982; Hofmann & Sernetz 1983; Adam & Duncan 2001; Green et al. 2006), d'une mesure par minute (Rotmant & Papermaster 1966; Boender 1984; Sontag 1977), ou même de plusieurs mesure par minute pour des mesures couplées à l'utilisation d'un cytomètre à flux (Watson 1980; Malin-Berdel & Valet 1980; Bedner et al. 1998; Jochem 1999).

### 2.1 Cinétique de réaction de la FDA

Plusieurs hypothèses sont débattues pour décrire la cinétique réactionnelle de la FDA. Alors que certains articles font référence à une simple cinétique de premier ordre (Cercek & Cercek 1972; P Breeuwer et al. 1995), d'autres évoquent une cinétique de Michealis-Menten (Hanniba-Friedrich & Sernetz 1979; Pieter Breeuwer et al. 1995; Green et al. 2006). Si ces approximations peuvent paraître satisfaisantes avec une faible fréquence d'échantillonnage, des mesures plus haute-fréquence montrent des biais entre ces modèles et les données expérimentales (Watson 1980).

Alors que certains auteurs expliquent la transformation du FDA en Fluorescéine par une étape directe, d'autres font intervenir un intermédiaire de réaction (Sontag 1977; Hofmann & Sernetz 1983; Thuysbaert 2012; Anzo et al. 2013; Ridder 2010). Hofmann & Sernetz (1983) prouvent l'existence de cet intermédiaire de réaction, la Fluorescéine MonoAcetate (FMA), en mesurant l'évolution conjointe du substrat (FDA), de l'intermédiaire (FMA) et du produit (U, la fluorescéine) au cours d'une expérience. Ils établissent un modèle numérique basé sur une cinétique entre deux inhibiteurs compétitifs (où la FDA et la FMA sont deux substrats en compétition). Ce modèle seul ne permettant pas d'approcher correctement leurs données, ils ajoutent un terme d'"augmentation locale de la concentration en intermédiaire". Ce terme traduit le fait qu'à la suite de l'hydrolyse

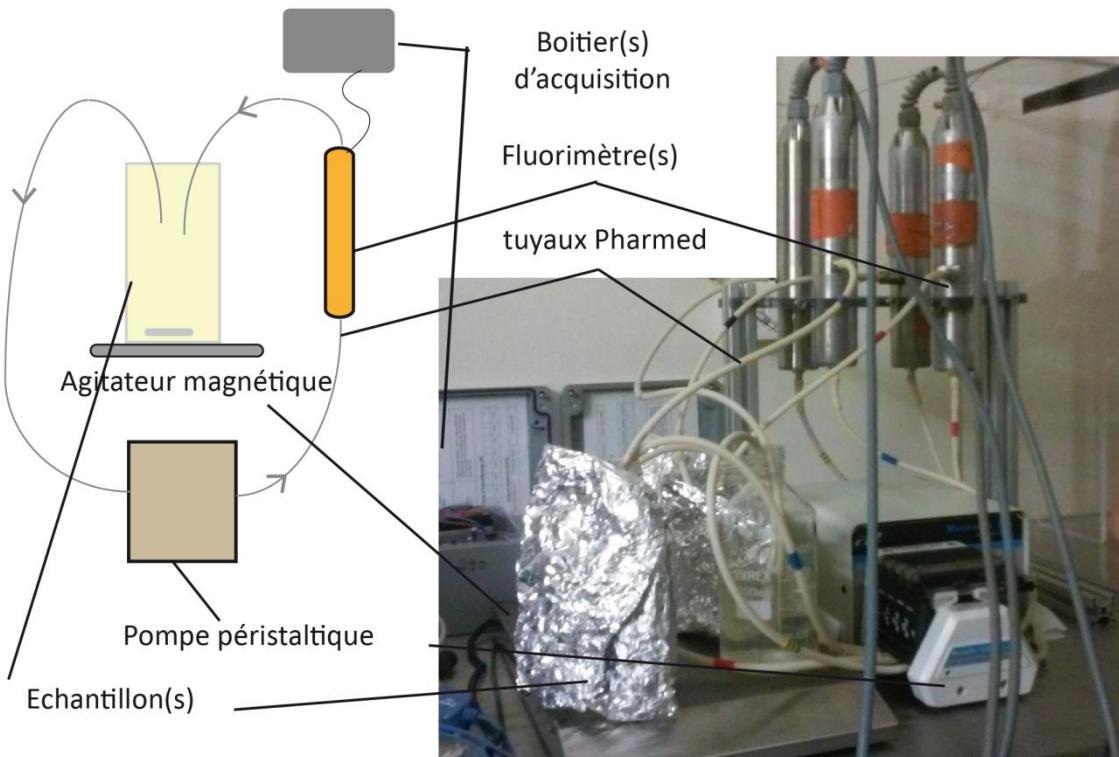
enzymatique de la FDA, l'intermédiaire formé se trouve proche du site actif de l'enzyme et a donc plus de chance d'être rapidement dégradé.

Sontag (1977) distingue l'"hydrolyse alcaline" (dégradation spontanée) et "l'hydrolyse enzymatique *in vitro*" de la FDA (où la FDA est mise en solution avec des enzymes). Il déduit que les deux processus suivent une fonction de Bateman (somme de deux exponentielles) mais pour des raisons distinctes: la formation d'un intermédiaire de réaction dans le cas de l'hydrolyse alcaline, et l'existence de différentes formes stériques de la FDA pour l'hydrolyse enzymatique (il n'y aurait pas d'évidence de la formation d'intermédiaire pour la transformation enzymatique).

La littérature fait ainsi apparaître des hypothèses diverses sur la cinétique de transformation de la FDA en fluorescéine en présence d'enzymes. Nous avons effectué une série d'expériences permettant d'apporter de nouvelles contraintes sur la cinétique de dégradation de la FDA afin de proposer un modèle.

## 2.2 Dispositif expérimental

La méthode que nous avons développée permet une mesure haute fréquence (toutes les 10 secondes) et autonome de la fluorescence au cours du temps. Le fonctionnement du dispositif est illustré dans la figure 2.2. La solution investiguée, composée de FDA et d'enzymes ou d'eaux naturelles, est stockée dans un flacon en verre et prélevée en continu à l'aide d'une pompe péristaltique. La solution circule dans des tuyaux biochimiquement inertes (Pharmed®) et passe dans un fluorimètre GGUN (Albilia®) (Schnegg & Doucen 2006) avant de regagner le flacon, mis sous agitation par un barreau aimanté. Les fluorimètres utilisés sont des fluorimètres de terrain, les mêmes qui seront utilisés pour les expériences de traçage (présentées dans le chapitre 2). La fréquence d'acquisition est d'une mesure toutes les 10 secondes avec une précision  $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Les flacons sont recouverts de papier aluminium afin de les protéger de la lumière extérieure, celle-ci pourrait affecter la stabilité de la fluorescéine. Au début de l'expérience une certaine quantité de FDA est ajoutée dans un volume de solution connu. La réaction débute alors, au cours du temps la solution testée prend une teinte jaunâtre du fait de l'accumulation de la fluorescéine produite par la réaction. Plus l'apparition de la fluorescéine est rapide, plus l'activité de la solution est importante.



*Figure 2.2: Dispositif expérimental composé de fluorimètres GGUN et de leur boîtier d'acquisition (Albilia), d'une pompe péristaltique multi-voies, d'un agitateur magnétique et de tuyaux biochimiquement inertes.*

### 2.3 Préparation de la solution mère

La fluorescéine di-acétate est très peu soluble dans l'eau. Pour la dissoudre il faut utiliser un solvant polaire aprotique (c'est-à-dire un solvant dont la capacité à libérer des ions H<sup>+</sup> est nulle). A l'instar de la grande majorité des études réalisées dans le passé, nous utiliserons comme solvant l'acétone. La concentration maximum est théoriquement de 25 mg de FDA par mL d'acétone. Afin d'être sûr que de la quantité de FDA dissoute, nous travaillerons avec des concentrations de 20 ou 15 mg.mL<sup>-1</sup>. En raison de la grande volatilité de l'acétone, il est conseillé de stocker la solution mère dans un récipient imperméable de faible volume et pendant un temps limité (quelques jours). La FDA pure (sous forme de poudre) doit être conservée à une température de -20°C, la solution mère quant à elle, peut-être conservée au frais (4-6°C). Les fluorimètres utilisés saturent pour une concentration de fluorescéine avoisinant les 500 ppb (environ 1,3 µM), ce qui correspond à des volumes de solution mère n'excédant pas 20µL pour solution testée de 500 mL.

### 2.4 Solutions enzymatiques

Pour dégrader la FDA, les microbes utilisent des enzymes, ces protéines catalytiques ont pour effet de baisser l'énergie d'activation nécessaire à une réaction. Pour calibrer le traceur, nous avons travaillé avec l'enzyme endo-1,4-β-Xylanase (ref: X2629 chez Sigma-Aldrich), une hydrolase (classe d'enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse) produite par le foie de porc. Les enzymes étant des substances inertes, l'activité mesurée dépendra principalement de la quantité d'enzyme ajoutée, et ne variera donc pas au cours du temps.

## **3- Résultats**

### **3.1 Quantification de la dégradation chimique de la FDA**

Avant d'aborder la dégradation de la FDA par les microorganismes, il convient de traiter la dégradation "chimique" de la FDA. La FDA peut en effet subir une dégradation spontanée au cours du temps (Guilbault & Kramer 1964; Ge et al. 2007; Eshghi et al. 2011), cette dégradation non-enzymatique est indépendante des processus que nous voulons mesurer. La plupart des auteurs n'évoque pas son existence, d'autres l'ont cependant mesurée en réalisant des blancs (échantillons témoins). Certains auteurs choisissent de soustraire l'hydrolyse chimique de leurs données (Fontvieille et al. 1992; Gumprecht et al. 1995; V S Green et al. 2006), quand d'autres considèrent ce processus comme étant négligeable (Brunius 1980; Malin-Berdel & Valet 1980; Köster et al. 1997). Toutefois l'auto-hydrolyse de la FDA peut devenir critique pour des pH et des températures fortes (Guilbault & Kramer 1964; Köster et al. 1997). Le fait que la stabilité de la FDA soit affectée par le pH est une des raisons qui conduit de nombreux auteurs à tamponner leur solution à pH 7,6 avec du phosphate de sodium (l'autre raison étant liée à la détection de la fluorescéine qui est également affectée par le pH). Cependant, La FDA étant relativement stable sur une gamme de pH comprise entre 1 et 7.8 (Köster et al. 1997) et des températures inférieures à 40°C (Adam & Duncan 2001), la dégradation naturelle ne doit pas poser de problème dans la plupart des eaux naturelles (Obst & Holzapfel-Pschorn 1988)). La dégradation spontanée de FDA sera cependant à prendre en compte pour des environnements trop alcalins.

Les mesures que nous avons effectuées tendent à corroborer ces assertions. Selon nos expériences, la dégradation spontanée de la FDA apparaît comme étant linéaire dans le temps. Pour les différentes expériences menées, les coefficients directeurs des droites varient entre  $5,5 \cdot 10^{-8}$  et  $8,2 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ (voir figure 2.3). Ces variations peuvent paraître importantes, toutefois nous verrons par la suite que la dégradation spontanée de la FDA est lente par rapport à la dégradation enzymatique. Elle pourra donc être négligée dans la plupart des cas.

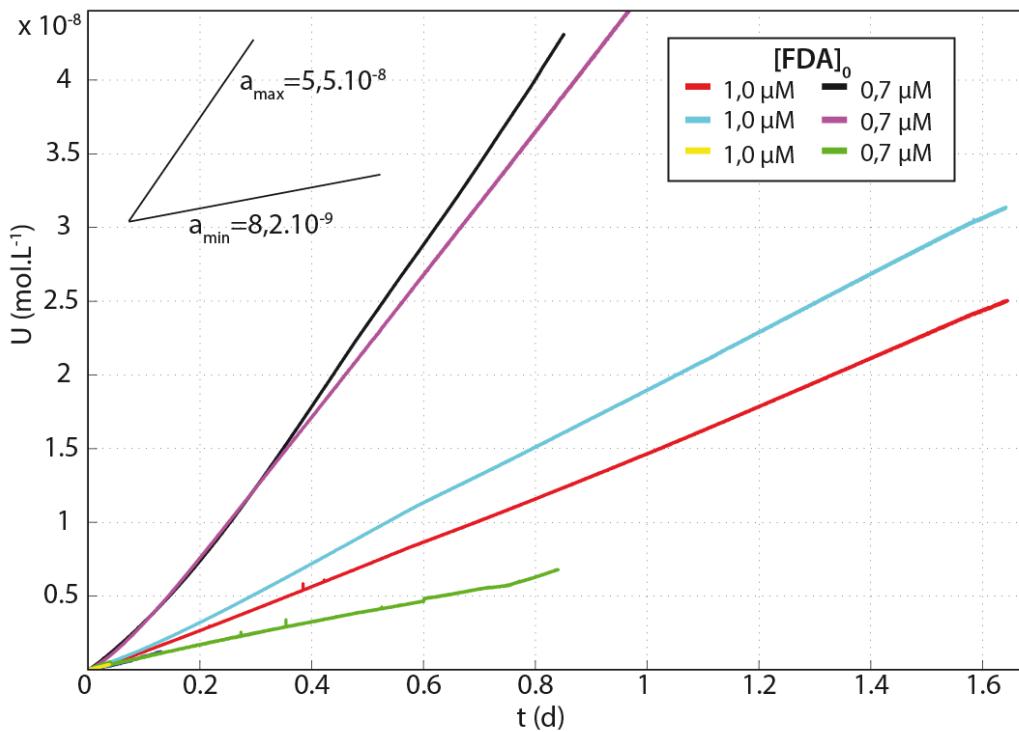


Figure 2.3: Quantification de la dégradation spontanée (chimique) de la FDA pour différentes concentrations initiales

### 3.2 Dynamique de la consommation enzymatique de la FDA

Une deuxième voie de dégradation de la FDA est la dégradation par voie enzymatique, celle utilisée par les microorganismes. C'est cette dégradation que nous souhaitons exploiter pour quantifier l'activité microbiologique. La figure 2.4 illustre le suivi de la concentration en fluorescéine pour une concentration enzymatique de 0,1 g.L<sup>-1</sup>. La haute résolution temporelle de nos mesures permet de calculer la vitesse d'apparition de la fluorescéine à partir de la courbe de concentration de fluorescéine en fonction du temps (U(t)).

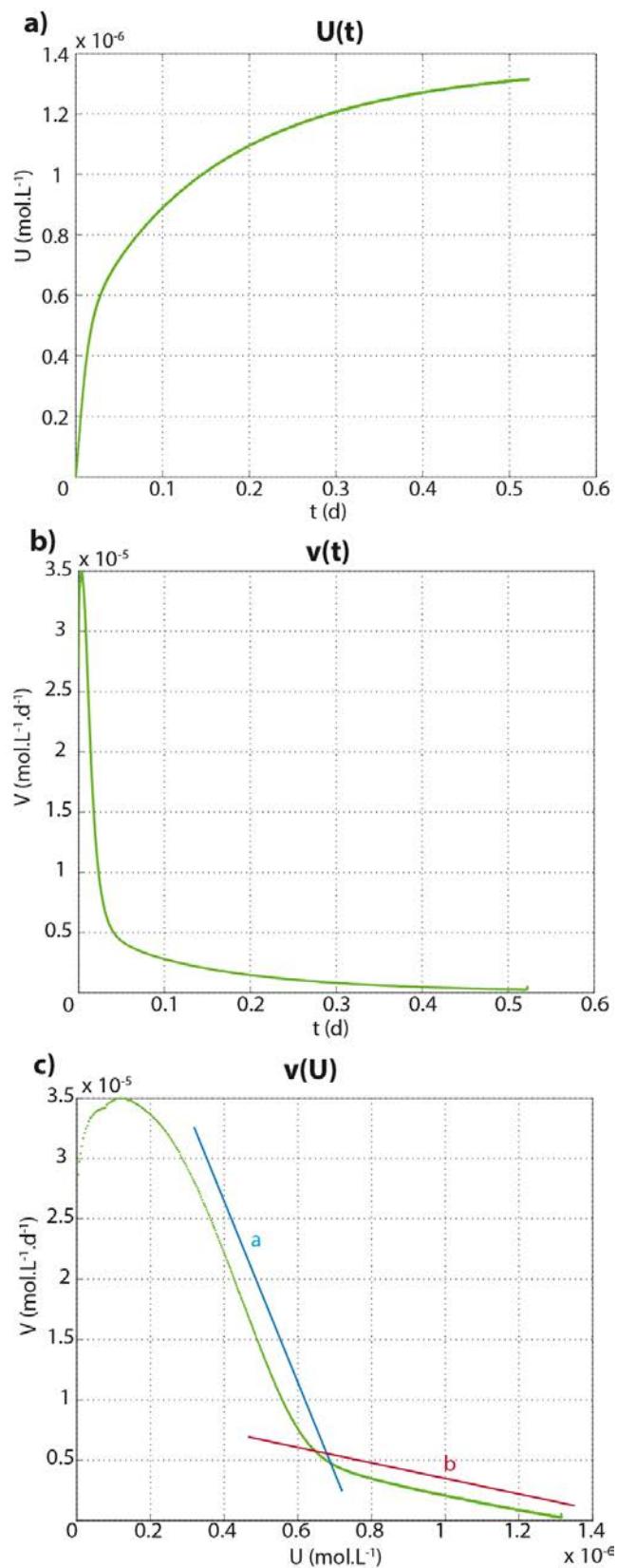


Figure 2.4: Résultat d'une expérience réalisée avec une concentration enzymatique  $[E]=0,1\text{ g.L}^{-1}$ , et  $[FDA]_0=1,4\text{ }\mu\text{M}$ . a) Evolution temporelle de la concentration en fluorescéine (produit de dégradation de la FDA). b) Evolution temporelle de la vitesse de formation de la fluorescéine. c) Evolution de la vitesse de formation de la fluorescéine en fonction de la concentration en fluorescéine formée.

L'évolution de la concentration en fluorescéine connaît une augmentation rapide aux temps courts, puis continue d'augmenter jusqu'à atteindre un plateau (figure 2.4 a). Lorsqu'on s'intéresse à l'évolution temporelle de la vitesse (figure 2.4 b), on observe une phase de délai ("lag phase") au cours de laquelle la vitesse augmente rapidement jusqu'à atteindre un maximum, elle diminue ensuite progressivement jusqu'à devenir nulle. Lorsque l'on représente la vitesse en fonction de la concentration ( $v(U)$ ) (voir figure 2.4 c), on s'aperçoit que l'évolution de la vitesse suit trois phases. Une première, correspondant à une augmentation jusqu'à un maximum (la phase de délai), suivie d'une diminution en deux phases. Une première phase au cours de laquelle la décroissance est rapide, et une deuxième plus lente. Cette décroissance biphasique peut être approximée par deux droites de pente "a" et "b". La pente "a" est facilement mesurable, et ce avec des expériences relativement courtes. La mesure de la deuxième pente (de coefficient directeur "b") est plus difficilement accessible, elle demande des expériences longues et peu bruitées.

Certaines expériences présentent une transition entre les phases "a" et "b" moins marquée. Les raisons de ce changement seront expliquées dans la suite de ce chapitre. Toutefois, bien que la forme de la courbe change (ce qui est principalement visible sur le tracé de la vitesse en fonction de la quantité de fluorescéine figure 2.5 c), il est toujours possible de déterminer le coefficient directeur "a" de la première pente. Il devient parfois plus difficile de mesurer "b" (voir figure 2.5 c)).

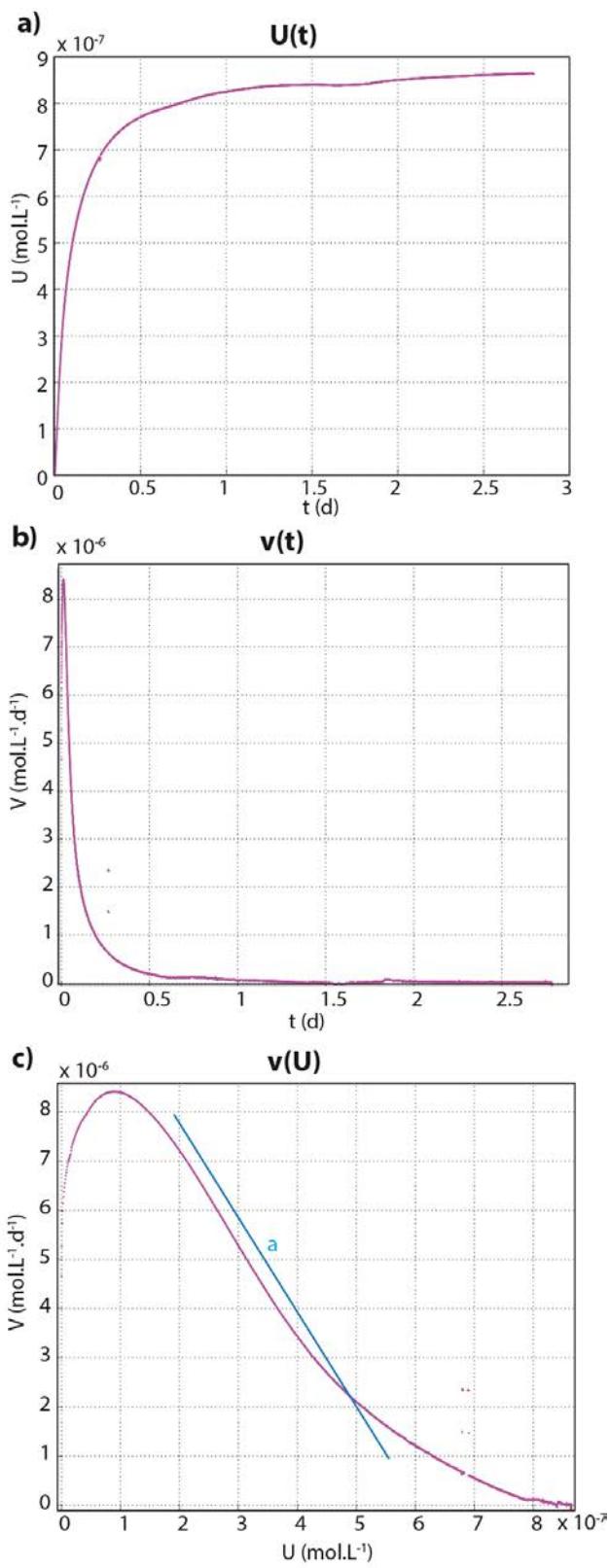


Figure 2.5: Résultats d'une expérience réalisée avec une concentration enzymatique  $[E]=0,02 \text{ g.L}^{-1}$ , et  $[FDA]_0=0,9 \mu\text{M}$ . a) Evolution temporelle de la concentration en fluorescéine. b) Evolution temporelle de la vitesse de formation de la fluorescéine. c) Evolution de la vitesse de formation de la fluorescéine en fonction de la concentration en fluorescéine formée, cette expérience présente deux pentes "a" et "b" moins marquées.

### **3.3 Cinétique de dégradation du FDA par les enzymes**

Pour mieux comprendre la manière dont réagit le traceur, les expériences ont été répétées en utilisant des solutions de différentes concentrations en FDA et en enzymes.

#### **3.3.a) Influence de la concentration en FDA**

Afin d'étudier l'impact de la concentration initiale en FDA ( $[FDA]_0$ ), nous avons réalisé une série d'expériences où différentes concentrations de FDA ont été introduites dans des solutions enzymatiques de même concentration (figure 2.6). La figure 2.6 a.1) montre que la concentration finale en fluorescéine dépend de la concentration initiale en FDA. Il est à noter que les paliers visibles sur les courbes cyan et jaune (correspondant aux deux  $[FDA]_0$  les plus hautes) indiquent une saturation du fluorimètre (tous les fluorimètres ne possèdent pas exactement la même gamme de mesure). La figure 2.6 a.2) représente l'avancement de la réaction en fonction du temps, ce qui permet de normaliser les courbes de la figure 2.6 a.1) par la concentration initiale en FDA. L'avancement est ainsi défini par le rapport entre la concentration de FDA initialement introduite et la concentration en fluorescéine à un temps  $t$ ,  $U(t)$ :  $A\nu = \frac{U(t)}{[FDA]_0}$ . La superposition des courbes indique que la réaction est proportionnelle à la concentration de FDA initiale (figure 2.6 b). Ainsi, nous pourrons analyser les résultats des expériences en nous intéressant à l'avancement de la réaction au cours du temps, indépendamment de la quantité de FDA initialement introduite. Le fait que l'avancement tende vers 1 aux temps longs, indique une réaction totale. La figure 2.6 b) montre la dépendance de la vitesse de consommation de la FDA à la concentration en FDA. Toutes les courbes présentent la même forme, cependant la réaction étant proportionnelle à la quantité de substrat (FDA) dans l'échantillon, les valeurs absolues des vitesses sont contrôlées par la concentration en substrat dans l'échantillon.

Au regard de la figure 2.6 c), on constate que les pentes "a" et "b" semblent identiques pour chacune des expériences. Cette observation indique que les pentes sont indépendantes de la concentration en FDA initiales, et dépendent uniquement de la concentration enzymatique, et donc de l'activité de la solution. Cette étape de validation est importante, car elle implique que la FDA est consommée selon la même dynamique indépendamment de sa concentration. Ainsi, lors de son utilisation au cours d'un traçage sur le terrain, il est probable que la répartition du traceur dans le milieu n'ait pas d'influence sur la vitesse à laquelle il sera consommé, au facteur de dilution près.

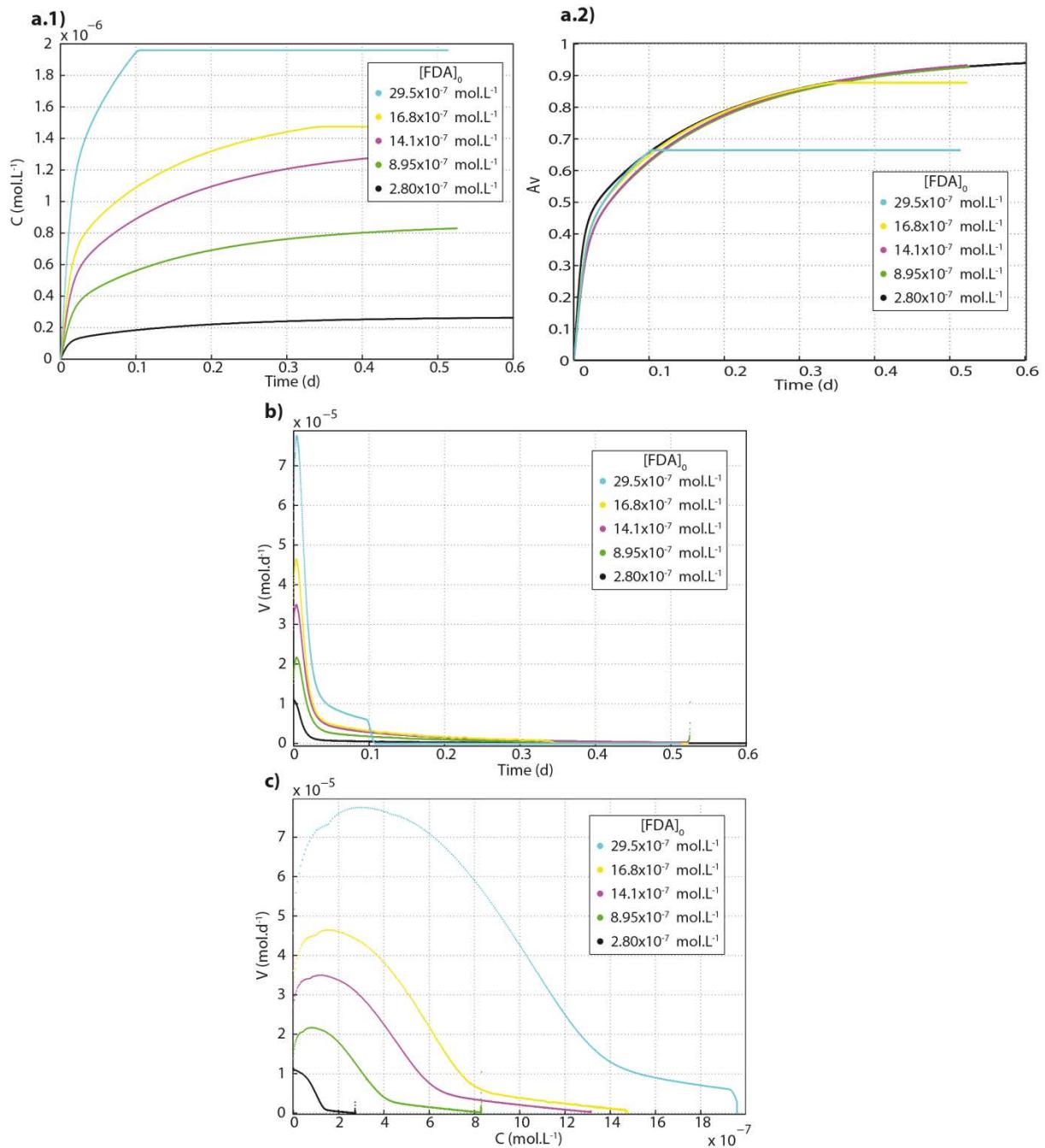


Figure 2.6: Influence de la concentration initiale de FDA sur la dégradation de la FDA en fluorescéine:  
(a.1) Evolution de la concentration en fluorescéine en fonction du temps. (a.2) Evolution de l'avancement de la réaction en fonction du temps. (b) Evolution de la vitesse de formation de la fluorescéine en fonction du temps. (c) Evolution de la vitesse de formation de la fluorescéine en fonction de la concentration en fluorescéine. Les concentrations initiales en FDA testées sont 0.28, 0.86, 1.36, 1.55 et 2,5  $\mu$ M. Les cinq expériences ont été réalisées avec des solutions enzymatiques de 0.1 g.L<sup>-1</sup>.

### **3.3.b) Influence de la concentration enzymatique**

Dans cette partie, nous testons l'influence de la concentration des solutions enzymatiques de concentrations variées. La figure 2.7 présente les résultats d'expériences pour lesquelles quatre concentrations enzymatiques différentes ont été testées. La figure 2.7 a.1 présente l'évolution de la fluorescence en fonction du temps. Les quantités de FDA initiale n'étant pas les mêmes pour chacune des expériences, la fluorescence U a été normalisée par la concentration de FDA initiale (Avancement de la réaction). (figure 2.7.a.2). Le graphe a.2 permet d'identifier clairement l'expérience ayant l'activité la plus faible (courbe rouge), toutefois il est plus difficile d'y différencier les trois autres courbes.

L'analyse de l'évolution de la vitesse en fonction du temps permet de mieux apprécier les différences d'une expérience à l'autre (2.7.b.1). Pour corriger les différences en concentration initiale la vitesse a été normalisée par la concentration  $FDA_0$  (2.7.b.2). On constate que la vitesse maximum la plus élevée est associée à la concentration enzymatique la plus forte (courbe verte, noire, jaune, puis rouge). Cependant nous remarquons que la forme des courbes varie. Ceci est particulièrement marqué sur les graphes 2.7.c.1 et 2.7.c.2, qui représente la vitesse en fonction de la concentration de fluorescéine. Les courbes jaunes et noires montrent une transition entre les pentes "a" et "b" moins marquée que celle de la courbe verte (comme expliqué figure 2.4 et 2.5), rendant parfois difficile la mesure de la pente "b". Toutefois la première pente ("a") reste facilement identifiable. En comparant les pentes "a" de ces différentes courbes, on constate que les pentes les plus fortes sont associées aux concentrations enzymatiques les plus élevées. Ainsi la mesure de la pente "a" pourrait constituer un outil intéressant pour mesurer une activité enzymatique comme discuté dans la section qui suit.

