HAL
open science

Catalyse biotique et abiotique de la réduction des nitrates en milieu alcalin dans le contexte du stockage profond des déchets radioactifs

Alexandra Bertron, Benjamin Erable, Marjorie Alquier, Nicolas Jacquemet, Caroline Kassim, Caroline Sablayrolles, Claire Albasi, Régine Basséguy, Pierre Strehaiano, Mireille Vignoles, et al.

To cite this version:

Alexandra Bertron, Benjamin Erable, Marjorie Alquier, Nicolas Jacquemet, Caroline Kassim, et al.. Catalyse biotique et abiotique de la réduction des nitrates en milieu alcalin dans le contexte du stockage profond des déchets radioactifs. Matériaux & Techniques, 2013, vol. 101 (1), pp. 104-1. 10.1051/mattech/2012054 . hal-00835302

HAL Id: hal-00835302

https://hal.science/hal-00835302

Submitted on 18 Jun 2013

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.

Copyright

Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO)
OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in: http://oatao.univ-toulouse.fr/
Eprints ID: 9070

To link to this article: DOI: 10.1051/mattech/2012054
URL: http://dx.doi.org/10.1051/mattech/2012054

To cite this version: Bertron, Alexandra and Erable, Benjamin and Alquier, Marjorie and Jacquemet, Nicolas and Kassim, Caroline and Sablayrolles, Caroline and Albasi, Claire and Basséguy, Régine and Strehaiano, Pierre and Vignoles, Mireille and Albrecht, Achim and Escadeillas, Gilles *Catalyse biotique et abiotique de la réduction des nitrates en milieu alcalin dans le contexte du stockage profond des déchets radioactifs.* (2013) Matériaux & Techniques, vol. 101 (n° 1). pp. 104-1-104-10. ISSN 0032-6895

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

DOI: 10.1051/mattech/2012054

Catalyse biotique et abiotique de la réduction des nitrates en milieu alcalin dans le contexte du stockage profond des déchets radioactifs*

A. Bertron[1], B. Erable[2], M. Alquier[2], N. Jacquemet[1], C. Kassim[2], C. Sablayrolles[3,4], C. Albasi[2], R. Basseguy[2], P. Strehaiano[2], M. Vignoles[3,4], A. Albrecht[5] et G. Escadeillas[1]

Résumé – Cette étude explore la réactivité des nitrates à l'interface bitume-béton dans une alvéole de stockage de déchets radioactifs de moyenne activité et à vie longue dans la perspective de déterminer les conditions redox qui s'y développeront. La première partie du travail visait à identifier, en conditions abiotiques (sans bactéries), les interactions entre deux composants du système : le béton (introduit sous forme de pâtes de ciment) et le bitume (simulé par des lixiviats modèles constitués de solutions d'acides organiques et de nitrates). La seconde partie de l'étude a été conduite en conditions biotiques avec deux espèces de bactéries hétérotrophes dénitrifiantes (*Pseudomonas stutzeri – Ps* et *Halomonas desiderata – Hd*) et avait pour but d'analyser la réaction de réduction des nitrates (cinétiques, sous-produits, rôle de la matière organique) en conditions de pH neutre à alcalin (caractéristiques de l'environnement chimique imposé par le béton). Les résultats ont montré que des interactions fortes se produisaient entre la matrice cimentaire et les acides organiques, acétique et oxalique, interactions susceptibles de réduire la biodisponibilité de cette matière organique (pour l'oxalate en particulier), et ont confirmé la stabilité des nitrates dans ces conditions. En conditions biotiques, les nitrates ont été réduits par *Ps* et *Hd* selon la voie métabolique de dénitrification anaérobie. Les cinétiques de réduction étaient plus élevées avec *Ps* mais les réactions étaient inhibées pour pH > 9. *Hd* était en revanche capable de réaliser la dénitrification jusqu'à pH 11 au moins.

Mots clés : Béton / nitrate / bitume / bactéries dénitrifiantes hétérotrophes / acides organiques

Abstract – Biotic and abiotic catalysis of nitrate reduction in alkaline environment of repository storage cell for long-lived intermediate-level radioactive wastes. This study investigates the reactivity of nitrates at the bitumen-concrete interface with the aim of determining redox conditions inside a repository storage cell for long-lived intermediate-level radioactive wastes. The first part of the work aimed to identify, under abiotic conditions, the interactions between two components of the system: concrete (introduced as cement pastes in the system) and bitumen (represented by leachates composed of organic acids and nitrates). The second part of the study was conducted under biotic conditions with selected denitrifying heterotrophic bacteria (*Pseudomonas stutzeri – Ps* and *Halomonas desiderata – Hd*) and aimed to analyse the microbial reaction of nitrate reduction (kinetics, by-products, role of the organic matter) under neutral to alkaline pH conditions (i.e. imposed by a concrete environment). Results showed that strong interactions occurred between cementitious matrices and acetic and oxalic organic acids, likely reducing the bioavalability of this organic matter (oxalate in particular). Results also confirmed the stability

* Cet article est écrit sur la base de la contribution au « XIème Forum Biodétérioration » qui a eu lieu les 4–5 juin 2012 à l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne. Le forum était organisé par la Commission « Biodétérioration des Matériaux » en collaboration avec la Commission « Construction – Bâtiment » du CEFRACOR.

[1] Université de Toulouse, UPS, INSA, LMDC (Laboratoire Matériaux et Durabilité des Constructions), 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4, France
bertron@insa-toulouse.fr
[2] Université de Toulouse, INPT, UPS, CNRS, Laboratoire de Génie Chimique, 4 Allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France
[3] Université de Toulouse, INP, LCA (Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle), ENSIACET, 4 allée Emile Monso, BP 44 362, 31432 Toulouse Cedex 4, France
[4] INRA, LCA (Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle), 31029 Toulouse, France
[5] Andra, 1-7 rue Jean-Monnet, 92298 Châtenay-Malabry, France

of nitrates under these conditions. Under biotic conditions, nitrates were reduced by both *Ps* and *Hd* following an anaerobic denitrification metabolic pathway. Reduction kinetics was higher with *Ps* but the reaction was inhibited for pH > 9. *Hd* was capable of denitrification at least up to pH 11.

Key words: Concrete / nitrate / bitumen / denitrifying heterotrophic bacteria / organic acids

1 Introduction

Cette étude s'inscrit dans le contexte du stockage des déchets radioactifs de moyenne activité et à vie longue (déchets B). Dans la perspective de leur stockage, les déchets radioactifs sont d'abord stabilisés dans une matrice de bitume puis coulés dans des fûts métalliques (colis primaire). Ces fûts sont agencés dans des colis en béton armé (colis secondaire), qui seront stockés dans des alvéoles en béton (barrière ouvragée) positionnées au sein d'une roche hôte (argilite du Callovo-Oxfordien, ou COx, constituant la barrière géologique) [1,2]. Après fermeture du stockage, la resaturation en eau des alvéoles (atteignant environ 97 % en quelques milliers d'années) devrait entrainer le relargage d'espèces chimiques parmi lesquelles, des sels solubles, dont des nitrates, et des matières organiques contenues dans les matrices bitumineuses [3], ou encore des gaz (H_2) issus de la radiolyse et/ou de la corrosion anaérobique des aciers noirs et inox (fûts et armatures de béton armé). Or, la présence des nitrates dans l'environnement des colis de déchets peut établir des conditions oxydantes propices à la mobilité de certains radionucléides [4]. En conditions biotiques (i.e. en présence de micro-organismes) et en présence de matière organique et/ou de H_2 comme donneurs d'électrons, les nitrates sont susceptibles d'être réduits [5], ce qui assurerait un retour à des conditions réductrices plus favorables à la sureté du stockage.

