

185280  
193178

N040-MIC-Q

Quantification des microflores dénitrifiantes  
associées aux eaux souterraines  
d'un bassin versant agricole (Kerharo, Finistère)

octobre 1998

IFREMER Bibliotheque de BREST



OEL07452

contrat IFREMER n° 95 2 450408 DEL

N 040

MIC-Q

## **Sommaire**

### **Introduction**

### **Matériel et méthodes**

- 1- Microflore bactériennes analysées p 1
- 2- Origine des prélèvements p 2

### **Résultats**

- 1- Analyse quantitative p 3
- 2- Analyse qualitative p 6

### **Discussion**

- 1- Cycle de l'azote p 8
- 2- Autres métabolismes p 9

### **Conclusion**

p 10

### **Bibliographie**

## Introduction

Cette étude fait suite à une première approche menée en 1997. Elle a pour objet une évaluation des densités de microflores dénitrifiantes associées aux eaux souterraines du bassin versant du Kerharo. Plus précisément cette seconde phase vise à affiner la méthodologie de quantification de ces germes, en ciblant plus précisément les localisations susceptibles d'être favorables à leur développement.

En effet, les premiers résultats obtenus, lors d'une campagne menée en mai 1997, montraient que les densités de bactéries dénitrifiantes associées aux eaux étaient faibles : inférieures à  $10^2$  bactéries hétérotrophes/ml et inférieures à 10 bactéries autotrophes/ml. Sur cette base, l'hypothèse d'une dénitrification des eaux liée au métabolisme des bactéries n'avait pu être confirmée.

## Matériel et méthodes

### 1- Microflores bactériennes analysées

\* Deux types de microflores, directement liés au processus de dénitrification, ont été dénombrés ; il s'agit de :

- La microflore dénitrifiante hétérotrophe. Dans cette dernière, deux fractions ont été différenciées, d'une part la fraction capable d'une dénitrification vraie jusqu'au stade azote moléculaire et d'autre part la fraction, plus importante, capable de réaliser la réduction des nitrates en nitrites.

- La microflore dénitrifiante autotrophe, et plus précisément au sein de cette dernière, *Thiobacillus denitrificans*.

\* La microflore sulfatoréductrice a été dénombrée sur quelques échantillons sélectionnés. Ces germes hétérotrophes, en réduisant les sulfates peuvent être responsables de la production d'hydrogène sulfuré ( $H_2S$ ), dont la présence a été décelée dans les eaux souterraines. La mise en évidence de bactéries capables de produire ce composé peut apporter des éléments d'appréciation de ces observations.

\* De plus, la microflore totale a été estimée en microscopie photonique à épifluorescence. En effet, la quantification de métabolismes spécifiques que sont la dénitrification ou la sulfatoréduction, ne prend toute sa signification en terme de potentialité d'un biotope donné, que lorsque les densités trouvées correspondent à une fraction représentative du peuplement bactérien présent.

\* Cette approche quantitative sera complétée par l'observation en microscopies photonique et électronique de quelques prélèvements afin d'y rechercher présomptivement certains germes difficilement cultivables et présentant une morphologie particulière telles que les gallionelles. Ces bactéries interviennent dans le cycle du fer en oxydant ce composé. Ce cycle étant souvent couplé à celui du soufre, il convenait de s'y intéresser dans le cadre de cette étude.

## 2- Origine des prélèvements

Dix huit prélèvements ont été réalisés. Leur origine est précisée dans le tableau 1.

Ils correspondent :

- à des **eaux**

- à des **masses**, c'est-à-dire à des fragments de roche (schiste avec inclusions pyritiques) de quelques millimètres de longueur introduits dans différents ouvrages 9 mois avant la campagne de prélèvements réalisée dans le cadre de cette étude. En effet, dans les milieux oligotrophes, les bactéries ont tendance à se fixer aux surfaces qui concentrent les éléments nutritifs. En outre, le processus de dénitrification pouvant être associé à la pyrite, la recherche des bactéries dénitrifiantes devait être optimisée en échantillonnant directement la roche en contact avec les eaux souterraines. L'accès à la paroi rocheuse des ouvrages n'étant pas possible, la stratégie s'est ainsi orientée vers l'immersion de fragments de roche placés dans des supports perforés, afin d'assurer le contact entre l'eau et la roche.

- à des **boues**, récupérées par pompage en fond d'ouvrage, afin, là encore, d'optimiser la recherche des germes cités au §1.

- à des **grattages** de différentes surfaces (câbles, tuyaux, obturateurs) immergées dans plusieurs des ouvrages.

