

Evaluation du potentiel de déchloration réductive des éthènes chlorés dans les aquifères contaminés - Un manuel d'assistance technique pour l'évaluation de l'atténuation naturelle des sites contaminés

- SYNTHÈSE -

Sur mandat de l'OFEV

Le présent document est une synthèse du manuel «*Screening of the bacterial reductive dechlorination potential of chlorinated ethenes in contaminated aquifers - A technical assistance manual for assessment of natural attenuation of chloroethenes-contaminated sites*», Tarnawski, S-E., Rossi, P., Holliger, C., EPFL/OFEV-version-01-03-2016, 86pp.

Adresse de téléchargement du manuel: <http://infoscience.epfl.ch/record/213613?ln=en>

Titre court : *Synthèse du manuel d'évaluation du potentiel de déchloration réductive dans les aquifères*

L'objectif de ce document est de résumer de manière simple et pratique, la démarche de screening pour l'évaluation du potentiel de déchloration réductive des éthènes chlorés dans des aquifères contaminés et sa méthodologie en trois étapes. Le terme « screening » désigne ici la stratégie de dépistage des caractéristiques physicochimiques et biologiques spécifiques de la déchloration réductive dans un aquifère contaminé.

La démarche est replacée dans le contexte de l'investigation de détail de la procédure suisse pour l'étude des sites contaminés. La synthèse éclaircit les contributions de la procédure de screening dans l'évaluation des variantes d'assainissement *in situ* via la déchloration réductive et apporte des informations complémentaires sur les aspects pratiques nécessaires à l'application de la démarche.

Mentions légales

Mandant

Office fédéral de l'environnement (OFEV), division Sols et biotechnologie, CH-3003 Berne
L'OFEV est un office du Département fédéral de l'environnement, des transports, de l'énergie et de la communication (DETEC).

Mandataire

Sonia-Estelle Tarnawski, D.Sc., microbiologie de l'environnement

Auteur

Sonia-E. Tarnawski

Accompagnement OFEV

Christiane Wermeille

Le présent rapport a été réalisé sur mandat de l'OFEV. Seul le mandataire porte la responsabilité de son contenu.

Sommaire

Introduction	5
1. Bases de la procédure de screening et conditions de la déchloration réductive	6
1.1. Identification des processus accepteurs terminaux d'électrons prédominants et caractérisation rédox	6
1.2. Spécificités des bactéries impliquées dans le processus de déchloration réductive	8
1.3. Quelles sont les conditions optimales naturelles pour la déchloration réductive ?	9
2. La procédure de screening en 3 étapes	9
2.1. Etapes de la procédure	10
2.2. Logique de la démarche	11
2.3. Avantages et limites pour l'évaluation de variantes d'assainissement biologique	13
- En quoi la démarche est une aide pour le choix d'une remédiation par atténuation naturelle <i>via</i> la déchloration réductive ?	13
- A quoi la démarche ne répond pas ?	14
3. Considération technique préalable à la procédure de screening et équipement des sites	14
Récapitulatif des prérequis	15
Note importante pour l'échantillonnage	15
4. Résumé des objectifs techniques de la procédure et données collectées	16
Etape 1	16
Etape 2	17
Etape 3	18
Conclusion	18
Références	18
Annexe 1	21
Retours d'expérience (ADEME)	21
Annexe 2	26
Evaluation qualitative d'un site contaminé pour l'application d'une ENA (Parsons)	26

Liste des illustrations

Tableau 1 – Principaux paramètres indicateurs des conditions d'aquifères et appréciations qualitatives des valeurs seuils favorables au processus de déchloration réductive

Figure 1 – Principaux processus de biodégradation anaérobie et aérobie des chloroéthènes

Figure 2 – Succession écologique des processus accepteurs terminaux d'électrons (TEAPs)

Figure 3 – Répartition rédox en zone saturée dans un panache conceptuel de contamination aux éthènes chlorés

Figure 4 – Schéma général des réactions séquentielles de la déchloration réductive, gènes et genres bactériens impliqués dans les différentes étapes

Figure 5 – Intégration écologique de la procédure de screening

Figure 6 - Démarche de screening systématique en trois étapes pour l'évaluation du potentiel de déchloration réductive dans un aquifère contaminé par des éthènes chlorés

Figure 7 - Illustration détaillée de la procédure de screening en trois étapes pour l'évaluation du potentiel *in situ* de déchloration réductive d'un site contaminé par des éthènes chlorés

Figure 8 - Réseau piézométrique de surveillance dans un panache idéal de dispersion de la pollution

Figure 9 - Déroulement général du traitement d'un site contaminé selon l'ordonnance sur les sites contaminés (OSites RS 814.680)

Figure 10 – Synthèse des objectifs techniques de la procédure de screening pour l'évaluation du processus de déchloration réductive dans des aquifères contaminés par des éthènes chlorés

Introduction

Dans les sites pollués, une diminution de la concentration des contaminants sources peut être observée sans qu'aucune action d'assainissement n'ait encore été menée. Il s'agit d'une **atténuation naturelle** qui est possible grâce à des **processus physiques, chimiques et biologiques naturellement à l'œuvre** et permettant de réduire les émissions de polluants. L'exploitation de ce potentiel d'atténuation naturelle est à l'origine de différents modes de gestion de sites contaminés. Par exemple, l'application d'une **atténuation naturelle contrôlée** (monitored natural attenuation, MNA) repose sur la **surveillance** des processus physiques, chimiques et biologiques se déroulant déjà dans la nature, et une **atténuation naturelle dynamisée** (enhanced natural attenuation, ENA) consiste à appliquer les mesures susceptibles d'**accroître** l'efficacité de ces processus (1). L'usage de ces modes de gestion exige de bien **connaître les processus d'atténuation naturelle** à l'œuvre en réalisant les investigations appropriées afin d'évaluer le succès possible de l'assainissement.

La **part biologique** de l'atténuation naturelle repose sur la présence *in situ* de micro-organismes (en particulier des bactéries) qui transforment le plus souvent par des **processus métaboliques** les composés polluants afin d'en retirer de l'énergie. Dans le cadre d'une pollution aux **éthènes chlorés (ECs)**, les contaminants concernés sont les per-, tri-, et di-chloroéthènes (respectivement **PCE**, **TCE** et **DCE**) et le chlorure de vinyle (**CV**). La valeur de concentration selon l'annexe 1 de l'OSites (OSites 814.680, Ordonnance fédérale du 26 août 1998 sur l'assainissement des sites pollués) qui permet de déterminer le besoin de surveillance et d'assainissement par rapport aux eaux souterraines est de 0.04 mg/L pour le PCE, 0.07 mg/L pour le TCE, 0.05 mg/L pour la somme du cis- et trans-1,2-DCE, 0.03 mg/L pour le 1,1-DCE et 0.0005 mg/L pour le CV. L'exigence de qualité pour les eaux du sous-sol utilisées comme eau potable ou destinées à l'être (OEaux 814.201, Ordonnance fédérale du 28 octobre 1998 sur la protection des eaux) est une concentration ne dépassant pas 0.001 mg/L pour chaque substance. Ces faibles concentrations relèvent de la toxicité des ECs qui est d'autant plus grande que la molécule d'éthène est faiblement chlorée.

Plusieurs processus bactériens, réalisés par différents types de bactéries, peuvent participer à la dégradation des ECs selon que les conditions du milieu sont anaérobies (sans oxygène) ou aérobies (avec oxygène). Dans la plupart des cas, il s'agit de réactions d'oxydo-réduction impliquant des donneurs d'électrons et des accepteurs d'électrons. En fonction du composé éthène chloré (PCE, TCE, DCE ou VC), de la population bactérienne et des conditions environnementales, le mécanisme actif peut être l'**oxydation** ou la **déchloration réductive**, le métabolisme bactérien pouvant être direct (métabolique) ou cométabolique. Ces voies principales de biodégradation sont résumées dans la Figure 1.

En condition anaérobie, la déchloration réductive est démontrée comme étant le processus majeur d'atténuation naturelle des CEs (2,3,4). Ce processus est intéressant à exploiter dans la gestion de sites pollués lorsqu'il se réalise de manière complète jusqu'à l'éthène, produit final « inoffensif ». Pourtant la déchloration réductive du PCE peut naturellement se réaliser de façon partielle et aboutit à une accumulation dans le site de cDCE et CV, intermédiaires toxiques de la dégradation. Ceci est le cas dans les aquifères où la réduction anaérobie du PCE est inévitable du fait de la présence d'une zone saturée et les raisons du blocage réel ou apparent de la déchloration au cDCE et CV sont diverses. Afin d'opter pour la variante d'assainissement adéquate, il sera alors essentiel d'éclaircir les raisons d'une déchloration réductive incomplète.

Dans ce contexte, le manuel «*Screening of the bacterial reductive dechlorination potential of chlorinated ethenes in contaminated aquifers - A technical assistance manual for assessment of natural attenuation of chloroethenes-contaminated sites*» s'adresse à toute personne impliquée dans la **recherche de solutions d'assainissement** qui souhaite évaluer le potentiel de dégradation biologique **via la déchloration réductive** présente dans un site en investigation. Il s'agit d'une démarche d'analyse composée d'une **methodologie en trois étapes** qui apporte des éléments de **réponse** nécessaires lors de **l'évaluation des variantes d'assainissement in situ**, ainsi qu'un **outil d'aide à la surveillance** dans la mise en œuvre d'une **MNA** ou d'une **ENA** (5).

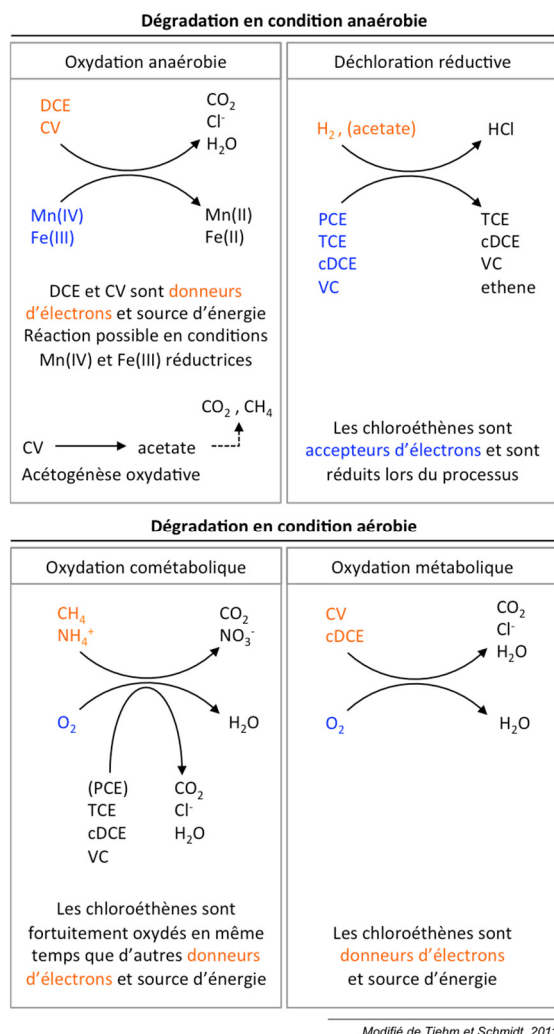


Figure 1 – Principaux processus de biodégradation anaérobie (sans oxygène) et aérobie (avec oxygène) des chloroéthènes. Les donneurs d'électrons et sources d'énergie sont indiqués en orange et sont oxydés au cours des réactions. Les accepteurs d'électrons sont indiqués en bleu et sont réduits au cours des réactions. PCE: perchloroéthène, TCE: trichloroéthène, cDCE: cis-1,2-dichloroéthène, CV: chlorure de vinyle, Cl⁻: chlorure, NO₃⁻: nitrate, NH₄⁺: ammonium, CH₄: méthane.

1. Bases de la procédure de screening et conditions de la déchloration réductive

Le processus de déchloration réductive se réalise dans la **zone saturée anaérobie** de l'aquifère et nécessite la **présence de bactéries spécialisées** ainsi que des **conditions de milieu spécifiques** (6). Ces conditions de milieu sont définies par la géologie, la pédologie et l'hydrogéologie de l'aquifère ainsi que par des micro-organismes dont les activités métaboliques participent naturellement à la mise en place des conditions favorables à la déchloration réductive. L'ensemble de ces micro-organismes forme **les communautés microbiennes** qui **soutiennent le fonctionnement biogéochimique du système d'eau souterraine** (SES). Il est donc indispensable de considérer un aquifère comme un système écologique hétérogène, cohérent et dynamique, présentant des interactions complexes entre ses composantes physique, chimique et biologique (7,8,9).