Le travail présenté ici vise à valider ce scénario en analysant la réactivité des nitrates à l'interface bitume – matrice cimentaire en conditions biotiques dans différentes configurations expérimentales simplifiées, afin

(i) de déterminer les interactions entre les différents composants du système (béton-bitume-bactéries),
(ii) d'identifier les sous-produits issus de la réactivité des nitrates (NO_2^-, NH_4^+, N_2...),
(iii) d'évaluer les cinétiques de réactions et,
(iv) de déterminer le rôle des microorganismes et de la matière organique dans ces réactions.

Dans un premier temps, les interactions matière organique-matrice cimentaire-nitrates ont été analysées en conditions abiotiques (sans micro-organismes). Des pâtes de ciment CEM V ont été immergées dans des solutions simulant des lixiviats modèles de bitumes et contenant des acides organiques et des nitrates. Les évolutions des concentrations des ions d'intérêt du système en solution et les modifications minéralogiques de la matrice cimentaire ont été déterminées. Dans un deuxième temps, le rôle de l'activité microbienne sur le devenir des nitrates a été exploré. Deux espèces de bactéries dénitrifiantes (capables de catalyser la réduction des nitrates) ont été considérées : *Pseudomonas stutzeri* (*Ps*), souche bactérienne neutrophile, et *Halomonas desiderata* (*Hd*), souche bactérienne alcalophile. La réaction microbienne a été étudiée en conditions simplifiées (systèmes fermés), c'est-à-dire dans des milieux synthétiques modèles simulant le relargage des matériaux d'intérêt du système.

2 Matériaux, matériels et méthodes

2.1 Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées pendant l'étude devaient répondre au cahier des charges suivant :

- *Bactéries dénitrifiantes* : pour favoriser la sécurité du stockage, les nitrates relâchés par les bitumes devaient être réduits en azote gazeux (N_2) pour maintenir des conditions réductrices strictes. La dénitrification microbienne, transforme les nitrates en azote gazeux et comporte plusieurs intermédiaires dont les ions nitrites et l'oxyde nitreux : $NO^-_{3(aq)} \rightarrow NO^-_{2(aq)} \rightarrow NO_{(\text{complexe enzymatique})} \rightarrow N_2O_{(\text{gaz})} \rightarrow N_{2(\text{gaz})}$ [6]. Seules des souches pures dénitrifiantes capables de synthétiser la chaîne enzymatique complète menant jusqu'au stade N_2 ont été retenues.
- *Hétérotrophes* (utilisant le carbone organique comme substrat et source d'énergie) : l'étude porte sur la réduction des nitrates en présence de matière organique (donneur d'électrons) relâchée par les bitumes (acides carboxyliques en particulier).
- *Anaérobies strictes ou aéro-anaérobies facultatives* : à long terme, des conditions anaérobies prévaudront dans le stockage.
- *Neutrophiles ou alcalophiles* ($7 < \text{pH} < 11{,}5$) : un environnement alcalin sera imposé par le relargage du béton des alvéoles et des colis secondaires. Des zones avec des pH locaux plus acides (interface bitume) ne sont cependant pas à exclure.
- *Mésophiles* (<30 °C) : L'alvéole destinée au stockage des déchets bituminés (type B) est dimensionnée pour limiter la température à 30 °C.

Parmi les bactéries éligibles recensées dans la littérature [7], notre choix s'est porté sur deux souches non pathogènes, *Pseudomonas stutzeri* (*Ps*), neutrophile [8] et *Halomonas desiderata* (*Hd*), alcalophile [9]. Ces souches sont fournies par DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Allemagne) sous forme déshydratée, puis réhydratées en laboratoire et maintenues sous forme de cultures actives sur des géloses nutritives selon les recommandations du fournisseur.

La souche *Ps* est aéro-anaérobie facultative, son pH optimal et sa température optimale de croissance sont respectivement de 7,0 et 37 °C. Le maintien de sa croissance

a été réalisé en conditions aérobies dans un milieu riche (peptone 5 g/l, extrait de viande 3 g/l, eau distillée qsp 1 L). En conditions anaérobies, la bactérie est capable de se développer en présence de nitrate mais dans un milieu minimum (acétate 300 mg/l, KNO_3 1 g/l, K_2HPO_4 1 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l, Na_2SO_4 0,054 g/l, $MgCl_2$ 0,025 g/l, Eléments traces 1 ml, Eau distillée qsp 1 l).

Pour *Hd*, le maintien de la culture active est également préférentiellement réalisé en aérobiose mais à 30 °C et à un pH optimal de 9,5–10 dans un milieu composé de glucose 5 g/l, $MgCl_2$ 0,2 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, Na_2CO_3 5,4 g/l, $NaHCO_3$ 4,2 g/l, eau distillée qsp 1 l. Cependant, la souche ne peut pas se développer en conditions anaérobies dans ce type de milieu sans une source azotée. Le milieu minéral utilisé en conditions anaérobie était similaire à celui décrit par [10] : il contenait notamment une source de carbone (Na-acétate dans cette étude, 0,3 g/l) et des nitrates (KNO_3, 1 g/l).

2.2 Matériaux

2.2.1 Matrices cimentaires

Des pâtes de ciment à base de ciment CEM V/A 42,5 (S-V) 42,5 N CE PM-ES-CP1 (ciment au laitier et aux cendres) de l'usine Calcia d'Airvault, ont été fabriquées. Le rapport eau/ciment a été pris égal à 0,4. Les éprouvettes ont été coulées dans des moules cylindriques en plastique (Ø = 2,7 cm et h = 5,0 cm, volume = 28,6 cm^3 et aire de surface = 53,9 cm^2) non enduits d'huile de décoffrage et passées à la table vibrante pour favoriser l'évacuation des bulles d'air. Les éprouvettes ont été démoulées 24 h après le coulage puis conservées dans l'eau à température ambiante pendant 27 jours (période de cure).

2.2.2 Solutions modèles de lixiviats de bitume

Des incertitudes persistent sur le relâchement de matière organique et inorganique lors de la lixiviation et de la radiolyse des colis bitumés. Des études expérimentales ont montré que la dégradation des bitumes entraînait la libération de matières organiques et de sels [11–14]. Sur la base de ces données bibliographiques, le vieillissement (ou relargage en solution) du bitume a été simulé par des solutions de nitrates et d'acides organiques. La détermination des concentrations en nitrates de ces solutions s'est appuyée sur les travaux de modélisation couplant phénomènes chimiques et transferts de matière au sein du stockage développés par l'Andra pour l'étude du transfert des nitrates dans l'environnement des déchets [15, 16]. Le choix des acides et de leurs concentrations s'est basé également sur les travaux expérimentaux de [3, 11, 14, 17, 18].

Les concentrations en nitrates (NO_3^-) des solutions modèles étaient de 32,3 mM (2 g/l) pour les expériences réalisées en conditions abiotiques et de 9,7 mM (600 mg/l) en conditions biotiques. Les nitrates ont été introduits sous forme de sels de $NaNO_3$.