Ouvrage	Réf.	Prélèvement	n°
<i>le 05/06/98</i>			
Forage	F	grattage cable (6,5m)	1
		grattage cable (50cm <sup>2</sup> au dessus obturateur)	2
		grattage haut de l'obturateur (- 23m)	3
		grattage bas de l'obturateur (- 24m)	4
<i>le 24/06/98</i>			
Piézomètre	PZ3	eau	14
		fragments de roche (masses)	13
		grattage tuyau (film brun ocre visqueux)	8
	PZ4	eau	10
		fragments de roche (masses)	9
		grattage tuyau de pompe (film noir)	12
		boue brune	11
		boue orange	11bis
	PZ9	eau	7
		fragments de roche (masses)	9
boue		15	
Forage	F31	eau	16
	F34	eau	18
		fragments de roche (masses)	17
	F36	fragments de roche (masses)	5

Tableau 1 : Type et origine des prélèvements analysés.

## Résultats

### 1- Analyse quantitative

Les densités des différentes microflores analysées sont présentées dans le tableau 2 et illustrées par la figure 1.

Ouvrage	Prélèv.	Microflore totale	Microflore dénitrifiante		Microflore sulfato-réductrice
			hétérotrophe		
			NO <sub>3</sub> ->NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> ->N <sub>2</sub>	
05/06/98					
F31	grattage 1	1,2.10 <sup>7</sup>	1,8.10 <sup>3</sup>	7,3.10 <sup>2</sup>	< 2
	grattage 2	3,3.10 <sup>6</sup>	> 7,3.10 <sup>5</sup>	1,5.10 <sup>5</sup>	< 2
	grattage 3	7,4.10 <sup>6</sup>	> 7,3.10 <sup>6</sup>	6,6.10 <sup>5</sup>	< 0,75
	grattage 4	5,2.10 <sup>6</sup>	1,6.10 <sup>3</sup>	1,6.10 <sup>3</sup>	< 0,75
24/06/98					
PZ3	eau	6,2.10 <sup>3</sup>	2,6.10 <sup>4</sup>	2,6.10 <sup>1</sup>	< 0,5
	masses	2,6.10 <sup>6</sup>	6,0.10 <sup>6</sup>	5,2.10 <sup>2</sup>	1,2.10 <sup>0</sup>
	grattage	-	> 4,0.10 <sup>5</sup>	> 4,0.10 <sup>5</sup>	< 0,5
PZ4	eau	4,5.10 <sup>3</sup>	2,2.10 <sup>2</sup>	5,0.10 <sup>0</sup>	5,0.10 <sup>0</sup>
	masses	3,4.10 <sup>5</sup>	1,0.10 <sup>5</sup>	5,2.10 <sup>3</sup>	1,2.10 <sup>1</sup>
	grattage	-	1,4.10 <sup>6</sup>	6,0.10 <sup>4</sup>	> 1,4.10 <sup>3</sup>
	boue brune	4,8.10 <sup>5</sup>	4,0.10 <sup>5</sup>	2,6.10 <sup>4</sup>	2,2.10 <sup>3</sup>
	boue orange	5,7.10 <sup>5</sup>	4,0.10 <sup>4</sup>	4,0.10 <sup>3</sup>	2,6.10 <sup>0</sup>
PZ9	eau	5,5.10 <sup>5</sup>	> 2,2.10 <sup>5</sup>	4,0.10 <sup>2</sup>	< 0,5
	masse	3,6.10 <sup>7</sup>	> 4,4.10 <sup>7</sup>	2,6.10 <sup>4</sup>	< 0,5
	boue	4,9.10 <sup>8</sup>	> 2,2.10 <sup>8</sup>	2,6.10 <sup>6</sup>	1,0.10 <sup>2</sup>
F31	eau	3,4.10 <sup>3</sup>	6,0.10 <sup>3</sup>	1,2.10 <sup>1</sup>	1,3.10 <sup>1</sup>
F34	eau	3,7.10 <sup>3</sup>	4,0.10 <sup>2</sup>	2,6.10 <sup>0</sup>	< 0,5
	masses	9,4.10 <sup>5</sup>	1,0.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	5,0.10 <sup>0</sup>
F36	masses	2,2.10 <sup>6</sup>	2,6.10 <sup>6</sup>	2,6.10 <sup>4</sup>	1,2.10 <sup>0</sup>

