

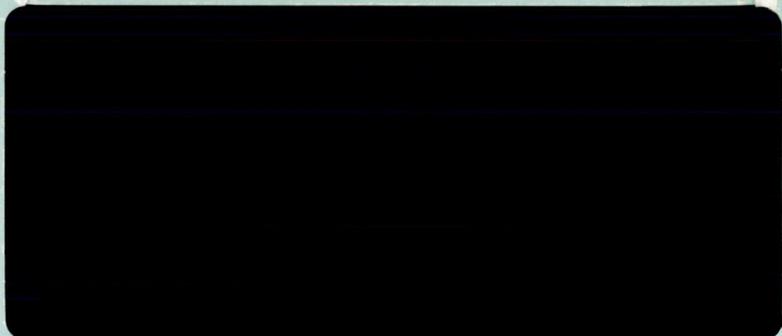


Environnement  
Canada

Environment  
Canada

Conservation et  
Protection

Conservation and  
Protection



# PLAN D'ACTION SAINT-LAURENT ST. LAWRENCE ACTION PLAN

CENTRE SAINT-LAURENT  
ST. LAWRENCE CENTRE

242006

SC350302  
S26d

SC350302  
S26d  
CSL-1831

**Développement d'un protocole de  
biotraitabilité appliqué aux  
procédés de restauration  
biologique des sols contaminés.**

**RAPPORT FINAL**

réalisé par

**Réjean Samson, Charles W. Greer**

et

**Institut de recherche en biotechnologie  
(Conseil national de la recherche du Canada)**

pour

Division des technologies d'assainissement  
Direction du développement technologique  
CENTRE SAINT-LAURENT  
Environnement Canada

Février 1992

Publié avec l'autorisation du ministre de l'Environnement du Canada  
©Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1993  
No de cat.: En153-25/1992F  
ISBN 0-66298358-0

## **AVIS DE REVISION**

Le présent document a été examiné par le Centre Saint-Laurent, Conservation et Protection, Environnement Canada, qui en a autorisé la publication. Cette autorisation ne signifie pas nécessairement que son contenu reflète les opinions et les politiques du Ministère. Les mentions de marque de commerce ou de produits commerciaux ne signifient aucunement que leur utilisation est recommandée.

## **COMMENTAIRES DES LECTEURS**

Veillez adresser vos commentaires sur le contenu du présent document à la Direction du Développement technologique, Centre Saint-Laurent, Conservation et Protection, Environnement Canada, 105 rue McGill, Montréal (Québec) H2Y 2E7.

<b>Table des matières</b>	<b>Page</b>
<b>1- Résumé</b>	<b>3</b>
<b>2- Description du mandat</b>	<b>4</b>
<b>3- Problématique</b>	<b>4</b>
3.1 Biodégradabilité des polluants organiques	5
3.2 Facteurs environnementaux limitant la biodégradation	7
3.3 Protocole d'évaluation de la biotraitabilité d'un sol contaminé	10
<b>4- Description de la méthodologie</b>	<b>11</b>
4.1 Analyse chimique du sol	12
4.2 Analyse génétique des microorganismes du sol	13
4.3 Minéralisation de polluants témoins	15
4.4 Activité biologique dans le sol contaminé	17
<b>5. Exemple d'utilisation du protocole</b>	<b>18</b>
5.1 Analyse chimique des polluants	18
5.2 Caractérisation génétique des microorganismes indigènes	20
5.3 Biodégradation des hydrocarbures (Analyse respirométrique et minéralisation)	23
<b>6. Conclusions et recommandations</b>	<b>28</b>
<b>7. Remerciements</b>	<b>29</b>
<b>8. Littératures citées</b>	<b>29</b>

## 1. Résumé:

Ce travail porte sur le développement d'un protocole d'évaluation de l'applicabilité des procédés biologiques pour la restauration des sols contaminés par les hydrocarbures d'origine pétrolière. Ce protocole est conçu pour mettre en évidence l'activité des microorganismes par rapport aux pertes par des phénomènes abiotiques. Ce protocole comporte quatre tests qui lorsqu'utilisés conjointement permet de prédire avec un bon niveau de certitude le potentiel de biotraitabilité d'un sol. L'utilisation d'un tel protocole est utile dans deux circonstances, premièrement pour vérifier si un sol peut ou non être traité par des microorganismes et deuxièmement pour suivre l'évolution d'un procédé de biotraitement. Les quatre tests utilisés sont: 1- une analyse de la composition chimique des hydrocarbures par GC/MS en fonction du potentiel de biodégradation des polluants 2- la détection et la quantification des bactéries hydrocarbonoclastiques par l'utilisation de sonde biomoléculaire "gene probe". Ces sondes sont spécifiques aux microorganismes qui possèdent le matériel génétique essentiel aux réactions de biodégradation des polluants, 3- un test de minéralisation des hydrocarbures à l'aide de polluants témoins marqués au carbone-14. Ce test permet d'éviter toute ambiguïté quant au devenir du polluant car il permet d'obtenir le rendement de transformation du polluant en son produit final, le gaz carbonique, et 4- la mesure de l'activité biologique des microorganismes dans le sol par respirométrie. Ce dernier test permet d'évaluer le degré d'inhibition des microorganismes du sol par des causes associées à la nature du sol et des polluants.

La méthodologie a été testée au laboratoire avec un sol provenant d'un site contaminé par des hydrocarbures, des BPC et du plomb.

Bien qu'il soit impossible d'assurer que les données obtenues à partir d'essais effectués au laboratoire soient transposables à un site réel, des résultats positifs nous permettent de croire que l'utilisation combinée de ces quatre tests augmente la probabilité de succès sur les sites. D'un autre côté, des résultats négatifs nous assureront qu'il n'y a pas de possibilité d'utiliser la biodégradation comme technologie de traitement.

## **2. Description du mandat:**

Dans ce projet, l'Institut de recherche en biotechnologie devait mettre au point et documenter une méthodologie pour évaluer la biodégradabilité des polluants se retrouvant dans un site contaminé:

1- La nature des hydrocarbures présents dans un échantillon de sol contaminé. Les hydrocarbures seront caractérisés par spectroscopie de masse (GC/MS) dans le but de s'assurer que les composés présents sont biodégradables. Ces données nous permettront d'évaluer le temps "normal" nécessaire aux microorganismes pour dégrader les hydrocarbures présents.

