



**Biodégradation des solvants chlorés
en conditions naturelles
mécanismes et caractérisation
Synthèse bibliographique**

Ministère de l'Écologie et du Développement
Durable

S. DENYS
Unité Déchets et Sites Pollués
Direction des Risques Chroniques

OCTOBRE 2004

Biodégradation des solvants chlorés en conditions naturelles

mécanismes et caractérisation

Synthèse bibliographique

OCTOBRE 2004

Ministère de l'Ecologie et du Développement
Durable

Ce document comporte 31 pages (hors couverture et annexes).

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	S. DENYS	C. ROLLIN et O. BOUR	H. BAROUDI
Qualité	Ingénieur de l'unité "Déchets et Sites Pollués" à la Direction des Risques Chroniques	Ingénieurs de l'unité "Déchets et Sites Pollués" à la Direction des Risques Chroniques	Responsable de l'Unité "Déchets et Sites Pollués" à la Direction des Risques Chroniques
Visa			

TABLE DES MATIERES

1	CONTEXTE ET OBJECTIFS	3
2	MECANISMES DE BIODEGRADATION DES SOLVANTS CHLORES	3
2.1	PROCESSUS GENERAUX IMPLIQUES DANS LA BIODEGRADATION DE COMPOSES ORGANIQUES.....	3
2.1.1	<i>Utilisation du composé organique pour la croissance bactérienne</i>	4
2.1.2	<i>Co-métabolisme</i>	4
2.1.3	<i>Phénomènes impliqués dans la dégradation des solvants chlorés</i>	4
2.2	DÉGRADATION REDUCTRICE DES SOLVANTS CHLORÉS OU HALORESPIRATION	5
2.2.1	<i>Mécanisme moléculaire</i>	5
2.2.2	<i>Caractérisation moléculaire des bactéries halorespirantes</i>	7
2.2.3	<i>Thermodynamique de la réaction de halorespiration</i>	7
2.2.4	<i>Produits et cinétiques de halorespiration des solvants chlorés</i>	9
2.2.5	<i>Stœchiométrie des réactions de déchloration réductrice</i>	10
2.2.6	<i>Indicateur sur site de la dégradation par halorespiration</i>	11
2.3	DÉGRADATION PAR OXYDATION DES SOLVANTS CHLORÉS	11
2.3.1	<i>Oxydation aérobie</i>	11
2.3.2	<i>Oxydation anaérobie</i>	12
2.3.3	<i>Co-métabolisme</i>	12
2.4	TAUX DE BIODEGRADATION DES SOLVANTS CHLORÉS ISSUS DE LA LITTÉRATURE [SOURCE : WIEDEMEIER ET AL., 1999].....	12
2.5	CLASSIFICATION DES SITES VIS À VIS DE LA DEGRADATION DES SOLVANTS CHLORES	15
3	EVALUATION DU POTENTIEL D'ATTENUATION NATURELLE	16
3.1	INTRODUCTION.....	16
3.2	DÉTERMINATION DE PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES DU MILIEU	17
3.3	CARACTÉRISATION ISOTOPIQUE DE LA DEGRADATION DES SOLVANTS CHLORES	23
3.3.1	<i>Principes et caractérisation du fractionnement isotopique</i>	23
3.3.2	<i>Fractionnement isotopique des solvants chlorés en microcosme</i>	25
3.3.3	<i>Intérêt du fractionnement isotopique pour une caractérisation de l'atténuation naturelle sur un site industriel</i>	27
3.3.4	<i>Influence d'autres processus physico-chimiques sur le fractionnement isotopique</i>	28
3.3.5	<i>Conclusions</i>	29
	REFERENCES	30

TABLES DES FIGURES

Figure 1 : Déchloration réductrice du PCE.	6
Figure 2 : Domaines de concentration en hydrogène pour lesquels diverses réactions anaérobies sont observées [source : Wiedemeier et al., 1999].	7
Figure 3 : Séquences des réactions rédox associée aux valeurs d'énergie libre des réactions [d'après US-EPA, 1998].	8
Figure 4 : Potentiels d'oxydo-réduction de diverses réactions et domaines de potentiels permettant la déchloration réductrice [source Wiedemeier et al., 1999].	8
Figure 5 : Chaîne de déchloration réductrice du PCE.	10
Figure 6 : Variations des concentrations et des rapports isotopiques des produits issus de la biodégradation du tétrachloroéthylène (PCE) d'après Hunkeler et al. (1999).	25
Figure 7 : Variations du $\delta^{13}\text{C}$ du TCE et du toluène sous les formes de vapeur (symboles clairs) et de produits bruts (symboles noirs). L'incertitude expérimentale est de 0,5 ‰. D'après (Slater et al., 1999).	28

TABLES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Processus de dégradation biologique pour différents solvants chlorés [source : Wiedemeier et al., 1999]	5
Tableau 2 : Valeurs de constantes de demi-vies issues de la littérature (échelle du laboratoire et du terrain).	14
Tableau 3 : Valeurs moyennes et valeurs recommandées de taux de dégradation du premier ordre [source : Aronson and Howard, 1997].	15
Tableau 4 : Interprétation des scores obtenus d'après le tableau 7 [source : US-EPA, 1998].	17
Tableau 5 : Paramètres physico-chimiques à mesurer dans les sols pour l'évaluation de l'atténuation naturelle [source : Wiedemeier et al., 1999]	18
Tableau 6 : Paramètres physico-chimiques à mesurer dans les eaux pour l'évaluation de l'atténuation naturelle [source : Wiedemeier et al., 1999]	19
Tableau 7 : Paramètres et scores issus du protocole technique pour mettre en évidence l'existence d'une biodégradation par les solvants chlorés sur site [source : US-EPA, 1998].	20
Tableau 8 : Liste de modèles disponibles pour l'atténuation naturelle des contaminants dans les sols et les eaux souterraines [source : Mulligan and Yong, 2004].	22
Tableau 9 : Constantes de dégradation obtenues depuis des données in situ [source : Mulligan and Yong, 2004].	23
Tableau 10 : Facteur d'enrichissement ϵ de différents solvants chlorés, d'après la littérature. Ces facteurs sont calculés par le modèle de Rayleigh, sauf pour les valeurs issues de [Hunkeler et al., 1999].	26

1 CONTEXTE ET OBJECTIFS

L'atténuation naturelle, également appelée remédiation passive, est un phénomène qui conduit à la diminution de la concentration d'un contaminant qui migre depuis sa source jusque dans un compartiment de l'environnement (sol, air, eau). Il s'agit d'un processus non intrusif dont l'utilisation peut être envisagée lors de la remédiation de sites contaminés. Les mécanismes impliqués dans l'atténuation naturelle sont ceux qui contrôlent naturellement le devenir des contaminants dans les sols : la dispersion, la dilution, la volatilisation, la dégradation biotique ou abiotique, la sorption.... L'utilisation de l'atténuation naturelle comme outil de remédiation a été développée par l'US-EPA (1998, pour les solvants chlorés) sous le nom d'« atténuation naturelle contrôlée » (monitored natural attenuation) qui vise à exploiter les mécanismes naturels impliqués dans ce phénomène. Cette technique a notamment l'intérêt d'être économiquement avantageuse, en comparaison avec d'autres méthodes de remédiation.

Parmi l'ensemble des mécanismes contrôlant l'atténuation naturelle des solvants chlorés, la dégradation de ces substances par les microorganismes présents dans l'environnement est le phénomène prépondérant (Wiedemeier et al., 1999). En outre, une évaluation aussi bien qualitative que quantitative de ce mécanisme semble réalisable à l'échelle de sites contaminés, du fait de l'existence de composés intermédiaires (métabolites) issus de la dégradation des molécules mères et dont la détection permet de confirmer l'existence de l'atténuation. Cependant la mise en œuvre d'une telle évaluation à l'échelle d'un site impose le développement de techniques pertinentes pour permettre de suivre avec efficacité l'évolution des concentrations en solvants chlorés dans le temps et l'espace.

Ce rapport a pour objectif de décrire dans un premier temps les mécanismes impliqués dans la biodégradation des solvants chlorés, mécanisme majeur de la dégradation des molécules chlorées. La description de ces mécanismes permettra, dans un second temps, d'analyser les conditions importantes à caractériser sur un site pour mettre en évidence l'atténuation naturelle. Enfin, une présentation de l'intérêt des méthodes isotopiques pour caractériser la dégradation des solvants chlorés sera réalisée.

2 MECANISMES DE BIODEGRADATION DES SOLVANTS CHLORES

2.1 PROCESSUS GENERAUX IMPLIQUES DANS LA BIODEGRADATION DE COMPOSES ORGANIQUES

Deux processus sont impliqués dans la biodégradation des composés organiques :

- l'utilisation de la molécule comme source d'énergie pour la croissance bactérienne, et dans ce cas trois cas de figures, développés ci-après sont possibles :

- oxydation des composés organiques qui jouent le rôle de donneur d'électron ;
- réduction des composés organiques qui jouent le rôle d'accepteur d'électron ;
- fermentation des composés organiques.

- le co-métabolisme, lors duquel la molécule n'est pas utilisée pour la croissance bactérienne mais est dégradée du fait de l'activité métabolique.

2.1.1 Utilisation du composé organique pour la croissance bactérienne

Dans le cas où les microorganismes utilisent les substances organiques (tels les solvants chlorés) pour leur croissance, la dégradation de la molécule organique est couplée à une production d'énergie lors d'une réaction d'oxydo-réduction. Dans ce cas, les substances impliquées (molécules naturelles ou anthropogéniques) sont considérées comme des sources de croissance primaires, puisqu'elles sont directement impliquées dans la croissance bactérienne.

Oxydation :

Concernant les phénomènes d'oxydation microbienne des solvants chlorés, seul le chlorure de vinyle semble pouvoir être dégradé selon ce processus (dégradation aérobie) alors que les composés les plus chlorés tels le perchloroéthylène (PCE) ou le trichloroéthylène (TCE) ne sont pas susceptibles d'être utilisés comme donneur d'électrons car ces molécules sont beaucoup plus oxydées que d'autres composés présents dans l'environnement (US-EPA, 1998).

Réduction :

Concernant les phénomènes de réduction des solvants chlorés, ce mécanisme a été particulièrement bien caractérisé : il s'agit de la halorespiration. Le solvant est dans ce cas utilisé comme un accepteur final d'électron. La réaction mise en œuvre est la déhalogénéation réductrice. Cette réaction semble prédominante pour le PCE, TCE, trichloroéthane (TCA) et tétrachlorure de carbone. Ce processus sera particulièrement décrit ci-dessous (cf. § 2.2).