**Tableau 2** : Densités des différentes microflores analysées.

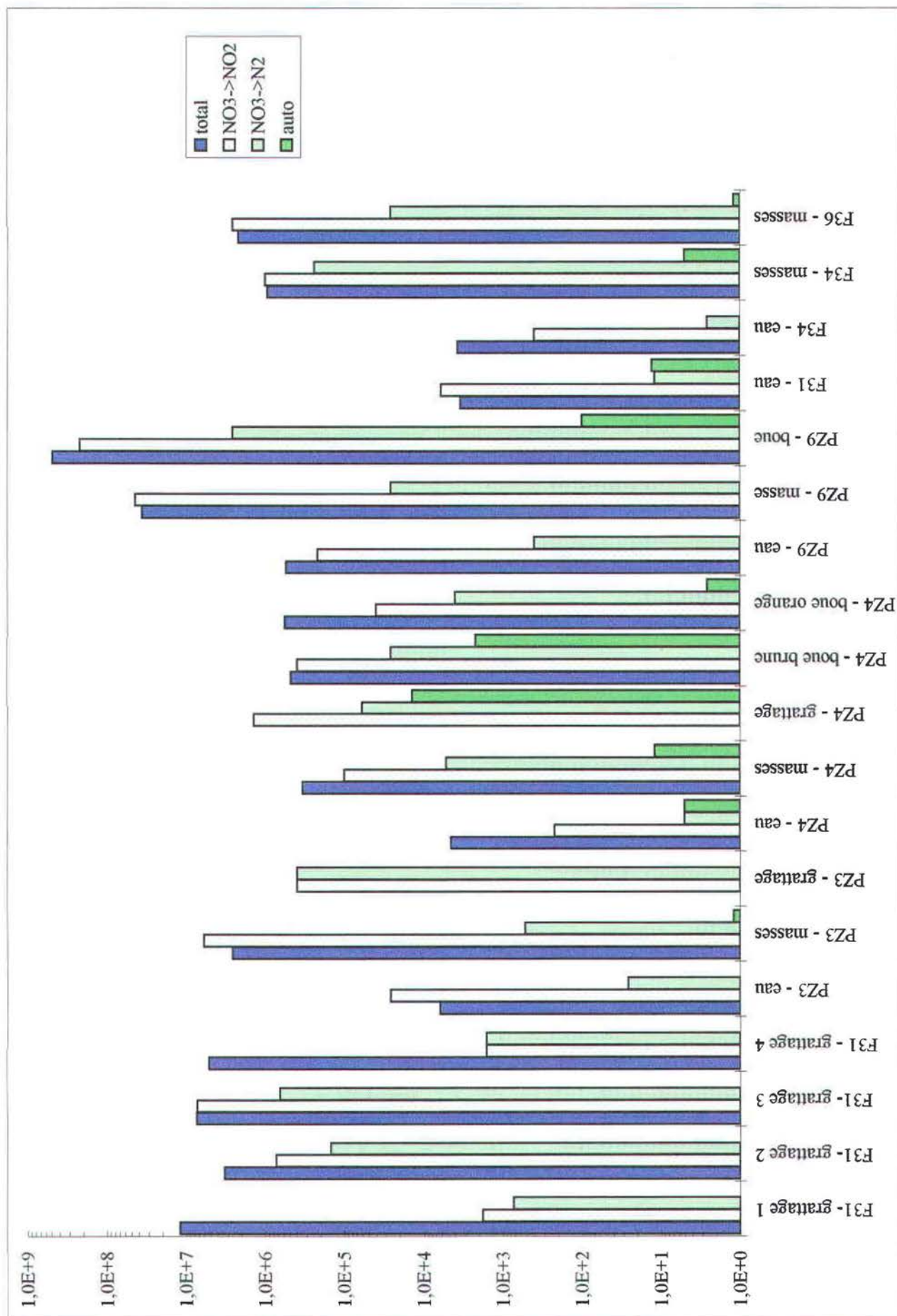
Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries :

- par ml pour les eaux
- par g pour les masses
- par cm<sup>2</sup> pour les grattages

#### • Microflore totale

- Les densités de microflore totale associée aux eaux sont en général de l'ordre de 5.10<sup>3</sup> bactéries/ml sauf dans le cas de PZ9, où la charge atteint 5.10<sup>5</sup> bactéries/ml.

- Au niveau des fragments de roche (masses), la variabilité est plus importante avec des valeurs comprises entre 3.10<sup>5</sup> (PZ4) et 4.10<sup>7</sup> bactéries/g (PZ9). Des valeurs situées aux alentours de 10<sup>6</sup> bactéries/g sont décelées au niveau des forages et du piézomètre PZ3.



**Figure 1** : Densités des microflores totales, dénitrifiantes hétérotrophes (allant jusqu'au stade nitrites NO<sub>2</sub> et jusqu'au stade azote moléculaire N<sub>2</sub>) et dénitrifiantes autotrophes sur les différents ouvrages échantillonnés.

Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries /ml pour les eaux, /g pour les masses et /cm<sup>2</sup> pour les grattages.



- Dans les eaux "boueuses" prélevées au fond des piézomètres PZ4 et PZ9, les charges bactériennes sont respectivement de  $5 \cdot 10^5$  et de  $5 \cdot 10^8$  bactéries/ml.

- Sur les surfaces grattées au niveau des infrastructures immergées dans le forage F31, les densités sont comprises entre  $10^6$  et  $10^7$  bactéries/cm<sup>2</sup>. Les deux autres grattages n'ont pu faire l'objet de dénombrements en microscopie en raison de la présence d'un mucus important et/ou de bactéries filamenteuses difficilement comptables en raison de leur enchevêtrement.

#### • Microflore dénitrifiante hétérotrophe

Elle est mise en évidence sur la totalité des échantillons analysés.