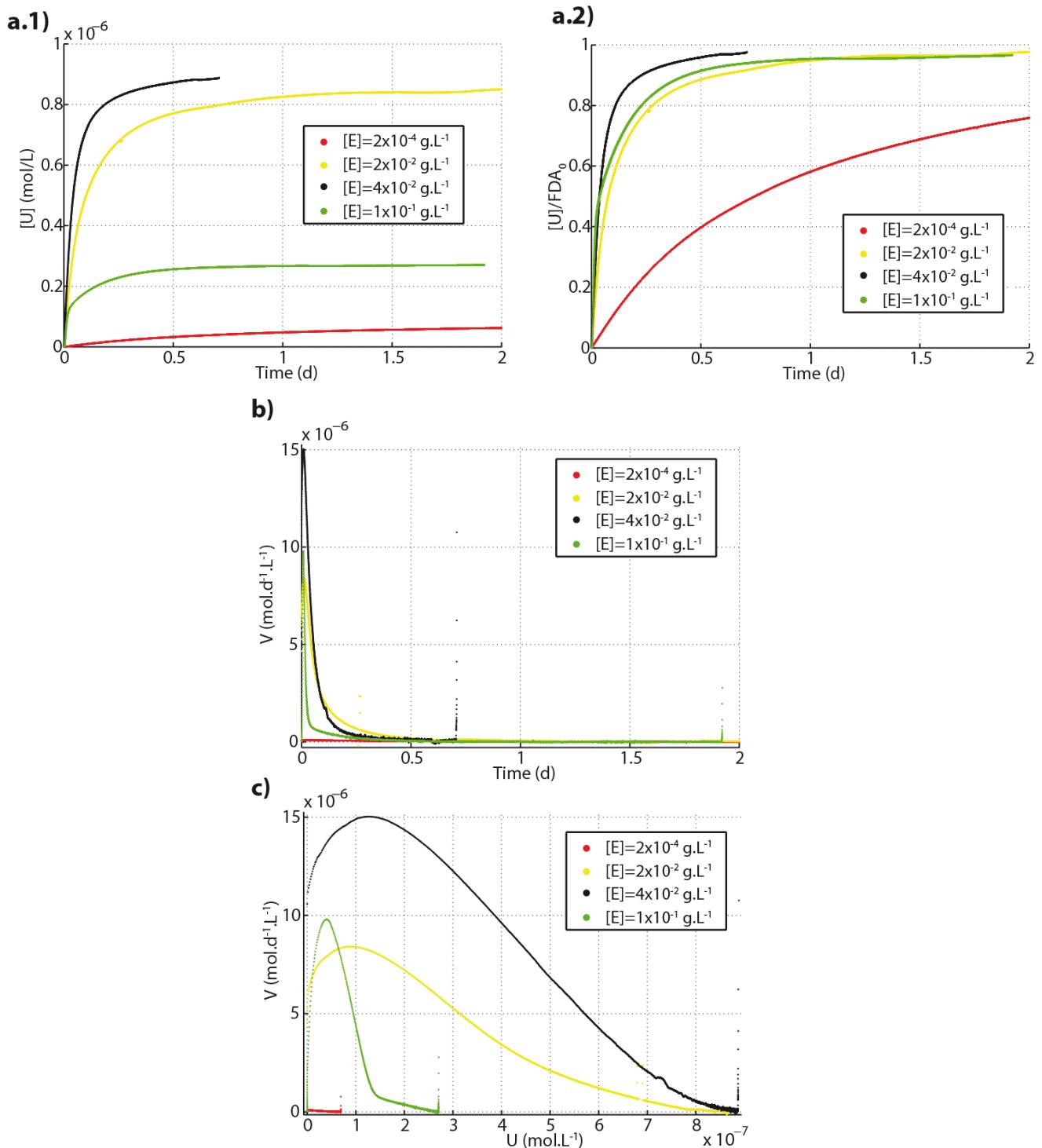
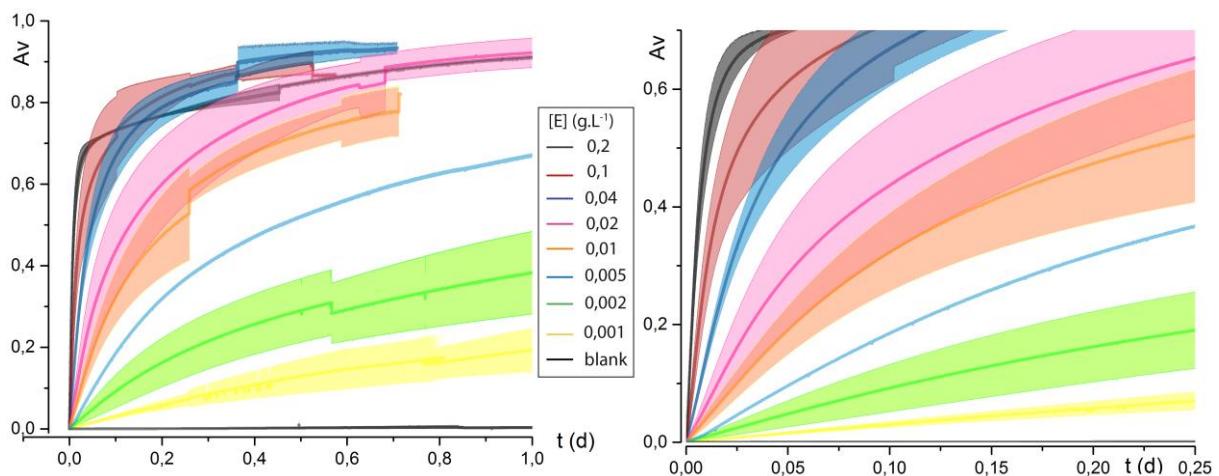


Figure 2.7: Dynamique de dégradation de la FDA pour différentes concentrations enzymatiques (courbe rouge:  $2.10^{-4}$  g.L<sup>-1</sup>; jaune:  $2.10^{-2}$  g.L<sup>-1</sup>; noire:  $4.10^{-2}$  g.L<sup>-1</sup>; verte:  $1.10^{-1}$  g.L<sup>-1</sup>) a.1) Evolution de la concentration en fluorescéine en fonction du temps. (a.2) Evolution de l'avancement de la réunion en fonction du temps. (b) Evolution de la vitesse de formation de la fluorescéine en fonction du temps. (c) Evolution de la vitesse de formation de la fluorescéine en fonction de la concentration en fluorescéine.

### 3.4 Calibration du traceur

#### 3.4.a) Reproductibilité et variabilité des mesures

Afin d'évaluer la reproductibilité et la variabilité des mesures nous avons répété les expériences pour de mêmes concentrations enzymatiques sur une gamme de concentrations comprise entre  $5.10^{-4}$  à  $4,8.10^{-1}$  g.L<sup>-1</sup>. La figure 2.8 présente les courbes U(t) (évolution de la concentration en fluorescéine formée au cours du temps) moyennées pour ces expériences. L'aire colorée autour des courbes représente l'écart type entre les différentes mesures effectuées avec une même concentration. Les expériences n'ont pas été reproduites suffisamment de fois pour qu'il soit possible d'effectuer un véritable traitement statistique des données, toutefois l'écart type est ici présentée à titre indicatif, il met en exergue la variabilité des mesures.



*Figure 2.8: Evolution de la concentration enzymatique en fonction du temps pour différentes concentrations enzymatiques. Les traits pleins représentent la moyenne des expériences effectuées pour une concentration enzymatique donnée, les aires colorées représentent l'écart-type. (La figure de droite est un agrandissement, pour les temps courts de la figure de gauche)*

Pour chacune des courbes représentées, l'avancement augmente au cours du temps. Plus la concentration enzymatique est élevée, plus l'augmentation de l'avancement se fait rapidement (du moins pour des temps courts, figure 2.8 b). Cette évolution peut donc permettre d'identifier différentes concentrations enzymatiques à partir de leur courbe d'évolution. La validité de l'identification n'est cependant pas identique sur toute la plage analysée. La distinction n'est pas claire pour les valeurs hautes qui s'approchent de 1, aux temps longs, où les courbes peuvent se croiser. Cependant, elle est plus aisée pour des temps courts. Pour des concentrations enzymatiques entre 0,02 et 0,01 g.L<sup>-1</sup>, la différence est moins tranchée du fait d'un certain recouvrement entre les deux courbes (aires orange et rose). En revanche, bien que le nombre de courbes soit faible pour la concentration 0,001 g.L<sup>-1</sup> (aire jaune), la distinction semble très apparente pour de faibles concentrations. Pour déterminer clairement les incertitudes et établir le lien concentration-courbe d'avancement de manière plus solide, un jeu de donné plus conséquent serait nécessaire. Toutefois, en première approximation, déterminer à partir de notre jeu de données la concentration enzymatique d'une solution s'avère possible en traçant la courbe U(t) obtenue sur la figure 2.8.

### 3.4.b) Comparaison des "pentes a" pour différentes concentrations enzymatiques

Un autre moyen de déduire la concentration enzymatique à partir de ces expériences est de mesurer la pente "a" sur un graphique de vitesse en fonction de la concentration (comme expliqué en 3.3.b)). Pour chacune des expériences réalisées avec différentes concentrations enzymatiques, les pentes "a" ont été mesurées. Elles sont présentées dans la figure 2.9 ci-dessous. Afin d'estimer la précision de nos mesures, l'écart-type a été calculé, aux concentrations pour lesquelles au moins deux mesures ont été effectuées. L'écart-type est représenté par la surface verte, l'intervalle de confiance 95% (1,96 fois l'écart-type) par la surface orange.

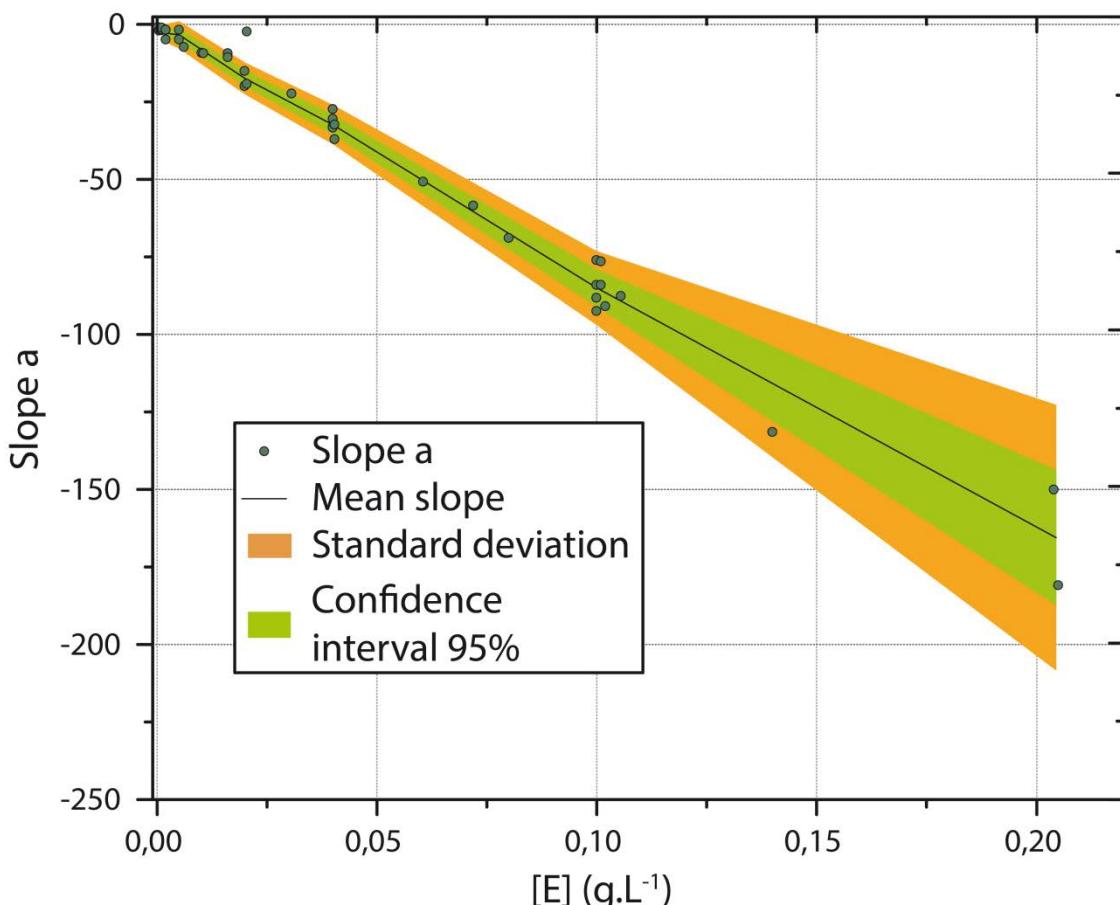


Figure 2.9: pente "a" fonction de la concentration enzymatique de la solution testée

La relation entre la pente a et la concentration est approximativement linéaire ( $a=-800[E]$ ). Nous en déduisons que la pente "a" est proportionnelle à la concentration en enzyme. Toutefois pour des concentrations enzymatiques faibles (inférieures à 0,005), la pente "a" ne peut être déterminée avec précision. Cette méthode de mesure ne pourra donc être effective que pour des concentrations en enzymes (ou activités microbiennes équivalentes) supérieures à  $0.005 \text{ g.L}^{-1}$ . En dessous de cette limite, il sera préférable de déterminer l'activité de la solution en analysant les courbes de concentration en fonction du temps.

La mesure de la pente "a" d'une solution enzymatique inconnue peut ainsi être associée à une concentration enzymatique en endo-1,4- $\beta$ -Xylanase équivalente. S'il s'avère que le traceur réagit de la même manière avec des eaux naturelles, il sera alors possible d'estimer l'activité microbiologique des eaux naturelles.

## 4- Modélisation de la cinétique réactionnelle

A partir des observations expérimentales détaillées précédemment, nous proposons un modèle permettant de prédire la cinétique réactionnelle de la FDA. Le modèle que nous avons créé est construit à la fois sur la présence d'un intermédiaire de réaction, et sur l'existence de deux formes stériques de la FDA. Il s'agit donc d'une combinaison des hypothèses formulées par Hofmann & Sernetz (1983) et Sontag (1977), qui, pour expliquer la cinétique de dégradation enzymatique de la FDA, ont respectivement avancé l'existence d'un intermédiaire de réaction et l'existence de deux formes stériques de la FDA.

Les deux stéréoisomères étant dégradés à des vitesses différentes:

-le premier stéréoisomère est dégradé selon l'équation (2.1):



-Le second, selon l'équation (2.2)



Ainsi, l'évolution de la concentration en substrat, en intermédiaire et en produit, pour chacun des stéréoisomères, est décrite par:

$$\frac{dFDA_n(t)}{dt} = -k_{n1}[FDA]_n \quad (2.3)$$

$$\frac{dFMA_n(t)}{dt} = k_{n1}[FDA]_n - k_{n2}[FMA]_n \quad (2.4)$$

$$\frac{dU_n(t)}{dt} = k_{n2}[FMA]_n \quad (2.5)$$

$$\text{avec } FDA_1^0 = FDA_1^t + FMA_1^t + U_1^t \quad (2.6),$$

$$FDA_2^0 = FDA_2^t + FMA_2^t + U_2^t \quad (2.7),$$

$$\text{et } FDA^0 = FDA^t + FMA^t + U^t \quad (2.8)$$

où n=1 ou 2, selon qu'il s'agisse du stéréoisomère 1 ou 2. La concentration totale étant donnée par la somme des deux stéréoisomères:

$$FDA(t) = FDA_1(t) + FDA_2(t), FMA(t) = FMA_1(t) + FMA_2(t), F(t) = U_1(t) + U_2(t) \quad (2.9)$$

La résolution des équations ci-dessus donne les solutions suivantes:

$$[FDA]_n^t = FDA_n^0 \times k_{n1} \times e^{-k_{n1}t} \quad (2.10)$$

$$[FMA]_n^t = FDA_n^0 \times \frac{k_{n1}}{k_{n2}-k_{n1}} \times (e^{-k_{n1}t} - e^{-k_{n2}t}), \text{ pour } k_1 \neq k_2 \quad (2.11),$$

$$\text{Ainsi pour } k_1 \neq k_2, [F]_n^t = FDA_n^0 - FDA_n^0 \times \frac{k_{n2}}{k_{n2}-k_{n1}} \times e^{-k_{n1}t} - FDA_n^0 \times \frac{k_{n1}}{k_{n2}-k_{n1}} \times e^{-k_{n2}t} \quad (2.12),$$

de plus  $FDA_0 = f \times FDA_0 + (1 - f) \times FDA_0$  (13), où  $f$  est la proportion en stéréoisomère 1.

L'évolution de la concentration en FDA, FMA et F total est donc donnée par:

$$FDA^t = FDA_1^t + FDA_2^t \quad (2.14)$$

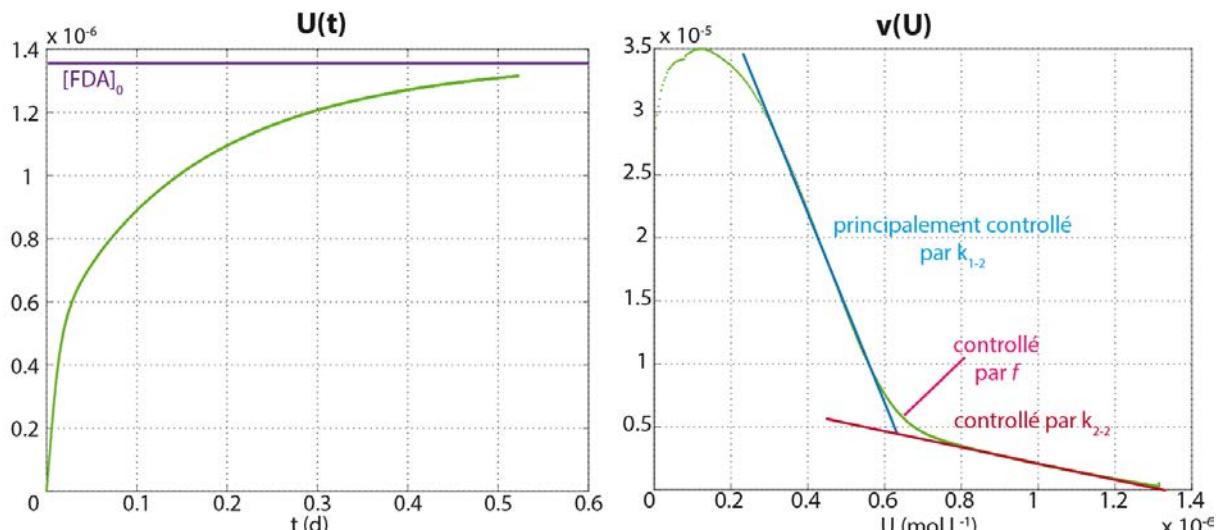
$$FMA^t = FMA_1^t + FMA_2^t \quad (2.15)$$

$$U^t = U_1^t + U_2^t \quad (2.16)$$

## 4.1 Influence des paramètres du modèle

Notre modèle comporte donc 5 variables:  $[FDA]_0$ ,  $f$ ,  $k_{1-1}$ ,  $k_{1-2}$ ,  $k_{2-1}$  et  $k_{2-2}$ .  $[FDA]_0$  , la concentration initiale en substrat est fixée pour chaque expérience. Les proportions en stéréoisomères, "f" étant inconnue, cette variable sera une variable d'ajustement. Les constantes de réactions  $k_{1-1}$ ,  $k_{1-2}$ ,  $k_{2-1}$  et  $k_{2-2}$ , sont quant à elles dépendantes de la concentration enzymatique.

Mathématiquement, il est possible de prouver que la "pente b" est contrôlée par la constante  $k_{2-2}$  (voir annexe 2.1). La "pente a" est quant à elle principalement contrôlée par la constante  $k_{1-2}$  (avec  $k_{1-2} > k_{2-2}$ ). Tandis que la proportion initiale entre les deux stéréoisomères ( $f$ ) contrôle la transition entre les deux pentes (si les deux stéréoisomères sont en proportion égale ( $f=0,5$ ), la transition se situera sur la graphe  $v(U)$  à l'abscisse  $U=[FDA]_0/2$ ) (voir figure 2.10).



## 4.2 Comparaison entre modèle et données

La figure 2.11 présente une comparaison entre des données expérimentales et le modèle que nous avons développé. La concentration initiale en FDA,  $[FDA]_0$ , est connue et égale à  $0.85 \mu\text{M}$ . Pour ajuster ce modèle nous avons mesuré graphiquement la "pente b", déduisant ainsi que la constante  $k_{2-2}$  avait pour valeur  $6 \text{ j}^{-1}$ . Par visualisation graphique, nous pouvons également évaluer que le coefficient  $f$  est compris entre 0,4 et 0,5. Nous avons ensuite ajusté manuellement les autres paramètres. Le modèle le plus satisfaisant a été obtenu avec les paramètres suivants:  $f=0.41$ ,  $k_{1-1}=228$  ( $38*k_{2-2}$ ),  $k_{1-2}=120$  ( $20*k_{2-2}$ ),  $k_{2-1}=72$  ( $12*k_{2-2}$ ). Nous constatons que le modèle développé permet de reproduire de manière très satisfaisante les données expérimentales. Les hypothèses formulées semblent donc satisfaisantes pour expliquer la transformation de la FDA en fluorescéine.

Ce modèle nous permet aussi d'expliquer les différentes formes de courbe obtenues expérimentalement (différences observées entre les figures 2.4 et 2.5) et donc la variabilité entre les différentes expériences. Ces différences seraient liées à la proportion de stéréoisomère 1 et 2 présente dans la solution. Toutefois, à notre connaissance, en dehors de Sontag (1977), aucune étude ne s'est intéressée aux différentes formes stériques de la fluorescéine diacétate. Nous ne sommes donc pas en mesure d'expliquer les changements de proportion entre ces deux formes de la FDA.

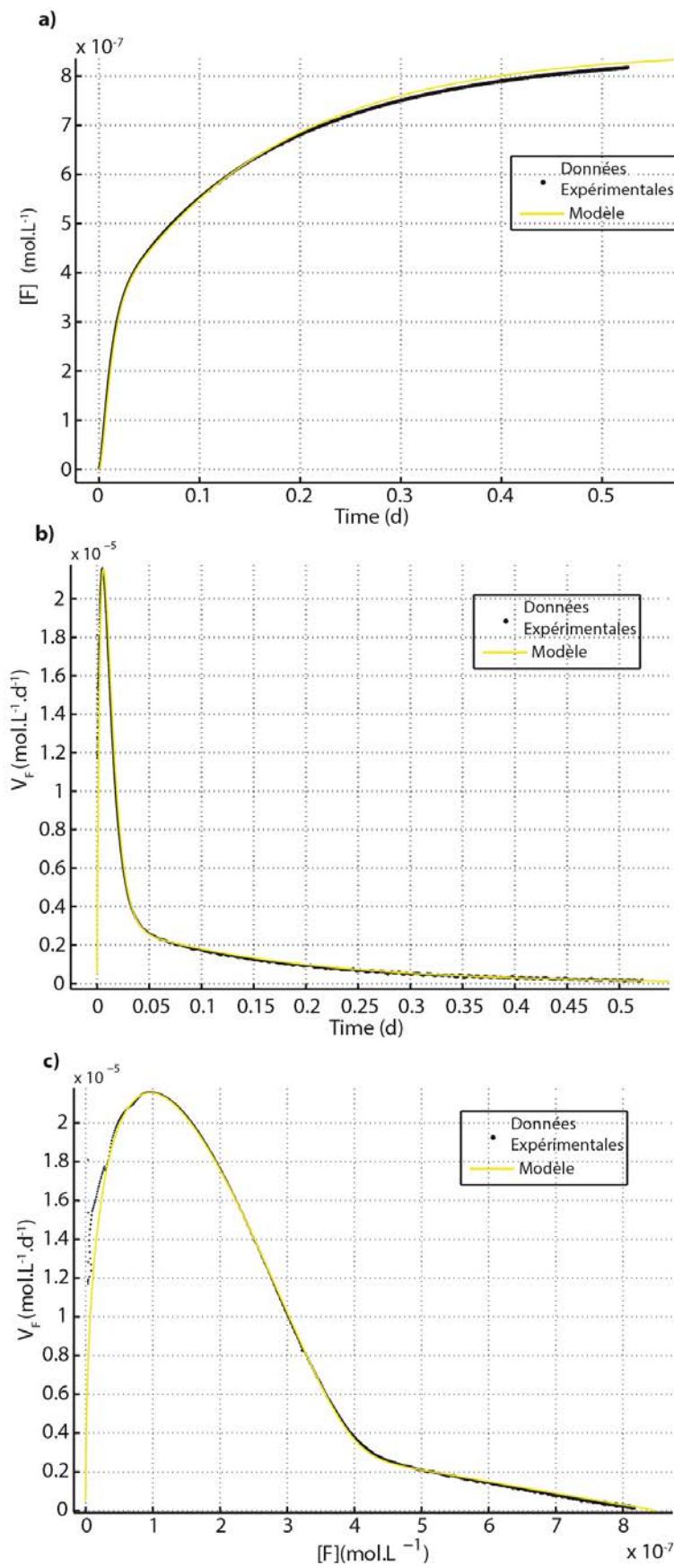


Figure 2.11: Comparaison entre données expérimentales et modélisées.  $[E]=0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $[FDA]_0=0.85\mu\text{M}$ .  
Paramètres du modèle:  $[FDA]_0=85\mu\text{M}$ ,  $f=0.41$ ,  $k_{1-1}=228$  ( $38*k_{2-2}$ ),  $k_{1-2}=120$  ( $20*k_{2-2}$ ),  $k_{2-1}=72$  ( $12*k_{2-2}$ ).

## 5- Utilisation de la FDA pour mesure de l'activité microbiologique des eaux naturelles

Après avoir testé et calibré notre traceur avec des solutions enzymatiques, nous avons évalué la possibilité d'utiliser la FDA pour mesurer l'activité microbienne des eaux naturelles. Pour ce faire nous avons utilisé la FDA sur des eaux prélevées dans différents environnements sur le campus de Beaulieu (Université de Rennes): dans une mare, un étang et un forage. Les résultats de trois de ces expériences sont présentés figure 2.12.

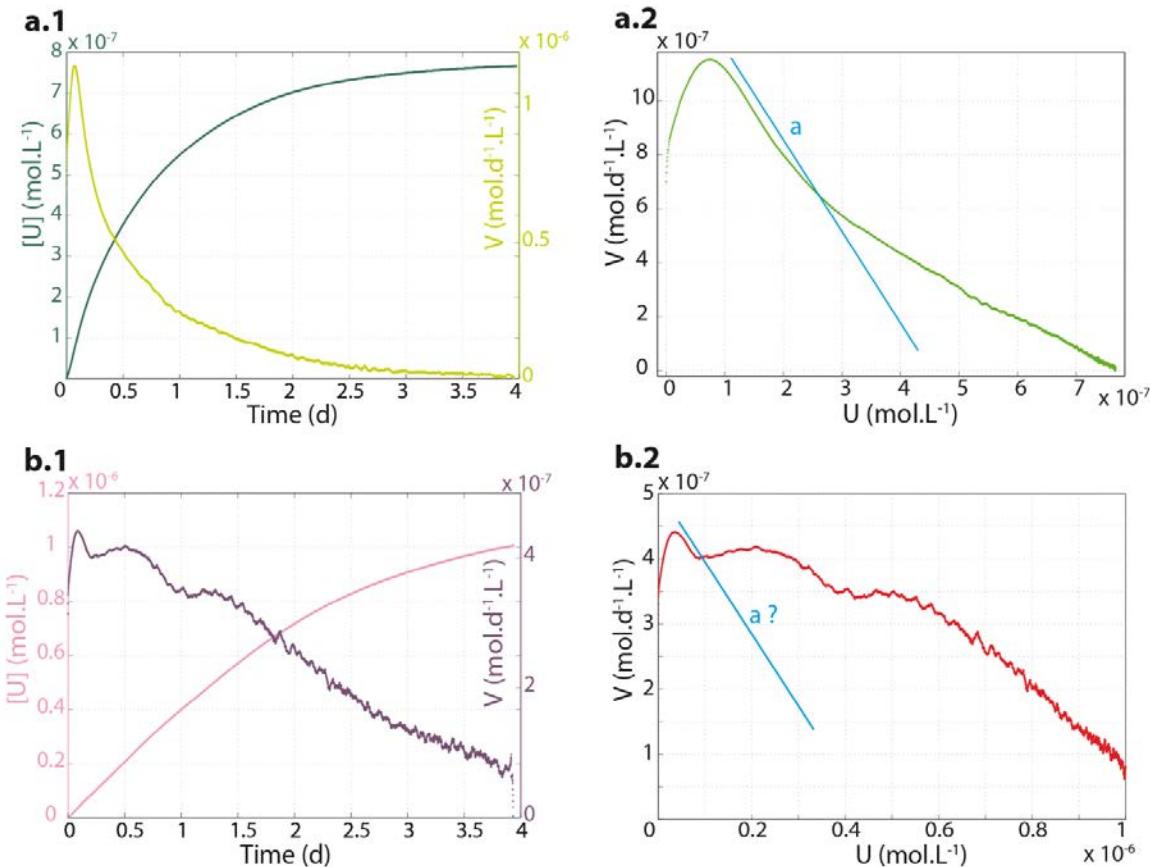


Figure 2.12: Test FDA sur des eaux naturelles souterraines et de surface. a) et b) Mesures effectuées sur de l'eau prélevée dans le forage du campus de Beaulieu.

Les courbes présentées figure 2.12 sont plus complexes que celles obtenues pour les solutions enzymatiques. Si les courbes de concentration en fonction du temps ( $U(t)$ ) semblent à première vue semblables, des différences sont visibles lorsque l'on regarde l'évolution de la vitesse en fonction du temps et de la concentration ( $v(t)$  et  $v(U)$ ). Les cinétiques réactives de la figure 2.12 a), obtenues à partie de l'eau du forage, présentent un comportement similaire à celui obtenu avec les enzymes. On y observe une phase de délai suivie d'une décroissance en deux phases. Toutefois, l'expérience de la figure 2.12 b), effectuée également avec de l'eau du forage à la même période, présente un profil différent. Bien que les résultats soient similaires pour des temps courts (jusqu'à  $t=1.5$  jour environ, où on observe une augmentation rapide de la vitesse jusqu'à l'atteinte d'un maximum puis l'amorce d'une diminution), une divergence apparaît par la suite. La vitesse augmente de nouveau, puis décroît de manière irrégulière.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces différences. Tout d'abord, les solutions enzymatiques testées ne contiennent qu'une seule et même enzyme alors que les eaux naturelles peuvent en contenir plusieurs. Le fait que la FDA soit transformée par plusieurs enzymes implique une cinétique plus complexe, puisque chaque enzyme est susceptible de présenter des constantes de réaction différentes.

Un autre facteur de divergence entre eaux naturelles et solutions enzymatiques pourrait être la localisation de la réaction. Lors de nos expériences de calibration la FDA est dégradée par des enzymes en solution. Dans des eaux naturelles la dégradation de la FDA peut se faire de deux manières, soit par des enzymes libres en solution, soit à l'intérieur des cellules, après que la FDA a pénétré dans le cytoplasme (Stubberfield & Shaw 1990). Cette étape supplémentaire pourrait donc ajouter de la complexité à la cinétique réactionnelle. De plus, comme le soulignait Chrzanowski et al. (1984), la capacité des membranes cellulaires à laisser passer la FDA varie en fonction des organismes. Son étude soulignait une perméabilité plus importante à la FDA des bactéries à gram-positive.

D'autre part, les solutions enzymatiques artificielles possèdent une activité constante dans le temps, puisque l'activité dépend essentiellement de la concentration enzymatique, gardée invariante au long de l'expérience. Les enzymes présentes dans les eaux naturelles sont formées par les microorganismes présents dans le milieu. Or, la composition des communautés microbiennes dans les eaux naturelles peut évoluer au cours du temps, et de fait changer l'activité de la solution au cours d'une expérience. La probabilité que ces changements d'activité se produisent est d'autant plus élevée que les conditions physico-chimiques entre le milieu naturel (dans lequel l'eau a été prélevée) et le laboratoire sont contrastées.

Enfin, l'introduction de la solution de FDA (bien que la quantité introduite soit faible, de l'ordre de quelques microlitres) peut avoir un impact sur la communauté microbienne présente dans l'eau investiguée, puisqu'elle constitue une perturbation du milieu originel.

Bien que les expériences sur les eaux naturelles ne permettent pas une analyse aussi poussée que les expériences avec des enzymes, une analyse est possible en se focalisant sur les courbes  $U(t)$  (voir figure 2.13) et en les comparant aux résultats obtenus pour les enzymes (figure 2.8).

