

# Guide Methodologique pour l'Utilisation des Approches Isotopiques dans le Cadre de la Démonstration d'Atténuation Naturelle

PROJET ATTENA – PHASE 2

Juin 2013

Étude réalisée pour le compte de l'ADEME par M. BLESSING et A. SAADA

**Coordination technique :** Yves Duclos – Service Friches Urbaines et Sites pollués  
(SFUSP) – Direction Villes et Territoires Durables (DVTD) – ADEME (Angers)



---

**RAPPORT FINAL**



## Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier l'ADEME (convention n°0572C0064), ArcelorMittal Real Estate France, Rhodia et Total pour le soutien financier du projet. Nos remerciements vont également aux membres du Groupe d'Utilisateurs du projet ATTENA, pour l'aide qu'ils ont apporté à l'élaboration du protocole ATTENA, ainsi qu'aux membres du comité scientifique pour leur disponibilité et leur contribution à la rédaction des modes opératoires.

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite selon le Code de la propriété intellectuelle (art. L 122-4) et constitue une contrefaçon réprimée par le Code pénal. Seules sont autorisées (art. 122-5) les copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé de copiste et non destinées à une utilisation collective, ainsi que les analyses et courtes citations justifiées par la caractère critique, pédagogique ou d'information de l'œuvre à laquelle elles sont incorporées, sous réserve, toutefois, du respect des dispositions des articles L 122-10 à L 122-12 du même Code, relatives à la reproduction par reprographie.

## Synthèse

La gestion des sols et des eaux souterraines pollués par les principaux composés organiques (COHV, BTEX, HAP) est devenue une préoccupation majeure dans l'intérêt général. L'atténuation naturelle (AN) représente une mesure de gestion des eaux souterraines *in situ*, reconnue dans le plan de gestion de la méthodologie française de gestion des sites et sols pollués, basée sur l'utilisation contrôlée des capacités naturelles de dépollution du milieu. Toutefois, l'acceptation du concept d'AN sur des sites contaminés sera favorisée par l'établissement de preuves tangibles de la dégradation microbiologique des polluants. Les approches classiques, principalement basées sur le monitoring des concentrations et sur un bilan des accepteurs/donneurs d'électrons sont parfois suffisantes pour mettre en évidence l'existence de processus d'AN. En revanche, dans les cas plus compliqués et pour une mise en évidence formelle de la dégradation du polluant, ces approches ne suffisent plus. Est-ce qu'une diminution de concentrations est due à des effets de la sorption, de la dilution, du dégazage, ou est-ce qu'il y a des processus de transformation chimique ? Seule la dégradation microbienne ou une dégradation abiotique provoquent une perte nette des polluants et donc, la réduction durable d'une pollution. Une approche isotopique novatrice, l'analyse isotopique des polluants organiques (*compound-specific isotope analysis* - CSIA) permet d'obtenir les informations nécessaires pour mettre en évidence et estimer l'efficacité des processus de dégradation *in situ*, de façon unique/explicite à cause de deux faits suivants :

- a) des polluants organiques d'origines/sources différentes peuvent différer par leur composition isotopique ;
- b) l'évolution de la signature isotopique d'un composé dans un aquifère contaminé peut servir d'indicateur de l'occurrence de processus de dégradation *in situ*, ainsi que de la nature et de la vitesse d'un processus de dégradation.

Afin d'évaluer si l'atténuation naturelle surveillée est une option viable pour gérer un site contaminé, les questions qui se posent sont multiples. Dans les cas où les réponses apportées par des moyens classiques d'investigation ne sont pas assez solides, l'analyse des rapports isotopiques de composés spécifiques peut donner des réponses complémentaires, notamment pour :

1. **Caractériser les processus de l'AN** (dilution, volatilisation, dispersion, etc. ou perte nette de polluants par transformation biotique/abiotique). La CSIA peut fournir une preuve rapide et tangible sur l'activité microbienne *in situ*.
2. **Quantifier la biodégradation *in situ***. La CSIA permet d'étudier en détail le devenir d'un polluant, les mécanismes de dégradation et fournir des réponses quantitatives.
3. **Déterminer l'origine des produits organiques**. La CSIA peut identifier les sources, peut vérifier s'il s'agit d'un produit initial ou d'un métabolite.

Ce guide pour l'utilisation des méthodes isotopiques dans le cadre de la démonstration d'atténuation naturelle s'adresse aux principaux acteurs du management des sites pollués, et tout particulièrement aux décideurs sur des opérations de remédiation des sites pollués. L'objectif de ce guide est de montrer l'intérêt des analyses isotopiques de polluants organiques (CSIA) dans des études environnementales et en particulier dans le cadre d'une démonstration d'atténuation naturelle. Dans ce but le guide veut

transmettre la base de connaissance sur l'outil isotopique CSIA et sur les performances de cette technique en vue d'une caractérisation complémentaire des sites contaminés, mais également de pointer les paramètres susceptibles de limiter sa faisabilité.

Dans cet objectif, le guide est organisé en mettant en lumière :

- L'état de l'art international de la technique, basée sur une revue bibliographique des articles scientifiques publiés.
- Les principes de mise en œuvre opérationnelle, incluant les pré-requis nécessaires à l'analyse, ainsi que les précautions à prendre en termes d'échantillonnage et d'analyse.
- Des illustrations des apports de l'analyse isotopique, issues de retours d'expérience internationaux ou de travaux originaux effectués dans le cadre du projet ATTENA.
- Des éléments de coûts et de bénéfice associés permettant d'évaluer l'intérêt de l'utilisation de la technique.



## Sommaire

<b>1. Introduction .....</b>	<b>12</b>
<b>2. Etat de l’art de technique.....</b>	<b>15</b>
2.1. METHODE ET PRINCIPE .....	15
2.2. THEORIE DU FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE (EN MICROCOSME) .....	15
2.3. APPLICATIONS (SUR SITES POLLUES) .....	17
2.3.1. Discrimination de sources .....	17
2.3.2. Etudes de dégradation .....	18
<b>3. Principes de mise en œuvre.....</b>	<b>21</b>
3.1. REX (RETOUR D’EXPERIENCE) ET LABORATOIRES IMPLIQUES .....	21
3.2. PRE-REQUIS .....	21
3.3. ECHANTILLONAGE .....	22
3.3.1. Précautions .....	22
3.3.2. Fréquence et positionnement .....	23
3.4. ANALYSES ISOTOPIQUES .....	25
3.4.1. Equipement .....	25
3.4.2. Assurance de la qualité analytique .....	26
<b>4. Illustrations .....</b>	<b>27</b>
4.1. EXEMPLES SOLVANTS CHLORES (REX INTERNATIONAUX) .....	27
4.2. EXEMPLES BTEX ET NAPHTALENE : LES SITES ATTENA - 2 ET 3BIS (ETUDES BRGM).....	28
4.2.1. Site 2 : Stratégie analytique et interprétations de résultats .....	28
4.2.2. Site 3bis : Stratégie analytique et interprétations de résultats .....	34
4.2.3. Avantages / Inconvénients rencontrés sur les sites ATTENA .....	39
<b>5. Interprétation et points clés .....</b>	<b>41</b>
5.1. CAS D’EXCLUSION / LIMITATIONS .....	41
5.2. LIMITE DE DETECTION, SENSIBILITE .....	41
5.3. TRAITEMENT DES DONNEES .....	42
<b>6. Eléments de coûts et bénéfices associés .....</b>	<b>45</b>

<b>7. Conclusion.....</b>	<b>47</b>
<b>8. Bibliographie .....</b>	<b>49</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Fractionnement isotopique pour carbone et hydrogène pendant la biodégradation anaérobie de benzène dans des cultures microbiennes diverses Mancini et al. (2008).....	17
Figure 2 : Fractionnement isotopique pour carbone et hydrogène de la dégradation de MTBE. Les symboles remplis représentent des données de site étudié par Zwank et al. (2005) et montrent que le mécanisme majeur de dégradation sur ce site et celui de la biodégradation sous conditions anaérobies (figure de Zwank et al., 2005).....	19
Figure 3 : Recommandations à titre indicatif de l’US-EPA (Hunkeler et al., 2008) pour une stratégie d’échantillonnage sur des sites contaminés afin d’évaluer la biodégradation naturelle in situ en utilisant l’approche CSIA. ....	24
Figure 4 : Courbe de la concentration et résultats isotopiques du perchloroéthylène en fonction de la profondeur de prélèvement pour mieux cibler la dégradation d’un polluant dans un aquifère profond. Les flèches grises représentent le résultat d’un prélèvement d’échantillons moyennés sur la profondeur. Blessing et al. (2008).....	25
Figure 5 : Schéma pour l’analyse isotopique des compositions isotopiques en carbone ( $\delta^{13}C$ ) par GC-C-IRMS (CSIA) d’après Elsner et al. (2012). ....	26
Figure 6 : La diminution de concentration en perchloroéthylène est accompagnée par un enrichissement isotopique en sens de l’écoulement d’eau souterraine (flèche bleue) ; Figure extraite de Blessing (2008). ....	28
Figure 7 : Mise en évidence de la biodégradation in situ de cis-1,2-dichloroéthylène et de chlorure de vinyle (VC) au long d’un panache contaminé, prouvé par changement de la composition isotopique entre la source et des piézomètres en aval (Brabant site, projet CORONA, Lerner et al. 2005, figure issue de Slenders et al., 2005). ....	28
Figure 8 : Intérêt des signatures isotopiques de composés spécifiques afin de différentier des sources/origines de contaminations montré à l’exemple des études ATTENA site 2 (ancienne cokerie) et site 3bis (fuite de pétrole). ....	29
Figure 9 : L’enrichissement isotopique ( $\delta^{13}C$ du benzène, indiqué par les flèches bleues continues) avec la distance croissante de la zone source vers les piézomètres en aval hydraulique (Pz 15 vers Pz S – Pz W et Pz 15 vers Pz N/NW – Pz 12, diminution des concentrations en benzène indiqué par les flèches rouges hachurés) donne une première indication pour l’existence d’une biodégradation de benzène dans l’aquifère du site. ....	30
Figure 10 : Corrélation entre la concentration (abscisse) et la composition isotopique (axe des ordonnées) du benzène tout au long de panache de pollution dans l’aquifère de site 2. ....	30
Figure 11 : Corrélation entre la concentration du naphtalène (abscisse, en échelle logarithmique) et sa composition isotopique (axe des ordonnées) en différents points de prélèvement entre la zone source et les piézomètres en aval hydraulique du site 2. ....	31
Figure 12 : La bonne corrélation ( $R^2=0.88$ ) entre la diminution des concentrations (abscisse) et l’enrichissement isotopique (axe des ordonnées) de benzène montre que la dégradation sur ce site suit le modèle de Rayleigh. ....	32



Figure 13 : Couplage de données $\delta^{13}\text{C}$ (abscisse) et $\delta\text{D}$ (axe des ordonnées) pour mieux identifier les mécanismes de dégradation du benzène dans l’aquifère de site 2 (à noter que les échelles des deux axes ne sont pas les mêmes).....	33
Figure 14 : Taux de benzène biodégradée in situ, calculés sur la base des valeurs $\delta^{13}\text{C}$ (axe des ordonnées primaire, en cercles noirs) et $\delta\text{D}$ (axe des ordonnées secondaire, en triangles rouges) pour les deux axes hydrauliques (cf. figure 9) du site 2.....	34
Figure 15 : Agrandissement/extension du réseau de piézomètres au fur et à mesure de l’avancement de l’étude (04-2009 : bleu, 03-2011 : rouge, 01-2012 : vert).....	35
Figure 16 : Valeurs isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ versus concentrations des piézomètres en amont (Pz 1, 5 et 8) et en aval (Pz 2 et 7) de la source de pollution présumée ; résultats de la campagne de prélèvements effectuée en novembre 2009.....	36
Figure 17 : Les résultats isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ par rapport à des concentrations de la campagne de prélèvement effectuée en mars 2011 ont mis en évidence I) la biodégradation du toluène (triangles), II) le comportement récalcitrant du benzène (carreaux) dans la zone de l’aquifère étudiée et III) ont fourni des indications pour plusieurs sources de benzène sur ce site 3bis.....	37
Figure 18 : Variations temporelles des signatures isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ et des concentrations du piézomètre Pz 2 (proche source) sur le site. Le toluène (rectangles) a subi des processus de biodégradation en 2009, contrairement au benzène (carreaux) qui se comporte recalcitrant dans cette zone de l’aquifère.....	38
Figure 19 : Variations spatiales des valeurs $\delta^{13}\text{C}$ et des concentrations du benzène dans l’aquifère du site 3bis. Les analyses ont mis en évidence trois sources de benzène sur ce site (Pz 9 zone « distributeurs », et Pz 2 et P4 dans la zone « cuves »). Les piézomètres en aval montrent des processus de biodégradation et de la dilution en ampleurs variés.....	39
Figure 20 : Variations spatiales des signatures isotopiques et des concentrations du toluène dans l’aquifère du site 3bis. La source de la pollution de toluène est localisée autour de Pz 2 (avec des variations temporelles de la concentration). Les piézomètres en aval montrent des processus de biodégradation et de la dilution en ampleurs variés.....	39
Figure 21 : Limite de détection (en $\mu\text{g/L}$ dans l’eau) des techniques d’injection diverses afin d’analyser les $\delta^{13}\text{C}$ des certains composés organiques volatils par GC-C-IRMS ; valeurs modifiées d’après Zwank et al. (2003).....	42

## Liste des annexes

Annexe 1 Liste des abbreviations .....	55
Annexe 2 Facteurs d’enrichissement ( $\epsilon$ ) .....	59

## PREAMBULE

Le projet de recherche ATTENA a été coordonné par le BRGM, avec un partenariat public (ADEME, l’INERIS) et privé (l’APESA, ArcelorMittal Real Estate France, BURGEAP, Rhodia et TOTAL). Le rôle de chacun des partenaires du projet est présenté dans le tableau ci-dessous.

Organisme	Rôle dans le projet ATTENA
ADEME	Suivi scientifique du projet
BRGM	Coordination du projet ; Responsable du protocole ATTENA, de l’application du protocole ATTENA sur les sites 2 (HAP) et 3 (hydrocarbures pétroliers), des modes opératoires consacrés aux outils géophysique et isotopique, participation aux modes opératoires analyse de gaz et capteurs passifs
APESA	Responsable de la communication du projet et coordination des travaux du groupe utilisateur
ArcelorMittal Real Estate France	Mise à disposition du site 2. Participation à l’élaboration du protocole et à son application sur le site 2.
BURGEAP	Mise à disposition du site 1. Participation à l’élaboration du protocole ATTENA. Responsable de l’application des guides Macaoh sur le site 1 (solvants chlorés)
INERIS	Participation à l’élaboration du protocole ATTENA ; responsable de l’application du protocole ATTENA sur le site 1 (solvants chlorés) ; responsable des modes opératoires analyse de gaz et capteurs passifs
RHODIA	Participation à l’élaboration du protocole ATTENA
TOTAL	Mise à disposition du site 3. Participation à l’élaboration du protocole et à son application sur le site 3.

### *Rôle de chacun des partenaires du projet ATTENA*

L’objectif du projet ATTENA est triple :

- En premier lieu, il s’est agit de développer un protocole opérationnel d’utilisation de l’atténuation naturelle permettant une gestion proportionnée et raisonnée des sites pollués par certains polluants organiques (solvants chlorés, hydrocarbures pétroliers, HAP) dans le contexte réglementaire et méthodologique français actuel. Ce protocole a été élaboré à travers le travail d’un groupe d’utilisateur, constitué de représentants des différentes parties prenantes de la thématique des sites et sols pollués : industriels, administration, bureaux d’étude, sociétés de travaux, organismes de recherche. Le détail des membres du groupe d’utilisateurs est donné dans le Tableau suivant.

Organisme	Représentant
MEDDE/DGPR/BSSS	Dominique Gilbert
DREAL	Jérémie Heinz (DREAL Alsace), Erika Peixoto (DREAL Lorraine)
BRGM	Céline Blanc, Stéfan Colombano, Alain Saada, Laurent Rouvreau, Elicia Verardo, Clément Zornig
ADEME	Yves Duclos, Nadine Dueso
TOTAL	Yannick Bret, Sébastien Dehez, Agathe Reubrez
ArcelorMittal Real Estate France	Patrick Charbonnier
Rhodia Services	Thierry Delloye
INERIS	Fabrice Quiot, Claire Rollin
APESA	Jean-Louis Crabos, Jean-François Lascourreges
BURGEAP	Sébastien Kaskassian, Jean-Marie Côme
UIC	David Cazaux (Solvay)
UIMM	Christian Cornet (CETIM)
EPF Yvelines	Thomas Lacaze
UPDS	Franck Karg (HPC Envirotec), Joachim Maier (ICF), Sophie Michel,

	Thierry Gisbert (ARCADIS), Alain Dumestre (SERPOL)
UCIE	Thierry Blondel

*Constitution du Groupe Utilisateur du projet ATTENA*

- Dans un second temps, il s'est agi de confronter ce protocole sur 3 sites, mis à disposition par les partenaires du projet, afin de tester ses possibilités d'application sur des cas réels et d'apporter des améliorations pratiques pour l'utilisation de l'atténuation naturelle dans la gestion des sites.
- Enfin, le projet ATTENA a visé à développer et/ou tester des outils de caractérisation dans l'objectif de faciliter la mise en évidence de l'efficacité de l'AN sur un site. Ces outils (géophysique, isotopie, analyse de gaz, capteurs passifs) étaient destinés à améliorer la caractérisation des zones sources et panache, où à faciliter l'identification des mécanismes contribuant à l'atténuation naturelle, en particulier des processus de biodégradation. Des modes opératoires de l'utilisation de ces outils ont été rédigés au cours du projet dans l'objectif de permettre aux professionnels une appropriation facilitée. Ces modes opératoires ont été examinés et validés au cours du projet par un comité scientifique constitué de spécialistes issus du monde Académique présentés ci-dessous

Membres du Comité Scientifique du projet ATTENA	Organisme
Peter Werner	Université de Dresde (D). Coordinateur du programme national allemand KORA. <a href="http://www.natural-attenuation.de/">http://www.natural-attenuation.de/</a>
Gerhardt Schäfer	Université Louis Pasteur – Strasbourg
Patrick Höhener	Université de Provence

*Comité Scientifique du projet ATTENA*

Les différents livrables du projet (protocole, cas d'étude, modes opératoires) sont publiés en ligne sur le site du projet ATTENA <http://attena.org/> et sur le site de l'ADEME.

# 1. Introduction

La méthodologie française de gestion des sites et sols pollués reconnaît l'atténuation naturelle (AN) comme une mesure de gestion qui peut être appliquée pour la gestion d'un site pollué, sous réserve que l'on puisse démontrer que cela est la meilleure solution de gestion, sur la base de critères techniques et économiques. L'AN consiste à surveiller la dépollution des eaux souterraines par des processus naturels (dispersion, dilution, adsorption, biodégradation,...). Elle s'applique plus favorablement aux polluants organiques susceptibles d'être dégradés, en particulier les BTEX les HAP et les solvants chlorés.

Le projet ATTENA, coordonné par le BRGM, est le fruit d'une recherche en partenariat public/privé entre l'ADEME, le BRGM, l'INERIS, l'APESA, BURGEAP, ArcelorMittal Real Estate France, Total et Rhodia.