La fraction capable de réduire les nitrates en nitrites est largement plus représentée que la fraction susceptible d'aller jusqu'au stade azote moléculaire.

Les rapports entre la microflore totale et la fraction capable de réduire les nitrates en nitrites, aptitude très répandue chez les bactéries, sont en général compris entre 1 et 10, suggérant la forte aptitude des peuplements bactériens à réduire les nitrates en condition anaérobie. Quelques exceptions sont à noter :

- le cas des grattages 1 et 4 effectués respectivement dans la partie haute du cable et dans le bas de l'obturateur immergé dans le forage F31 ; la fraction capable de réduire les nitrates ne correspond alors qu'à 1/1000 ème du peuplement bactérien.

- le cas de quelques autres échantillons (cf. tableau 2), pour lesquels les densités observées en dénitrifiantes sont légèrement supérieures à celles de la microflore totale. Ceci s'explique par la présence de nombreuses particules, principalement au niveau des masses, des grattages et des boues ; ces particules tendent à masquer les bactéries et entraînent une possible sous-estimation des densités de microflore totale.

La fraction capable de réduire les nitrates jusqu'au stade azote moléculaire est en général de 10 à 100 fois moins importante que celle allant jusqu'aux nitrites. Les rapports entre la microflore totale et cette fraction sont alors principalement compris entre 10 et 1000. Cette microflore apparaît en outre plus représentée au niveau des surfaces (grattages F31-PZ3-PZ4, masses F34 et boues PZ4-PZ9). Dans ce cas, les valeurs peuvent atteindre  $10^5$  à  $10^6$  bactéries/cm<sup>2</sup> ou /g.

#### • Microflore dénitrifiante autotrophe

La microflore dénitrifiante autotrophe reste globalement peu représentée.

A l'issue de la première série d'expérimentations menée en 1997, la qualité du milieu de culture avait été évoquée. Préalablement à cette nouvelle phase expérimentale, le milieu utilisé a été validé par inoculation d'une souche pure de *Thiobacillus denitrificans* (collection de l'Institut Pasteur).

La présence de ces germes est essentiellement décelée sur le piézomètre PZ4, avec des valeurs comprises entre 5 bactéries/ml sur l'eau et  $10^4$  bactéries/cm<sup>2</sup> sur les surfaces (grattage).

Ces germes sont également notés dans la boue du piézomètre PZ9 ( $10^2$  bactéries/ml) et dans l'eau du forage F31 (5 bactéries/ml).

• Microflore sulfatoréductrice

Cette microflore a été recherchée sur les ouvrages dégageant des odeurs d'hydrogène sulfuré. Elle est effectivement présente sur les deux piézomètres possédant cette caractéristique (PZ4 et PZ9) avec des densités atteignant au maximum  $10^2$  bactéries/ml ou /cm<sup>2</sup>.

## 2- Analyse qualitative

Les observations faites en microscopie photonique sont consignées dans le tableau 2. Elles devaient permettre de sélectionner quelques échantillons apparemment intéressants pour la microscopie électronique.

Ouvrage	Prélèv.	Observation en microscopie photonique
PZ3	eau	quelques éléments particuliers + cellules bactériennes isolées
	masses	matière particulaire + cellules bactériennes isolées - quelques formes filamenteuses
	grattage	nombreuses formes filamenteuses
PZ4	eau	matière particulaire + cellules bactériennes isolées
	masses	matière particulaire + cellules bactériennes
	grattage	nombreuses formes filamenteuses de type et de morphologie variés
	boue brune	nombreuses formes filamenteuses de type et de morphologie variés
	boue orange	nombreuses formes filamenteuses de type et de morphologie variés
PZ9	eau	quelques éléments particuliers + cellules bactériennes isolées
	masse	matière particulaire + cellules bactériennes isolées
	boue	matière particulaire + cellules bactériennes isolées
F31	eau	quelques éléments particuliers + cellules bactériennes isolées
F34	eau	quelques éléments particuliers + cellules bactériennes isolées
	masses	quelques formes filamenteuses
	grat. orange	nombreuses bactéries - très peu de formes filamenteuses - bâtonnets longs
	grattage noir	nombreuses formes filamenteuses de type et de morphologie variés
F36	masses	matière particulaire + cellules bactériennes

**Tableau 2 :** Principales caractéristiques microscopiques des échantillons analysés.

Les grattages effectués sur le forage F34 n'ont été faits que dans l'optique de la recherche de formes filamenteuses. Dans ce sens, ils n'ont pas été analysés quantitativement.

L'absence de formes filamenteuses notée au cours des observations ne signifie pas une absence totale de ces formes mais leur existence à des densités trop faibles pour être décelées sur des fractions de quelques microlitres.

Les formes filamenteuses sont essentiellement mises en évidence sur les boues, les grattages et dans une moindre mesure sur les fragments de roche. Elles n'ont pas été décelées dans les eaux.