Fermentation :

Enfin dans le cas de la dégradation par fermentation, la molécule organique qui est dégradée est à la fois donneur et accepteur d'électron. Ce processus est le principal fournisseur d'électrons (l'hydrogène) et contrôle la réaction de déhalogénéation réductrice, mécanisme majeur de l'atténuation naturelle des solvants chlorés (cf. § 2.2.1).

2.1.2 Co-métabolisme

Le co-métabolisme est un processus par lequel le contaminant est dégradé par une enzyme ou un co-facteur produit par les microorganismes. Le microorganisme ne tire pas de bénéfice de cette dégradation.

Alors que la halorespiration est une réaction enzymatique spécifique, à partir de laquelle un gain d'énergie peut être effectivement retiré, le co-métabolisme est une réaction non spécifique, catalysée par des bactéries méthanogènes et acétogènes (Middeldorp et al., 1999).

2.1.3 Phénomènes impliqués dans la dégradation des solvants chlorés

A l'inverse des hydrocarbures, qui peuvent être oxydés par les micro-organismes dans des conditions aérobies ou anaérobies, les solvants chlorés ne sont dégradés que dans des domaines spécifiques de potentiels d'oxydo-réduction. Les principaux mécanismes de biodégradation des solvants chlorés sont présentés dans les paragraphes suivants (halorespiration - forme de déchloration réductrice -, réactions d'oxydation aérobies et anaérobies). Les types de réaction de biodégradation observés pour différents solvants chlorés figurent dans le Tableau 1.

Substance	Halorespiration	Oxydation aérobie directe	Oxydation anaérobie directe	Co- métabolisme aérobie	Co- métabolisme anaérobie
PCE	X				X
TCE	X			X	X
DCE	X	X	X	X	X
CV	X	X	X	X	X

PCE : perchlororoéthylène ou tétrachloroéthylène ; TCE : trichloroéthylène ; DCE : dichloroéthylène ; CV : chlorure de vinyle

Tableau 1 : Processus de dégradation biologique pour différents solvants chlorés [source : Wiedemeier et al., 1999]

Le tableau ci-dessus montre que les solvants les moins chlorés (DCE, CV) sont les plus susceptibles d'être dégradés en conditions aérobies. Le degré de chloration contrôle la voie de dégradation : oxydation ou réduction. Ainsi, les composés les plus chlorés sont aussi les plus oxydés et la dégradation se produit essentiellement par réduction, alors que les composés les plus faiblement chlorés peuvent être dégradés par oxydation (US-EPA, 1998). Ci-dessous sont décrits plus en détail les réactions de réduction et d'oxydation impliquées dans la dégradation des solvants chlorés.

2.2 DEGRADATION REDUCTRICE DES SOLVANTS CHLORES OU HALORESPIRATION

Le processus d'halorespiration consiste en une déhalogénéation réductrice. Il s'agit d'une réaction qui contrôle de façon majoritaire la dégradation des solvants chlorés et notamment pour les plus fortement chlorés d'entre eux. Elle peut être schématisée par la réaction suivante :



2.2.1 Mécanisme moléculaire

La déchloration réductrice est une réaction d'oxydo-réduction pour laquelle le solvant chloré est l'accepteur final d'électron. Dans cette réaction, le solvant chloré est réduit et un atome de chlore est remplacé par un atome d'hydrogène. Lorsque cette réaction est biologique, elle est appelée halorespiration. La réaction de réduction est décrite ci-dessous pour le PCE (*figure 1*) [source : Wiedemeier et al., 1999].

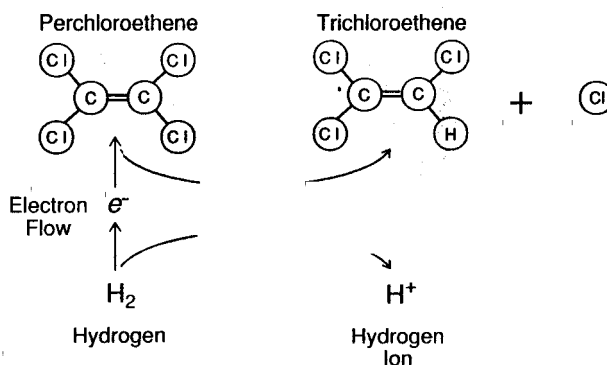


Figure 1 : Déchloration réductrice du PCE.

Lors de cette réaction, de l'énergie est produite utilisée pour la croissance bactérienne. Dans ce cas, les solvants chlorés sont des substrats qui assurent la croissance bactérienne. Les bactéries halo-respirantes jouent notamment un rôle dans la déchloration de composés hautement chlorés comme les chlorobenzènes et le PCE (Furukawa, 2003; Smidt et al., 2000).

Dans ce type de réaction, il a été montré que le donneur d'électrons est essentiellement le dihydrogène (H_2). Celui-ci peut être utilisé si il est présent directement sous forme dissoute dans le milieu, ou suite à la fermentation de composés organiques (matière organique naturelle ou polluants organiques). La réaction de fermentation est en effet productrice d'hydrogène, utile à la réaction de déchloration réductrice. Sur le plan métabolique, une relation de syntrophie existe donc entre les bactéries impliquées dans la fermentation et les bactéries halo-respirantes.

D'autres bactéries utilisent également l'hydrogène comme donneur initial d'électrons : ce sont par exemple les bactéries sulfato-réductrices ou les bactéries dénitrifiantes. Ainsi, dans un milieu qui présente des teneurs en H_2 dissous limitées, une compétition peut s'instaurer entre ces différentes populations microbiennes.

La constante de Monod, caractéristique de la cinétique de croissance bactérienne, permet de quantifier l'aptitude d'une souche donnée à entrer en compétition avec d'autres souches pour l'utilisation de l'hydrogène, si celui-ci est présent dans le milieu en quantité limitante. La comparaison des constantes pour les différentes populations montre que les bactéries halo-respirantes utilisent de façon moins efficace l'hydrogène que les bactéries dénitrifiantes. Cependant lorsque les teneurs en H_2 dissous sont suffisamment élevées, cet élément n'est plus limitant et la compétition ne semble plus se produire.

La figure suivante (figure 2) illustre la capacité de différents microorganismes à utiliser l'hydrogène dissous à de faibles concentrations.

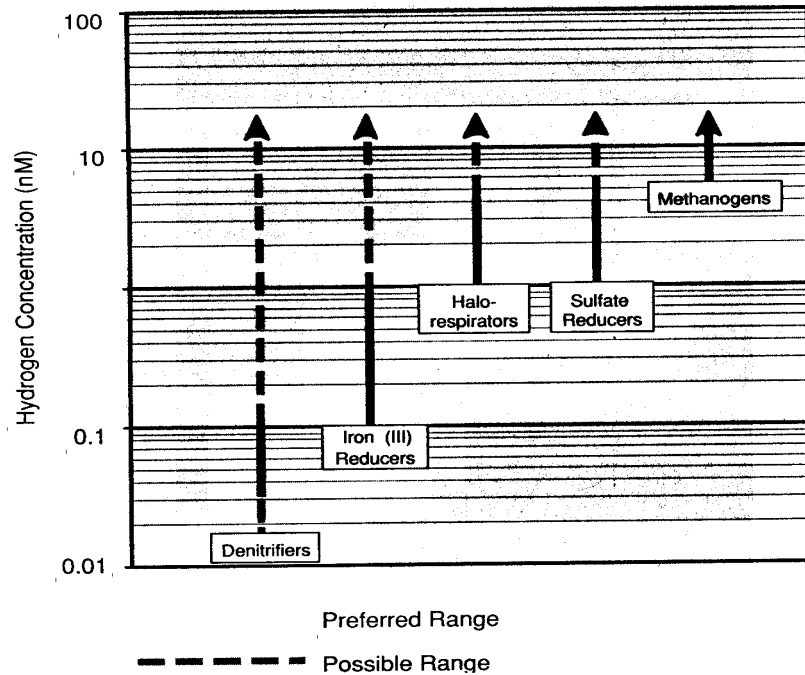


Figure 2 : Domaines de concentration en hydrogène pour lesquels diverses réactions anaérobies sont observées [source : Wiedemeier et al., 1999].

2.2.2 Caractérisation moléculaire des bactéries halorespirantes

Il a été récemment montré que l'enzyme clé impliquée dans le processus de la halorespiration est une déhalogénase réductrice (Smidt et al., 2000). Cette enzyme appartient à la classe des réductases et sa caractérisation moléculaire a permis de mettre en évidence l'existence de protéines contenant des groupements « fer-sulfure », qui traduisent l'existence de ferrédoxines bactériennes (Furukawa, 2003; Smidt et al., 2000). Cette connaissance moléculaire des bactéries halorespirantes peut servir pour le développement de tests moléculaires pour révéler sur un site l'existence du phénomène de halorespiration (Smidt et al., 2000).

Jusqu'à ce jour, il a été découvert que les bactéries capables de déchlorer de façon complète le PCE en éthène sont des bactéries anaérobies strictes (Furukawa, 2003; Smidt et al., 2000).

2.2.3 Thermodynamique de la réaction de halorespiration

Les mécanismes décrits ci-dessus à l'échelle moléculaire sont régis par les lois de la thermodynamique. Ainsi, la dégradation de composés organiques est une réaction d'oxydo-réduction qui permet, par transfert d'électrons, de fournir de l'énergie utile à la croissance bactérienne. L'énergie disponible pour la croissance bactérienne et issue de ces réactions peut être quantifiée par l'énergie libre de Gibbs G_r . Selon les principes thermodynamiques, les réactions qui produisent le plus d'énergie prévalent sur les autres réactions. Ainsi la figure ci-dessous (figure 3) montre les séquences attendues de réactions d'oxydo-réduction bactériennes et l'énergie libre associée à chacune de ces réactions (US-EPA, 1998) :

Accepteurs d'électron d'origine anthropique	ΔG	Accepteurs d'électrons naturels	ΔG
		Respiration aérobie	-3202
		Dénitrification	-3245
		Réduction du Manganèse (IV)	-3202
		Réduction du Fer (III)	-2343
Réduction du PCE	-1500		
Réduction du TCE	-1465		
Réduction du Cis-1,2-DCE	-1166		
		Sulfate (?)	-514
		Méthanogenèse	-136

Figure 3 : Séquences des réactions rédox associée aux valeurs d'énergie libre des réactions [d'après US-EPA, 1998].

La figure ci-dessous (figure 4) précise les potentiels d'oxydo-réduction pour lesquels les réactions de déchloration réductrice peuvent se produire (d'après Wiedemeier et al., 1999).