L'objectif de ce projet est triple :

- En premier lieu, il s'agit de développer un protocole opérationnel permettant l'utilisation de l'atténuation naturelle dans le contexte réglementaire français. Ce protocole a été élaboré par les partenaires du projet, et validé à travers le travail d'un groupe d'utilisateurs, dans lequel les différentes parties prenantes de la thématique sont représentés (administration, bureaux d'étude, sociétés de travaux, industriels).
- Le second objectif consiste en une opération de démonstration, basée sur ce protocole, sur 3 sites contaminés par des polluants organiques (solvants chlorés ; hydrocarbures pétroliers ; HAP) mis à disposition par les partenaires du projet.
- Le troisième objectif du projet ATTENA porte sur le développement et la validation d'outils *in situ* de caractérisation et de surveillance des sites visant à améliorer la compréhension du fonctionnement du site, conformément aux prescriptions de la nouvelle méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués, élaborée en 2007 par le MEDDE. Les outils de caractérisation testés dans le cadre du projet ATTENA sont de 4 types : géophysique, géochimiques, analyse de gaz, isotopie. Chaque type d'outil donne lieu à la rédaction d'un guide méthodologique présentant les apports et limitations de la technique testée, validé par le comité scientifique du projet. Le présent guide porte sur l'utilisation des outils isotopiques dans le cadre de la démonstration d'AN.

Un critère important pour l'acceptabilité de l'atténuation naturelle concerne la dégradation : une dégradation microbiologique (i.e. biodégradation) et/ou une transformation chimique (i.e. dégradation abiotique) sont les seuls procédés qui provoquent une perte nette de polluants et une réduction durable de la pollution. Une preuve solide de l'existence des processus de dégradation est souvent difficile à obtenir. En général, la simple caractérisation ou le suivi des concentrations des polluants dans les eaux souterraines et sols contaminés ne constitue pas un indicateur évident d'une dégradation naturelle. L'analyse de la composition isotopique de chaque composé organique individuel (*compound-specific isotope analysis* – CSIA) propose un moyen novateur afin de savoir si une baisse de concentration est causée par un simple processus de dilution (une dispersion, un dégazage, des effets de sorption) ou si il

s'agit d'une perte nette des polluants par la dégradation (microbienne ou transformation abiotique).

Pour l'acceptation publique de ce concept et afin d'appliquer le concept de l'atténuation naturelle surveillée, en particulier dans des situations de contamination complexe, la CSIA offre un outil complémentaire aux méthodes conventionnelles que sont l'identification et la quantification des polluants et ses métabolites, le bilan des accepteurs/donneurs d'électrons, les modélisations hydrogéologiques, ou des méthodes biologiques afin d'avoir une affirmation rapide et tangible sur des processus de dégradation *in-situ* et/ou sur l'origine d'une pollution.

L'utilisation de l'approche isotopique dans des études environnementales pour la caractérisation des polluants organiques spécifiques (CSIA) était menée et valorisée par la communauté scientifique internationale. Les études CSIA sont économiquement intéressantes dans l'objectif de mieux comprendre le fonctionnement d'un site en particulier afin de :

- ✓ **Caractériser les processus de l'AN** (dilution par évaporation, dispersion, etc. ou perte nette de polluants par transformation biotique/abiotique). La CSIA peut fournir une preuve rapide et tangible sur l'activité microbienne *in situ*.
- ✓ **Quantifier la biodégradation *in situ***. La CSIA permet d'étudier en détail le devenir d'un polluant, les mécanismes de dégradation et fournir des réponses quantitatives.
- ✓ **Déterminer l'origine des produits organiques**. La CSIA peut identifier les sources, peut vérifier s'il s'agit d'un produit initial ou d'un métabolite.



## 2. Etat de l'art de technique

### 2.1. METHODE ET PRINCIPE

Pour chaque molécule organique on retrouve les isotopes stables dans une certaine proportion fixée (p.ex.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , D/H,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ). Or, la composition isotopique d'un élément dans une molécule peut se modifier pendant le passage de ce composé d'un état physique ou d'une composition chimique à un autre. Ce phénomène est appelé fractionnement isotopique. L'utilisation du fractionnement isotopique dans l'étude de l'atténuation naturelle de composés organiques est basée sur le fait que, si l'on considère l'ensemble des processus capables d'engendrer une diminution de concentration des espèces chimiques, certains processus n'affectent pas les ratios entre isotopes stable. C'est le cas pour les processus de dilution ou de transport, de changement de phase (dégazage), ou des effets de sorption/désorption qui ne fractionnent pas ou seulement dans l'ordre de l'écart-type analytique. Par contre, les processus destructifs tels que la dégradation biologique ou les transformations chimiques (abiotiques), sont accompagnées par un fractionnement isotopique significatif.

Au cours des 20 dernières années, les applications des méthodes en isotopes stables ont connu un développement considérable dans le domaine de la chimie environnementale. Les outils analytiques modernes de la spectrométrie de masse à rapport isotopique couplés à la chromatographie en phase gazeuse par des interfaces de combustion (GC-C/TC-IRMS) ont rendu possible la mesure précise des faibles variations des abondances en isotopes stables des éléments pour des composés spécifiques (*compound-specific isotope analysis* - CSIA). Le rapport isotopique d'un composé est exprimé par la notation delta (en ‰, par rapport à une référence internationale), ci-dessous montré à l'exemple du carbone :

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{composé}} = \left[ \left( \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{composé}}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{référence}}} - 1 \right) \right] * 1000 \quad \text{Équation 1}$$

La méthode CSIA est devenue un outil d'investigation convenable pour la détermination de l'origine et/ou de la discrimination entre les différentes sources de pollution, de même que pour la surveillance et la recherche des mécanismes de dégradation des polluants, ou encore le suivi des migrations/transferts (Slater, 2003; Meckenstock et al., 2004; Schmidt et al., 2004; Elsner et al., 2005; Hofstetter et al., 2008; Elsner, 2010).

### 2.2. THEORIE DU FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE (EN MICROCOSME)

Le fractionnement isotopique cinétique est dû à la différence d'énergie entre les molécules impliquant des isotopes différents. Toutes réactions (bio)chimiques qui détruisent la molécule dans son ensemble mettent en jeu ce type de fractionnement : les isotopes les plus légers sont plus facilement mobilisés et donc les liaisons entre atomes légers seront plus rapidement dissociées. Cet enrichissement en isotopes lourds dans la fraction de composé de départ (au cours d'une réaction de dégradation) peut être exprimé à l'aide de l'équation de Rayleigh :

$$R_t / R_0 = (c_t / c_0)^{(\alpha - 1)} \quad \text{Équation 2}$$

$R_t$  désigne la composition isotopique (p.ex.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) du substrat restant,  $R_0$  désigne le rapport isotopique initial,  $c_t/c_0$  désigne le ratio entre la concentration de substrat au début ( $c_0$ ) et à la fin ( $c_t$ ), et  $\alpha$  représente le facteur de fractionnement isotopique. Cette évaluation des rapports isotopiques (enrichissement) d'un composé au cours de la (bio)dégradation peut être déterminée en microcosmes laboratoires dans des conditions contrôlées. Les facteurs de fractionnement isotopique ( $\alpha$ ), également exprimés comme facteurs d'enrichissement ( $\epsilon$ , qui dépend de  $\alpha$  selon l'équation 3) dépendent directement du mécanisme de réaction. Le fractionnement isotopique peut donc être utilisé pour identifier un processus de dégradation.

$$\epsilon = (\alpha - 1) * 1000 \quad \text{Équation 3}$$

Un des exemples classiques est l'étude des composés chlorés aliphatiques, notamment du perchloroéthylène (PCE) et du trichloroéthylène (TCE), et le suivi de leur biodégradation à l'aide des isotopes stables du carbone (Hunkeler et al., 1999), qui montre une différence significative entre le  $\delta^{13}\text{C}$  du produit initial, le  $\delta^{13}\text{C}$  du produit restant et celui de ses produits de dégradation au cours d'une déhalogénéation réductrice.

Un autre exemple est la dégradation des composés aromatiques, par exemple du toluène en conditions anaérobique, qui induit un fractionnement isotopique significatif dans lequel la fraction du toluène résiduaire s'enrichit en isotopes de  $^{13}\text{C}$  (Meckenstock et al., 1999). A titre d'exemple, la *Figure 1* montre l'enrichissement du  $\delta^{13}\text{C}$  et du  $\delta\text{D}$  lors de la biodégradation de benzène en conditions anaérobies.

De la même façon, les études laboratoires (microcosme/batch) pour étudier l'influence de la dégradation (biotique et abiotique) sur les compositions isotopiques ont montré que ce fractionnement isotopique est suffisamment discriminant pour caractériser une dégradation des hydrocarbures aromatique (BTEX), des solvants chlorés (PCE, DCA, VC etc.), des éthers-oxydes (MTBE, TBA), des *n*-alcanes légers à chaîne courte, des naphthalènes, quelques composés organochlorés et certains hydrocarbures azotés. Un aperçu sur des valeurs  $\epsilon$  pour les composés principaux de l'étude ATTENA avec des données de la littérature se trouve dans l'annexe 2 de ce rapport.

Plus de détails concernant l'utilisation des méthodes isotopiques pour étudier le devenir des polluants organiques (en microcosme et/ou sur le terrain) et des facteurs de fractionnement isotopique compilés existent dans des revues scientifiques actuelles, p.ex. Meckenstock et al. (2004), Schmidt et al. (2004), Hofstetter et al. (2008) ou dans l'ouvrage sur l'application des outils isotopiques dans des études environnementales de Aelion et al. (2010).



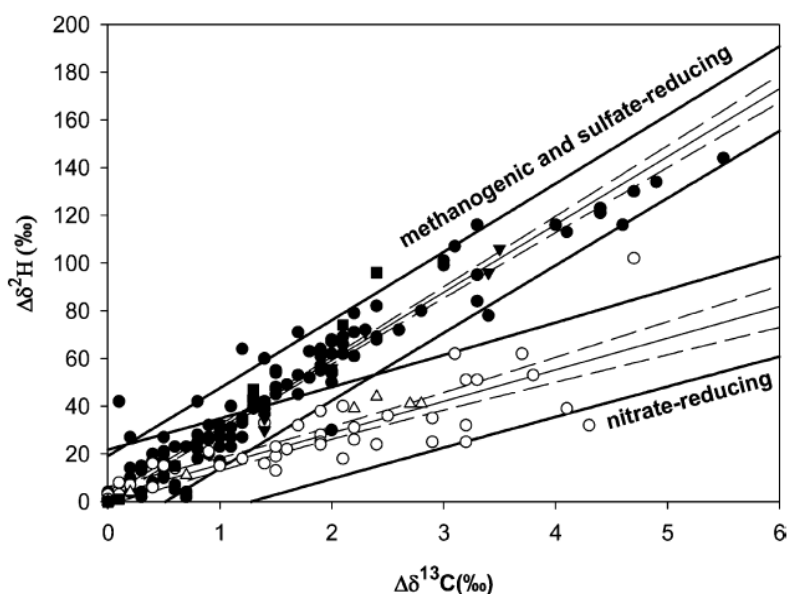


Figure 1 : Fractionnement isotopique pour carbone et hydrogène pendant la biodégradation anaérobie de benzène dans des cultures microbiennes diverses Mancini et al. (2008).

## 2.3. APPLICATIONS (SUR SITES POLLUES)

### 2.3.1. Discrimination de sources

Les rapports isotopiques des composés organiques dépendent de leurs précurseurs chimiques et/ou de la méthode de synthèse utilisée pendant leur production. Sous conditions que i) les valeurs des rapports isotopiques initiaux ne sont pas modifiées par un fractionnement isotopique (du par exemple à de la dégradation) et ii) que les produits constituant la source sont homogènes, les polluants de différentes origines/manufactures peuvent donc être discriminés directement par leur signature isotopique. Néanmoins, un fractionnement isotopique peut être utile afin de déterminer l'origine d'un polluant : chaque produit issu d'une dégradation est appauvri en isotopes lourds par rapport à son précurseur, la signature isotopique d'un produit issu d'une dégradation (un métabolite) est donc plus négative que celle de la molécule mère. Par exemple: si le  $\delta^{13}\text{C}$  de chlorure de vinyle (VC) est très léger (-45 à -50‰), il est plutôt issu de la dégradation d'isomères du dichloroéthylène que directement issu d'une synthèse industrielle, où le  $\delta^{13}\text{C}$  est proche de -28‰ (Hunkeler et al., 2002).

Dempster et al. (1997) ont montré que les BTEX de différentes origines pouvaient être discriminés sur la base de leurs signatures isotopiques spécifiques ( $\delta^{13}\text{C}$ ). L'application des signatures isotopiques ( $\delta^{13}\text{C}$ ) comme outil pour discriminer des sources était proposé pour des solvants chlorés (COHV) des différentes manufactures/sources (Beneteau et al., 1999; Hunkeler et al., 2004; Blessing et al., 2009), pour les *n*-alcane de différentes origines (Rogers & Savard, 1999), et pour des composés présents dans des essences des différents groupes pétroliers (Smallwood et al., 2002). Démonstré par Smallwood et al. (2002) pour le MTBE ou par Blessing et al. (2009) pour le PCE, la composition isotopique en carbone de certaines molécules peut être utilisée en correspondance avec des informations d'autres méthodes afin d'assigner les polluants à leur source originale. L'utilisation des isotopes du carbone semble également être un

outil précieux pour l'identification des sources de pollution pour les HAP de 2 à 5 cycles aromatiques où la dégradation microbienne n'engendre pas de fractionnements isotopiques significatifs (O'Malley et al., 1994; Hammer et al., 1998). Un exemple d'application était présenté par Mazeas & Budzinski (2002), lors du naufrage d'un navire pétrolier, où l'analyse isotopique des HAP sur les résidus d'huile collectés sur les côtes françaises Atlantique a permis de confirmer la contamination par les produits pétroliers issu de ce navire. Le même principe peut s'adapter pour les PCB où les analyses  $\delta^{13}\text{C}$  des composés spécifiques peuvent être un outil complémentaire pour le traçage de ces molécules dans l'environnement (Yanik et al., 2003).

Le vaste domaine d'investigation CSIA d'abord ouvert par l'analyse des isotopes du carbone s'élargit de plus en plus avec l'accès analytique maintenant possible (depuis 1998) aux isotopes de l'hydrogène (deutérium – D). Par exemple, Smallwood et al. (2001) ont montré que les différents groupes pétroliers pouvaient être discriminés de manière non-ambiguë sur la base des compositions  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta\text{D}$  des composés spécifiques (comme les BTEX, les *n*-alcanes, le MTBE). De même façon, Sun et al. (2003) ont reporté que les analyses  $\delta\text{D}$  des composés spécifiques peuvent être un outil complémentaire pour le traçage des HAP dans l'environnement.

### 2.3.2. Etudes de dégradation

L'analyse de la composition isotopique de chaque composé organique individuel (*compound-specific isotope analysis* – CSIA) propose un moyen complémentaire afin d'étudier le devenir des polluants dans les milieux. Les possibilités d'application de cette approche isotopique dans les études environnementales sont diversifiées : La CSIA peut fournir une affirmation tangible sur l'occurrence d'un mécanisme de biodégradation *in situ* et de différencier les processus de transport de ceux de transformation/biodégradation. De plus, l'approche isotopique permet d'étudier la voie de dégradation détaillée (cinétique de dégradation) et ainsi de quantifier la biodégradation observée sur un site contaminé. La méthode CSIA peut également être utilisée pour surveiller l'efficacité des mesures d'assainissement dans le cadre d'une dépollution dynamisée, ou de différencier un produit initial d'un métabolite de dégradation. Les études d'atténuation naturelle des hydrocarbures aromatiques volatils (comme les BTEX, le MTBE) et des solvants chlorés (PCE, TCE, etc.) sont parmi des plus référencées en raison des potentialités offertes par cette technique d'analyse (par exemple Hunkeler et al., 1999; Sherwood Lollar et al., 2001; Griebler et al., 2004; Kuder et al., 2005; Morrill et al., 2005; Vieth et al., 2005; Zwank et al., 2005).

L'évaluation *in situ* d'une biodégradation est par exemple montrée dans le cas d'une étude menée par Zwank et al. (2005). Cette étude a utilisé l'approche isotopique pour évaluer le devenir du méthyl tert-butyl éther (MTBE), et de son produit majeur de dégradation, le tert-butyl alcohol (TBA), sur un site industriel. Leur étude décrit un panache avec un point central d'une forte concentration en MTBE (la source présumée), d'où se répand en sens radial la contamination. Le fait que plusieurs piézomètres dans la zone « source » en concentration forte montrent une signature isotopique presque identique, indiquent que la contamination en MTBE dans cette zone vient d'une source commune et que la biodégradation n'est pas significative dans cette zone. Des valeurs isotopiques constantes de TBA proposent l'absence de processus de dégradation pour cette molécule. Par contre, les concentrations en MTBE diminuent en dehors de cette zone et les valeurs isotopiques représentent des valeurs plus enrichies (de -26.4‰ jusqu'à +40‰ en  $\delta^{13}\text{C}$  et de -73.1‰ jusqu'à +60.3‰

en  $\delta^2\text{H}$ ). Cet enrichissement isotopique significatif avec la distance croissante de la zone source, tout au long du panache, donne une première indication d'existence d'une biodégradation *in situ* dans cet aquifère. De plus, l'approche analytique combinée de  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta\text{D}$  (voir Figure 2) a permis de conclure sur la nature (anaérobie) et les mécanismes de dégradation (i.e. le type de réactions) sur ce site (Zwank et al., 2005).

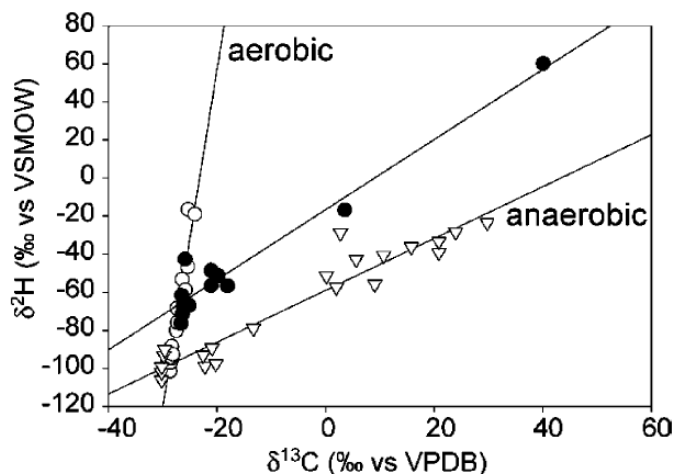


Figure 2 : Fractionnement isotopique pour carbone et hydrogène de la dégradation de MTBE. Les symboles remplis représentent des données de site étudié par Zwank et al. (2005) et montrent que le mécanisme majeur de dégradation sur ce site est celui de la biodégradation sous conditions anaérobies (figure de Zwank et al., 2005).

Les analyses isotopiques en carbone des composés organiques chlorés (particulièrement 1,2-DCA et TCE) ont également servi pour contrôler l'efficacité d'un biotraitement dans des aquifères (Song et al., 2002; Chartrand et al., 2005; Hirschorn et al., 2007) et en aval d'une barrière perméable réactive (VanStone et al., 2005). Les études qui s'intéressent à l'influence de la biodégradation sur les compositions isotopiques des composés aromatiques (BTEX) ont montré des variations de  $\delta\text{D}$  plus significatives par rapport au  $\delta^{13}\text{C}$  (Ward et al., 2000; Hunkeler et al., 2001; Mancini et al., 2002 et 2003) Sur la base de son étude, Ward et al. (2000) suggèrent d'utiliser les  $\delta\text{D}$  comme indices plus probants de l'implication de la biodégradation des BTEX, tandis que les  $\delta^{13}\text{C}$  pourraient servir comme traceurs de sources de contamination en BTEX ou traceurs du transport de ces derniers dans les aquifères contaminés (Dempster et al., 1997). Des analyses isotopiques du carbone associées à celles de l'hydrogène fournissent des indicateurs plus précis permettant l'évaluation de biodégradation de certains polluants (Hunkeler et al., 2001; Mancini et al., 2002 et 2008, voir figures 1 et 2). La même observation était faite récemment pour la dégradation de naphtalène dans des microcosmes laboratoires sous conditions anaérobies : le fractionnement isotopique pour l'hydrogène était beaucoup plus prononcé par rapport aux faibles facteurs d'enrichissement observés pour le carbone (Bergmann et al., 2011).