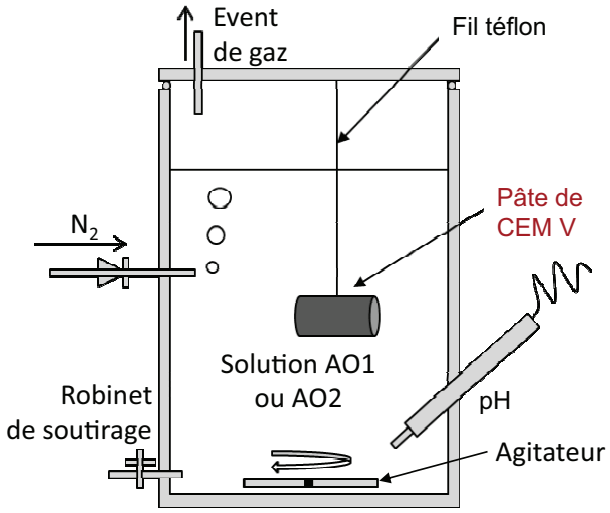

Fig. 1. Schéma du réacteur pour les expériences en conditions abiotiques.

Fig. 1. Experimental device for abiotic experiments.

Deux types de solutions acide ont été considérés dans les expériences réalisées en conditions abiotiques. Le premier type était constitué d'acide acétique seul à 0,5 mM (30 mg/l) à pH 4,0. Le second type de solution correspondait à un mélange d'acides organiques à même concentration totale en acides (0,5 mM) composé de 2/3 d'acide acétique (0,33 mM) et 1/3 d'acide oxalique (0,17 mM), l'oxalate étant réputé très complexant pour la matrice cimentaire [19, 20]. Le pH de cette solution était de 3,7. Ces deux solutions, additionnées de nitrates (32,3 mM), ont été notées N+AO1 et N+AO2, respectivement.

Pour les expériences réalisées en présence de bactéries, seul l'acide acétique (5 mM ou 300 mg/l) a été considéré car une étude préalable a montré qu'il s'agissait du composé le plus facilement assimilable par les bactéries sélectionnées lors de la réaction de dénitrification dans le temps des expériences. En comparaison, les acides formique et oxalique n'étaient pas utilisables par les souches sélectionnées, dans le temps des expériences.

2.3 Protocoles expérimentaux

2.3.1 Expériences en système fermé abiotique

Le dispositif expérimental mis en œuvre pour les expériences en conditions abiotiques est schématisé sur la figure 1.

Le réacteur, rempli avec 1 l de solution N+AO1 ou N+AO2, comprenait notamment un robinet de soutirage pour le prélèvement de fluide pendant l'expérience, une entrée de gaz avec clapet anti-retour (permettant d'effectuer un bullage avec du N_2 pour imposer des conditions anaérobies dans le réacteur), un piquage hermétique pour une sonde pH et un couvercle muni d'un évent pour le gaz. Le couvercle du réacteur était fermé hermétiquement.

La sonde de pH était reliée à un système d'acquisition de données (Consort, D230 Data Acquisition System, v1.1.13). La solution du réacteur était agitée en continu par un barreau magnétique. La matrice cimentaire (cylindre Ø = 2,7 cm et h = 5,0 cm) était suspendue dans la solution par un fil en Téflon. Le rapport volumique solide/liquide était de 3 %. Le dispositif expérimental était placé dans une pièce climatisée à 25 °C pendant toute la durée des expériences.

Les solutions N+AO1 (acide acétique 0,5 mM ; NO_3^- 32,23 mM) et N+AO2 (acides acétique 0,33 mM et oxalique 0,17 mM ; NO_3^- 32,23 mM) ont été renouvelées quotidiennement pendant 5 jours. Au cours du premier jour d'exposition, 4 prélèvements de solution ont été réalisés dans le réacteur. Les jours suivants, un échantillon de solution a été prélevé sur le volume renouvelé. Sur chacun des prélèvements, les concentrations en Ca, K, acétate, nitrate, nitrite ont été mesurées.

2.3.2 Expériences en système fermé biotique

Les expériences ont été réalisées en batch (ou culture discontinue), c'est-à-dire dans un système clos sans ajout ni élimination de milieu réactionnel au cours de l'expérience. Les bioréacteurs étaient des flacons hermétiques, en verre sertis à l'aide de bouchons en caoutchouc et de capsules métalliques assurant une étanchéité parfaite, contenant 50 ml de milieu réactionnel liquide. L'ensemencement (ou inoculation) des bioréacteurs a été réalisé avec 1 ml de pré-culture bactérienne (*Ps* ou *Hd*). Après l'ensemencement, des conditions anaérobies ont été imposées dans le bioréacteur en dégazant le milieu réactionnel avec un bullage continu de N_2 pendant 10 min. Les réacteurs étaient ensuite incubés à la température optimale de croissance de la bactérie sous agitation (150 tours par minute) pendant plusieurs jours. Des prélèvements réguliers (intervalles de temps : 5 à 10 h) ont été effectués au moyen de seringues et d'aiguilles stériles pour le suivi analytique : 1 ml était prélevé pour une mesure immédiate de densité optique et 2 ml étaient prélevés, filtrés sur 0,2 μm puis stockés en Eppendorfs au congélateur à –18 °C pour les analyses anioniques.

2.4 Méthodes analytiques

2.4.1 Méthodes microbiologiques

La concentration cellulaire bactérienne a été suivie par mesure de la densité optique (DO) par spectrophotométrie (Spectrophotomètre Jenway 7305. UV – Visible) à 550 nm pour *Pseudomonas stutzeri* et 600 nm pour *Halomonas desiderata.* La numération totale des bactéries a été réalisée à l'aide d'un examen microscopique sur une cellule de Malassez et a permis de corréler la densité cellulaire (exprimée en nombre de bactéries par ml) à la densité optique.

2.4.2 Méthodes de dosage chimique des solutions aqueuses

Les concentrations en anions (acétate, oxalate, nitrate, nitrite) et en cations (calcium, potassium) ont été mesurées par chromatographie ionique haute performance couplée à un détecteur conductimétrique avec suppresseur chimique (Dionex ICS-2000 et ICS-3000). Les conditions analytiques ont été rassemblées dans le tableau 1.

La quantification a été réalisée par étalonnage externe avec une gamme allant de 1 à 40 mg/l avec un coefficient de régression égal à 0,999 obtenu à partir de l'aire des pics. La répétabilité des mesures a été évaluée sur 5 injections et est inférieure à 2 %. L'erreur de justesse était comprise entre 5 et 10 %. Les limites de détection, définies, pour chaque composé, comme les quantités injectées donnant un rapport signal sur bruit égal à 3, et les limites de quantification, définies comme les quantités injectées donnant un rapport signal sur bruit égal à 10, ont été calculées.

Les échantillons à analyser ont été filtrés sur 0,2 μm (Minisart PES, Fisher Scientific) pour éliminer les microorganismes et matières en suspension [21–23].

2.4.3 Méthode de caractérisation minéralogiques des matériaux cimentaires

À la fin des expériences en conditions abiotiques, les pâtes de ciment ont été soumises à des analyses par Diffraction des Rayons X (SIEMENS D5000, anticathode : Co, tension : 40 kV, courant : 30 mA). Les analyses ont été réalisées en fonction de la distance par rapport à la surface en contact avec la solution agressive. Les premiers diffractogrammes ont été acquis, pour chaque échantillon, sur la surface plane des cylindres de pâte de ciment. Les diffractogrammes « témoin » ont été acquis sur une section droite de cylindre située à 10 mm environ de la surface (après sciage de l'échantillon perpendiculairement à son axe). Les analyses intermédiaires ont été réalisées après abrasion successive de la surface en utilisant un disque de polissage. La profondeur d'analyse a été mesurée au pied à coulisse.