En microscopie électronique à balayage, des formes identifiées présomptivement comme appartenant au genre *Gallionella* sont notées dans les boues du piézomètre PZ4 (planche photos 1). Sur les autres échantillons des formes filamenteuses de morphologie variée sont observées. La plupart de ces formes semblent gainées et certaines montrent des incrustations sur toute leur surface. De telles incrustations d'oxyde de fer ou de manganèse existent, par exemple, chez les bactéries du genre *Leptothrix*.



## Planche photo 1

1    I    2  
3    I    4  
5    I    6

**Recherche de *Gallionella* sur des échantillons prélevés au niveau des eaux souterraines du bassin versant du Kerharo (piézomètre PZ4)**

**Photo 1 :** x 2 500

Fragments de formes filamenteuses. La gaine entourant ces formes ne permet pas de visualiser les cellules bactériennes.

**Photo 2 :** x 2 500

Certaines de ces formes présentent des incrustations d'oxyde de fer et/ou de manganèse et pourraient appartenir au genre *Leptothrix*.

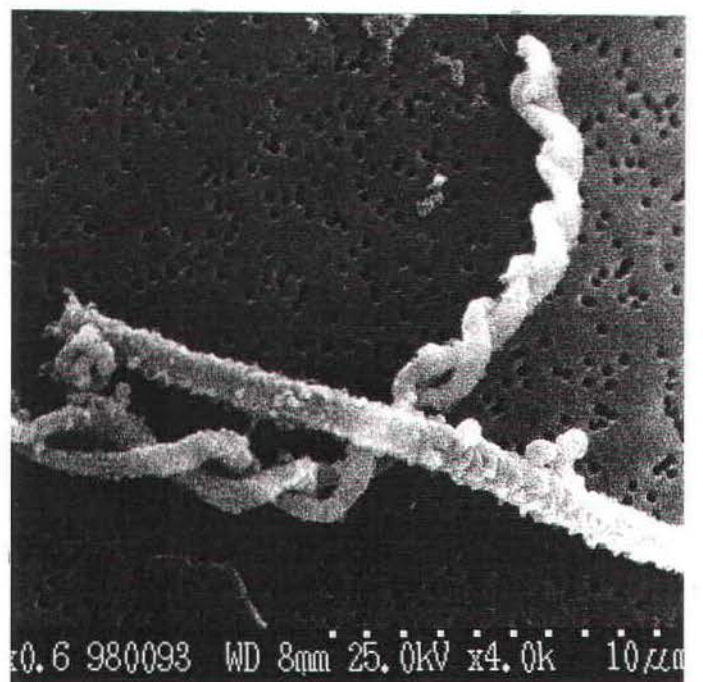
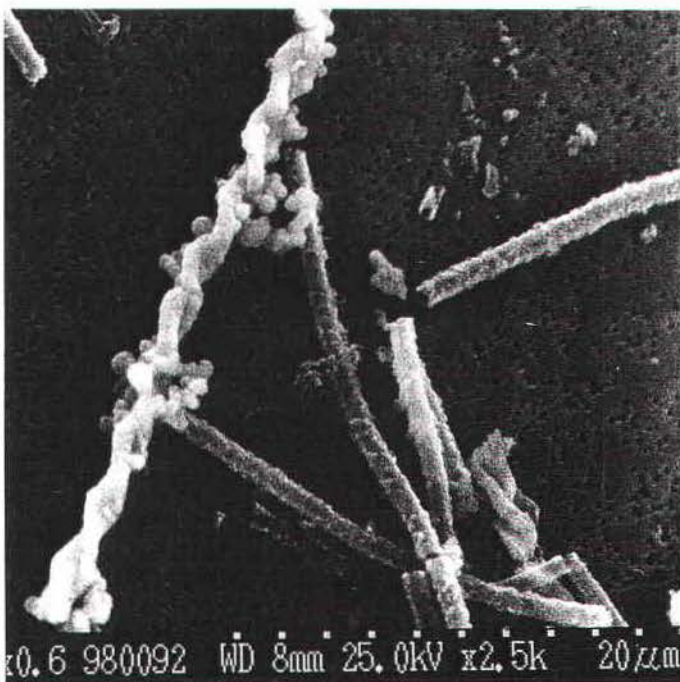
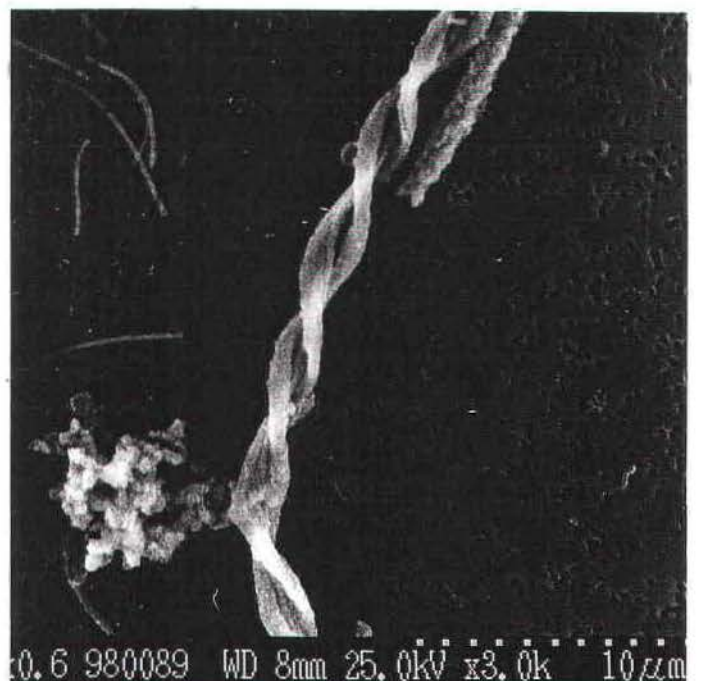
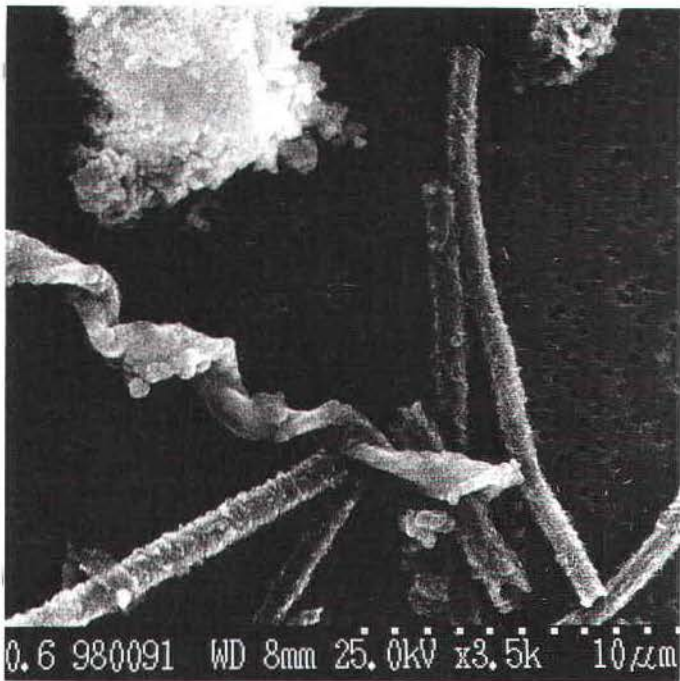
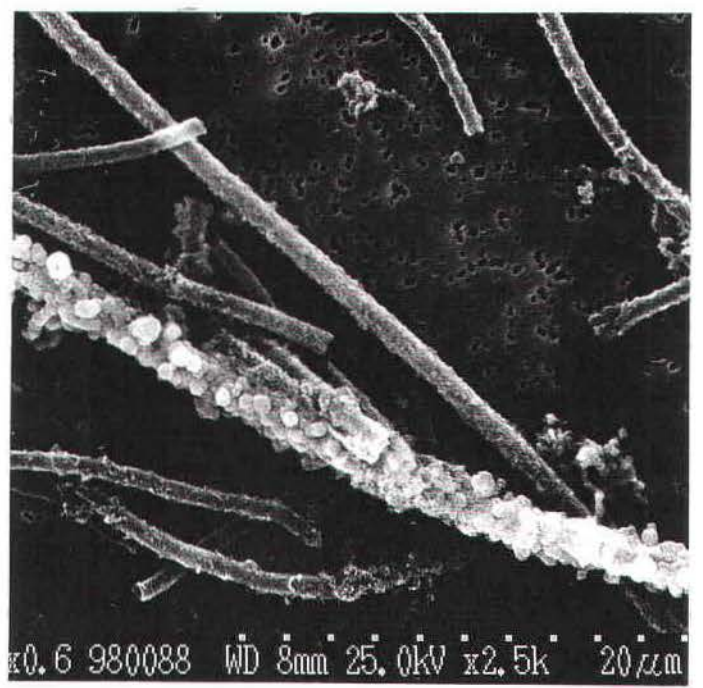
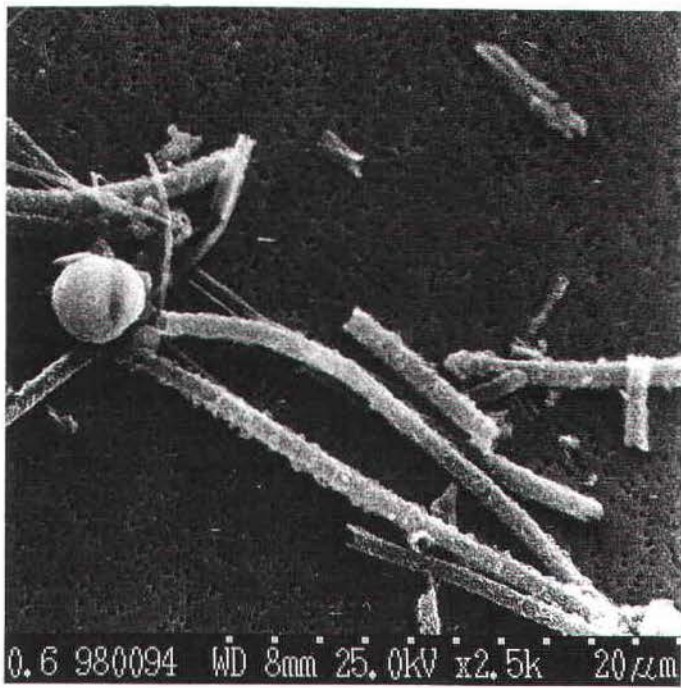
**Photo 3 :** x 3 500