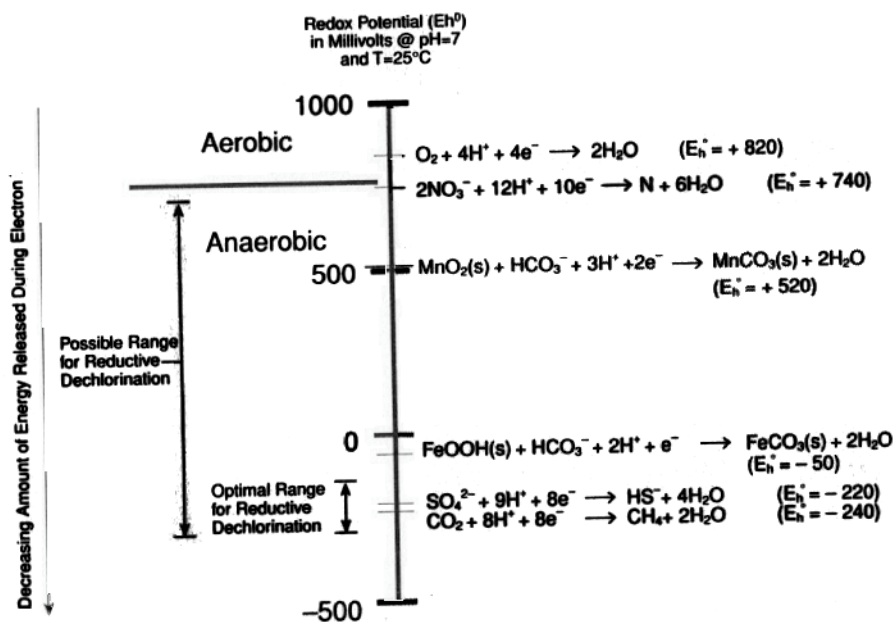


Figure 4 : Potentiels d'oxydo-réduction de diverses réactions et domaines de potentiels permettant la déchloration réductrice [source Wiedemeier et al., 1999].

Ainsi, les conditions favorables aux réactions de déhalogénéation réductrice sont les conditions anaérobies, proches de celles favorables à la méthanogenèse ou à la réduction des sulfates (Ferguson and Pietari, 2000).

Sur la base de ces considérations thermodynamiques, la séquence de réactions mises en jeu au droit des sites où l'atténuation naturelle se produit, est probablement la suivante (Wiedemeier et al., 1999) :

- les bactéries aérobies consomment les substrats organiques non chlorés jusqu'à ce que l'O₂ soit consommé ;
- les bactéries nitro-réductrices consomment les substrats organiques non chlorés jusqu'à ce que les nitrates soient consommés ;
- les bactéries ferro-réductrices consomment les substrats organiques non chlorés jusqu'à ce que le Fe(III) soit consommé ;
- les processus de fermentation consomment les substrats organiques non chlorés et génèrent de l'hydrogène. Les bactéries halo-respirantes consomment l'H₂ et déchlorent les solvants. Les bactéries sulfato-réductrices consomment les substrats organiques non chlorés jusqu'à disparition des sulfates, les bactéries méthanogènes consomment le H₂ pour générer du méthane.

2.2.4 Produits et cinétiques de halorespiration des solvants chlorés

La chaîne de dégradation des solvants chlorés par halorespiration est présentée ci-dessous (figure 5). La déhalogénéation réductrice du PCE conduit à l'apparition de produits de dégradation dans le milieu et à une augmentation de la teneur en chlorures. Lors de ces réactions, les trois isomères du DCE peuvent être produits, mais il semblerait que le cis-1,2-DCE soit majoritairement formé (Wiedemeier et al., 1999).

Chaque phase de la dégradation répond à une cinétique qui lui est propre. La plupart des études menées montrent que la dégradation la plus rapide est obtenue pour les substances les plus fortement chlorées. Ainsi, le PCE est la substance dégradée le plus rapidement et ce quel que soit l'environnement anaérobie considéré. Le CV est dégradé quant à lui à une vitesse relativement lente (Middeldorp et al., 1999). La mise en œuvre d'expérimentations en batch, dans lesquelles la dégradation du PCE est suivie, permet de mettre en évidence ces différences dans les cinétiques de dégradation. Classiquement, deux jours après le début de la dégradation du PCE, le CV apparaît et la conversion en éthène débute. Cependant, cette conversion se produit avec une cinétique 10 fois plus lente par rapport aux réactions en amont de la chaîne de dégradation. Dans ces conditions, la dégradation du dernier atome de chlore prend 20 jours, contre 2 jours pour les trois premiers atomes (Ferguson and Pietari, 2000).

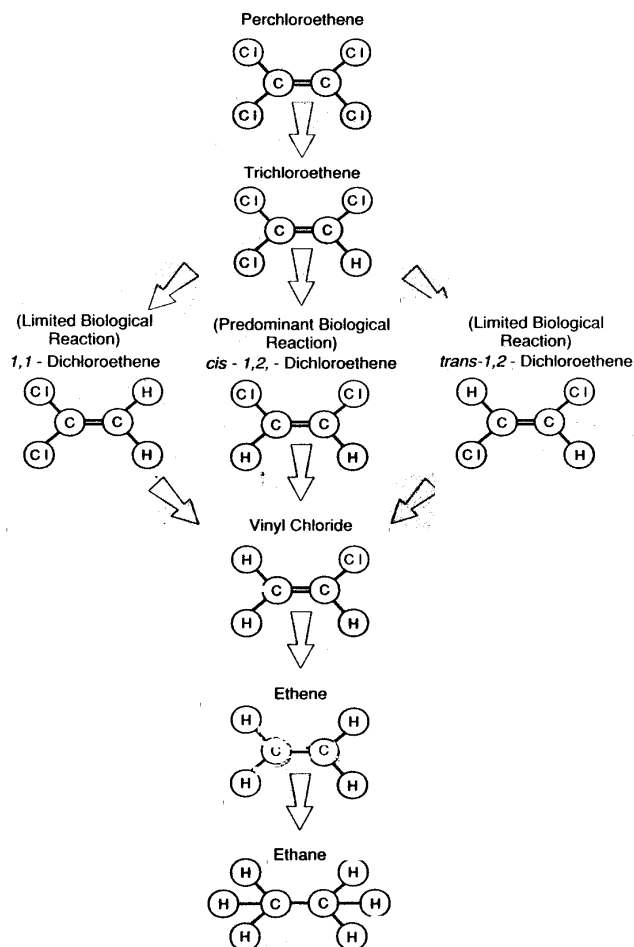


Figure 5 : Chaîne de déchloration réductrice du PCE.

2.2.5 Stœchiométrie des réactions de déchloration réductrice

Ci-après sont données les quantités nécessaires de H₂ pour déchloration un solvant chloré en éthène :

- 1 mg H₂ pour déchloration 21 mg de PCE en éthène,
- 1 mg H₂ pour déchloration 22 mg de TCE en éthène,
- 1 mg H₂ pour déchloration 24 mg de DCE en éthène,
- 1 mg H₂ pour déchloration 3 mg de CV en éthène.

En outre, la fermentation complète de 1 mg de BTEX produit 0,25 à 0,4 mg de H₂. Ainsi pour chaque mg de BTEX consommé, 4,5 à 7 mg de chlore sont produits lors de la déchloration réductrice.

Cependant, différents processus utilisent également l'hydrogène, aussi une règle empirique, non démontrée sur site est proposée : pour la déchloration réductrice complète d'un panache de solvants chlorés, les concentrations en substrats organiques doivent être 25 à 100 fois plus élevées que celles des solvants chlorés (Wiedemeier et al., 1999).

2.2.6 Indicateur sur site de la dégradation par halorespiration

D'après ce qui a été décrit ci-dessus, l'existence d'une dégradation de solvants chlorés par halorespiration impose l'existence de potentiels d'oxydo-réduction faibles et d'une source de substrats fermentescibles, sources de H₂ dissous. Selon l'US-EPA (1998), le potentiel d'oxydo-réduction en deçà duquel la réaction de déchloration réductrice est susceptible de se produire est de -100 mV.

En outre, le composé susceptible de s'accumuler du fait de la halorespiration est le cis-1,2-DCE qui peut être un indicateur pertinent de l'existence de cette réaction. En effet, si la concentration de cis-1,2-DCE représente 80% des isomères du DCE, il est fort probable qu'il provienne de la dégradation du PCE par halorespiration (Parsons et al., 1984, Parsons and Lage, 1985, Barrio-Lage et al., 1987, RTDF, 1997, US-EPA, 1998). Le CV, quant à lui, est susceptible d'être rencontré à de plus faibles teneurs puisqu'il peut migrer vers d'autres zones et être dégradé par oxydation aérobie ou anaérobie directe.

Même si l'évaluation de l'activité biologique sur site est difficile, certains indicateurs peuvent être utilisés de façon qualitative pour mettre en évidence l'existence d'une dégradation des solvants chlorés via cette voie métabolique :

1. Indicateurs de conditions anaérobies : concentrations en O₂ dissous faibles et production de Fe(II) ;
2. Indicateurs de l'existence d'une fermentation : présence de méthane ;
3. Indicateurs de la présence du donneur d'électrons utilisés par la halorespiration : concentration en H₂ supérieure à 1 nM ;
4. Indicateurs de la dégradation des solvants chlorés : présence de produits de dégradation et notamment :

production de cis-1,2-DCE ;

production de chlorure de vinyle et d'éthène ;

concentrations en chlore élevées.

Divers auteurs ont montré l'existence d'une atténuation naturelle en se fondant sur ces indicateurs. Ainsi, An et collaborateurs (2004) ont prouvé l'existence de la biodégradation du TCE en mesurant dans les eaux souterraines au droit du site étudié une faible teneur en oxygène, l'abondance de méthane et la présence de produits de dégradation du TCE. Ils ont également noté que le domaine spatial de dégradation des solvants chlorés correspondait à une zone où la teneur en sulfates diminuait, ce qui selon les auteurs montre que les sulfates sont probablement réduits avant ou de façon concurrente à la méthanogenèse et confirment ainsi les données thermodynamiques présentées plus haut (section 2.2.3).

2.3 DEGRADATION PAR OXYDATION DES SOLVANTS CHLORES

2.3.1 Oxydation aérobie

L'oxydation directe de certains solvants chlorés peut se produire de façon biologique. Dans ce cas, le solvant chloré est le donneur d'e⁻ et l'O₂, SO₄, Fe(III) sont les accepteurs d'e⁻.