## 3. Principes de mise en œuvre

### 3.1. REX (RETOUR D'EXPERIENCE) ET LABORATOIRES IMPLIQUES

L'intérêt des méthodes isotopiques pour caractériser et/ou surveiller l'atténuation naturelle sur des sites industriels contaminés est, en général, plutôt résumé dans des ouvrages/publications scientifiques (voir chapitre 2) ; très souvent des laboratoires impliqués se trouvent dans le milieu scientifique (p.ex. BRGM en France, et/ou laboratoires universitaires). Néanmoins, il existe quelques laboratoires commerciaux (souvent localisé en Allemagne ou aux Pays Bas) qui, en partenariat avec des chercheurs impliqués, proposent des analyses CSIA et éventuellement l'interprétation de données. Les laboratoires commerciaux concernés sont des laboratoires historiquement dans différents projets européens menés pour étudier l'atténuation naturelle : CORONA (Lerner et al., 2005), NICOLE (Slenders et al., 2005), KORA (Wabbels et al., 2008), ou SNOWMAN – ENACT (Volkering et al., 2009).

Les modes opératoires et/ou retours d'expérience de divers projets proposent d'inclure les analyses isotopiques (et notamment l'outil « CSIA ») comme outil supplémentaire en « 2nd-line-of-evidence » pour une preuve solide de dégradation (en cas d'absence de preuve solide offert par des analyses chimiques et microbiennes classiques) et pour distinguer l'origine de polluants ou de métabolites (différencier un produit initial d'un métabolite de dégradation). Les exemples d'application sur site se trouvent actuellement surtout pour les aquifères pollués par :

- des « éthylènes chlorés » (plutôt PCE, TCE, cis-1,2-DCE et VC) ;
- des composés mono-aromatiques type « BTEX » (surtout benzène et toluène) ;
- du naphthalène et
- du méthyl tert-butyl éther (MTBE).

Les exemples de mise en évidence et d'estimation de processus de biodégradation par des approches isotopiques sur différents sites contaminés sont nombreux, et la liste suivante est loin d'être exhaustive : des exemples d'application sont à voir dans l'ouvrage de Aelion et al. (2011), dans les rapports finaux de CORONA (Lerner et al., 2005) ou KORA (Wabbels et al., 2008), pour des sites divers au Canada (Hunkeler et al., 2004), pour le Dover Air Field Base dans les EU (Sherwood Lollar et al., 2001; Atteia et al., 2008), le Vejen plume en Danemark (Richnow et al., 2003), et des sites divers en Allemagne (Vieth et al., 2003; Griebler et al., 2004; Fischer et al., 2007; Blessing et al., 2009; Pooley et al., 2009).

### 3.2. PRE-REQUIS

Avant de mettre en œuvre les analyses isotopiques sur un site, il est nécessaire de collecter un certain nombre d'informations nécessaires pour l'interprétation des données isotopiques. Ces informations nécessaires vont dépendre de l'objectif fixé (recherche de source, évaluation qualitative de la dégradation, identification des mécanismes, ...) et de la complexité du site. Dans tous les cas, un réseau de piézomètres disposés judicieusement tout au long de panache contaminé sera

nécessaire à la collecte d'échantillons d'eaux présentant toute une gamme de concentration en polluants.

De plus, en règle générale, il est recommandé de connaître :

- le contexte général du site pollué,
- les concentrations et type de contamination/polluants,
- en cas de plusieurs pollueurs/sources potentielles, une identification et caractérisation du site et de son environnement est requis.

De plus, les GC-IRMS détectent le CO<sub>2</sub> (ou le H<sub>2</sub>, resp.) de chaque composé introduit après l'oxydation (ou réduction en cas de l'hydrogène). Il n'est par conséquent pas possible de vérifier à quelle molécule correspond un pic sauf par comparaison des temps de rétention avec de composés de référence. Les échantillons doivent donc tout d'abord être analysés par GC/MS pour vérifier une absence des pics éventuels qui peuvent co-éluer avec le pic d'intérêt.

Si l'objectif de l'étude est la quantification de la dégradation, il sera de plus nécessaire de connaître ou d'estimer le facteur d'enrichissement  $\epsilon$  approprié pour le site, ce qui peut conduire à le mesurer au laboratoire (étude en microcosmes), reproduisant les conditions géochimiques du site, et couplée à une modélisation hydrogéochimique réactive, etc.

Enfin, le polluant visé doit subir un fractionnement mesurable, ce qui est seulement le cas pour les polluants à masses relativement faibles (BTEX, naphtalène). Un effet dilution intrinsèque peut masquer le fractionnement isotopique <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C détectable, comme démontré dans l'étude de Bouchard et al. (2008) pour les n-alcanes ayant >10 atomes de carbone.

### 3.3. ECHANTILLONAGE

#### 3.3.1. Précautions

Pour préserver l'information originelle sur les propriétés qualitatives et quantitatives des composés organiques dans l'eau et donc pour éviter une modification non désirée de la composition isotopique due au dégazage, ou aux réactions photolytiques ou microbiennes, les mêmes précautions que pour un échantillonnage destiné à l'analyse des concentrations sont nécessaires. Les recommandations générales sont :

- utilisation d'un flaconnage en verre ambré avec bouchon à visser et septum flexible et inerte (silicone ou caoutchouc recouvert du PTFE) ;
- remplissage sans espace de tête ;
- stockage au froid (< 4°C).

La mode de conservation s'adapte en fonction de la classe de substances à analyser. L'acidification est souvent utilisée pour la conservation des composés organiques aromatiques volatils dans l'eau (habituellement pH = 2). Dû à l'hydrolyse en milieu acide, le MTBE fait exception à cette règle ; la conservation des échantillons dans ce cas est recommandée par NaOH (pH > 10). Pour conserver les COHV dans l'eau il suffit, en général, de respecter une température maximale de stockage de 4°C. De

toute façon, il est important que le travail analytique soit réalisé immédiatement ou le plus tôt possible après l'échantillonnage, et donc, le planning de prélèvements doit être établi en consultation avec le laboratoire qui exécute les analyses isotopiques. Le laboratoire doit également choisir le type et la taille des flacons adéquats en fonction des concentrations des composés. En règle générale, les flacons sont fournis par le laboratoire analytique en charge de l'analyse isotopique car leur type et leur contenance dépendent non seulement des composés organiques à analyser mais aussi de la méthode d'extraction utilisée préalablement à l'analyse. En principe, on réservera une bouteille d'échantillonnage par groupe de substances (BTEX, HAP, additifs, COHV, ...) et par élément (C, H, N, ...) à analyser.

En fonction des profondeurs de l'aquifère il est recommandé de choisir un système de prélèvements qui permet l'échantillonnage sur plusieurs niveaux (afin d'éviter de perdre des informations restreintes à des zones spécifiques de l'aquifère (Blessing et al., 2008)). Les paramètres chimiques additionnels à analyser sont les concentrations de composés organiques d'intérêt, les molécules associées en mélange avec un ou plusieurs de ceux composés et les paramètres inorganiques indicateur des réactions d'oxydoréduction dans l'aquifère (bilan des accepteurs et donneurs d'électrons).

### 3.3.2. Fréquence et positionnement

La fréquence d'échantillonnage est en fonction du contexte du site et du type d'étude. En général, pour des pollutions de type COV (éthylènes chlorés comme PCE, TCE et hydrocarbures aromatiques comme le benzène, le toluène) on peut recommander une campagne tous les six mois et au moins, deux ans de suite pour pouvoir suivre un fractionnement isotopique à cause d'une biodégradation naturelle. Pour contrôler l'efficacité d'une biodégradation renforcée ou un traitement abiotique (mesures de dépollution *in situ*) les campagnes d'échantillonnage doivent se renouveler plus souvent. Par contre, pour un diagnostic préliminaire une seule campagne analytique peut déjà livrer des informations précieuses et des premières indications sur une activité de biodégradation *in situ* et/ou sur la présence de sources éventuelles.

Il faut choisir l'endroit et un nombre des piézomètres adéquats pour pouvoir répondre aux questions posées. Le guide de l'US-EPA pour l'application des études CSIA à des sites contaminés propose des recommandations à titre indicatif (voir Figure 3, Hunkeler et al., 2008).

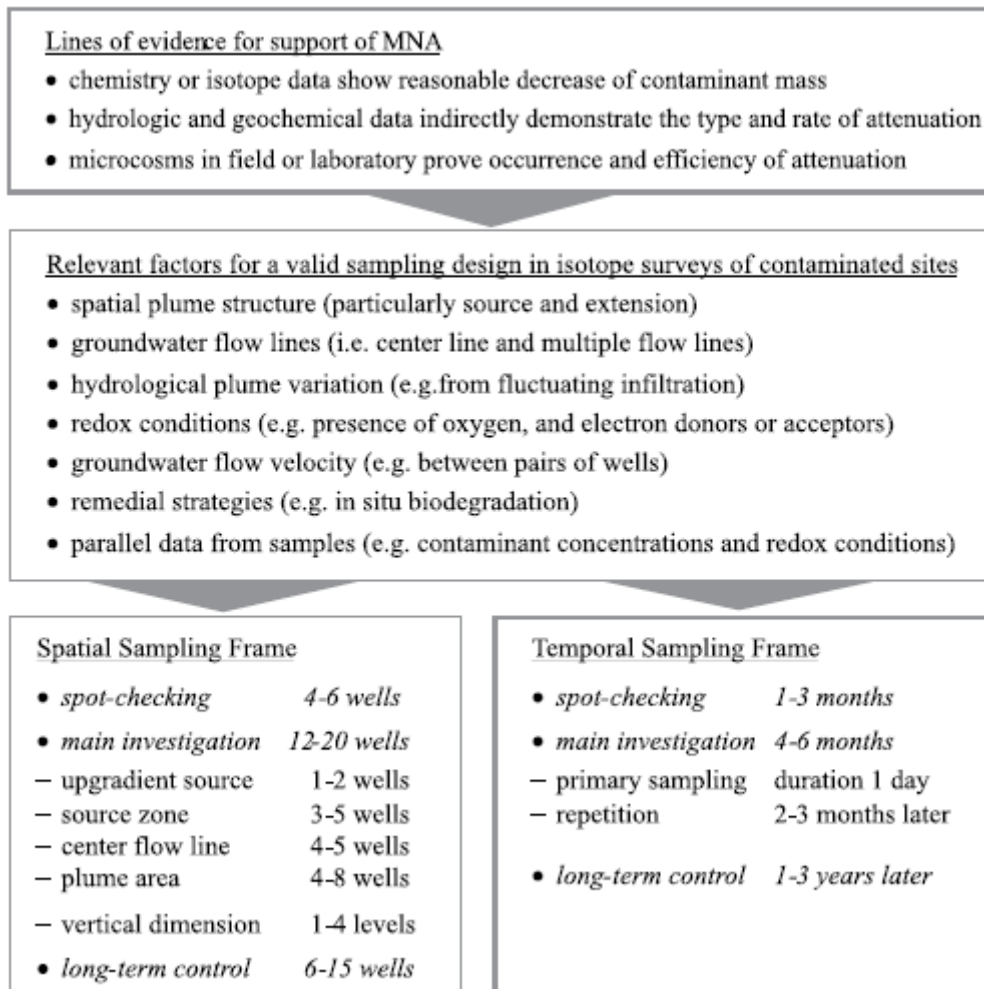


Figure 3 : *Recommandations à titre indicatif de l’US-EPA (Hunkeler et al., 2008) pour une stratégie d’échantillonnage sur des sites contaminés afin d’évaluer la biodégradation naturelle in situ en utilisant l’approche CSIA.*

La stratégie d’échantillonnage est à adapter aux conditions spécifiques du site (en fonction de la complexité d’aquifère, de la contamination, des questions posées, etc.). En tous cas, il est recommandé d’avoir un ou deux piézomètres en amont de la source ; les autres puits d’observation doivent se trouver en aval hydraulique de la source. Certains doivent être situés près de celle-ci afin de caractériser la contamination tandis que d’autres, plus loin en aval, servent à déterminer l’étendue de la contamination. Le nombre de points d’observation requis, ainsi que leur emplacement exact, se précisera souvent à mesure que la campagne d’échantillonnage progressera. Dans des aquifères profonds l’installation des piézomètres à niveaux multiple peut être avantageuse (voir *Figure 4*).



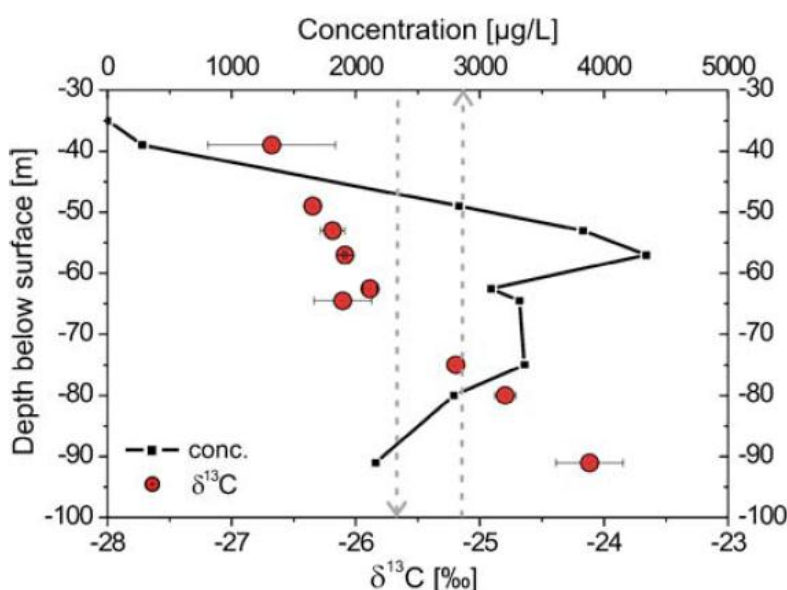


Figure 4 : Courbe de la concentration et résultats isotopiques du perchloroéthylène en fonction de la profondeur de prélèvement pour mieux cibler la dégradation d'un polluant dans un aquifère profond. Les flèches grises représentent le résultat d'un prélèvement d'échantillons moyennés sur la profondeur. Blessing et al. (2008)

### 3.4. ANALYSES ISOTOPIQUES

#### 3.4.1. Equipement

Les analyses isotopiques de composés spécifiques sont effectuées par des laboratoires spécialisés sur la thématique « CSIA ». L'équipement nécessaire pour une analyse des compositions isotopiques en carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) par CSIA consiste d'un chromatographe en phase gazeuse et un module de combustion couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (GC-C-IRMS). Dans ce système en ligne (voir Figure 5), les constituants sont d'abord séparés par chromatographie en phase gazeuse (GC), ensuite chaque composé est transformé en  $\text{CO}_2$  dans une interface de combustion (C) située en sortie de colonne GC. Les molécules produites passent ensuite par un réacteur de réduction où le surplus d'oxygène est éliminé. L'interface est également équipée d'un piège de type Nafion® pour éliminer l'eau résiduelle. Les produits ( $\text{CO}_2$  de chaque polluant organique présent dans l'échantillon) sont alors introduits dans la source d'ionisation du spectromètre de masse (IRMS), pour la détermination des rapports isotopiques ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) individuels. La précision analytique est comprise entre 0.2 et 0.5‰, et elle dépend de l'élément dosé (concentration) et des spécificités instrumentales. La justesse et la précision sont contrôlées par l'analyse répétée d'échantillons témoins à compositions isotopiques calibrées par rapport aux références internationales. A la variabilité instrumentale s'ajoute la variabilité liée à la préparation des échantillons (pureté des extraits, homogénéité, mode d'injection etc.).

La mesure des compositions isotopiques en hydrogène ( $\delta\text{D}$ ) par CSIA est effectuée à l'aide d'un système GC-TC-IRMS en flux-continu (même principe que pour le carbone ci-dessus, mais équipé avec un four à haute température). Ce système analytique se compose d'un chromatographe en phase gazeuse (GC), couplé à un spectromètre de

masse isotopique (IRMS). L'interface est assurée par un four de haute température (thermo-combustion : TC à T >1400°C) pour réduire chaque composé organique présent dans l'échantillon en hydrogène (sous forme de gaz H<sub>2</sub>). Le gaz d'analyse est ensuite directement transféré dans la source d'ionisation du spectromètre de masse à rapport isotopique (IRMS), pour la détermination des rapports isotopiques (D/H) de chaque polluant individuel. La précision analytique d'après les spécifications de l'instrument est définie à 2-5‰.

Afin d'assurer de données fiables, il faut assurer que les analyses isotopiques sont systématiquement effectuées en duplicat, en cas d'écart types élevées (i.e. >0.5‰ pour δ<sup>13</sup>C ou >5‰ pour δD), les analyses sont à tripler.

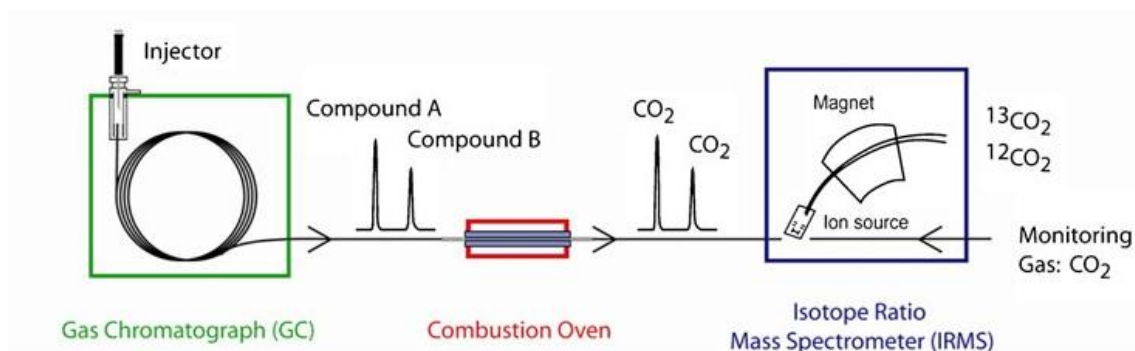


Figure 5 : Schéma pour l'analyse isotopique des compositions isotopiques en carbone (δ<sup>13</sup>C) par GC-C-IRMS (CSIA) d'après Elsner et al. (2012).