1.1. Identification des processus accepteurs terminaux d'électrons prédominants et caractérisation rédox

Une approche fiable dans l'investigation du potentiel de biodégradation des ECs consiste à l'identification des processus biogéochimiques présents dans les eaux souterraines, souvent référencés sous le terme de processus accepteurs terminaux d'électrons (Terminal Electron-Accepting Processes, TEAPs) (10). Les TEAPs sont directement liées aux processus d'oxydo-

La **déchloration réductive** est le processus de dégradation majeur des ECs en condition anaérobie. Cette voie permet la déchloration séquentielle du PCE au TCE, puis du TCE au cDCE, puis du cDCE au CV et finalement du CV à l'éthène, molécule gazeuse inoffensive. De ce fait, en exploitant la déchloration réductive complète jusqu'à l'éthène, il est possible d'assainir un site. Ce processus est catalysé par différentes bactéries et la déchloration des ECs faiblement substitués (cDCE et CV), se fait plus difficilement que celle du PCE et TCE. L'inconvénient de ce processus est qu'il produit des molécules intermédiaires plus toxiques qui peuvent s'accumuler dans le site.

Les **oxydations anaérobies** sont d'autres processus connus pour la dégradation des ECs en absence d'oxygène. Il s'agit principalement de l'oxydation anaérobie directe dans des conditions permettant la réduction du fer (III), du manganèse (IV). Ces mécanismes considérés comme mineurs concernent uniquement le CV et peut-être le cDCE.

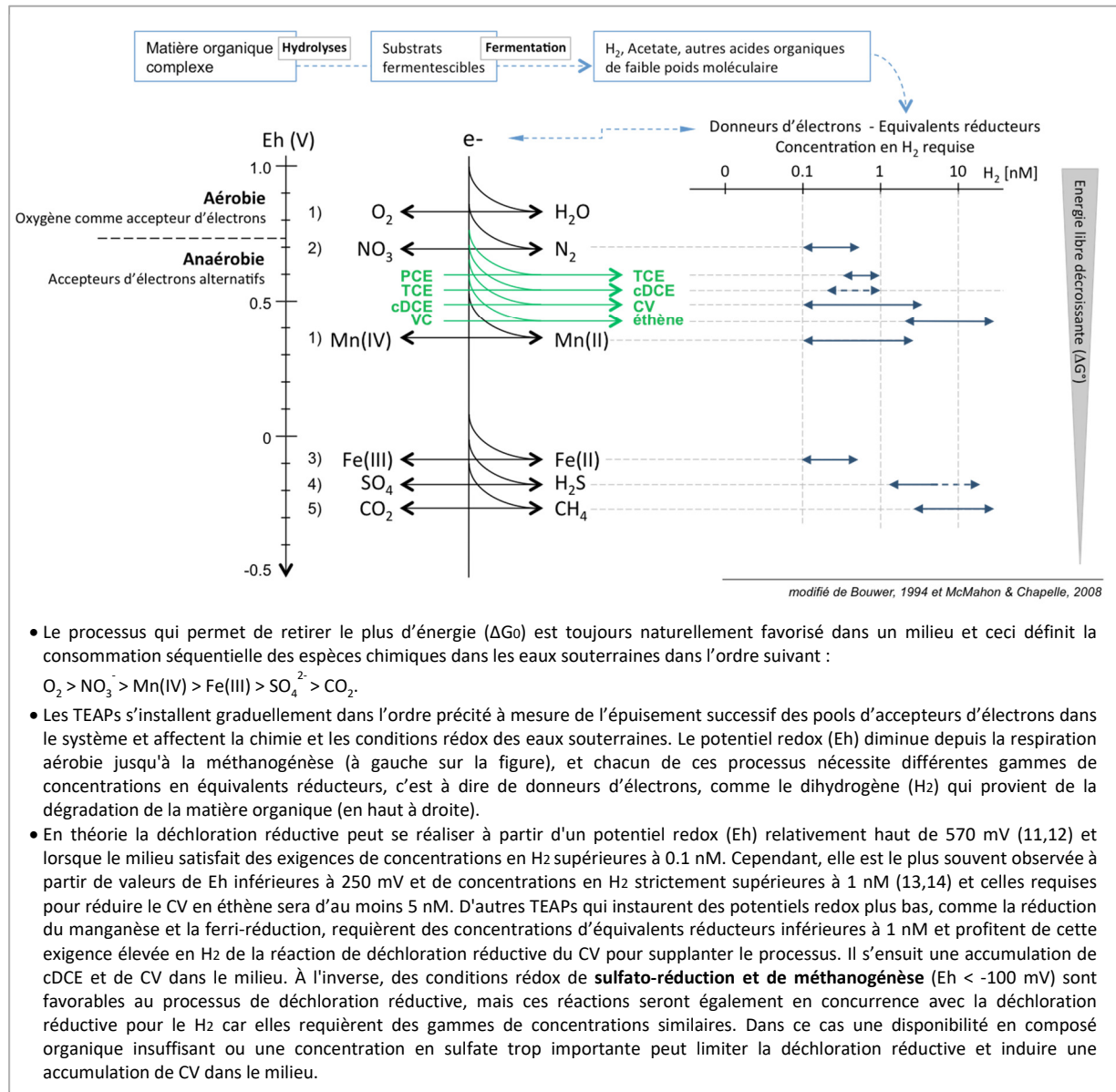
L'**oxydation métabolique** est le principal processus observé en condition aérobie. Cette voie est efficace pour la dégradation du CV et a aussi été observée pour le cDCE, mais pas pour les ECs très substitués tels que le PCE et le TCE. Le CV et le cDCE sont directement oxydés pour produire de l'énergie. Ce processus peut être naturellement important dans les zones aérobies de l'aquifère. Cette réaction est intéressante à exploiter lors d'assainissement pour éliminer une pollution persistante au cDCE ou CV car elle suppose la minéralisation complète du CV ou du cDCE sans altération de la qualité des eaux par la production d'intermédiaires toxiques.

Le processus de dégradation par **oxydation cométabolique** fait intervenir des enzymes du métabolisme bactérien qui sont non-spécifiques à la déchloration, mais qui peuvent réduire de manière fortuite des molécules chlorées. Ce processus de dégradation indirecte a été observé pour le CV et cDCE et nécessite la co-occurrence au niveau de l'enzyme de l'oxygène, des donneurs d'électrons et des ECs. Ceci correspond à un événement rare et ce mécanisme est certainement à considérer comme mineur dans l'atténuation naturelle.

réduction des respirations bactériennes : les bactéries transfèrent des électrons tirés de composés organiques à des composés inorganiques accepteurs terminaux d'électrons. En condition de milieu aérobie, l'oxygène O_2 est l'accepteur d'électrons terminal et le TEAP lié est la **respiration aérobie**. En absence d'oxygène, d'autres composés inorganiques oxydés comme le nitrate NO_3^- , le manganèse $Mn(IV)$, le fer $Fe(III)$, le sulfate SO_4^{2-} , et le CO_2 , sont utilisés comme accepteurs terminaux d'électrons et les TEAPs liés sont respectivement la **dénitrification** (y compris la réduction des nitrates), la **réduction du manganèse**, la **ferri-réduction**, la **sulfato-réduction** et la **méthanogénèse**. Pour illustrer cela, l'encadré Figure 2 présente une vue de la succession écologique des TEAPs dans un aquifère et ses interactions avec le processus de déchloration réductive.

Dans ce contexte, le potentiel d'atténuation naturelle des ECs par déchloration réductive dépend des conditions rédox de l'aquifère établies par les populations bactériennes présentes naturellement et impliquées dans les TEAPs, ainsi que de la disponibilité en équivalents réducteurs et accepteurs d'électrons le long du panache de contamination (Figure 3).

Figure 2 – Succession écologique des processus accepteurs terminaux d'électrons (TEAPs) : 1) Respiration aérobie, 2)



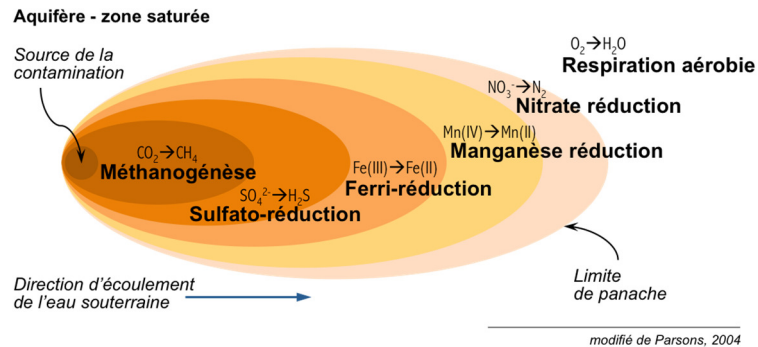
- Le processus qui permet de retirer le plus d'énergie (ΔG_0) est toujours naturellement favorisé dans un milieu et ceci définit la consommation séquentielle des espèces chimiques dans les eaux souterraines dans l'ordre suivant : $O_2 > NO_3^- > Mn(IV) > Fe(III) > SO_4^{2-} > CO_2$.
- Les TEAPs s'installent graduellement dans l'ordre précité à mesure de l'épuisement successif des pools d'accepteurs d'électrons dans le système et affectent la chimie et les conditions rédox des eaux souterraines. Le potentiel redox (Eh) diminue depuis la respiration aérobie jusqu'à la méthanogénèse (à gauche sur la figure), et chacun de ces processus nécessite différentes gammes de concentrations en équivalents réducteurs, c'est à dire de donneurs d'électrons, comme le dihydrogène (H_2) qui provient de la dégradation de la matière organique (en haut à droite).
- En théorie la déchloration réductive peut se réaliser à partir d'un potentiel redox (Eh) relativement haut de 570 mV (11,12) et lorsque le milieu satisfait des exigences de concentrations en H_2 supérieures à 0.1 nM. Cependant, elle est le plus souvent observée à partir de valeurs de Eh inférieures à 250 mV et de concentrations en H_2 strictement supérieures à 1 nM (13,14) et celles requises pour réduire le CV en éthène sera d'au moins 5 nM. D'autres TEAPs qui instaurent des potentiels redox plus bas, comme la réduction du manganèse et la ferri-réduction, requièrent des concentrations d'équivalents réducteurs inférieures à 1 nM et profitent de cette exigence élevée en H_2 de la réaction de déchloration réductive du CV pour supplanter le processus. Il s'ensuit une accumulation de cDCE et de CV dans le milieu. À l'inverse, des conditions rédox de **sulfato-réduction et de méthanogénèse** (Eh < -100 mV) sont favorables au processus de déchloration réductive, mais ces réactions seront également en concurrence avec la déchloration réductive pour le H_2 car elles requièrent des gammes de concentrations similaires. Dans ce cas une disponibilité en composé organique insuffisant ou une concentration en sulfate trop importante peut limiter la déchloration réductive et induire une accumulation de CV dans le milieu.

Dénitrification (Nitrate réduction), 3) Manganèse réduction, 4) Ferri-réduction, 5) Sulfato- réduction, et 6) Méthanogénèse. Le potentiel d'oxydo-réduction (Eh en Volts) de chaque processus se trouve sur l'échelle à la gauche de la figure. Les gammes de concentration en dihydrogène (H_2) requises par chacun des TEAPs sont présentées sur la droite. Le processus séquentiel de déchloration réductive est en vert. La voie de dégradation de la matière organique qui fournit le système en donneurs d'électrons est schématisée en bleu en haut de la figure.

Par conséquent, déterminer les TEAPs prédominants dans un aquifère, documenter leur répartition spatiale dans le panache de contamination et comprendre comment ils affectent le processus de

déchloration réductive sont des éléments essentiels pour prédire les possibilités d'atténuation naturelle des ECs d'un aquifère contaminé. L'évaluation de la disponibilité en donneurs d'électrons est aussi importante, car une quantité insuffisante entraîne des compétitions et un « gaspillage » d'équivalents réducteurs au détriment de la déchloration réductive.