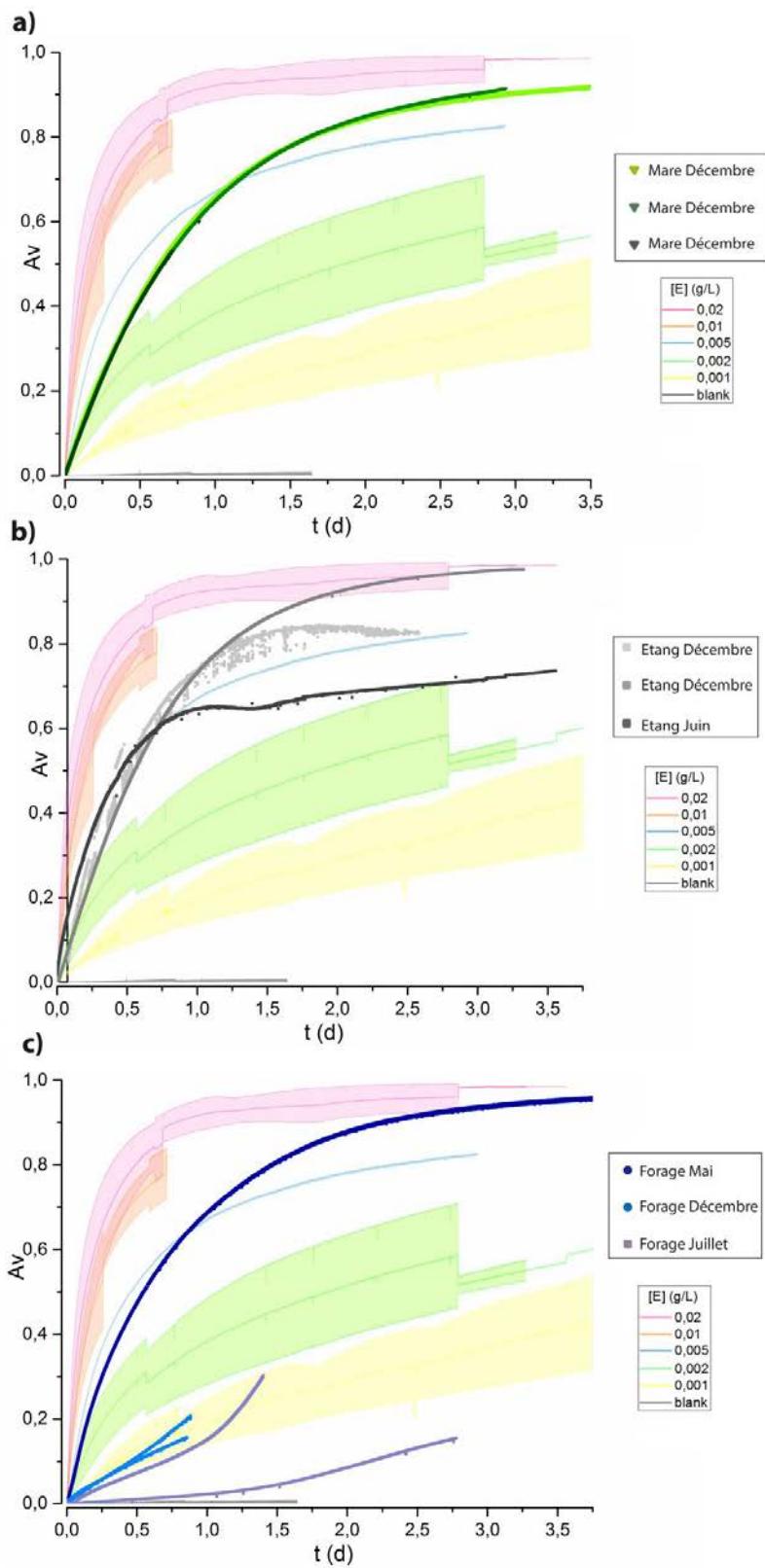


Figure 2.13: Evolution temporelle de la concentration de fluorescéine  $U(t)$  pour les expériences effectuées avec de l'eau a) de la mare, b) de l'étang et c) du forage. Les courbes obtenues pour les solutions d'enzymes pures (figure 2.8) sont superposées pour comparaison.

Pour les expériences effectuées avec de l'eau de surface, nous constatons une bonne reproductibilité des résultats pour les eaux de la mare, comme en témoigne la superposition des trois courbes vertes (figure 2.13 a). Il en est de même pour les expériences réalisées sur l'eau de l'étang (courbes grises), bien que ces données soient plus bruitées (et que l'expérience de juin dévie des deux autres à partir d'un jour environ) (figure 2.13 b). On peut assimiler à ces deux eaux de surface une activité FDA équivalente à celle obtenue pour une concentration enzymatique de xylanase comprise entre 0.01 et 0.002 g.L<sup>-1</sup>.

Les expériences réalisées avec de l'eau de forage présentent une variabilité plus importante (figure 2.13 .c). De plus, bien que certaines courbes possèdent les formes attendues, d'autres en présentent de plus inhabituelles (expériences de juillet). Toutefois si l'on compare ces résultats à ceux obtenus avec les enzymes (à l'exception d'une expérience), lors de la phase initiale (de 0 à 0,5 jour), l'activité FDA mesurée pour ces eaux est proche de la limite de détection de notre dispositif et l'activité est similaire à des solutions enzymatiques de concentrations inférieures à 0.002 g/L.

Pour expliquer la plus grande variabilité des résultats entre les eaux de surfaces et l'eau souterraine il est possible de formuler différentes hypothèses. Une première possibilité est que les changements d'activité microbienne de l'eau au cours de l'année sont plus importants dans l'eau souterraine que dans l'eau de surface mais cette hypothèse est peu probable. Une autre possibilité est que les perturbations subies par les eaux de surface, lorsqu'elles sont analysées dans les conditions du laboratoire, soient moins importantes pour les eaux de surfaces que pour l'eau souterraine. Tout d'abord, ces eaux de surfaces sont riches en carbone organique, contrairement aux eaux souterraines, les microorganismes présents dans ces eaux seront donc probablement moins perturbés par l'injection de la FDA. De plus, l'eau souterraine en question possède des concentrations faibles en oxygène (environ 1 mg.L<sup>-1</sup>) et le fait que nos expériences soient réalisées en conditions aérobies provoque certainement des perturbations sur la communauté microbienne.

Les expériences de terrain menées *in situ* permettent de s'affranchir de ce problème. Nous présenterons l'application de la mesure de l'activité microbiologique par la FDA couplée à des expériences de traçage dans un aquifère dans le chapitre suivant.

## 6- Conclusions

Dans ce chapitre nous avons testé la faisabilité de l'utilisation de la Fluorescéine Diacétate (FDA) comme traceur de l'activité microbienne dans les eaux souterraines. La FDA est une molécule qui, lorsqu'elle est dégradée, se transforme en fluorescéine, molécule dont la concentration est facilement mesurable par un fluorimètre ou un spectrophotomètre. Le dispositif expérimental que nous avons mis en place a permis l'acquisition de mesures autonomes (car alimenté en continu par une pompe péristaltique) et haute fréquence (toutes les 10 secondes).

Une première étape dans ce travail a été de comprendre la cinétique de dégradation de la FDA par voie enzymatique, dans le cas simplifié d'une solution monoenzymatique. Dans un premier temps nous avons démontré que la vitesse de consommation de la FDA est proportionnelle à la concentration en FDA initialement introduite  $[FDA]_0$ . Ceci qui nous permet d'étudier la réaction en s'intéressant à son avancement (rapport entre la fluorescéine formée et  $[FDA]_0$ ). Par la suite, nous avons observé que la cinétique d'apparition de la fluorescéine sur un graphe  $v(U)$  (vitesse en fonction de la concentration) présente une phase de délai durant laquelle la vitesse augmente jusqu'à un maximum) suivi d'une décroissance selon deux pentes successives. Pour expliquer ce comportement, et en nous appuyant sur les travaux de Sontag (1977) et Hofmann & Sernetz (1983), nous avons émis deux hypothèses:

- 1) l'existence d'un intermédiaire de réaction - la FDA est dégradée en Fluorescéine Monoacétate (FMA) avant d'être dégradé en Fluorescéine ;
- 2) l'existence de deux formes stériques de la FDA.

En se basant sur ces hypothèses nous avons pu déduire une expression mathématique décrivant l'évolution de la concentration en fluorescéine au cours du temps permettant d'approximer nos données expérimentales de manière très satisfaisante.

Afin de calibrer le nouveau traceur, nous avons réalisé une série d'expériences avec une large gamme de concentration en enzyme. Nous avons ainsi validé deux méthodes pour déterminer la concentration enzymatique d'une solution. La première consiste en l'observation de la concentration en fluorescéine en fonction du temps  $U(t)$ . La deuxième se base sur la mesure de la "pente a" dans un graphe  $v(U)$ , qui s'est avérée être proportionnelle à la concentration de la solution enzymatique testée. Dans un deuxième temps nous avons utilisé la FDA sur des eaux naturelles. En raison de la complexité des milieux naturels, les résultats apparaissent plus complexes que ceux obtenus avec l'utilisation d'une simple enzyme. Cependant, les résultats pour les eaux de surface testées sont apparus relativement reproductibles et ont permis d'estimer l'activité microbienne de celles-ci. Les résultats concernant l'eau souterraine sont quant à eux plus variables et délicats à analyser, bien qu'une gamme d'activité ait pu être déterminée. Les changements de condition entre milieu souterrain et laboratoire pourraient être en partie responsables de ces difficultés. Afin de faire abstraction de ces problèmes, des mesures *in situ* s'avéreraient préférables. Ce sera l'objet du chapitre suivant.

## 7- Perspectives

Les résultats expérimentaux présentés dans cette partie suggèrent que la FDA est un traceur permettant de mesurer une activité enzymatique *in situ*. Nous avons également montré que la FDA peut être utilisée pour quantifier l'activité microbienne d'eaux naturelles. Bien que ces travaux nécessitent encore des développements, ces premiers résultats sont prometteurs. Toutefois les activités estimées pour les eaux naturelles testées se situent dans la limite basse de ce qu'il nous est possible de mesurer. Augmenter la précision de nos mesures permettrait de mieux quantifier ces faibles activités et de pouvoir distinguer des activités plus proches. Ainsi, des suivis pour l'étude de la variabilité saisonnière de l'activité microbienne d'un environnement donné pourraient être mis en place. Pour ce faire, plusieurs améliorations sont envisageables, notamment l'ajout d'un dispositif permettant un contrôle plus précis de la température au cours de l'expérience. La possibilité de travailler sous atmosphère confinée, afin de permettre par exemple l'étude de milieux anaérobies en laboratoire serait également intéressante. Une source d'incertitude importante de notre méthode s'est avérée être les variations de la proportion entre les deux formes stériques de la FDA (*f*). Mieux comprendre ce qui contrôle ce paramètre, et à terme le contrôler, permettrait d'augmenter considérablement la précision des mesures.

Les résultats de certaines expériences réalisées avec de l'eau naturelle soulèvent plusieurs hypothèses qu'il n'est pas toujours possible de valider. Coupler la mesure de l'activité FDA avec d'autres méthodes de mesure de l'activité permettrait de les confirmer ou de les infirmer. Il serait également intéressant de coupler ces mesures d'activités avec des méthodes de caractérisation microbiologique. Des comptages de microorganismes au cours de l'expérience seraient envisageables, ils permettraient d'établir un lien entre les activités mesurées, et même *a fortiori* les variations d'activité, avec l'évolution de la population microbienne. Dans un deuxième temps, des tests génétiques (sur des traceurs de l'activité, tels que l'ARN) pourraient également être possible, bien que plus difficile à mettre en place.

Ce traceur pourrait également être utilisé pour évaluer la dépendance de l'activité enzymatique à certains paramètres physico-chimiques, tels que la température ou l'efficacité du mélange. Un des avantages de la méthode que nous avons développée est la facilité à mesurer le produit de réaction, la fluorescéine. Sa concentration est en effet mesurable dans l'espace à l'aide d'une caméra. La FDA pourrait donc être utilisée pour étudier des réactions enzymatiques dans un milieu poreux 2D ou 3D. Elle pourrait ainsi permettre de visualiser la répartition spatiale de la réactivité dans ces milieux, afin d'apporter des réponses sur les questions relatives à l'importance du mélange et l'hétérogénéité des milieux sur la réactivité biogéochimique. Des essais préliminaires ont déjà été effectués dans ce sens.

# Chapitre 3 - Expériences de traçage réactif pour la mesure de l'activité microbienne *in situ*

## 1- Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré la possibilité de mesurer une activité microbienne de manière continue grâce au traceur FDA. Dans ce chapitre nous présentons les résultats des premières expériences que nous avons effectuées pour tester cette méthode sur le terrain. L'objectif de ces expériences est ainsi de mesurer une activité microbienne globale *in situ* dans les eaux souterraines, en couplant l'usage de la FDA à des méthodes de traçage réactif. Une partie des expériences présentées a fait l'objet du stage de master 2 de Dorian Putigny que j'ai encadré durant ma thèse.

## 2- Matériels et Méthodes

Dans le but de mettre au point une méthode de mesure *in situ* de l'activité microbienne globale dans les eaux souterraines, 5 expériences de traçages réactifs ont été réalisées sur le site du campus de Beaulieu (Université de Rennes 1) (Tableau 3.1).

Pour chacune de ces expériences nous avons utilisé la FDA comme traceur réactif. Comme expliqué dans le chapitre précédent, en présence de microorganismes, la FDA est dégradée en Fluorescéine MonoAcétate (FMA), puis en fluorescéine supposée stable sur la durée des expériences. La vitesse à laquelle la réaction a lieu, renseigne sur l'activité microbiologique globale du milieu. L'avantage principal de ce traceur est que le produit de la réaction est fluorescent et peut donc être mesuré avec une grande précision et en continu par des fluorimètres de terrain.

Trois de ces cinq expériences de traçages effectuées sont des tests de push-pull. Cette méthode consiste en l'injection dans un puits d'une solution test contenant le traceur (phase de "push"). S'en suit dans un deuxième temps la phase d'extraction (phase de "pull"), lors de laquelle un pompage est établi dans le même puits que le puits d'injection. Le traceur, mélangé à l'eau de l'aquifère, est ainsi restitué et sa concentration mesurée à la sortie du forage. Les deux phases (injection et extraction) peuvent être séparées par une phase de repos (resting time) au cours de laquelle le traceur est transporté librement dans le milieu par les flux naturels et par simple diffusion. Pour réaliser un push-pull test réactif, un traceur réactif est ajouté au(x) traceur(s) conservatif(s). L'analyse comparative des courbes de restitution de chacun des traceurs permet ainsi de mesurer le taux de réaction du traceur réactif.

Les deux autres expériences sont des expériences de traçages puits-à-puits (well-to-well tracer test). Lors de ces expériences, la solution test est injectée dans un premier puits (puits d'injection), tandis qu'un pompage est mis en place dans un deuxième puits. La concentration en traceur est mesurée à la sortie du deuxième puits, afin d'obtenir une courbe de restitution du traceur dans le temps. Là encore, un traceur réactif est ajouté à la solution test.

## 2.1 Choix des traceurs conservatifs

Lorsque l'on injecte le traceur dans le milieu souterrain, il est dilué par mélange avec l'eau de l'aquifère. Afin de pouvoir mesurer le taux de dilution, indispensable à la mesure d'un taux de réaction (avancement), l'utilisation d'un traceur conservatif est nécessaire. Pour les cinq expériences de traçage réalisées, trois traceurs conservatifs différents ont été utilisés.

Lors du traçage puits-à-puits de novembre 2015 nous avons utilisé l'hélium, gaz noble (non réactif), comme traceur conservatif. La mesure était effectuée par MIMS (Membrane Inlet Mass Spectrometer (Chatton et al. 2017) avec une résolution d'une mesure toutes les 8 secondes.

Pour le traçage puits-à-puits effectué en janvier 2017, nous avons utilisé deux traceurs conservatifs, l'hélium et un traceur fluorescent, la sulforhodamine G. Les fluorimètres de terrain GGUN sont capables de mesurer plusieurs longueurs d'onde ((Schnegg & Kennedy 1998; Lemke et al. 2013). Moyennant une calibration en laboratoire il est possible de déconvoluer le signal obtenu afin de retrouver les différentes concentrations en traceur (voir Annexe 3.1). L'acquisition des données est effectuée avec une résolution d'une mesure toutes les 10 secondes.

Pour les trois expériences de push-pull, nous n'avons pas ajouté de traceur conservatif au sens strict. Le traceur faisant office de traceur conservatif est obtenu en faisant réagir au laboratoire, par l'ajout d'enzyme, tout le substrat (FDA et FMA) présent dans un échantillon prélevé en sortie. La concentration en fluorescéine totale mesurée ( $[U_{tot}] = [FDA] + [FMA] + [U]$ ) fait ainsi office de traceur conservatif. Cette méthode est intéressante car elle permet de se soustraire à l'injection d'un second traceur dans le milieu. Toutefois, la résolution temporelle de mesure est plus faible et demande plus de travail en laboratoire qu'une simple acquisition en continu avec un fluorimètre.

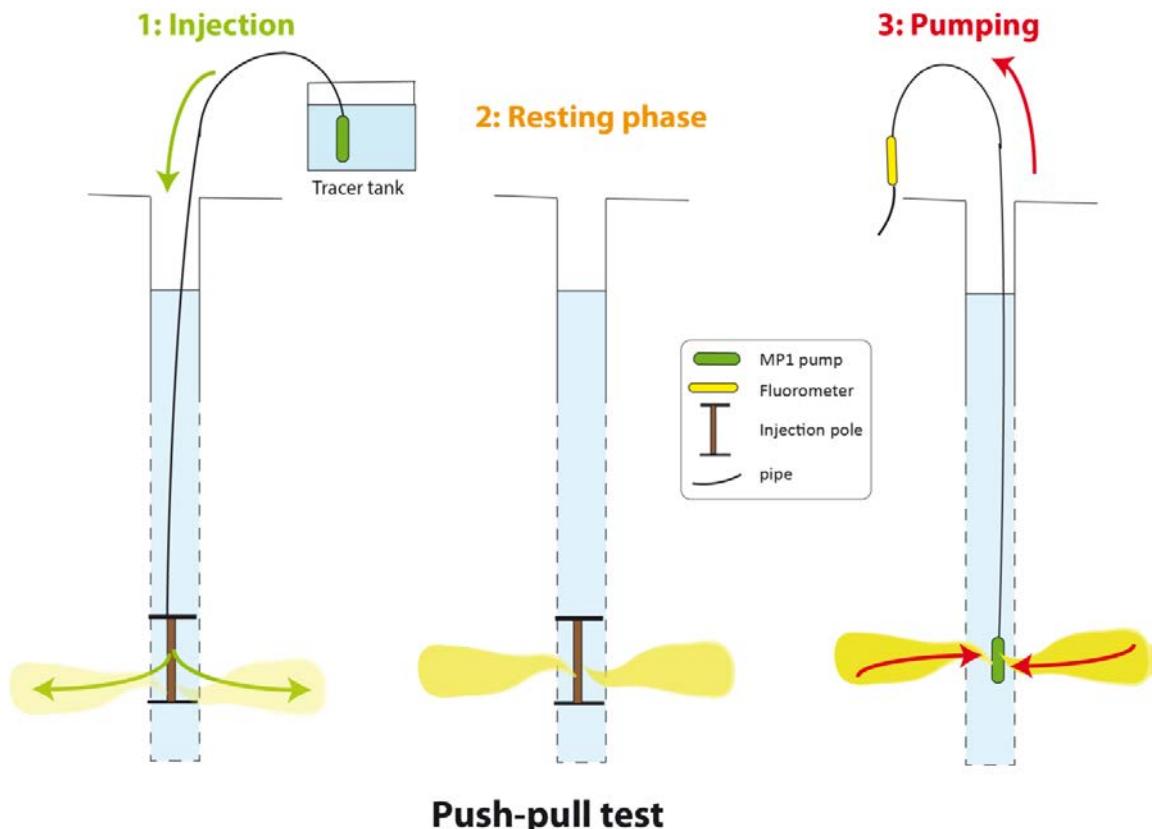
## **2.2 Site d'étude et dispositifs expérimentaux**

Les cinq traçages ont été réalisés sur le site expérimental de Beaulieu (campus de l'Université de Rennes 1). Les deux forages utilisés, Beaulieu-haut et Beaulieu-bas, font respectivement 74m et 77m de profondeur et sont distants d'une dizaine de mètres. Ils sont connectés par une zone fracturée située à 25-27m de profondeur. C'est à l'intérieur de cette zone fracturée qu'ont été injectées les solutions tests.

### **2.2.a) Push-Pull Tests**

Les tests de push-pulls présentent trois phases (voir figure 3.1 et 3.2):

- 1) La première correspond à la phase d'injection, (Push) au cours de laquelle la solution test (contenant de l'eau du forage et la solution de FDA) est injectée dans le milieu. L'injection de la solution test est suivie par l'injection d'un volume d'eau du forage (chaser) équivalent à celui de la solution test. L'injection du "chaser" a pour objectif de pousser la solution test dans l'aquifère et de l'écartier de l'abord immédiat du forage afin qu'elle pénètre pleinement dans l'aquifère. Les injections sont réalisées au travers d'une perche perforée, aux extrémités de laquelle sont disposés des disques en caoutchouc qui limitent la dispersion du traceur dans la colonne d'eau du forage (Boisson et al. 2013).
- 2) Cette phase est suivie d'une phase de repos (resting time), au cours de laquelle le traceur réagit librement dans le milieu, diffuse, et est advecté par les flux ambients.
- 3) La troisième et dernière phase est la phase de pompage (pull), pendant laquelle la solution test, mélangée à l'eau de l'aquifère, est extraite de l'aquifère. C'est pendant cette phase que l'on mesure au cours du temps les concentrations en traceurs réactifs et conservatifs, afin d'obtenir la courbe de restitution que nous étudierons.



### Push-pull test

Figure 3.1: Dispositif expérimental pour les expériences de push-pull. L'expérience comporte trois phases: 1) L'injection (Push) 2) Temps de repos (resting time) 3) Extraction (Pull)

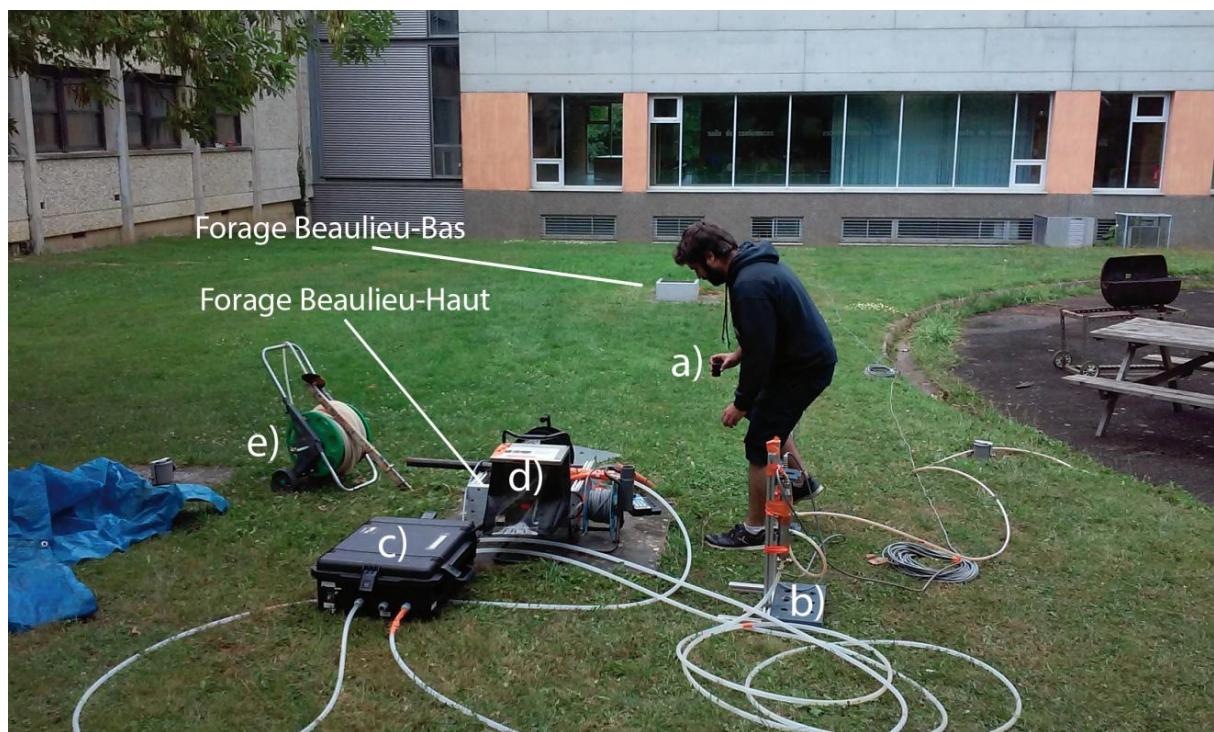


Figure 3.2: Dorian Putigny, stagiaire de Master 2, s'apprête à prélever un échantillon lors d'une expérience de push-pull dans le forage Beaulieu-Haut. a) Flacon d'échantillonnage b) Fluorimètres c) Valise de mesure du débit d) Contrôleur de pompe e) Perche d'injection (pour la phase de "Push")

## 2.2.b) Traçages puits-à-puits (Well-to-well tracer tests)

Lors des expériences de traçage puits-à-puits, les phases d'injection et de pompage sont simultanées et la solution test suit un chemin d'écoulement contraint par le pompage. La solution test est injectée dans le forage Beaulieu-haut puis récupérée dans le forage Beaulieu-Bas. Les mesures sont effectuées au cours de l'expérience sur la solution (mélange eau de l'aquifère-solution test) extraite du puits de pompage. Le dispositif utilisé pour les expériences puits-à-puits est illustré par la figure 3.3. La solution test est injectée à 26m, au niveau de la fracture qui connecte les deux forages.

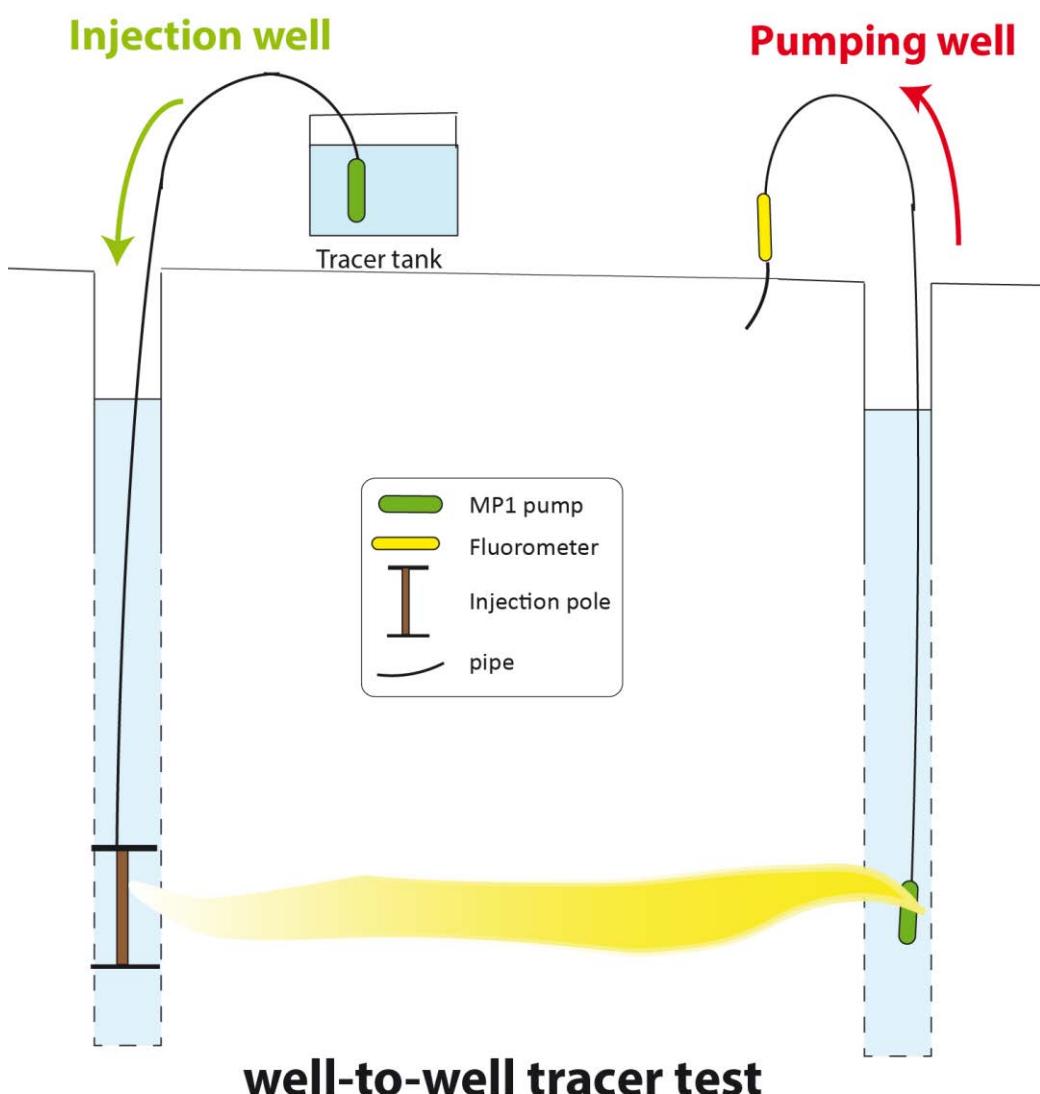


Figure 3.3: Dispositif expérimental pour les expériences de traçage puits-à-puits entre les puits Beaulieu-Haut et Beaulieu-Bas distants de 10m.

Les paramètres relatifs à chacune des expériences réalisées sont synthétisés dans le tableau ci-dessous:

Méthode	Short q Push-Pull 1	Long Q Push-Pull 2	Short Q Push-Pull 3	puits à puits Janvier 2017	puits à puits Nov 2015
Traceur réactif	FDA	FDA	FDA	FDA	FDA
Traceur conservatif	FDA+FMA+U	FDA+FMA+U	FDA+FMA+U	Rhodamine G Hélium	Hélium
Resting time	14h51	34h21	16h22	-	-
Pumping rate (L/min)	3,6	10,9	10,6	5.5	21.8
Débit d'injection -solution test (L/min)	7.4	4.8	5	-	-
Débit d'injection - chaser (L/min)	5.4	2.4	5	-	-
Volume injecté - solution test (L)	98	105	98	100	78L
[FDA] à l'injection (mol/L)	3.80E-05	3.50E-05	3.80E-05	1.60E-04	1.50E-03
Date de l'expérience	27/07/16- 29/07/16	30/07/16- 04/08/16	09/08/16- 10/08/16	09/01/17- 16/01/17	25/11/2015- 27/11/15
Taux restitution (%)	12	42	24	24 (S) 35 (He)	66

Tableau 3.1: Récapitulatif des paramètres propres à chacune des expériences de traçage

## 2.3 Interprétations des résultats

De la même manière que pour les expériences en laboratoire présentés dans le chapitre 2, nous utilisons l'évolution de l'avancement de la réaction de dégradation de la FDA en fluorescéine pour estimer l'activité microbienne globale de l'aquifère investigué. L'avancement de la réaction est déduit des courbes de restitution des traceurs réactifs et conservatifs.

Nous faisons l'hypothèse que les traceurs réactifs (FDA) et conservatifs (Rhodamine G ou Hélium) sont transportés de la même manière pendant les expériences. Dès lors, il est possible d'estimer la dilution du traceur réactif à partir de la courbe de restitution du traceur conservatif. Le coefficient de dilution est donné par le rapport entre la concentration initiale du traceur conservatif dans la cuve d'injection et sa concentration restituée à un temps t :

$$dilution(t) = \frac{[Conservatif]_0}{[Conservatif](t)}. \quad (3.1)$$

L'avancement de la réaction est alors obtenu par la relation suivante:

$$Av(t) = \frac{U(t)}{FDA_0} \times dilution \quad (3.2)$$

Dans le cas des push-pull tests où il n'y a pas de traceur conservatif à proprement parler, le taux de dilution est obtenu en faisant réagir tout le substrat (FDA et FMA) encore présent dans les échantillons prélevés et en mesurant la concentration résultante en fluorescéine. L'avancement est obtenu simplement par la relation:

$$Av(t) = \frac{U(t)}{[U+FDA+FMA](t)} \quad (3.3)$$

## 2.4 Modélisation des expériences

Afin d'interpréter les résultats obtenus lors des expériences de traçage, nous avons modélisé les courbes d'avancement de la réaction en fonction du temps. Les modèles sont basés sur les expériences de calibration avec les solutions enzymatiques d'endo-1,4- $\beta$ -Xylanase présentées dans le chapitre 2. A l'aide du modèle développé dans ce chapitre (section "Modélisation de la cinétique réactionnelle", Chapitre 2), les courbes moyennes de chaque concentration enzymatiques (présentées figure 2.8 chapitre 2) ont été modélisées. Les résultats du chapitre 2 montrent que les constantes de réaction de dégradation de la FDA en fluorescéine sont proportionnelles à la concentration enzymatique des solutions testées. Nous avons donc pu extrapoler les modèles obtenus pour une concentration enzymatique à des concentrations comprises entre 0 et 0,2 g.L<sup>-1</sup>. Nous avons ainsi obtenu plusieurs matrices de valeurs d'avancement en fonction du temps et de la concentration E (une pour chaque concentration: 0,001; 0,002; 0,005, 0,01; 0,02; 0,04; 0,1; 0,2 g.L<sup>-1</sup>). A partir de ces huit matrices, une matrice moyenne a été calculée, elle est représentée figure 2.4. C'est à partir de celle-ci que nous avons réalisé les modèles présentés ci-après (figure 2.5 et 2.6). (Chaque colonne de la matrice correspondant à l'avancement en fonction du temps pour une concentration donnée).