2- L'IRB ayant développé une série de sondes moléculaires "gene probe" qui nous permettent de scruter le sol pour y détecter les microorganismes ayant le potentiel génétique de dégrader des composés tels les hydrocarbures aliphatiques et les aromatiques, nous nous proposons de réaliser un essai avec le sol. Ainsi dans ce projet nous fournirons des données concernant la présence de microorganismes hydrocarbonoclastiques, à la suite de la détermination du gène *xylE* et *alkB* codant pour les enzymes responsables de la biodégradation de certains hydrocarbures.

3- La détermination du potentiel de minéralisation de contaminants caractéristiques du sol à l'aide de composés marqués au carbone-14.

4- Des données sur l'activité biologique présente dans des sols contaminés. Ces tests sont réalisés à l'aide d'un respiromètre électrolytique.

## **3-Problématique:**

Les dernières années ont vu l'apparition de plusieurs compagnies intéressées dans le développement de bioprocédés de restauration des sites contaminés [17, 36, 38, 40, 48, 57]. Ainsi cette technologie s'est largement propagée en Europe et aux États-Unis. Au Canada, même si nous avons un climat très rigoureux, plusieurs compagnies ont adopté les techniques biologiques pour la restauration des sites contaminés. Toutefois, malgré le grand potentiel de la biotechnologie pour le traitement des sols contaminés, plusieurs entrepreneurs ont fait face à des difficultés insoupçonnées. Par exemple, la concentration

résiduelle en polluant obtenu à la fin d'un traitement ne rencontrait pas toujours les normes acceptables. Dans d'autre cas on s'est aperçu que le traitement était beaucoup plus long que prévu, quelque fois de l'ordre de plusieurs saisons. Dans d'autre cas, après un départ fructueux toute activité de biodégradation cessait abruptement. Ces phénomènes sont encore peu documentés. Ceci est causé par plusieurs facteurs, notamment:

- 1- L'hétérogénéité entre les sites, les types de sols et les polluants qui sont traités.
- 2- Le peu de connaissance sur les facteurs contrôlant l'activité des microorganismes dans les sols (métabolisme de destruction des polluants, biodisponibilité, activité biologique, etc.).
- 3- Le peu de contrôle de qualité concernant les essais pilotes et de grandes tailles.
- 4- L'absence d'une méthodologie apte à évaluer le potentiel de biotraitabilité d'un sol.
- 5- L'absence d'une méthodologie pour mesurer adéquatement les performances d'un système de traitement biologique des sols

### **3.1 Biodégradabilité des polluants organiques**

La biodégradation des contaminants du sol dépend non seulement du type de composés à transformer et des microorganismes indigènes présents dans le sol mais aussi des conditions environnementales existantes dans ces sols [21]. Dans plusieurs études menées au laboratoire, certaines souches de microorganismes ont montré beaucoup de potentiel pour la dégradation des hydrocarbures, des pesticides, des BPCs et des HAPs. Dans la plupart de ces travaux, des bactéries aérobies ont prouvé leur potentiel pour l'oxydation des structures aromatiques substituées et non-substituées [12, 22, 35]. De plus, certains champignons ont aussi été rapportés capables d'oxyder des produits aromatiques [14, 15]. Des données commencent à apparaître sur les mécanismes de biodégradation anaérobie [2, 43, 44, 45, 46]. Cependant plusieurs points apparaissent communs et spécifiques à la biodégradation des composés organiques toxiques. Plusieurs généralités issues de la littérature scientifique et des travaux réalisés à l'Institut de recherche en biotechnologie peuvent être résumées comme suit [5, 25, 26]:

a) la présence d'un type d'hydrocarbure peut influencer le taux de biodégradation positivement (co-métabolisme) ou négativement (effet toxique). Par exemple la présence

d'alcanes de faibles poids moléculaires relativement solubles dans l'eau accélère le taux de biodégradation. Au contraire, la présence de composés aromatiques faiblement substitués (hexane, heptane, benzène, etc.) causera un effet d'inhibition sur la majorité des souches de microorganismes.

b) l'utilisation des alcanes  $C_1$ -  $C_4$  est limitée à quelques espèces très spécifiques de microorganismes. Ces composés sont généralement considérés comme biodégradables. Ils ne causent généralement pas de problème car ils disparaissent du sol par volatilisation. Pour leur part, les  $C_5$  -  $C_9$  sont toxiques mais quelques microorganismes bien adaptés peuvent les biodégrader. Pour leur part les n-alcanes  $C_{10}$  -  $C_{22}$  sont facilement biodégradables. Les alcanes de hauts poids moléculaires (généralement sous forme de graisse et de cire) sont biodégradables mais à un faible taux de réaction. La biodégradation de composés jusqu'à  $C_{44}$  a déjà été rapportée [28, 31]. Des essais réalisés à l'IRB ont montré que des hydrocarbures de très hauts poids moléculaires  $>C_{60}$  pouvaient être biodégradés.

d) les iso-alcanes sont beaucoup moins biodégradables que les n-alcanes et la présence de substituants, particulièrement les groupes méthylés, peut réduire considérablement la biodégradation. Toutefois, les oléfines (éthylène et propylène) sont considérées toxiques sous des conditions aérobies [5].

e) les HAMs sont biodégradables mais peuvent occasionner une inhibition des microorganismes [4, 20, 27, 33, 55, 61]. À faible concentration, plusieurs microorganismes, notamment les méthylotrophes, peuvent utiliser ces composés. Les HAM sont généralement très volatils et sont souvent éliminés dans l'air avant d'être métabolisés. Certaines données récentes indiquent aussi que les microorganismes dénitrifiants peuvent dégrader les BTEXs [32].

f) Les HAP n'ayant pas plus que quatre anneaux aromatiques sont biodégradables par plusieurs bactéries et champignons [7, 29, 41, 42, 47]. Pour ces composés, les expériences montrent que le niveau de biodégradation diminue avec le nombre d'anneaux aromatiques, et que le taux de biodégradation est contrôlé par le taux de dissolution de ces composés dans la phase aqueuse du sol. Les HAPs de plus de cinq anneaux aromatiques sont très résistants aux attaques bactériennes et tendent à persister dans l'environnement [13]. Jusqu'à présent seulement quelques espèces de champignons ont montré un potentiel de transformation de ces HAPs [13, 15]. Ces transformations produisent des intermédiaires qui peuvent être toxiques [13].