### 3.4.2. Assurance de la qualité analytique

Ce type d'analyses isotopiques (δ<sup>13</sup>C et δD de composés spécifiques) est proposée par des laboratoires spécialisés, en général dans le cadre d'une étude complète (analyse et interprétation des données). L'assurance de la qualité analytique est traitée dans des références internationales, par exemple Meier-Augenstein et al., 1999; Sessions, 2006; Sherwood Lollar et al., 2007; Blessing et al., 2008; et dans les recommandations proposées dans le guide « CSIA » de l'US-EPA (Hunkeler et al., 2008). A titre indicatif on peut recommander de

- assurer la justesse du système analytique par un étalon interne laboratoire (même composé que le composé d'intérêt) en composition isotopique connue au début et à la fin d'une séquence analytique
- analyser les échantillons en plusieurs reprises (idéalement en triplicat) pour assurer la précision des analyses isotopiques
- intégrer régulièrement un étalon interne laboratoire en composition isotopique connue dans une séquence analytique, ce qui permet de détecter toute déviation dans la mesure isotopique au cours d'analyses pratiquées en série.
- intégrer un « blanc » dans la série analytique

## 4. Illustrations

### 4.1. EXEMPLES SOLVANTS CHLORES (REX INTERNATIONAUX)

L'analyse isotopique des polluants organiques spécifiques (CSIA) des solvants chlorés est parmi les exemples d'application majeure de cette technique sur différents sites industriels. Plusieurs auteurs ont montré que la dégradation des solvants chlorés induit un fractionnement isotopique en carbone significatif, par exemple jusqu'à  $-16.7\text{‰}$  et  $-18.9\text{‰}$  pour per- et tri-chloroéthylène (PCE, TCE; Cichocka et al. 2007, 2008; voir compilation de données dans l'annexe 2).

Pour illustrer l'intérêt de l'utilisation de cette technique à l'échelle d'un site contaminé nous présentons une étude réalisée sur un site d'un projet de recherche sur l'atténuation naturelle en Allemagne (KORA). Il s'agit d'un aquifère profond contaminé par du PCE dû à une activité de nettoyage à sec.

Le changement isotopique au cours de la dégradation est observé en fonction du sens d'écoulement de la nappe. En concordance avec la théorie décrit dans le chapitre 2, la *Figure 6* montre l'application des mesures isotopiques pour fournir la preuve solide de la biodégradation du PCE dans l'aquifère de ce site. Les teneurs en PCE mesurées au droit de la source de contamination sont élevées ; le  $\delta^{13}\text{C}$  du PCE à ce point est de  $-27.1\text{‰}$  ( $\pm 0.5\text{‰}$ ). La diminution des teneurs en PCE en aval hydraulique de la zone source est accompagnée par un enrichissement de  $\delta^{13}\text{C}$  du PCE ( $-22.3\text{‰}$ ). Ce changement isotopique sur ce site correspond à une biodégradation nette de 59 à 91% pour le PCE entre la source et le point de prélèvement en aval (Blessing, 2008).

A l'exemple d'une étude faite sur un site néerlandais (projet de recherche européen sur l'atténuation naturelle CORONA, *Figure 7*) la diminution des concentrations est accompagnée par enrichissement significatif du  $\delta^{13}\text{C}$  de cis-DCE et de VC, étudiés en colonnes et sur site au long du panache.

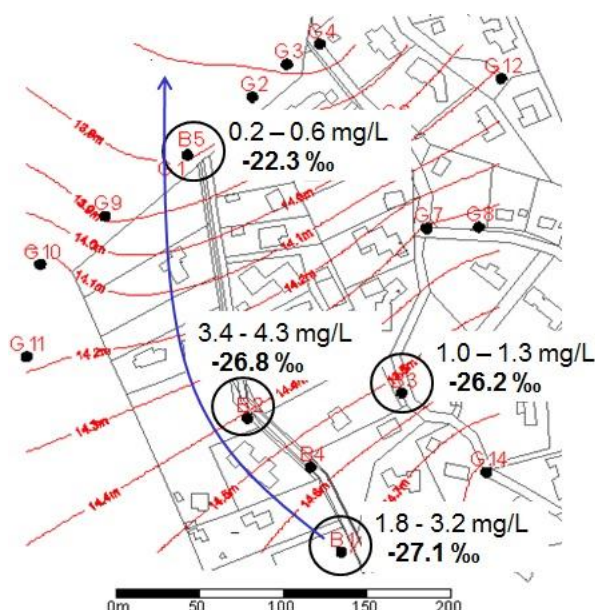


Figure 6 : La diminution de concentration en perchloroéthylène est accompagnée par un enrichissement isotopique en sens de l'écoulement d'eau souterraine (flèche bleue) ; Figure extraite de Blessing (2008).

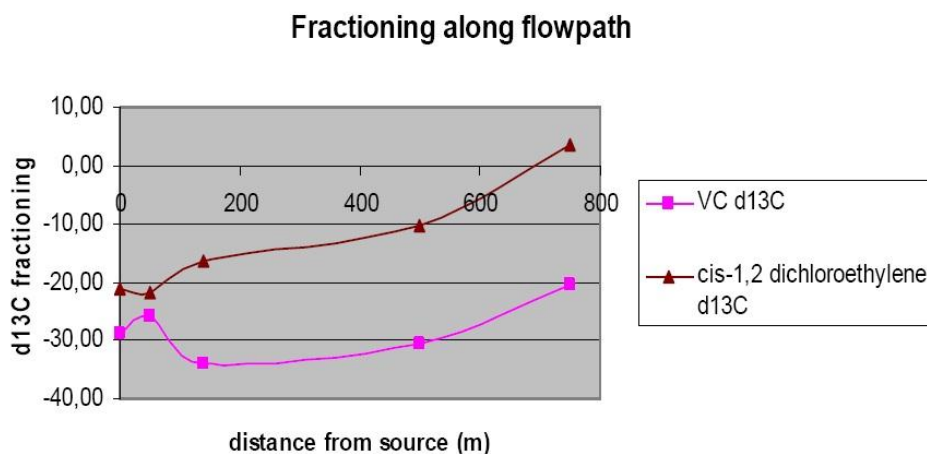


Figure 7 : Mise en évidence de la biodégradation *in situ* de cis-1,2-dichloroéthylène et de chlorure de vinyle (VC) au long d'un panache contaminé, prouvé par changement de la composition isotopique entre la source et des piézomètres en aval (Brabant site, projet CORONA, Lerner et al. 2005, figure issue de Slenders et al., 2005).

## 4.2. EXEMPLES BTEX ET NAPHTALENE : LES SITES ATTENA - 2 ET 3BIS (ETUDES BRGM)

Dans le cadre du projet ATTENA nous avons employé l'approche isotopique CSIA (*compound-specific isotope analysis*), i.e. l'analyse isotopique des polluants organiques spécifiques, afin d'obtenir les informations nécessaires pour la mise en évidence et l'estimation des processus de (bio)dégradation *in situ*. Dans les deux cas, une caractérisation isotopique de certains hydrocarbures aromatiques était effectuée en analysant le  $\delta^{13}\text{C}$  et le  $\delta\text{D}$  par GC-C/TC-IRMS.

### 4.2.1. Site 2 : Stratégie analytique et interprétations de résultats

Le site 2 représente un site d'une ancienne cokerie contaminé par des goudrons d'houille (BTEX, HAP, ammonium, etc.).

- analyses isotopiques ( $\delta^{13}\text{C}$  et le  $\delta\text{D}$  des BTEX et du naphthalène) effectuées par SPME (micro-extraction sur phase solide) – GC-C/TC-IRMS en différents points de l'aquifère: variations spatiales – 7 piézomètres (campagne de prélèvements effectuée en juin 2009)
- campagne de prélèvements effectuée en novembre 2011 -14 piézomètres, dont 2 prélevés sur plusieurs niveaux
- campagne de prélèvements effectuée en mai 2012 – 4 piézomètres, dont 3 plus loin (jusqu'à 190m) en aval de la zone « source »

Dans l'ensemble des 14 piézomètres analysés depuis 2009, 9 points de prélèvement ont montré des concentrations convenables pour effectuer une analyse isotopique en carbone et en hydrogène ( $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta\text{D}$ ). La caractérisation isotopique du benzène et du naphthalène de la source de contamination sur ce site (piézomètre Pz 15 avec une concentration de <10mg/L en naphthalène et >6mg/L) donne des valeurs isotopiques en  $\delta^{13}\text{C}$  de -25‰ ( $\pm 0.5\text{‰}$ ). Les valeurs issues de ce piézomètre montrent des valeurs typiquement retrouvées pour une source de pollution à partir des goudrons (voir *Figure 8* ci-dessous). Les valeurs isotopiques peuvent donc servir comme signature de la source d'une contamination.

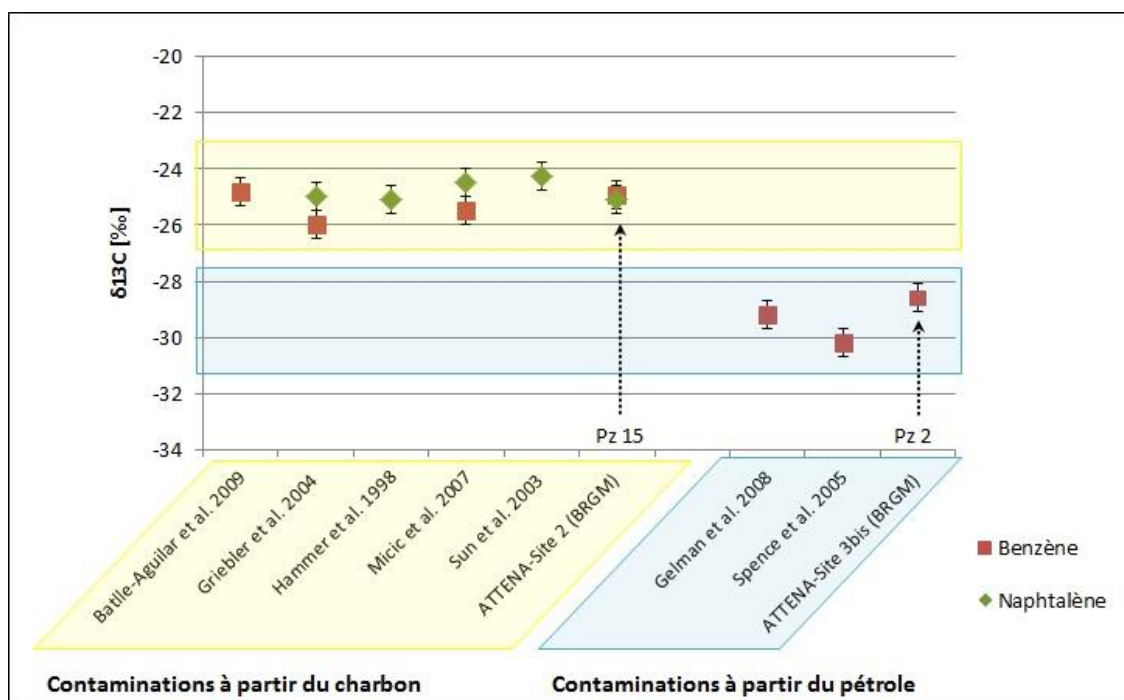


Figure 8 : Intérêt des signatures isotopiques de composés spécifiques afin de différencier des sources/origines de contaminations montré à l'exemple des études ATTENA site 2 (ancienne cokerie) et site 3bis (fuite de pétrole).

Du fait que seuls les processus de dégradation peuvent être accompagnés par un fractionnement isotopique, la mise en évidence formelle de la biodégradation des polluants est montrée à l'exemple des valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  du benzène pour ce site. L'enrichissement isotopique avec la distance croissante de la zone source (voir *Figure 9*) donne une première indication pour l'existence d'une biodégradation de benzène dans cet aquifère. La comparaison des teneurs et des résultats isotopiques obtenus pour ce composé en différents points de prélèvement tout au long du panache (*Figure 10*) a permis de montrer une bonne corrélation entre la concentration en benzène et sa composition isotopique. De façon analogue, la diminution de concentration de naphthalène en aval de la source est accompagnée par un enrichissement isotopique dans ce composé (*Figure 11*). L'approche CSIA permet donc de prouver d'une façon indépendante (p.ex. en absence de métabolites) la dégradation microbologique des polluants dans des eaux souterraines.



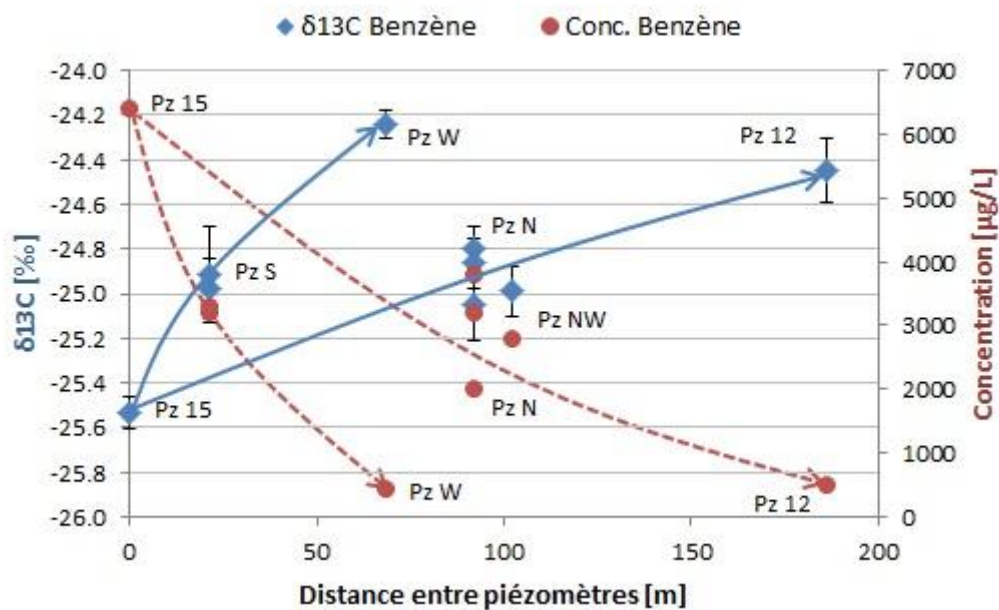


Figure 9 : L'enrichissement isotopique ( $\delta^{13}C$  du benzène, indiqué par les flèches bleues continues) avec la distance croissante de la zone source vers les piézomètres en aval hydraulique (Pz 15 vers Pz S – Pz W et Pz 15 vers Pz N/NW – Pz 12, diminution des concentrations en benzène indiqué par les flèches rouges hachurés) donne une première indication pour l'existence d'une biodégradation de benzène dans l'aquifère du site.

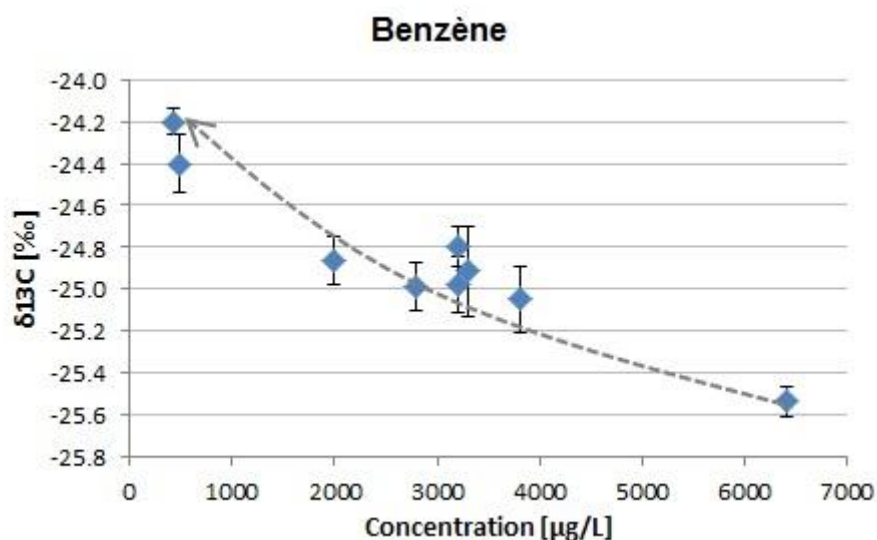


Figure 10 : Corrélation entre la concentration (abscisse) et la composition isotopique (axe des ordonnées) du benzène tout au long de panache de pollution dans l'aquifère de site 2.

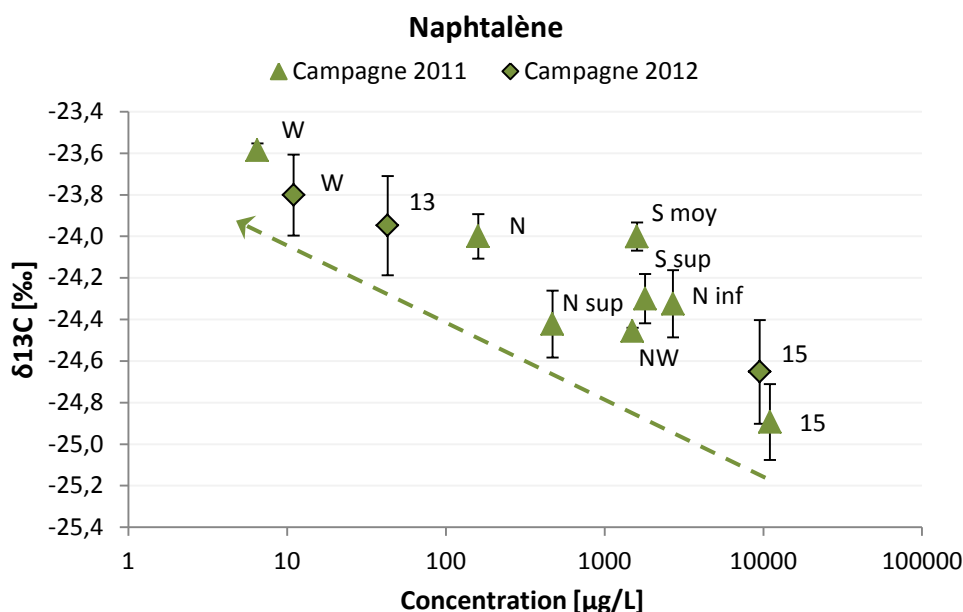


Figure 11 : Corrélation entre la concentration du naphthalène (abscisse, en échelle logarithmique) et sa composition isotopique (axe des ordonnées) en différents points de prélèvement entre la zone source et les piézomètres en aval hydraulique du site 2.

A partir des données de site on peut déterminer le facteur d'enrichissement  $\epsilon_{\text{terrain}}$ , qui met en relation la variation de teneurs (en fonction  $\ln f$ ) avec les changements isotopiques observés (voir Figure 12). Le coefficient de cette régression, i.e. le facteur  $\epsilon$  du terrain, sert uniquement à montrer la corrélation entre la concentration et la composition isotopique. La droite de corrélation permet de juger si les processus de dégradation sur site suivent le modèle de Rayleigh ; elle donne donc des indications si la dégradation sur site suit une cinétique du premier ordre. Les facteurs  $\epsilon_{\text{terrain}}$  sont, en général, inférieures à ceux qu'ils devraient être en comparaison avec des facteurs obtenues en microcosmes, du fait des autres processus qui entraînent une baisse de concentration dans des eaux souterraines (i.e. dilution, sorption, dégazage). Dans notre cas le  $\epsilon_{\text{terrain}}$  du benzène est  $-0,4\text{‰}$ . Cette valeur faible par rapport à des valeurs reportées en microcosme (de  $-0,8$  à  $-4,3\text{‰}$ ) indique qu'il y a également autres processus qu'une biodégradation qui contribuent à la diminution des concentrations dans cet aquifère. La mesure de la composition isotopique d'un composé spécifique peut donc être utile comme indicateur pour déterminer les processus qui règnent dans l'aquifère.