3 Résultats et discussion

3.1 Interactions matrice cimentaire-bitumes-nitrates en conditions abiotiques

3.1.1 Caractérisation chimique des solutions agressives

Les concentrations en K^+ et Ca^{2+} dans les prélèvements effectués à différentes échéances lors des lixiviations de la matrice cimentaire par la solution N+AO2 sont présentées dans la figure 2. La concentration en ions hydroxyde, déduite de la mesure du pH en continu, est également représentée. Les résultats obtenus pour la solution N+AO1 étant similaires, ils ne sont pas présentés.

Le pH évolue de façon similaire lors des 5 séquences de 24 h : de sa valeur initiale (4,0 pour la solution N+AO1 et 3,6 pour la solution N+AO2), il augmente rapidement et

Tableau 1. Conditions opératoires de la chromatographie ionique haute performance.
Table 1. HPIC test conditions.

	Eluant (1 ml/min)	Pré-colonne	Colonne chromatographique	Suppresseur
Anions	KOH (1×10^{-3} mol/l) Gradient d'élution : 10 % phase mobile à 60 % phase mobile en 25 min	NG1 (4 × 50 mm, Dionex) + IonPac AG11-HC (4 × 50 mm, Dionex)	IonPac AS11-HC (4 × 250 mm, Dionex)	ASRS 300 (4 mm, Dionex) + CRD 200 (4 mm, Dionex)
Cations	Acide méthylsulphonique (30×10^{-3} mol/l) Isocratique (30 min)	NG1, (4 × 50 mm, Dionex) + IonPac CG16 (4 × 50 mm, Dionex)	IonPac CS16 (4 × 250 mm, Dionex)	Suppresseur CSRS 300 (4 mm, Dionex)

Tableau 2. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) des cations et anions en μmol/l (S/B = Signal/Bruit).
Table 2. Detection and quantification limits (LD and LQ) of ions (μmol/l) (S/B = Signal/Noise).

	Acétate	Oxalate	Nitrite	Nitrate	Potassium	Calcium
LD (3 < S/B)	0,68	0,79	1,74	2,42	0,402	0,764
LQ (10 < S/B)	2,04	2,61	6,09	8,06	1,339	2,546

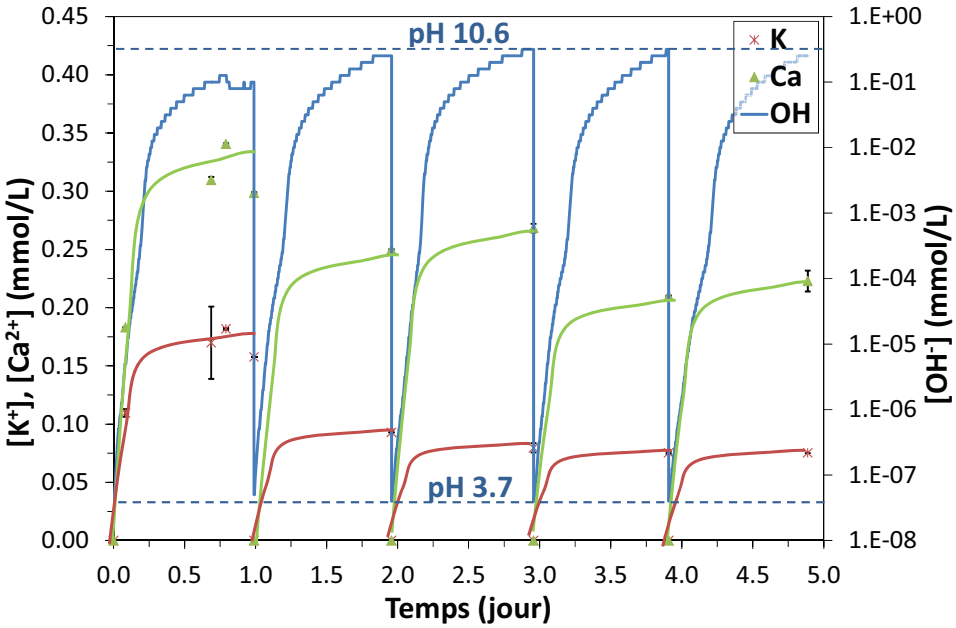

Fig. 2. Concentrations en K^+, Ca^{2+} et OH^- dans la solution de lixiviation N+AO2 (nitrates et acides acétique/oxalique). Solution renouvelée tous les jours. Concentration en OH^- déduite de la mesure continue de pH. Pour les jours 2, 3, 4 et 5, les évolutions des concentrations en K et Ca ont été représentées à partir des évolutions modélisées sur le jour 1.

Fig. 2. Concentrations of K^+, Ca^{2+} et OH^- in N+AO2 solution (nitrates and acetic/oxalic acids). Solution renewed daily. Concentration of OH^- calculated from pH. On days 2, 3, 4 et 5, evolutions of K and Ca concentrations were drawn from evolution modeled on day 1.

atteint 10,5 environ au bout de 24 h pour les deux types de solution.

Les concentrations en K^+ et Ca^{2+} évoluent de manière similaire. Au cours de la 1e lixiviation, les variations suivent celles du pH et les concentrations atteignent $[Ca^{2+}] \approx 0{,}35$ mmol/l et $[K^+] \approx 0{,}20$ mmol/l.

Sur les lixiviations 2 à 5, les concentrations en fin de cycle diminuent progressivement pour atteindre $[Ca^{2+}] \approx 0{,}25$ mmol/l et $[K^+] \approx 0{,}10$ mmol/l en fin de 5e lixiviation. Ces évolutions sont typiques d'une matrice cimentaire lixiviée.

Ces cinétiques d'évolution du pH et de lixiviation des éléments cimentaires en solution sont très rapides et orientent le choix des espèces bactériennes à utiliser pour l'étude vers des espèces alcalophiles.

Les concentrations en nitrates des solutions N+AO1 et N+AO2 (Tab. 3) restent stables au cours du temps et elles sont équivalentes à la quantité initialement introduite (32,3 mM). Les nitrites n'ont pas été détectés dans la solution N+AO1. Pour N+AO2, un pic éventuellement attribuable aux nitrites est présent sur les chromatogrammes dans les solutions finales des lixiviations 3, 4

Tableau 3. Concentrations (mM) des anions dans les solutions N+AO1 et N+AO2 lors de la lixiviation de la matrice cimentaire. Solution renouvelée tous les jours. <LD : inférieur à la limite de détection <LQ : inférieur à la limite de quantification.

Table 3. Concentrations (mM) of anions in N+AO1 and N+AO2 solutions. Solution renewed daily. <LD: lower than detection limit <LQ: lower than quantification limit.