g) Les cyclo-alcanes de faibles poids moléculaires peuvent être décomposés par certaines souches adaptées de microorganismes [8,18]. Toutefois les cyclo-alcanes fortement

polymérisés sont pratiquement non biodégradables.

h) Les hydrocarbures hétérocycliques constitués d'azote, de soufre et d'oxygène (NSO) sont faiblement biodégradables et nécessitent de longues périodes d'incubation [3, 9, 16, 30, 37].

i) Beaucoup d'études ont été réalisées concernant la biodégradabilité des BPCs [1, 23, 24, 39, 54]. Il en ressort que ceux-ci sont difficilement biodégradables. Généralement le taux de biodégradation diminue avec l'augmentation du pourcentage de chlore sur les molécules. Des essais ont montré que l'Aroclor 1242 pouvait être dégradé sous des conditions aérobies. Sous des conditions anaérobies, la déhalogénéation réductrice permet de diminuer le pourcentage de chlore des BPC fortement chlorés (ex: Aroclor 1254 et 1260) [10, 11, 51].

### **3.2 Facteurs environnementaux limitant la biodégradation**

Du point de vue des caractéristiques environnementales, il existe beaucoup de facteurs qui peuvent nuire au succès de la restauration d'un site contaminé.

Dans des conditions naturelles, la toxicité des hydrocarbures, des HAPs, et des HAMs couplée à leur faible taux de biodégradation, au lavage du sol par les pluies, ainsi qu'aux changements climatiques, réduit considérablement le potentiel de dégradation des microorganismes. La nature adsorptive des composés lipophiliques par la matière organique du sol est très bien documentée [2, 19, 34, 49, 53, 56, 58, 59, 60]. Ainsi, l'adsorption des HAPs et HAMs sur les sédiments organiques et inorganiques, les particules de sols, les substances huileuses et lipophiles ainsi que sur le charbon activé constitue une autre entrave à la biodégradation. Ce problème a amené certains groupes de recherche à étudier la possibilité de dégrader les contaminants du sol par voie biologique après extraction de ceux-ci par des solvants organiques ou par des surfactants. Toutefois une meilleure compréhension des mécanismes qui contrôlent la disponibilité des polluants permettra de mieux appliquer les biotechnologies à la restauration de site contaminés

Quelques études ont été réalisées pour comprendre les mécanismes de la récalcitrance et de la toxicité des produits récalcitrants. Ainsi, les microorganismes ont de la difficulté à utiliser ces produits pour les raisons suivantes:

### - manque de nutriments pour la croissance des microorganismes

Dans la plupart des sols contaminés la seule source de carbone disponible pour la croissance sont les polluants. Ces composés se retrouvent généralement en faible concentration et ne sont pas suffisants pour maintenir les microorganismes en phase exponentielle de croissance. Le même phénomène se produit pour l'oxygène qui pénètre difficilement dans le sol. Les sols sont généralement déficients en microéléments essentiels pour la croissance des microorganismes. Par exemple, le magnésium sous forme soluble est essentiel dans la phosphorylation oxydative (production d'ATP).

### - toxicité des substrats ou des métabolites secondaires

Les hydrocarbures s'ils se retrouvent en trop grande concentration sont toxiques pour les microorganismes. Par exemple, les solvants tels les BTEXs et les aliphatiques chlorés ont des effets inhibiteurs à des concentrations inférieures à 100 ppm. Certains détergents, lorsque présents dans les sols détruiront entièrement la flore bactérienne. Ceci s'applique aussi aux métaux lourds et notamment au mercure dont le seuil de toxicité pour les microorganismes est très faible (environ 50 ppm). Les métabolites produits dans les réactions biologiques peuvent aussi être des agents toxiques pour certaines espèces de bactéries. Par exemple, lors de la dégradation aérobie des chlorophénols, l'un des produits de décomposition est l'acide chlorobenzoïque. Ces acides sont très toxiques pour plusieurs espèces de bactéries du sol.

### - inaccessibilité des substrats

La nature des sols (glaise, sable, argile, etc.) rend problématique l'accessibilité du substrat et de l'oxygène aux microorganismes. On observe beaucoup de particules de sol compacté qui n'ont pas été affecté par un traitement biologique. Des moyens mécaniques doivent être utilisés pour assurer l'homogénéité des sols. Le même problème survient pour le "monitoring" des concentrations résiduelles de polluants. Les sols argileux fixent irréversiblement les molécules hydrophobiques. Il y a souvent nécessité de désorber les polluants afin qu'ils deviennent disponibles pour les microorganismes. Toutefois l'utilisation d'agents dispersants peut causer la destruction des parois cellulaires.

### - liaison du substrat avec des composés organiques résistants à la biodégradation

Dans la majorité des sols les hydrocarbures et autres polluants se retrouvent adsorbés sur des particules diverses. Par exemple, des résidus lignocellulosiques, de tourbe ou du charbon activé adsorbent les composés organiques. Dans certains cas les interactions

chimiques (liaison covalente et hydrogène) entre les molécules rendent impossibles l'action des microorganismes. Ceci est causé par le fait que la majorité des biotransformations se réalisent à l'intérieur des parois cellulaires des microorganismes et qu'un substrat adsorbé à une macromolécule ne peut migrer dans la cellule. De plus, dans le cas où des enzymes extracellulaires sont impliquées, un polluant adsorbé n'est généralement pas "reconnu" par une enzyme.

#### - empêchement des molécules à pénétrer dans les cellules

Ce problème est associé à la nature lipophile des hydrocarbures et de la majorité des composés aromatiques. Nos travaux et les données de la littérature indiquent que pour les hydrocarbures de faibles poids moléculaires et les HAPs, le taux de biodégradation est contrôlé par le taux de désorption. Ce phénomène prend de l'importance lorsque les sols sont de nature argileuse ou sont riches en matière organique. De son côté, ce phénomène de désorption serait associé à la capacité qu'ont certains microorganismes de produire des substances tensio-actives permettant une meilleure disponibilité des polluants [56].