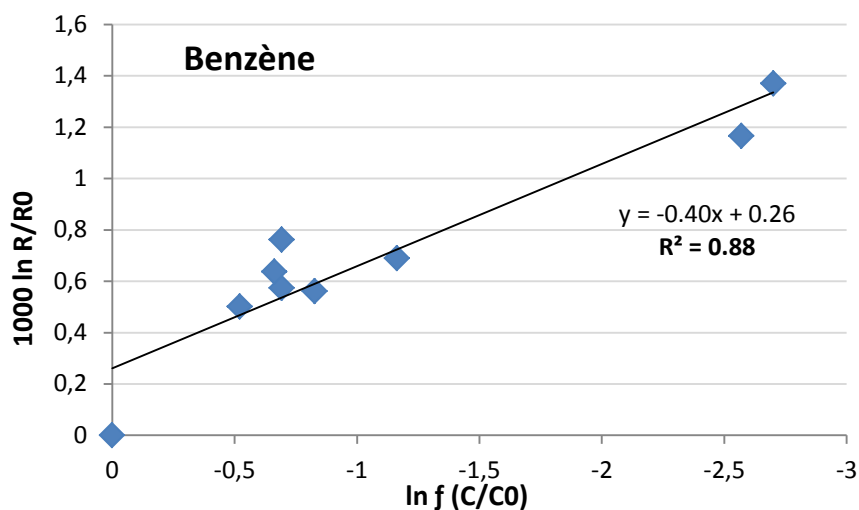


Figure 12 : La bonne corrélation ( $R^2=0.88$ ) entre la diminution des concentrations (abscisse) et l'enrichissement isotopique (axe des ordonnées) de benzène montre que la dégradation sur ce site suit le modèle de Rayleigh.

Une quantification précise de la biodégradation d'un composé sur le site étudié implique la connaissance des facteurs d'enrichissement spécifique pour les conditions présentes sur ce site. En l'absence des facteurs appropriés, on peut appliquer des valeurs issues de la littérature pour une première estimation du degré de la biodégradation. Dans notre cas (toujours à l'exemple de benzène), l'approche « multi »-isotopiques (mesure combinée du  $\delta^{13}\text{C}$  et du  $\delta\text{D}$ ) permet de mieux caractériser le phénomène de biodégradation *in situ*. Les compositions isotopiques en carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) des composés aromatiques ont montré de plus faibles variations par rapport à celles en hydrogène ( $\delta\text{D}$  ; voir *Figure 13*), conforme à des observations faites par Mancini et al. (2002, 2003). En intégrant les données de la littérature sur le fractionnement isotopique pour la biodégradation du benzène en fonction des mécanismes/conditions de microcosmes étudiés (annexe 2), le couplage d'enrichissements isotopiques analysés pour carbone et pour l'hydrogène sur le site 2 permet d'identifier la voie de dégradation du composé (*Figure 13*).



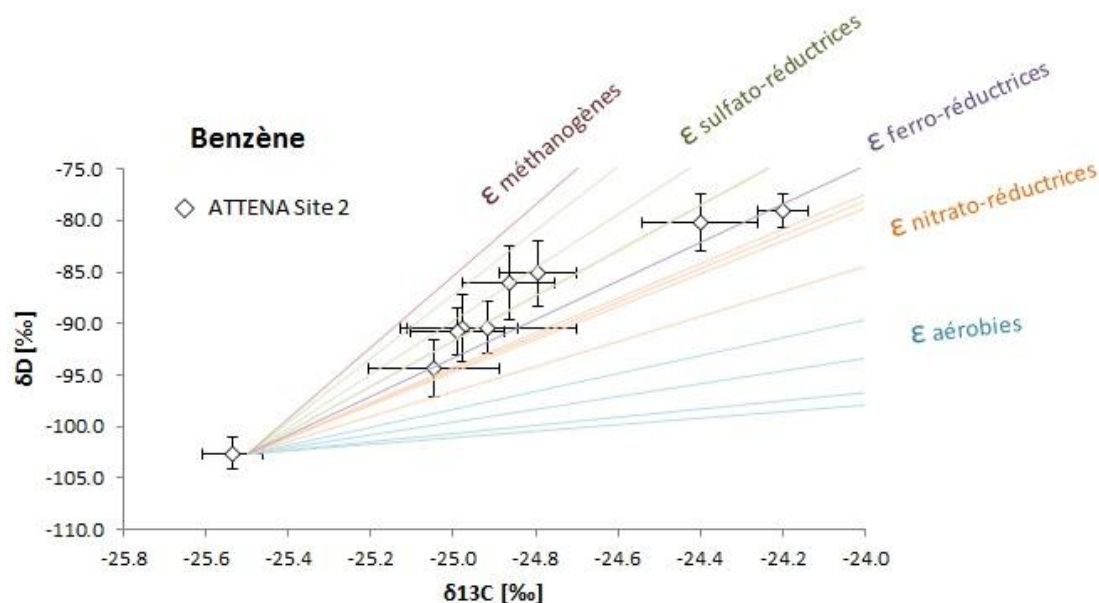


Figure 13 : Couplage de données  $\delta^{13}C$  (abscisse) et  $\delta D$  (axe des ordonnées) pour mieux identifier les mécanismes de dégradation du benzène dans l'aquifère de site 2 (à noter que les échelles des deux axes ne sont pas les mêmes).

Les variations isotopiques observées sur ce site correspondent à des facteurs d'enrichissement ( $\epsilon$ ) en carbone entre -2.5 à -3.6‰, et en hydrogène de -55 à -79‰ reportés par Mancini et al. (2003), Fischer et al. (2009) et Bergmann et al. (2011) pour des microcosmes sous conditions sulfato-réductrice et ferro-réductrice. Cette observation est conforme au fait que les seuls accepteurs d'électrons présents dans des eaux souterraines du site sont les sulfates (pas d'informations disponibles sur de teneurs en  $Fe^{2+}$ ).

Ces facteurs  $\epsilon$  adéquats pour ce site permettent de calculer les taux de biodégradation (B [%]), i.e. la perte nette des polluants due à des processus d'une dégradation entre deux piézomètres du site, en utilisant les équations 3-5 (pour détails voir chapitres 2.2 et 5.3).

Les résultats pour B [%] sur le site 2 sont calculés avec les compositions isotopiques ( $\delta^{13}C$  et  $\delta D$ ) du benzène observées au Pz 15 et aux piézomètres en aval hydraulique; les résultats sont présentés dans la Figure 14. Ils sont calculés sur la base de des facteurs d'enrichissement du benzène ( $\epsilon_{\text{carbone}}$  de -2.5 à -3.6‰, et en  $\epsilon_{\text{hydrogène}}$  de -55 à -79‰), reportés par Mancini et al. (2003), Fischer et al. (2009) et Bergmann et al. (2011). Il convient de noter que les taux de dégradation, calculés sur deux bases autonomes, montrent des résultats concordants. Dans ce cas, les approches isotopiques ont permis d'identifier les mécanismes de dégradation dans l'aquifère et de mieux cibler les facteurs  $\epsilon$  adéquats à ce site afin de calculer les taux de biodégradation.

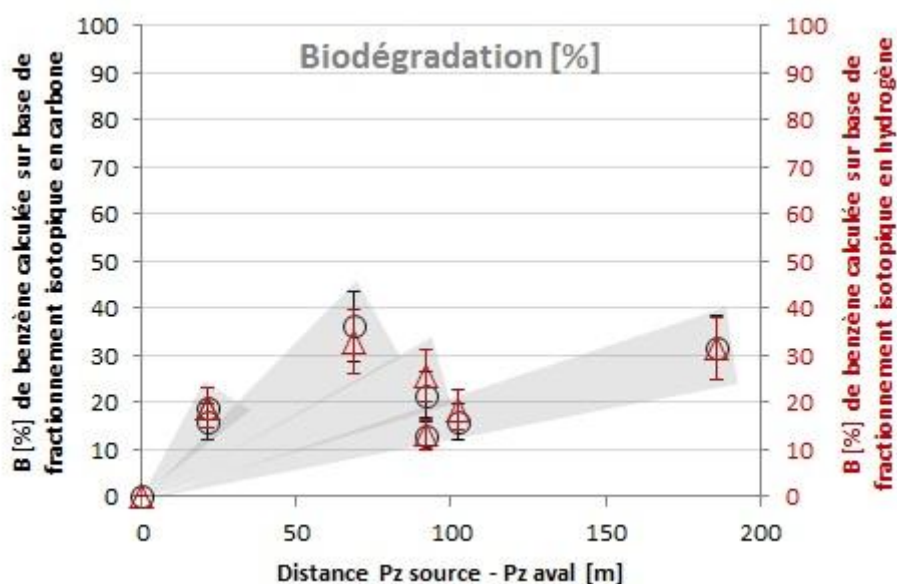


Figure 14 : Taux de benzène biodégradée in situ, calculés sur la base des valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  (axe des ordonnées primaire, en cercles noirs) et  $\delta\text{D}$  (axe des ordonnées secondaire, en triangles rouges) pour les deux axes hydrauliques (cf. figure 9) du site 2.

#### 4.2.2. Site 3bis : Stratégie analytique et interprétations de résultats

La contamination du site 3bis est due à une cuve d'une station-service défectueuse, il s'agit d'un aquifère contaminé par des hydrocarbures pétroliers (surtout BTEX).

Les analyses isotopiques  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta\text{D}$  des BTEX ont été effectuées par GC-C/TC-IRMS après extraction par SPME (micro-extraction sur phase solide).

Les échantillons ont été collectés en différents points de l'aquifère: variations spatiales (Figure 15), à des périodes différentes: variations temporelles (3 campagnes), en fonction des nouveaux piézomètres installés pour les besoins de l'étude.

- campagne octobre 2008 – un piézomètre (Pz 2)
- campagne novembre 2009 – 8 piézomètres
- campagne mars 2011 – 7 piézomètres
- campagne janvier 2012 – 11 piézomètres
- campagne juin 2012 – 17 piézomètres

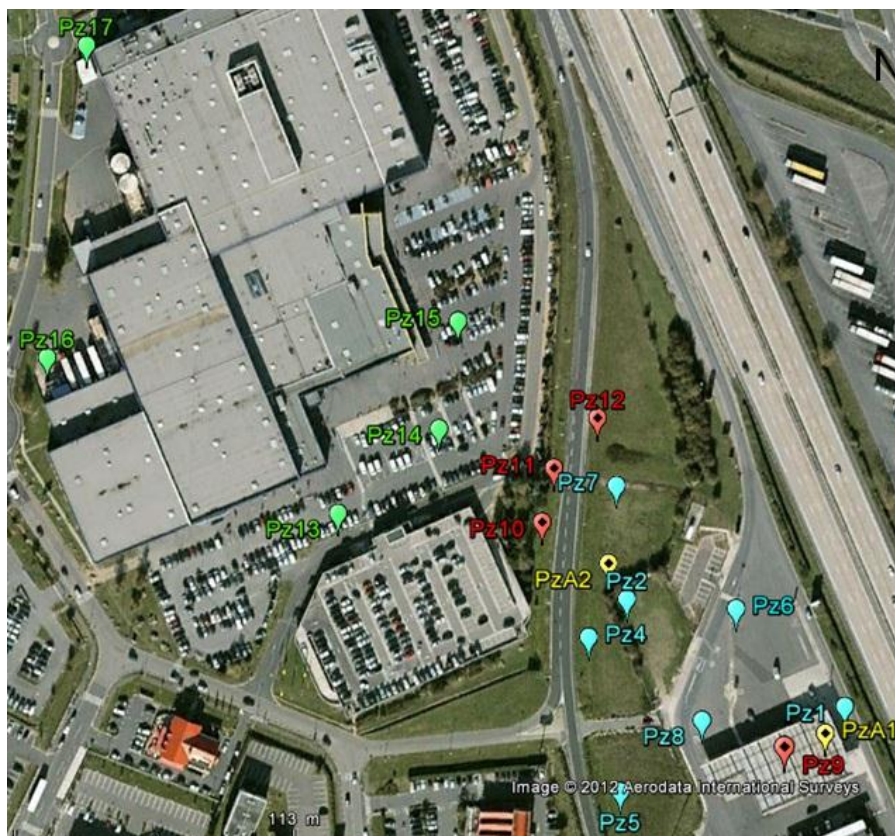


Figure 15 : Agrandissement/extension du réseau de piézomètres au fur et à mesure de l'avancement de l'étude (04-2009 : bleu, 03-2011 : rouge, 01-2012 : vert).

La première campagne d'analyses isotopiques a été réalisée fin 2008 incluant le piézomètre Pz 2, qui est localisé à proximité de la source de pollution présumée et des piézomètres en amont pour comparaison. Les points de prélèvement en amont ont montré des concentrations trop faibles pour effectuer une analyse isotopique (en utilisant une technique d'extraction liquide-liquide). Au cours de l'étude, et au fur et à mesure de l'avancement du projet, de nouveaux piézomètres ont été installés sur le site. De ce fait, le nombre de piézomètres prélevés, ainsi que leur localisation, ont évolué d'une campagne à l'autre (voir Figure 15). La méthode d'extraction a également été modifiée au profit de la technique de micro-extraction sur phase solide (SPME) permettant d'atteindre de plus faibles niveaux de détection (voir chapitre 5.2).

En novembre 2009, les piézomètres localisés en amont hydrologique et en aval de Pz2 ont été prélevés afin de caractériser leurs signatures isotopiques. Tous les piézomètres en amont ont montré une présence du MTBE, pas de présence du benzène et des signatures isotopiques ( $\delta^{13}\text{C}$ ) des TEX (Toluène, Ethylbenzène, Xylène) très différentes de celles des TEX présents dans une concentration faible similaire, mais dans les piézomètres localisés en aval du Pz 2 ce qui traduit des pollutions d'origine différentes : la pollution en aval de Pz 2 est connectée à la source en Pz 2, tandis que les hydrocarbures dans les piézomètres amont à Pz 2 ont une autre origine (vraisemblablement due à de légères pertes dans la zone des postes de distribution d'essence, Figure 16). De plus, la valeur isotopique ( $\delta^{13}\text{C}$ ) du benzène de la zone source présumée (Pz 2,  $-28.5\text{‰}$ ) est comparable à des valeurs typiques pour des produits pétroliers ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{BTEX}}$  de l'essence/carburant entre  $-28$  à  $-30\text{‰}$ , Figure 8).

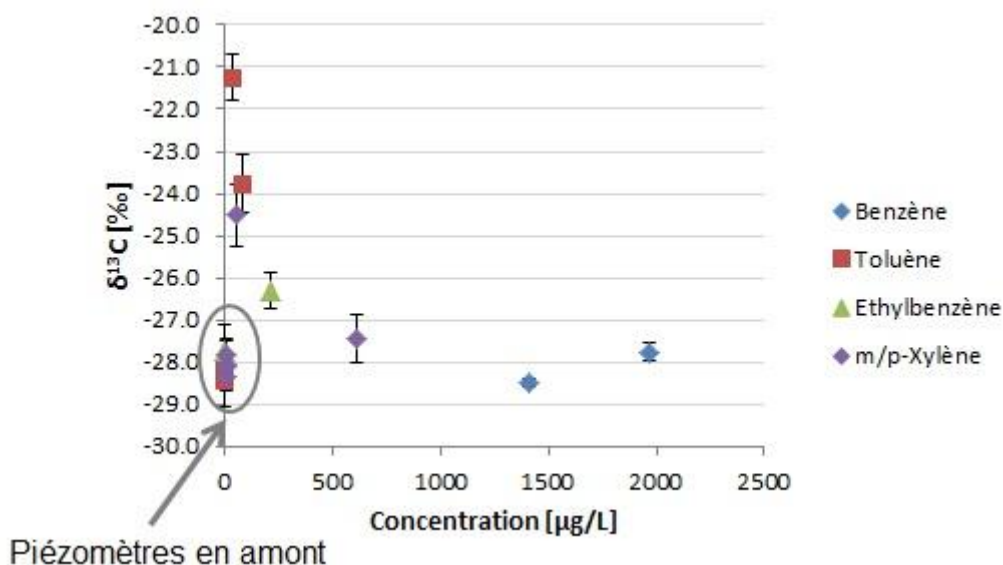


Figure 16 : Valeurs isotopiques  $\delta^{13}C$  versus concentrations des piézomètres en amont (Pz 1, 5 et 8) et en aval (Pz 2 et 7) de la source de pollution présumée ; résultats de la campagne de prélèvements effectuée en novembre 2009.

La campagne en mars 2011 a eu pour but de suivre le changement isotopique en aval de la source de pollution, i.e. entre les piézomètres Pz 2, Pz 7, Pz 10 et Pz 11 (Figure 17). La concentration élevée ( $\geq 1800 \mu\text{g/L}$ ) et les valeurs isotopiques du benzène des piézomètres en aval avec un  $\delta^{13}C$  autour de  $-27.5\text{‰}$  ( $\pm 0.5\text{‰}$ ) sont en contradiction avec le  $\delta^{13}C$  du benzène de la source présumée (Pz 2) qui se trouve à  $-28.8\text{‰}$  avec une concentration de  $\leq 1800 \mu\text{g/L}$ . Les valeurs isotopiques du benzène en aval de la zone source présumée restent stables (inchangées entre Pz 11, 7 et 10) quelle que soit la concentration en benzène.

Ceci montre que I) le benzène n'est pas biodégradé dans la zone d'aquifère étudiée et II) plusieurs sources de benzène doivent se retrouver sur ce site.

En revanche, la diminution de la concentration du toluène entre Pz 2 de  $3300 \mu\text{g/L}$  et les piézomètres en aval hydraulique de  $< 90 \mu\text{g/L}$  est bien associée à un enrichissement isotopique significatif de  $-28.4\text{‰}$  jusqu'à  $-22.2\text{‰}$  ( $\pm 0.5\text{‰}$ ), ce qui prouve une biodégradation du toluène dans l'aquifère. Dans la zone polluée du site 3bis, les eaux souterraines sont en conditions anaérobies. Les observations faites sur ce site montrent que, contrairement au toluène, le benzène peut se comporter récalcitrant sous conditions strictement anaérobies (Colberg & Young, 1995). Cette campagne ne suffisait pas pour interpréter de façon fiable les premiers résultats obtenus, pourtant elle a mis en évidence que le nombre de points de prélèvements et leur localisation devront être adaptés.



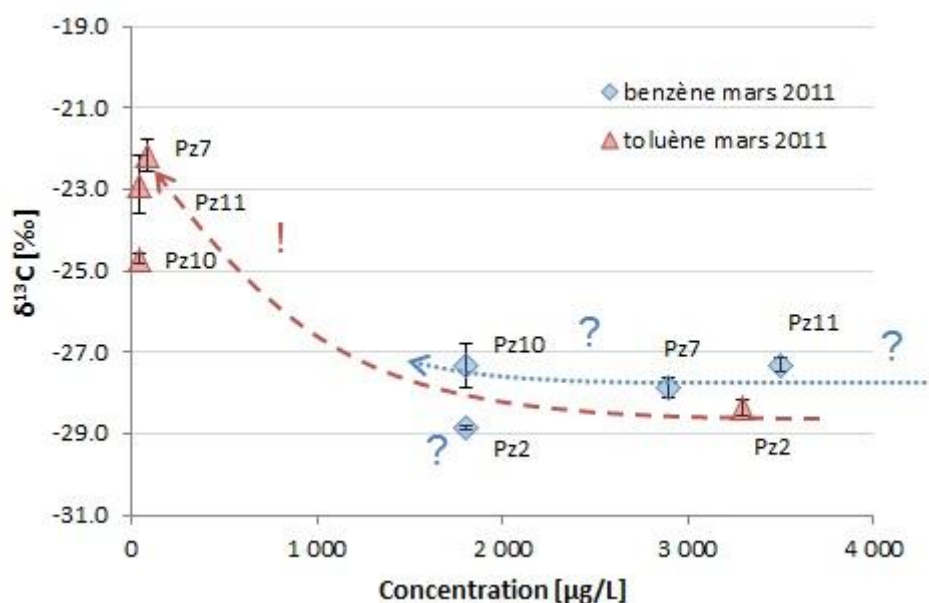


Figure 17 : Les résultats isotopiques  $\delta^{13}\text{C}$  par rapport à des concentrations de la campagne de prélèvement effectuée en mars 2011 ont mis en évidence I) la biodégradation du toluène (triangles), II) le comportement récalcitrant du benzène (carreaux) dans la zone de l'aquifère étudiée et III) ont fourni des indications pour plusieurs sources de benzène sur ce site 3bis.