La dégradation par oxydation aérobie concerne les substances les moins chlorées, comme le DCE. Ce dernier est dégradé en conditions aérobies et l'isomère cis l'est le plus rapidement (Klier et al., 1998). Le CV peut être utilisé comme un substrat primaire en conditions aérobies. Dans ce cas il est minéralisé en CO₂ et H₂O. Certaines études montrent que la dégradation aérobie du CV est plus rapide que la déhalogénéation réductrice de ce composé (US-EPA, 1998).

L'oxydation directe des composés les plus chlorés, tels le PCE ou le TCE, du fait du degré d'oxydation de ces composés, est plus limitée. Récemment, une dégradation du TCE a été observée, en batch, après mise en contact du composé avec un consortium de 5 souches bactériennes. Dans ces conditions, une efficacité de la dégradation a été obtenue à hauteur de 95 %, après une semaine et pour des concentrations en TCE comprises entre 228 et 2500 mg.l⁻¹. Les taux de dégradation variaient entre 16 et 47 µg.l⁻¹.h⁻¹ (Meza et al., 2003).

2.3.2 Oxydation anaérobie

L'oxydation anaérobie se produit quand des bactéries anaérobies utilisent le solvant chloré comme donneur d'électrons. L'accepteur d'électrons peut être le Fe(III). Le CV peut être oxydé en CO₂ et H₂O via la réduction de Fe(III) : il a en effet été montré, dans des microcosmes amendé avec du Fe(III)-EDTA, que la réduction du CV suit sensiblement la production de CO₂ et d'H₂O. La cinétique de la réaction est limitée par la biodisponibilité du Fe(III) (Bradley et Chapelle, 1996).

2.3.3 Co-métabolisme

En conditions aérobies, les éthènes chlorés, à l'exception du PCE, peuvent subir une oxydation co-métabolique. Les taux d'oxydation augmentent alors que le degré de chloration diminue. Il faut qu'il existe un substrat primaire en des concentrations plus élevées (toluène, phénol, méthane) que le solvant chloré, ainsi que des conditions aérobies.

Dans le cas du co-métabolisme aérobie, les microorganismes utilisent le méthane, phénol, toluène comme source de carbone.

2.4 TAUX DE BIODEGRADATION DES SOLVANTS CHLORES ISSUS DE LA LITTERATURE [SOURCE : WIEDEMEIER ET AL., 1999].

La biodégradation des solvants chlorés est modélisée le plus couramment par une cinétique de premier ordre du type :

$$C = C_0 e^{-kt}$$

avec C : concentration du contaminant à l'instant t

C₀ : concentration initiale du contaminant

k : constante de dégradation du contaminant.

Le temps de demi-vie $t_{1/2}$ de la substance est alors donné par la relation :

$$t_{1/2} = 0,693/k$$

Des valeurs de constantes de dégradation sont présentées dans les tableaux suivants issu de Weidemeier et collaborateurs (1999). Ce tableau montre la large variation des valeurs de constante de dégradation, notamment entre les mesures effectuées en microcosmes et celles réalisées sur le terrain.

Ces constantes étant des paramètres sensibles pour l'utilisation de modèles décrivant l'atténuation naturelle des solvants chlorés (cf section 3.2), il est important de les choisir de manière pertinente et éventuellement de recourir à une mesure spécifique pour le site étudié.

	First-Order Biodegradation Half-Life (days)	Microcosm	Field Scale	Reference
PCE	13			Bouwer and McCarty (1983)
	35	×		Parsons et al. (1984)
	877-1019			Ellis et al. (1996)
TCE	2	×		Fogel et al. (1986)
	69	×		B. H. Wilson et al. (1996)
	89	×		B. H. Wilson et al. (1986)
	33-90	×		Barrio-Lage et al. (1987)
	141	×		B. H. Wilson et al. (1990)
	141-210	×		Haston et al. (1994)
	231-6930	×		B. H. Wilson et al. (1991)
	116-347		×	Gorder et al. (1996)
	147-845		×	Weaver et al. (1996)
	182-210		×	Ehike et al. (1994)
	198-1100		×	Wiedemeier et al. (1996b)
	231		×	Cox et al. (1995)
	365		×	Lee et al. (1995)
	433-630		×	J. T. Wilson et al. (1996)
	788		×	Benker et al. (1994)
	877-1540		×	Ellis et al. (1996)
990-1155		×	Dupont et al. (1996)	
1386			Swanson et al. (1996)	

Compound	First-Order Biodegradation Half-Life (days)	Microcosm	Field Scale	Reference
DCE	116			Bradley and Chapelle (1997)
	277-4331			Wiedemeier et al. (1996b)
	495-1019			Ellis et al. (1996)
,2-DCE	2			Fogel et al. (1986)
	77			J. T. Wilson et al. (1986)
Chlorobenzene	117			J. T. Wilson et al. (1983)
<i>cis</i> -1,2-DCE	27-82			B. H. Wilson et al. (1991)
	77-976		×	Swanson et al. (1996)
	158-495		×	Ehike et al. (1994)
	289		×	Weaver et al. (1996)
	385-578		×	B. H. Wilson et al. (1996)
	1386		×	Cox et al. (1995)
<i>trans</i> -1,2DCE	89-347			Barbee (1994)
	139			J. T. Wilson et al. (1982)
VC	77			Tabak et al. (1981)
	58 (aerobic)			Davis and Carpenter (1990)
	23,100			Barrio-Lage et al. (1990)
	82		×	Cox et al. (1995)
	98-1690		×	Weaver et al. (1996)
	533-1824		×	Wiedemeier et al. (1996b)
693-806		×	Ellis et al. (1996)	
TCA	70	×		Parsons et al. (1985)
1,1,1-TCA	0.4	×		Bouwer and McCarty (1983)
	< 1	×		Vogel and McCarty (1987)
	198-210	×		Klecka et al. (1990)
1,1-DCA	<< 6 (to CA)	×		Vogel and McCarty (1987)
	63-144	×		Henson et al. (1989)
	158	×		J. T. Wilson et al. (1982)
,2-DCA	100-365	×		Henson et al. (1989)

^aRate constant = 0.693 half-life.

Tableau 2 : Valeurs de constantes de demi-vies issues de la littérature (échelle du laboratoire et du terrain).

Dans le tableau suivant, sont présentées des valeurs « recommandées » pour les taux de dégradation anaérobies de premier ordre. Ces valeurs sont issues d'un travail de Aronson et Howard (1997, cités par Wiedemeier et al., 1999) qui ont relevé les données issues de 16 études (in situ ou expériences en laboratoire).

280 **TABLE 6.7. Mean and Recommended First-Order Rate Coefficients for Selected Chlorinated Solvents Presented by Aronson and Howard (1997)**

Compound	Mean of Field/In Situ Studies			Recommended First-Order Rate Coefficients				Comments
	First-Order Rate		Number of Studies Used for Mean	Low End		High End		
	Coefficient (day ⁻¹)	Half-Life (day ⁻¹)		Coefficient (day ⁻¹)	Half-Life (day ⁻¹)	Coefficient (day ⁻¹)	Half-Life (day ⁻¹)	
Tetrachloroethylene (PCE)	0.0029	239	16	0.00019	3647	0.0033	210	Lower limit was reported for a field study under nitrate-reducing conditions.
Trichloroethylene (TCE)	0.0025	277	47	0.00014	4950	0.0025	277	Lower limit was reported for a field study under unknown redox conditions.
Vinyl chloride (VC)	0.0079	88	19	0.00033	2100	0.0072	96	Lower limit was reported for a field study under methanogenic/sulfate-reducing conditions.
1,1,1-Trichloroethane (TCA)	0.016	43	15	0.0013	533	0.01	69	Range not appropriate for nitrate-reducing conditions. Expect lower limit to be much less.
1,2-Dichloroethane (DCA)	0.0076	91	2	0.0042	165	0.011	63	Range reported from a single field study under methanogenic conditions.
Carbon tetrachloride (CT)	0.37	1.9	9	0.0037	187	0.13	5	Range not appropriate for nitrate-reducing conditions. Expect lower limits to be much less.
Chloroform	0.030	23	1	0.0004	1733	0.03	23	Only one field study available. Biodegradation under nitrate-reducing conditions expected.
Dichloromethane	0.0064	108	1	0.0064	108	—	—	Rate constant reported from a single field study under methanogenic conditions.
Trichlorofluoromethane	—	—	—	0.00016	4331	0.0016	433	All studies with very low concentrations of this compound.
2,4-Dichlorophenol	0.014	50	2	0.00055	1260	0.027	26	Range may not be appropriate for nitrate-reducing conditions.

Tableau 3 : Valeurs moyennes et valeurs recommandées de taux de dégradation du premier ordre [source : Aronson and Howard, 1997].

2.5 CLASSIFICATION DES SITES VIS A VIS DE LA DEGRADATION DES SOLVANTS CHLORES

En fonction de la quantité et de la nature des précurseurs de la fermentation qui vont fournir l'hydrogène essentiel à la halorespiration, une classification en trois types des sites industriels contaminés par des solvants chlorés a été proposée. Cette classification est décrite par Wiedemeier et collaborateurs (1999) et un résumé en est fait ci-après.

Les sites de type I sont les sites pour lesquels le carbone d'origine anthropogénique (BTEX...) subit la fermentation et produit de l'hydrogène qui contrôle la halorespiration. Les eaux souterraines, dans ce type d'environnement sont caractérisées par de fortes conditions réductrices. En outre, l'environnement de tels sites se caractérise également par une faible teneur en oxygène dissous, nitrate et sulfate ainsi que par des concentrations élevées en Fe(II) et en méthane. Les solvants les plus chlorés (PCE, TCE et DCE) sont les plus rapidement dégradés dans ce type d'environnement.

Dans ce type d'environnement, trois questions doivent être posées quant à l'évolution du panache :

- les quantités de substrats fermentescibles sont-elles suffisantes pour assurer une réduction microbienne totale des solvants chlorés et la production d'hydrogène est-elle suffisante pour mener à bien la déchloration ?

- la compétition entre les différentes substances accepteuses d'électrons sera-elle suffisamment faible pour maintenir un niveau élevé de halorespiration ?
- les teneurs en CV sont-elles suffisamment protectrices vis à vis de la santé humaine et de l'environnement ?

Les sites de type II sont les sites pour lesquels la matière organique naturelle sert de substrat à la fermentation. Un environnement de type II se caractérise en général par une dégradation plus lente des produits les plus chlorés par rapport à un environnement de type I. Les mêmes questions que celles évoquées ci-dessus peuvent également se poser dans un environnement de type II.