Temps (j)	Solution AO1			Solution AO2			
	[Ac]	[NO_3]	[NO_2]	[Ac]	[Ox]	[NO_3]	[NO_2]
0,00	0,57	31,64	<LD	0,37	0,17	31,83	< LD
0,08	0,53	31,87	<LD	0,30	0,05	32,05	<LD
0,67	0,62	31,39	<LD	0,26	0,07	31,73	<LD
0,79	0,60	31,66	<LD	0,34	0,07	31,73	<LD
1,00	0,61	31,62	<LD	0,34	0,06	31,79	<LD
2,04	0,55	31,81	<LD	0,32	0,05	31,68	<LQ
3,04	0,52	31,71	<LD	0,28	0,06	31,90	<LQ
3,99	0,47	31,71	<LD	0,31	0,05	31,68	<LQ
4,97	0,56	31,64	<LD	0,30	0,05	31,79	<LQ

et 5, mais la concentration associée est inférieure à la limite de quantification et est donc négligeable par rapport à la quantité de nitrates. Par ailleurs, les chromatogrammes des cations n'ont pas fait apparaitre de pic attribuable à l'ammonium, produit de la réduction abiotique des nitrates en condition anoxiques, observé notamment par Truche et al. [24] et Alquier et al. [7] en présence de différents types d'acier agissant comme catalyseur de réaction et/ou donneur d'électrons. Les résultats obtenus dans cette étude indiquent qu'aucune réduction abiotique des nitrates n'a eu lieu dans les conditions de l'expérience.

Les concentrations en acétate des solutions N+AO1 et N+AO2 sont quasiment constantes durant l'expérience et similaires aux concentrations initiales (Tab. 3). En revanche, la concentration en oxalate, initialement de 0,17 mmol/l, diminue dès la première échéance de prélèvement (0,08 j $\sim$ 2 h) et reste relativement stable et égale à 0,06 $\pm$ 0,01 mmol/l dans les différents prélèvements.

3.1.2 Caractérisation minéralogique des pâtes de ciment

La figure 3 présente les caractérisations minéralogiques par DRX des échantillons de pâte de ciment à la fin des expériences de lixiviation dans la solution AO2 (acide acétique 2/3 + oxalique 1/3).

Les spectres des zones témoins (cœur ou zone 1, analyse à 10 mm de profondeur) des pâtes de CEM V présentaient les pics caractéristiques des phases cimentaires cristallisées anhydres (C_3S[6] ou $3CaO.SiO_2$, C_2S ou $2CaO.SiO_2$, mullite $Al_{4,56}Si_{1,44}O_{9,72}$) et hydratées (ettringite ($C_3A.3C\overline{S}.H_{32}$ où $\overline{S} = SO_3$) ou $3CaO.Al_2O_3.3CaSO_4.32H_2O$, portlandite CH ou $Ca(OH)_2$, aluminates de calcium hydratés C_4AH_x ou $4CaO.Al_2O_3.xH_2O$) et du quartz. La zone périphérique, zone où l'échantillon a subi des modifications minéralogiques, avait une épaisseur d'environ 1,3 mm pour les échantillons immergés dans AO2 (acide acétique + oxalique). Elle comportait 3 zones de caractéristiques minéralogiques distinctes (zones 2 à 4). La portlandite a disparu de la zone 2 (400 à 1300 μm de profondeur) où un composé de type hydrotalcite ($Mg_4Al_2(OH)_{14}.3H_2O$) a précipité ainsi que de la calcite. La précipitation d'hydrotalcite a également été observée par Faucon et al. [25] dans la zone dégradée de pâtes de ciments lixiviées à pH7. La zone 3 (300 à 400 μm de profondeur) était le siège de la disparition de l'ettringite et de la précipitation de calcite et de whewellite ou oxalate de calcium mono-hydraté ($C_2CaO_4.H_2O$). La zone 4 (de la surface à 300 μm de profondeur) présentait les pics caractéristiques de la calcite, de la whewellite et de l'oxalate de calcium tri-hydraté ($C_2CaO_4.3H_2O$). La précipitation de whewellite lors de l'exposition de pâtes de ciment à de l'acide oxalique a également été observée par Larreur-Cayol et al. [20]. L'oxalate de calcium tri-hydraté [26] est une forme a priori peu stable d'oxalate de calcium ; néanmoins sa précipitation, conjointe à celle du mono-hydrate, a déjà été observée à de nombreuses reprises [27, 28]. Aucun pic caractéristique d'un sel d'acétate ou d'oxalate de sodium n'a, par ailleurs, été détecté.

La zone périphérique des échantillons immergés dans AO1 (acide acétique, résultats non présentés), d'épaisseur d'environ 1 mm, comptait 2 zones de minéralogies différentes (zones 2 et 3). La zone 2 avait les mêmes caractéristiques que la zone homologue de l'échantillon immergé dans AO2. La zone 3, d'épaisseur 150 μm environ, était carbonatée, toutes les autres phases cristallisées de la matrice cimentaire ayant disparu. Cette fine couche carbonatée était également observée sur les échantillons de pâte de CEM V témoins conservés en eau (carbonatation de la peau des échantillons du fait du contact avec le CO_2 ambiant et dissous dans l'eau de conservation). Aucun pic caractéristique d'un sel d'acétate n'a été détecté dans l'échantillon.

Ces résultats d'analyses minéralogiques des matrices cimentaires couplés à ceux des analyses chimiques des solutions montrent que l'exposition de la pâte de CEM V à la solution d'acide acétique seul s'apparentait à une

[6] En notation cimentaire : C = CaO, S = SiO_2, A = Al_2O_3, H = H_2O, $\overline{S} = SO_3$.

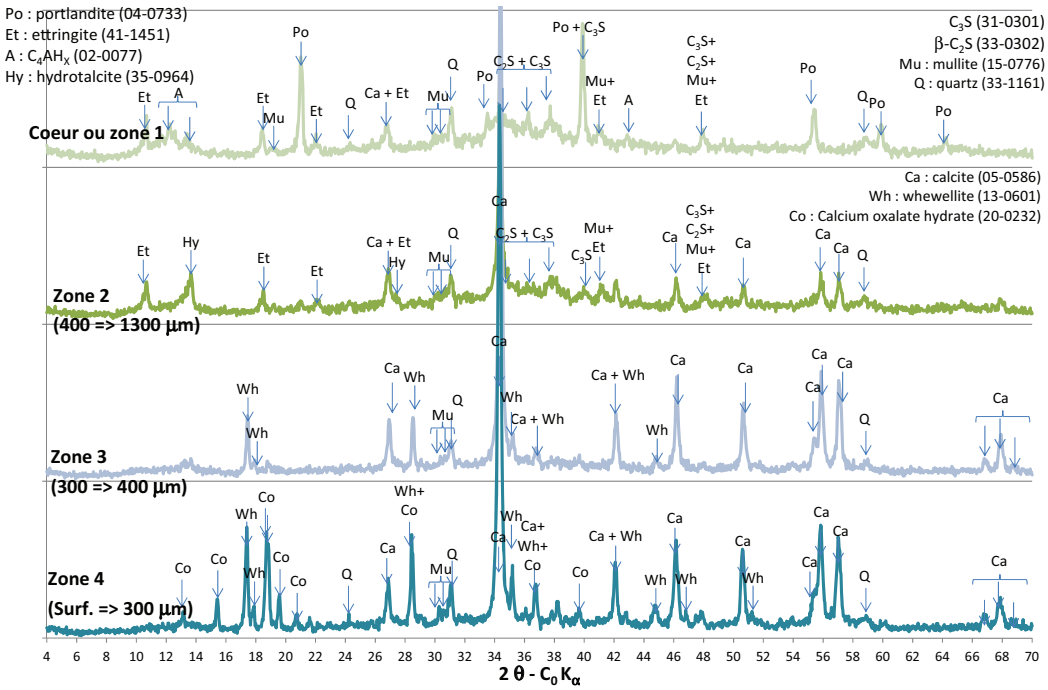

Fig. 3. Analyses minéralogiques par DRX de la pâte de CEM V après lixiviation par la solution AO2 (acides acétique et oxalique –nitrate) en fonction de la distance par rapport à la surface en contact avec la solution.