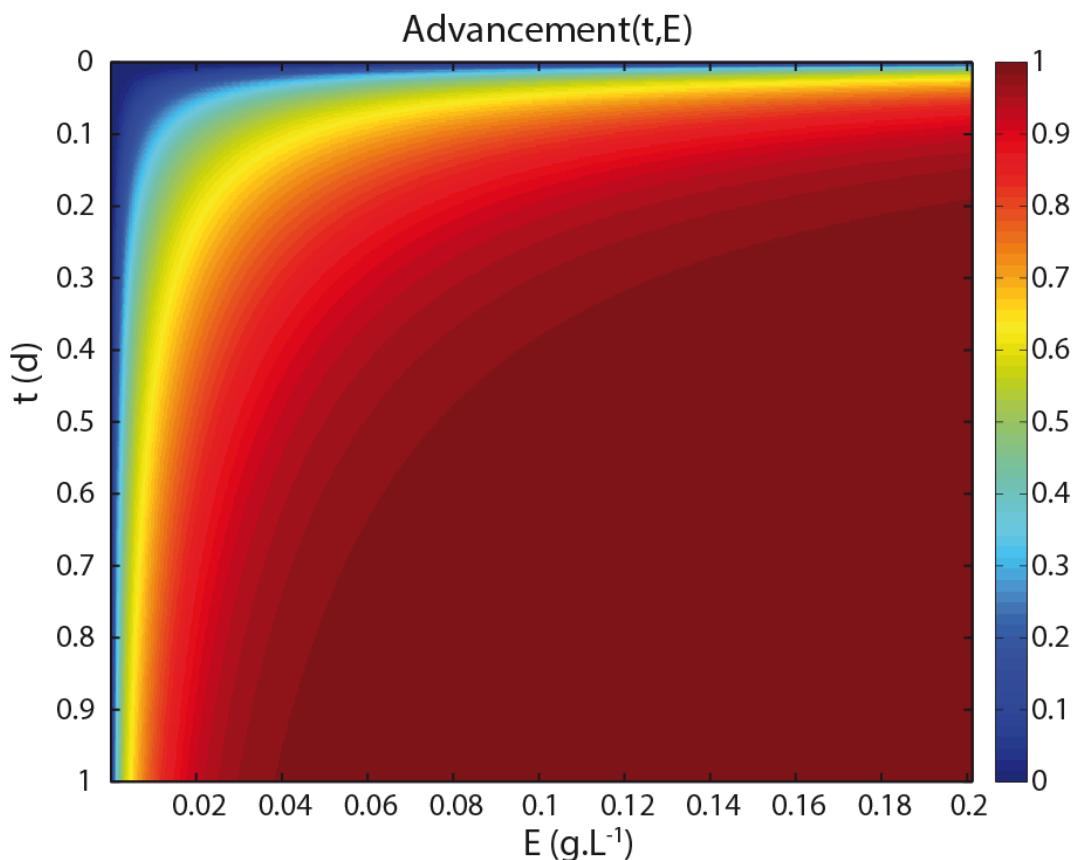


Figure 2.4: Modélisation de l'avancement de la réaction de dégradation de la FDA par les enzymes modèles (chapitre 2) en fonction du temps et de la concentration enzymatique.

## 3- Résultats

### 3.1. Push-Pull tests

Les courbes de restitution des différents push-pull tests sont présentés figure 2.5 a.1, a.2 et a.3. Les courbes vertes et rouges représentent les concentrations en fluorescéine au cours du temps, mesurées respectivement avec le fluorimètre (toutes les 10 secondes, mesures *in situ*) et le spectrophotomètre (échantillonnage manuel, mesures effectuées au laboratoire directement après le prélèvement). Les courbes noires représentent le traceur conservatif (mesuré par spectrophotométrie, après avoir fait réagir totalement, par l'ajout d'enzyme, la FDA et la FMA présentes dans les échantillons prélevés). Les traceurs conservatifs présentent l'évolution classiquement attendue des courbes de restitution d'un traceur conservatif lors d'un traçage hydrogéologique: la présence d'un pic de concentration suivi d'une phase où la concentration diminue de plus en plus lentement (la queue de restitution). Pour chacune de ces trois expériences, on remarque qu'au cours du temps l'écart entre les concentrations du traceur conservatif (FDA ayant réagi + FDA n'ayant pas réagi) et du produit de la réaction (FDA ayant réagi) diminue. Ceci implique que la proportion de FDA ayant réagi augmente au cours du temps. Cet effet est visible en observant l'évolution de l'avancement de la réaction (proportion de FDA transformée en fluorescéine) représenté figures 2.5 b.1, b.2, b.3. On observe, pour les trois expériences de push-pulls, une augmentation de l'avancement de la réaction dans le temps et donc, une augmentation de la proportion relative de fluorescéine par rapport à la FDA.

Pour chacune des expériences, nous avons modélisé l'avancement de la réaction grâce au modèle développé dans le chapitre 2. La courbe noire, correspond à la meilleure approximation obtenue, les courbes saumon et bleues, à la plus haute et à la plus basse approximation. La première expérience de push-pull (figure 2.5 1.b) est représentée au plus près par le modèle correspondant à une concentration enzymatique en xylanase de  $7.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, elle est encadré par le bas par la courbe correspondant à l'activité de  $6.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> et par le haut par la courbe  $[E]= 1.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>. Pour la deuxième expérience (figure 2.5 2.b), le meilleur ajustement est obtenu pour  $[E]= 8.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, encadré par les courbes  $[E]= 5.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> et  $[E]= 1,7.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>. La troisième expérience est également bien ajustée avec la courbe  $[E]= 8.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, encadrée par le bas par la courbe  $[E]= 4.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> et par le haut par  $[E]= 1,9.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>.

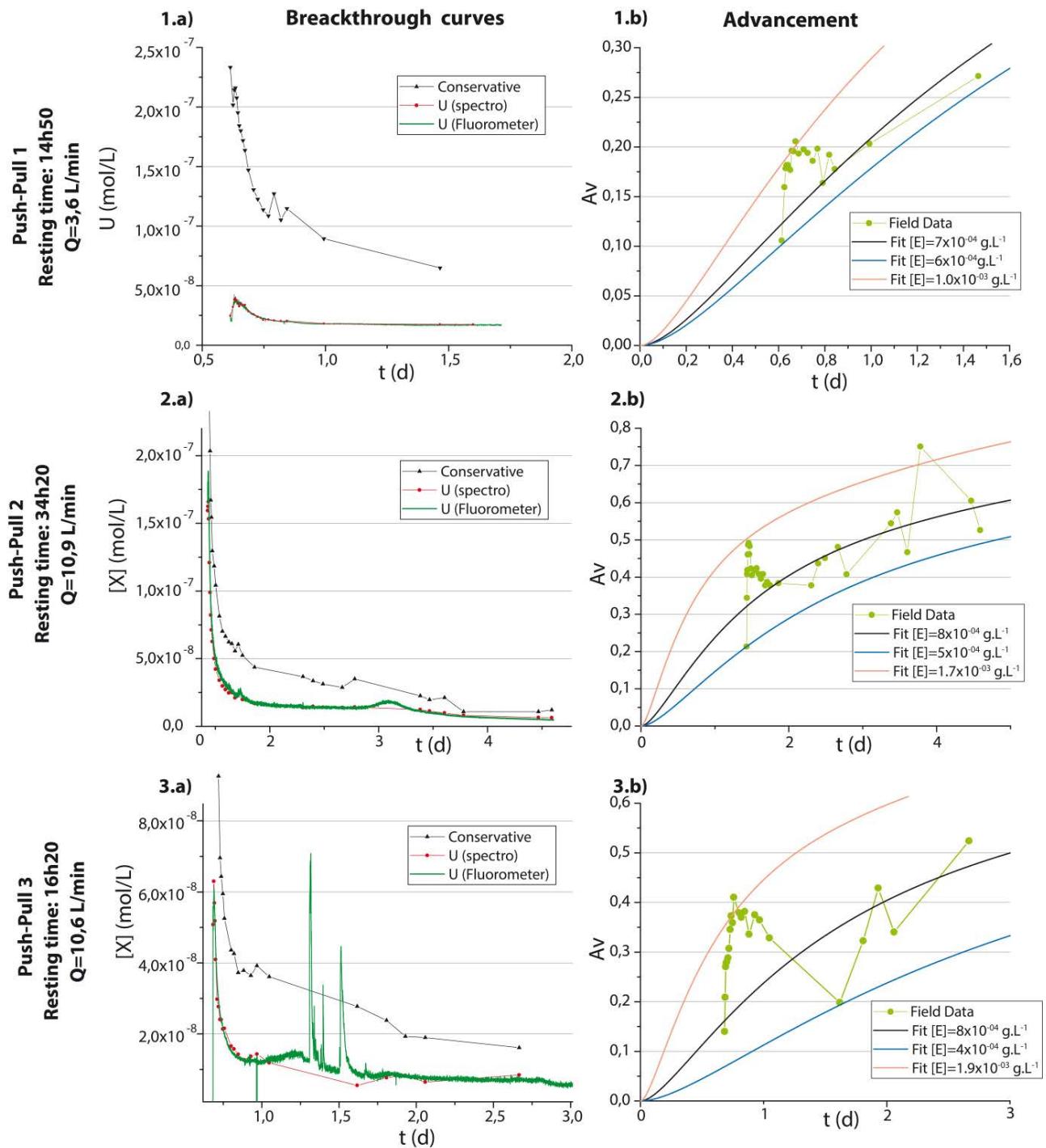


Figure 2.5: Courbe de restitution et d'avancement de la réaction des tests Push-Pull réactifs à la FDA.  
a) Courbe de restitution des traceurs conservatif (noires) et réactifs (vertes-fluorimètre, rouges-spectrophotomètre)  
b) Evolution de l'avancement au cours de la réaction: données de terrain (vert), Meilleur ajustement (noire), ajustement maximum (saumon) et minimum (bleu). L'origine des temps ( $t=0$ ) correspond au début de l'injection dans la solution test dans le milieu (qui intervient directement après l'injection de la solution de FDA dans la cuve d'injection).

### 3.2 Tests de traçage puits-à-puits

La figure 2.6 présente les résultats des tests de traçage de puits-à-puits effectués entre les forages Beaulieu-Haut et Beaulieu-Bas. La figure 2.6 1.a présente les courbes de restitution obtenues pour le traçage puits-à-puits de janvier 2017, effectué avec pour traceur conservatif, la sulforhodamine G et l'hélium (qui n'est pas présenté ici). La courbe d'évolution de la concentration en sulforhodamine G (noire) présente la forme caractéristique d'une courbe de restitution de traceur conservatif. La courbe du traceur réactif (en vert sur la figure 2.6 1.a) est très bruitée, et présente des baisses brutales de concentration. Ces diminutions sont dues à un encrassement des fluorimètres par des dépôts d'oxydes de fer venant perturber la détection de la fluorescéine, et qui rendent les mesures difficilement interprétables au-delà de quelques heures de mesures. Les "sauts" visibles correspondent au nettoyage de la cellule de mesure du fluorimètre. Nous pouvons considérer la mesure immédiatement après le nettoyage comme étant juste. Ce problème d'encrassement du fluorimètre pourrait avoir eu un impact lors du traçage puits-à-puits de 2015 (figure 2.6 b). Cependant, les 3 push-pulls réalisés au mois d'août en sont exempts, comme en témoigne la bonne corrélation entre les mesures du fluorimètre (*in situ*) et du spectrophotomètre (laboratoire) (voir figure 2.5 a)). La figure 2.6 1.b représente l'avancement de la réaction au cours du temps. Le début de la courbe, avant que l'encrassement du fluorimètre ne vienne perturber les mesures, est très bien représenté par le modèle  $[E] = 7.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Pour un temps de réaction plus avancé, les mesures sont en deçà de ce que prévoit ce modèle. Toutefois étant donné la difficulté à obtenir des mesures continues, il est difficile d'interpréter la fin de ce traçage.

La figure 2.6.b présente les résultats du traçage puits-à-puits effectué en novembre 2015 avec l'hélium comme traceur conservatif. La courbe de restitution de l'hélium figure 2.6.2.a), est caractéristique d'une courbe de restitution d'un traceur conservatif, mais présente toutefois, entre  $t=0,9$  et  $t=1,1$  jour, une légère augmentation de la concentration en hélium, alors que celle-ci est censée diminuer. La courbe de restitution de la fluorescéine est très bruitée et présente des discontinuités. Alors qu'une tendance globale à la hausse est observée entre l'arrivée du traceur et  $t=0,9$  jour, on observe une diminution entre  $t=0,9$  et 1,1 jour (corrélée à l'augmentation de la concentration en hélium), suivi d'une phase de stagnation (entre  $t=1,1$  et 1,3 jour). En raison d'un problème technique, les données n'ont malheureusement pas pu être recueillies entre 1,3 et 1,6 jour. Lorsque les mesures ont repris, la concentration était considérablement supérieure ( $3,75.10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$  à  $t=1,3$  jour, et  $1,5.10^{-8}$  à  $t=1,6$  jour). L'avancement de la réaction (figure 2.6 2.b) suit la même évolution que la courbe de concentration en fluorescéine. Il est bien représenté par le modèle  $[E]=4.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  depuis l'arrivée du traceur à  $t=0,9$  jour et s'en écarte entre 0,9 et 1,3 jour. L'avancement mesuré entre 1,1 et 1,3 jour est très légèrement supérieur aux mesures d'échantillon "blanc" (sans enzyme ni microorganisme) et témoigne donc d'une activité très faible. A la reprise des mesures à  $t=1,6$  jour, l'avancement mesuré est de nouveau proche de celui attendu par le modèle  $[E]=4.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .

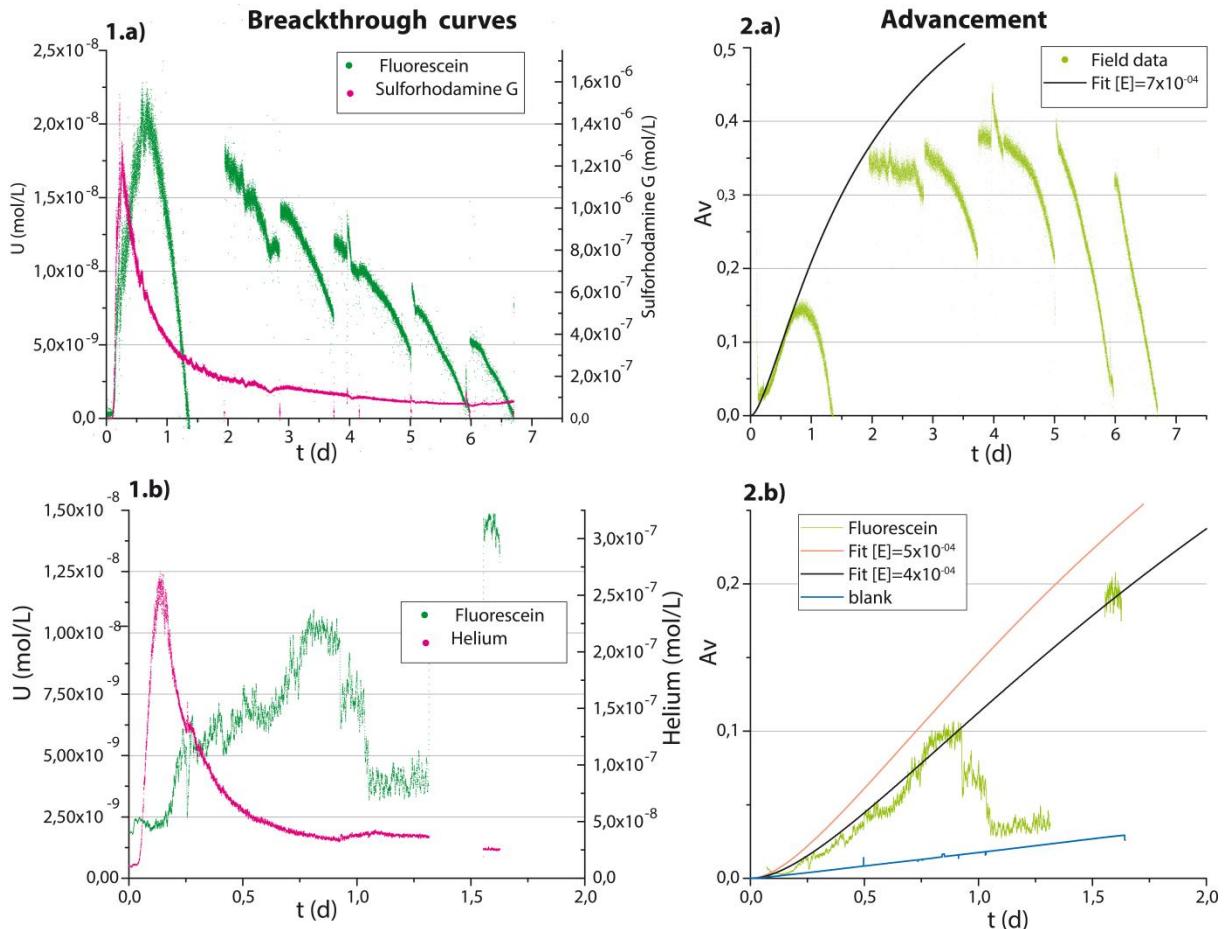


Figure 2.6: Courbe de restitution et d'avancement de la réaction des tests traçage puits-à-puits à la FDA. 1: Traçage de janvier 2017 a) Courbe de restitution de la sulforhodamine G (noir) et de la fluorescéine (vert) 2: Traçage de Novembre 2015 a) Courbe de restitution de l'hélium (mauve) et de la fluorescéine (vert) b) Evolution de l'avancement au cours de la réaction: données de terrain (vert), meilleur ajustement (noir), ajustement maximum (saumon) et minimum (bleu)

## 4- Discussion

### 4.1 Analyse générale des résultats

D'une manière générale, nous constatons que les résultats obtenus pour les différentes expériences de traçage sont relativement cohérents, indifféremment de la méthode employée (push-pull ou puits-à-puits, de la durée du temps de repos, ou de la vitesse de pompage (voir figure 2.7). Pour chacune des expériences réalisées, les meilleurs ajustements sont obtenus pour les modèles  $[E] = 7 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  (Push-pull 1),  $[E] = 8 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  (Push-pull 2),  $[E] = 8 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  -Push-pull 3),  $[E] = 7 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  (puits-à-puits 2017),  $[E] = 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  (Puits-à-puits 2015). Ces valeurs sont remarquablement proches malgré les incertitudes liées aux mesures et les conditions très différentes dans lesquelles les différentes séries d'expériences ont été réalisées. Toutefois, ces résultats sont à prendre avec précaution puisque les gammes de concentration enzymatiques obtenues sont proches de la limite inférieure correspondant aux tests en laboratoire avec des enzymes (chapitre 2). La reproductibilité des différentes expériences de traçage laisse cependant penser que, moyennant une calibration plus précise pour les activités faibles, il sera possible d'augmenter considérablement la précision de la méthode.

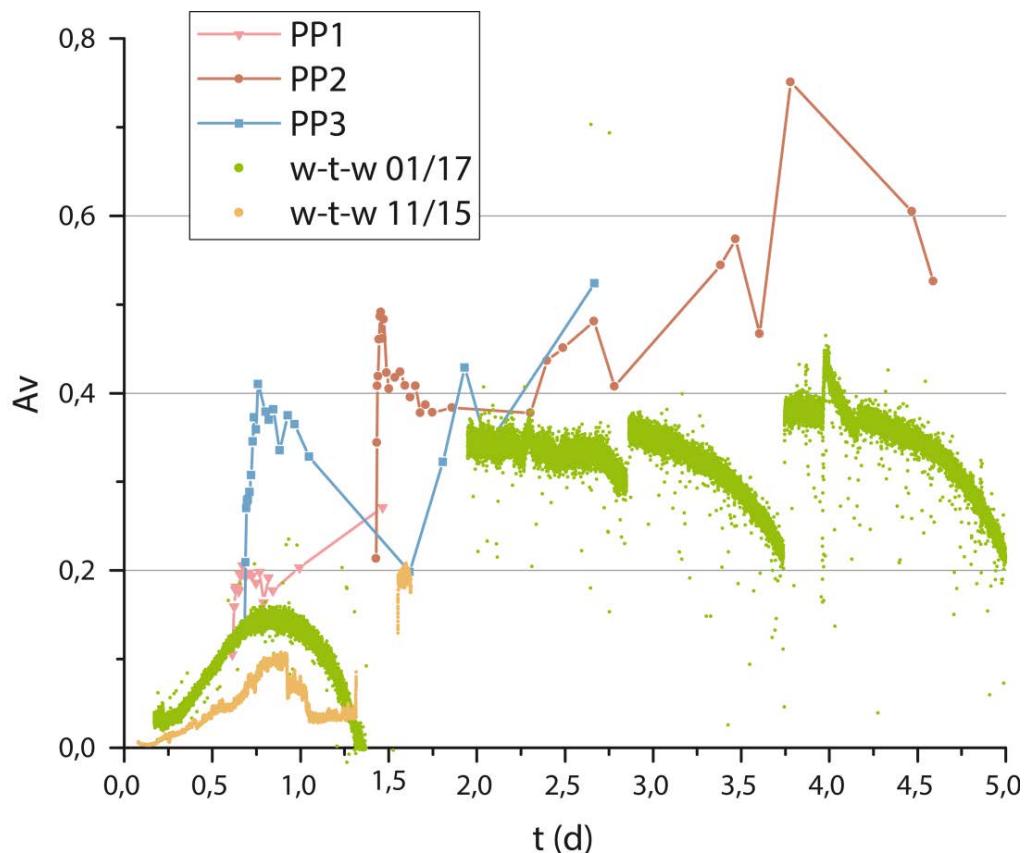


Figure 2.7: Avancement en fonction du temps des 5 traçages réactifs à la FDA

## 4.2 Influence de la vitesse d'écoulement sur le taux de dilution et l'avancement de la réaction

Les trois push-pull réalisés possèdent des débits d'injection et de pompage différents. Des débits (d'injection et de pompage) plus élevés entraînent des taux de dilution plus importants (voir figure 2.7). Toutefois, ces différences entre conditions d'injection et de pompage ne semblent pas avoir d'effet majeur sur l'activité mesurée, puisque les courbes d'avancement pour chacun de ces push-pull sont approchées par le même modèle. Cela est cohérent avec le fait que la cinétique de dégradation de la FDA est indépendante de la concentration en FDA initiale (chapitre 2, figure 2.7). Ainsi, l'avancement de la réaction ne dépendrait pas de la distribution de la FDA dans le milieu. Les expériences réalisées dans des conditions d'injection et de pompage différentes pourront donc être comparées.

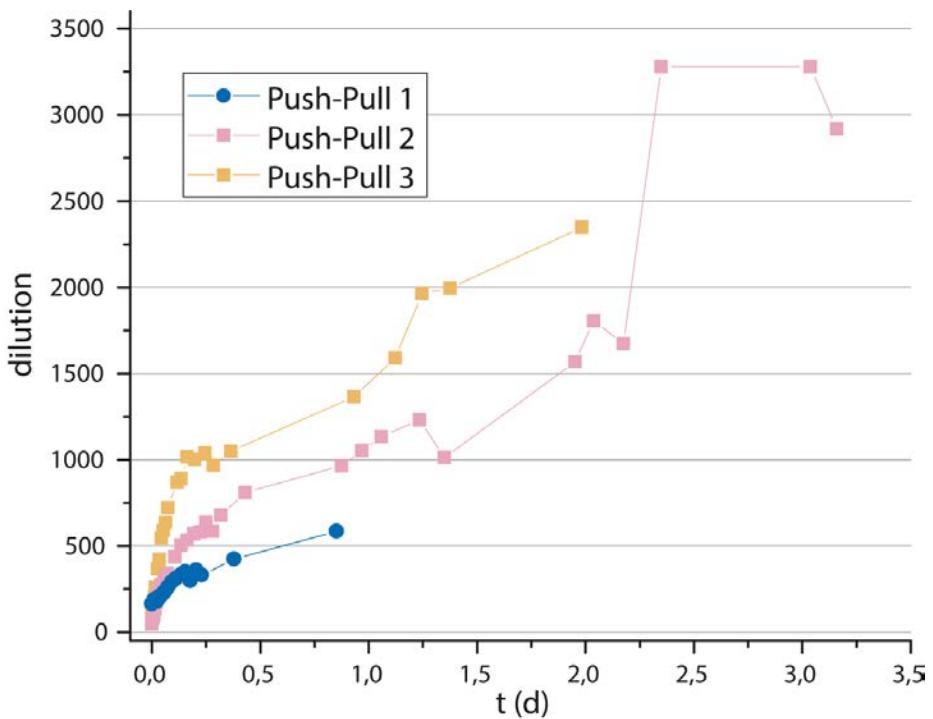


Figure 2.7: Dépendance de la dilution de la FDA aux conditions d'injection et de pompage. Push-pull 1:  $Q_{inj-tracer}=7,4 \text{ L}.\text{min}^{-1}$   $Q_{inj-chaser}=5,4 \text{ L}.\text{min}^{-1}$   $Q_{pump}=3,6 \text{ L}.\text{min}^{-1}$ ; Push-pull 2:  $Q_{inj-tracer}=4,8 \text{ L}.\text{min}^{-1}$   $Q_{inj-chaser}=2,4 \text{ L}.\text{min}^{-1}$   $Q_{pump}=10,9 \text{ L}.\text{min}^{-1}$ ; Push-pull 3:  $Q_{inj-tracer}=5 \text{ L}.\text{min}^{-1}$   $Q_{inj-chaser}=5 \text{ L}.\text{min}^{-1}$   $Q_{pump}=10,6 \text{ L}.\text{min}^{-1}$ ;

### 4.3 Influence du traceur conservatif

Lors de ces différentes expériences nous avons utilisé différents traceurs conservatifs, et donc différentes manières de mesurer la dilution. Pour calculer l'avancement de la réaction à partir de la concentration du produit de réaction (fluorescéine) nous avons besoin d'une mesure de la dilution de la FDA dans le milieu. Nous faisons donc l'hypothèse que la dilution du traceur réactif (la FDA) est égale à celle du traceur conservatif.

Pour les expériences de push-pull, nous n'avons pas injecté de traceur conservatif à proprement parler, puisque la dilution est mesurée en faisant réagir totalement l'ensemble du traceur réactif (FDA et FMA) contenu dans les échantillons prélevés. Ainsi, la dilution mesurée est la dilution réelle de la FDA.

Pour les expériences de traçage puits-à-puits, deux traceurs conservatifs ont été utilisés: l'hélium et la rhodamine G. Lors du traçage de 2017, les deux traceurs ont été utilisés simultanément. Lorsque l'on compare les courbes de restitution de ces deux traceurs conservatifs (figure 2.8 a), on observe des différences importantes, la dilution devient même difficilement mesurable après un temps long ( $t > 3$  jours) pour l'hélium (voir figure 2.8 b).

Ces différences entraînent d'importants biais dans le calcul de l'avancement de la réaction. Dans un premier temps ( $t < 3$  jours) l'avancement calculé à partir de l'hélium est sous-estimé par rapport à celui calculé à l'aide de la sulforhodamine G. Dans un second temps ( $t < 3$  jours) il est fortement surestimé (voir figure 2.8 c). Ces différences peuvent être expliquées par la différence entre les coefficients de diffusion des différents éléments. La sulforhodamine G et la fluorescéine possèdent des coefficients de diffusion similaires, de  $4.14 \times 10^{-6}$  et  $4.25 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  respectivement. Cependant le coefficient de diffusion de l'hélium est de  $6.28 \times 10^{-5}$ , soit plus d'un ordre de grandeur en-dessous de celui de la fluorescéine. L'hypothèse de travail (à savoir que la dilution du traceur réactif est égale à celle du traceur conservatif), ne serait donc pas valide pour l'hélium car les coefficients de diffusion des molécules réactives et conservatives sont différents.

L'hélium ne semble donc pas être un traceur conservatif adapté pour suivre la réaction de la FDA au cours d'une expérience de traçage. Ces observations remettent donc en cause les résultats obtenus pour l'expérience de novembre 2015. Toutefois l'expérience de novembre a été réalisée à un débit 4 fois supérieur à celle de janvier 2017 (environ  $21.8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  contre  $5.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Lorsque la vitesse de pompage est augmentée, l'influence de la diffusion du traceur conservatif devient moins importante, comme en témoigne la forme de la courbe de restitution de l'hélium pour le traçage puits-à-puits de 2015, en comparaison à celle de 2017 (voir figure 2.6 b). De plus, la figure 2.8 c) suggère que l'estimation de l'avancement de la réaction en utilisant l'hélium comme traceur conservatif tend à sous-estimer l'avancement. Cette observation peut expliquer l'estimation de l'activité microbienne plus faible ( $[E] = 4.10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) pour le traçage de novembre 2015, par rapport aux estimations réalisées avec les autres expériences de traçages (qui donnent des activités globales équivalentes à des concentrations enzymatiques de  $7.10^{-4}$  et  $8.10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

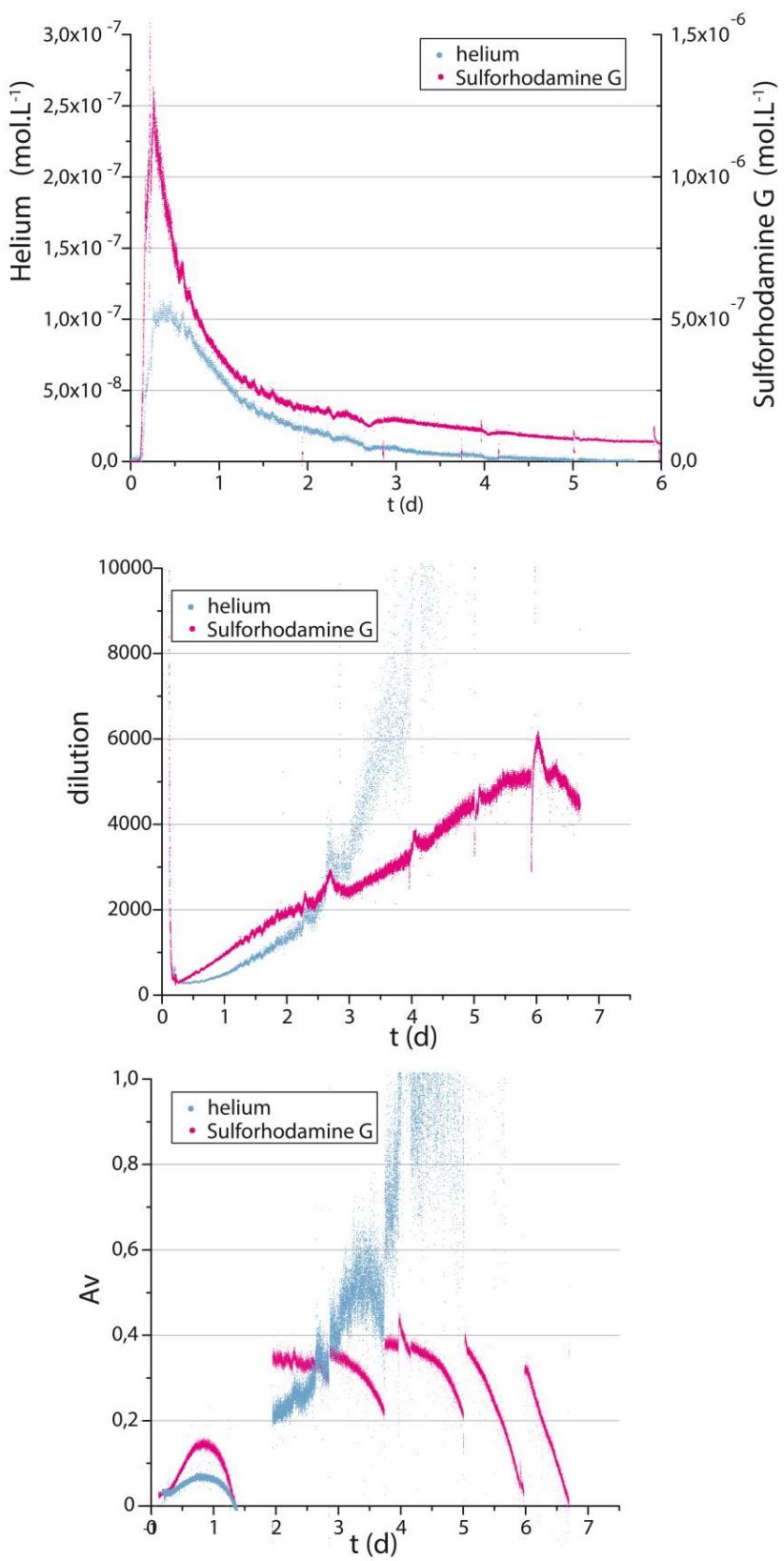


Figure 2.8: Comparaison entre Sulforhodamine G et Hélium et conséquences sur le calcul de l'avancement utilisés pour le traçage puits à puits de 2017 a) Courbe de restitution des deux traceurs conservatifs b) Comparaison des taux de dilution mesurés pour chacun des traceurs c) Comparaison des avancements calculés avec les deux traceurs

#### 4.4 Influence des conditions physico-chimiques

Au cours des traçages puits-à-puits, la concentration en oxygène a été mesurée. Ces mesures ont été motivées par le fait que nous savions que des bactéries ferrooxydantes étaient présentes dans l'aquifère de Beaulieu (Annexe 3.2), et que l'activité de ces bactéries est dépendante de la concentration en oxygène (Anderson et al. 2006) (voir chapitre 1).