Les sites de type III se caractérisent en général par une eau souterraine très oxygénée avec peu ou pas de matière organique. Les concentrations en oxygène dans ce type d'environnement sont typiquement supérieures à 1 mg/L Il s'agit de sites où les conditions sont faiblement réductrices. Les solvants chlorés peuvent être alors co-métabolisés par les hétérotrophes aérobies et les méthanotrophes mais la halorespiration sera défavorisée et les solvants comme le PCE ou le TCE ne seront pas biodégradés. Pour ces derniers, les mécanismes majeurs de l'atténuation seront l'advection, la dispersion et la sorption (phénomènes physiques). Le CV, ainsi que le DCE, pourront être oxydés rapidement dans ce type d'environnement.

Pour un même panache, plusieurs types peuvent être rencontrés, dans ce cas, l'environnement est dit mixte. L'environnement le plus favorable à l'atténuation naturelle est un environnement mixte type III / type I.

3 EVALUATION DU POTENTIEL D'ATTENUATION NATURELLE

3.1 INTRODUCTION

L'atténuation naturelle comme outil de remédiation d'un site contaminé ne peut être utilisée qu'après avoir prouvé l'existence, sur le site considéré, d'un tel phénomène. Selon les critères définis par l'US-EPA (1998), il doit avoir en outre été prouvé que l'atténuation naturelle permettrait d'aboutir aux objectifs de remédiation définis pour le site, dans un délai comparable à celui qu'offrirait d'autres techniques de traitement.

La mise en évidence de l'existence d'une atténuation naturelle passe essentiellement par la recherche de paramètres indicateurs d'une biodégradation puisque ce phénomène est le principal qui contrôle l'atténuation naturelle (Wiedemeier et al., 1999).

Différentes méthodes, complémentaires, peuvent être utilisées pour mettre en évidence l'existence d'une atténuation naturelle de solvants chlorés (Vieth et al., 2003 ; Sherwood Lollar et al., 2001 ; Wiedemeier et al., 1999 ; US-EPA, 1998) :

- la détermination de paramètres physico-chimiques du milieu, indicateurs de phénomènes de dégradation tels que ceux décrits ci-dessus (§ 2). Les paramètres ainsi déterminés pourront être utilisés dans des modèles de transfert des contaminants dans lesquels des modules relatifs à l'atténuation naturelle sont intégrés ;

➤ la caractérisation isotopique des solvants chlorés en différents points de l'aquifère.

En plus de ces mesures, l'historique de la contamination, ainsi qu'une caractérisation hydrogéologique précise du site doivent également être effectués.

3.2 DETERMINATION DE PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DU MILIEU

Comme déjà dit ci-dessus, les paramètres physico-chimiques du milieu à déterminer sont indicateurs de la dégradation des solvants chlorés. En d'autres termes, ces paramètres permettent de caractériser la source de contamination, les paramètres de sorption, les accepteurs d'électrons impliqués dans la dégradation, les sous-produits issus du métabolisme, et les paramètres de qualité générale des eaux souterraines. Les paramètres sont décrits dans les tableau 5 et tableau 6 ci-dessous. La signification de ces paramètres ainsi que les limites de quantification associées aux mesures, telles que précisées par Wiedemeier et collaborateurs (1999) et les éventuels problèmes à anticiper lors de la détermination de ces paramètres sont également indiqués dans les tableaux qui suivent.

In fine, ces paramètres permettent de caractériser la composition de la source de contamination, de montrer l'existence d'une atténuation naturelle et d'identifier les mécanismes impliqués dans l'atténuation naturelle.

Il est à noter qu'il n'est pas forcément nécessaire de mesurer l'ensemble des paramètres évoqués dans les tableaux ci-dessous, mais que la sélection des paramètres à mesurer doit se faire en fonction des sites considérés ainsi que de l'historique de contamination.

Dans le même esprit, l'US-EPA (1998), dans son protocole technique pour l'évaluation de l'atténuation naturelle des solvants chlorés dans les eaux souterraines, propose un ensemble de paramètres à déterminer sur site (tableau 7). A chacun de ces paramètres sont attribués une interprétation ainsi qu'un score qui permet d'évaluer le potentiel d'atténuation naturelle pour un site donné (tableau 4 ci-dessous).

Score obtenu	Interprétation
0 à 5	Preuve insuffisante de l'existence d'une biodégradation
6 à 14	Preuve limitée de l'existence d'une biodégradation
15 à 20	Preuves adéquates
> 20	Fortes preuves

Tableau 4 : Interprétation des scores obtenus d'après le tableau 7 [source : US-EPA, 1998].

Analyse	Signification du paramètre	Limites de quantification	Limites
Hydrocarbures aromatiques et chlorés (BTEX, solvants chlorés)	Extension de la contamination du sol	1 mg/kg	Echantillonnage délicat : volatiles
Carbone organique total (COT)	Des concentrations élevées en COT dans l'aquifère permettent une déchloration réductrice	0,1 %	
Fe(III) biologiquement disponible	Si CV : potentiel pour dégradation via réduction du fer	50 mg/kg	
Hydrocarbures aromatiques et chlorés dans les NAPL	Composition et "force" de la source		

Tableau 5 : Paramètres physico-chimiques à mesurer dans les sols pour l'évaluation de l'atténuation naturelle [source : Wiedemeier et al., 1999]

Analyse	Signification du paramètre	Limite de quantification	Limites
Hydrocarbures aromatiques et chlorés (BTEX, solvants chlorés)	Extension panache		Echantillonnage délicat : volatiles
Oxygène dissous	Si concentration < 0,5 mg/l : conditions anaérobies	0,2 mg/l	A faire sur site. Protection des échantillons d'eau pendant échantillonnage et mesure
Nitrates	Substrat pour la respiration en cas d'absence d'O ₂	0,1 mg/l	
Mn (II)	Indication de la réduction de Mn(IV) pendant la dégradation de composés organiques en absence de O ₂ et nitrates	0,5 mg/l	
Fe(II)	Indication de la réduction de Fe(III) pendant la dégradation de composés organiques en absence de O ₂ , nitrates et Mn(IV)	0,5 mg/l	
Sulfates	Substrat pour la respiration en cas d'absence d'O ₂	5 mg/l	
Méthane, éthane, éthène	Méthane : présence de dégradation de carbone organique	1 µg/l	
CO ₂		5 mg/l	
alcalinité	Mesure capacité tampon, vérification origine de l'eau souterraine	50 mg/l	
Potentiel d'oxydo réduction			In situ, protéger les échantillons de l'oxygène
pH	Les processus anaérobies et aérobie sont sensibles au pH		
Conductivité	Vérification origine de l'eau souterraine		
Chlorures	Vérification origine de l'eau souterraine + produit final dégradation des chlorés	1 mg/l	

Tableau 6 : Paramètres physico-chimiques à mesurer dans les eaux pour l'évaluation de l'atténuation naturelle [source : Wiedemeier et al., 1999]

Analyse	Concentration dans la zone la plus contaminée	Signification du paramètre	Score
Oxygène	< 0,5 mg/l	Tolérable, la déchloration réductrice n'a pas lieu à des concentrations plus élevées	3
Oxygène	> 5 mg/l	Pas de déchloration réductrice. Possibilité de dégradation aérobie du CV	-3
Nitrates	< 1 mg/l	A des concentrations plus élevées, compétition possible avec la déchloration réductrice	2
Fer (II)	>1 mg/l	La déchloration réductrice est possible. Le CV peut être dégradé via des conditions Fe(III)-réductrices	3
Sulfates	< 20 mg/l	A des concentrations plus élevées, compétition possible avec la déchloration réductrice	2
Sulfites	> 1 mg/l	Déchloration réductrice possible	3
Méthane	< 0,5 mg/l	Oxydation du CV Dernier produit de la voie réductrice. Accumulation du CV	0
	> 0,5 mg/l		3
Potentiel rédox	< 50 mV	Voie réductrice possible	1
	< -100 mV	Voie réductrice probable	2
pH	5<pH<9	Conditions optimales	0
	5>pH>9	Conditions défavorables	-2
TOC	>20 mg/l	Source de C et d'énergie, contrôle la déchloration, peut être naturelle ou anthropogène	2

Tableau 7 : Paramètres et scores issus du protocole technique pour mettre en évidence l'existence d'une biodégradation par les solvants chlorés sur site [source : US-EPA, 1998].

Température	>20 °C	Accélération des processus biochimiques	1
CO ₂	> 2 * bruit de fond	Dernier produit de l'oxydation	1
Alcalinité	> 2 * bruit de fond	Résultats de l'interaction entre CO ₂ et les minéraux de l'aquifère	1
Chlorures	> 2 * bruit de fond	Produit de dégradation des solvants chlorés	2
H	> 1 nM	Déchloration réductrice possible, le CV peut s'accumuler	3
H	< 1 nM	Le CV est oxydé	0
Acides gras volatils	>0,1 mg/l	Métabolites issus de la dégradation de composés plus complexes, source de carbone et d'énergie	2
BTEX	>0,1 mg/l	Source de carbone et d'énergie, contrôle la déchloration réductrice	0
PCE		Originaire de la source	0
TCE		Originaire de la source Issu de la dégradation des chlorés	0 2
DCE		Originaire de la source Issu de la dégradation des chlorés.	0 2
CV		Originaire de la source Issu de la dégradation des chlorés	0 2
Ethène	> 0,01 mg/l	Produit fils de la dégradation du CV	0
	> 0,1 mg/l		2

Tableau 8 (suite)

Les paramètres ainsi déterminés peuvent être utilisés dans des modèles prédictifs du devenir des polluants dans les eaux souterraines intégrant un module d'évaluation de l'atténuation naturelle. Mulligan et Yong (2004) ainsi que Wiedemeier et collaborateurs (1999) proposent une revue de ces différents modèles. Le tableau ci-dessous, issu de Mulligan et Yong, 2004 montre la diversité des modèles qu'il est possible d'utiliser.