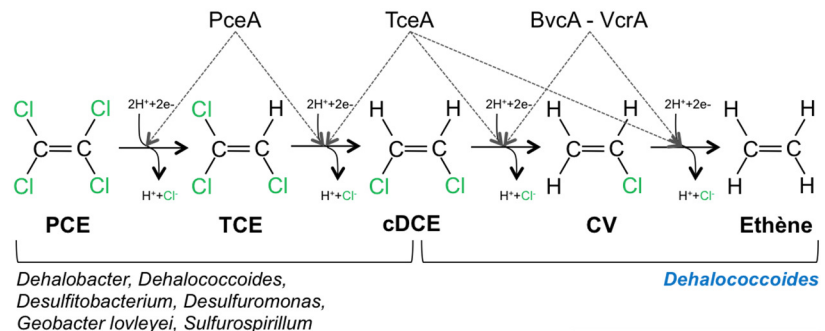
Figure 3 – Répartition rédox en zone saturée dans un panache conceptuel de contamination aux éthènes chlorés. Du fait de la dilution des contaminants dans le sens d'écoulement de l'eau souterraine et des activités microbiennes liées au processus accepteurs terminaux d'électrons (TEAPs), il s'établit un gradient de zones rédox le long du panache.



1.2. Spécificités des bactéries impliquées dans le processus de déchloration réductive

Les micro-organismes impliqués dans le processus de déchloration réductive sont des bactéries déhalorespirantes (organohalid respiring bacteria, OHRB). Elles réduisent les ECs pour en tirer de l'énergie et assurer leur croissance. Les OHRB font partie d'une communauté microbienne anaérobie où des micro-organismes fermenteurs, acétogènes et autres, contribuent à leur fournir : des donneurs d'électrons (ex. le H₂), du carbone organique (ex. l'acétate) et éventuellement d'autres éléments nutritifs (ex. cofacteurs contenant du cobalt). L'activité de déchloration réductive est associée à la présence d'enzymes déhalogénases réductrices constituées d'une sous-unité catalytique (RdhA) et d'une sous-unité d'ancrage à la membrane bactérienne (RdhB). Différents types de RdhA, au fonctionnement similaire, catalysent le transfert d'électrons aux composés organo-halogénés dans le processus séquentiel de déchloration réductive. (Figure 4).

Figure 4 – Schéma général des réactions séquentielles de la déchloration réductive, gènes et genres bactériens impliqués dans les différentes étapes. L'efficacité de la déchloration réductive diminue d'autant que la molécule d'éthène chloré est faiblement substituée. PCE: perchloroéthène, TCE: trichloroéthène, cDCE: cis-1,2-dichloroéthène, CV: chlorure de vinyle



La diversité des bactéries déchlorant le PCE jusqu'au cDCE est plus grande que celles qui réduisent le cDCE jusqu'à l'éthène : les OHRB qui catalysent les deux premières étapes du processus sont affiliées aux genres *Dehalobacter*, *Desulfitobacterium*, *Desulfuromonas*, *Geobacter* et *Sulfurospirillum* alors que seulement des bactéries du genre *Dehalococcoides* sont connues actuellement pour effectuer une déchloration réductive complète du PCE jusqu'à l'éthène (Figure 4).

Les OHRB sont décrites comme des **bactéries anaérobies strictes**, très sensibles à l'oxygène. Celles qui catalysent les réactions de déchloration réductive du **PCE jusqu'au cDCE** sont **déhalorespirantes facultatives** : elles présentent un métabolisme respiratoire versatile et peuvent utiliser des accepteurs d'électrons autres que les composés organo-halogénés. A l'inverse les bactéries affiliées à *Dehalococcoides* sont **déhalorespirantes obligatoires** : leur métabolisme restrictif nécessite obligatoirement des composés organo-halogénés comme accepteurs d'électrons et le plus souvent du H₂ comme donneur d'électrons.

La diversité des déhalorespirantes facultatives et les exigences métaboliques strictes de *Dehalococcoides* entraînent une cinétique de dégradation qui est plus rapide du PCE au cDCE que du

cDCE à l'éthène. Cela peut se manifester par une accumulation transitoire importante de cDCE dans le panache de contamination.

En d'autres termes, il faut comprendre que **la mise en place d'un processus de déchloration réductive complet dans un aquifère contaminé n'est pas un phénomène instantané**. Le facteur temps est nécessaire pour développer les conditions environnementales anaérobies appropriées et les populations bactériennes capables de dégrader complètement le PCE. Cette notion est importante à considérer lors de l'application d'une MNA ou d'une ENA car elle participe à déterminer le coût et le temps nécessaires à l'assainissement d'un site.

1.3. Quelles sont les conditions optimales naturelles pour la déchloration réductive ?

La démarche d'analyse par screening assume que la réalisation *in situ* de la déchloration réductive complète du PCE à l'éthène dépend principalement des conditions suivantes :

- L'absence d'oxygène (zone saturée anaérobie)
- La présence dans le panache de conditions fortement réductrices (rédox sulfato-réduction)
- Des concentrations faibles en accepteurs d'électrons (nitrate, manganèse (IV), fer (III), sulfate et CO₂) afin de limiter la concurrence entre la déchloration réductive et les TEAPs pour les équivalents réducteurs
- Une quantité de matière organique oxydable suffisante (donneurs d'électrons, source de carbone et de nutriments)
- La présence de *Dehalococcoides*.

Les paramètres classiquement mesurés dans des échantillons d'eaux pour l'investigation d'aquifères contaminés et leurs valeurs seuils (3,13,15) en faveur de la déchloration réductive sont également répertoriés dans le Tableau 1. Le dépassement des valeurs seuils n'indique pas nécessairement qu'un processus complet de déchloration réductive est impossible, mais cela pourrait signifier qu'il s'établira difficilement dans le temps. L'interprétation est plus critique si le pool d'éléments conduisant les réactions réductrices concurrentes de la déchloration réductive est constamment alimenté dans le site. Ces valeurs seuils ne constituent en rien une méthode de diagnostic, mais permettent une première évaluation qualitative de l'aquifère et indiquent les paramètres qui pourraient être limitants à l'application d'un assainissement par MNA (cf. Annexe 1). Des aspects décisionnels complémentaires concernant l'évaluation d'un site pour une variante d'assainissement par ENA sont présentés en Annexe 2.

2. La procédure de screening en 3 étapes

En appréhendant les aquifères comme des ensembles écologiques qui présentent des interactions complexes entre les composantes physiques, chimiques et biologiques du système d'eau souterraine, la procédure de screening s'appuie sur la mesure de paramètres en rapport avec (Figure 5):

- la distribution des ECs dans le panache de pollution et leur niveau de dégradation
- la géochimie et l'hydrogéologie des eaux souterraines
- la microbiologie

Figure 5 – Intégration écologique de la procédure de screening : instantané d'une situation dynamique où microbiologie (orange) et milieu (bleu) sont interdépendants et en interactions constantes

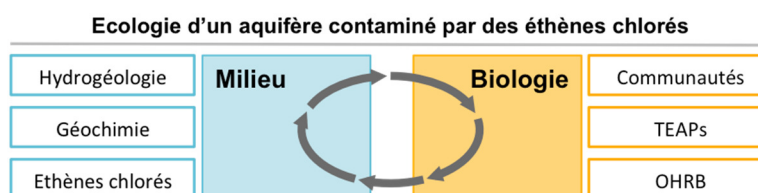


Tableau 1 – Principaux paramètres indicateurs des conditions d'aquifères et appréciations qualitatives des valeurs seuils favorables au processus de déchloration réductive (modifié et compilé de EPA 1998, ADEME 2007, NIDEP-SRP 2012)

Paramètres	Valeur seuil dans l'eau	Informations Interprétations
Potentiel d'Oxydo-	< -100 mV	Confirme le potentiel rédox du milieu

réduction, POR (électrode Ag/AgCl)		Le POR est influencé par la nature du TEAP prédominant au point de mesure. Dès 50 mV la déchloration réductive est possible, à POR < -100 mV elle est favorisée et très probable
pH	5 < pH < 9	Plage optimale de pH pour la déchloration réductive Compléter avec la mesure d'alcalinité, valeur seuil = 2X > à la valeur basale du site
Oxygène dissous dO ₂ ou OD	< 0.5 mg/mL	Conditions anaérobies Si OD > à 0.5 mg/L et FeII < à 2 mg/L (ou POR positif), alors les voies de la dégradation sont strictement aérobies
Nitrate NO ₃ ⁻	< 1 mg/L	Réduction des nitrates A concentration > à 1 mg/L et POR > à 50 mV, la réduction des nitrates limite le processus de déchloration réductive La concentration a tendance à diminuer avec la dégradation
Manganèse (II) Mn (II)	> 1 mg/L ?	Réduction du manganèse Mn(IV) La déchloration réductive est possible, à analyser avec la COD La concentration a tendance à augmenter avec la biodégradation Le DCE et le CV peuvent aussi être oxydés en condition réductrice du Mn(IV)
Fer ferreux Fe (II)	> 2 mg/L	Réduction du fer ferrique Fe(III) La déchloration réductive est possible, à analyser avec la COD La concentration a tendance à augmenter avec la biodégradation Le DCE et le CV peuvent aussi être oxydés en condition réductrice du Fer(III)
Sulfate SO ₄ ²⁻	< 20 mg/L	Sulfato-réduction , le fer (II) doit être > à 2 mg/L et le POR < à -100mV Favorable à la déchloration réductive jusqu'à l'éthène La concentration a tendance à décroître durant la biodégradation A concentration > à 20 mg/L et COD faible, la sulfato-réduction concurrence fortement la déchloration réductive du cDCE à l'éthène.
Sulfide H ₂ S (S ²⁻)	> 1mg/L	Sulfato-réduction (produit de la réduction du sulfate) Favorable à la déchloration réductive jusqu'à l'éthène
Méthane CH ₄	> 0.5 - 1 mg/L	Méthanogénèse (produit de la réduction du CO ₂) Sa concentration a tendance à augmenter avec la biodégradation. Favorable à la déchloration mais peut la concurrencer et induire une accumulation de CV, à analyser avec la COD
Ethène	20 à 200 µg/L	Produit final "inoffensif" de la déchloration réductive Indicateur d'un processus de déchloration réductive complet déjà présent Ce paramètre peut-être complété des taux de déchloration mesurés qui contribuent à qualifier l'efficacité/ la performance de la déchloration réductive
Carbone Organique Dissous "Non Purgeable" COD-NPOC	> 10 - 20 mg/L	Source de donneurs d'électrons et de carbone Conduit la déchloration réductive Considérer en plus le Carbone "Purgeable" d'origine anthropogénique autres que les ECs (BTEX, alkyl-benzène, naphtalène...) si sa valeur est > à 2 mg/L

2.1. Etapes de la procédure

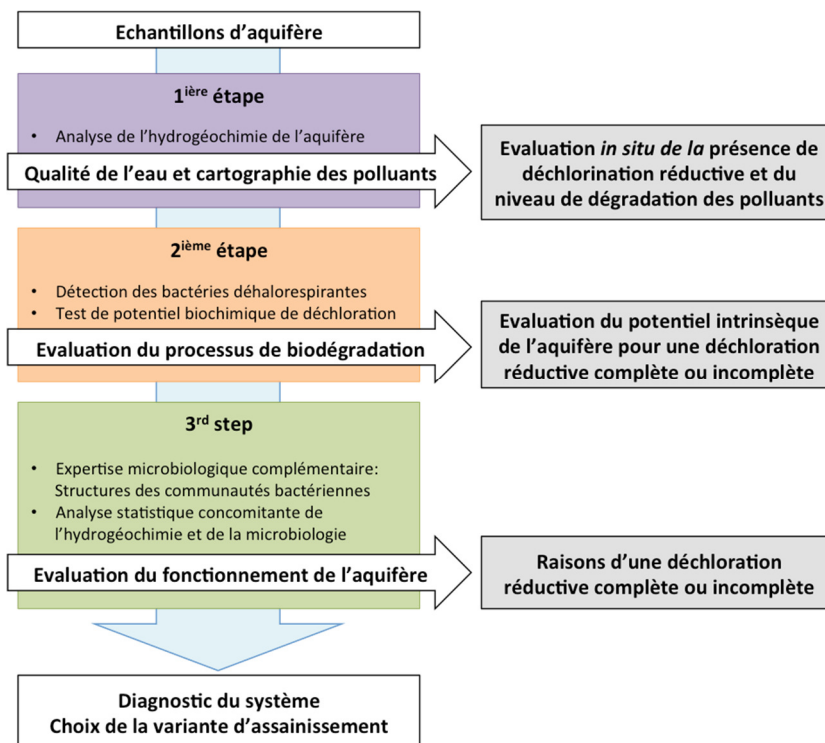
La démarche présentée consiste en trois étapes successives d'investigation (Figure 6):

- La 1^{ière} étape est consacrée à l'acquisition des données physicochimiques clés de l'aquifère, afin d'évaluer la présence *in situ* du processus de déchloration réductive ainsi que le niveau de dégradation des contaminants.
- La 2^{ème} étape caractérise la présence des bactéries directement impliquées dans la déchloration réductive des ECs et évalue la capacité intrinsèque de l'aquifère à exprimer un processus de déchloration réductive complet ou partiel.
- La 3^{ième} étape complète l'analyse de la microbiologie du site par une mesure de la structure des communautés bactériennes globales présentes dans l'aquifère. Cette dernière étape fournit également une analyse statistique intégrée des données collectées aux étapes 1 et 3 afin d'évaluer les caractéristiques biogéochimiques globales de l'aquifère (TEAPs prédominants) et leur impact sur le potentiel de biodégradation des ECs.