Nous constatons tout d'abord, qu'entre ces deux expériences, la concentration moyenne en oxygène est différente. Elle se situe autour de  $0,6\text{-}0,8 \text{ mg.L}^{-1}$  en janvier 2017, et entre  $0,14$  et  $0,20 \text{ mg.L}^{-1}$  pour l'expérience de novembre 2015 (voir figure 2.9). Bien qu'une mesure continue de la concentration en oxygène n'ait pas été mise en place pour les expériences de push-pull, des mesures ponctuelles ont donné une concentration en oxygène de  $0,7\text{-}0,8 \text{ mg.L}^{-1}$  durant cette période. Cette différence pourrait expliquer que l'activité mesurée lors de l'expérience de janvier 2017 (et de push-pull en août 2016) soit supérieure à celle de novembre 2015.

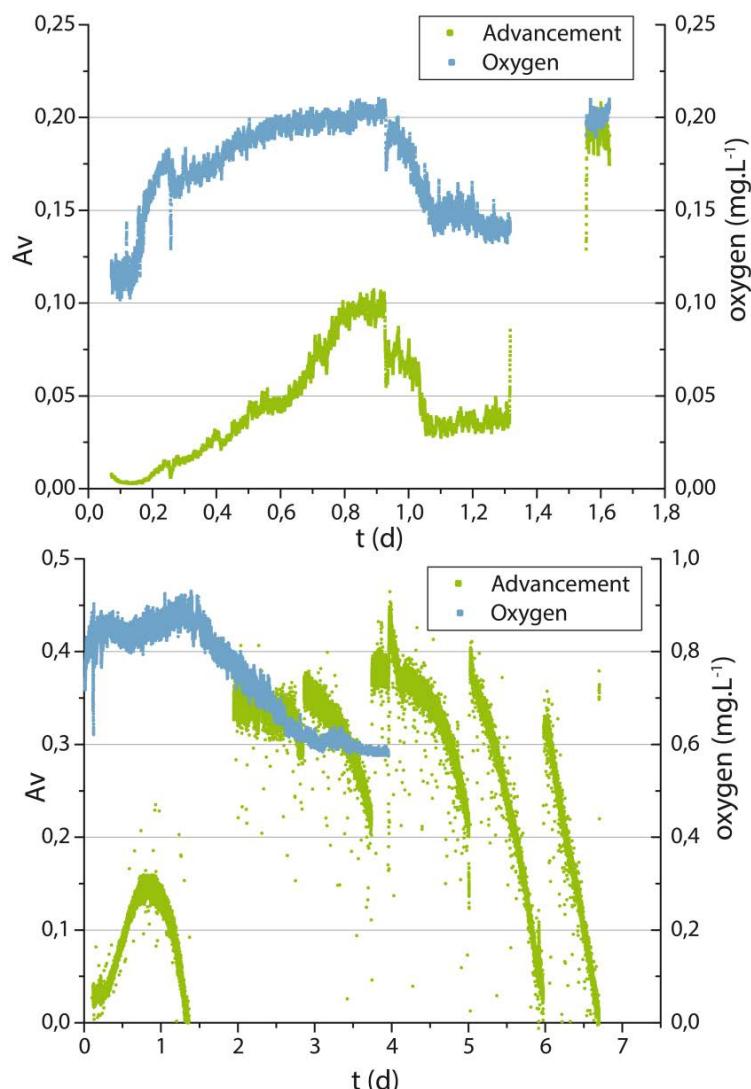


Figure 2.9: Evolution conjointe de la concentration en oxygène et de l'avancement de la réaction pour les expériences de traçage puits-à-puits de a) novembre 2015 et b) janvier 2017.

L'évolution de la concentration en oxygène au cours d'une même expérience, montre des discontinuités (voir figure 2.9). En effet, en janvier 2017, la concentration en oxygène diminue à partir de 1,3 jour. Cette diminution semble associée (bien que la courbe soit difficilement interprétable) à une baisse de l'activité mesurée (le signal mesuré étant en-deçà du modèle choisi pour approcher le début de l'expérience (voir figure 2.9). Le même phénomène est observé sur l'expérience de novembre 2015. On constate, après un jour de pompage, une diminution de la concentration en oxygène associée à une diminution de l'avancement de la réaction (Nous remarquons également des "anomalies" sur la concentration en hélium qui augmente à ce même moment de l'expérience). Lorsque les mesures reprennent, après un trou dans les données dû à des problèmes techniques, la concentration en oxygène est égale à celle mesurée au début de l'expérience, l'avancement de la réaction se situe quant à lui dans la gamme de valeurs prévues par le modèle ajusté sur la première partie de la courbe (voir figure 2.6). Ces observations laissent penser qu'au cours de ces expériences, des eaux aux propriétés différentes sont mobilisées. Elles suggèrent donc une hétérogénéité spatiale dans les propriétés physico-bio-chimiques de l'aquifère.

Les hétérogénéités spatiales pourraient également expliquer les profils des courbes de l'avancement des tests de push-pull. On observe en effet, pour les 3 expériences, un avancement supérieur à celui prévu par le modèle (courbes noires) au début de la restitution du traceur (voir figure 2.5). Cet effet pourrait être expliqué par une augmentation locale de l'activité aux abords du forage, zone de mélange potentiellement propice au développement microbien. En effet, lors d'un test de push-pull, la solution restituée aux temps courts, est majoritairement constitué de l'eau restée proche du puits. Toutefois d'autres hypothèses pourraient être avancées. Pour ces expériences de push-pull, nous n'avons pas mis en place de "bullage", chargé d'empêcher l'oxygénation de la solution test (constituée de l'eau de l'aquifère, faiblement concentrée en oxygène dissous) par contact avec l'atmosphère. Ainsi, il est probable que la concentration en oxygène dissous dans la solution test introduite en fin d'injection était supérieure à celle introduite au début de l'injection. Lors d'un test de push-pull, l'eau restituée aux temps courts étant majoritairement celle qui a été injectée tardivement (Istok 2013), il est possible que le pic d'avancement observé au début de l'injection soit dû à une augmentation de l'activité microbienne liée à cette injection d'oxygène.

## 5- Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les premières expériences de mesure de l'activité microbienne *in situ* dans les eaux souterraines, avec pour "smart tracer" la Fluorescéine DiAcétate (FDA). Cette méthode est relativement facile à mettre en œuvre et peut être réalisée à haute résolution temporelle, contrairement aux tests de traçage classiques qui requièrent un échantillonnage manuel de l'eau pour analyse au laboratoire. Cinq expériences de traçage (dont trois tests de push-pull et deux traçages puits-à-puits), ont été effectuées sur un même site, situé sur le campus de Beaulieu. Pour ces cinq expériences, les activités microbiennes mesurées sont globalement similaires. La mesure de l'activité microbienne par traçage réactif à la FDA est donc reproductible, et les résultats peu dépendants de la méthode de traçage et des conditions d'injection et de pompage. Les modèles qui approchent le mieux nos données expérimentales correspondent à des concentrations équivalentes en enzymes xylanase de  $7 \times 10^{-4}$  g.L<sup>-1</sup> (Push-pull 1),  $8 \times 10^{-4}$  g.L<sup>-1</sup> (Push-pull 2),  $8 \times 10^{-4}$  g.L<sup>-1</sup> (Push-pull 3),  $4 \times 10^{-4}$  g.L<sup>-1</sup> (Puits-à-puits 2015) et  $7 \times 10^{-4}$  (Puits-à-puits 2017). Les faibles variations observées, entre les différentes expériences peuvent être imputables à différents facteurs. Tout d'abord, elles peuvent être du ressort de la méthode de mesure de l'activité microbienne FDA en elle-même. Les incertitudes exposées lors de l'analyse des données de laboratoire (dans le chapitre 2) sont pour certaines également valables sur le terrain (variabilité de la proportion entre les deux stéréoisomères de la FDA, perturbations du milieu par l'ajout de carbone organique). Elles peuvent également s'expliquer par une distribution hétérogène des propriétés physico-bio-chimiques dans l'aquifère (hétérogénéité spatiale et/ou temporelle).

Cette méthode est prometteuse car elle peut-être mise en place relativement facilement et permet, à l'aide d'un simple spectrophotomètre, de mesurer l'avancement de la dégradation de la FDA en fluorescéine, à partir de laquelle il est possible d'estimer l'activité microbienne globale au sein de l'aquifère. L'usage d'un fluorimètre capable de mesurer simultanément la concentration deux traceurs (fluorescéine et sulforhodamine G par exemple) permet de mesurer cet avancement au cours d'un traçage avec une très bonne résolution temporelle.

## 6- Perspectives

Les expériences présentées ici constituent le point de départ de nombreuses expériences qui pourraient être réalisée à l'avenir. Nous avons développé notre méthode sur un seul et même site. Il serait à l'avenir intéressant de reproduire ces expériences sur différents sites, afin de pouvoir comparer les activités microbiennes estimées dans différents environnements. De plus, il a été montré que la mesure de l'activité microbienne par la FDA était possible par la méthode de traçage du push-pull, ainsi, la variabilité spatiale sur un même site contenant plusieurs forages pourrait être testée. La variabilité saisonnière de l'activité microbienne pourrait également être mesurée par cette méthode, en reproduisant les expériences sur un même site à différentes périodes de l'année. Afin de mieux interpréter les résultats obtenus, il serait intéressant de coupler ces traçages à la FDA à des méthodes de caractérisation microbiologie (comptage, séquençage...).

Afin de valider la méthode développée, il serait intéressant de la confronter à d'autres méthodes de mesure de l'activité. Le raz-rue ne peut être utilisé pour mesurer l'activité dans les eaux souterraine aux propriétés trop réductrices, cependant les deux traceurs pourraient être comparés dans d'autres environnements. La FDA pourrait ainsi être utilisée dans divers milieux aquatiques (rivières, zone hyporhéiques, étangs, océans...).

Nous pourrions également utiliser la FDA dans le cadre d'expériences de traçages réactifs visant à mesurer les capacités de biodégradation spécifique dans les aquifères. Par exemple, pour étudier la dénitritification dans les eaux souterraines, un traçage réactif peut être réalisé en injectant dans le milieu une solution test contenant des nitrates. Il serait envisageable d'ajouter de la FDA à la solution test et de mesurer l'activité microbienne au cours d'une telle expérience. L'analyse des résultats, comparée à l'activité mesurée sans injection de nitrate, pourrait permettre d'estimer l'impact de l'injection des nitrates sur l'activité microbienne. D'une manière générale, ce protocole pourrait être utilisé pour mesurer la l'impact de la biodégradation stimulée par l'ajout de composés quelconques, par exemple dans le cadre d'opération de remédiation des sites contaminés.

Des traçages FDA pourraient également être menés conjointement avec des mesures hydrogéophysiques, telles que le radar en forage (voir annexe 4), pour visualiser la distribution spatiale du traceur lors des expériences et ainsi apporter de nouvelles contraintes sur la distribution spatiale de la réactivité.

## Déroulement de la thèse et conclusion générale

L'objectif premier de ce travail de thèse a été de développer les méthodes de push-pull pour mieux caractériser les processus de mélange et la réactivité qui peut y être liée. Cependant, il est apparu rapidement que le développement d'une mesure de l'activité microbienne était particulièrement nécessaire. Nous avons donc mené un travail général qui a porté tout d'abord sur le développement d'un traceur réactif via des expérimentations contrôlées et le test de solutions naturelles en laboratoire. En parallèle, nous avons mis au point les méthodes de push-pull et nous les avons appliquées en utilisant le traceur développé. Bien que cela ne transparaisse pas dans la rédaction de la thèse, la mise au point du traceur a nécessité un long travail d'expérimentation et la levée de nombreux verrous (dissolution du traceur, mis en place d'un dispositif efficient et adapté à notre problématique, choix des eaux, conditionnement des expériences...) qui ont nécessité de nombreux essais. De même, la réalisation des expériences sur le terrain ont également demandé beaucoup de développements techniques (mis en place des dispositifs de terrain, dissolution et injection des traceurs, calibration des fluorimètres...). L'un des aspects importants de ce travail réside ainsi dans la complémentarité entre le travail de laboratoire et l'expérimentation de terrain.

La découverte du « hot spot de Guidel » nous a semblé un analogue extrêmement intéressant du concept de mélange et de réactivité biogéochimique qui en résulte. Pour mener à bien les analyses de ce système, plusieurs campagnes ont été nécessaires. Dans un premier temps, nous avons travaillé en isolant non pas chaque fracture une à une, mais en isolant progressivement celles du haut et en progressant vers le bas. Les résultats de cette première campagne ont principalement servi à dimensionner la seconde campagne de caractérisation. Ces deux campagnes ont nécessité d'importantes ressources humaines et matérielles pour assurer le suivi hydrologique, les prélèvements et le suivi des paramètres hydrochimiques, les prélèvements et le traitement sur le terrain pour la microbiologie ainsi que les mesures diagraphiques.

Cette analyse du biofilm de Guidel a permis de faire là encore un lien complet entre le travail de laboratoire, le terrain et a permis d'aller jusqu'à la modélisation du système. Les réactions et l'analyse génomique ont été reproduites en laboratoire, ce qui nous a permis d'accéder à une finesse d'analyse des Gallionellaceae allant jusqu'à la découverte de nouvelles espèces et l'analyse de leur répartition dans le forage. Le vaste ensemble de données de terrain a permis de mener une analyse détaillée du système de hot spot de Guidel. Les circulations hydrologiques et leur lien avec les structures géologiques d'une part et les conditions hydrogéologiques ont pu être investiguées via les données de terrain et le modèle. Nous avons ainsi pu mener à travers ce travail une véritable caractérisation des processus de mélange dans le milieu naturel qui complète le travail réalisé pour se doter d'outils permettant d'analyser la réactivité via des expériences de traçage.

## Références

- Abbott, B.W. et al., 2016. Using multi-tracer inference to move beyond single-catchment ecohydrology. *Earth Science Reviews*, Accepted, pp.19–42. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.earscirev.2016.06.014>.
- Adam, G. & Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. , 33.
- Anderson, C.R. et al., 2006. In situ ecological development of a bacteriogenic iron oxide-producing microbial community from a subsurface granitic rock environment. *Geobiology*, 4(1), pp.29–42.
- Anzo, K., Harada, M. & Okada, T., 2013. Enhanced kinetics of pseudo first-order hydrolysis in liquid phase coexistent with ice. *Journal of Physical Chemistry A*, 117(41), pp.10619–10625.
- Ayotte, J.D. et al., 2011. Effects of human-induced alteration of groundwater flow on concentrations of naturally-occurring trace elements at water-supply wells. *Applied Geochemistry*, 26(5), pp.747–762. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088329271100045X>.
- Baldwin, B.R. et al., 2008. Multilevel samplers as microcosms to assess microbial response to biostimulation. *Ground water*, 46(2), pp.295–304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18194316>.
- Barker, J.P., Patrick, G.C. & Major, D., 1987. Natural attenuation of aromatic hydrocarbons in a shallow sand aquifer. *Ground Water Monitoring & ...*, pp.64–71. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-6592.1987.tb01063.x/abstract>.
- Bastin, E.S. et al., 1926. The Presence of Sulphate Reducing Bacteria in Oil Field Waters. *Source: Science, New Series*, 63(1618), pp.21–24.
- Battin, T.J., 1997. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms. *Science of The Total Environment*, 198(1), pp.51–60. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969797054417>.
- Battin, T.J., 1997. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms. *Science of The Total Environment*, 198(1), pp.51–60. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969797054417>.
- Bayani Cardenas, M., 2015. Hyporheic zone hydrologic science: A historical account of its emergence and a prospectus. *Water Resources Research*, 51(5), pp.3601–3616.
- Bedner, E., Melamed, M.R. & Darzynkiewicz, Z., 1998. Enzyme kinetic reactions and fluorochrome uptake rates measured in individual cells by laser scanning cytometry. *Cytometry*, 33(1), pp.1–9.
- Bernard, P., 1994. Les Zones Humides - Rapport d'évaluation. , p.396.
- Boano, F. et al., 2014. Hyporheic flow and transport processes: Mechanisms, models, and biogeochemical implications. *Reviews of Geophysics*, pp.1–77.
- Bochet et al, 2017. Fractures sustain dynamic microbial hot spots in the subsurface, submitted to

- Boisson, a. et al., 2013. Reaction chain modeling of denitrification reactions during a push-pull test. *Journal of Contaminant Hydrology*, 148, pp.1–11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconhyd.2013.02.006>.
- Bonnet, E. et al., 2001. Scaling of fractures in geological media , (2001), pp.347–383.
- Bour, O. & Davy, P., 1997. Fault Length Distribution. *Water Resources*, 33(7), pp.1567–1583.
- Breeuwer, P. et al., 1995. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), pp.1614–1619.
- Brune, A., Frenzel, P. & Cypionka, H., 2000. Life at the oxic - anoxic interface : microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, pp.691–710.
- Brunius, G., 1980. Technical aspects of the use of 3',6'-diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria. *Current Microbiology: An International Journal*, 4(6), pp.321–323.
- Cercek, L. & Cercek, B., 1972. Studies on the Structuredness of Cytoplasm and Rates of Enzymatic Hydrolysis in Growing Yeast Cells. , 22.
- Chapelle, F., 2001. Ground-Water Microbiology and Geochemistry. , p.477. Available at: <https://books.google.com/books?id=6q1zJVKegCsC&pgis=1>.
- Chapelle, F.H., 2000. The significance of microbial processes in hydrogeology and geochemistry. *Hydrogeology Journal*, 8, pp.41–46.
- Chapelle, F.H. & Bradley, P.M., 1996. Measuring rates of biodegradation in a contaminated aquifer using field and laboratory methods. *Ground water*, 34(4). Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-6584.1996.tb02057.x/full>.
- Chatton, E. et al., 2017. Field Continuous Measurement of Dissolved Gases with a CF-MIMS: Applications to the Physics and Biogeochemistry of Groundwater Flow. *Environmental science & technology*, 51(2), pp.846–854.
- Chrzanowski, T.H. et al., 1984a. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. *Microbial ecology*, 10(2), pp.179–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24221097>.
- Cullimore, 2000. Microbiology of Well Biofouling.pdf.
- Cullimore, R., 2007. Practical Manual of Groundwater Microbiology.
- Dentz, M. et al., 2011. Mixing, spreading and reaction in heterogeneous media: a brief review. *Journal of contaminant hydrology*, 120–121, pp.1–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20561710> [Accessed September 4, 2014].
- Drever & McKee, 1980. The push-pull test - a method of evaluating formation adsorption parameters for predicting the environmental effects on in-situ coal gasification and uranium recovery.
- Drever & McKee, 1980. Drever and McKee 1980; The push-pull test; a method of evaluating formation adsorption parameters for predicting the environmental effects on in-situ coal gasification and uranium recovery.pdf.

Swisher & Carroll, 2016. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as an Estimator of Microbial Biomass on Coniferous Needle Surfaces, Published by : Springer Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/4250620> Accessed : 17-08-2016 01 : 18 . , 6(3), pp.217–226.

Ehrlich, 1982. Degradation of phenolic contaminants in groundwater by anaerobic bacteria: St. Louis Park, Minnesota.

Eshghi, H., Mirzaie, N. & Asoodeh, A., 2011. Synthesis of fluorescein aromatic esters in the presence of P 2O5/SiO<sub>2</sub> as catalyst and their hydrolysis studies in the presence of lipase. *Dyes and Pigments*, 89(2), pp.120–126. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2010.09.013>.

Federle, T.W. et al., 1986. Microbial biomass, activity, and community structure in subsurface soils. *Ground Water*, 24(3), pp.365–374.

Field, J. a. et al., 2000. Effect of cation exchange on surfactant-enhanced solubilization of trichloroethene. *Journal of Contaminant Hydrology*, 46(1–2), pp.131–149. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169772200001157>.

Flury, M. & Wai, 2003. Dyes as tracers for vadose zone hydrology. *Reviews of Geophysics*, 41.

Fontvieille, D.A., Outaguerouine, A. & Thevenot, D.R., 1992. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludges. *Environmental Technology*, 13(6), pp.531–540. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/09593339209385181>.

Freeze, R.A., Cherry, J.A., 1979. *Groundwater*

Frei, S. et al., 2012. Surface micro-topography causes hot spots of biogeochemical activity in wetland systems: A virtual modeling experiment. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 117(4), pp.1–18.

Garnier, 2012. Contribution à l'évaluation biogéochimique des impacts liés à l'exploitation géothermique des aquifères superficiels : Expérimentations et simulations à l'échelle d'un pilote et d'installations réelles.

Gaspar, M.L. et al., 2001. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of fungal biomass in soil. *Current Microbiology*, 42(5), pp.339–344.

Ge, F.Y. et al., 2007. Synthesis and study on hydrolytic properties of fluorescein esters. *Dyes and Pigments*, 72(3), pp.322–326.

Ghiorse, W.C., 1997. Subterranean Life. , 275(February), pp.789–790.

Gillham, R.W., Starr, R.C. & Miller, D.J., 1990. A Device for In Situ Determination of Geochemical Transport Parameters 2. Biochemical Reactions. *Groundwater*, 28(6), pp.858–862.

González-pinzón, R. et al., 2015. A field comparison of multiple techniques to quantify groundwater – surface-water interactions. *Freshwater Science*, 34(August 2014), pp.139–160.

González-Pinzón, R., Haggerty, R. & Myrold, D.D., 2012. Measuring aerobic respiration in stream ecosystems using the resazurin-resorufin system. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 117(3), pp.1–10.

Green, V.S., Stott, D.E. & Diack, M., 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(4), pp.693–701.

- Green, V.S., Stott, D.E. & Diack, M., 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(4), pp.693–701.
- Griebler, C. et al., 2002. Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an in situ sediment exposure microcosm. *Aquatic Microbial Ecology*, 28(2), pp.117–129.
- Guilbault, G.G. & Kramer, D.N., 1964. Fluorometric determination of lipase, acylase, alpha-and-gamma-chymotrypsin and inhibitors of these enzymes. *Journal of Analytical Chemistry*, 36(2), pp.409–412.
- Gumprecht, R., Geriach, H. & Nehrkorn, A., 1995. FDA hydrolysis and resazurin reduction as a measure of microbial activity in sediments from the south-east Atlantic. , 199, pp.189–199.
- Hagedorn, F., 2010. Hot spots and hot moments for greenhouse gas emissions from soils. *Sites The Journal Of 20Th Century Contemporary French Studies*, (1), pp.9–14.
- Haggerty, R. et al., 2009. Resazurin as a “smart” tracer for quantifying metabolically active transient storage in stream ecosystems. *Journal of Geophysical Research*, 114(G3), p.G03014. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1029/2008JG000942>.
- Haggerty, R., Argerich, A. & Martí, E., 2010. Development of a “smart” tracer for the assessment of microbiological activity and sediment-water interaction in natural waters: The resazurin-resorufin system. *Water Resources Research*, 46(4), pp.1–10.
- Haggerty, R., Argerich, A. & Martí, E., 2008. Development of a “smart” tracer for the assessment of microbiological activity and sediment-water interaction in natural waters: The resazurin-resorufin system. *Water Resources Research*, 44(4), p.n/a–n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1029/2007WR006670>.
- Hanniba-Friedrich & Sernetz, 1979. Journal of Solid-Phase Biochemistry, Vol. 3, No. 4, 1978. , 3(4), pp.301–321.
- Haveman, S.A. & Pedersen, K., 1999. Distribution and Metabolic Diversity of Microorganisms in Deep Igneous Rock Aquifers of Finland. *Geomicrobiology Journal*, 16(4), pp.277–294.
- Heim, C. et al., 2015. Assessing the utility of trace and rare earth elements as biosignatures in microbial iron oxyhydroxides. *Frontiers in Earth Science*, 3(February), pp.1–15. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/feart.2015.00006/abstract>.
- Hofmann, J. & Sernetz, M., 1983. A kinetic study on the enzymatic hydrolysis of fluoresceindiacetate and Fluorescein di beta D Galactopyranoside. *Analytical Biochemistry*, 131, p.180–186.
- Hubbard, S. and Linde, N. (2011). Hydrogeophysics, in s. uhlenbrook (ed.) , ch. 2.15, elsevier. Treatise on Water, 2:402–434.
- Hurst, 2010. Environmental Microbiology. *Environmental Microbiology*, p.363.
- Inagaki, F. et al., 2015. Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor. *Science*, 349(6246), pp.420–424.
- Istok, J.D., 2013. *Push-Pull Tests for Site Characterisation*
- Istok, J.D. et al., 1997. Single-well, “Push-Pull” Test for In Situ Determination of Microbial Activities. *Ground Water*, 35, pp.619–631.

- Jiang, X.W. et al., 2010. Simultaneous rejuvenation and aging of groundwater in basins due to depth-decaying hydraulic conductivity and porosity. *Geophysical Research Letters*, 37, pp.1–5.
- Jochem, F.J., 1999. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate. *Marine Biology*, 135(4), pp.721–728.
- Johnston, C., Detenbeck, N. & Niemi, G., 1990. The cumulative effect of wetlands on stream water quality and quantity. A landscape approach. *Biogeochemistry*, 10(2), pp.105–141.
- Jørgensen, P.E., Eriksen, T. & Jensen, B.K., 1992. Estimation of viable biomass in wastewater and activated sludge by determination of ATP, oxygen utilization rate and FDA hydrolysis. *Water Research*, 26(11), pp.1495–1501.
- József Tóth, 1999. Groundwater as a geologic agent: An overview of the causes, processes, and manifestations. *Hydrogeology Journal*, 7(1), pp.1–14.
- Kallmeyer, J. et al., 2012. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), pp.16213–16216. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1203849109>.
- Kang, P. et al., 2015. Impact of velocity correlation and distribution on transport in fractured media: Field evidence and theoretical model. *Water Resources Research RESEARCH*, pp.940–959.
- Kitanidis, K. & McCarty, P.L., 2012. *Delivery and Mixing in the Subsurface* P. K. Kitanidis & P. L. McCarty, eds., New York, NY: Springer New York. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-2239-6>.
- Kleikemper, J. et al., 2002. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), pp.1516–1523.
- Klepikova, M. V. et al., 2011. A methodology for using borehole temperature-depth profiles under ambient, single and cross-borehole pumping conditions to estimate fracture hydraulic properties. *Journal of Hydrology*, 407(1–4), pp.145–152. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhydrol.2011.07.018>.
- Korbel, K. et al., 2017. Wells provide a distorted view of life in the aquifer: implications for sampling, monitoring and assessment of groundwater ecosystems. *Scientific Reports*, 7(December 2016), p.40702. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep40702>.
- Korom, S.F. et al., 2005. In situ mesocosms: Denitrification in the Elk Valley aquifer. *Ground Water Monitoring & Remediation*, 25(1), pp.79–89. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-6592.2005.0003.x>.
- Köster, M. et al., 1997. Microbiological studies along a gradient of eutrophication in a shallow coastal inlet in the southern Baltic Sea (Nordrügensche Bodden). *Marine Ecology Progress Series*, 152, pp.27–39. Available at: <http://www.int-res.com/abstracts/meps/v152/p27-39/> <http://www.int-res.com/articles/meps/152/m152p027.pdf>.
- Lemke, D. et al., 2013. On-line fluorometry of multiple reactive and conservative tracers in streams. *Environmental Earth Sciences*, 69(2), pp.349–358.
- Lerner, D.N. & Teutsch, G., 1995. Hydrology Recommendations for level-determined sampling in wells. *Journal of Hydrology*, 171(2), pp.355–377.

- Li, L., Peters, C.A. & Celia, M.A., 2007. Effects of mineral spatial distribution on reaction rates in porous media. *Water Resources Research*, 43.
- Lichtner, P.C. & Kang, Q., 2007. Upscaling pore-scale reactive transport equations using a multiscale continuum formulation. In *Water Resources Research*.
- Long, P.E. et al., 2016. Microbial Metagenomics Reveals Climate-Relevant Subsurface Biogeochemical Processes. *Trends in Microbiology*, 24(8), pp.600–610.
- MacIntyre, W.G. et al., 1993. Degradation kinetics of aromatic organic solutes introduced into a heterogeneous aquifer. *Water Resources Research*, 29(12), pp.4045–4051.
- Malin-Berdel, J. & Valet, G., 1980. Flow cytometric determination of esterase and phosphatase activities and kinetics in hematopoietic cells with fluorogenic substrates. *Cytometry*, 1(3), pp.222–228.
- McAllister & Chiang, 1994. A Practical Approach to Evaluating Natural Attenuation of Contaminants in Ground Water.PDF.
- McClain, M.E. et al., 2003. Biogeochemical Hot Spots and Hot Moments at the Interface of Terrestrial and Aquatic Ecosystems. *Ecosystems*, 6(4), pp.301–312.
- McMahon, P.B., 2001. Aquifer/aquitard interfaces: Mixing zones that enhance biogeochemical reactions. *Hydrogeology Journal*, 9(1), pp.34–43.
- McMahon, P.B., Chapelle, F.H. & Bradley, P.M., 2011. Evolution of redox processes in groundwater. *ACS Symposium Series*, 1071(January), pp.581–597.
- Mcmahon, S. & Parnell, J., 2014. Weighing the deep continental biosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(1), pp.113–120.
- McNicholl, B.P., McGrath, J.W. & Quinn, J.P., 2007. Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management. *Water Research*, 41(1), pp.127–133.
- Medzon, E.L. & Brady, M.L., 1969. Direct measurement of acetylesterase in living protist cells. *Journal of Bacteriology*, 97(1), pp.402–415.
- Meile, C. & Tuncay, K., 2006. Scale dependence of reaction rates in porous media. *Advances in Water Resources*, 29, pp.62–71.
- Melton, E.D. et al., 2014. The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle. *Nature reviews. Microbiology*, 12(12), pp.797–809. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25329406>.
- Misstear, B., Banks, D. & Clark, L., 2006. *Water Wells and Boreholes (Google eBook)*, Available at: <http://books.google.com/books?id=DyppFa2PmYcC&pgis=1>.
- Nyyssönen, M. et al., 2012. Methanogenic and Sulphate-Reducing Microbial Communities in Deep Groundwater of Crystalline Rock Fractures in Olkiluoto, Finland. *Geomicrobiology Journal*, 29(10), pp.863–878. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490451.2011.635759>.
- Obst, U., 1985. Or [ g na | Papers Test Instructions for Measuring the Microbial Metabolic Activity in Water Samples, pp.166–168.