Model name	Applicability	Developer or reference
BIO1D	1D model for aerobic and anaerobic biodegradation and sorption of hydrocarbons	GeoTrans
BIOF & T 3-D	2 or 3D model for flow and transport in saturated/unsaturated zone. Includes convection, dispersion, diffusion, desorption, first order or Monod biodegradation, sequential biodegradation	Scientific Software Group
BIOREDOX	3D model for chlorinated solvents and petroleum hydrocarbons. Couples biodegradation and reduction of oxygen, nitrate, sulphate and carbon dioxide	Carey et al. (1998)
BIOPLUME II	2D model for transport of a single dissolved hydrocarbon species with oxygen limited biodegradation, first order decay, linear sorption, advection and dispersion	Rifai et al. (1988)
BIOPLUME III	2D model for multiple hydrocarbons with advection, dispersion, sorption, first order decay, reactant limited biodegradation	Development commissioned by AFCEE
BIOSLURP	Finite element 2D model for vapor transport of LNAPLs in the groundwater in the vadose zone. Includes convection, dispersion, diffusion, adsorption, first-order biodegradation kinetics	Scientific Software Group
BioTracker	1D Natural attenuation screening model with visualization tools for groundwater. Multispecies transport and transformation. Used with Sequence and BioTrends. Based on Bioredox	Scientific Software Group
CHEMFLO	To simulate 1D water movement and chemical transport in unsaturated soils and the convection-dispersion equation (chemicals). Partitioning is assumed to be instant and reversible. Public domain.	http://www.epa.gov/ada/csamos/models/chemflo.html
3DFATMIC	3D model to simulate subsurface flow, transport, and fate of contaminants which are undergoing chemical and/or biological transformations for both saturated and unsaturated zones.	http://www.epa.gov/ada/csamos/models/3dfatmic.html
MODFLOW	3D finite difference model for estimating the vertical migration of dissolved organic solutes through the vadose zone to ground water and is a closed-form analytical solution of the advective-dispersive-reactive transport equation. Evapotranspiration and drainage included	McDonald and Harbaugh (1988)
MT3D, MT3DMS	For simulation of unsaturated zone flow and transport of oily wastes by finite difference. Advection, dispersion, partitioning of pollutant between the liquid, soil, vapor, and oil phases by linear equilibrium isotherms. Degradation of pollutant and oil is described as first-order process.	S.S. Papadopoulos and Associates
PESTAN	Finite difference model for transient and steady state groundwater flow. Used with transport models MT3D, Biotrans, RAND3D	http://www.epa.gov/ada/csamos/models/pestan.html
RITZ	3D transport model for advection, linear and non-linear sorption dispersion, first order decay of single species. Coupled with MODFLOW	http://www.epa.gov/ada/csamos/models/ritz.html
RT3D	Modification of MT3D. For multispecies transport of chlorinated compounds, by-products and solid-phase species. Instantaneous aerobic degradation, BTEX degradation with multiple electron acceptors, sequential anaerobic degradation of PCE/TCE, and combined aerobic/anaerobic degradation of PCE/TCE. Advection, dispersion, Monod biodegradation, sorption, decay.	Washington State University and Pacific Northwest National Laboratory
SEAM3D	Transport of multiple solutes in aquifers. Monod kinetics biodegradation, Based on engine of MT3D. Can follow NAPL dissolution.	U.S. Military
SESOIL	Transport through vadose zone in water, soil and air phases. Can be combined with MODFLOW. Includes surface runoff and erosion pollution transport, volatilization to soil surface	U.S. Salinity Lab
SWIFT, SWIFT/486	3D finite difference model to simulate contaminant, fluid and heat transport in porous and fractured media. Linear and nonlinear desorption, dispersion, diffusion, dissolution, leaching and decay. Public domain	Sandia National Laboratory
SWMSM_2D	3D Modeling transient and steady-state flow and mass transport in the groundwater (saturated) and vadose (unsaturated) zones of aquifers. Physical, chemical and biological processes. Includes multiple organic NAPL phases; the dissolution and/or mobilization of NAPL's by nondilute remedial fluids; chemical and microbiological transformations; and changes in fluid properties. Includes nonequilibrium interphase mass transfer; sorption; geochemical reactions; and the temperature dependence of pertinent chemical and physical properties. Model includes inhibition, sequential use of electron acceptors, and cometabolism for a general class of bioremediation processes	U.S. Salinity Lab
UTCHEM	2D model for transport of water and solutes in various saturated media. Linear sorption, zero-order production, first-order decay, dispersion. Public domain.	http://www.epa.gov/ada/csamos/models/utchem.html
VLEACH	1D finite difference model for evaluating effects on ground water from the leaching of volatile, sorbed contaminants through the vadose zone. Includes liquid-phase advection, solid-phase sorption, vapor-phase diffusion, and three-phase equilibration in terms of soil properties, recharge rates, depth of water, or initial conditions. Public domain.	http://www.epa.gov/ada/csamos/models/vleach.html

Tableau 8 : Liste de modèles disponibles pour l'atténuation naturelle des contaminants dans les sols et les eaux souterraines [source : Mulligan and Yong, 2004].

Les constantes de dégradation telles que décrites dans la section 2.4. sont également utilisées comme paramètre d'entrée des différents modèles. A titre informatif pour différents solvants chlorés, Mulligan et Yong (2004) récapitulent les constantes de biodégradation obtenues depuis des données in situ et couramment utilisées dans les modèles (tableau 9).

	Constante de dégradation
PCE	4,0 par an (4 sites)
TCE	1,1 par an (18 sites)
cis-DCE	1,6 par an (13 sites)
CV	1,3 par an (6 sites) 0,002 à 0,15 par jour (7 sites)

Tableau 9 : Constantes de dégradation obtenues depuis des données in situ [source : Mulligan and Yong, 2004].

3.3 CARACTERISATION ISOTOPIQUE DE LA DEGRADATION DES SOLVANTS CHLORES

A l'échelle d'un site industriel, la mise en évidence formelle de la dégradation des solvants chlorés peut être difficile. En effet l'observation seule d'une diminution de la concentration en solvants chlorés ne suffit pas, du fait des phénomènes de volatilisation ou de dilution qui peuvent entraîner des diminutions de concentration, sans pour autant être indicateurs de la (bio)dégradation de ces composés.

Quelques auteurs ont montré en microcosmes ou sur le terrain que la dégradation des solvants chlorés s'accompagnait d'un fractionnement isotopique du carbone ou du chlore (Numata et al., 2002 ; Witt et al., 2002 ; Sherwood Lollar et al., 2001 ; Slater et al., 2001; Bloom et al., 2000 ; Heraty et al., 1999 ; Hunkeler et al., 1999 ; Sherwood Lollar et al., 1999 ; Sturchio et al., 1998).

Ainsi, l'utilisation de cette propriété pourrait être un outil efficace pour caractériser la (bio)dégradation de solvants chlorés. Schmidt et al (2004) ont procédé à une revue de l'état de l'art concernant l'utilisation des méthodes isotopiques pour l'étude du devenir des contaminants organiques dans l'environnement.

3.3.1 Principes et caractérisation du fractionnement isotopique

L'analyse des isotopes stables du carbone s'avère être un outil efficace pour mettre en évidence et estimer le processus de dégradation des COHV.

A partir d'échantillons d'eau et de sol prélevés sur différents sites contaminés, différents auteurs ont montré que la biodégradation des COHV se matérialisait par un important fractionnement isotopique (*e.g.* une augmentation du $\delta^{13}\text{C}$) au cours du temps et pour chacune des étapes du processus (Slater *et al.*, 2001 ; Sherwood Lollar *et al.*, 2001 ; Bloom *et al.*, 2000 ; Hunkeler *et al.*, 1999 et Sherwood Lollar *et al.*, 1999). Le fractionnement isotopique au cours de la dégradation de solvants chlorés par déchloration réductrice se fait dans diverses conditions, en présence de différentes populations dégradantes. Ce fractionnement isotopique est également observé dans le cas de la dégradation de solvants chlorés par la voie aérobie ou lors de l'utilisation de barrières réactives. Ce fractionnement traduit un enrichissement des produits obtenus à partir des réactifs en ^{12}C alors que les réactifs sont appauvris en ^{12}C au cours de la réaction. Ceci est lié à une énergie de liaison $^{12}\text{C}-\text{Cl}$ plus faible que celle de la liaison $^{13}\text{C}-\text{Cl}$ qui est donc dégradée plus difficilement.

Le ratio isotopique d'un composé donné s'exprime par une notation delta, $\delta^{13}\text{C}$, définie par la relation :

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{échantillon}}/({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{standard}} - 1] * 1000 \text{ (Équation 1)}$$

Le fractionnement isotopique en une molécule précurseur et son produit de dégradation peut être exprimé par le rapport des ratio isotopiques des deux composés :

$$\alpha = ({}^{13}\text{P}/{}^{12}\text{P})/({}^{13}\text{R}/{}^{12}\text{R}) \text{ (Équation 2)}$$

avec P les produits de la réaction et R les réactifs de la réaction.

α est dépendant de la température et du système de dégradation, c'est à dire du chemin de dégradation suivi.

On définit également le facteur d'enrichissement $\varepsilon_{\text{P/R}}$:

$$\varepsilon_{\text{P/R}} = 1000 (\alpha - 1) \text{ (Équation 3)}$$

L'évolution du ratio isotopique entre le réactif et le produit, si elle suit une cinétique du premier ordre, peut être modélisée selon l'équation de Rayleigh (d'après Mariotti *et al.*, 1981) :

$$\ln (10^{-3} \delta^{13}\text{C}_{\text{final}} + 1 / 10^{-3} \delta^{13}\text{C}_{\text{initial}} + 1) = (\alpha - 1) \ln f \text{ (Équation 4)}$$

qui équivaut à l'équation 5 ci-dessous :

$$1000 * \ln (10^{-3} \delta^{13}\text{C}_{\text{final}} + 1 / 10^{-3} \delta^{13}\text{C}_{\text{initial}} + 1) = \varepsilon * \ln f \text{ (Équation 6)}$$

f étant la fraction résiduelle du polluant avant dégradation, $f = C_t/C_0$ (où C_t et C_0 sont respectivement la concentration du polluant à un instant t quelconque et à l'origine).

Il convient de noter que le modèle de Rayleigh ne peut être appliqué que dans le cas d'un système clos, pour une source finie de polluant et lorsqu'il n'y a pas de réaction entre le polluant source et le produit de dégradation.

Dans ces conditions, le tracé de la droite $\ln(10^{-3} \delta^{13}C_{\text{final}} + 1 / 10^{-3} \delta^{13}C_{\text{initial}} + 1)$ en fonction de $\ln f$, permet de déduire, pour des conditions données, le coefficient de régression linéaire ϵ ou le facteur de fractionnement isotopique α qui sont liés par l'équation 7. Ces deux paramètres caractérisent le fractionnement isotopique qui a lieu pour un type de dégradation donné et dans les conditions de validité du modèle de Rayleigh.

Concernant l'évolution des produits de dégradation intermédiaires des solvants chlorés, Hunkeler et collaborateurs (2002) ont développé un modèle, testé sur le chlorure de vinyle, qui tient compte du fractionnement isotopique pour un processus en deux temps. Ce modèle est en fait une adaptation du modèle de Rayleigh qui part d'hypothèses similaires : il est en effet supposé que chaque phase de la transformation peut être modélisée par une cinétique du premier ordre et que le facteur de fractionnement reste constant.