**Photo 4 :** x 3 000

**Photo 5 :** x 2 500

**Photo 6 :** x 4 000

La forme torsadée très caractéristique des filaments permettrait de rattacher présomptivement ces bactéries au genre *Gallionella*.



## Discussion

Cette nouvelle campagne de prélèvements visait à vérifier l'existence d'une microflore dénitrifiante dans la zone souterraine du bassin versant du Kerharo. En effet, la première campagne, effectuée sur les eaux n'avait montré que de faibles densités de germes dénitrifiants. Aussi, cette nouvelle intervention prend en compte des échantillons susceptibles de concentrer la microflore bactérienne, à savoir des surfaces.

### 1- Cycle de l'azote

Les analyses réalisées montrent que les peuplements bactériens dénitrifiants sont dominés quantitativement par la fraction hétérotrophe. Les bactéries hétérotrophes tirent leur énergie et effectuent leurs biosynthèses à partir de molécules organiques. Les nitrates peuvent alors être utilisés comme accepteur terminal d'électrons en l'absence d'oxygène (conditions anaérobies ou microaérobies). Il s'ensuit une réduction des nitrates jusqu'au stade  $N_2O$  ou  $N_2$ . Les potentialités en matière de dénitrification révélées par l'analyse ne seront donc effectives *in situ* que si les conditions, entre autres en terme de concentration en matière organique et en oxygène, sont compatibles avec ce métabolisme.

Les densités de germes capables de réduire les nitrates jusqu'à l'azote moléculaire sont généralement de l'ordre de 10 à 100 bactéries/ml. Ils tendent à se concentrer sur les surfaces et dans les boues avec des valeurs pouvant atteindre  $10^5$  à  $10^6$  bactéries/cm<sup>2</sup> ou /ml. Ces densités peuvent aller jusqu'à représenter 1/10ème de la microflore totale.

Il est à noter qu'une très large proportion des peuplements présents réalise la réduction des nitrates en nitrites.

La fraction autotrophe est également décelée sur tous les ouvrages échantillonnés. Le germe recherché, *Thiobacillus denitrificans*, couple l'oxydation de composés soufrés (dans le cas présent la pyrite  $FeS_2$ ) à la réduction des nitrates. Les densités de ce germe sont cependant faibles, avec des valeurs comprises entre 1 et  $10^3$  bactéries/ml, g ou cm<sup>2</sup>, ce qui ne représente que 1/100 ème à 1/1 000 000 ème de la microflore totale. Là encore, les densités les plus fortes sont observées au niveau des surfaces (grattage et boue).

Cette dominance des peuplements bactériens hétérotrophes par rapport aux autotrophes est également relatée par d'autres auteurs en milieu souterrain ; plus précisément, il s'agirait de bactéries oligotrophes, c'est-à-dire capables de se développer en conditions de très faibles concentrations en éléments nutritifs (Gounot *et al.*, 1991). En outre, les cinétiques des réactions de dénitrification impliquant les bactéries autotrophes seraient plus faibles que celles des bactéries hétérotrophes (Haidler *et al.*, 1988).

La comparaison des résultats obtenus sur les six ouvrages échantillonnés (3 piézomètres et 3 forages) permet de dégager quelques caractéristiques spécifiques :

- Les charges bactériennes sont plus importantes sur le piézomètre PZ9 que sur les autres ouvrages. Ainsi, au niveau de l'eau, si les densités totales sont en général de l'ordre de  $10^3$  bactéries/ml sur les différents ouvrages échantillonnés, elles atteignent  $10^5$  bactéries/ml sur PZ9. Cette supériorité est également perceptible sur les densités de microflore dénitrifiante hétérotrophe dans les eaux et se répercute sur les surfaces. Au



cours de la campagne menée en 1997, c'est aussi sur cet ouvrage que les plus fortes densités de microflore dénitrifiante avaient été dénombrées ( $10^3$  bactéries/ml dans l'eau).