La réalisation de la démarche complète permet de recueillir un maximum de renseignements pour le bon choix de la variante d'assainissement *in situ*.

Une illustration détaillée de la procédure de screening est présentée en Figure 7. Les variantes d'assainissement *in situ* suggérées par les résultats au cours de la démarche sont indiquées tout à gauche de la figure. La méthodologie évalue avant tout le potentiel du processus de déchloration réductive dans une atténuation naturelle. Des investigations complémentaires en tests pilotes *ex* ou *in situ* et des analyses de risques dans certains cas seront toujours nécessaires pour s'assurer de l'applicabilité de la variante suggérée.

Figure 6 - Démarche de screening systématique en trois étapes pour l'évaluation du potentiel de déchloration réductive dans un aquifère contaminé par des éthènes chlorés



2.2. Logique de la démarche

Chaque étape de la procédure de screening repose sur des objectifs techniques (résumés au § 4.) qui complètent au fur et à mesure l'analyse du potentiel de déchloration réductive de l'aquifère en investigation. Les premières étapes relèvent d'approches classiques et bien établies dans les guides d'évaluation de l'atténuation naturelle d'aquifères contaminés (ex. 3,13,15,16); même s'ils présentent quelques variantes dans le choix des analyses à réaliser. L'originalité de l'approche en trois étapes présentée ici est : i) l'intégration de l'analyse des communautés bactériennes globales dans la caractérisation du site et ii) l'utilisation d'outils statistiques de l'écologie numérique pour appréhender le fonctionnement dynamique du système d'eau souterraine et ses liens avec le processus de déchloration réductive. De plus, le présent document parle souvent d'échantillons d'aquifère et sous-entend que la procédure s'applique aussi bien à des échantillons d'eaux qu'à des échantillons solides de la zone saturée.

La logique de la méthodologie est de répondre graduellement aux questions qui généralement se posent successivement lors de l'investigation d'un site contaminé (Figure 7):

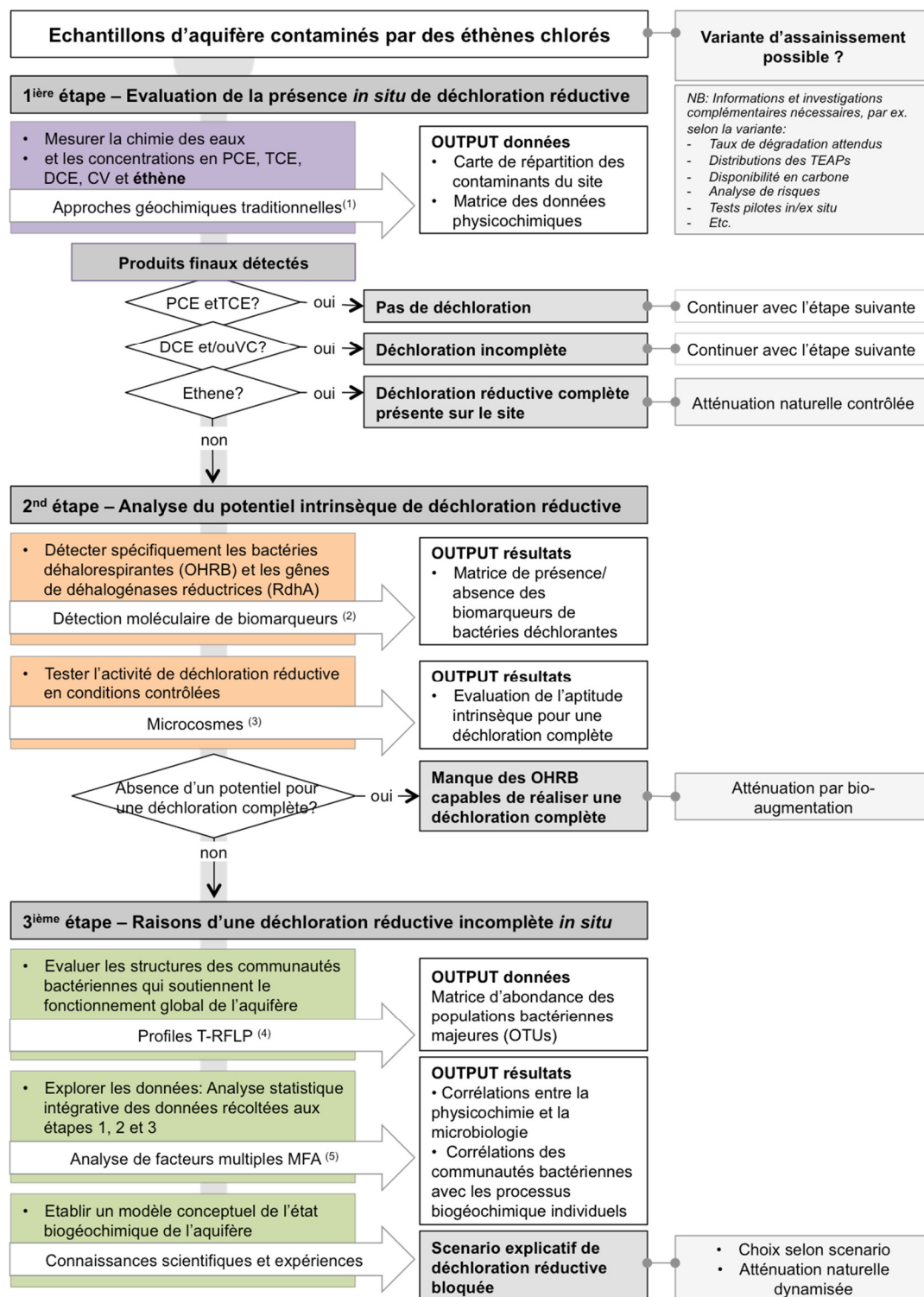
1) En l'état et sans autre intervention, le site présente-t-il déjà une activité *in situ* de déchloration réductive complète du PCE jusqu'à l'éthène ?

Après la réalisation de l'étape 1, les réponses peuvent être « oui », ou « oui avec déchloration réductive incomplète », ou « non ». Si la réponse est « oui » alors le site peut être envisagé en MNA après investigations complémentaires. Poursuivre la procédure, avec les étapes 2 et 3 apportera également une compréhension approfondie pour la surveillance de l'assainissement de l'aquifère.

2) Si la réponse à l'étape 1 est « oui avec déchloration réductive incomplète » ou « non », il est nécessaire de savoir si l'absence d'un processus complet de déchloration est liée à l'absence de OHRB et indépendant des conditions environnementales de l'aquifère en investigation.

Après la réalisation de l'étape 2, la réponse peut-être « oui » ou « non ». Si la réponse est « oui » alors le site en l'état ne peut pas être envisagé pour un assainissement par la déchloration réductive. Après investigations complémentaires (notamment poursuivre avec l'étape 3), l'alternative serait un assainissement par bio-augmentation qui correspond à une re-dynamisation du site par un apport important de la population de bactérie manquante. Cette variante d'assainissement est peu usitée car elle concerne également la législation sur l'usage d'organismes dans l'environnement (Ordonnance sur la dissémination dans l'environnement, ODE, Chap.2, Sect.1). Idéalement, elle devrait se réaliser

par ajout dans l'aquifère d'un enrichissement de bactéries autochtones capables de déchloration réductive complète. De fait, des consortia bactériens sont commercialisés avec des procédures d'assurance et de contrôle qualité variables (17).



modifié de Tamawski et coll. 2016

Figure 7 - Illustration détaillée de la procédure de screening en trois étapes pour l'évaluation du potentiel *in situ* de déchloration réductive d'un site contaminé par des éthènes chlorés. T-RFLP : acronyme anglophone pour Polymorphisme de Longueur des Fragments Terminaux ; OTU : acronyme anglophone pour Unité Taxonomique Opérationnelle, elles sont définies lors de l'analyse T-RFLP ; OHRB: bactéries déhalorespirantes ; TEAPs: processus accepteurs terminaux d'électrons. Références : ⁽¹⁾ Appelo et Postma, 2005; ⁽²⁾ Maphosa et coll., 2010 ; ⁽³⁾ Holliger et coll., 1993 ; ⁽⁴⁾ Rossi et coll., 2009; ⁽⁵⁾ Shani et coll., 2013

3) Si la réponse à l'étape 2 est « non », alors quelles sont les raisons d'une déchloration réductive incomplète?

Après réalisation de l'étape 3, l'interprétation concomitante des résultats via l'analyse statistique de facteurs multiples (MFA) peut révéler différentes raisons. Chaque site ayant sa spécificité, il est difficile de réaliser une liste exhaustive de raisons ou combinaisons de raisons par avance. Quelques-unes sont répertoriées ci-dessous:

- Les conditions biogéochimiques (TEAPs) de l'aquifère sont défavorables à une déchloration réductive complète, cDCE et CV s'accumulent dans l'aquifère. Par exemple une ferri-réduction importante draine une partie des équivalents réducteurs, elle ralentit ou bloque temporairement l'installation d'une déchloration réductive performante. Ou encore plusieurs TEAPs prédominant dans des endroits différents du panache et influencent négativement le processus de déchloration réductive. Dans ce cas, le site peut être envisagé en ENA, après investigations complémentaires, en apportant dans le site du substrat organique afin de baisser le rédox du milieu et limiter la concurrence pour les donneurs d'électrons (18). Une MNA pourrait éventuellement être appliquée après une étude de l'évolution possible des conditions rédox du milieu et une évaluation sérieuse de la durée d'assainissement. Le CV et le cDCE peuvent migrer vers des zones aérobies (Figure 3) où l'oxydation directe de ces composés peut se produire (Figure 1). Cela indique que l'assainissement pourrait être réalisé par la succession des processus de déchloration anaérobie et aérobie en fonction des conditions. Pour éviter une mauvaise interprétation de la non-détection de l'éthène, l'hydrochimie du site devra être surveillée et les taux de dégradation évalués.
- La communauté bactérienne est incomplète pour soutenir le fonctionnement du système. Par exemple les bactéries fermentatrices capables de dégrader la matière organique complexe pour implémenter le système avec des molécules organiques simples, donneurs d'électrons des OHRB et des TEAPs, sont déficientes dans le système. Dans ce cas le site peut être envisagé en ENA.
- Toutes les conditions sont favorables pour une déchloration réductive complète mais le taux de dégradation des dernières étapes du processus est faible et crée une accumulation apparente de cDCE ou de CV. Un assainissement par MNA est cohérent dans ce cas et une ENA peut aussi être envisagée si la durée évaluée pour un assainissement par MNA est trop longue.
- L'hydrogéologie du site ne permet pas des flux de substances suffisantes ou stables pour réaliser les bonnes conditions aux bons endroits de l'aquifère (7). Dans ce cas un assainissement par atténuation naturelle n'est pas envisageable.

2.3. Avantages et limites pour l'évaluation de variantes d'assainissement biologique

En quoi la démarche est une aide pour le choix d'une remédiation par atténuation naturelle via la déchloration réductive ?