L'objectif des campagnes de prélèvement de 2012, surtout de la campagne en juin pour laquelle cinq piézomètres supplémentaires ont été installés entre la zone en aval des anciennes cuves de pétrole et en amont hydraulique des piézomètres Pz 10, 7 et 12, était de surveiller l'évolution de la pollution, suivre les différents processus de dégradation dans l'aquifère et de mieux cibler la zone source de la pollution. Les différentes campagnes effectuées entre 2008 et 2012 ont démontré des variations temporelles importantes de la concentration, même dans la zone proche des anciennes cuves (Pz 2, voir Figure 18). La diminution des teneurs en toluène constaté en 2009 est accompagnée par un enrichissement isotopique indiquant une biodégradation du toluène en 2009 avec un relargage des polluants à partir de la source de contamination due à des changements importants de niveau de la nappe dans l'année suivante. Le benzène se comporte récalcitrant dans la zone de l'aquifère étudiée. Les différentes campagnes ont donc mis en évidence que le panache de pollution ne se comporte pas de façon stationnaire.

L'installation des piézomètres additionnels (P1 à P5) a permis une meilleure localisation de la zone source de la pollution pour le benzène autour du piézomètre P4. Cette campagne a finalement permis de conclure sur des processus de transport et de dégradation dans l'aquifère en aval hydraulique des anciennes cuves de stockage (voir Figure 19 et Figure 20 pour détails).

Une estimation du taux de biodégradation (i.e. la partie de la diminution de la concentration qui peut être attribué à une dégradation intrinsèque) était effectuée pour le benzène et le toluène sur la base des signatures isotopiques analysées dans le piézomètre source (resp. P4 ou Pz 2) et les piézomètres Pz 10 et P5 en aval, qui montrent des signatures isotopiques les plus enrichies. La partie de benzène diminuée à cause d'une biodégradation entre P4 et Pz10/P5 se monte à 47%. Ce taux est une

estimation conservatrice sur la base de  $\epsilon_{\text{benzène}}$  de  $-3.6\text{‰}$  (Mancini et al., 2003), reporté comme valeur max. pour une population microbienne anaérobie en culture mixte. La partie de toluène diminuée à cause d'une biodégradation entre Pz2 et Pz10/P5 se monte entre 91 et 94%. Ce taux est une estimation conservatrice sur la base de  $\epsilon_{\text{toluène}}$  de  $-2.8\text{‰}$  (Vogt et al., 2008), reporté comme valeur max. pour une population microbienne anaérobie en culture mixte (annexe 2).

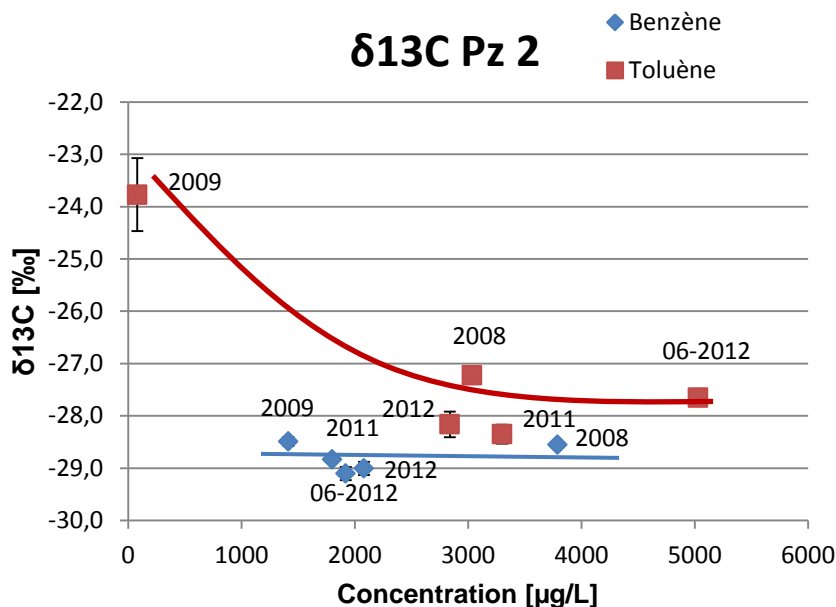


Figure 18 : Variations temporelles des signatures isotopiques  $\delta^{13}\text{C}$  et des concentrations du piézomètre Pz 2 (proche source) sur le site. Le toluène (rectangles) a subi des processus de biodégradation en 2009, contrairement au benzène (carreaux) qui se comporte recalcitrant dans cette zone de l'aquifère.

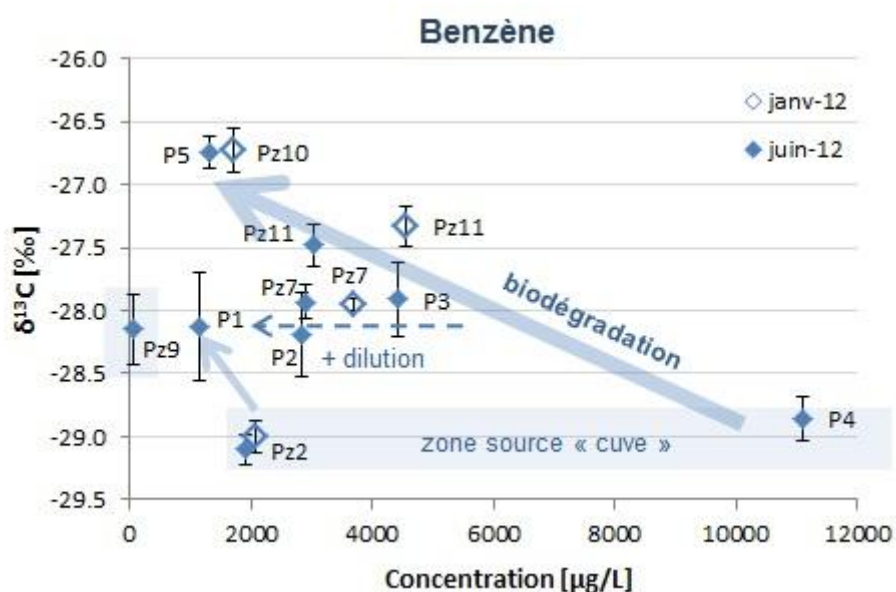


Figure 19 : Variations spatiales des valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  et des concentrations du benzène dans l'aquifère du site 3bis. Les analyses ont mis en évidence trois sources de benzène sur ce site (Pz 9 zone « distributeurs », et Pz 2 et P4 dans la zone « cuves »). Les piézomètres en aval montrent des processus de biodégradation et de la dilution en ampleurs variés.

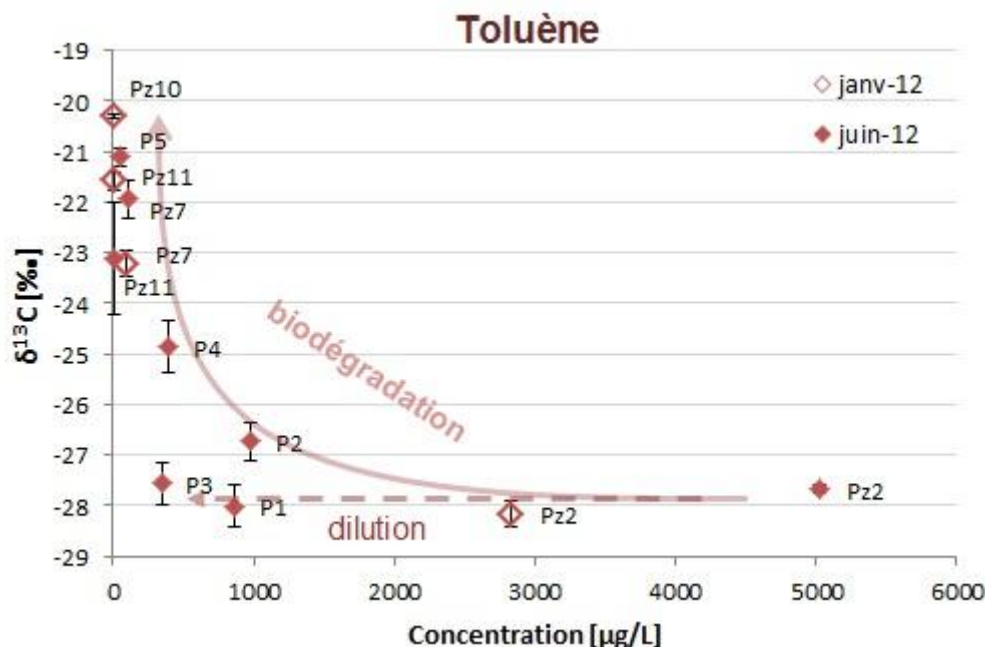


Figure 20 : Variations spatiales des signatures isotopiques et des concentrations du toluène dans l'aquifère du site 3bis. La source de la pollution de toluène est localisée autour de Pz 2 (avec des variations temporelles de la concentration). Les piézomètres en aval montrent des processus de biodégradation et de la dilution en ampleurs variés.

#### 4.2.3. Avantages / Inconvénients rencontrés sur les sites ATTENA

Avantages :

- Les signatures isotopiques en carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) permettent de distinguer/caractériser des sources différentes.
- Preuve qualitative de la biodégradation naturelle *in situ* sur les deux sites étudiés
- Preuve de l'existence des processus autres que la biodégradation, telles que dilution/dispersion, sur les sites.
- La mise en évidence formelle d'une biodégradation est faisable, même en absence des métabolites.
- Le site 2 montre l'importance d'un bon positionnement des endroits de prélèvement. Seules les campagnes incluant le Pz 15 (source) et les piézomètres les plus dégradés (W, 12, 13), ont fourni la preuve solide pour une biodégradation et les éléments nécessaires pour une quantification fiable de la biodégradation *in situ*.
- L'approche multi-isotopique est utile pour mieux caractériser les processus sur site : sur la base des résultats obtenus sur le site 2, il était possible de

caractériser les processus d'atténuation naturelle et de quantifier la biodégradation dans la partie de l'aquifère étudiée.

- Compréhension des mécanismes de dégradation et relargage des composés source sur le site 3bis.
- Sur le site 3bis les valeurs isotopiques ont enlevé des doutes sur la position de la source de contamination – aide pour un meilleur positionnement des piézomètres.
- L'approche CSIA, i.e. la caractérisation isotopique des composés individuels est une méthode efficace pour caractériser les processus de façon plus définitive (différentiation entre dilution et dégradation) dans les eaux souterraines contaminées.

#### Inconvénients :

- Les premières campagnes de prélèvement sur les deux sites ont démontré l'intérêt d'un bon positionnement des piézomètres tout au long du panache d'une pollution, depuis des zones proches de la source jusqu'à la limite du panache, faute de quoi les variations isotopiques mesurées risquent d'être peu significatives.
- L'absence des facteurs de fractionnement ou d'enrichissement appropriés (mesurés ou données pertinentes issues de la littérature) peut ne pas permettre une quantification ou une estimation correcte de la biodégradation *in situ*.
- Les concentrations des composés organiques peuvent être trop faibles pour permettre une analyse isotopique fiable (surtout pour les analyses en hydrogène  $\delta D$ ).
- L'analyse isotopique du MTBE n'a pas été possible sur le site 3bis (pas reproductible, raison probable : conservation des échantillons n'était pas approprié pour le MTBE, concentrations faibles voir chapitre 3.3.1).
- Les résultats du site 3bis montrent l'importance d'optimisation de nombre des piézomètres analysés et de la fréquence des campagnes de prélèvements: fluctuations des concentrations et des variations isotopiques importantes en cas où le panache d'une pollution ne se comporte pas d'une façon stationnaire.



## 5. Interprétation et points clés

### 5.1. CAS D'EXCLUSION / LIMITATIONS

Il existe des recommandations pour la mise en œuvre de l'outil « CSIA » sur des sites contaminés donnés par l'US-EPA (Hunkeler et al., 2008). Les décisions sur l'application et/ou la mise en œuvre de cet outil sont faites au cas par cas en fonction des conditions de sites, le type de la pollution constatée etc., par des spécialistes de cette méthode. Parmi les limitations à l'utilisation de cet outil on trouve les points suivants

- concentrations trop faibles pour permettre un résultat juste et précis (en fonction des composés organiques, des techniques analytiques utilisés, de la matrice d'échantillon,...)
- l'exactitude des mesures ne peut être obtenue que pour des pics chromatographiques bien résolus (facteurs limitant : présence éventuelle d'hydrocarbures non résolus par la chromatographie (UCM), mauvaise efficacité d'une purification éventuelle, co-élution des composés qui entraîne des difficultés particulières lors de la séparation des pics,...)
- une réponse qualitative sur la présence d'une biodégradation naturelle *in-situ* n'est pas possible pour certaines molécules lorsque la dégradation n'engendre pas de fractionnement isotopique. L'analyse de fractionnement isotopique est limitée par le nombre d'atomes d'élément cible dans une molécule. Morasch et al. (2004) suggèrent qu'à partir de 11 à 12 atomes de carbone dans la molécule cible le fractionnement isotopique en carbone peut se situer sur l'échelle d'erreur analytique.
- une quantification de la biodégradation est souvent limitée par l'absence des facteurs  $\epsilon$  adéquats pour le site en question. Sur ces sites, l'analyse isotopique donne donc seulement une appréciation qualitative de la biodégradation.
- le choix des endroits de prélèvement et l'emplacement des piézomètres est cruciale pour une interprétation approfondie des données.

### 5.2. LIMITE DE DETECTION, SENSIBILITE

En ce qui concerne l'analyse isotopique par CSIA, les études des isotopes comme traceurs de processus et/ou traceurs de sources sont très souvent limitées par la sensibilité des systèmes analytiques (*Figure 21*). En théorie, les quantités de l'élément à analyser sont de l'ordre du nmol, p.ex. 1nmol du carbone et 10nmol d'hydrogène pour chaque composé sur la colonne GC (Schmidt et al., 2004; Sessions, 2006). Dans le cas de l'analyse de composés organiques dans des matrices environnementales, des quantités deux ou trois fois supérieures sont requises pour assurer une mesure reproductible du rapport isotopique par GC-IRMS. Pour mesurer la composition isotopique de composés en concentrations dans l'ordre de quelques  $\mu\text{g/L}$  (comme on peut les retrouver en bordure d'une contamination), des techniques d'extraction et/ou d'injection novatrices ont été développées ces dernières années. Parmi les plus efficaces on trouve le système « purge & trap » (P&T), la micro-extraction sur phase

solide (SPME) et l'injection en large volume (LVI), toutes ces techniques ont été validées. On peut citer par exemple (Hunkeler & Aravena, 2000a; Zwank et al., 2003; Jochmann et al., 2006; Mikolajczuk et al., 2009).

	split 1:50 *1	splitless *1	SPME *2	P&T *3
méthyl tert-butyl éther	1650	145	1.4	0.63
trichlorométhane	9500	800	14.8	2.3
tetrachlorométhane	14000	1100	24.3	5
trans-1,2-dichloroéthylène	4300	470	11.3	1.5
cis-1,2-dichloroéthylène	4200	415	8	1.1
trichloréthylène	5500	400	8.2	1.4
tetrachloroéthylène	6000	370	5.7	2.2
benzène	1050	90	1.9	0.3
toluène	1100	70	0.8	0.25

\*1 - valeurs recalculées sur la base d'un litre d'eau extrait par 5 mL de solvant

\*2 - valeurs recalculées sur la base d'un volume d'extraction de 15 mL

\*3 - valeurs données sur la base d'un volume d'extraction de 25 mL

Figure 21 : Limite de détection (en µg/L dans l'eau) des techniques d'injection diverses afin d'analyser les  $\delta^{13}\text{C}$  des certains composés organiques volatils par GC-C-IRMS ; valeurs modifiées d'après Zwank et al. (2003).

### 5.3. TRAITEMENT DES DONNEES

Sur un site industriel contaminé, il faut toujours prendre en compte qu'il peut y avoir plusieurs sources de pollution. Une caractérisation isotopique des composés spécifiques en différents points de l'aquifère, en combinaison avec d'autres mesures (concentrations des polluants et paramètres physico-chimiques du milieu), des informations sur l'historique de la contamination, et une caractérisation hydrogéologique de l'aquifère peut permettre de juger sur la présence des sources multiples sur un site (Blessing et al., 2009).

Pour pouvoir interpréter un changement isotopique en terme de biodégradation il faut avoir plusieurs piézomètres en série, tout au long d'un panache. Si les molécules en question montrent, dans le sens d'écoulement de la nappe, une diminution des concentrations associée à des variations significatives des valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  (enrichissement en  $^{13}\text{C}$ ), la (bio)dégradation est mise en évidence sur ce site. Il est en général considéré qu'un changement de la valeur isotopique de 2‰ est significatif pour mettre en évidence une biodégradation (Meckenstock et al., 2004; Hunkeler et al., 2008). L'outil isotopique peut être couplé avec d'autres paramètres chimiques de ce site pour avoir plus d'indication sur un processus de dégradation. Une approche multi-isotopique (p.ex.  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta\text{D}$ ) peut être utile pour mieux caractériser ce phénomène de biodégradation *in situ*.

Une corrélation linéaire entre la concentration et la composition isotopique peut démontrer que les processus de dégradation sur site suivent le modèle Rayleigh et que la composition de la source est homogène. La valeur  $\epsilon_{\text{field}}$  du site est très souvent

inférieure au facteur de fractionnement issus de mesures réalisées en microcosmes, du fait des processus d'advection dans l'aquifère qui entraînent une diminution des concentrations des molécules dans l'eau (Vieth et al, 2003). Afin de corriger de ces processus de dilution, les concentrations peuvent être normalisées en utilisant un traceur conservatif approprié, s'il en existe sur le site (Pooley et al., 2009).

Si le changement du ratio isotopique suit une cinétique du premier ordre, il peut être modélisé selon l'équation de Rayleigh. Les facteurs d'enrichissement issus de la littérature peuvent servir pour estimer la biodégradation pour le site en question (Sherwood Lollar et al., 2001; Vieth et al., 2003). En revanche, le modèle de Rayleigh ne s'applique pas pour calculer la biodégradation de TCE, si le TCE est à la fois issu de la dégradation de PCE et en même temps soumis à une biodégradation lui-même. Dans ce cas très spécifique, une quantification est valide seulement pour le produit mère (PCE dans ce cas), et non pas pour les composés qui suivent la chaîne de dégradation dehalogéno-réductrices (TCE, cis-DCE, VC) ; leurs signatures isotopiques peuvent néanmoins fournir des réponses qualitatives sur la progression de leur dégradation.

Il convient de noter que la littérature peut fournir, pour une même substance, des valeurs d'enrichissement très différentes. Une estimation correcte de la biodégradation des composés organiques *in situ* implique une caractérisation précise des facteurs de fractionnement isotopiques, spécifiques de la population microbienne présente sur le site étudié ainsi que de milieu du site étudié (Schmidt et al., 2004). En cas idéal, des expérimentations en microcosmes dans les mêmes conditions géochimiques et microbiologiques que celles du site étudié doivent être réalisées. Sinon, il faut s'assurer que les données de la littérature peuvent s'appliquer pour le site étudié ce qui implique a minima de connaître les mécanismes de biodégradation actifs sur le site.