Fig. 3. Mineralogical analyses by XRD of CEM V pastes after leaching by AO2 solution (acetic/oxalic acids – nitrate) as a function of the distance to the surface of the specimen.

lixiviation de matrice cimentaire classique, l'ion acétate ne se recombinant pas avec les cations libérés par la matrice. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par ailleurs [29, 30]. En outre, les résultats de l'étude numérique de Larreur-Cayol et al. [31] suggère que, dans les conditions des expériences, aucun complexe aqueux calcium-acétate n'est en mesure de se former en solution. En revanche, l'immersion de la matrice cimentaire dans la solution d'acides acétique et oxalique conduit à la précipitation d'oxalates de calcium diminuant, de fait, la concentration en anions oxalate en solution et donc leur biodisponibilité en solution.

3.2 Réduction biotique des nitrates

3.2.1 Croissance bactérienne et influence du pH

L'influence du pH sur les cinétiques de croissance des souches bactériennes dénitrifiantes *Ps* et *Hd* a été évaluée en milieu modèle contenant des concentrations en acide acétique de 300 mg/l (5 mM) et en nitrate de 600 mg/l (9,7 mM). La gamme de pH initial testée s'étendait de 7 à 11. Les courbes de croissance bactérienne, obtenues par le suivi de la DO (550 nm pour *Ps*, 600 nm pour *Hd*) sont reportées sur la figure 4.

Pour *Pseudomonas stutzeri*, la croissance a été étudiée dans trois conditions de pH initiaux : pH 7, pH 9 et pH 10 (Fig. 4a). La croissance démarrait quasi-instantanément à pH 7,0, alors qu'elle ne débutait qu'après 10 h d'incubation à pH 9,0. À ce pH, la cinétique de croissance bactérienne était nettement ralentie : la phase exponentielle durait quasiment 3 fois plus longtemps qu'à pH 7,0 (32 h et 10 h respectivement). L'évaluation des vitesses de croissance atteintes pendant cette phase a révélé des valeurs de $1{,}6 \times 10^7$ bactéries/ml/h à pH 7,0 contre seulement $0{,}3 \times 10^7$ bactéries/ml/h à pH 9,0. À pH 10, la croissance de *Ps* était totalement inhibée.

La souche *Halomonas desiderata* est connue pour son caractère alcalophile, son pH optimal de croissance se situant aux alentours de pH 9,5. La croissance de la souche *Hd* a donc été étudiée dans une gamme de pH plus alcalins : pH 9, pH 10 et pH 11 (Fig. 4b). Quel que soit le pH initial du milieu réactionnel, la croissance de *Hd* ne démarrait qu'après une phase de latence dont la durée dépendait du pH : plus le pH était élevé, plus la phase de latence était longue (de 24 h à pH 9 à 72 h à pH 11). De la même façon, la cinétique de croissance était fortement influencée par le pH. Plus le pH était basique, plus la cinétique de croissance d'*Halomonas desiderata* était lente. La souche n'était cependant pas totalement inhibée dans un environnement très alcalin, i.e. proche de 11, et la croissance restait possible dans ces conditions. Aussi, une faible consommation des substrats, évaluée respectivement à 0,25 mg/l/h et 0,36 mg/l/h pour l'acétate et les nitrates (soit $4{,}1 \times 10^{-3}$ mM/l/h et $5{,}8 \times 10^{-3}$ mM/l/h), a pu également être constatée. La présence, voire le développement, de *Hd* localement dans des zones où le pH est encore plus alcalin (>pH 10.6), i.e. au voisinage très proche de la matrice cimentaire voire même au contact direct de celle-ci, est une piste sérieuse

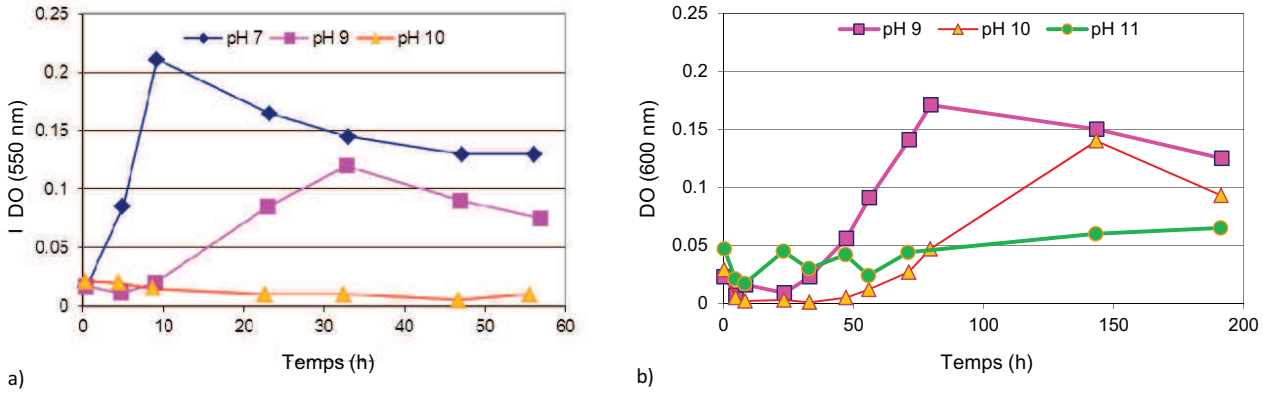

Fig. 4. Suivi de la croissance de (a) *Pseudomonas stutzeri* et (b) *Halomonas desiderata* à différents pH en présence de 300 mg/l d'acide acétique (5 mM) et d'un excès de nitrates (600 mg/l–8,07 mM pour *Ps* et 800 mg/l pour *Hd*).

Fig. 4. Bacterial growth monitoring of (a) Pseudomonas stutzeri and (b) Halomonas desiderata at different pH with acetic acid 300 mg/l (5 mM) and excess nitrate (600 mg/l–8,07 mM for Ps and 800 mg/l for Hd).

à envisager mais sur des campagnes d'étude longues (plusieurs semaines à plusieurs mois).

En conclusion, bien que la cinétique de croissance bactérienne soit impactée par l'augmentation de pH, cette expérience montre que *Halomonas desiderata* est bien capable de croître dans des milieux à pH alcalins ($9 < \text{pH} < 11$) contrairement à la souche *Pseudomonas stutzeri*.

3.2.2 Réaction bactérienne

La figure 5 présente l'évolution des concentrations en composés d'intérêt (acétate, nitrate, nitrite) dans le milieu réactionnel au cours de tests de croissance bactérienne réalisés en systèmes fermés avec *Pseudomonas stutzeri*, au pH initial de 7, d'une part, et *Halomonas desiderata* au pH initial de 9,7, d'autre part. Au démarrage des tests de croissance, les milieux réactionnels contenaient 300 mg/l (5,0 mM) d'acétate et 600 mg/l (9,7 mM) de nitrate.