- + La réalisation de la procédure de screening en 3 étapes apporte des réponses indispensables pour le choix de la technique d'assainissement la plus appropriée
- + Elle permet de connaître les conditions biogéochimiques d'un site contaminé et savoir si elles sont favorables à la biodégradation des éthènes chlorés.
- + Quand une déchloration réductive incomplète est observée, la démarche permet de savoir si un site contient un potentiel intrinsèque de déchloration réductive complet (test en microcosmes). Autrement dit, il est possible de savoir si des échantillons d'aquifère libérés des contraintes environnementales par des tests en laboratoire expriment une déchloration réductive complète jusqu'à l'éthène. Dans ce cas, la question cruciale est de savoir s'il sera aussi possible d'activer *in situ* un processus complet en appliquant une ENA.
- + Elle permet de détecter les OHRB présentes dans un site. Si *Dehalococcoides* n'est pas détecté et que les tests en microcosmes sont négatifs, une stimulation par ENA sera probablement sans succès. La stratégie alternative serait un assainissement par bio-augmentation qui pourrait être combiné avec une ENA suivant les résultats d'investigations complémentaires du site.
- + La force majeure de la méthode de screening est l'analyse concomitante de la microbiologie et de l'hydrogéochimie de l'ensemble des échantillons prélevés d'un aquifère pour préciser la ou les raisons d'une déchloration réductive partielle quelles qu'en soient les causes : la physicochimie (en lien avec les TEAPs), l'hydrogéologie ou la microbiologie du site.
- + Lors d'une MNA ou d'une ENA, la réalisation régulière des étapes 1 à 3 sur des lots d'échantillons prélevés d'un aquifère, permet la surveillance de la procédure d'assainissement (5) et d'évaluer les actions correctives nécessaires en éclaircissant les processus qui ont lieu lors de l'atténuation.

A quoi la démarche ne répond pas ?

- La démarche ne présente pas de méthodologie précisant le temps que prendra un assainissement et n'évalue pas les taux de dégradation *in situ* des éthènes chlorés. Les données recueillies à l'étape 1 et 2 seront utiles à ces évaluations, et des investigations complémentaires en tests pilotes *ex/in situ* seront souvent nécessaires (19,3).
- Elle ne quantifie pas la part biologique de l'atténuation naturelle, pour l'obtenir, des études du fractionnement isotopique des ECs dans l'aquifère sont nécessaires (20,21).
- Elle n'analyse pas les flux d'eau souterraine et la géologie mais ces données sont nécessaires
- Le manuel initial ne présente rien quant à la mise en application sur le terrain des techniques d'assainissements suggérées par les résultats d'analyses de la démarche. Par exemple, pour l'application d'une ENA, la démarche ne précise pas les types et les quantités de substrats à utiliser et comment choisir le ou les points d'injections. Pour cela, se référer aux articles (ex. 20,21,22), guides (ex. 4,14,19,23) existants et aux documentations d'aide à l'exécution (24,25,26).
- Elle ne définit pas si une stratégie d'assainissement par alternance des procédés biologiques aérobies et anaérobies est à envisager, par exemple lorsqu'un site présente une forte accumulation de CV. Les résultats indiqueront néanmoins les pistes à explorer dans ce sens et il sera très souhaitable d'intégrer une investigation de la microbiologie impliquée dans l'oxydation métabolique aérobie des ECs en complément des analyses de la procédure screening.
- La méthode ne détaille pas les investigations complémentaires éventuellement nécessaires pour valider la technique d'assainissement suggérée par les résultats de la procédure. Elle se concentre sur l'étude de la part biologique, *via* la déchloration réductive, de l'atténuation naturelle.
- Le manuel original ne discute pas des procédés d'assainissement *in situ*, autres que biologiques, qui peuvent être explorés lors du choix de la technique d'assainissement (1).

3. Considération technique préalable à la procédure de screening et équipement des sites

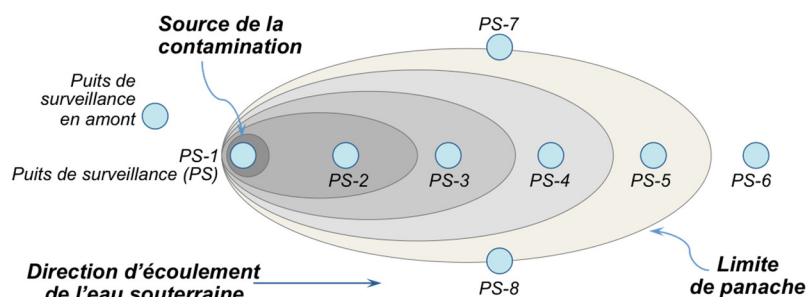
La démarche étant axée sur le processus anaérobie de déchloration réductive, l'aquifère devra présenter **une zone saturée permanente**, peu influencée par les variations de charge hydraulique saisonnière, et suffisamment profonde pour permettre l'établissement de potentiels rédox bas.

Généralement, les données recueillies dans les investigations de sites contaminés sont répertoriées et analysées individuellement par puits de prélèvement. Ceci rend la vision d'ensemble de l'aquifère complexe, voire impossible, du fait de résultats souvent contradictoires localement. L'hétérogénéité d'un site est difficilement mesurable et assimilable dans une interprétation puits par puits. Dans la procédure de screening, l'hydrogéochimie et la microbiologie de lots d'échantillons d'aquifère sont analysées successivement dans les étapes 1 à 3. Les données collectées à chaque étape (OUTPUT données, Figure 7) sont ensuite compilées pour l'ensemble du lot d'échantillons, et utilisées dans l'étape 3 pour l'analyse statistique de facteurs multiples (MFA) et l'élaboration du modèle conceptuel du fonctionnement de l'aquifère. Ceci transmet à la fin une vision globale et précise des conditions biogéochimiques de l'aquifère et de l'état du processus de dégradation des ECs. Cette force analytique de la démarche repose de manière critique, sur la capacité à collecter des lots d'échantillons d'aquifère représentatifs de l'hétérogénéité du panache de pollution. Par conséquent, les sites en évaluation devront présenter **un équipement piézométrique suffisant** avec un nombre et une répartition spatiale des puits de surveillance adéquats afin d'établir une carte complète de la répartition des contaminants depuis la ou les sources de contaminations jusqu'aux limites du panache (Figure 8) ou des zones contaminées dans le cas de site hétérogène. Pour ce faire, le document d'aide à l'exécution de l'OFEV (27) pour définir la disposition et le nombre de puits de surveillance sur un site contaminé permet la mise en place des points de sondage les plus judicieux et informatifs pour assurer la protection des eaux ainsi qu'évaluer l'atténuation naturelle à long terme.

La possibilité d'accéder à des échantillons d'eaux à travers au **minimum 7 à 12 puits** de surveillance placés dans des zones hétérogènes représentatives du panache de contaminants permet l'application de l'ensemble des 3 étapes de la procédure pour une évaluation du site. Il y a néanmoins des chances que la statistique de l'étape 3 ne soit pas significative, la variance des différents facteurs testés (c'est à dire les TEAPs, l'état de dégradation des CEs et les communautés bactériennes) à contenir dans l'analyse n'étant pas supporté par la collecte d'une quantité suffisante de données. Cependant, cette analyse pourra être complétée par des séries de données récoltées ultérieurement, comme dans une procédure standard de surveillance des eaux souterraines, en analysant ensemble les jeux de données obtenus au fur et à mesure des **différentes campagnes d'échantillonnages**.

Dans la plupart des cas, la procédure de screening s'applique de façon **optimale** sur un site équipé d'un réseau de **15 à 20 piézomètres** et l'aquifère pourra être évalué en réalisant la procédure de screening complète sur les échantillons provenant **d'une seule campagne d'échantillonnage** (consulter également Annexe 1, Figure 11).

Figure 8 - Réseau piézométrique de surveillance dans un panache idéal de dispersion de la pollution. Le réseau comprend des puits dans la zone source de la contamination, le long du gradient de dilution des contaminants depuis la zone source, dans la zone limite du panache, et des contrôles en amont du panache. Le réseau peut inclure des puits perpendiculaires au sens d'écoulement de l'eau souterraine pour surveiller les composants latéraux du panache.



modifié de McAllister et Chiang, 1994

De facto, la **démarche de screening** devrait idéalement être **mise en œuvre dès « l'investigation de détail »** de la procédure pour la gestion des sites contaminés (Figure 9). En effet les sites sont souvent peu équipés lors de « l'investigation préalable » (3 à 7 puits) et des forages complémentaires sont réalisés lors de « l'investigation de détail » afin de déterminer selon l'art. 14 OSites:

- type, emplacement, quantité et concentration des substances dangereuses pour l'environnement présentes sur le site pollué;
- type des atteintes à l'environnement effectives et possibles, charge et évolution de ces atteintes dans le temps;
- emplacement et importance des domaines environnementaux menacés.

Les objectifs de « l'investigation de détail » devraient assurer la mise en place d'un réseau de piézomètres en concordance avec les exigences de la procédure de screening. Cette dernière sera également un outil essentiel pour évaluer les variantes d'assainissement *in situ* et élaborer le projet d'assainissement (Figure 9) selon les aides à l'exécution de l'OFEV (1,25).

Récapitulatif des prérequis

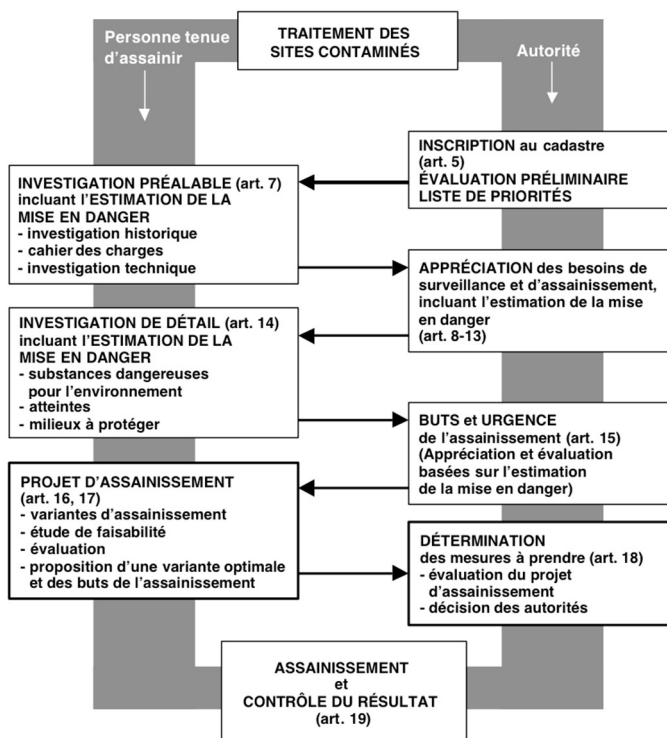
- La démarche d'analyses de l'étape 1 à 3 s'applique au mieux sur des sites équipés convenablement avec un minimum de 15 à 20 piézomètres.
- Un suivi est possible pour les sites faiblement équipés, minimum 7 à 12 piézomètres. L'évaluation complète nécessitera 2 à 3 campagnes d'échantillonnages, espacées dans le temps, de manière à analyser ensemble un total minimal de 15 à 20 échantillons d'aquifère.
- La réalisation complète de la procédure de screening pour l'évaluation d'un site analysé sur une seule campagne d'échantillonnage nécessite un délai minimal de 2 mois et maximal de 3 mois (cf. § 4., tests en microcosmes de l'étape 2).
- Dans tous les cas, il est nécessaire que les emplacements des points de prélèvements soient dans la zone saturée de l'aquifère et représentatifs de l'ensemble de la zone contaminée. Sinon quoi, même l'analyse d'un grand nombre d'échantillons ne relatera pas efficacement les processus souterrains et amènera des conclusions erronées quant aux stratégies d'assainissements possibles. La réussite de l'évaluation passe obligatoirement par un plan d'échantillonnage cohérent et optimisé, et un effort doit être fourni pour équiper le site le cas échéant.
- La réalisation de la démarche sera donc dépendante du site en investigation, de son niveau d'équipement ainsi que des ressources techniques et financières disponibles.