3.3.2 Fractionnement isotopique des solvants chlorés en microcosme

En microcosmes, le fractionnement isotopique des solvants chlorés lors de leur dégradation peut être mis en évidence pour différentes voies de dégradation : déchloration réductrice biotique (Bloom et al., 2000 ; Hunkeler et al., 1999) ou abiotique (Bill et al, 2001) ; co-métabolisme (Brungard et al., 2003). Aussi, le fractionnement isotopique n'est pas spécifique à une voie de dégradation et devra être utilisé comme un indicateur global de la dégradation des solvants chlorés, même si la plupart des études menées utilisaient le fractionnement isotopique en vue de caractériser la biodégradation.

A titre d'exemple, la figure suivante montre une évolution caractéristique du $\delta^{13}C$ au cours des différentes étapes de la déchloration du PCE en condition anaérobie biotique (déchloration réductrice) (Hunkeler et al., 1999).

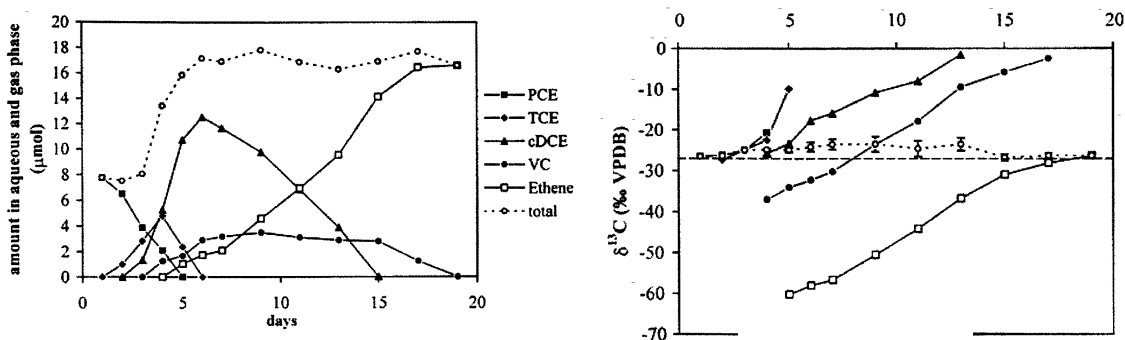


Figure 6 : Variations des concentrations et des rapports isotopiques des produits issus de la biodégradation du tétrachloroéthylène (PCE) d'après Hunkeler et al. (1999).

Le $\delta^{13}C$ de chaque produit issu de la dégradation est moins négatif que celui de son précurseur. Ces résultats ainsi que ceux issus d'autres études (e.g. Bloom et al., 2000) montrent que la déchloration réductrice des solvants chlorés s'accompagne d'un fractionnement isotopique significatif du carbone. En outre, il est également montré que le $\delta^{13}C$ décroît avec le nombre d'atomes de chlore de la molécule. De plus, pour une molécule donnée, le $\delta^{13}C$ augmente au cours du temps, ce qui montre que la dégradation entraîne un enrichissement de la molécule mère en ^{13}C .

Il faut également noter que lorsque la dégradation est complète, le $\delta^{13}C$ de l'éthène est égal au $\delta^{13}C$ du PCE en début d'expérimentation.

A partir de différentes études relevées dans la littérature, les facteurs d'enrichissement des différents solvants chlorés PCE, TCE, cis-DCE et CV lors de la biodégradation et calculés à partir du modèle de Rayleigh (sauf pour l'étude Hunkeler et al., 1999) sont récapitulés dans le tableau 10 ci-dessous.

Produit	ϵ (‰)	Conditions	Source
PCE	-2	batch, anaérobie	[Hunkeler et al., 1999]
	-5,2	batch, enrichissement méthanogène	[Slater et al., 2001]
TCE	-2,5	batch, enrichissement méthanogène	[Bloom et al., 2000]
	-4	batch, anaérobie	[Hunkeler et al., 1999]
	-6,6	batch, enrichissement méthanogène	[Bloom et al., 2000]
	-7,1	batch, anaérobie	[Sherwood-Lollar et al., 1999]
	-13,8	batch, anaérobie	[Slater et al., 2001]
cDCE	-12	batch, anaérobie	[Hunkeler et al., 1999]
	-14,1	batch, enrichissement méthanogène	[Bloom et al., 2000]
	-16,1	batch, enrichissement méthanogène	[Bloom et al., 2000]
	-20,4	batch, anaérobie	[Slater et al., 2001]
CV	-21,5	batch, enrichissement méthanogène	[Bloom et al., 2000]
	-22,4	batch, anaérobie	[Slater et al., 2001]
	-26,6	batch, enrichissement méthanogène	[Bloom et al., 2000]
	-26	batch, anaérobie	[Hunkeler et al., 1999]

Tableau 10 : Facteur d'enrichissement ϵ de différents solvants chlorés, d'après la littérature. Ces facteurs sont calculés par le modèle de Rayleigh, sauf pour les valeurs issues de [Hunkeler et al., 1999].

En concordance avec l'étude de Hunkeler et collaborateurs (1999) décrite ci-dessus (figure 6), le tableau 10 montre que, malgré une variation des facteurs d'enrichissement d'une expérience à l'autre, un fractionnement isotopique existe au cours de chaque étape de la dégradation du solvant chloré.

Les deux dernières étapes de la biodégradation du PCE sont les plus lentes. Ainsi Hunkeler et collaborateurs (1999) montrent que la déchloration du 1,1 DCE est rapide (8 jours), suivie par celle du cis-1,2,-DCE (25 jours), trans-1,2,-DCE (90 jours) et chlorure de vinyle (100 jours). Néanmoins, comme montré dans le tableau 10 ci-dessus, c'est au cours des deux dernières étapes de la déchloration que le fractionnement isotopique est le plus grand et donc que la dégradation est la plus quantitativement importante. La réussite du processus d'atténuation naturelle dépend donc de ces deux dernières étapes (Bloom et al., 2000).

Le fractionnement isotopique peut être utilisé également pour déterminer l'origine d'une contamination. En effet, il peut permettre d'identifier l'origine de produit de dégradation dans le cas d'un panache où un mélange complexe de polluant est présent [Hunkeler et al., 2002 ; Beneteau et al., 1999]. C'est le cas par exemple du chlorure de vinyle, qui est particulièrement appauvri lorsqu'il est issu de la dégradation d'isomères du DCE, en comparaison de chlorure de vinyle issu d'une synthèse industrielle. Le $\delta^{13}\text{C}$ varie, en fonction du précurseur, entre $-49,6$ ‰ et -46 ‰ si le chlorure de vinyle est issu de la dégradation du DCE alors que le $\delta^{13}\text{C}$ est proche de -28 ‰ si la molécule est directement issue d'une synthèse (Hunkeler et al., 2002).

Dans le cas d'un mélange, comme c'est souvent le cas dans un panache, certains auteurs proposent une analyse conjointe du fractionnement isotopique de l'hydrogène, du chlore et du carbone. En particulier, le fractionnement isotopique de l'hydrogène permet de distinguer la source de TCE : dégradation du PCE ou produit en tant que tel (Shouakar-Stash et al., 2003).

3.3.3 Intérêt du fractionnement isotopique pour une caractérisation de l'atténuation naturelle sur un site industriel

Hunkeler et collaborateur (1999), sur la base de comparaisons de résultats obtenus en microcosmes et sur le terrain, montrent une bonne correspondance entre les résultats obtenus aux différentes échelles. Ainsi le profil d'enrichissement isotopique obtenu en microcosme, tel que présenté ci-dessus (*figure 6*) est semblable à celui obtenu d'après des mesures faites sur des échantillons d'eau souterraine prélevés sur un site situé à Toronto (Canada).

De façon analogue, les observations faites par Sherwood Lollar et collaborateurs (2001) sur la base aérienne de Dover (EU) aboutissent aux mêmes conclusions que celles décrites plus haut pour des expérimentations réalisées en microcosmes. Les teneurs en PCE et TCE mesurées sur des échantillons d'eau souterraine en provenance d'un puits situé au droit immédiat de la source de contamination sont élevées. En cet point, le $\delta^{13}\text{C}$ du TCE est de -25‰ . En aval de la source, d'autres prélèvements montrent des zones plus enrichies en produits de dégradation (cis-DCE, CV et éthène) et le $\delta^{13}\text{C}$ du TCE en ces points est plus enrichi (-18‰). Ces mesures montrent l'existence d'une dégradation des solvants chlorés présents dans le panache (PCE et TCE) qui entraîne, dans le sens d'écoulement de la nappe, une diminution des teneurs en produits mères et une augmentation des teneurs en produits de dégradation. Ces variations de teneurs sont accompagnées de variation dans les $\delta^{13}\text{C}$ des composés.

Vieth et collaborateurs (2003) utilisent le ratio isotopique comme signature de la source de contamination. Des mesures de $\delta^{13}\text{C}$ du TCE faites dans deux aquifères différents leur permettent de conclure quant à une source unique de contamination du fait de l'égalité des $\delta^{13}\text{C}$. En fonction des résultats obtenus, ils calculent également un facteur de fractionnement isotopique *in-situ*, qui permet de montrer la corrélation entre la concentration et la composition isotopique. Dans ce cas, la valeur du facteur de fractionnement isotopique est inférieure à ce qu'elle devrait être pour des mesures réalisées en microcosmes, du fait de la sorption du PCE sur la matrice de l'aquifère, qui entraîne une diminution de la teneur en PCE dans l'eau. De même, Beneteau et collaborateurs [1999] utilisent le fractionnement isotopique du carbone ainsi que celui du chlore ($^{36}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) sur un site de nettoyage à sec situé à Angus (Ontario) pour identifier la source de la contamination.

Une estimation correcte de la biodégradation des solvants chlorés à l'échelle d'un site industrielle implique une caractérisation précise des facteurs de fractionnement isotopiques, spécifiques de la population microbienne présente sur le site étudié ainsi que de l'environnement du site étudié (Schmidt et al., 2004). Cette caractérisation impose la réalisation, pour un site donné, d'expérimentations en microcosmes dans les mêmes conditions que celles du site étudié. En plus de mettre en évidence l'existence du fractionnement isotopique, les expérimentations de laboratoire permettront de quantifier la biodégradation en utilisant le modèle de Rayleigh, si les facteurs d'enrichissement ou de fractionnement sont déterminés avec pertinence.

3.3.4 Influence d'autres processus physico-chimiques sur le fractionnement isotopique

L'utilisation des techniques isotopiques pour mettre en évidence l'existence d'une (bio)dégradation sera efficace si les autres phénomènes conduisant à une diminution de la concentration des solvants chlorés dans les eaux souterraines mais n'entraînant pas une dégradation de ces composés (sorption, dilution...) s'accompagnent d'un fractionnement isotopique nul ou négligeable face à celui obtenu pour la dégradation.