- Obst, U., Ag, S.M. & Mainz, D.-, 1988. BIOCHEMICAL TESTING OF GROUNDWATER. , 20(3), pp.101–107.
- P. Gombert, J.C., 2016. Toxicité et écotoxicité des principaux traceurs fluorescents employés en hydrogéologie et de leurs produits de dégradation. , 2(December).
- Peacock, a D. et al., 2004. Utilization of microbial biofilms as monitors of bioremediation. *Microbial ecology*, 47(3), pp.284–292. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14994174>.
- Pedersen, K., 2014. Microbial life in terrestrial hard rock environments. *Microbial Life of the Deep Biosphere*, pp.63–82. Available at: <http://www.degruyter.com/view/books/9783110300130/9783110300130.63/9783110300130.63.xml>.
- Peeters, E., Nelis, H.J. & Coenye, T., 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), pp.157–165. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701207003909>.
- Purkamo, L. et al., 2013. Dissecting the deep biosphere: Retrieving authentic microbial communities from packer-isolated deep crystalline bedrock fracture zones. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(2), pp.324–337.
- Radloff et al., 2012. Arsenic migration to deep groundwater in Bangladesh influenced by adsorption and water demand. , 477(7363), pp.211–215.
- Reusser, D.E. et al., 2002. In situ transformation of deuterated toluene and xylene to benzylsuccinic acid analogues in BTEX-contaminated aquifers. *Environmental science & technology*, 36(19), pp.4127–4134. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12380085>.
- Чейпеш., 2010. Л КИНЕТИКА ЩЕЛОЧНОГО ГИДРОЛИЗА ДИЛАУРИЛФЛУОРЕСЦЕИНА В ВОДНО-ЭТАНОЛЬНОЙ СМЕСИ И МИЦЕЛЛЯРНОМ РАСТВОРЕ ЦЕТИЛТРИМЕТИЛAMМОНИЙ БРОМИДА. *Electronic Publishing*, 23(46), pp.0–6.
- Rogers, G.S., 1917. Chemical relations of the oil field waters in San Joaquin Valley, California. , (653), p.119 p.
- Roques, C. et al., 2016. High-yielding aquifers in crystalline basement: insights about the role of fault zones, exemplified by Armorican Massif, France. *Hydrogeology Journal*, 24(8), pp.2157–2170. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10040-016-1451-6>.
- De Rosa, S., Sconza, F. & Volterra, L., 1998. Biofilm amount estimation by fluorescein diacetate. *Water Research*, 32(9), pp.2621–2626.
- Rotmant, B. & Papermaster, B.W., 1966. Membrane Properties of Living Mammalian Cells As Studied By Enzymatic Hydrolysis of Fluorogenic Esters\*. *Med. Res. Council, Spec. Rept. Ser. PROCEEDINGS PROCEEDINGS Am. J. Med*, 46(31), pp.368–1461.
- Sánchez-Monedero, M.A. et al., 2008. Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils. *Biology and Fertility of Soils*, 44(6), pp.885–890.
- Schnegg, P., 2002. An inexpensive field fluorometer for hydrogeological tracer tests with three tracers and turbidity measurement. *Groundwater and Human Development*, pp.1484–1488. Available at: <http://www-geol.unine.ch/GEOMAGNETISME/mardelp.pdf>.
- Schnegg, P. & Doucen, O. Le, 2006. Multispectral field fluorometer for tracer tests in waters of high

- natural fluorescence. *Karst, climate change and groundwater*. {...}, (1). Available at: <http://www.albillia.com/Files/Malaga2006.pdf>.
- Schnegg, P. & Kennedy, K., 1998. A new borehole fluorometer for double tracer tests. *Mass Transport in Fractured Aquifers and {...}*, pp.14–17. Available at: <http://www.albillia.com/Files/Copenhagen1998.pdf>.
- Schnurer, J. & Rosswall, T., 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), pp.1256–1261.
- Schroth, M.H. et al., 1998. Spatial variability in in situ aerobic respiration and denitrification rates in a petroleum-contaminated aquifer. *Ground Water*, 36(6), pp.924–937.
- Söderström, B.E., 1977. Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(1), pp.59–63.
- Sontag, W., 1977. A comparative kinetic study on the conversion of fluoresceindiacetate to fluorescein in living cells and in vitro. *Radiation and Environmental Biophysics*, 14(1), pp.1–12.
- Sorensen, J.P.R. et al., 2013. Using Boreholes as Windows into Groundwater Ecosystems. *PLoS ONE*, 8(7).
- Stegen, J.C. et al., 2016. Groundwater–surface water mixing shifts ecological assembly processes and stimulates organic carbon turnover. *Nature Communications*, 7, p.11237. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms11237>.
- Stubberfield & Shaw, 1990. A comparison of tetrazolium reduction and FDA\hydrolysis with other measures of microbial\activity. *Journal of Microbiological Methods*, 12, pp.151–162.
- Toth, J., 1999. Groundwater as a geologic agent: An overview of the causes, processes, and manifestations. *Hydrogeology Journal*, 7(1), pp.1–14.
- Thiruvenkatachari, R., Vigneswaran, S. & Naidu, R., 2008. Permeable reactive barrier for groundwater remediation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14(2), pp.145–156.
- Thuysbaert, J., 2012. The effect of osmotic stress and HSPI2 on passive and active transport in the yeast , p.177.
- Tomich, 1973. Single-Well Tracer Method To Measure Residual Oil Saturation. , pp.211–218.
- Toth, J., 1963. A Theoretical Analysis of Groundwater Flow in Small Drainage Basins '. *J.Geophys. Res.*, 68(16), pp.4785–4812.
- Trudell, M.R., Gillham, R.W. & Cherry, J.A., 1986. An in-situ study of the occurrence and rate of denitrification in a shallow unconfined sand aquifer. *Journal of Hydrology*, 83(3–4), pp.251–268.
- Urmann, K. et al., 2005. New Field Method: Gas Push–Pull Test for the In-Situ Quantification of Microbial Activities in the Vadose Zone. *Environmental Science & Technology*, 39(1), pp.304–310. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es0495720> [Accessed September 24, 2014].
- Watson, J. V, 1980. Enzyme kinetic studies in cell populations using fluorogenic substrates and flow cytometric techniques. *Cytometry*, 1(2), pp.143–151.
- Wilson, J.T. et al., 1983. Enumeration and Characterization of Bacteria Indigenous to a Shallow Water-Table Aquifer. *Groundwater*, 21(2), pp.134–142.

## Annexes

### Annexe 2.1: Preuve mathématique du lien entre k2-2 et la pente "b"

En Complément de la partie "**4- Modélisation de la cinétique réactionnelle**" **Chapitre 2**. Cette annexe donne la démonstration mathématique que la deuxième pente, dans un graphique représentant l'évolution de la vitesse d'apparition de la fluoroscéine en fonction de sa concentration, est égale à la constante k2-2 du modèle cinétique développé.

Soit la fonction  $F(t)$ , relation qui décrit l'évolution de la fluoroscéine ( $F$ ), en fonction du temps, (selon le modèle qui nous avons développé dans le chapitre 2):

$$\begin{aligned}[F]^t &= FDA^0 - FDA_1^0 \times \frac{k_{12}}{k_{12} - k_{11}} \times e^{-k_{11}t} - FDA_1^0 \times \frac{k_{11}}{k_{12} - k_{11}} \times e^{-k_{12}t} - FDA_2^0 \\ &\quad \times \frac{k_{22}}{k_{22} - k_{21}} \times e^{-k_{21}t} - FDA_2^0 \times \frac{k_{21}}{k_{22} - k_{21}} \times e^{-k_{22}t}\end{aligned}$$

et sa dérivée:

$$\begin{aligned}\frac{dF}{dt} &= FDA_1^0 \times \frac{k_{12} \cdot k_{11}}{k_{12} - k_{11}} \times e^{-k_{11}t} + FDA_1^0 \times \frac{k_{11} \cdot k_{12}}{k_{12} - k_{11}} \times e^{-k_{12}t} + FDA_2^0 \times \frac{k_{22} \cdot k_{21}}{k_{22} - k_{21}} \times e^{-k_{21}t} \\ &\quad + FDA_2^0 \times \frac{k_{21} \cdot k_{22}}{k_{22} - k_{21}} \times e^{-k_{22}t}\end{aligned}$$

que l'on peut écrire:

$$\begin{aligned}\frac{dF}{dt} &= f \times FDA^0 \times \frac{k_{12} \cdot k_{11}}{k_{12} - k_{11}} \times (e^{-k_{11}t} + e^{-k_{12}t}) + (1 - f) \times FDA^0 \\ &\quad \times \frac{k_{22} \cdot k_{21}}{k_{22} - k_{21}} \times (e^{-k_{21}t} + e^{-k_{22}t})\end{aligned}$$

Pour des temps longs, avec  $k_{11}, k_{12}$  et  $k_{21} > k_{22}$ ,

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} F^t = FDA^0 - (1 - f) \times FDA^0 \times \frac{k_{21}}{k_{22} - k_{21}} \times e^{-k_{22}t}$$

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} \frac{dF}{dt} = (1 - f) \times FDA^0 \times \frac{k_{22} \cdot k_{21}}{k_{22} - k_{21}} \times e^{-k_{22}t}$$

soit:

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} \frac{dF}{dt} = -k_{22} \times \lim_{t \rightarrow +\infty} F^t + k_{22} \times FDA^0$$

Ainsi, dans un graphe V(F), pour des temps longs (et donc des concentrations en fluoroscéine élevées), la courbe peut être approximée par une droite de coefficient d'équation  $y = -k_{22} \cdot x + k_{22} \cdot FDA^0$ . Il est ainsi possible d'estimer graphiquement la constante de réaction  $k_{2-2}$  (c'est-à-dire constante qui contrôle la réaction entre la FMA et la fluoroscéine pour le stéréoisomère 2 (ayant la constante de réaction la plus faible)).

Il est également possible de prouver mathématiquement ( $\lim dF/dt$  lorsque  $t \rightarrow 0$  avec développement du 1er ordre) que la tangente en zéro pour la courbe  $v(t)$  peut-être approxiée par la droite d'équation  $y = [FDA]_0 \times f \times k_{1-1} \times k_{1-2} \times t$

## Annexe 3.1: Calibration du fluorimètre pour la mesure simultanée des concentrations en fluorescéine et sulforhodamine G

Lors de l'expérience puits-à-puits de janvier 2017, nous avons choisi d'utiliser simultanément deux traceurs fluorescents. La sulforhodamine G, en tant que traceur réactif, et la fluorescéine, produit de dégradation de la Fluoresceine diacétate (FDA), traceur réactif. La sulforhodamine a été retenue car elle possède des spectres émission/excitation qui ne recoupent pas ceux de la fluorescéine (532/552 nm pour la sulforhodamine G et 480/525nm pour la fluoroscéine), ce qui permet de mesurer ces traceurs simultanément en limitant les interférences. De plus, la sulforhodamine G possède une toxicité limitée pour l'environnement (Gombert 2016).

Moyennant une calibration, la mesure de deux traceurs fluorescents est possible avec les fluorimètres de terrain GGUN, (Schnegg 2002). Le fluorimètre possède des lampes qui émettent aux longueurs d'onde d'absorption de la fluorescéine et de la rhodamine ainsi que deux cellules de détection qui réceptionnent la lumière aux longueurs d'émission de ces deux traceurs. Bien que les cellules de détection soient supposées propres à chacun des traceurs, la présence d'un autre traceur fluorescent affecte légèrement la mesure du premier. Il est cependant possible de déconvoluer le signal obtenu afin d'obtenir la concentration réelle en chacun des deux traceurs. Ces calibrations sont effectuées en créant des solutions aux concentrations de fluorescéine et de sulforhodamine connues et mesurées au laboratoire à l'aide du fluorimètre.

Le signal  $U$  mesurée (en millivolts, mV) par la cellule de détection de la fluorescéine peut s'écrire comme suit:  $U = a[U] + b[S]$  (1), où  $a$  et  $b$  sont des constantes et  $[U]$  et  $[S]$  les concentrations en fluoroscéine et rhodamine. Nous pouvons écrire la même relation pour  $S$ , signal détecté par la cellule de la sulforhodamine:  $S = c[S] + d[U]$  (2), où  $c$  et  $d$  sont des constantes. Ainsi, si pour une même concentration de sulforhodamine G, nous faisons varier la concentration de fluorescéine ( $[U]$ ) et que nous mesurons le signal  $U$ , il est possible de déduire " $a$ ". De la même manière, en gardant  $[U]$  constante et en faisant varier  $[S]$  nous obtenons " $b$ ". Avec la lampe  $S$ , nous obtiendrons " $c$ " en faisant varier  $[S]$  et en gardant  $[U]$  constante, et " $d$ " en faisant varier  $[U]$  et en gardant  $[S]$  constant. Les coefficients " $a$ ", " $b$ ", " $c$ " et " $d$ " sont données par les pentes dans des courbes de la figure suivante:

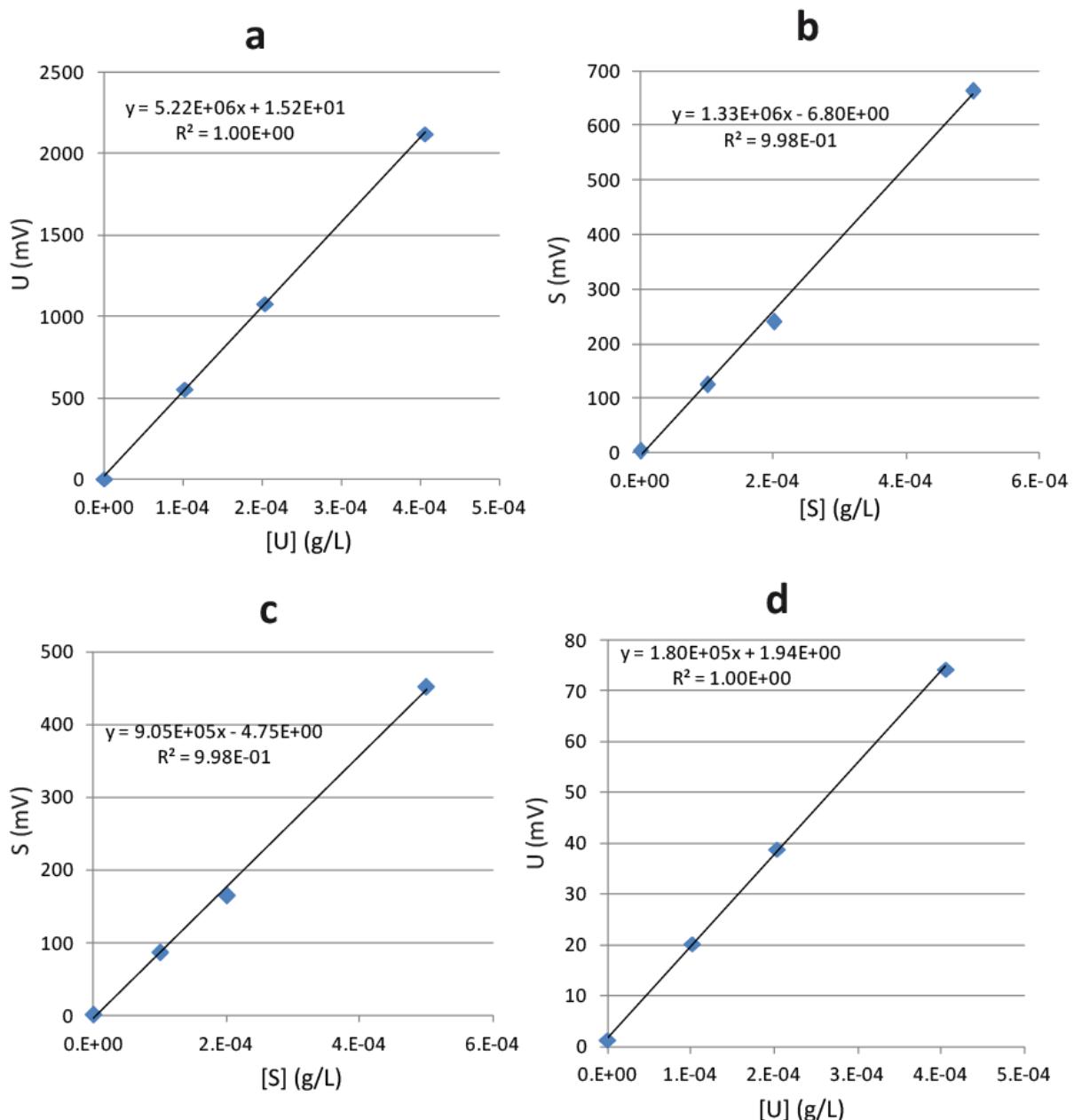


Figure A.3.1: Calibration des fluorimètre - Détermination des coefficients  $a, b, c$  et  $d$

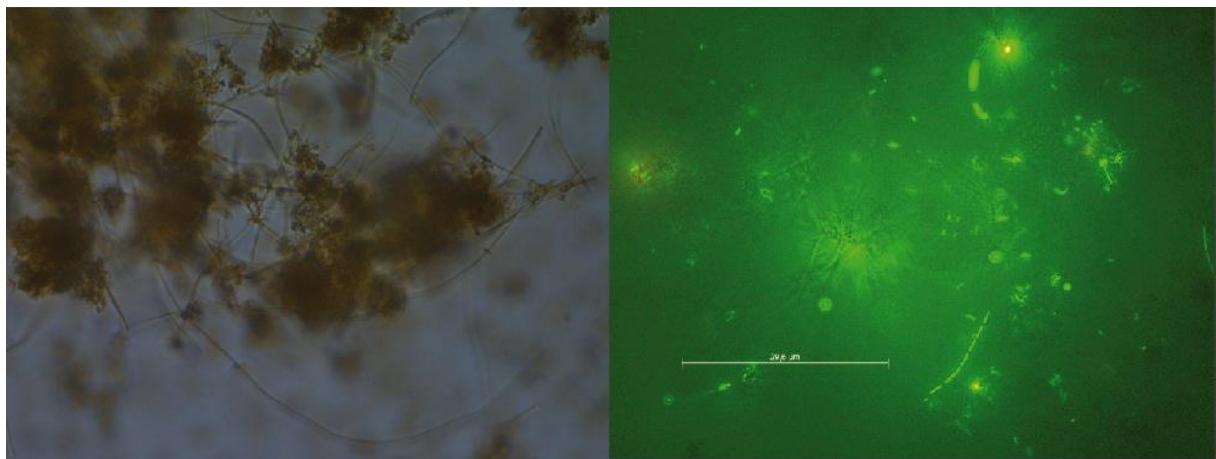
A partir des équations (1) et (2) et des pentes mesurées sur les figures ci-dessus (A.3.1), nous pouvons déduire les relations qui permettront de calculer les concentrations en fluorescéine  $[U]$  et en sulforhodamine G :

$$[U] = \frac{cU - bS}{ac - bd} \text{ et } [S] = \frac{aS - dU}{ac - bd},$$

où  $a = 5,22 \times 10^{-6}$ ,  $b = 1,33 \times 10^{-6}$ ,  $c = 9,05 \times 10^{-6}$  et  $d = 1,80 \times 10^{-5}$ .

## **Annexe 3.2: Bactéries ferroxydantes dans l'eau des forages de Beaulieu**

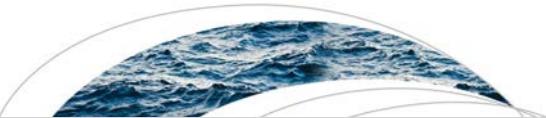
Lors des expériences de traçages réalisées sur le campus de Beaulieu, la formation d'un tapis de couleur rouille a été observée à la sortie du tuyau d'évacuation d'eau. Ces tapis sont typiques de la présence de bactéries ferro-oxydantes (chapitre 1). Au microscope à contraste de phase, des structures caractéristiques (gaines et pédoncules) ont été observés, elles viennent confirmer la présence de ces bactéries. Sur la photo de droite, l'usage du SYBR Green permet de mettre en évidence les bactéries alignées à l'intérieur des gaines.



*Figure A.3.2: Images microscopiques des biofilms formés dans l'eau de Beaulieu*

## **Annexe 4: Article "Hydrogeophysical characterization of transport processes in fractured rock by combining push-pull and single hole ground penetrating radar experiments"**

Nous présentons ci-dessous les résultats d'une campagne de traçage push-pull sur le site de Ploemeur menée en collaboration avec une équipe de l'Université de Lausanne. Ces travaux sont complémentaires aux traçages réactifs présentés dans le chapitre 3, le suivi par radar du déplacement du traceur permet en effet d'évaluer *in situ* la dispersion du traceur. Un couplage de cette méthode hydrogéophysique avec des traçages réactifs de type FDA pourrait permettre à terme d'évaluer l'exposition du traceur à des surfaces réactives. Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans Water Resources Research, dont je suis co-auteur.



## Water Resources Research

### RESEARCH ARTICLE

10.1002/2015WR017837

#### Key Points:

- Combined single-hole GPR and push-pull tracer tests help to infer transport phenomena
- Transport length scales are estimated through GPR difference imaging
- GPR inform on tracer velocity, fracture channeling, and density driven flow

#### Correspondence to:

A. Shakas,  
alexis.shakas@unil.ch

#### Citation:

Shakas, A., N. Linde, L. Baron, O. Bochet, O. Bour, and T. Le Borgne (2016), Hydrogeophysical characterization of transport processes in fractured rock by combining push-pull and single-hole ground penetrating radar experiments, *Water Resour. Res.*, 52, 938–953, doi:10.1002/2015WR017837.

Received 13 JUL 2015

Accepted 16 JAN 2016

Accepted article online 20 JAN 2016

Published online 12 FEB 2016

## Hydrogeophysical characterization of transport processes in fractured rock by combining push-pull and single-hole ground penetrating radar experiments

Alexis Shakas<sup>1</sup>, Niklas Linde<sup>1</sup>, Ludovic Baron<sup>1</sup>, Olivier Bochet<sup>2</sup>, Olivier Bour<sup>2</sup>, and Tanguy Le Borgne<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Applied and Environmental Geophysics Group, Institute of Earth Sciences, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland,

<sup>2</sup>Géosciences Rennes, Université de Rennes 1, CNRS, Geosciences Rennes, UMR 6118, Rennes, France

**Abstract** The *in situ* characterization of transport processes in fractured media is particularly challenging due to the considerable spatial uncertainty on tracer pathways and dominant controlling processes, such as dispersion, channeling, trapping, matrix diffusion, ambient and density driven flows. We attempted to reduce this uncertainty by coupling push-pull tracer experiments with single-hole ground penetrating radar (GPR) time-lapse imaging. The experiments involved different injection fractures, chaser volumes and resting times, and were performed at the fractured rock research site of Ploemeur in France (H+ network, hplus.ore.fr/en). For the GPR acquisitions, we used both fixed and moving antenna setups in a borehole that was isolated with a flexible liner. During the fixed-antenna experiment, time-varying GPR reflections allowed us to track the spatial and temporal dynamics of the tracer during the push-pull experiment. During the moving antenna experiments, we clearly imaged the dominant fractures in which tracer transport took place, fractures in which the tracer was trapped for longer time periods, and the spatial extent of the tracer distribution (up to 8 m) at different times. This demonstrated the existence of strongly channelized flow in the first few meters and radial flow at greater distances. By varying the resting time of a given experiment, we identified regions affected by density-driven and ambient flow. These experiments open up new perspectives for coupled hydrogeophysical inversion aimed at understanding transport phenomena in fractured rock formations.

### 1. Introduction

Characterization of flow and transport in fractured rock formations has been a central focus of hydrogeological research for several decades [e.g., National Research Council, 1996]. The interest arises from a multitude of applications, ranging from environmental remediation [e.g., Andrićević, and Cvetković, 1996] to safe disposal of nuclear waste [e.g., Cvetković *et al.*, 2004]. Experimental studies over several scales are essential to constrain site-specific conceptual models [Le Borgne *et al.*, 2006] that can be used for numerical simulations of flow and transport for purposes of predictions, risk-assessment, and decision-making [Berkowitz, 2002].

Fractured geological media are often assumed to be scale-invariant and power-law distributions have been successfully used to statistically describe scaling properties in terms of length or aperture [Bonnet *et al.*, 2001]. The resulting flow heterogeneity is characterized by strong channeling at both fracture and network scales, which implies that advection occurs mainly through preferential paths. This directly affects transport processes that display strongly non-Fickian dispersion behavior, including early tracer breakthrough and late time tailing, as observed in tracer test experiments [Haggerty *et al.*, 2000; Becker and Shapiro, 2003; Berkowitz, 2002]. The physical interpretation of these observations is often ambiguous as different physical processes, for example, diffusive trapping into a low velocity zone or advection into variable velocity channels, may cause similar tailing behavior in tracer breakthrough curves [Kang *et al.*, 2015]. This motivates the development of geophysical approaches that enable observing the motion and spatial distribution of tracers *in situ*. This is the focus of the present study.

The complexity of tracer pathways in fractured systems implies that tracer recovery, in classical cross-borehole tests, decays fast as the distance between injection and observation wells is increased. On the other hand, push-pull experiments [Istok, 2012]—also called single-well injection withdrawal experiments—with their higher tracer retrieval offer a time and cost-effective method for obtaining information about

transport properties of fractured rock formations [Nordqvist and Gustafsson, 2002]. Push-pull experiments are carried out by packing-off a fractured section of the borehole using a dual-packer system and injecting (pushing) a tracer (or multiple tracers) into the fractured system through the packed-off interval (injection interval). After pushing the tracer into the system, a chaser fluid is used to clean the injection chamber and to push the tracer further out into the formation. The chaser fluid is usually water at ambient aquifer conditions and the volume of chaser injected varies depending on the scale of investigation. During the pulling period, the flow is reversed to produce a tracer breakthrough curve.

The expected reversibility of advective transport in push-pull experiments implies that the recorded tracer breakthrough curve is only weakly sensitive to the transmissivity distribution of the fractured rock formation, and that the mean arrival time of the tracer breakthrough curve is uninformative [Becker and Shapiro, 2003]. Indeed, push-pull experiments are mainly sensitive to irreversible time-dependent processes [Nordqvist and Gustafsson, 2002; Kang et al., 2015] such as sorption and diffusion. It is possible to increase the sensitivity of push-pull experiments to these processes by introducing a resting time between the pushing and pulling phases [Berkowitz, 2002]. Multiple push-pull tests with varying pushing and/or chasing volumes make it possible to engage different volumes of the system and gain scale-dependent information [Gouze et al., 2008]. The results can be compared to analytical or numerical solutions, thus allowing inference about flow and transport properties of the system [Becker and Shapiro, 2003; Le Borgne and Gouze, 2008].

Geophysics offers high-resolution and high spatial coverage data that complement the information obtained by hydrological experiments [e.g., Hubbard and Linde, 2011]. For instance, ground penetrating radar (GPR) reflection imaging makes it possible to image dynamic processes and associated length scales of hydrogeological experiments in fractured rock formations, particularly when tracers with sufficient contrast in electrical conductivity are used, such as saline tracers [Tsoulfas and Becker, 2008]. The unique ability of GPR reflection imaging to remotely detect fractures of millimeter-thin aperture has been rigorously investigated in both laboratory [Grégoire and Hollender, 2004] and field-based conditions [e.g., Dorn et al., 2012b]. Recently, surface [Becker and Tsoulfas, 2010], cross-well [Day-Lewis et al., 2003], and single-well [Dorn et al., 2012a] GPR have been used in conjunction with dipole saline tracer experiments, not only to dynamically image the migration of tracer movement between boreholes but also to condition discrete fracture network (DFN) models [Dorn et al., 2013].

DFN models are conceptual models used to describe fractured rock formations, where flow and transport only occurs inside fractures [e.g., de Dreuzy et al., 2012]. This approximation is particularly suitable for crystalline rock formations [e.g., Nordqvist and Gustafsson, 2002]. To adequately condition DFN models, it is necessary to describe the physical properties of the fractures at both the single fracture and the fracture network scales [de Dreuzy et al., 2012]. For a single fracture, this description can include the mean aperture, fracture orientation, and fracture length. It is practically impossible to gain independent information on these properties through push-pull tests alone since the length scale over which the tracer is transported is unknown and fracture orientation is only known at the borehole location. Moreover, the effect of ambient flow and the buoyancy effect of tracers with a significant density contrast with respect to the formation water, are usually ignored when interpreting push-pull data.

To address the inherent ambiguity in interpreting push-pull tests alone, we conducted a series of combined push-pull and single-hole GPR experiments in a crystalline aquifer. We performed repeated push-pull experiments with varying resting times and chasing volumes and monitored the GPR response with both fixed and moving antenna configurations. In this contribution, we investigate how GPR monitoring of push-pull experiments can provide constraints on flow and transport characteristics of the fractured system.

## 2. Field Site and Experimental Setup

The experiments were carried out between the 19 and 26 June 2014 at the Ploemeur fracture rock experimental site in Brittany, France (H+ network of experimental sites). Previously acquired data at this well-studied site, such as optical, acoustic, and geological logs can be found in the H+ observatory database (<http://hplus.ore.fr/en>). The aquifer supplies drinking water to the town of Ploemeur (20,000 inhabitants) and it is mainly composed of granite and mica schists [Ruelleu et al., 2010]. At the borehole scale, only a few fractures dominate the hydraulic behavior of this highly transmissive aquifer (the average transmissivity at site scale is around  $T = 10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}$ ) [Le Borgne et al., 2004, 2006]. Borehole GPR data have been previously

acquired at the experimental site named Stang-Er-Bruné that is located 3 km west of the water supply wells [Le Borgne et al., 2007; Dorn et al., 2011, 2012a, 2012b; Kang et al., 2015]. To the best of our knowledge, this is the first time that push-pull tests and single-hole GPR are combined in a field experiment.

A series of cross-borehole and push-pull tracer tests were previously performed with fluorescent dyes on this site [Kang et al., 2015]. Breakthrough curve tailing was found to be characterized by power law behaviors,  $c(t) \sim t^{-1-b}$  at late times, with  $b$  ranging from 0.75 to 1. The tailing exponents were systematically larger (which implies that tailing was less significant) under push-pull conditions than under cross-borehole conditions. This implies that matrix diffusion is not expected to be significant in this low permeability granite and that the dispersion behavior measured from the fluorescent dye experiments was mostly controlled by dispersion in fracture planes, as observed in the similar geological setup at the Mirror Lake site [Becker and Shapiro, 2003].

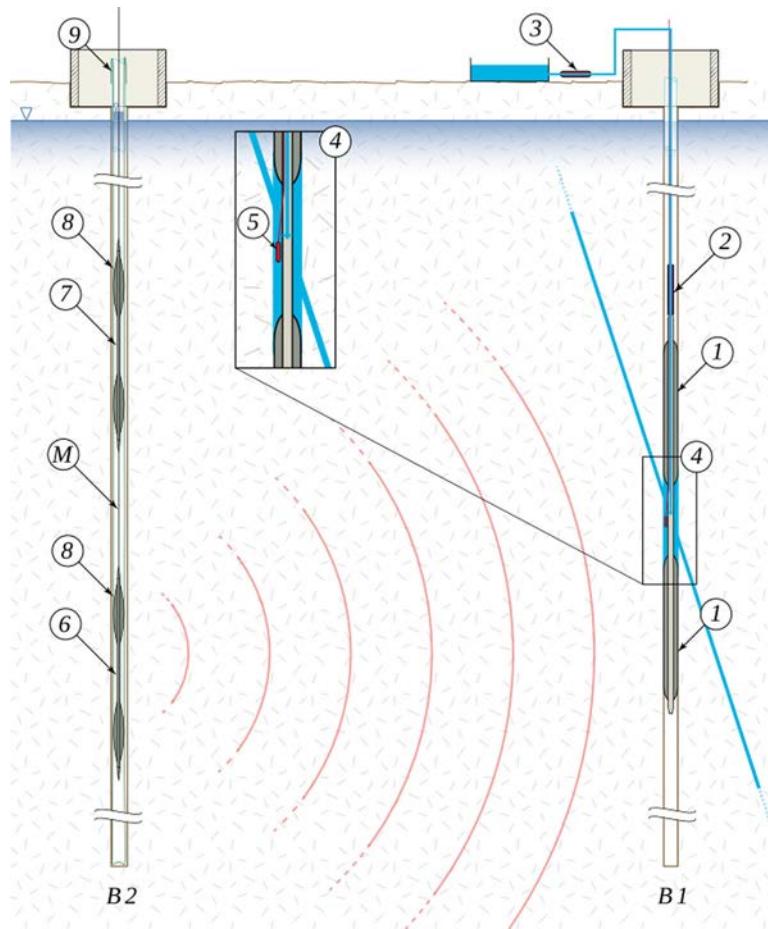
The injection (B1) and monitoring (B2) boreholes are separated on average by 6 m. We conducted push-pull experiments in B1 while we performed single-hole GPR monitoring in B2. In contrast to previous single-hole GPR acquisitions [e.g., Dorn et al., 2012a], we used a flexible liner (blank flexible liner by FLUTE) to seal-off the GPR monitoring borehole from the aquifer. The liner was filled with formation water, extended to the bottom of the borehole, and allowed smooth movement of the GPR antennas while preventing conductive tracer from entering the borehole and thereby affecting the effective GPR antenna signal [see Dorn et al., 2011, 2012a]. This also minimized the propagation of pressure variations arising from the antenna movement to the surroundings. A schematic description of the experimental setup is shown in Figure 1.