Note importante pour l'échantillonnage

La force de la procédure de screening, pour l'évaluation des variantes d'assainissement, repose sur l'analyse concomitante à l'étape 3 des résultats d'investigations de la physicochimie et de la microbiologie de l'aquifère (Figure 7 et 10). D'un point de vue écologique, ces deux aspects sont fortement dépendants l'un de l'autre (Figure 5) et sont soumis de pair aux variations spatiales et temporelles de l'aquifère. De ce fait, il est indispensable que ces paramètres soient mesurés sur les mêmes échantillons d'aquifère, de bout en bout de la procédure de screening. Il s'agira donc de prélever à chaque point d'échantillonnage une quantité suffisante de matériel afin de réaliser toutes les mesures prévues dans les objectifs techniques de la procédure (cf. point 4.).

Pour les analyses chimiques, l'échantillonnage des eaux souterraines contaminées peut se faire selon la procédure générale décrite dans l'aide à l'exécution de l'OFEV (27). Pour les analyses microbiologiques, la procédure d'échantillonnage est décrite dans le manuel et comporte des spécificités quant aux moyens et à la manière de réaliser les prélèvements.

Figure 9 – Déroulement général du traitement d'un site contaminé selon l'ordonnance sur les sites contaminés (OSites RS 814.680)



OFEV, 2001

4. Résumé des objectifs techniques de la procédure et données collectées

La synthèse des objectifs techniques de la démarche est présentée dans la Figure 10.

Etape 1

L'objectif de l'étape 1 est d'évaluer la présence *in situ* du processus de déchloration réductive. Dans cette étape, les **concentrations de PCE, TCE, cDCE, VC, éthène** sont mesurées, ainsi que les **chlorures** (produit final de la dégradation biologique et abiotique des CE), selon des méthodes analytiques présentées et référencées dans le manuel (29,30). Les **paramètres physicochimiques** importants de l'aquifère sont également mesurés. Le potentiel d'oxydo-réduction (POR), le pH, la température (t°C) au point de prélèvement, la conductivité électrique (eC) et l'oxygène dissous (dO₂) sont mesurés directement sur le terrain. Les concentrations en nitrate NO₃⁻, nitrite NO₂⁻, manganèse Mn(II), fer Fe(II), sulfate SO₄²⁻, sulfure d'hydrogène H₂S, méthane CH₄, dioxyde de carbone CO₂, et de carbone organique dissous "Non Purgeable" COD-NPOC sont les paramètres indispensables retenus, et sont mesurés selon des méthodologies analytiques référencées dans le manuel (27,29,28,31).

Les données collectées par la mesure des paramètres hydrogéochimiques serviront à évaluer les TEAPs prédominants de l'aquifère en investigation (cf. § 1.1.). Elles sont conservées et répertoriées par échantillons dans des **tableaux de relevés physicochimiques** et des concentrations des ECs. Les résultats des concentrations en ECs sont évalués en fonction des limites de concentrations admissibles selon l'OSites (cf. Introduction). Les zones d'aquifères avec des concentrations de PCE, TCE, cDCE, et VC supérieures aux limites sont cartographiées le long du panache. La **carte de répartition des contaminants** ainsi obtenue peut être interprétée à l'aide des données hydrogéologiques collectées sur le site. La présence des produits intermédiaires de dégradation démontre sans ambiguïté que l'atténuation naturelle est réalisée par le processus prédominant de déchloration réductive et la détection d'éthène est le meilleur indicateur d'un processus complet dans l'aquifère.

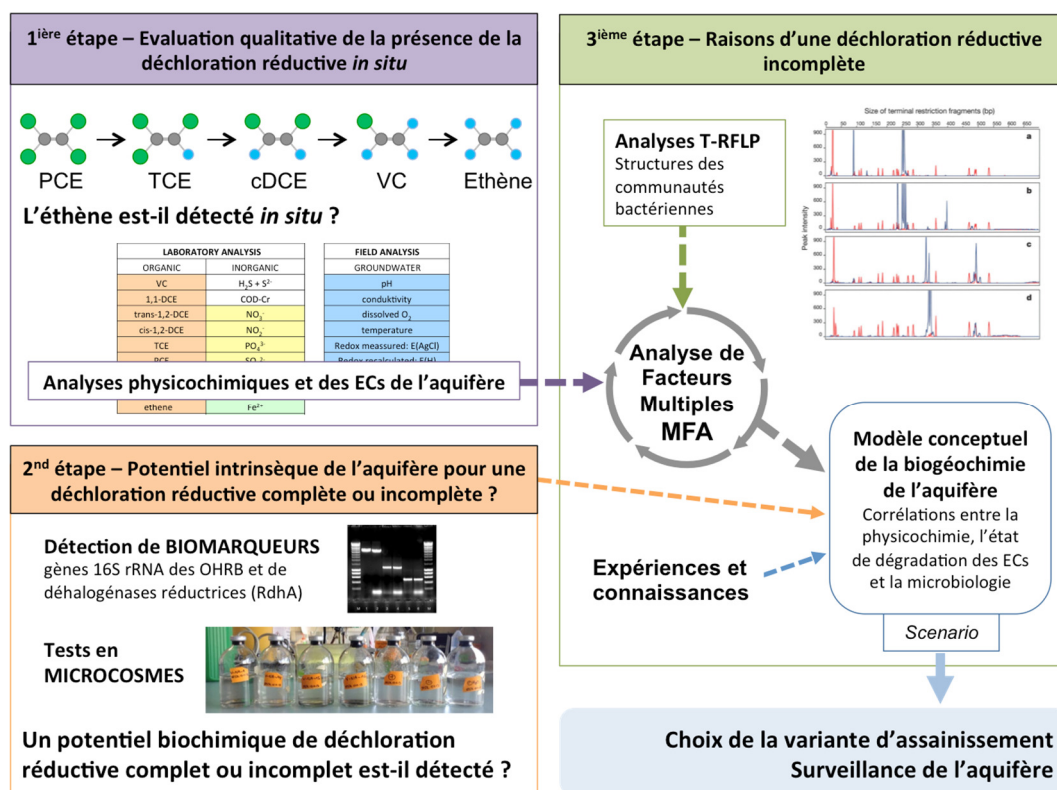


Figure 10 – Synthèse des objectifs techniques de la procédure de screening pour l'évaluation du processus de déchloration réductive dans des aquifères contaminés par des éthènes chlorés. OHRB: bactéries déhalorespirantes ; T-RFLP : acronyme anglophone pour Polymorphisme de Longueur des Fragments Terminaux ; PCE: perchloroéthène, TCE: trichloroéthène, cDCE: cis-1,2-dichloroéthène, VC: chlorure de vinyle.

Etape 2

L'objectif de l'étape 2 est d'analyser si le processus de déchloration réductive peut s'exprimer de façon complète et d'évaluer le potentiel biochimique de déchloration réductive intrinsèque de l'aquifère. Dans cette étape, la présence des bactéries impliquées dans la déchloration réductive, est analysée par **détection spécifique de biomarqueurs des OHRB** avec des outils de biologie moléculaire. Les biomarqueurs ciblés sont les **gènes 16S rRNA des bactéries OHRB et les gènes de déhalogénases réductrices BvcA et VcrA** (Figure 4). Les échantillons d'eau souterraine sont également incubés pendant au maximum 3 mois en **conditions contrôlées** et optimales pour l'expression biochimique de la déchloration réductive, en réalisant des cultures **tests en microcosmes**. La phase gazeuse des microcosmes est régulièrement analysée pour la présence des produits de déchloration TCE, DCE, VC et éthène. Les protocoles nécessaires à la réalisation de ces analyses sont détaillés dans le manuel.

La détection des biomarqueurs indiquera si les bactéries OHRB sont présentes ou absentes dans les échantillons d'aquifère, en particulier *Dehalococcoides* ainsi que les deux RdhA qui catalysent les réductions du cDCE et du VC en éthène. Les résultats de la recherche des biomarqueurs cibles sont conservés et répertoriés par échantillons dans une **matrice de présence/absence**. Dans les tests en microcosme, tous ou certains des composés intermédiaires de dégradation (TCE, DCE, VC et éthène) seront détectés en fonction des bactéries OHRB présentes dans les échantillons et de leur capacité à réaliser les différentes étapes de la déchloration réductive. Ceci révélera le **potentiel inhérent de l'aquifère à présenter un processus complet ou incomplet** de déchloration réductive.

Remarque : Les résultats d'analyse de l'étape 2 servent pour l'élaboration du modèle conceptuel du fonctionnement biogéochimique de l'aquifère à l'étape 3 (Figures 7 et 10). Ces résultats ne sont pas nécessairement intégrés dans l'analyse statistique de l'étape 3 (c'est le cas pour celle détaillée dans le manuel) et le nombre d'échantillons à analyser, comparé à celui nécessaire pour les étapes 1 et 3, peut être réduit. Toutefois plus le nombre d'échantillons testés à l'étape 2 est important plus l'expérience rendra compte du devenir de l'ensemble du site lors d'un assainissement par MNA.

Avertissement : Si un potentiel de dégradation complète du PCE est observé dans les tests en microcosme, cela suggère que la stimulation du processus de déchloration réductive *in situ* est possible. Il est néanmoins indispensable d'être prudent à ce stade quant à l'application d'une ENA, les

conditions de microcosmes en laboratoire présentant toujours un décalage certain avec les conditions de terrain. Des tests pilotes *ex situ* et *in situ* de terrain seront toujours nécessaires pour valider la variante d'assainissement.

Etape 3

L'objectif de l'étape 3 est d'élucider les raisons d'une déchloration réductive incomplète. Dans cette étape, les **communautés bactériennes** globales qui vivent dans l'aquifère et interagissent avec le milieu sont caractérisées par une technique de biologie moléculaire appelée T-RFLP. La méthode et ses principes sont détaillés dans le manuel. Cette technique restitue un profil T-RFLP qui peut être assimilé à une empreinte digitale ou un code barre représentatif de la communauté bactérienne présente dans un échantillon, chaque barre du code représentant une population bactérienne différente de la communauté. Le nombre de populations bactériennes différentes et leurs valeurs respectives d'abondance relative dans la communauté sont extraits des profils T-RFLP de chaque échantillon. Ces données sont conservées et répertoriées par échantillons dans une **matrice d'abondance des populations bactériennes**.

Les données collectées aux étapes 1 et 3 (tableaux des données physicochimiques, concentrations des ECs et matrice d'abondance) sont finalement analysées ensemble, de manière intégrative, dans une analyse statistique appelée Analyse de Facteurs Multiple (MFA, complètement détaillée dans le manuel). **Les corrélations significatives sont tirées de l'analyse MFA entre les paramètres physicochimiques, la microbiologie** (qu'ils s'agissent des TEAPs ou des communautés bactérienne), **et l'état de dégradation des ECs** dans l'aquifère. L'interprétation de ces corrélations, basée entre autres sur une connaissance des mécanismes de la succession écologique des TEAPs, du processus de déchloration réductive et de leurs exigences minimales en H₂, permet l'élaboration d'un **modèle conceptuel de la biogéochimie globale de l'aquifère** et ses interrelations avec le processus de déchloration réductive. Enfin, des hypothèses et des scénarii peuvent être formulés pour expliquer une déchloration incomplète. L'expérience et l'intuition de l'expert sont utiles à ce stade afin de comprendre ce qui se passe dans le site en étude et tirer de l'ensemble des analyses les informations importantes en terme de stratégie d'assainissement.

Conclusion

La démarche de screening apporte une évaluation approfondie du processus de déchloration réductive présent dans des sites contaminés. Elle permet vraiment d'analyser l'aquifère comme un système écologique dans lequel le processus de déchloration réductive est en complète interrelation avec le fonctionnement de l'ensemble du système.

La force de la procédure de screening pour l'évaluation des variantes d'assainissement repose sur l'analyse concomitante des résultats d'investigations de la physicochimie et de la microbiologie de l'aquifère. La contribution originale de la démarche d'analyse, pour évaluer le potentiel d'atténuation naturelle *via* la déchloration réductive, réside dans :

- la prise en compte dans l'analyse des communautés bactériennes globales de l'aquifère, en plus des bactéries déhalorespirantes, des processus respiratoires bactériens accepteurs terminaux d'électrons.
- l'usage d'outils statistiques dérivés de l'écologie numérique et présentant une puissance analytique indéniable pour le traitement des données complexes issues des différents paramètres mesurés.

La réalisation complète des étapes de la procédure permet de recueillir un maximum de renseignements pour le bon choix de la variante d'assainissement *in situ*. La démarche permet non seulement d'évaluer les variantes d'assainissements *via* la déchloration réductive mais constitue également un outil de surveillance globale des sites contaminés et de leur remédiation (5).