Les facteurs de fractionnement  $\alpha$  ou d'enrichissement  $\epsilon$  appropriés pour un site, permettent de quantifier la biodégradation en utilisant le modèle de Rayleigh. En cas d'absence des facteurs de fractionnement ou d'enrichissement spécifique pour un site donné, une gamme des valeurs  $\alpha$  (resp.  $\epsilon$ ) doit être choisi, qui va fournir l'estimation la plus conservatrice sur la fraction biodégradée. A partir de différentes études de la biodégradation relevées dans la littérature, les facteurs d'enrichissement des molécules étudiées dans le cadre du projet ATTENA sont présentés sous forme de tableau dans l'annexe 2 ; les facteurs d'autres composés organiques sont récapitulés dans les aperçus bibliographique de Meckenstock et al. (2004) et dans le guide de l'US-EPA (Hunkeler et al., 2008).

Les facteurs  $\alpha$  ou  $\epsilon$  adéquates permettent de calculer les taux de biodégradation (B [%]), i.e. la perte nette des polluants due à des processus d'une dégradation entre deux piézomètres du site, en utilisant les équations 3-5 (voir détails dans Sherwood Lollar et al., 2001 ; Aelion et al. 2010 ; Hofstetter & Berg, 2011) :

$$(\alpha-1) \ln f = \ln ((R_{\text{aval}} / 1000+1) / (R_{\text{source}} / 1000+1)) \quad \text{Équation 4}$$

où  $R_{\text{aval}}$  désigne la mesure du rapport isotopique actuel en notation delta à un point dans le panache, et  $R_{\text{source}}$  celui d'origine dans la pollution dans la source, (ou ainsi entre deux piézomètres en amont et aval hydrogéologique). Par la suite, la fraction restante ( $f$ , calculée sur la base du changement isotopique mesuré entre deux piézomètres) conduit au calcul de la biodégradation (B) :

$$B [\%] = (1 - f) * 100 \quad \text{Équation 5}$$

Les références internationales donnent un aperçu sur des facteurs  $\epsilon$  disponibles. Ils donnent également des recommandations sur les interprétations en terme de quantification de processus sur site (Hunkeler et al., 2008, et Meckenstock et al., 2004).

Si la biodégradation est répartie de façon très hétérogène dans un panache, on peut avoir des résultats biaisés en utilisant ce concept (Fischer et al., 2007, Thullner et al., 2012). Il devient alors nécessaire l'utiliser des données supplémentaires telles que des tests de traçage et/ou des approches couplant l'isotopie avec des modélisations hydrogéochimiques réactives (van Breukelen et al., 2007; van Breukelen & Prommer, 2008; Pooley et al., 2009).

Des méthodes de modélisation géochimique/hydraulique peuvent être combinées avec des méthodes isotopiques pour :

- permettre une meilleure quantification et une prédiction plus fine de la dégradation naturelle *in situ* des BTEX et des composés chlorés (Peter et al., 2004; Mak et al., 2006; van Breukelen, 2007; Atteia et al., 2008; Pooley et al., 2009; Höhener & Atteia, 2010).
- apporter des contributions importantes pour vérifier de façon indépendante un modèle géochimique établi sur la base de chimie des eaux (van Breukelen et al., 2004 ; Chen et al., 2004),
- développer une meilleure connaissance des processus cinétiques en relation avec la biodégradation dans des différentes zones redox p.ex. la décomposition bactérienne de la matière organique dans les sols et la formation du méthane ou encore la réduction de sulfates (Brunner et al., 2005)

## 6. Eléments de coûts et bénéfiques associés

La caractérisation d'un site pollué avec des réponses fiables sur l'origine et le devenir des polluants organiques dans les milieux environnementaux est souvent difficile à réaliser avec les méthodes d'investigation classiques. L'analyse isotopique de composés organiques individuels (*compound-specific isotope analysis* – CSIA) propose un moyen innovateur, rapide et tangible afin d'obtenir des indications supplémentaires sur des processus qui règnent *in situ*. Les chapitres précédents illustrent bien les avantages d'application de cette approche isotopique pour la gestion des sites contaminés :

- ✓ **Caractériser les processus de l'AN.** La CSIA peut donner une réponse rapide pour différencier une simple dilution par évaporation ou dispersion d'une perte nette de polluants par transformation biotique et/ou abiotique. Une modification des rapports isotopiques d'un polluant entre sa source et les piézomètres en aval hydraulique révèle que ce polluant a subi une transformation (p.ex. figures 10, 11 et 17 du § 4.2 ReX Attena). La CSIA peut ainsi fournir une preuve tangible sur la présence d'une biodégradation des polluants *in situ*.
- ✓ **Quantifier la biodégradation *in situ*.** La CSIA peut permettre d'étudier en détail le devenir d'un polluant. La composition isotopique se modifie différemment en fonction des processus (voir figure 13 du § 4.2.1 ReX Attena). La CSIA peut ainsi différencier les mécanismes de dégradation et fournir des réponses quantitatives (p.ex. figure 14 ReX Attena).
- ✓ **Déterminer l'origine des produits organiques.** La CSIA peut permettre d'identifier les sources (figures 16 et 19 du § 4.2.2 ReX Attena), et peut vérifier s'il s'agit d'un produit initial ou d'un métabolite (montré à l'exemple des solvants chlorés § 4.1 ReX internationaux).

Etant donné que les analyses isotopiques constituent un outil supplémentaire en « 2nd-line-of-evidence » pour une preuve solide de dégradation (en cas d'absence de preuve solide offert par des analyses chimiques et microbiennes classiques, par exemple) et pour distinguer l'origine de polluants ou de métabolites (différencier un produit initial d'un métabolite de dégradation), les coûts de ce type d'étude s'ajoutent à des analyses classiques.

Les couts de base associés à l'analyse de la composition isotopique des composés organiques individuels (CSIA) peuvent être estimés entre 250€ et 550€ par élément et par échantillon. Selon la nature d'échantillon et le degré de complexité d'un site contaminé (mélanges complexes, matrices environnementales, questions posées, expertises pour l'interprétation des données, etc.) le prix d'une étude isotopique peut s'accroître.

Au regard de ces possibilités d'application de l'approche isotopique afin de déterminer l'origine et le devenir d'un polluant, le bilan coûts-avantages peut s'achever souvent positif, même si à première vue les coûts d'une investigation en incluant l'approche isotopique CSIA sont plus élevés.

Les analyses isotopiques donnent très souvent une réponse rapide et tangible sur des processus de dégradation *in situ* et peuvent, en conséquence, aider à réduire le coût

total et la durée du programme d'investigation dans le cadre d'une démonstration d'atténuation naturelle. Le gain d'informations par ce type d'analyse peut aider à limiter l'effort financier total d'une intervention, par exemple en apportant des réponses pour un meilleur positionnement des piézomètres et ainsi éviter des forages inutiles, etc. Intégrée dans un programme de surveillance, l'approche isotopique CSIA doit permettre de prendre des décisions sur la base d'informations indépendantes des concentrations en polluants, et peut ainsi aider à réduire le nombre de campagnes de prélèvements, par exemple.

## 7. Conclusion

Ce guide pour l'utilisation des méthodes isotopiques dans le cadre de la démonstration d'atténuation naturelle s'adresse aux principaux acteurs du management des sites pollués, et tout particulièrement aux décideurs sur des opérations de remédiation des sites pollués. L'objectif de ce guide est de montrer l'intérêt des analyses isotopiques de polluants organiques (CSIA) dans des études environnementales et en particulier dans le cadre d'une démonstration d'atténuation naturelle. Dans ce but le guide veut transmettre la base de connaissance sur l'outil isotopique CSIA et sur les performances de cette technique en vue d'une caractérisation complémentaire des sites contaminés, mais également de pointer les paramètres susceptibles de limiter sa faisabilité.

Dans cet objectif, le guide est organisé en mettant en lumière :

- L'état de l'art international de la technique, basée sur une revue bibliographique des articles scientifiques publiés
- Les principes de mise en œuvre opérationnelle, incluant les pré-requis nécessaires à l'analyse, ainsi que les précautions à prendre en termes d'échantillonnage et d'analyse
- Des illustrations des apports de l'analyse isotopique, issues de retours d'expérience internationaux ou de travaux originaux effectués dans le cadre du projet ATTENA
- Des éléments de coûts et de bénéfices associés permettant d'évaluer l'intérêt de l'utilisation de la technique

Les analyses isotopiques effectuées dans le cadre du projet ATTENA ont mis en évidence l'existence de processus de dégradation pour les BTEX et les HAP sur les deux sites étudiés au cours du projet. La technique a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette dégradation, de détecter l'existence de différentes sources de pollution, voire de quantifier les taux de dégradation pour les polluants considérés.

Il existe, des retours d'expériences internationaux concernant l'utilisation de la CSIA dans la démonstration de processus de dégradation pour les solvants chlorés.

Cette technique semble donc prometteuse pour la gestion des sites et sols pollués, en particulier dans le cas des polluants organiques. Elle pourrait, à terme trouver son application aussi bien :

- dans des études de démonstration d'atténuation naturelle et dans le suivi des performances de traitement in-situ (biologiques ou chimiques), puisqu'elle peut permettre de démontrer qu'une dégradation est effective sur un site,
- dans des études de forensie environnementale, puisque la technique permet de remonter à l'origine, ou à la source de polluant, et donc de discriminer entre plusieurs sources potentielles dans le cas de sites multi-sources (zones industrielles par exemple).

Les étapes pour favoriser la dissémination et le recours à l'utilisation de l'analyse isotopique CSIA portent :

- vers les laboratoires prestataires, dans la mesure où la CSIA est en France encore cantonnée aux laboratoires de recherche. Il est par conséquent encore difficile aujourd'hui à un acheteur de CSIA de trouver un laboratoire capable de lui fournir les analyses demandées et leur interprétation.
- vers les donneurs d'ordre et les bureaux d'étude, qui n'ont pas tous aujourd'hui la connaissance des apports de ce type d'analyse pour les aider dans la gestion de leurs sites.



## 8. Bibliographie

- Aelion C.M., Höhener P., Hunkeler D., Aravena R., 2010. *Environmental Isotopes in Biodegradation and Bioremediation*. 450pp., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Atteia O., Franceschi M., Dupuy A., 2008. Validation of reactive model assumptions with isotope data: Application to the Dover case. *Environmental Science & Technology*, 42: 3289-3295.
- Beneteau K.M., Aravena R., Frape S.K., 1999. Isotopic characterization of chlorinated solvents- laboratory and field results. *Organic Geochemistry*, 30: 739-753.
- Bergmann F.D., Abu Laban N.M.F.H. Meyer A.H., Elsner M., Meckenstock R.U., 2011. Dual (C, H) Isotope Fractionation in Anaerobic Low Molecular Weight (Poly)aromatic Hydrocarbon (PAH) Degradation: Potential for Field Studies and Mechanistic Implications. *Environmental Science & Technology*, 45: 6947-6953.
- Blessing M., 2008. Compound-specific isotope analysis to delineate the sources and fate of organic contaminants in complex aquifer systems. Dissertation, pp.127, Universität Tübingen.
- Blessing M., Jochmann M.A., Schmidt T.C., 2008. Pitfalls in compound-specific isotope analysis of environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390: 591-603.
- Blessing M., Schmidt T.C., Dinkel R., Haderlein S.B., 2009. Delineation of Multiple Chlorinated Ethene Sources in an Industrialized Area-A Forensic Field Study Using. *Environmental Science & Technology*, 43: 2701-2707.
- Bouchard D., Hunkeler D., Höhener P., 2008. Carbon isotope fractionation during aerobic biodegradation of n-alkanes and aromatic compounds in unsaturated sand. *Organic Geochemistry* 39: 23-33.
- Brunner B., Bernasconi S.M., Kleikemper J., Schroth M.H., 2005. A model for oxygen and sulfur isotope fractionation in sulfate during bacterial sulfate reduction processes. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 69: 4773-4785.
- Chartrand M.M.G., Morrill P.L., Lacrampe-Couloume G., Sherwood Lollar B., 2005. Stable isotope evidence for biodegradation of chlorinated ethenes at a fractured bedrock site. *Environmental Science & Technology*, 39: 4848-4856.
- Chen D.J.Z. and MacQuarrie K.T.B., 2004. Numerical simulation of organic carbon, nitrate, and nitrogen isotope behavior during denitrification in a riparian zone. *Journal of Hydrology*, 293: 235-254.
- Cichocka D., Siegert M., Imfeld G., Andert J., Beck K., Diekert G., Richnow H.H., Nijenhuis I., 2007. Factors controlling the carbon isotope fractionation of tetra- and trichloroethene during reductive dechlorination by *Sulfurospirillum* ssp and *Desulfitobacterium* sp strain PCE-S. *Fems Microbiology Ecology*, 62: 98-107.
- Cichocka D., Imfeld G., Richnow H.H., Nijenhuis I., 2008. Variability in microbial carbon isotope fractionation of tetra- and trichloroethene upon reductive dechlorination. *Chemosphere*, 71: 639-648.
- Colberg P.J.S. and Young L.Y., 1995. Anaerobic degradation of nonhalogenated homocyclic aromatic compounds coupled with nitrate, iron, or sulfate reduction. In: *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Young L.Y. & Cerniglia C.E. (eds). p. 307-330, John Wiley & Sons Inc: New York, NY.
- Dempster H.S., Sherwood Lollar B., Feenstra S., 1997. Tracing organic contaminants in groundwater: A new methodology using compound-specific isotopic analysis. *Environmental Science & Technology*, 31: 3193-3197.
- Elsner M., Zwank L., Hunkeler D., Schwarzenbach R.P., 2005. A new concept linking observable stable isotope fractionation to transformation pathways of organic pollutants. *Environmental Science & Technology*, 39: 6896-6916.
- Elsner M., 2010. Stable isotope fractionation to investigate natural transformation mechanisms of organic contaminants: principles, prospects and limitations. *Journal of Environmental Monitoring*, 12: 2005-2031.
- Elsner M., Jochmann M.A., Hofstetter T.B., Hunkeler D., Bernstein A., Schmidt T.C., Schimmelmann A., 2012. Current challenges in compound-specific stable isotope analysis

- of environmental organic contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403: 2471-2491.
- Fischer A., Theuerkorn K., Stelzer N., Gehre M., Thullner M., Richnow H.H., 2007. Applicability of stable isotope fractionation analysis for the characterization of benzene biodegradation in a BTEX-contaminated aquifer. *Environmental Science & Technology* 41: 3689-3696.
- Griebler C., Safinowski M., Vieth A., Richnow H.H., Meckenstock R.U., 2004. Combined application of stable carbon isotope analysis and specific metabolites determination for assessing in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a tar oil-contaminated aquifer. *Environmental Science & Technology*, 38: 617-631.
- Hammer B.T., Kelley C.A., Coffin R.B., Cifuentes L.A., Mueller J.G., 1998.  $\delta$  C-13 values of polycyclic aromatic hydrocarbons collected from two creosote-contaminated sites. *Chemical Geology*, 152: 43-58.
- Hirschorn S.K., Grostern A., Lacrampe-Couloume G., Edwards E.A., MacKinnon L., Repta C., Major D.W., Sherwood Lollar B., 2007. Quantification of biotransformation of chlorinated hydrocarbons in a biostimulation study: Added value via stable carbon isotope analysis. *Journal of Contaminant Hydrology*, 94: 249-260.
- Hofstetter T.B., Schwarzenbach R.P., Bernasconi S.M., 2008. Assessing Transformation Processes of Organic Compounds Using Stable Isotope Fractionation. *Environmental Science & Technology*, 42: 7737-7743.
- Hofstetter T.B. and Berg M., 2011. Assessing transformation processes of organic contaminants by compound-specific stable isotope analysis. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 30: 618-627.
- Höhener P. and Atteia O., 2010. Multidimensional analytical models for isotope ratios in groundwater pollutant plumes of organic contaminants undergoing different biodegradation kinetics. *Advances in Water Resources* 33: 740-51.
- Hunkeler D., Aravena R., Butler B.J., 1999. Monitoring microbial dechlorination of tetrachloroethene (PCE) in groundwater using compound-specific stable carbon isotope ratios: Microcosm and field studies. *Environmental Science & Technology*, 33: 2733-2738.
- Hunkeler D. and Aravena R., 2000. Determination of compound-specific carbon isotope ratios of chlorinated methanes, ethanes, and ethenes in aqueous samples. *Environmental Science & Technology*, 34: 2839-2844.
- Hunkeler D., Anderson N., Aravena R., Bernasconi S.M., Butler B.J., 2001. Hydrogen and carbon isotope fractionation during aerobic biodegradation of benzene. *Environmental Science & Technology*, 35: 3462-3467.
- Hunkeler D., Aravena R., Cox E., 2002. Carbon isotopes as a tool to evaluate the origin and fate of vinyl chloride: Laboratory experiments and modeling of isotope evolution. *Environmental Science & Technology*, 36: 3378-3384.
- Hunkeler D., Chollet N., Pittet X., Aravena R., Cherry J.A., Parker B.L., 2004. Effect of source variability and transport processes on carbon isotope ratios of TCE and PCE in two sandy aquifers. *Journal of Contaminant Hydrology*, 74: 265-282.
- Hunkeler D., Meckenstock R.U., Sherwood Lollar B., Schmidt T.C., Wilson J.T., 2008. A Guide for Assessing Biodegradation and Source Identification of Organic Ground Water Contaminants Using Compound-Specific Isotope Analysis (CSIA); 82 pp; US-EPA/600/R-08/148; December 2008
- Jochmann M.A., Blessing M., Haderlein S.B., Schmidt T.C., 2006. A new approach to determine method detection limits for compound-specific isotope analysis of volatile organic compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20: 3639-3648.
- Kuder T., Wilson J.T., Kaiser P., Kolhatkar R., Philp P., Allen J., 2005. Enrichment of stable carbon and hydrogen isotopes during anaerobic biodegradation of MTBE: Microcosm and field evidence. *Environmental Science & Technology*, 39: 213-220.
- Lerner et al., 2005. CORONA - Confidence in forecasting of natural attenuation as a risk-based groundwater remediation strategy, Final report of the EU research project EVK1-2001-00087, pp. 25, University of Sheffield, UK.
- Mak K.S., Griebler C., Meckenstock R.U., Liedl R., Peter A., 2006. Combined application of conservative transport modelling and compound-specific carbon isotope analyses to assess in situ attenuation of benzene, toluene, and o-xylene. *Journal of Contaminant Hydrology*, 88: 306-320.
- Mancini S.A., Lacrampe-Couloume G., Jonker H., Van Breukelen B.M., Groen J., Volkering F., Sherwood Lollar B., 2002. Hydrogen isotopic enrichment: An indicator of biodegradation at