We present five push-pull tests with injections at either 50.9 or 78.7 m (see Table 1). We focus the analysis on experiments I, II, and III; experiments IV and V are only used herein to assess the repeatability of our results. Previous studies by Le Borgne et al. [2007] and Dorn et al. [2012a, 2013] concluded that the fracture at 50.9 m in B1 connects to low-permeable, subhorizontal fractures while the fracture at 78.7 m connects to transmissive, subvertically oriented fractures. These fractures were interpreted to be of the order of ~10 m in length and to have apertures in the millimeter to submillimeter range. We used a custom-made double-packer in B1 to seal off the injection interval during the push-pull experiments (Figure 1). The double-packer consisted of two inflatable packers separated by 0.6 m, which were inflated to firmly adhere on the borehole wall. We monitored and manually controlled the pumping rate with a flowmeter and pump (MP1 by Grundfos) installed above the double packer, while we measured the electrical conductivity, temperature, and pressure in the injection interval using a CTD diver by Schlumberger. Halfway through each saline tracer injection, we injected an additional fluorescent conservative tracer that had the same salinity as the formation water. In the present study, we focus on the joint analysis of GPR and saline tracer breakthrough curve data.

For the GPR acquisitions, we used the RAMAC 100 MHz system with slimhole borehole antennas, manufactured by MALÅ. In all experiments, we used a fixed separation of 4 m between the midpoints of the transmitter and receiver antennas. We centered the antennas in the borehole by using custom-made flexible centralizers that we attached to the top and bottom of each antenna (Figure 1). The use of centralizers and a flexible liner made the GPR acquisition very smooth and the estimated positioning errors during the moving antenna experiments were minor (standard deviation of 8 mm). During the moving antenna experiments, we acquired data with a spatial sampling rate of 5 cm along the borehole. For the moving antenna experiment, we sampled at 1148 MHz for a time-window of 450 ns, and used 64 stacks per trace to increase the signal-to-noise ratio. For the fixed antenna experiment, we used a sampling rate of 4278 MHz and 128 stacks per trace. While GPR reflections contain information about the fracture aperture at the millimeter scale [Dorn et al., 2011], the spatial resolution along the fracture plane (based on the Fresnel zone) is roughly 1 m for the 100 MHz antennas we used and the distances we investigate [e.g., Jol, 2009, section 1.3.4]. After the processing of the moving antenna experiments, the resolution is refined to roughly a quarter of the wavelength (i.e., 0.25 m). Both types of acquisition (fixed and moving antenna) resulted in data with very high signal-to-noise ratios that required minimal processing.

### 3. GPR Data Processing Steps

In this section, we describe the processing steps that were applied to the raw single-hole GPR data. We begin with the basic concept of single-hole GPR and continue to analyze each processing step (see Jol [2009] for a more detailed description of GPR theory and processing).



**Figure 1.** Schematic description of the combined push-pull experiment in borehole B1 and single-hole GPR monitoring in borehole B2 (not to scale). In B1, a section of the borehole is isolated using two inflatable packers (1) while a pump (2) and a flowmeter (3) are used to control the pushing and pulling of saline tracer in the injection interval (4). A CTD diver (5) measures the electrical conductivity, temperature, and hydraulic pressure in the chamber. In B2, GPR monitoring takes place with the transmitter (6) and receiver (7) antennas, which have a fixed separation with midpoint M and are centered in the borehole using custom-made centralizers (8). B2 is hydraulically isolated from the surroundings by a flexible borehole liner (9).

### 3.1. Basic Concepts of Borehole GPR

A dipole GPR transmitter antenna, as the one we used, generates an alternating high-frequency electric field. This field propagates symmetrically around the antenna axis but is the strongest in the plane that is perpendicular to the antenna and intersects the antenna midpoint [Jol, 2009, section 1.4].

The propagating field is attenuated and dispersed as it travels through the rock matrix and water-filled fractures. Reflections occur at rock-fracture interfaces due to the high contrast in electrical properties

**Table 1.** Push-Pull and GPR Parameters for Experiments I–V

Experiment	I	II	III	IV	V
Injection depth (m)	78.7	78.7	50.9	78.7	78.7
Monitoring depths (m)	75.1	50–90	30–60	50–90	50–90
GPR antennas	Fixed	Moving	Moving	Moving	Moving
Tracer density ( $\text{kg m}^{-3}$ )	1044	1044	1044	1042	1041
Salinity ( $\text{g kg}^{-1}$ )	44	44	44	42	41
Tracer volume (L)	100	100	100	100	100
Chaser volume (L)	90	90	100	90	710
Resting time (hh:mm)	00:00	00:00	04:45	03:47	00:00
Pumping rate ( $\text{L min}^{-1}$ )	3.2	3.2	3.3	3.3	3.3
Mass recovery (%)	55	51	79	40	27

between the rock matrix and water. The strength of the reflections depends on fracture properties such as orientation, aperture, and roughness. Within the water-filled fracture, the electric field experiences strong attenuation and dispersion, which results in a decreased amplitude and a phase shift of the electric field. When the electrical properties of the fracture filling change, such as the change in electrical conductivity induced by the presence of a saline tracer, the magnitude and phase of the reflected electric field also change [Bradford and Deeds, 2006; Tsolias and Becker, 2008].

The receiver antenna measures a voltage as a function of time (a GPR trace) that is proportional to the amplitude of the reflected electric field. If the GPR antennas are kept fixed at a specific depth along the borehole, changes in the reflected traces over time are indicative of salinity variations in the vicinity of the transmitter-receiver pair. These changes reflect the (averaged) temporal dynamics of the saline tracer in the region surrounding the transmitter-receiver midpoint. If the GPR antenna pair is moved along the borehole during a push-pull experiment—using saline or any other tracer with electrically contrasting properties to the ambient fluid—then the changes in the GPR traces recorded along the borehole can be directly linked to the spatiotemporal migration of the tracer.

### 3.2. Time Corrections, Filtering, and Normalization

The initiation time (time-zero) of the receiver and transmitter antennas varies slightly every time the system is turned on and it may drift over time. To account for this, we applied a time-zero correction following Peterson [2001]. After the time-zero correction, we applied a digital bandpass filter (a Kaiser Window with edges at 10-40-150-200 MHz) to concentrate on frequencies around the dominant frequency that is indicated by the antenna manufacturer as 100 MHz.

In single-hole GPR acquisition, part of the electric field is refracted at the GPR borehole wall [e.g., Dorn et al., 2011]. These refractions (termed borehole refractions in the following) of high amplitude are measured earlier in time than the reflections from the tracer-filled fractures that are located further away. By sealing the GPR borehole with the flexible liner, we ensured that the borehole conditions remained constant during acquisition, which implies that the amplitude and phase of the borehole refractions were constant over time at each depth along the borehole.

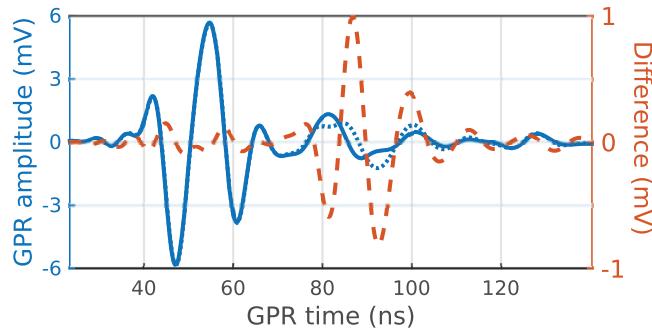
After the initial time-zero correction, subtle time shifts (with a mean of 0.4 ns and a standard deviation of 0.25 ns) were observed in the borehole refractions when repeating the measurements at the same locations in the borehole. We attribute these time shifts to small variations in the initiation time of each pulse and to centimeter-scale vertical and/or horizontal shifts in the location of the antennas within the borehole. To correct for these time shifts, we compared collocated traces to a reference trace that was measured at each depth before the initiation of the push-pull experiment. Since these time shifts were smaller than the sampling rate, we upsampled each trace at 5 times the original sampling rate by performing a Fourier transform on the data and padding the Fourier spectrum with zeros. We then shifted the upsampled traces so that the borehole refractions coincided with the ones of the reference trace. We subsequently performed an inverse Fourier transform and downsampled the data to the original sampling rate to obtain the resulting phase-shifted traces.

### 3.3. Time-Lapse Changes and Migration

Before each push-pull experiment, the measured GPR data were indicative of the ambient conditions (e.g., water-filled fractures with formation water, the presence of boreholes, and double-packer system). After the initiation of the push-pull experiment, the saline tracer started filling the fractures that are connected to the injection interval. The electromagnetic field that is reflected by the tracer-filled fractures becomes amplitude and phase shifted. These changes are subtle and are best appreciated by subtracting the later traces from the reference trace. To minimize the errors in the subtraction process, it is important to precisely locate the traces along the borehole and to align the traces with the reference (see section 3.2).

Figure 2 displays the reference trace and a trace recorded during a push-pull experiment. We also show the difference of the later trace with respect to the reference trace (difference trace). The difference trace has clear peaks that accentuate the changes that result from the presence of the saline tracer.

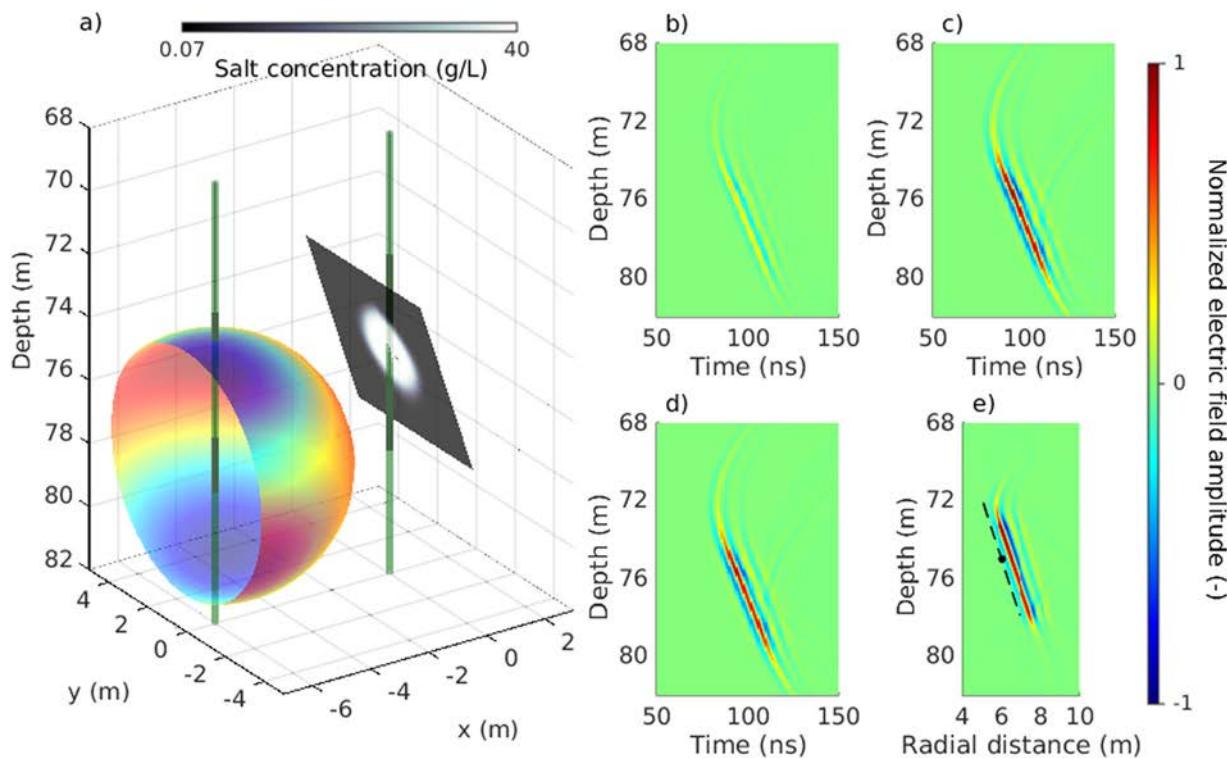
To partly account for attenuation of the signal [Jol, 2009, section 1.6.2], we applied a gain to scale the later times in the difference traces with respect to the earlier times. We choose to linearly scale each GPR difference trace with time, with appropriate scaling so that the resulting amplitudes are normalized to 1.



**Figure 2.** GPR data from experiment I. The reference trace (solid blue line) and a trace measured after pushing (dotted blue line) are shown together with the difference of the two traces (dashed red line). The difference is plotted on a different scale to the right of the figure.

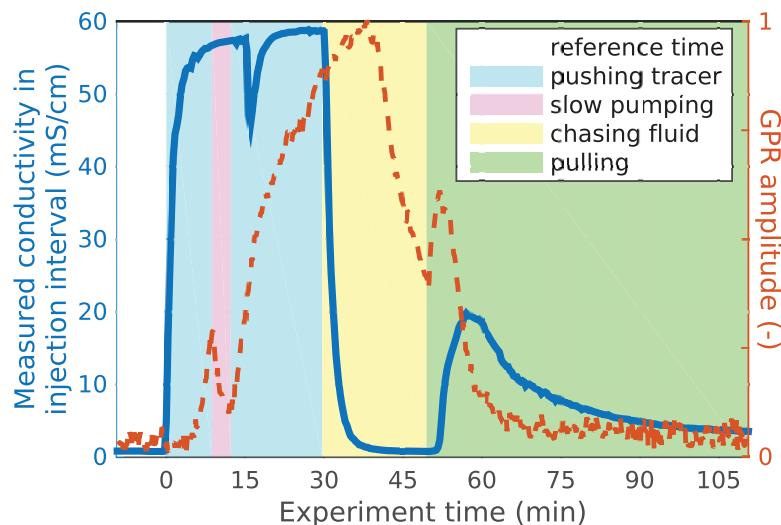
extensive cross-hole travel time tomography that the radar velocity in the granite is practically constant and isotropic.

Figure 3a illustrates a synthetic 3-D model with the electric field at a given instant in time and the resulting saline tracer distribution (at the end of the injection period) within a rectangular, tilted fracture of uniform (0.5 mm) aperture. For this model, we calculate the GPR forward response using a newly developed algorithm [Shakas and Linde, 2015] to simulate the section prior to (Figure 3b) and at the end of the tracer injection (Figure 3c). The finite emission time (some 20 ns in this example) of the alternating source manifests itself as positive and negative signal amplitudes in the GPR traces. This effect is visible in the difference section (Figure 3d) and the migrated difference section (Figure 3e). The finite emission time also implies that the actual fracture location coincides with the shortest distance at which the absolute amplitude of the migrated difference section is above zero (see Figure 3e). Indeed, the fracture has an aperture of 0.5 mm,



**Figure 3.** (a) A synthetic 3-D model with the electric field and the tracer concentration in a fracture at a given time. (b) The simulated GPR section with formation water, (c) the same section with the tracer distribution (shown in Figure 3a), (d) their difference and the migrated difference section, along with the fracture location and injection point (e). The GPR simulations were performed with a newly developed algorithm [Shakas and Linde, 2015] and the flow-and-transport simulation was done with MaFloT 2-D.

As a final step, we performed migration that refers to the summation of energy along certain paths to account for spherical spreading. A collection of traces along the borehole forms a section. We refer to sections from which the reference is subtracted as difference sections. We migrate the difference sections using a Kirchoff-migration algorithm developed for seismic data from the CREWES Matlab toolbox (<http://www.crewes.org/>) under the assumption of a constant GPR velocity of  $0.12 \text{ m ns}^{-1}$ . Dorn et al. [2012a] showed through



**Figure 4.** GPR and push-pull data for experiment I (fixed-antenna). The measured conductivity in the injection interval is shown (solid blue line) along with the normalized GPR breakthrough curve (dashed red line).

but the corresponding reflection in the migrated difference section shows an imprint of the source over a width of approximately 2 m.

## 4. Results

### 4.1. Fixed Antenna Acquisition

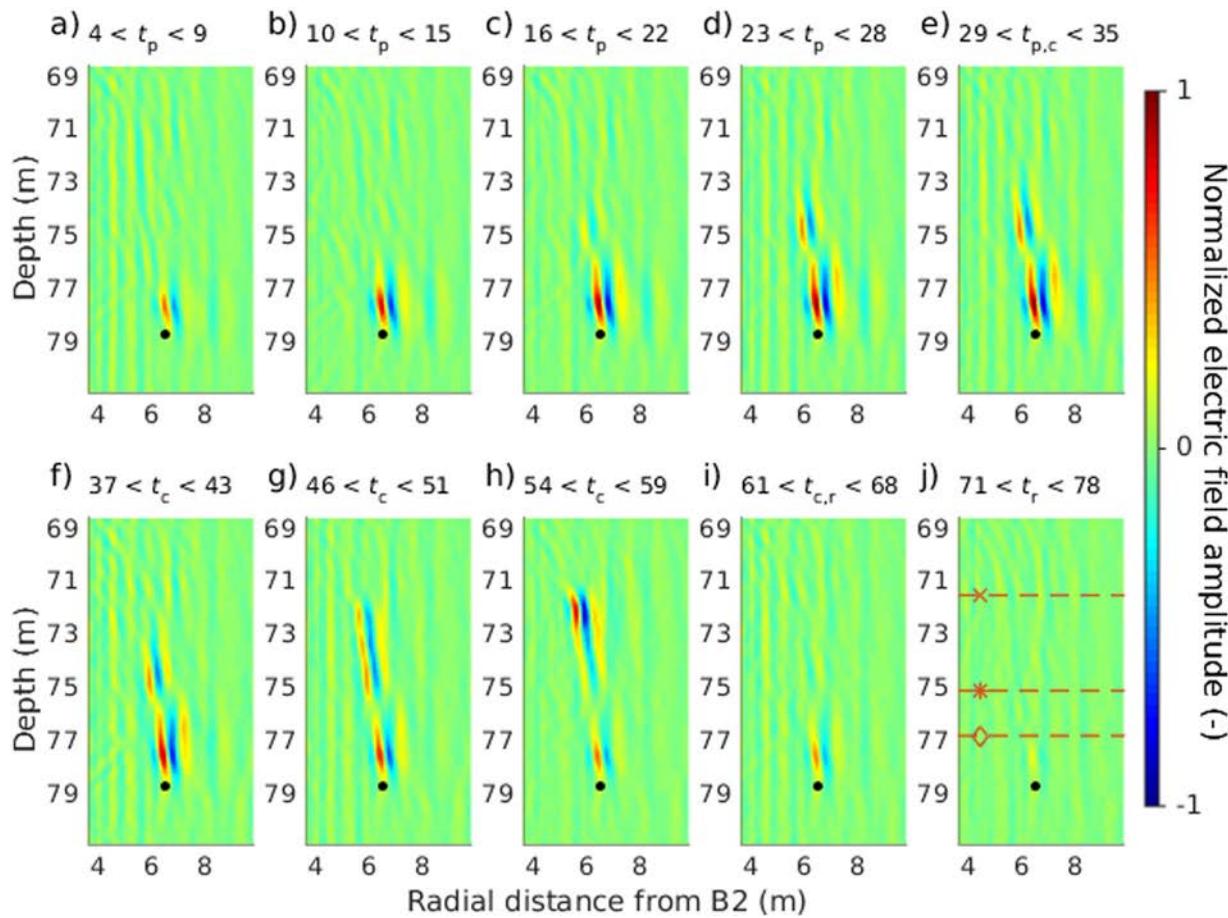
For the fixed antenna acquisition (experiment I in Table 1), we kept the midpoint between the transmitter and receiver antennas at 75.1 m depth while the injection depth was 78.7 m. We chose this location based on results from a previously acquired moving antenna experiment that suggested an upward tracer migration.

First, we computed the Root Mean Square (RMS) of each GPR difference trace and plotted the evolution of the RMS curve over time along with the measured electrical conductivity in the injection interval (Figure 4). This measure is representative of the change in the total (measured) reflected energy and is, therefore, indicative of the volume and electrical conductivity of the saline tracer within the antenna range. In the following, we refer to this type of curve as the GPR breakthrough curve.

Before the push-pull experiment started (reference acquisition), the GPR breakthrough was close to zero and dominated by noise. The saline tracer reached the injection interval at  $t = 0$  min and the magnitude of the GPR breakthrough increased considerably about 5 min later. One reason for this delay is that the antenna system was located above the injection depth and the tracer needed to travel some distance upward before it was detected. Also, a sufficient volume of tracer must be injected to allow measurable changes in the reflected GPR signal.

At  $t = 10$  min after the saline tracer reached the injection interval, we temporarily paused the saline tracer injection and started to inject a second tracer of ambient conductivity during 3 min at  $0.33 \text{ L min}^{-1}$ , that is, at a 10 times lower rate than during the saline tracer injection. This period is indicated in Figure 4 as “slow pumping.” Note that the second tracer was injected at the surface and it took about 3 min to reach the injection interval (seen as a decrease in the measured conductivity at  $t = 15$  min). The GPR breakthrough curve responded to the lower injection rate by a sharp decrease of its amplitude that only starts to increase after the previous flow rate and saline tracer injection was resumed.

The peak in the tracer breakthrough curve was reached at  $t = 25$  min and the GPR breakthrough curve shows a clear maximum at  $t = 38$  min. After the peak was reached in the GPR breakthrough curve, the amplitudes start decreasing as the tracer was diluted by the addition of the chaser fluid and migrated away from the antenna location.



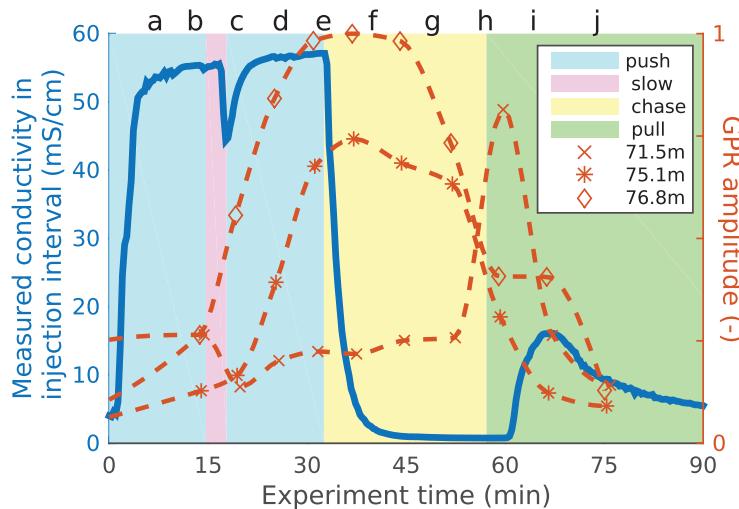
**Figure 5.** Migrated difference sections from experiment II. The black dot indicates the injection location and the acquisition times for each section (in min) are shown at the top of the subfigures along with the phase of the push-pull experiment indicated by the index ( $\rho$ : pushing,  $c$ : chasing,  $r$ : pulling). The dashed red lines in Figure 5j are analyzed in Figure 6.

During the pulling phase, another peak was observed in the GPR breakthrough curve at  $t = 52$  min that is smaller in amplitude and duration. The peak in the pulling phase was reached later in the tracer breakthrough than in the GPR breakthrough because the tracer first passed by the static antenna setup before migrating further down toward the injection interval, at 78.7 m, before it reached the CTD diver in the injection interval. At times later than  $t = 70$  min, the GPR breakthrough curve showed noisy behavior at an amplitude that was more than twice the one measured before the tracer injection.

#### 4.2. Moving Antenna Acquisition

During the moving antenna acquisitions—see experiments II–V in Table 1—we monitored over a depth range that was wide enough to capture all expected changes induced by the saline tracer. Here we present experiment II that had the same experimental parameters as experiment I, apart from the moving antenna setup. The difference sections after migration are shown for this experiment, along with the acquisition times, in Figure 5. Note that we only present the part of the depth section where temporal changes are visible. The migration of the saline tracer from the injection location through an upward trajectory of roughly 8 m is clearly seen. The maximum extent of the tracer is found in Figure 5h, which corresponds to a difference section acquired at the end of the chaser injection. The sharp change in the distribution of tracer between pushing and pulling is most evident by comparing the difference sections obtained right before (Figure 5h) and right after (Figure 5i) the initiation of the pulling phase. There are little indications of significant amounts of remaining tracer at the end of the experiment (Figure 5j). Throughout the experiment, a fraction of the tracer remained close to the injection location.

In Figure 6, we plot the tracer breakthrough curve along with the GPR breakthrough curves at three depths that are indicated in Figure 5j. The three depths were chosen such that one is close to the injection depth,



**Figure 6.** Plot of the measured conductivity in the injection interval (solid blue line) along with the GPR breakthrough curves (dashed red lines) during experiment II. The GPR breakthrough curves are shown for three depths (see Figure 5j). The letters at the top of the figure refer to the times at which the GPR profiles were taken (see the difference sections in Figure 5).

one is the same as the depth during the fixed antenna acquisition (see section 4.1) and one is close to the furthest extent of the tracer imaged by the GPR. In the moving antenna configuration, GPR measurements at a given depth were repeated every  $\sim 5$  min. As expected, the noise levels in the GPR breakthrough curves were noticeably higher than for the fixed antenna acquisition—around 0.3 normalized units for the moving acquisition compared to 0.05 normalized units for the fixed acquisition—but a clear signal related to tracer transport was still evident.

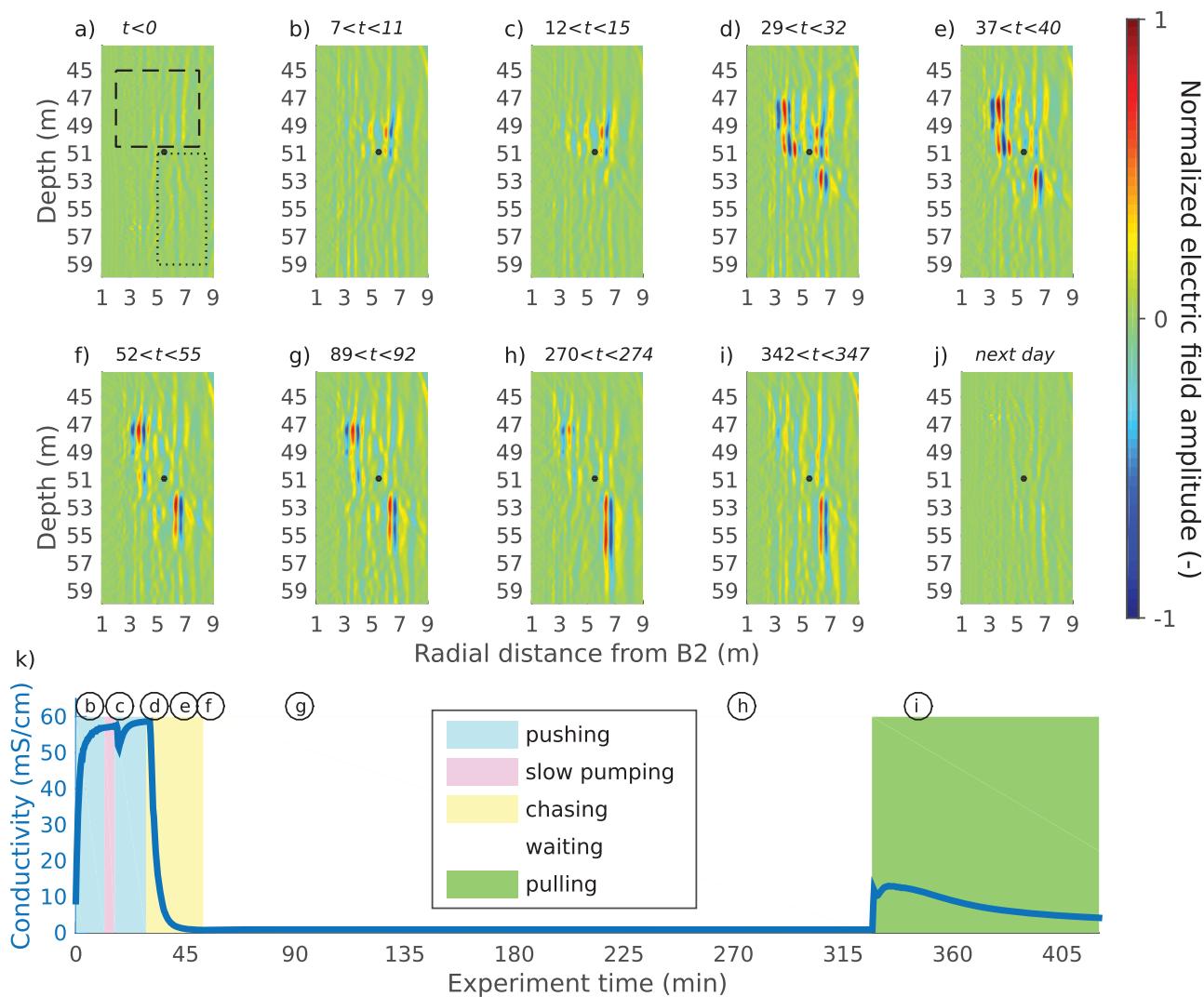
Near the injection location at 76.8 m depth, we measured strong difference signals toward the end of the saline tracer injection that decreased during the chasing period but prevailed until the end of the pulling period, suggesting that saline tracer was still present at this depth. The GPR breakthrough curve was considerably above the noise level from  $t = 5$  min to  $t = 68$  min. At the depth of 75.1 m (same as the fixed antenna experiment), we measured a peak with smaller amplitude that extended from  $t = 15$  min to  $t = 55$  min. Finally, the GPR breakthrough curve measured at 71.5 m reached a well-defined peak at  $t = 56$  min. The saline tracer did not remain for a long time at this depth, but a considerable volume must have reached this depth interval to account for the strong changes in reflectivity (also seen in the surrounding traces in Figure 5h).

#### 4.3. Imaging Ambient Transport Processes During the Resting Time

We now present the results of experiment III that was performed with the saline injection at 50.9 m (see Table 1), a moving antenna acquisition and a resting time (4:35h) between pushing and pulling. This experiment highlights density-related effects. As before, we only show the depth interval where strong temporal changes occurred. We have no GPR data between  $t = 180$  min and  $t = 270$  min as we charged the antenna batteries during this time period.

We present the difference sections from this experiment in Figure 7 and focus on two regions: an *upper* region found above the injection depth and a *lower* region found below the injection depth (shown in Figure 7a). The migrated difference sections show that changes during the pushing period arise mainly in the upper region and in the vicinity of the injection location (Figures 7b and 7c). During the chasing period, from  $t = 30$  min to  $t = 50$  min, some of the tracer migrated to the upper region from 51 m to 47 m depth and some to the lower region from 52 m to 54 m depth (seen in Figures 7d and 7e). At the beginning of the resting period, some tracer remained in the vicinity of the injection location (3 m radial distance and 51 m depth in Figure 7f). During the pulling phase (Figure 7i), the tracer from the upper region is recovered very quickly while the tracer in the lower region takes more time to be recovered. The tracer breakthrough curve is shown in Figure 7k.

The two regions of interest showed considerably different responses. The upper region shows amplitude differences at early times that were strongly attenuated during the resting time, and almost disappeared



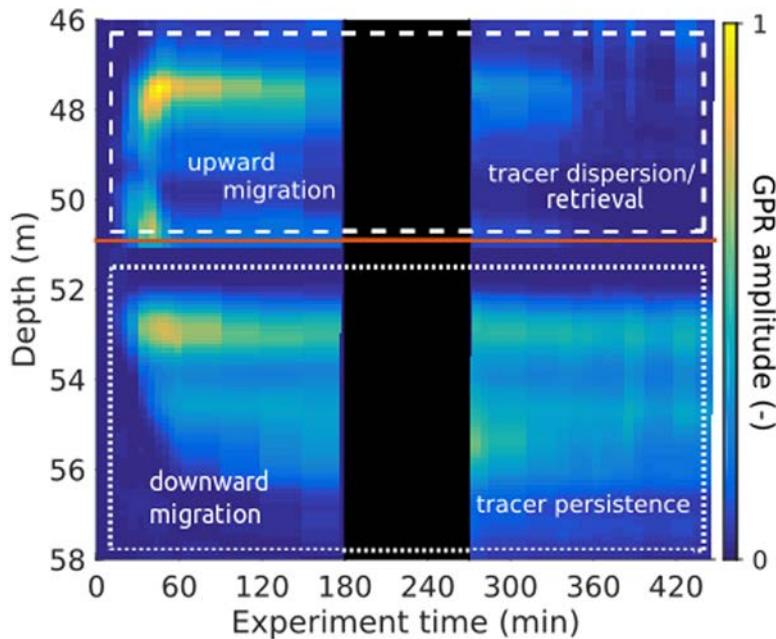
**Figure 7.** (a)–(j) The migrated difference sections from experiment III. The black dot indicates the injection location and the acquisition times for each section (in min) are shown at the top of the subfigures and also indicated along with the measured conductivity in the injection interval (k).

once the pulling begun. The lower region showed considerable amplitude differences that arise at the end of the pushing period (Figures 7d–7i). The saline tracer that caused this change exhibits a strong downward migration during the resting time, from 55 m (Figure 7f) to 59 m (Figure 7h).