#### - nécessité de plusieurs espèces de microorganismes

Les réactions de biodégradation de composés complexes de natures variées nécessitent la présence de plusieurs espèces différentes de microorganismes. Si le sol a été récemment contaminé, il est évident que toutes les espèces nécessaires à la biodégradation ne seront pas présentes, conduisant ainsi à une décontamination partielle. Un sol contaminé depuis plusieurs années aura probablement la flore nécessaire pour effectuer une biodégradation complète. L'adaptation, par le développement d'un écosystème spécifique à un site est la clé du succès d'un procédé de biotraitement des sols.

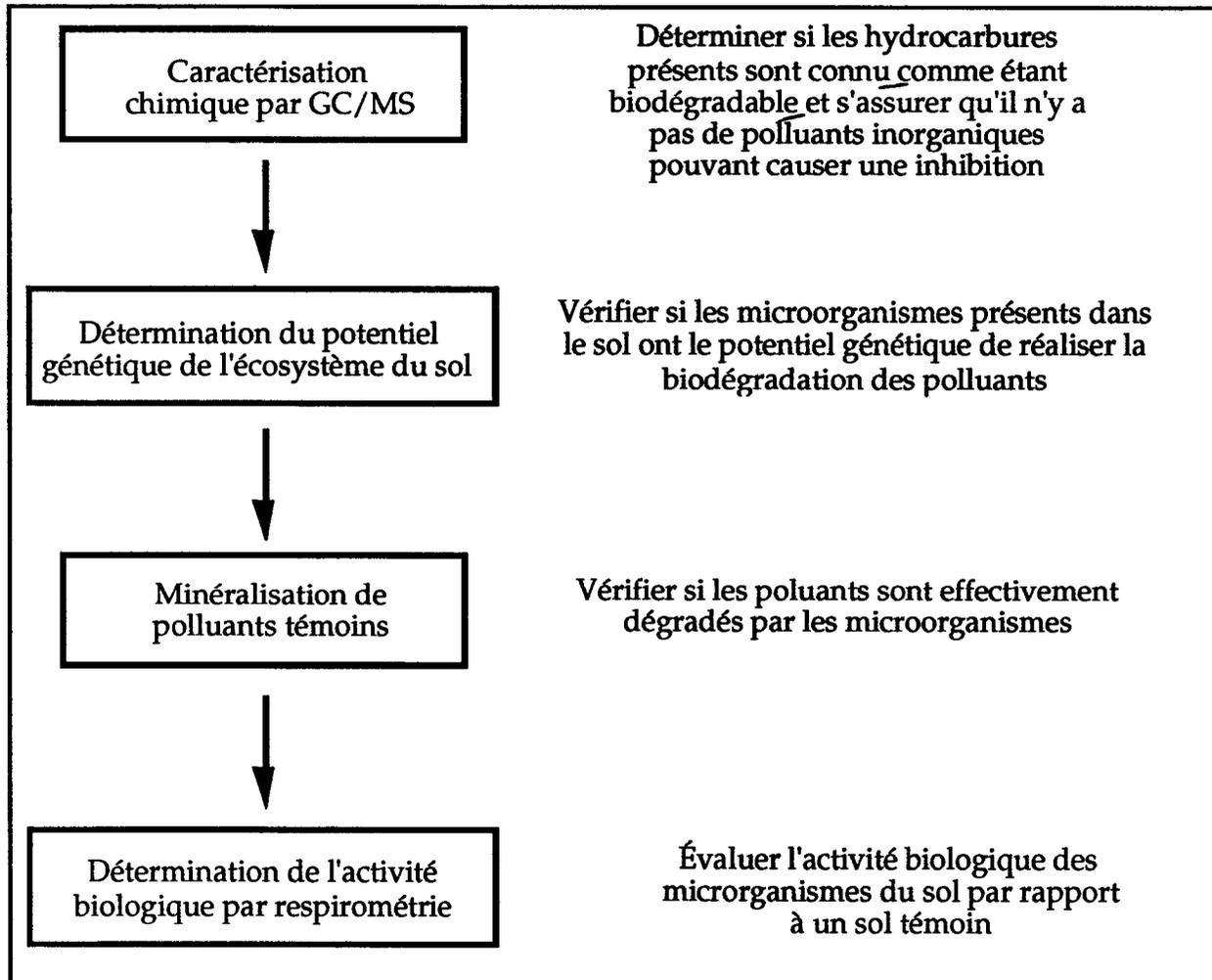
#### - prédation des bactéries par des organismes supérieurs

Les bactéries ne sont pas les seuls organismes vivants présents dans les sols. Des champignons, algues, protozoaires et métazoaires sont aussi présents. Les protozoaires se nourrissent essentiellement de bactéries. Ainsi il a été reporté qu'un seul protozoaire peut consommer plusieurs dizaines de milliers de bactéries à l'heure![50]. De plus une augmentation rapide du nombre de bactéries dans un sol est généralement suivie d'une augmentation rapide du nombre de protozoaires. Bien que la présence d'un grand nombre de protozoaires soit peu probable dans un sol très contaminé il peut être difficile de maintenir une population élevée de bactéries pour réaliser une décontamination

rapide.

### 3.3 Protocole d'évaluation de la biotraitabilité d'un sol contaminé

La figure suivante représente la démarche que nous proposons pour évaluer l'applicabilité d'un procédé biologique de restauration d'un site contaminé. Ce protocole comporte quatre étapes.



Dans un premier temps, l'analyse critique de la composition des polluants. Ainsi, tel qu'indiqué dans la section 3.1 de ce rapport, la présence de certains polluants toxiques ou récalcitrants rendra improbable l'utilisation de biotechnologies. D'un autre côté si l'analyse chimique indique la présence de polluants reconnus "biodégradables", il sera beaucoup plus facile de recommander un procédé biologique.

La deuxième étape consiste à vérifier la présence de microorganismes hydrocarbonoclastiques à l'aide de sonde moléculaire "gene probe". Ces microorganismes sont spécialisés dans la dégradation des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques et se retrouvent en très petite quantité dans les sols contaminés [5, 6]. Bien qu'il soit possible de réaliser des tests d'isolation et de caractérisation de ces microorganismes par des techniques microbiologiques standards, l'utilisation de sondes moléculaires nous permet d'obtenir très rapidement des données quantitatives sur la présence de ces microorganismes [52]. De plus, ce test n'est pas limité à l'identification d'un microorganisme en particulier mais plutôt aux microorganismes qui possèdent le potentiel génétique nécessaire à l'expression d'une série de réaction enzymatiques essentielles dans la dégradation d'un polluant.