- a petroleum hydrocarbon contaminated field site. *Environmental Science & Technology*, 36: 2464-2470.
- Mancini S.A., Ulrich A.C., Lacrampe-Couloume G., Sleep B., Edwards E.A., Sherwood Lollar B., 2003. Carbon and hydrogen isotopic fractionation during anaerobic biodegradation of benzene. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 191-198.
- Mancini S.A., Devine C.E., Elsner M., Nandi M.E., Ulrich A.C., Edwards E.A., Sherwood Lollar B., 2008. Isotopic Evidence Suggests Different Initial Reaction Mechanisms for Anaerobic Benzene Biodegradation. *Environmental Science & Technology*, 42: 8290-8296.
- Mazeas L. and Budzinski H., 2002. Molecular and stable carbon isotopic source identification of oil residues and oiled bird feathers sampled along the Atlantic coast of France after the Erika oil spill. *Environmental Science & Technology*, 36: 130-137.
- Meckenstock R.U., Morasch B., Warthmann R., Schink B., Annweiler E., Michaelis W., Richnow H.H., 1999. C-13/C-12 isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environmental Microbiology*, 1: 409-414.
- Meckenstock R.U., Morasch B., Griebler C., Richnow H.H., 2004. Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *Journal of Contaminant Hydrology*, 75: 215-255.
- Meier-Augenstein W., 1999. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 842: 351-371.
- Mikolajczuk A., Geypens B., Berglund M., Taylor P., 2009. Use of a temperature-programmable injector coupled to gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry for compound-specific carbon isotopic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23: 2421-2427.
- Morasch B., Richnow H.H., Schink B., Meckenstock R.U., 2001. Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: Mechanistic and environmental aspects. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4842-4849.
- Morasch B., Richnow H.H., Vieth A., Schink B., Meckenstock R.U., 2004. Stable isotope fractionation caused by glycol radical enzymes during bacterial degradation of aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2935-2940.
- Morrill P.L., Lacrampe-Couloume G., Slater G.F., Sleep B.E., Edwards E.A., McMaster M.L., Major D.W., Sherwood Lollar B., 2005. Quantifying chlorinated ethene degradation during reductive dechlorination at Kelly AFB using stable carbon isotopes. *Journal of Contaminant Hydrology*, 76: 279-293.
- O'Malley V.P., Abrajano T.A., Hellou J., 1994. Determination of the C-13 C-12 Ratios of Individual PAH from Environmental Samples - Can PAH Sources be Apportioned. *Organic Geochemistry*, 21: 809-822.
- Peter A., Steinbach A., Liedl R., Ptak T., Michaelis W., Teutsch G., 2004. Assessing microbial degradation of o-xylene at field-scale from the reduction in mass flow rate combined with compound-specific isotope analyses. *Journal of Contaminant Hydrology*, 71: 127-154.
- Pooley K.E., Blessing M., Schmidt T.C., Haderlein S.B., MacQuarrie K.T.B., Prommer H., 2009. Aerobic Biodegradation of Chlorinated Ethenes in a Fractured Bedrock Aquifer: Quantitative Assessment by Compound-Specific Isotope Analysis (CSIA) and Reactive Transport Modeling. *Environmental Science & Technology*, 43: 7458-7464.
- Richnow H.H., Meckenstock R.U., Reitzel L.A., Baun A., Ledin A., Christensen T.H., 2003. In situ biodegradation determined by carbon isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an anaerobic landfill leachate plume (Vejen, Denmark). *Journal of Contaminant Hydrology*, 64: 59-72.
- Rogers K.M. and Savard M.M., 1999. Detection of petroleum contamination in river sediments from Quebec City region using GC-IRMS. *Organic Geochemistry*, 30: 1559-1569.
- Schmidt T.C., Zwank L., Elsner M., Berg M., Meckenstock R.U., Haderlein S.B., 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. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 283-300.
- Sessions A.L., 2006. Isotope-ratio detection for gas chromatography. *Journal of Separation Science*, 29: 1946-1961.
- Sherwood Lollar B., Slater G.F., Sleep B., Witt M., Klecka G.M., Harkness M., Spivack J., 2001. Stable carbon isotope evidence for intrinsic bioremediation of tetrachloroethene and trichloroethene at area 6, Dover Air Force Base. *Environmental Science & Technology*, 35: 261-269.

- Sherwood Lollar B., Hirschorn S.K., Chartrand M.M.G., Lacrampe-Couloume G., 2007. An approach for assessing total instrumental uncertainty in compound-specific carbon isotope analysis: Implications for environmental remediation studies. *Analytical Chemistry*, 79: 3469-3475.
- Slater G.F., 2003. Stable isotope forensics - When isotopes work. *Environmental Forensics*, 4: 13-23.
- Slenders et al., 2005. Monitored Natural Attenuation – demonstration and review of the applicability of MNA at 8 field sites, Part I: NICOLE Main Report, pp. 73, TNO, Apeldoorn, The Netherlands.
- Smallwood B.J., Philp R.P., Burgoyne T.W., Allen J.D., 2001. The use of stable isotopes to differentiate specific source markers for MTBE. *Environmental Forensics*, 2: 215-221.
- Smallwood B.J., Philp R.P., Allen J.D., 2002. Stable carbon isotopic composition of gasolines determined by isotope ratio monitoring gas chromatography mass spectrometry. *Organic Geochemistry*, 33: 149-159.
- Song D.L., Conrad M.E., Sorenson K.S., Alvarez-Cohen L., 2002. Stable carbon isotope fractionation during enhanced in situ bioremediation of trichloroethene. *Environmental Science & Technology*, 36: 2262-2268.
- Sun C.G., Cooper M., Snape C.E., 2003. Use of compound-specific delta C-13 and delta D stable isotope measurements as an aid in the source apportionment of polyaromatic hydrocarbons. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17: 2611-2613.
- Thullner M., Centler F., Richnow H.H., Fischer A., 2012. Quantification of organic pollutant degradation in contaminated aquifers using compound specific stable isotope analysis - Review of recent developments. *Organic Geochemistry* 42: 1440-1460.
- van Breukelen B.M., Griffioen J., Roling W.F.M., van Verseveld H.W., 2004. Reactive transport modelling of biogeochemical processes and carbon isotope geochemistry inside a landfill leachate plume. *Journal of Contaminant Hydrology*, 70: 249-269.
- van Breukelen B.M., Hunkeler D., Volkering F., 2005. Quantification of sequential chlorinated ethene degradation by use of a reactive transport model incorporating isotope fractionation. *Environmental Science & Technology*, 39: 4189-4197.
- van Breukelen B.M., 2007. Extending the Rayleigh equation to allow competing isotope fractionating pathways to improve quantification of biodegradation. *Environmental Science & Technology*, 41: 4004-4010.
- van Breukelen B.M. and Prommer H., 2008. Beyond the Rayleigh equation: Reactive transport modeling of isotope fractionation effects to improve quantification of biodegradation. *Environmental Science & Technology*, 42: 2457-2463.
- VanStone N., Przepiora A., Vogan J., Lacrampe-Couloume G., Powers B., Perez E., Mabury S., Sherwood Lollar B., 2005. Monitoring trichloroethene remediation at an iron permeable reactive barrier using stable carbon isotopic analysis. *Journal of Contaminant Hydrology*, 78: 313-325.
- Vieth A., Muller J., Strauch G., Kastner M., Gehre M., Meckenstock R.U., Richnow H.H., 2003. In-situ biodegradation of tetrachloroethene and trichloroethene in contaminated aquifers monitored by stable isotope fractionation. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 39: 113-124.
- Vogt C., Cyrus E., Herklotz I., Schlosser D., Bahr A., Herrmann S., Richnow H.H., Fischer A., 2008. Evaluation of Toluene Degradation Pathways by Two-Dimensional Stable Isotope Fractionation. *Environmental Science & Technology*, 42: 7793-7800.
- Volkering et al., 2009. ENACT - Extending the Monitored Natural Attenuation Toolbox for Chlorinated Solvents, Project No. SN-01/24, Final Research Report, pp. 26, Tauw bv, The Netherlands.
- Wabbels et al., 2008. Leitfaden Natürliche Schadstoffminderungsprozesse bei mineralölkontaminierten Standorten, BMBF-Förderschwerpunkt KORA, pp.222, Universität Tübingen.
- Ward J.A.M., Ahad J.M.E., Lacrampe-Couloume G., Slater G.F., Edwards E.A., Sherwood Lollar B., 2000. Hydrogen isotope fractionation during methanogenic degradation of toluene: Potential for direct verification of bioremediation. *Environmental Science & Technology*, 34: 4577-4581.
- Yanik P.J., O'Donnell T.H., Macko S.A., Qian Y., Kennicutt M.C., 2003. Source apportionment of polychlorinated biphenyls using compound specific isotope analysis. *Organic Geochemistry*, 34: 239-251.

- Zwank L., Berg M., Schmidt T.C., Haderlein S.B., 2003. Compound-specific carbon isotope analysis of volatile organic compounds in the low-microgram per liter range. *Analytical Chemistry*, 75: 5575-5583.
- Zwank L., Berg M., Elsner M., Schmidt T.C., Schwarzenbach R.P., Haderlein S.B., 2005. New evaluation scheme for two-dimensional isotope analysis to decipher biodegradation processes: Application to groundwater contamination by MTBE. *Environmental Science & Technology*, 39: 1018-1029.



## Annexe 1

### Liste des abbreviations

BTEX : hydrocarbures aromatiques volatils benzène, toluène éthylebenzène et les xylènes

COHV : composés organiques halogénés volatils

COV : composés organiques volatils

CSIA : compound-specific isotope analysis – analyse isotopique des composés spécifiques par GC-C/TC-IRMS

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

MNA : monitored natural attenuation – atténuation naturelle surveillée

MTBE : méthyl tert-butyl éther

AN : atténuation naturelle

PCE : perchloroéthylène ou tétrachloroéthylène

TBA : tert-butylalcohol

TCE : trichloroéthylène









## Annexe 2

### Facteurs d'enrichissement ( $\epsilon$ )

Tableau 2-1 : Données de la littérature sur des valeurs de  $\epsilon$  pour la biodégradation de benzène en fonction des mécanismes/conditions.

Conditions	Type de microorganisme	carbon		hydrogen		Reference
		$\epsilon$ [‰]	$\pm$ [‰]	$\epsilon$ [‰]	$\pm$ [‰]	
aerobic	Acinetobacteria sp.	-1.5	0.1	-13	1	Hunkeler et al. 2001
	Burkholderia sp.	-3.5	0.3	-11	2	Fischer et al. 2008
	Rh.opacus B-4	-1.3	0.2	n.f.	5	
	P. putida ML2	-0.7	0.1	n.f.	5	
	R. pickettii PKO1	-1.7	0.2	-11	4	
	C. necator ATCC 17697	-4.3	0.4	-17	11	
	A. dentitrificans strain BC	-2.6	0.8	-16	4	
microcosm (sand)	-1.4		n.d.		Bouchard et al. 2008	
chlorate-reducing	A. dentitrificans strain BC	-1.5	0.5	-18	6	Fischer et al. 2008
nitrate-reducing	enrichment culture	-2.4	0.1	-29	4	Mancini et al. 2003
	enrichment culture	-2.2	0.4	-35	6	Mancini et al. 2008
	enrichment culture	-2.6	0.6	-47	11	
	enrichment culture	-2.8	0.6	-47	4	
	enrichment culture	-1.9	0.7	-31	7	
iron-reducing	enrichment culture BF	-3	0.5	-56	8	Bergmann et al. 2011
sulfate-reducing	enrichment culture	-3.6	1.4	-79	11	Mancini et al. 2003
	mixed culture	-1.9	0.3	-59	10	Fischer et al. 2008
	microcosm (sand)	-2.9	1.1	-75	26	Fischer et al. 2009
	enrichment culture BPL	-2.5	0.2	-55	4	Bergmann et al. 2011
methanogenic	enrichment culture	-2	0.1	-58	6	Mancini et al. 2003
	enrichment culture	-1.1	0.1	-38	6	Mancini et al. 2008
	enrichment culture	-0.8	0.2	-34	8	

Tableau 2-2 : Données de la littérature sur des valeurs de  $\epsilon$  pour la biodégradation de toluène en fonction des mécanismes/conditions.

Conditions	Type de microorganisme	carbon		hydrogen		Reference
		$\epsilon$ [‰]	$\pm$ [‰]	$\epsilon$ [‰]	$\pm$ [‰]	
aerobic	R. pickettii PKO1	-1.1	0.2	lb		Morasch et al. 2002
	P. putida strain F1	-0.4	0.3	lb		
	P. putida strain mt-2	-3.3	0.3	lb		
	P. putida strain mt-2	-2.6	0.2	n.d.		Meckenstock et al. 1999
	P. putida strain mt-2 (high Fe)	-1.7	0.1	-77	4	Mancini et al. 2006
	P. putida strain mt-2 (low Fe)	-2.5	0.3	-159	11	
	P. putida strain mt-2	-2.8	0.2	-140	8	Vogt et al. 2008
	R. opacus B-4	-1.8	0.3	-2	5	
	C. sphaerospermum	-0.4	0.2	-8.6	3.7	
	microcosm	n.f.		n.d.		Sherw.Lollar et al. 1999
microcosm (sand)	-0.8		n.d.		Bouchard et al. 2008	
nitrate-reducing	T. aromatica strain K172	-1.7	0.2	n.d.		Meckenstock et al. 1999
	T. aromatica	-2.7	0.1	-35	14	Vogt et al. 2008
	Azoarcus T	-6.2	1.1	-79	21	
	Azoarcus EbN1	-3.8	0.5	-58	10	
iron-reducing	Geobacter metallireducens	-1.8	0.3	n.d.		Meckenstock et al. 1999
anoxicphototrophic	B. sulfoviridis	-4	0.5	-23	6	Vogt et al. 2008
sulfate-reducing	Strain TRM1	-1.7	0.2	n.d.		Meckenstock et al. 1999
	Strain TRM1			-728		Morasch et al. 2001
	Strain TRM1	-2	0.2	-66	19	Vogt et al. 2008
	D. cetonicum			-198		Morasch et al. 2001
	D. cetonicum	-2.4	0.2	-74	7	Vogt et al. 2008
	microcosm	-1.5	0.2	n.d.		Meckenstock et al. 1999
	enrichment culture	-0.8		n.d.		Ahad et al. 2000
	enrichment culture	-2.8	0.2	-87	6	Vogt et al. 2008
methanogenic	enrichment culture	-0.5		n.d.		Ahad et al. 2000
	enrichment culture			-12 to-65		Ward et al. 2000

Tableau 2-3 : Données de la littérature sur des valeurs de  $\epsilon$  pour la biodégradation de naphthalène en fonction des mécanismes/conditions.

Conditions	Type de microorganisme	carbon		hydrogen		Reference
		$\epsilon$ [‰]	$\pm$ [‰]	$\epsilon$ [‰]	$\pm$ [‰]	
aerobic	P. putida strain NCIB9816	-0.1	0.2	lb		Morasch et al. 2002
sulfate-reducing	pure culture Naph S2	-0.3	0.1	-43	6	Bergmann et al. 2011
	enrichment culture N47	-2	0.4	-59	8	
	enrichment culture N47	-1.1	0.4	n.d.		Griebler et al. 2004

Tableau 2-4 : Données de la littérature sur des valeurs de  $\epsilon$  pour la biodégradation de perchloroéthylène (PCE) en fonction des mécanismes/conditions.

Conditions	Type de microorganisme	carbon		chlorine		Reference
		$\epsilon$ [‰]	$\pm$ [‰]	$\epsilon$ [‰]	$\pm$ [‰]	
anaerobic	Sulfurospirillum multivorans	-0.4	0.1			Nijenhuis et al. 2005
	Sulfurospirillum multivorans	-1.3	0.1			Liang et al. 2007
	Sulfurospirillum halorespirans	-0.5	0.2			Cichocka et al. 2007
	Desulfitobacterium sp strain PCE-S	-5.2	0.5			Nijenhuis et al. 2005
	Desulfitobacterium sp strain Viet1	-16.7	4.5			Cichocka et al. 2008
	D. michiganensis strain BB1	-1.4	0.2			Liang et al. 2007
	D. michiganensis	n.f.				Cichocka et al. 2008
	G. lovleyi strain SZ	n.f.				
	D. ethenogenes strain 195	-6	0.7			Hunkeler et al. 1999
	microcosm	-2				
	enrichment culture KB-1 (methanol)	-5.5	0.8			Slater et al. 2001
	enrichment culture TP (butyricacid)	-5.2	0.3			
	enrichment culture TP (ethanol)	-2.7	0.9			Liang et al. 2007
	enrichment culture BDI	-7.1	0.7			
	strain T (sulfate-reducing)	n.d.		-9		Numata et al. 2002
enrichment culture F (nitrate-reducing)	n.d.		-13			
enrichment culture N	n.d.		-10			

Tableau 2-5 : Données de la littérature sur des valeurs de  $\epsilon$  pour la biodégradation de trichloroéthylène (TCE) en fonction des mécanismes/conditions.

Conditions	Type de microorganisme	carbon		chlorine		Reference
		$\epsilon$ [‰]	$\pm$ [‰]	$\epsilon$ [‰]	$\pm$ [‰]	
aerobic	B. cepaciastrain G4	-18.2	0.7			Barth et al. 2002
	Me. trichosporium OB3b	-1.1	0.3			Chu et al. 2004
anaerobic	D. michiganensis strain BB1	-4.1	0.5			Liang et al. 2007
	D. michiganensis	-3.5	0.2			Cichocka et al. 2008
	Sulfurospirillum multivorans	-12.8	1.6			Liang et al. 2007
	Sulfurospirillum multivorans	-18.7	4.2			Cichocka et al. 2007
	Sulfurospirillum multivorans	-16.4	1.5			Lee et al. 2007
	Sulfurospirillum halorespirans	-18.9	0.1			Cichocka et al. 2007
	Sulfurospirillum sp.	-18.8	0.6			Aeppli et al. 2009
	Desulfitobact. sp strain PCE-S	-12.2	2.3			Cichocka et al. 2007
	D. ethenogenes strain 195	-9.6	0.4			Lee et al. 2007
	D. ethenogenes strain 195	-13.7	1.8			Cichocka et al. 2008
	D. restrictus strain PER-K23	-3.3	0.3			Lee et al. 2007
	G. lovleyi strain SZ	-8.5	0.6			Cichocka et al. 2008
	microcosm	-4				Hunkeler et al. 1999
	enrichment culture	-7.1				Sherw.Lollar et al. 1999
	enrichment culture KB-1 (methanol)	-6.6 / -2.5				Bloom et al. 2000
	enrichment culture KB-1 (methanol)	-13.8	0.7			Slater et al. 2001
	Dehalococc.-cont. enr. cult. BDI	-15.3	0.8			Liang et al. 2007
	Dehalococc.-cont. enr. cult. ANAS	-16	0.6			Lee et al. 2007
	strain T (sulfate-reducing)	n.d.		-5.5	0.9	
	enrichment culture F (nitrate-red.)			-5.7	1	Numata et al. 2002
enrichment culture N			-5.6	0.7		

## L'ADEME EN BREF

L'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) est un établissement public sous la triple tutelle du ministère de l'Ecologie, du Développement durable, des Transports et du Logement, du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et du ministère de l'Economie, des Finances et de l'Industrie. Elle participe à la mise en œuvre des politiques publiques dans les domaines de l'environnement, de l'énergie et du développement durable.

Afin de leur permettre de progresser dans leur démarche environnementale, l'agence met à disposition des entreprises, des collectivités locales, des pouvoirs publics et du grand public, ses capacités d'expertise et de conseil. Elle aide en outre au financement de projets, de la recherche à la mise en œuvre et ce, dans les domaines suivants : la gestion des déchets, la préservation des sols, l'efficacité énergétique et les énergies renouvelables, la qualité de l'air et la lutte contre le bruit.

ADEME  
20, avenue du Grésillé  
BP 90406 | 49004 Angers Cedex 01

[www.ademe.fr](http://www.ademe.fr)

## **ABOUT ADEME**

The French Environment and Energy Management Agency (ADEME) is a public agency under the joint authority of the Ministry for Ecology, Sustainable Development, Transport and Housing, the Ministry for Higher Education and Research, and the Ministry for Economy, Finance and Industry. The agency is active in the implementation of public policy in the areas of the environment, energy and sustainable development.

ADEME provides expertise and advisory services to businesses, local authorities and communities, government bodies and the public at large, to enable them to establish and consolidate their environmental action. As part of this work the agency helps finance projects, from research to implementation, in the areas of waste management, soil conservation, energy efficiency and renewable energy, air quality and noise abatement.

[www.ademe.fr](http://www.ademe.fr).