In Figure 8, we plot the GPR breakthrough curves for the complete depth range at which changes were visible during the experiment. The injection depth and the two areas of interest (upper and lower region) are indicated. As was evident in the migrated sections of Figure 7, we can see the upward and downward migration of the tracer from the injection depth. In this figure, the downward migration of the tracer during the resting time is evident from  $t = 60$  min to  $t = 330$  min. During the resting time and after, we charged the batteries, we measured weaker GPR differences in the top than in the lower region (see Figure 8 between  $t = 270$  min and  $t = 330$  min). During the pulling phase, the GPR breakthrough curves in the upper region were quickly attenuated while the ones in the lower region showed considerably high values throughout the acquisition period.

## 5. Interpretation

In this section, we discuss how the coupling of push-pull tracer tests and GPR imaging provides a means of estimating transport length scales, transport velocities, ambient flow, and density effects.



**Figure 8.** Plot of the GPR breakthrough curves computed for experiment III. The injection depth at 50.9 m is shown with the solid (red) line. The dashed and dotted rectangles correspond to the regions shown in Figure 7a. The GPR antenna batteries were charged between  $t = 175$  and  $t = 270$  min.

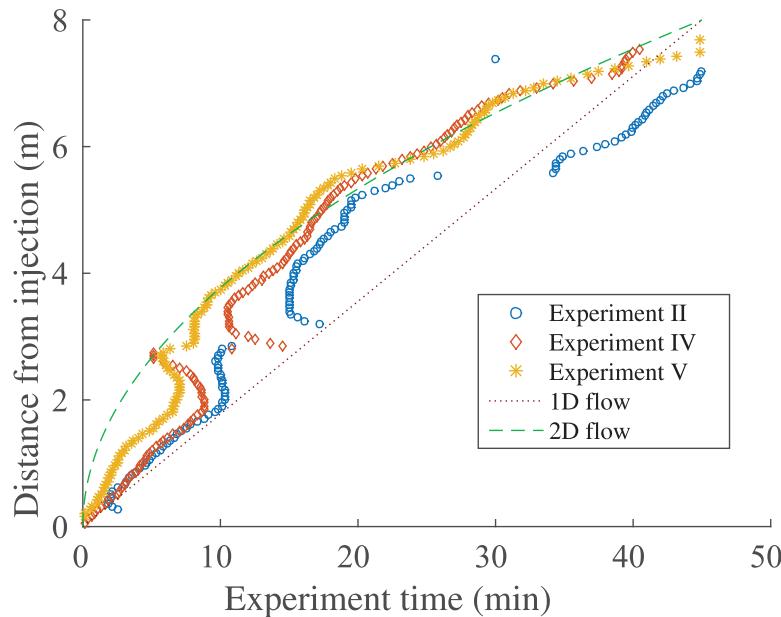
### 5.1. Transport Length Scales

One major advantage of coupling push-pull experiments with GPR difference imaging is that the representative length scale of the experiment can be quantified, that is, how far did the saline tracer reach into the formation. For example, during the pushing and chasing phase of experiment II (Figure 5) with injection at 78.7 m, the saline tracer migrated approximately 8 m upward from the injection location in a clearly defined trajectory. This is in contrast to the same phases of experiment III (Figure 7) with injection at 50.9 m, in which the saline tracer was seen to migrate less than 4 m from the injection location, but in several separate trajectories. Furthermore, different transport length scales are also highlighted within a single experiment when some of the tracer remains relatively close to the injection, while the rest of the tracer migrates further away. This information is crucial to assess the volume investigated by the tracer tests, as well as the characteristic fracture surface that is seen by the tracers, especially when considering reactive transport. It also helps to define the appropriate conceptual model for fracture flow and transport.

### 5.2. Transport Velocities and Associated Scale Effects

Another important advantage of single-hole GPR difference imaging is that inference about the tracer mean velocity can be made, since the tracer is mapped in both space and time. To demonstrate this, we consider the GPR breakthrough curves during the pushing and chasing period of experiments II, IV, and V. These experiments were conducted at the same location and apart from minor changes in the experimental parameters (injection rate, tracer concentration, and volume) they can be considered identical. We used the corresponding GPR breakthrough curves at each depth interval to compute a mean arrival time of the tracer that we defined as the time at which each curve crosses a noise threshold, set as 30% of the maximum value seen in the difference images. In Figure 9, we plot the travel distance as a function of the mean arrival time of the tracer along its complete trajectory after chasing (see Figure 5h for the complete trajectory), hence, the slope of this plot can be thought of as the mean velocity of the tracer. The overall agreement of the mean arrival times for the different experiments not only indicates that the push-pull experiments and the GPR monitoring results were repeatable, but also that calculating GPR breakthrough curves is a sound approach.

From this plot, we can identify two flow regimes; for the first 3 m, the tracer velocity appears to be constant (at  $0.18 \text{ m min}^{-1}$ , expected for channelized flow) and for the next 4 m the velocity is decreasing with a rate as expected for radial flow along a plane. For comparison, we plot the analytical solutions of advective



**Figure 9.** Travel distance versus time of the saline tracer for experiments II, IV, and V, computed using the GPR breakthrough curves. The analytic solutions for 1-D (channelized) and 2-D (planar) flow are also shown, assuming the saline tracer travels a total distance of 8 m in 45 min.

transport within a 1-D pipe and within a 2-D fracture plane. We assume that the tracer reaches a distance of  $x = 8$  m within  $t = 45$  min and compute the curves  $x = (8/45)t$  for the 1-D solution and  $x = (8/45^{1/2})t^{1/2}$  for the 2-D solution.

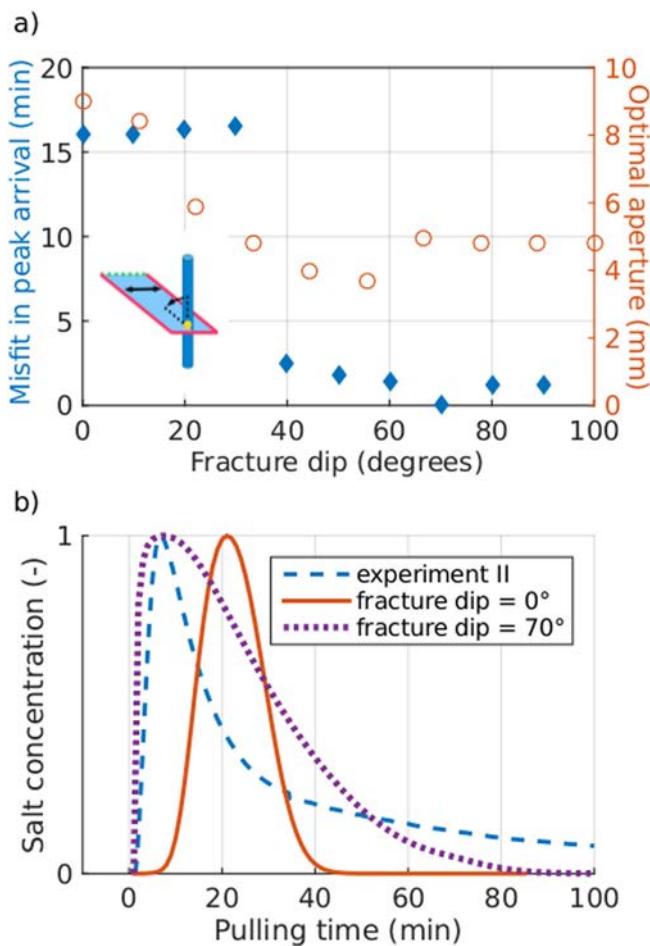
### 5.3. Geometric Properties of Transport Flow Paths

Another type of information that is lacking in classical push-pull experiments is information about the complexity of the pathways that the tracer follows, such as the number of fractures involved as well as their orientations and sizes. For example, borehole optical logs of B1 [Belghoul, 2007] along with prior push-pull and flowmeter tests suggest the presence of an open fracture with a dip angle of  $15^\circ$  at 78.7 m and another with a dip angle of  $37^\circ$  at 50.9 m [Le Borgne et al., 2007]. From the difference sections obtained in experiment II (Figure 5), we see changes that originate from the injection at 78.7 m and extend vertically upwards at an angle steeper than  $70^\circ$ . This suggests that the subhorizontal fracture that intersects the borehole is connected to a major subvertical fracture that is dominating the flow behavior during the experiment. Similarly, the difference sections for experiment III (Figure 7) suggest that the flow originating from the injection location at 50.9 m is dominated by two subvertical fractures on either side of the injection location. Since these fractures do not intersect the injection interval, a subhorizontal fracture (not clearly visible in the difference sections) may have provided the necessary pathway for the tracer. The presence of a subhorizontal fracture in this injection interval is in agreement with Dorn et al. [2011, 2013, 2012b].

### 5.4. Observation of Density Effects and Ambient Flow

It is important to assess the effect of density on the tracer distribution as we use a tracer with a high salinity contrast. In experiment I (Figure 4), we measured a decrease in the GPR breakthrough curve when the pumping rate was lowered (by a factor of 10) to inject the second tracer, and the curve only continued to increase when the previous pumping rate was resumed. Since the antennas were located 3.6 m above the injection interval, this decrease may have occurred because the lower pumping rate was not sufficient to push the tracer upwards, but instead a downward (density-driven) migration of the tracer occurred. Immediately after the previous pumping rate resumed, the tracer continued its upward migration and the GPR breakthrough curve peaks during the chasing period. A smaller peak is seen when the flow is reversed that results from the downward migration of the tracer toward the injection interval.

In experiment II (Figure 5), we saw an upward migration of the tracer during the pushing and chasing, followed by a sharp decrease in GPR difference amplitudes in the upper region (71–75 m) as soon as pulling



**Figure 10.** (a) Plot of the misfit (left axis) between the simulated and measured peak arrival time of the saline tracer in experiment II (see subfigure for the modeling setup). Injection was performed at the bottom of a uniform fracture (yellow circle) with no-flow boundaries (red solid lines) on the bottom and two sides. The distance between the two sides (double arrow) was adjusted so that the tracer would reach a length of 8 m at the end of the chasing period while the open boundary at the top (dashed green line) was kept far from the tracer. The simulations were performed for 10 dip angles (inclined arrow), between  $0^\circ$  and  $90^\circ$ , and each simulation was optimized to obtain the best fitting mean aperture (right axis). The (normalized) best fitting simulation for  $0^\circ$  and  $70^\circ$ , along with the measured concentration for experiment II are shown in Figure 10b.

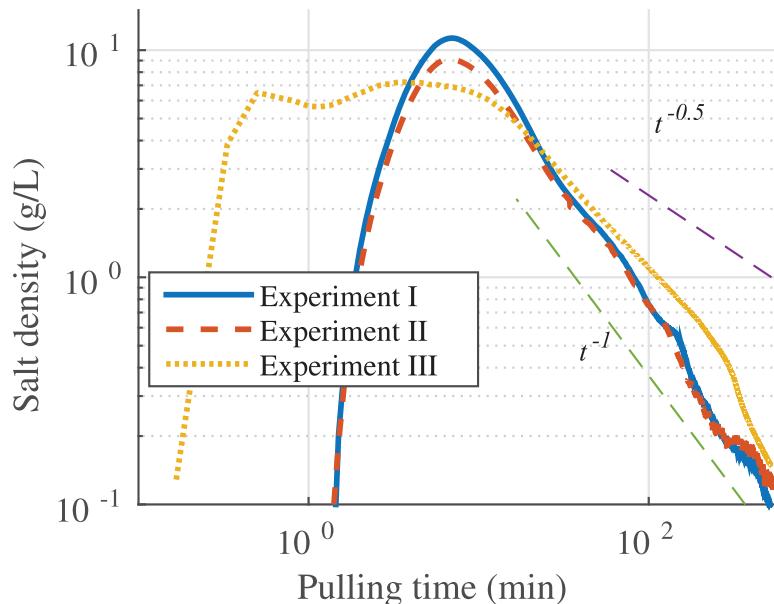
Another effect that is visible in both the difference sections (Figure 7) and in the GPR breakthrough curves (Figure 8) is the vertical spreading of the saline tracer, mainly during the resting time, in the fracture found in the lower region. This is most likely due to density effects since the saline tracers used had strong density contrasts to the surrounding fluid. Note that saline tracers are needed to image tracer transport with GPR difference methods but the salinity could be reduced to minimize density effects, while still conserving sufficient contrasts in the GPR images.

### 5.5. Physical Meaning of Early Tracer Breakthrough

To investigate the effect of density on the push-pull results, we simulated experiment II, using the measured flow rates and converted the electrical conductivity into salinity [Sen and Goode, 1992] using the reference temperature of  $25^\circ\text{C}$  used by the CTD diver. For the simulation, we modified a finite volume solver for flow-and-transport in 2-D porous media [Künze and Lunati, 2012]. The solver allows for density effects by incorporating the force of gravity into the solution of the flow velocity. We adjusted the permeability to account for the transmissivity of a parallel plate fracture through the cubic law [e.g., Lunati et al., 2003] and scaled the porosity by the aperture to account for the volume occupied by the tracer. To allow for inclinations of the

begun (compare Figures 5h and 5i). As already suggested in the previous paragraph, the sharp decrease partly occurs due to the fast downward migration of the tracer. However, some of the visible tracer may have been dispersed into subhorizontal fractures to which our GPR data are largely insensitive. Ambient flow in these fractures may have led to the low mass recovery for this experiment (Table 1).

In experiment III (Figures 7 and 8), we see different behavior of the tracer in the upper ( $45\text{--}51\text{ m}$  depth) and lower ( $51\text{--}59\text{ m}$  depth) regions relative to the injection interval. While the upper region shows strong amplitude changes early on, the amplitudes are quickly diminished during the resting time, possibly due to ambient flow in this location that causes the tracer to be quickly dispersed. As soon as pulling started, the GPR breakthrough curves from this region are quickly attenuated to the background level. On the contrary, the lower region exhibits persistent amplitude differences with respect to the reference throughout the whole experiment, indicating that this fracture is perhaps not strongly affected by ambient flow. The same analysis performed on experiment IV showed that the tracer persists during the resting time in the bottom part of the fracture (from the injection depth to  $76\text{ m}$  depth in Figure 5) while in the top part (from  $76\text{ m}$  to  $71\text{ m}$  in Figure 5) the tracer is quickly dispersed.



**Figure 11.** Measured tracer breakthrough curves for experiments I, II, and III presented in Table 1 along with plots for arrival times with exponents  $-1$  and  $-0.5$ .

fracture, we multiply the gravity term by a component that is equal to the sine of the dip angle. Flow in a fracture with zero dip angle is therefore not affected by gravity. Guided by the changes shown in the GPR sections of experiment II (Figure 5), we defined as a modeling domain a fracture with no-flow boundaries on the bottom and sides and with an open boundary on the top so that tracer movement would be primarily upward. To avoid any tracer reaching the open boundary, we kept the total volume of the fracture 2 times larger than the volume of injected fluid in the domain. We then performed a local optimization (using the golden section search algorithm) to match the peak arrival in the data with a uniform aperture. Note that this simplified model that ignores dispersion, fracture heterogeneity, and ambient flow only serves to highlight the impact of density and fracture dip on the peak arrival time, and that no emphasis has been placed on fitting the tail of the tracer breakthrough curve and honoring the recovered mass.

Using this simplified model, we attempted to reproduce the early arrival of the tracer seen in the tracer breakthrough curve (Figure 6). We allowed the fracture dip to vary between  $0^\circ$  (no density effect) and  $90^\circ$  (maximum density effect) in increments of  $10^\circ$ . The width of the fracture, for a given aperture, was chosen such that the volume of tracer at the end of the chasing phase would occupy a length of 8 m along the fracture. This constraint was motivated by the GPR difference sections (Figure 5h). In Figure 10a, we plot the optimal aperture for each dip angle along with the misfit in peak arrival time between the simulations and the experiment. It is evident that high dip angles are required to fit the early arrival times obtained in the experiment, with an optimal effective aperture of roughly 5 mm. The simulations not only indicate that the effect of density should be modeled when using highly saline tracers, but more importantly that the constraints on the tracer trajectory obtained from the GPR difference images are necessary to obtain realistic estimates. We also plot (Figure 10b) the measured and (optimal) simulated curves for fractures with 0 and  $70$  degrees dip angle. Note that we use a normalized concentration for comparison purposes, since our modeling does not account for processes that would reproduce the lower mass recovery seen in the field data.

### 5.6. Breakthrough Curve Tailing

As discussed in section 2, previous fluorescent dye experiments measured power law breakthrough curve tailing, such as  $c(t) \sim t^{-1-b}$  at late time, with  $b$  ranging from 0.75 to 1, and concluded to a limited role of matrix diffusion in this low porosity granite [Kang et al., 2015]. The tailing behavior measured here is more pronounced, showing a behavior close to  $c(t) \sim t^{-1}$ . This strong tailing is thus likely induced by density effects affecting the transport of the saline tracer used in these experiments.

Our results (Figures 4 and 6, and 8) suggest a strong link between the tracer and GPR breakthrough curves. In Figure 11, we plot the tracer breakthrough curves for experiments I, II, and III. The repeatability of the push-pull experiments is evident in the tracer breakthrough curves for experiments I and II (same experimental parameters), while the tracer breakthrough curve for experiment III (a different injection location) indicates an early arrival time and a longer tail compared to the other two experiments. During the later part of the pulling period (between  $t = 100$  and  $t = 200$  min), the concentration of recovered tracer is higher in experiment III than in the other two experiments. This agrees well with the GPR difference sections (Figure 7) and the GPR breakthrough curves (Figure 8), which show persistent reflections arising from the lower region. The tailing in the tracer breakthrough curve, in light of the GPR results, can thus be attributed to tracer that has migrated downward during the resting time.

## 6. Conclusions and Outlook

Combined push-pull tracer tests and single-hole GPR monitoring experiments with a saline tracer provides important insights into a range of transport phenomena that can be observed *in situ* in fractured rocks. This includes characteristic length scales of transport, scale effects in transport velocities, ambient flow and density-driven migration, and trapping effects. The information contained in the single-hole GPR reflections helps to gain physical understanding of the processes that are responsible for the observed tracer breakthrough curves.

During a fixed antenna experiment, we measured a GPR breakthrough curve that was consistent with the tracer breakthrough curve and provided a means to investigate the rise and decay of tracer concentrations at different distances along the main fracture flow paths. This relationship was used to deduce a mean velocity of the saline tracer during the moving antenna experiments. During the push phase, we observed a scale effect in tracer displacement, with a transition from linear to radial flows. This suggests that a significant flow channeling controls transport until a characteristic scale of about 3 m, above which it follows a radial behavior. Our results demonstrate that GPR monitoring combined with push-pull saline tracer tests is useful to image flow channeling in fractured rocks, at least in the near field around boreholes.

We used a 2D flow and transport solver, modified to simulate flow in a parallel plate fracture, to show that, when density effects are significant, the peak tracer breakthrough time is highly sensitive to the fracture dip. Our modeling results suggest that a large dip is necessary to reproduce the early tracer arrival measured in the field and this is in agreement with the large dip seen in the GPR difference sections.

These experimental results offer new perspectives for combined hydrogeophysical modeling of fractured rock formations. In particular, the new insights obtained may be very useful for interpreting reactive tracer tests, often performed in push-pull configuration [Istok, 2012] since reaction rates are expected to depend on the spatial tracer distribution and its surface of exposure to the rock. To obtain quantitative information on tracer mass distribution *in situ*, we plan to couple flow-and-transport modeling with a recently developed approach to simulate GPR reflections from saline-occupied fractures of arbitrary orientation and aperture [Shakas and Linde, 2015].

### Acknowledgments

This research was supported by the Swiss National Science Foundation under grant 200021-146602 and by the French National Observatory H+ ([hplus.ore.fr/en](http://hplus.ore.fr/en)). We would like to thank Pavel Tomin and Ivan Lunati for their help with the MaFloT simulations, Antoine Armandine les Landes for fruitful discussions on modeling density effects and Valentin Guilbaut for his indispensable help in the field. The comments provided by Associate Editor Lee Slater, George Tsoufias, and two anonymous reviewers helped to significantly improve the manuscript. The data and input files required to reproduce the results are available from the first author upon request.

### References

- Andrićević, R., and V. Cvetković (1996), Evaluation of risk from contaminants migrating by groundwater, *Water Resour. Res.*, 32(3), 611–621, doi:10.1029/95WR03530.
- Becker, M. W., and A. M. Shapiro (2003), Interpreting tracer breakthrough tailing from different forced-gradient tracer experiment configurations in fractured bedrock, *Water Resour. Res.*, 39(1), 1024, doi:10.1029/2001WR001190.
- Becker, M. W., and G. P. Tsoufias (2010), Comparing flux-averaged and resident concentration in a fractured bedrock using ground penetrating radar, *Water Resour. Res.*, 46, W09518, doi:10.1029/2009WR008260.
- Belghoul, A. (2007), Caractérisation pétrophysique et hydrodynamique du socle cristallin, PhD thesis, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France.
- Berkowitz, B. (2002), Characterizing flow and transport in fractured geological media: A review, *Adv. Water Resour.*, 25(8), 861–884. doi:10.1016/S0309-1708(02)00042-8.
- Bradford, J. H., and J. C. Deeds (2006), Ground-penetrating radar theory and application of thin-bed offset-dependent reflectivity, *Geophysics*, 71(3), K47–K57.
- Bonnet, E., O. Bour, N. E. Odling, P. Davy, I. Main, P. Cowie, and B. Berkowitz (2001), Scaling of fracture systems in geological media, *Rev. Geophys.*, 39(3), 347–383, doi:10.1029/1999RG000074.
- Cvetković, V., S. Painter, N. Outters, and J. O. Selroos (2004), Stochastic simulation of radionuclide migration in discretely fractured rock near the Äspö Hard Rock Laboratory, *Water Resour. Res.*, 40, W02404, doi:10.1029/2003WR002655.

- Day-Lewis, F. D., J. W. Lane Jr., J. M. Harris, and S. M. Gorelick (2003), Time-lapse imaging of saline-tracer transport in fractured rock using difference-attenuation radar tomography, *Water Resour. Res.*, 39(10), 1290, doi:10.1029/2002WR001722.
- de Dreuzy, J.-R., Y. Méheust, and G. Pichot (2012), Influence of fracture scale heterogeneity on the flow properties of three-dimensional discrete fracture networks (DFN), *J. Geophys. Res.*, 117, B11207, doi:10.1029/2012JB009461.
- Dorn, C., N. Linde, T. Le Borgne, O. Bour, and L. Baron (2011), Single-hole GPR reflection imaging of solute transport in a granitic aquifer, *Geophys. Res. Lett.*, 38, L08401, doi:10.1029/2011GL047152.
- Dorn, C., N. Linde, J. Doetsch, T. Le Borgne, and O. Bour, (2012a), Fracture imaging within a granitic rock aquifer using multiple-offset single-hole and cross-hole GPR reflection data, *J. Appl. Geophys.*, 78, 123–132, doi:10.1016/j.jappgeo.2011.01.010.
- Dorn, C., N. Linde, T. Le Borgne, O. Bour, and M. Klepikova (2012b), Inferring transport characteristics in a fractured rock aquifer by combining single-hole ground-penetrating radar reflection monitoring and tracer test data, *Water Resour. Res.*, 48, W11521, doi:10.1029/2011WR011739.
- Dorn, C., N. Linde, T. Le Borgne, O. Bour, and J. R. de Dreuzy, (2013), Conditioning of stochastic 3-D fracture networks to hydrological and geophysical data, *Adv. Water Resour.*, 62, 79–89, doi:10.1016/j.advwatres.2013.10.005.
- Gouze, P., T. Le Borgne, R. Leprovost, G. Lods, T. Poidras, and P. Pezard (2008), Non-Fickian dispersion in porous media: 1. Multiscale measurements using single-well injection withdrawal tracer tests, *Water Resour. Res.*, 44, W06426, doi:10.1029/2007WR006278.
- Grégoire, C., and F. Hollender (2004), Discontinuity characterization by the inversion of the spectral content of ground penetrating radar (GPR) reflections: Application of the Jonscher model, *Geophysics*, 69(6), 1414–1424, doi:10.1190/1.1836816.
- Haggerty, R., S. A. McKenna, and L. C. Meigs (2000), On the late-time behavior of tracer test breakthrough curves, *Water Resour. Res.*, 36(12), 3467–3479, doi:10.1029/2000WR900214.
- Hubbard, S. S., and N. Linde (2011), Hydrogeophysics, in *Treatise on Water*, vol. 2, *Hydrology*, chap. 2.15, edited by S. Uhlenbrook, pp. 402–434, Elsevier, Amsterdam.
- Istok, J. D. (2012), *Push-Pull Tests for Site Characterization*, Springer, Berlin, doi:10.1007/978-3-642-13920-8.
- Jol, H. M. (2009), *Ground Penetrating Radar Theory and Applications*. Elsevier, Oxford, U. K., doi:10.1016/B978-0-444-53348-7.00019-3.
- Kang, P. K., T. Le Borgne, M. Dentz, O. Bour, and R. Juanes (2015), Impact of velocity correlation and distribution on transport in fractured media: Field evidence and theoretical model, *Water Resour. Res.*, 51, 940–959, doi:10.1002/2014WR015799.
- Künze, R., and I. Lunati (2012), An adaptive multiscale method for density-driven instabilities, *J. Comp. Phys.*, 231, 5557–5570, doi:10.1016/j.jcp.2012.02.025.
- Le Borgne T., and P. Gouze (2008), Non-Fickian dispersion in porous media: 2. Model validation from measurements at different scales, *Water Resour. Res.*, 44, W06427, doi:10.1029/2007WR006279.
- Le Borgne, T., O. Bour, J. R. de Dreuzy, P. Davy, and F. Touchard (2004), Equivalent mean flow models for fractured aquifers: Insights from a pumping tests scaling interpretation, *Water Resour. Res.*, 40, W03512, doi:10.1029/2003WR002436.
- Le Borgne, T., O. Bour, F. Paillat, and J.-P. Caudal (2006), Assessment of preferential flow path connectivity and hydraulic properties at single-borehole and cross-borehole scales in a fractured aquifer, *J. Hydrol.*, 328(1), 347–359, doi:10.1016/j.jhydrol.2005.12.029.
- Le Borgne, T., et al. (2007), Comparison of alternative methodologies for identifying and characterizing preferential flow paths in heterogeneous aquifers, *J. Hydrol.*, 345(3), 134–148, doi:10.1016/j.jhydrol.2007.07.007.
- Lunati, I., W. Kinzelbach, and I. Sørensen (2003), Effects of pore volume-transmissivity correlation on transport phenomena, *J. Contam. Hydrol.*, 67(1), 195–217, doi:10.1016/S0169-7722(03)00065-2.
- National Research Council (1996), *Rock Fractures and Fluid Flow: Contemporary Understanding and Applications*, Natl. Acad. Press, Washington, D. C., doi:10.1029/97EO000345.
- Nordqvist, R., and E. Gustafsson (2002), Single-well injection-withdrawal tests (SWIW): Literature review and scoping calculations for homogeneous crystalline bedrock conditions, technical rep. R-02-34 Swed. Nucl. Fuel and Waste Manage. Co., Stockholm, Sweden.
- Peterson, J. E., Jr. (2001), Pre-inversion corrections and analysis of radar tomographic data, *J. Environ. Eng. Geophys.*, 6(1), 1–18, doi:10.4133/JEG6.1.1.
- Ruelleu, S., F. Moreau, O. Bour, D. Gapais, and G. Martelet (2010), Impact of gently dipping discontinuities on basement aquifer recharge: An example from Plœmeur (Brittany, France), *J. Appl. Geophys.*, 70(2), 161–168, doi:10.1016/j.jappgeo.2009.12.007.
- Sen, P. N., and P. A. Goode (1992), Influence of temperature on electrical conductivity on shaly sands, *Geophysics*, 57(1), 89–96, doi:10.1190/1.1443191.
- Shakas, A., and N. Linde (2015), Effective modeling of ground penetrating radar in fractured media using analytic solutions for propagation, thin-bed interaction and dipolar scattering, *J. Appl. Geophys.*, 116, 206–214, doi:10.1016/j.jappgeo.2015.03.018.
- Tsoflias P. G., and M. W. Becker (2008), Ground-penetrating-radar response to fracture-fluid salinity: Why lower frequencies are favorable for resolving salinity changes, *Geophysics*, 73(5), J25–J30, doi:10.1190/1.2957893.

## Résumé

Les processus microbiens ont une importance déterminante dans la dynamique des processus réactifs dans les eaux souterraines. La compréhension de la variabilité spatiale et temporelle de ces phénomènes, et le développement de méthodes expérimentales de terrain, ouvrent de nouveaux champs de recherches et d'applications allant de la remédiation des aquifères contaminés à la compréhension des grands cycles biogéochimiques naturels.

Dans le premier volet de cette thèse nous présentons des observations de terrain permettant de comprendre le rôle des fractures sur la formation d'un « hot spot » d'activité microbienne en profondeur. Du fait de leur forte réactivité, ces « hot spots » peuvent dominer la dynamique biogéochimique des milieux souterrains, malgré leur faible extension spatiale. Nous avons ainsi analyser les conditions de formation d'un tapis microbien par des bactéries ferro-oxydantes à 60 mètres de profondeur sur l'observatoire de Ploemeur (réseau H+) alors que ces phénomènes ont été observé jusqu'à présent en surface. Les résultats de cette étude montrent que des circulations hétérogènes, liées à la structure des milieux fracturés, créent des zones mélanges entre des eaux riches en fer et des eaux oxygénées, à l'origine de ce hot spot microbien.

Le deuxième volet de ce travail de thèse a été consacré au développement d'une méthode innovante pour la mesure en continu de l'activité microbienne dans les eaux souterraines. La méthode est basée sur l'utilisation de la Fluoroscéine DiAcétate (FDA) dont le produit de réaction peut être mesuré en continu par un fluorimètre de terrain. Après avoir testé et validé les protocoles sur des solutions enzymatiques et des eaux naturelles en laboratoire, nous avons mis en œuvre cette technique sur le terrain au cours d'expériences de traçages réactifs. Un modèle cinétique nous a permis d'approcher les résultats obtenus en laboratoire, et de comparer nos résultats de terrain aux calibrations effectuées *in vitro*. Cette méthode ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour la caractérisation des processus biogéochimiques sur le terrain.

## Abstract

Microbial processes play a key role in controlling biogeochemical reactivity in groundwater. The understanding of the spatial and temporal variability of these phenomena and the development of novel experimental field methods, has opened new fields of research and applications, ranging from groundwater remediation to understanding of global biochemical cycles.

In the first part of this thesis, we present field observations providing new insights on the role of fractures in the formation of a hot spot of microbial activity. Because of their large reactivity, these hot spots can dominate the biogeochemical dynamics of subsurface systems, despite their small spatial extent. We have thus analyzed the conditions for the formation of a microbial mat composed of iron-oxidizing bacteria at 60 meters depth in the Ploemeur fractured rock observatory (H+ network) while these phenomena are usually observed at the surface. These results show that heterogeneous flowpaths, linked to the structure of fractured media, create mixing zones between iron rich water and oxygen rich water, at the origin of the microbial hot spot.

The second part of this work was devoted to the development of a novel method for a continuous measurement of microbial activity in groundwater. The method is based on the use of Fluorescein DiAcetate (FDA) whose product of reaction can be measured continuously by a field fluorimeter. After testing and validating protocols in the lab on enzymatic solutions and natural water, we have implemented this technic in the field in reactive tracer test experiments. A kinetic model allowed us to interpret the lab results, and to compare them to the field kinetics. This method thus opens new perspectives for the characterization of biogeochemical processes in the field.