La troisième étape du protocole consiste à évaluer s'il y a effectivement biodégradation des polluants visés. Dans ce test on ajoute à un sol contaminé des polluants marqués au carbone-14. Par exemple, dans le cas d'un sol contaminé par des huiles, on mesurera la minéralisation de l'hexadécane ( $C_{16}$ ) et du dotriacontane ( $C_{32}$ ) en  $CO_2$ . Dans le cas des sols contaminés par des hydrocarbures légers, on évaluera la minéralisation du naphthalène et du phénol. Il est évidemment possible d'utiliser un produit particulier au sol à traiter.

Le quatrième test consistera à évaluer l'activité biologique des microorganismes du sol en fonction de la disparition des hydrocarbures. Ce test est réalisé en mesurant la consommation d'oxygène d'un sol contaminé en utilisant un respiromètre électrolytique. De plus, il est possible de varier les conditions physiques et chimiques du sol afin de trouver les conditions nutritionnelles qui favoriseront l'activité biologique.

#### **4- Description de la méthodologie:**

Dans cette section nous décrivons la procédure utilisée dans les quatre tests.

4.1 Analyse chimique du sol

4.2 Caractérisation génétique des microorganismes du sol

4.3 Minéralisation de polluants témoins

4.4 Activité biologique dans le sol contaminé

## **4.1 Analyse chimique (GC/MS) et physico-chimique du sol**

### **4.1.1 - La caractérisation des hydrocarbures du sol par GC/MS**

Les échantillons préparés selon la section 4.1.2 ont été analysés par un chromatographe en phase gazeuse HP5890 couplé à un détecteur de spectrométrie de masse MSD HP5970. Le GC est équipé d'une colonne capillaire DB5 de 30 m x 0.25 mm avec une phase stationnaire de 0.25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. 1  $\mu\text{l}$  d'échantillon a été injecté et le gaz porteur était l'hélium. La température à l'injection est 275 °C et au détecteur, elle est de 340 °C. Le programme de température du four est à 50 °C pendant 5 minutes initialement. Elle est augmentée de 5 °C/min jusqu'à une température finale de 340 °C qui est maintenue pendant 27 minutes, pour une élution totale de 90 minutes.

L'identification de quelques-uns des constituants est réalisée statistiquement à partir de la librairie de spectres de masse NBS comportant quelques 40000 composés.

### **4.1.2 Analyse des huiles et graisses**

La mesure des huiles et graisses est basée sur les méthodes EPA #9071 et APHA #5520E, 5520F ET 5520C.

Des échantillons de  $20.00 \pm 0.01$  g des sols sains sont pesés dans un bécher de 100 ml, 25 g de  $\text{MgSO}_4$  anhydre est ajouté à chaque échantillon pour le sécher. L'échantillon est déposée dans une cartouche en papier pour extraction Soxhlet. L'extraction est effectuée avec du 1,1,2-trichloro-1,2,2-trifluoroéthane (TCTFE) pendant 16 heures à une vitesse approximative de 6 cycles/hr. Après l'extraction, pour enlever les composés polaires, l'échantillon est élué à travers une colonne de 10 g de gel de silice 100-200 mesh préalablement activée à 150 °C pendant 3 heures et lavée avec 25 ml de TCTFE. Le solvant est évaporé dans un évaporateur rotatif Büchi jusqu'à environ 2 ml. L'échantillon est analysé par spectrophotométrie en infra-rouge en effectuant un balayage entre 3200 et 2700  $\text{cm}^{-1}$  et en mesurant l'absorbance au pic maximum à 2930  $\text{cm}^{-1}$ . La concentration des huiles et graisses est calculée en utilisant une courbe standard effectuée avec un mélange de isooctane:hexadécane 1:1 dilué à différentes concentrations dans le TCTFE.

## 4.2 Analyse génétique des microorganismes du sol

Un échantillon représentatif de sol a été examiné pour la présence du nombre de bactéries hydrocarbonoclastiques viables. Cet essai est réalisé sur des plaques de pétri. A partir de bactéries qui se sont développées sur des membranes, l'acide déoxyribonucléique (ADN) des microorganismes du sol est extrait et purifié. L'ADN ainsi obtenu est analysé par la technique d'hybridation de l'ADN afin de déterminer s'il y a similarité avec le gène *xyIE*. Le gène *xyIE* code la production de l'enzyme catechol-2,3-dioxygénase, qui est l'enzyme centrale impliquée dans la biodégradation de composés tels le phénol, le toluène, xylène et benzène. Ce gène est aussi impliqué dans la dégradation de certains hydrocarbures aromatiques (naphthalène, phénanthrène). Cette sonde moléculaire est donc indiquée pour confirmer la présence des hydrocarbonoclastiques.

La procédure utilisée pour vérifier si l'ADN des bactéries est similaire à l'ADN du gène *xyIE* est décrite schématiquement dans la figure suivante. Ainsi, on place l'extrait d'ADN du sol sur une membrane de nitrocellulose et on y ajoute notre sonde *xyIE* marquée au phosphore-32. Si l'ADN marquée se conjugue à l'ADN du sol on peut confirmer la présence de bactéries capables de réaliser la biodégradation des hydrocarbures. L'IRB possède aussi un système qui permet l'amplification de l'ADN. Cette technique appelée "polymerase chain reaction; PCR" permet d'amplifier le signal plusieurs milliers de fois. Ceci nous permet donc de confirmer la présence de bactéries hydrocarbonoclastiques qui seraient en très petit nombre ou en phase de latence.

Plus spécifiquement nous avons réalisé les étapes suivantes. Ainsi, une masse de 5 g de sol est mélangée avec 9 ml d'une solution saline 0.85 % (P/V). Des dilutions dans la solution saline ont été effectuées et les bactéries ont été étalées sur des géloses d'agar (BBL) contenant un milieu nutritif à 275 mg/L (BBL). Les géloses ont été incubées pendant sept jours à 20 °C.