Pour *Ps*, l'acétate a été consommé dans son intégralité durant les 10 premières heures. Simultanément, les nitrates ont été consommés (335 mg/l) et seule une faible proportion de nitrates a été convertie au stade des nitrites (32,8 mg/l). Au-delà de 10 h, la réaction de dénitrification était terminée et les concentrations de tous les composés encore présents dans le milieu de culture sont restés stables. En outre, dans une expérience similaire réalisée par ailleurs (résultats non présentés), des ions ammonium NH_4^+ ont été ajoutés (300 mg/l) au milieu contenant *Ps* afin d'explorer une éventuelle réaction de réduction des nitrates faisant intervenir ces cations. La concentration en ions ammonium, initialement présents dans le milieu modèle n'a pas varié pendant l'expérience. Ces ions n'étaient donc ni consommés ni produits au cours de l'expérience : la réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (réalisée par l'intermédiaire des réductases du micro-organisme en conditions anaérobies [6]) est donc une voie de moindre importance.

Dans le cas de *Hd*, l'oxydation de l'acétate et la réduction du nitrate ont été également observées simultanément. Cependant, 200 h au minimum ont été nécessaires pour achever la réaction de dénitrification contre seulement 10 h avec *Ps*. La cinétique de dénitrification en conditions hétérotrophes était donc nettement ralentie à pH alcalin.

Il est à noter que la production de nitrite est variable : elle peut être négligeable et temporaire à pH alcalin pour *Hd* (8 mg/l ou 0,17 mM formés puis immédiatement réduits, soit 1,8 % du nitrate dans la Fig. 4b), d'environ 7,5 % de la quantité de nitrate initialement présente pour *Ps* à pH neutre (34 mg/l soit 0,74 mM de nitrites au maximum en solution) (Fig. 4a), voire même atteindre 67 % de la quantité molaire initiale de nitrates pour *Hd* à pH 9 [7]. L'origine de ce phénomène, probablement d'ordre environnemental, n'a pas été approfondi dans le cadre de cette étude.

En complément, aucune croissance bactérienne de *Ps* ou *Hd* n'a été observée dans le temps des expériences en absence de nitrate [7]. Également, la concentration en ammonium mesurée à l'aide d'un kit colorimétrique reste négligeable et inférieure à la limite de quantification du test (<0.5 mg/l) tout au long de la réaction. En conclusion, la réduction des nitrates est donc, en conditions anaérobies, l'unique voie métabolique permettant aux espèces bactériennes *Pseudomonas stutzeri* et *Halomonas desiderata* d'évacuer les électrons issus de l'oxydation de la matière organique, ici l'acétate.

En théorie, il est possible de dégager des pistes pour la détermination des sous-produits de la réaction de dénitrification à l'aide des équations stœchiométriques (1), (2) et (3) correspondant respectivement aux cas d'une réduction incomplète (par exemple, formation de NO_2^-), d'une dénitrification complète (i.e. formation de N_2) et d'une réaction de dénitrification complète avec prise en compte de la biomasse [32].

Dénitrification incomplète :

$$CH_3COO^- + 4NO_3^- + H^+ \rightarrow 4NO_2^- + 2CO_2 + 2H_2O. \quad (1)$$

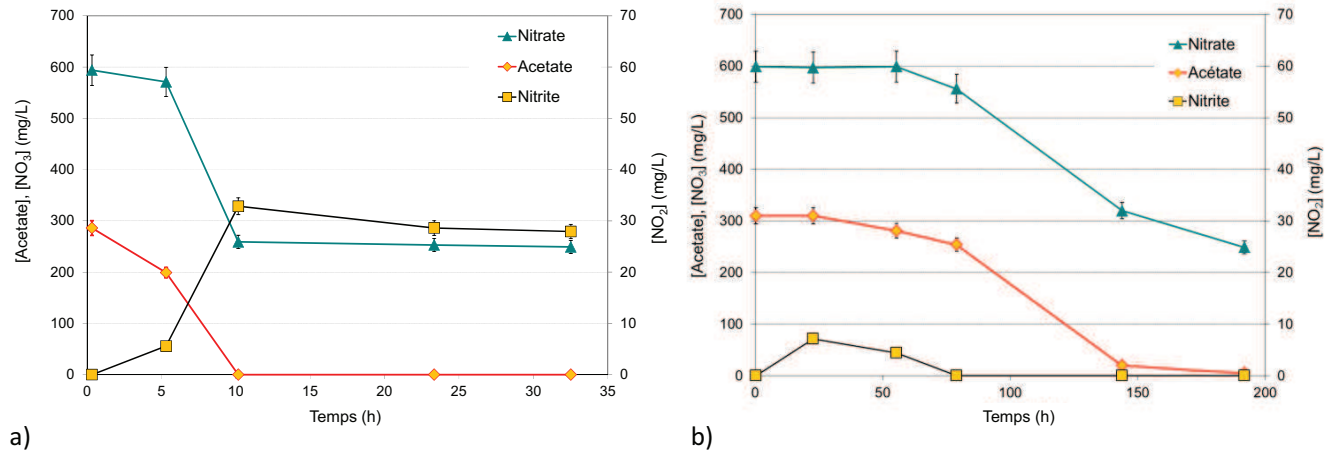

Fig. 5. Suivi analytique des différents composés au cours de la réaction de dénitrification en présence de 350 mg/l d'acétate et d'un excès de nitrate (620 mg/l) avec les bactéries (a) *Ps* et (b) *Hd*.

Fig. 5. Concentration of the different compounds during denitrification reaction with 350 mg/l acetate and excess nitrate (620 mg/l) with (a) Ps and (b) Hd bacteria.

Dénitrification complète :

$$5CH_3COO^- + 8NO_3^- + 13H^+ \rightarrow 4N_2 + 10CO_2 + 14H_2O. \quad (2)$$

Dénitrification complète avec prise en compte de la biomasse :

$$0,819CH_3COOH + NO_3 \rightarrow 0,068C_5H_7O_2N + HCO_3 + 0,466N_2 + 0,301CO_2 + 0,902H_2O. \quad (3)$$

Le calcul du ratio C/N, représentant la quantité de carbone consommé (C-CH_3COOH oxydé) par rapport à la quantité d'azote consommé (N-NO_3 consommé = N-NO_3 initial − N-NO_3 final), peut alors être un moyen de déterminer les sous-produits de la réaction de dénitrification et le stade d'avancement de la réaction de dénitrification. Les ratios C/N théoriques sont de 0,45, 1,13 et 1,48 respectivement pour les réactions (1), (2) et (3). Un ratio moyen de 1,8 a été obtenu sur l'ensemble des expériences avec *Ps* et *Hd*. La réaction (3) semble donc la voie métabolique la plus probable : la réduction du nitrate serait complète jusqu'au stade N_2 gazeux et une fraction de substrats (C et N notamment) serait mobilisée pour la croissance cellulaire.

4 Conclusion

L'étude des interactions matrice cimentaire-lixiviats modèles de bitumes (solutions d'acide acétique, d'acide oxalique et de nitrates) en conditions abiotiques a montré qu'un pH alcalin est rapidement imposé dans le milieu du fait de la lixiviation de la matrice cimentaire. L'action du lixiviat modèle de bitume constitué d'acide acétique seul s'est apparenté à celle d'une lixiviation de matrice cimentaire classique sans interaction particulière entre les cations cimentaires et les anions acétate. La matière organique reste donc disponible en solution dans ce cas pour une éventuelle consommation par les bactéries. En revanche, l'étude impliquant le lixiviat contenant de l'acide oxalique a montré une précipitation d'oxalates de calcium mobilisant une partie des anions oxalate et des ions calcium provenant de la matrice cimentaire. L'oxalate est de ce fait moins biodisponible en solution. Par ailleurs, les expériences avec les bactéries candidates ont montré que ce substrat était moins facilement assimilable. Enfin, cette étude a permis de confirmer la stabilité des nitrates en milieu abiotique en présence de matrice cimentaire et de lixiviats modèles de bitume.