Références

1. OFEV (2014) Module «Evaluation des variantes d'assainissement» de l'aide à l'exécution «Assainissement des sites contaminés». L'environnement pratique, UV-1401-F, 34 pp.
2. Chloronet (2009) Guide des hydrocarbures chlorés (HCC): Propriétés et comportement dans l'environnement. FOEN, 50 pp.
3. ADEME (2007) Atténuation naturelle des composés organochlorés aliphatiques dans les aquifères, Guide méthodologique ADEME, Programme R&D MACAOH (Modélisation, Atténuation, Caractérisation dans les

- Aquifères des Organo-Halogénés), Côme J.M., Kaskassian S., Ropars M., Quintard M., Vogel T., Razakarisoa O., Nex F., Schäfer G., Haeseler F., 228 pp.
4. EPA (2000) Engineered Approaches to In situ Bioremediation of Chlorinated Solvents: Fundamentals and Field Applications. EPA 542-R-00-008, 144 pp.
 5. Tarnawski, S., Rossi, P., Brennerova, M., Stavelova, M., Holliger, C. (2016) Validation of an integrative assessment methodology to determine the in situ potential for the complete reductive dechlorination of chlorinated ethenes in contaminated aquifers. *Frontiers in Environmental Science*, 4: 7.
 6. Tiehm, A., and Schmidt, K.R. (2011) Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes-aspects of field application. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 415-421.
 7. Shani, N. (2012) Assessing the Bacterial Ecology of Organohalide Respiration for the Design of Bioremediation Strategies, EPFL thesis, n°5379.
 8. Goldscheider, N., Hunkeler, D., Rossi, P. (2006) Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeology Journal*, 14(6): 926-941.
 9. Humphreys, W.F. (2006). Aquifers: the ultimate groundwater-dependent ecosystems. *Australian Journal of Botany*, 54: 115-132.
 10. Chapelle, F.H., McMahon, P.B., Dubrovsky, N.M., Fujii, R.F., Oaksford, E.T., and Vroblesky, D.A. (1995) Deducing the distribution of terminal electron-accepting processes in hydrologically diverse groundwater systems. *Water Resources Research*, 31: 359-371.
 11. Hiraishi, A. (2008) Biodiversity of dehalorespiring bacteria with special emphasis on polychlorinated biphenyl/dioxin dechlorinators. *Microbes and Environments*, 23: 1-12.
 12. Vogel, T. M., Criddle, C. S., McCarty, P. L. (1987) Transformations of halogenated aliphatic compounds. *Environmental Science Technology*, 21: 722-736.
 13. EPA (1998) Technical Protocol for Evaluating Natural Attenuation of Chlorinated Solvents in Ground Water. EPA/600/R-98/128, 248 pp.
 14. NJDEP-SRP (2012) Monitored Natural Attenuation Technical Guidance Document. Version 1.0, issued 3/1/2012, 175pp.
 15. NOBIS (2001) A decision support system for acceptance of natural attenuation as remediation strategy, Draft final v2.0. Prep. by Sinke A.J.C., Heimovaara T., Tonnaer H., Ter Meer J. (TNO-MEP, IWACO bv, TAUW bv)J., Gouda (in Dutch : Beslissingsondersteunend systeem voor de beoordeling van natuur-lijke afbraak als saneringsvariant – NOBIS : Nederlands Onderzoeksprogramma Biotechnologische In-Situ Sanering).
 16. Environment Agency (2000) Guidance on the Assessment and Monitoring of Natural Attenuation of Contaminants in Groundwater. R&D Publication 95, Environment Agency, UK. ISBN: 1 85705 263 2, 143 pp.
 17. SERDP ESTCP (2005) Bioaugmentation for Remediation of Chlorinated Solvents: Technology Development, Status, and Research Needs. Environmental Security Technology Certification Program, 88 pp.
 18. Shani, N., Rossi P. & Holliger C. (2013) Correlations between environmental variables and bacterial community structures suggest Fe (III) and vinyl chloride reduction as antagonistic terminal electron-accepting processes. *Environmental science & technology*, 47: 6836-6845.
 19. Parsons (2004) Principles and Practices of Enhanced Anaerobic Bioremediation of Chlorinated Solvents. For AFCEE, NFESC, ESTCP, USACE. Ref. 022/738863/28.doc, 457 pp.
 20. Badin, A., Broholm, M. M., Jacobsen, C. S., Palau, J., Dennis, P., and Hunkeler, D. (2016) Identification of abiotic and biotic reductive dechlorination in a chlorinated ethene plume after thermal source remediation by means of isotopic and molecular biology tools. *Journal of Contaminant Hydrology*, 192: 1-19.
 21. Schmidt, K. R. (2009) Natural attenuation am Standort Frankenthal: mikrobiologischer sequentiell anaerob-aerob Chloroethen-Abbau mit Kohlenstoff-Isotopenfraktionierung. Dissertation, Technische Universität Dresden / DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe. Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser (ISSN 1434-5765), Band 43.
 22. Kissell, Sarah M. (2017) "Comparing the Effect of Carbon Sources, Lactate and Whey, on Biological Reductive Dechlorination of TCE in Laboratory Flow Through Columns". All Graduate Theses and Dissertations, n°5394. <http://digitalcommons.usu.edu/etd/5394>
 23. WSRC, (2006) Characterization and monitoring of natural attenuation of chlorinated solvents in ground water : A system approach. WSRC-STI-2006, rev.1, 29808. Washington Savannah River Company Savannah River Site □ Aiken, SC.
 24. OFEV (2016) Assainissement in situ. Un module de l'aide à l'exécution «Assainissement de sites contaminés». 2e édition actualisée, décembre 2016; 1re édition 2008, L'environnement pratique, UV-0834-F, 70 pp.
 25. OFEV (2001) Elaboration de projets d'assainissement de sites contaminés. L'environnement pratique, VU-3410-F, 36pp.
 26. WSRC (2004) Natural and Passive Remediation of Chlorinated Solvents: Critical Evaluation of Science and Technology Targets, Report WSRC-TR-2003-00328. Westinghouse Savannah River Company. Savannah River Site, Aiken SC.

27. OFEV (2003) Sites contaminés - Estimation de la mise en danger - Prélèvements d'eau souterraine en relation avec les sites pollués. L'environnement pratique, VU-3413-F, 28 pp.
28. OFEV (2000) Sites contaminés - Estimation de la mise en danger - Cahier des charges pour l'investigation technique des sites pollués. L'environnement pratique, VU-3406-F, 24 pp.
29. OFEV (2013) Méthodes d'analyse dans le domaine des déchets et des sites pollués. L'environnement pratique, n° UV-1334-F, 80 pp.
30. Kampbell, D.H., Wilson, J.T., Vandegrift, S.A. (1989) Dissolved oxygen and methane in water by a GC headspace equilibrium technique. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 36: 249-257.
31. OFEV (2004) Instructions pratiques pour la protection des eaux souterraines. L'environnement pratique, VU-2508-F, 141 pp.

Annexe 1

Extrait du manuel : ADEME (2007) Atténuation naturelle des composés organochlorés aliphatiques dans les aquifères, Guide méthodologique ADEME, Programme R&D MACAOH (Modélisation, Atténuation, Caractérisation dans les Aquifères des Organo-Halogénés), Côme J.M., Kaskassian S., Ropars M., Quintard M., Vogel T., Razakarisoa O., Nex F., Schäfer G., Haeseler F., 228 pp.

Retours d'expérience (ADEME)

Pages 23 à 26

2.3 Retours d'expérience

Newell et al. [78] ont proposé une synthèse très concrète de l'application de l'ANS sur des sites pollués par des organo-chlorés. La synthèse est une exploitation statistique de questionnaires envoyés à 230 experts de la réhabilitation de sites pollués. 34 réponses ont été reçues concernant 191 sites traités par ANS sur la période 1998-2004. 45 panaches de composés dissous sont très bien documentés dont 10 situés en Europe. Les données de cette large enquête sont également commentées dans un rapport de la WSRC (Westinghouse Savannah River Company) pour le compte du DOE (US Department Of Energy) [113]. Les principaux résultats sont synthétisés ci-après.

Quelle est la taille des panaches ?

42% des panaches ont une longueur comprise entre 300 et 1500 m (Figure 4).

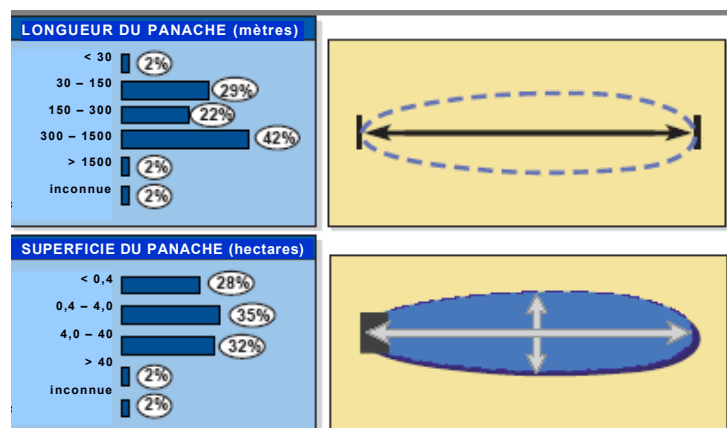


FIGURE 4 – TAILLE DES PANACHES (45 SITES) - D'APRÈS WSRC [113]

Quelle est la dynamique d'évolution des panaches ?

60% des panaches sont stables alors que seulement 16% sont en régression et 9% en extension (Figure 5).

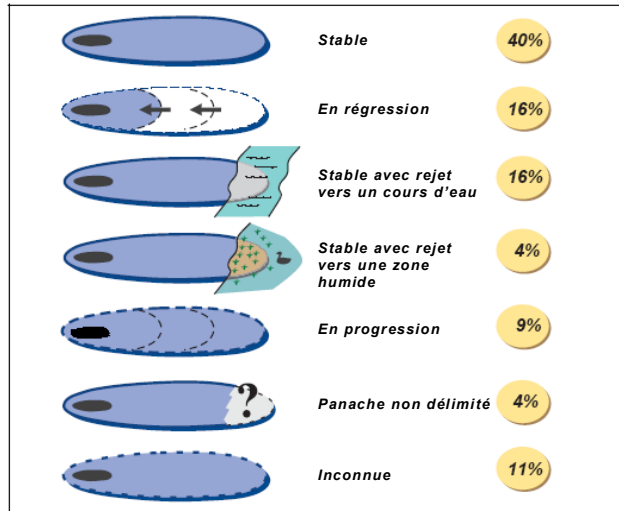


FIGURE 5 – EVOLUTION DE LA STABILITÉ DES PANACHES (45 SITES) - D'APRÈS WSRC [113]

Combien ça coûte ?

Les coûts varient sensiblement selon les sites : entre 10 000 et 750 000 \$ (moyenne 177 000 \$) pour les études de faisabilité de l'ANS, entre 3 000 et 150 000 \$ (moyenne 33 000 \$) pour un suivi annuel.

Quels sont les protocoles utilisés ?

Les protocoles de référence sont en priorité celui de l'USEPA (36% des cas) et un protocole spécifique au site (27% des cas).

Quels sont les mécanismes prépondérants ?

La biodégradation est le mécanisme principal d'Atténuation Naturelle. Dans 70% des cas, c'est la déchloration réductrice anaérobie qui est le principal processus biologique de dégradation (Figure 6). Cependant, dans 25% des cas, la conversion biologique aboutit à une accumulation de cis-1,2-dichloroéthylène.