En l'absence de biodégradation, dans des conditions de terrain, (Beneteau et al., 1999) et collaborateurs (1999) ont montré que le fractionnement isotopique du carbone est constant dans l'eau, quelque soit le point échantillonné en aval du panache.

(Slater et collaborateurs (2000) ainsi que Hunkeler et collaborateurs (1999) ont démontré que l'adsorption n'avait aucune influence significative sur le fractionnement isotopique du PCE et du TCE. (Schüth et al., 2003) en travaillant sur l'adsorption de composés organiques volatils, dont des solvants chlorés sur des matériaux calcaires a également montré que le fractionnement isotopique des composés lié aux phénomènes de sorption des polluants est négligeable face au fractionnement lié à la dégradation microbienne.

La volatilisation est un autre processus majeur qui régit le devenir des composés volatils dans la nature. La volatilisation du TCE en phase aqueuse et non aqueuse n'impliquerait, selon Slater et collaborateurs (1999), aucun changement significatif du $\delta^{13}\text{C}$. En effet, on observe (fig.4), après volatilisation (durée 24 heures), un léger enrichissement en ^{13}C , compatible avec une augmentation du $\delta^{13}\text{C}$ qui oscille entre 0,3 et 0,8 ‰. Ces valeurs sont peu significatives car elles correspondent également à l'incertitude analytique des mesures qui est de $\pm 0,5$ ‰. Ces premières conclusions sont confirmées par Poulson et Drever (1999) qui soulignent néanmoins que ce rapport isotopique augmente avec l'élévation de la température (de 5 à 35 °c). Ce sont pour les températures les plus élevées, que l'on retrouve les $\delta^{13}\text{C}$ les plus forts.

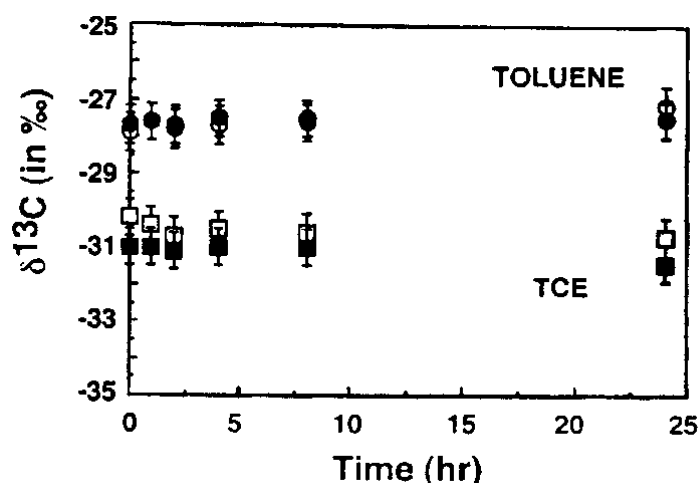


Figure 7 : Variations du $\delta^{13}\text{C}$ du TCE et du toluène sous les formes de vapeur (symboles clairs) et de produits bruts (symboles noirs). L'incertitude expérimentale est de 0,5 ‰. D'après (Slater et al., 1999).

3.3.5 Conclusions

Les isotopes stables du carbone s'avèrent être un outil très efficace dans la caractérisation de la dégradation des COHV. Des applications sur site ont été réalisées, prouvant l'efficacité de cette technique à mettre en évidence ce processus d'atténuation naturelle.

Cet outil peut être couplé avec d'autres paramètres chimiques, comme la concentration en méthane ou la teneur en oxygène dissous du milieu pour bien caractériser le phénomène de biodégradation (Witt et al., 2001).

L'utilisation des isotopes stables du chlore semble être un outil complémentaire efficace pour l'étude de la dégradation des solvants chlorés (Schmidt et al., 2004). Quelques études attestent de l'efficacité de cette méthode (Heraty et al., 1999 ; Poulson and Drever, 1999). Elles mettent en évidence un important fractionnement isotopique des isotopes stables du chlore. Le couplage de l'analyse du fractionnement isotopique du chlore et du carbone pourrait être un nouvel axe de recherche pour l'avenir.

Le fractionnement isotopique est également observé lors du co-métabolisme de molécules organiques. Le fractionnement obtenu est du même ordre de grandeur que d'autres voies de dégradation (déchloration réductrice) (Brungard et al., 2003). Ainsi, l'utilisation des isotopes permettrait de prouver l'existence d'une dégradation des composés mais ne permettrait pas d'identifier la voie de dégradation du composé.

REFERENCES

- Beneteau, K.M., R. Aravena, and S. Frapce. 1999. Isotopic characterization of chlorinated solvents - laboratory and field results. *Organic Geochemistry* 30:739-753.
- Bloom, Y., R. Aravena, D. Hunkeler, E. Edwards, and S. Frapce. 2000. Carbon isotope fractionation during microbial dechlorination of TCE, cis-1,2-DCE and vinyl chloride : implications for assessment of natural attenuation. *Environmental Science and Technology* 34:2768-2772.
- Brungard, K.L., J. Munakata-Marr, C.A. Johnson, and K.W. Mandernack. 2003. Stable carbon isotope fractionation of trans-1,2-dichloroethylene during co-metabolic degradation by methanotrophic bacteria. *Chemical Geology* 195:59-67.
- Ferguson, J.F., and J.M.H. Pietari. 2000. Anaerobic transformations and bioremediation of chlorinated solvents. *Environmental Pollution* 107:209-215.
- Furukawa, K. 2003. Super bugs for bioremediation. *Trends in biotechnology* 21:187-189.
- Heraty, L., M. Fuller, L. Huang, T. Abrajano, and N. Sturchio. 1999. Isotopic fractionation of carbon and chlorine by microbial degradation of dichloromethane. *Organic Geochemistry* 30:793-799.
- Hunkeler, D., R. Aravena, and B. Butler. 1999. Monitoring microbial dechlorination of PCE in groundwater using compound-specific stable carbon isotope ratios : microcosm and field studies. *Environmental Science and Technology* 33:2733-2738.
- Hunkeler, D., R. Aravena, and E. Cox. 2002. Carbon isotopes as a tool to evaluate the origin and fate of vinyl chloride: laboratory experiments and modelling of isotope evolution. *Environ. Sci. Technol.* 36:3378-3384.
- Meza, L., T.J. Cutright, B. El-Zahab, and P. Wang. 2003. Aerobic biodegradation of trichloroethylene using a consortium of five bacterial strains. *Biotechnology Letters* 25:1925-1932.
- Middeldorp, P.J.M., B.A. Luijten, M.H. Van Eekert, S.W.M. Kengen, G.W.M. Schraa, and A.J.M. Stams. 1999. Anaerobic microbial reductive dehalogenation of chlorinated ethenes. *Bioremediation Journal* 3:151-169.
- Mulligan, C.N., and R.N. Yong. 2004. Natural attenuation of contaminated soils. *Environment International* 30:587-601.
- Numata, M., N. Nakamura, H. Koshikawa, and Y. Terashima. 2002. Chlorine isotope fractionation during dechlorination of chlorinated ethenes by anaerobic bacteria. *Environmental Science and Technology* 36:4389-4394.
- Poulson, S., and J. Drever. 1999. Stable isotope (C, Cl, and H) fractionation during vaporization of TCE. *Environmental Science and Technology* 33:3689-3694.
- Schmidt, T.C., L. Zwank, M. Elsner, M. Berg, R. Meckenstock, and S.B. Haderlein. 2004. Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges. *Anal. Bioanal. Chem.* 378.
- Schüth, C., H. Taubald, N. Bolano, and K. Maciejczyk. 2003. Carbon and hydrogen isotope effects during sorption of organic contaminants on carbonaceous materials. *Journal of Contaminant Hydrology* 64:269-281.

- Sherwood Lollar, B., G. Slater, B. Sleep, M. Witt, G. Klecka, H. M., and J. Spivack. 2001. Stable carbon isotope evidence for intrinsic bioremediation of tetrachloroethene and trichloroethylene at area 6, Dover Air Force Base. *Environ. Sci. Technol.* 35:261-269.
- Shouakar-Stash, O., S. Frapce, and D. R.J. 2003. Stable hydrogen, carbon and chlorine isotope measurements of selected chlorinated organic solvents. *Journal of Contaminant Hydrology* 60:211-228.
- Slater, G., H. Dempster, B.S. Lollar, and J. Ahad. 1999. Headspace analysis : a new application for isotopic characterization of dissolved organic contaminants. *Environmental Science and Technology* 33:190-194.
- Slater, G., B.S. Lollar, B. Sleep, and E. Edwards. 2001. Variability in carbon isotopic fractionation during biodegradation of chlorinated ethes : implications for field applications. *Environmental Science and Technology* 35:901-907.
- Slater, G., J. Ahad, B.S. Lollar, R. Allen-King, and B. Sleep. 2000. Carbon isotope effects resulting from equilibrium sorption of dissolved VOCs. *Analytical Chemistry* 72:5669-5672.
- Smidt, H., A.D.L. Akkermans, J. van der Oost, and W.M. de Vos. 2000. Halorespiring bacteria-molecular characterization and detection. *Enzyme and Microbial Technology* 27:812-820.
- Sturchio, N.C., J.L. Clausen, L.J. Heraty, L. Huang, B.D. Holt, and T.A. Abrajano. 1998. Chlorine isotope investigation of natural attenuation of trichloroethylene in an aerobic aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 32:3037-3042.
- US-EPA. 1998. Technical protocol for evaluating natural attenuation of chlorinated solvents in ground water. EPA/600/R-98/128.
- Vieth, A., J. Müller, G. Strauch, M. Kästner, M. Gehre, R. Meckenstock, and H. Richnow. 2003. In-situ biodegradation of tetrachloroethene and trichloroethylene in contaminated aquifers monitored by stable isotope fractionation. *Isotopes Environ. Health Stud.* 39:113-124.
- Wiedemeier, T.H., H.S. Rifai, C.J. Newell, and J.T. Wilson. 1999. Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface John Wiley and Sons, Inc.
- Witt, M., G. Klecka, E. Lutz, T. Ei, N. Grosso, and F. Chapelle. 2001. Natural attenuation of chlorinated solvents at area 6, Dover Air Force Base : groundwater biogeochemistry. *Journal of Contaminant Hydrology* 57:61-80.

Travail	Nom	Qualité	Date	Visa
Rédacteur				
Responsable d'affaire				
Relecteur				
Vérificateur				
Approbateur				

☞ Fin du Complément non destiné au client ☞