Le travail réalisé en conditions biotiques a permis de montrer que les souches dénitrifiantes hétérotrophes sélectionnées, *Pseudomonas stutzeri* et *Halomonas desiderata*, réduisaient les nitrates selon la voie métabolique de dénitrification (avec accumulation de nitrites dans certains cas) en présence d'acide acétique comme donneur d'électrons. La croissance et l'activité dénitrifiante de la souche neutrophile *Ps* sont inhibées à pH > 9 alors que la souche alcalophile *Hd* est capable de réaliser la dénitrification jusqu'à pH 11, mais avec des cinétiques plus lentes.

Dans une prochaine étape de l'étude, les interactions nitrates-microorganismes-matière organique-matrice cimentaire seront analysées dans des conditions expérimentales comparables à celle du stockage grâce à la mise en œuvre d'un dispositif pilote fonctionnant en continu et permettant le découplage de la croissance microbienne et des interactions entre les différents composants du système. Cette situation visera à étudier l'impact de certains paramètres clefs, tels que le choix des vitesses d'écoulement et les changements globaux associés (i.e. pH) sur le métabolisme microbien et la réactivité des nitrates [7, 33].

Remerciements. Les auteurs remercient l'Andra (Agence Nationale pour la Gestion des Déchets Radioactifs) pour son soutien scientifique et financier à la réalisation de ce travail.

Références

[1] A. Roulet, Colis de stockage de déchets B. Rapport Andra C.NT.ASTE.04.0507.B, 2004

[2] Andra, Dossier 2005 Argile – Tome Architecture et Gestion du stockage géologique, Rapport Andra n °C.RP.ADP.04.0001B, 2005

[3] I. Walczak, M.F. Libert, S. Camaro, J.M. Blanchard, *Agronomie* **21** (2001) 247-257

[4] A. Albrecht, A. Bertron, M. Libert, in Advances on cement-based materials for nuclear waste, Springer, Berlin, edited by F. Bert, C. Cau Dit Coumes, F. Frizon, S. Lorette, 2012, 147-159

[5] J.F. Devlin, R. Eedy, B.J. Butler, *Journal of Contaminant Hydrology* **46** (2000) 81-97

[6] J. Tiedge, Genetic engineering of symbiotic nitrogen fixation and conservation of fixed-nitrogen, Chapitre Use of Nitrogen-13 and Nitrogen-15 in studies of dissimilatory fate of nitrate, Plenum. Publ., 1981

[7] M. Alquier, C. Kassim, A. Bertron, B. Erable, N. Jacquemet, C. Sablayrolles, C. Albasi, R. Basseguy, G. Escadeillas, P. Strehaiano, M. Vignoles Études expérimentales de la réactivité des nitrates à l'interface bitume – eau cimentaire – ciment en conditions biotiques, Rapport Andra, 2012

[8] C.B. Van Niel, M.B. Allen, A Note on *Pseudomonas Stutzeri*, Hopkins Marine Station of Stanford University, Pacific Grove, California, Vol. 64, 1952, pp. 413-422

[9] F. Berendes, G. Gottschalk, E. Heine-Dobbernack, E.R.B. Moore, B.J. Tindall, *Systematic Appl. Microbiol.* **19** (1996) 158-167

[10] J.R. Firth, C. Edwards, *J. Appl. Microbiol.* **88** (2000) 853-859

[11] L.R. Van Loon, Z. Kopajtic, Complexation of Cu^{2+}, Ni^{2+} and UO_2^{2+} by radiolytic degradation products of bitumen, Nagra technical report, 90-18, 1990

[12] L.R. Van Loon, W. Hummel, The radiolytic and chemical degradation of organic ion exchange resins under alkaline conditions : Effect on radionuclide speciation, Nagra technical report, 95-08, 1995

[13] M.F. Libert, I. Walczak, Effect of radio-oxidative ageing and pH on the release of soluble organic matter from bitumen, Avignon, Atalante, 2000

[14] I. Walczak, Détermination des produits organiques d'altérations chimiques et radiochimiques du bitume – applications aux enrobés bitumés, Thèse de Doctorat, INSA Lyon, 2000

[15] J. Sercombe, B. Gwinner, C. Tiffreau, B. Simondi-Teisseire, F. Adenot, *J. Nucl. Mater.* **349** (2006) 96-106

[16] B. Gwinner, J. Sercombe, C. Tiffreau, B. Simondi-Teisseire, I. Felines, F. Adenot, *J. Nucl. Mater.* **349** (2006) 107-118.

[17] A. Kagawa, M. Fukumoto, K. Kawamura, *J. Nucl. Sci. Technol.* **37** (2000) 934-937

[18] S. Nakayama, Y. Iida, T. Nagano, T. Akimoto, *J. Nucl. Sci. Technol.* **40** (2003) 227-237

[19] L. De Windt, P. Devilliers, *Cement and Concrete Research* **40** (2010) 1165-1174

[20] S. Larreur-Cayol, A. Bertron, G. Escadeillas, *Cement and Concrete Research* **41** (2011) 882-892

[21] A. Bories, J.M. Guillot, Y. Sire, M. Couderc, S.A. Lemaire, V. Kreim, J.C. Roux, *Water Research* **41** (2007) 2987–2995

[22] C. Glass, J. Silverstein, *Water Research* **32** (1998) 831-839

[23] P. Teixeira, R. Oliveira, *Biotechnology Lett.* **22** (2000) 1789-1792

[24] L. Truche, G. Berger, A. Albrecht, L. Domergue, Abiotic nitrate reduction induced by carbon steel and hydrogen : implications for environmental processes in waste repositories Applied Geochemistry, 2012 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2012.10.010

[25] P. Faucon, P. Le Bescop, F. Adenot, P. Bonville, J.F. Jacquinot, F. Pineau, B. Felix, *Cement and Concrete Research* **26** (1996) 1707-1715

[26] S. Deganello, A.R. Kampf, P.B. Moore, *American Mineralogist* **66** (1981) 859-865

[27] W. Heijnen, W. Jellinghaus, W.E. Klee, *Urological Research* **13** (1985) 281-283

[28] F.J. Opalko, J.H. Adair S.R. Khan, *Journal of Crystal Growth* **181** (1997) 410-417

[29] A. Bertron, J. Duchesne, G. Escadeillas, *Cement and Concrete Research* **35** (2005) 155-166

[30] O. Oueslati, J. Duchesne, *Cement and Concrete Research* **42** (2012) 205-214

[31] S. Larreur-Cayol, Attaques des matériaux cimentaires par les acides organiques des effluents agricoles et agro-alimentaires, Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, 2012

[32] V. Mateju, S. Cizinska, J. Krejei, T. Janoch, *Enzyme Microbe Technology* **14** (1992) 170-183

[33] M. Alquier, A. Bertron, B. Erable, N. Jacquemet, C. Sablayrolles, C. Albasi, R. Basseguy, M. Vignoles, A. Albrecht, G. Escadeillas, Catalyse biotique et abiotique de la réduction des nitrates en milieu alcalin dans le contexte du stockage profond des déchets radioactifs, XIe Forum Biodétérioration des Matériaux, Saint-Étienne, 2012