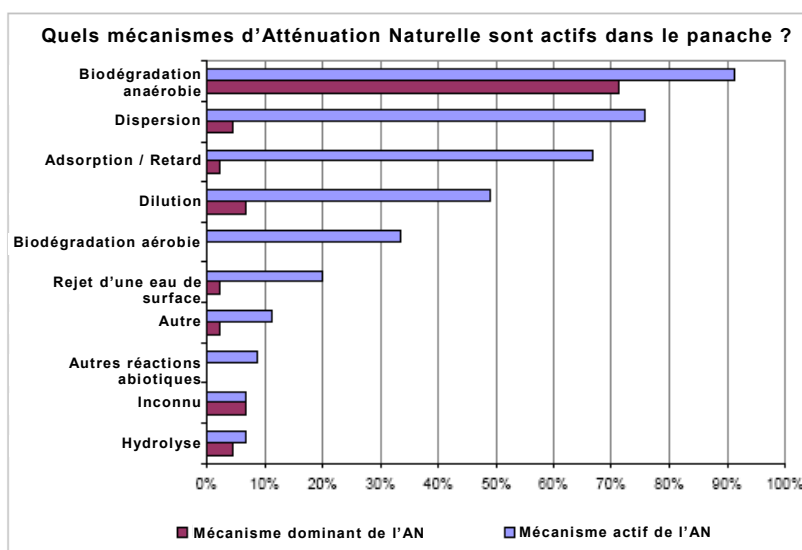


FIGURE 6 – MÉCANISMES D'ATTÉNUATION NATURELLE EN JEU (45 SITES) - D'APRÈS WSRC [113]

Quels sont les paramètres mesurés pour évaluer la biodégradation ?

Les indicateurs les plus pertinents sont la présence d'intermédiaires de dégradation (cis-DCE et CV pour les chloroéthènes) et la réduction des concentrations dans le temps et l'espace (Figure 7). Par contre, les mesures de l'hydrogène et des acides gras volatils (proposés en option dans le protocole de l'USEPA) ne sont pas fréquemment réalisées. De même, la détermination de populations bactériennes spécifiques telles que Dehalococcoides ethenogenes n'a été évaluée que sur deux des sites concernés par l'enquête.

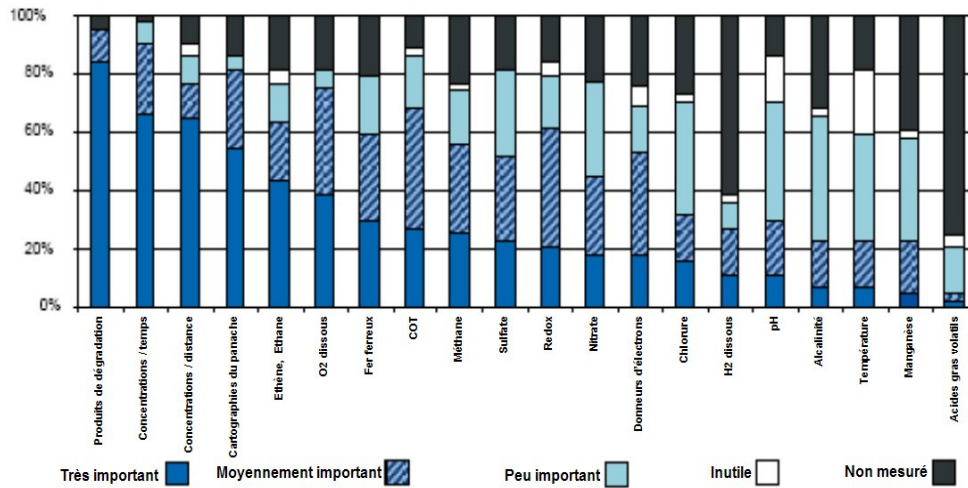


FIGURE 7 – IMPORTANCE RELATIVE DES PARAMÈTRES MESURÉS (45 SITES) - D'APRÈS WSRC [113]

Dans quelle proportion l'ANS est-elle mise en œuvre ?

L'ANS est mise en œuvre dans 77% des cas, seule ou combinée à des techniques actives. Dans 23% des cas, l'ANS n'est donc pas retenue au terme des études de faisabilité (Figure 8).

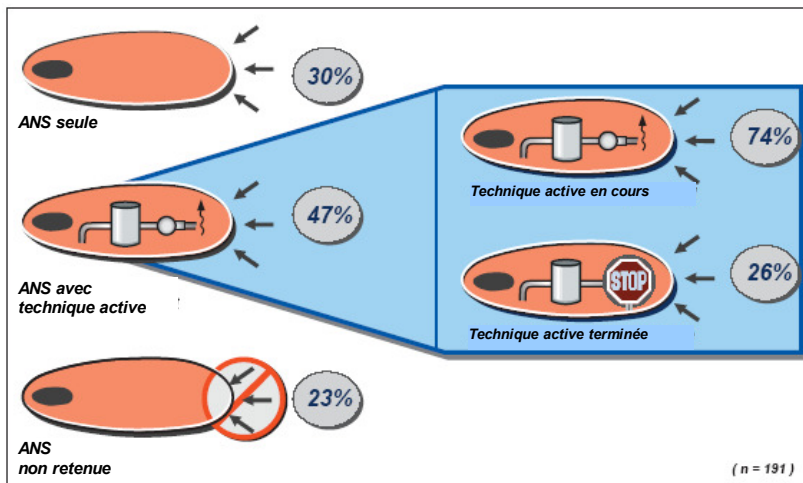


FIGURE 8 – EVALUATION DE LA FAISABILITÉ DE L'ANS (191 SITES) - D'APRÈS WSRC [113]

Pourquoi l'ANS n'est-elle pas retenue ?

Les raisons pour lesquelles l'ANS n'est pas retenue sont majoritairement un panache en extension et une durée de dépollution trop longue (Figure 9).

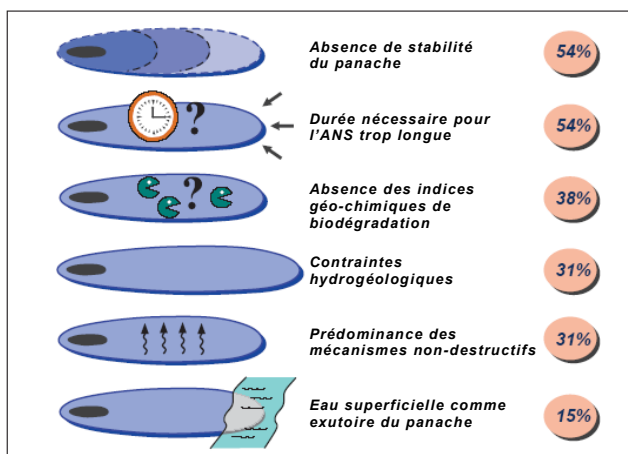


FIGURE 9 – FACTEURS D'EXCLUSION DE L'ANS COMME SOLUTION DE DÉPOLLUTION (23 SITES) - D'APRÈS WSRC [113]

Comment l'ANS est-elle mise ne œuvre ?

L'ANS est appliquée comme seule technique de dépollution sur seulement 30% des sites. Elle est associée à un traitement de la zone source dans 42% des cas et à un traitement du panache dans 13% des cas (Figure 10).

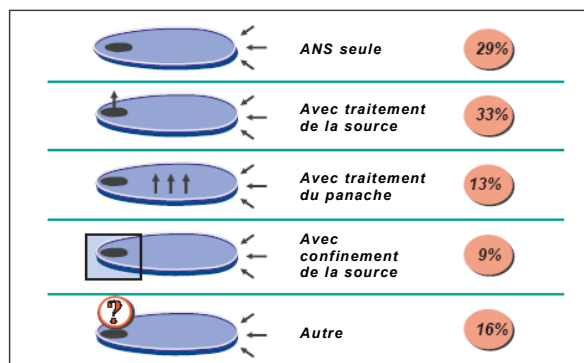


FIGURE 10 – L'ANS UTILISÉE COMME TECHNIQUE DE DÉPOLLUTION (45 SITES) - D'APRÈS WSRC [113]

Combien de piézomètres pour la surveillance à long terme ?

Le réseau de surveillance comprend au moins 20 piézomètres sur 50% des sites (Figure 11).

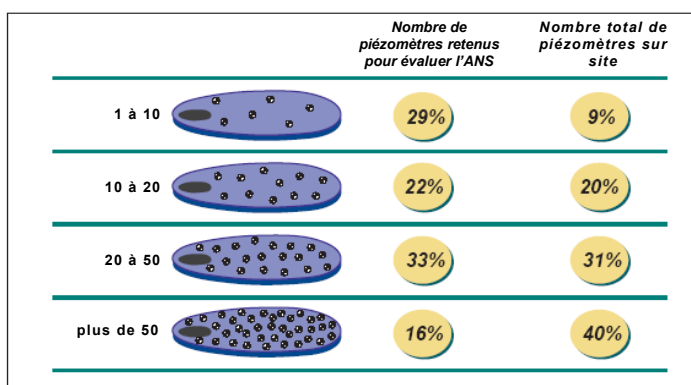


FIGURE 11 – NOMBRE DE PIÉZOMÈTRES DANS LE CADRE DE L'ANS (45 SITES) - D'APRÈS WSRC [113]

Annexe 2

Extrait du manuel : Parsons (2004) Principles and Practices of Enhanced Anaerobic Bioremediation of Chlorinated Solvents. For AFCEE, NFESC, ESTCP, USACE. Ref. 022/738863/28.doc, 457 pp.

Evaluation qualitative d'un site contaminé pour l'application d'une ENA (Parsons)

page 3-10

Table 3.1 Suitability of Site Characteristics for Enhanced Anaerobic Bioremediation

Site Characteristic	Suitable for Enhanced Bioremediation	Suitability Uncertain	Suitability Unclear - Possible Red Flag - Requires Further Evaluation
DNAPL Presence	Residual DNAPL or sorbed sources.	Poorly defined sources may require additional characterization.	May not be appropriate for aggressive treatment of pools of DNAPL.
Plume Size	Small, a few acres or less.	Medium to large, a few acres plus. May require concurrent technology.	Large plumes of many acres. May require concurrent technology.
On or Near Site Infrastructure	The risk of vapor intrusion from contaminants or biogenic gases is deemed acceptable.	Target treatment zone in close proximity to sensitive infrastructure.	Target treatment zone in an area where known vapor intrusion or high methane problems exist.
Evidence of Anaerobic Dechlorination	Slow or stalled dechlorination (see Table 3.2)	Limited evidence of anaerobic dechlorination.	No evidence of any degradation.
Depth	<50 feet to water	>100 feet to groundwater	Deep groundwater and deep contamination.
Hydraulic Conductivity	> 1 ft/day ($>3 \times 10^{-4}$ cm/sec)	0.01 to 1 ft/day (3×10^{-6} to 3×10^{-4} cm/sec)	<0.01 ft/day ($<3 \times 10^{-6}$ cm/sec)
Groundwater Velocity	30 ft/yr to 5 ft/day	10 ft/yr to 30 ft/yr, 5 ft/day to 10 ft/day	< 10 ft/yr, > 10 ft/day
pH	6.0 – 8.0	5.0 to 6.0, 8.0 to 9.0	< 5.0, > 9.0
Sulfate Concentration	< 500 ppm	500 to 5,000 ppm (with caution)	>5,000 ppm or presence of mineral gypsum may not be suitable

ft/day = feet per day; ft/yr = feet per year; cm/sec = centimeters per second; mg/L = milligrams per liter.

Table 3.2 Considerations and Red Flags for Preliminary Screening of Sites with PCE and TCE

Conditions	Site Classification		
	Type 1	Type 2	Type 3
No <i>cis</i> -DCE or other dechlorination products	Red Flag. Lack of any dechlorination products suggests the aquifer is sterile. Enhanced bioremediation not recommended.	Possible Red Flag. Lack of any dechlorination products may be due to substrate limitations. Additional site evaluation (e.g., pilot test or microcosm test) recommended (Section 4).	Red Flag. Potential for complete anaerobic dechlorination cannot be determined. Additional site evaluation (e.g., pilot test or microcosm test) recommended (Section 4).
<i>cis</i> -DCE present, but not VC or ethene	Marginally suitable for enhanced bioremediation. Lack of VC or ethene under Type 1 conditions requires further evaluation (Section 4).	Suitable for enhanced bioremediation. Evaluate potential for complete anaerobic dechlorination (Section 4) and proceed with caution.	Presence of <i>cis</i> -DCE under Type 3 conditions may be a result of limited dechlorination at the source or in more anaerobic microenvironments. Requires further evaluation (Section 4).
VC and ethene present	Suitable for enhanced bioremediation. Consider MNA alternative first.	Suitable for enhanced bioremediation. Consider MNA alternative and whether system may become carbon limited in the absence of substrate addition.	VC and ethene should not be present under Type 3 conditions, although this may sometimes occur as the result of locally reducing conditions created by the NAPL mix. For example, if the material released contained biodegradable oils, it is possible that some anaerobic dechlorination will take place, even in an aerobic aquifer.