**Transfert des microorganismes sur une membrane d'hybridation**

**Culture des microorganismes**

**Isolation de l'ADN**

**Lyse des microorganismes et relargage de l'ADN**

**Depôt de l'ADN sur la membrane**

**Dénaturation de l'ADN et fixation des brins séparés sur une membrane**

**Préhybridisation pour réduire les interférences**

**Addition de la sonde ADN marquée**

**Hybridisation de l'ADN complémentaire**

**Lavage de l'excès d'ADN et détection des hybrides positifs**

**Technique d'hybridisation de l'ADN**

Après croissance, les colonies sont transférées sur une membrane de nylon. Les membranes ont ensuite été traitées de façon à lyser les cellules et fixer l'ADN. Elles sont d'abord immergées dans 2.5 ml de NaOH 0.5 M pendant 5 min, séchées par absorption, immergées dans 1.5 ml de tampon TRIS-HCl 1 M à pH 7.5 pendant 1 min, séchées par absorption, immergées à nouveau dans 1.5 ml de tampon TRIS-HCl 0.5 M contenant du NaCl 1.5 M à pH 7.5 pendant 5 min, et enfin séchées par absorption. Les membranes ont été séchées à l'air pendant 30 min, et chauffées au four sous vide à 80 °C pendant 30 min. Les débris bactériens sont enlevés en trempant les membranes dans un tampon SSC concentré 2 fois contenant du Triton X-100 0.05 %, puis en grattant avec une lame de rasoir.

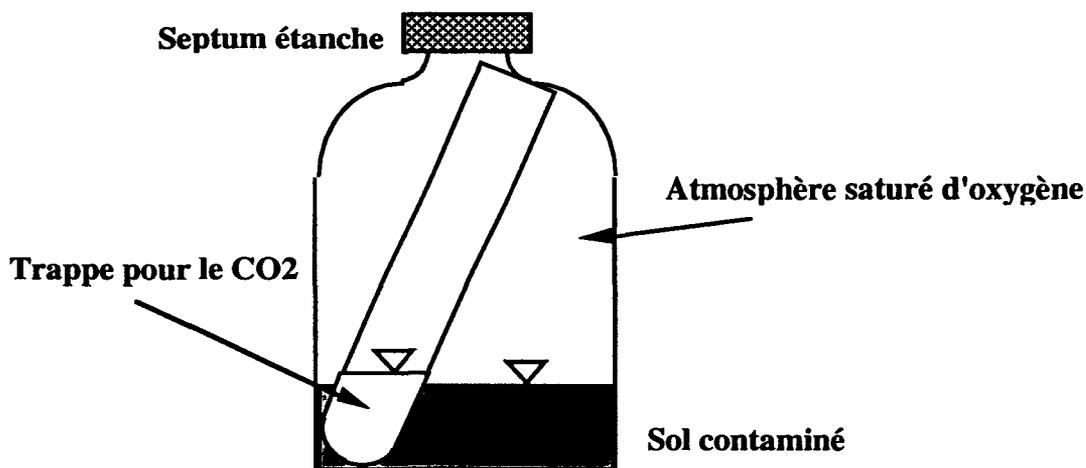
Deux sondes d'ADN ont été utilisées. La première est un fragment de 823 paires de bases de la région interne du gène *xyIE* codant pour l'enzyme catéchol-2,3-dioxygénase se trouvant sur le plasmide Tol (de *Pseudomonas putida*, ATCC 33015). Cette sonde est préparée par la réaction en chaîne de la polymérase en utilisant deux amorces d'ADN synthétique d'une taille de 30 nucléotides chacun dérivées des données publiées sur la séquence du gène *xyIE*. Le fragment constituant la sonde est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose, puis extrait et purifié du gel (technique du "GeneClean" développée par BIO 101 Inc.). Le fragment est marqué avec l'ATP-<sup>32</sup>P par la technique du marquage aléatoire (Multiprime d'Amersham). La deuxième sonde ADN utilisée est un fragment de 843 paires de bases de la région interne du gène *alkB* codant pour l'enzyme alcane-hydroxylase (de *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347).

Les membranes préparées selon les techniques décrites plus tôt sont pré-hybridées et hybridées en utilisant le protocole standard de la compagnie Bio-Rad Laboratories (Zeta-probe blotting membranes). Les membranes sont ensuite scellées dans deux sacs de plastique et exposées sur un film Kodak X-AR2 à -80 °C.

#### 4.3 Minéralisation de contaminants témoins

Pour déterminer la biodégradabilité d'un hydrocarbure, il s'agit de mettre un composé témoin dans un microcosme sous différentes conditions (ex: eau et/ou sol sous des conditions aérobies et anaérobies) et de vérifier s'il y a minéralisation de la part des microorganismes présents. Une masse de 20 g de sol sera déposée dans un microcosme

de 100 ml. Aucun élément nutritif ne sera ajouté. Les solutions d'hexadécane ( $C_{16}$ ) et de dotriacontane ( $C_{32}$ ) ont été utilisées et chaque microcosme est munie d'une trappe à  $CO_2$  constituée de 1 ml de KOH 0.5 M déposé dans un tube à l'intérieur de la bouteille (voir figure suivante).



Les microcosmes sont remplis d'oxygène pour éviter que celui-ci devienne un facteur limitant à la biodégradation et ils ont été scellés pour éviter la perte du  $CO_2$ . De l'oxygène est rajouté régulièrement durant l'expérience. Les microcosmes sont incubés à 20 °C sans agitation pendant toute la durée de l'expérience.