- Les densités de microflore dénitrifiante autotrophe les plus élevées sont mises en évidence sur le piézomètre PZ4. Les densités sont inférieures à 10 bactéries/ml dans l'eau mais atteignent des valeurs supérieures à  $10^3$  bactéries/g et /ml respectivement dans les fragments de roche et dans les boues. Là encore, c'est sur cet ouvrage que quelques *T. denitrificans* avaient été décelés dans les eaux en 1997.

## 2 - Autres métabolismes

Des formes appartenant présomptivement au genre *Gallionella* ont également été observées sur le piézomètre PZ4. Il s'agit de ferrobactéries autotrophes microaérophiles oxydant le  $Fe^{2+}$ . Ce genre est généralement très typique des milieux oligotrophes riches en fer et légèrement acides.

De nombreuses autres formes filamenteuses sont notées sur plusieurs des ouvrages analysés. Il s'agirait aussi de bactéries impliquées dans le cycle du fer. Après oxydation, le fer, trivalent, est insolubilisé sous forme d'hydroxyde et est ensuite stocké dans les sécrétions mucilagineuses des bactéries (gaines, pédoncules, capsules...). Outre *Gallionella*, ces bactéries pourraient appartenir au genre *Leptothrix*, *Sphaerotilus* ...

Par ailleurs, la présence de bactéries sulfatoréductrices est mise en évidence sur PZ4 et PZ9 avec des densités atteignant au maximum  $10^2$  bactéries/ml ou /g. Les *Thiobacillus* oxydent les diverses formes du soufre inorganique en sulfates. Ces sulfates peuvent à leur tour être réduits par les bactéries sulfatoréductrices et donner, entre autres, de l'hydrogène sulfuré dont l'odeur caractéristique est, à certaines périodes de l'année, particulièrement notée sur ces deux piézomètres. Ces bactéries sulfatoréductrices sont hétérotrophes et se développent en conditions d'anaérobiose stricte.

D'une façon générale, il convient de rappeler que si les conditions de faibles teneurs en oxygène, voire d'anaérobiose pour certains métabolismes, ne prévalent pas systématiquement au niveau de la masse d'eau, elles peuvent néanmoins exister au niveau de biofilms sur les surfaces. Ainsi dans ces biofilms, les interactions microbiennes peuvent créer des conditions particulières qui rendent alors possible le développement de certains métabolismes. Par exemple, la consommation de l'oxygène par les bactéries aérobies facultatives peut entraîner la formation de microniches anaérobies favorables au développement des germes anaérobies strictes. La croissance de ces germes est favorisée par l'abaissement du potentiel d'oxydo-réduction lié à l'excrétion de métabolites réducteurs par certaines bactéries constituant le biofilm. De même, les activités bactériennes peuvent entraîner des modifications significatives de pH au niveau des cellules bactériennes, sans qu'il s'ensuive de modification globale du pH du milieu (Gounot, 1991).

## Conclusion

Les différentes observations faites dans le cadre de cette étude suggèrent que la potentialité du site en matière d'activité bactérienne dénitrifiante serait principalement liée à la fraction hétérotrophe des peuplements bactériens et localisée au niveau des surfaces. La faible représentativité de la fraction dénitrifiante autotrophe, déjà mentionnée sur ce même site en 1997, est à nouveau confirmée. Pourtant différents auteurs font état d'une dénitrification autotrophe faisant intervenir *Thiobacillus denitrificans*, soit en condition expérimentale en réacteur garni de pyrite de fer (Moreau, 1994 ; Haidler *et al.*, 1988), soit directement *in situ* sur des formations pyritiques (Le Bideau et Dudoignon, 1996 ; Pauwels *et al.*, 1996). Si cette composante autotrophe peut jouer un rôle dans le cas du piézomètre PZ4, voire sur le piézomètre PZ9, elle reste toutefois réduite sur les autres ouvrages échantillonnés. Des investigations au niveau de la surface rocheuse directement en contact avec les masses d'eau seraient nécessaires pour affiner la part réellement attribuable à cette dénitrification autotrophe.

### **Bibliographie**

Haidler N., Moran N., Le Cloirec P., Martin G., 1988 - Dénitrification en réacteur garni en pyrite de fer : études de laboratoire. *Environmental Technology Letters*, 9 : 411-420.

Gounot A.M., 1991 - Ecologie microbienne des eaux et sédiments souterrains. *Hydrogéologie*, 3, 239-248.

Le Bideau L. et Dudoignon P., 1996 - Mise en évidence de mécanisme de dénitrification naturelle sur substrat sulfuré sur le site de Beuxes (Vienne, France). *C.R. Acad. Sci. Paris*, t 322, série IIa, 555-562.

Pauwels H., Martelat A., Foucher J.C., Lassagne P., 1996 - Dénitrification des eaux souterraines du bassin versant du Coët Dan : suivi géochimique et hydrologique du processus. rapport BRGM R39055, 66 p.