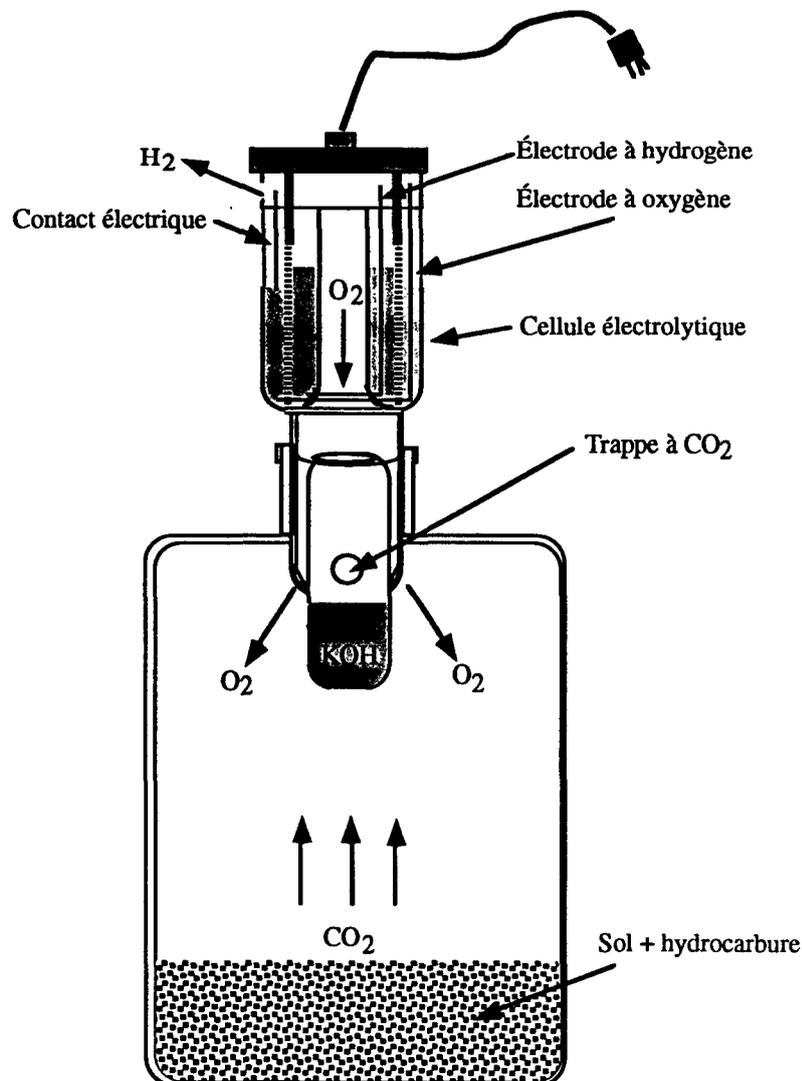
L'échantillonnage du KOH pour le comptage de la radioactivité est effectué en perçant le septum de caoutchouc avec une seringue et en aspirant la solution de KOH; de l'oxygène étant ajouté pour compenser le vide créé. Le tube contenant la trappe est rincé avec 1 ml de KOH 0.5 M, et rempli de nouveau avec 1 ml de KOH 0.5 M. Les deux fractions de KOH sont combinées et déposées dans un vial à scintillation auquel on ajoute 18 ml de liquide à scintillation (ACS, Amersham). La radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation Packard modèle Tri-Carb 4530.

La consommation des hydrocarbures par les microorganismes indigènes du sol en mettant le sol dans des microcosmes. Les courbes de consommation des hydrocarbures seront comparées à une courbe standard provenant de sol stérilisé au rayonnement Gamma.

Les essais ont été réalisés sur une période de 10 jours à une température de 20°C.

#### 4.4 Test d'activité biologique en respiromètre

La détermination de la respiration du sol est évaluée avec un respiromètre électrolytique. Cet appareil permet de mesurer en temps réel la consommation d'oxygène du sol (voir figure suivante). Une masse de 100 g de sol a été déposée dans le réacteur respirométrique de 1 L (voir figure suivante). Aucun élément nutritif n'est ajouté au sol. La consommation d'oxygène est mesurée en continu dans un respiromètre électrolytique modèle ER-100 (BioScience Management, Bethlehem, PA). À la fin de l'expérience, 20 g de sol est prélevé pour la détermination des huiles et graisses.



## 5. Exemple d'utilisation du protocole

L'exemple présenté ici provient d'essais qui ont été réalisés à partir d'un sol contaminé par des huiles qui nous a été fournies par la compagnie Biogéo Environnement. Il s'agissait ici d'un sol argileux contenant environ 20,000 ppm d'huiles et graisses minérales, 2 ppm de BPC, 900 ppm de plomb et quelques traces de HAP.

### 5.1 Analyse chimique par spectroscopie de masse

Dans cet essai le sol (16310.7 g) a été tamisé à l'état humide sur un tamis ayant des ouvertures de 4.75 mm. Les particules plus grosses que 4.75 mm ont été rejetées, ce qui représentait 67.7 % du poids total (11036.4 g). Le pH a été mesuré en agitant fortement 5 g de sol avec 5 g d'eau pendant 1 minute. Le mélange a reposé pendant 10 minutes et le pH a été mesuré dans le surnageant. La valeur initiale de pH du sol était de 7.2. Le pourcentage d'humidité du sol était de 13.13%.

L'analyse initiale des huiles et graisses par spectroscopie de masse montre que le poids moléculaire des hydrocarbures est distribué entre  $C_{12}$  et  $C_{50}$ . La plus grande partie des hydrocarbures se retrouvait entre  $C_{24}$  et  $C_{40}$ . De plus, nos analyses indiquent qu'il y a présence de HAP de poids moléculaire moyen. La concentration des hydrocarbures non polaires après extraction par Soxhlet et mesure au détecteur infra-rouge nous indique que ce sol contenait environ 21,200 ppm. On observe une masse non résolue d'hydrocarbures très diversifiés comprenant des alcanes linéaires, des alcanes branchés, des aromatiques et même des traces de HAP. L'analyse de tous les composés présents dans l'échantillon serait impossible malgré purification de l'extrait toutefois, nous avons retrouvé du tétracontane ( $C_{40}$ ), du benzothiophène, du benzopérylène et du tétracosane. De plus, les chromatogrammes obtenus par GC/MS (après 70 minutes) indiquent clairement l'élution de composés de très hauts poids moléculaires ( $>C_{40}$ ) (Figure 2).

En pratique ces résultats indiquent que le processus de biodégradation sera ralenti. En effet le temps de biodégradation pour des hydrocarbures plus grands que  $C_{24}$  est beaucoup plus lent que les fractions de faibles poids moléculaire. Ceci est d'autant plus vrai que les hydrocarbures branchés, substitués et cycliques sont beaucoup plus lents à traiter

que les composés aliphatiques.

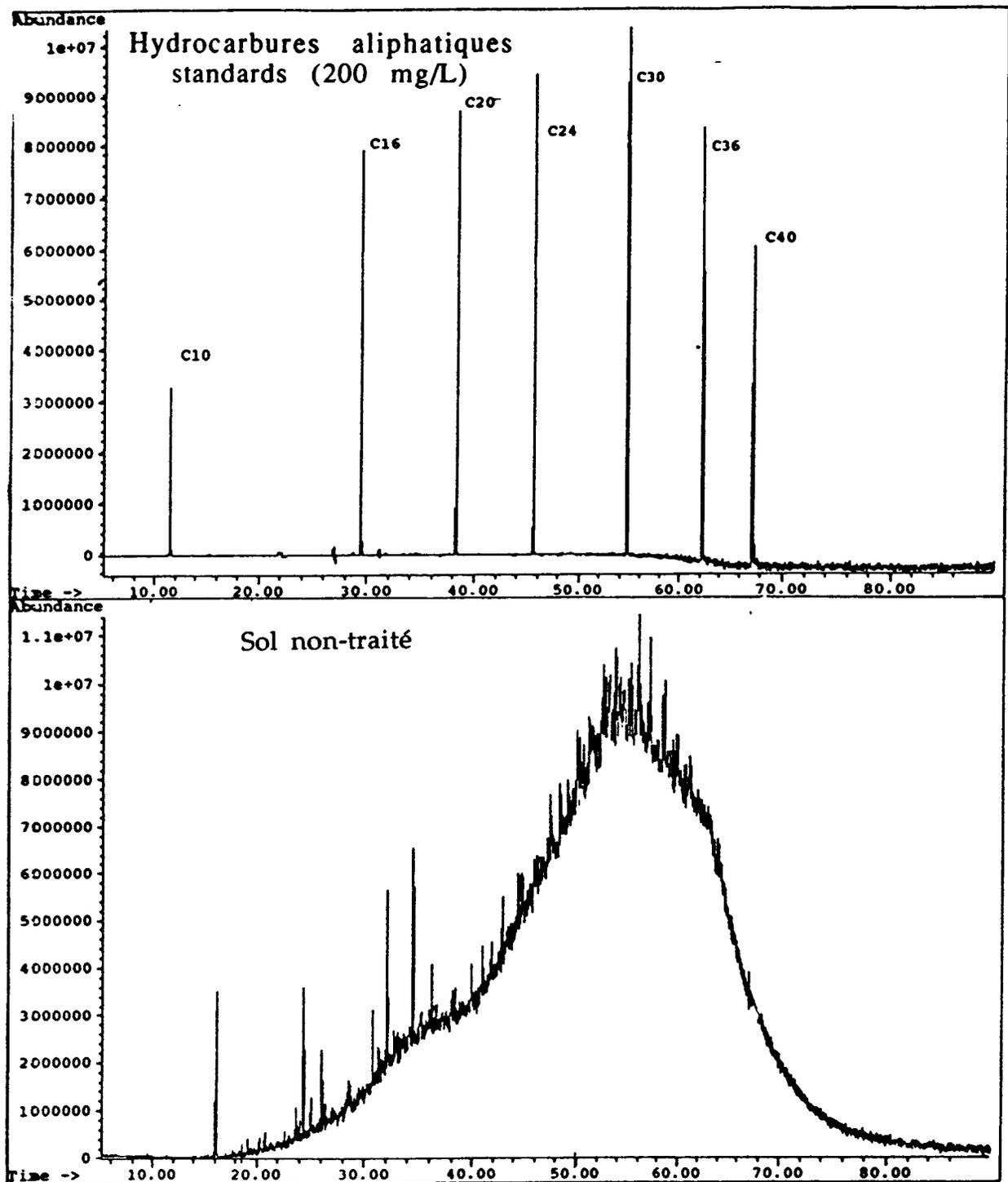


Figure 1: Spectrogramme de masse des hydrocarbures du sol contaminé

## 5.2 Caractérisation génétique des microorganismes indigènes

L'analyse microbiologique du sol indique que ce sol contenait environ  $5 \times 10^7$  bactéries par gramme. Cette concentration est relativement importante mais n'est pas garante de la présence de bactéries hydrocarbonoclastiques.

L'analyse génétique des microorganismes se trouvant dans le sol nous indique que 0.41% des bactéries ont la capacité génétique de dégrader les aliphatiques (gène *alkB*, figure 2) et que 0.06% ont la capacité de dégrader les aromatiques (gène *xyIE*, figure 3). Toutefois nous n'avons aucune évidence que ces microorganismes peuvent exprimer leur potentiel dans ces sols. Les deux figures suivantes montrent les colonies qui ont répondu positivement aux sondes. Ces figures furent reproduites à partir des autoradiographies sur film à rayon X et montrent différentes dilutions obtenues des colonies de bactéries ayant répondues positivement aux sondes. Ainsi, ce sol possède les microorganismes nécessaires à la dégradation des hydrocarbures. Il est intéressant de constater que très peu de microorganismes possèdent les capacités génétiques de dégrader des hydrocarbures. Ce faible taux d'hydrocarbonoclastiques a déjà été retrouvé chez plusieurs sols analysés dans notre laboratoire. Toutefois, il faut préciser que la sonde *alkB* utilisée dans ce test n'est valable que pour les microorganismes capables de dégrader des hydrocarbures ayant des chaînes aliphatiques inférieures à 10 carbones. Dans le futur des sondes capables de détecter des microorganismes s'attaquant aux longues chaînes seront disponibles.

Afin de démontrer l'intérêt des sondes biomoléculaires nous les avons testées avec des mélanges bactériens commerciaux. Ces mélanges sont vendus avec la prétention de posséder des populations bactériennes capables de dégrader des hydrocarbures. Ainsi des tests réalisés sur le mélange commercial #2 nous indiquent que celui-ci possède les gènes nécessaires à la biodégradation des hydrocarbures. Toutefois, la concentration de bactéries possédant les gènes ne dépassait pas 0.5%. Aucune analyse n'a été réalisée avec le mélange #1.

Hybridation ADN-ADN sur colonie  
avec la sonde *xyIE* codant pour la catéchol-2,3-dioxygénase

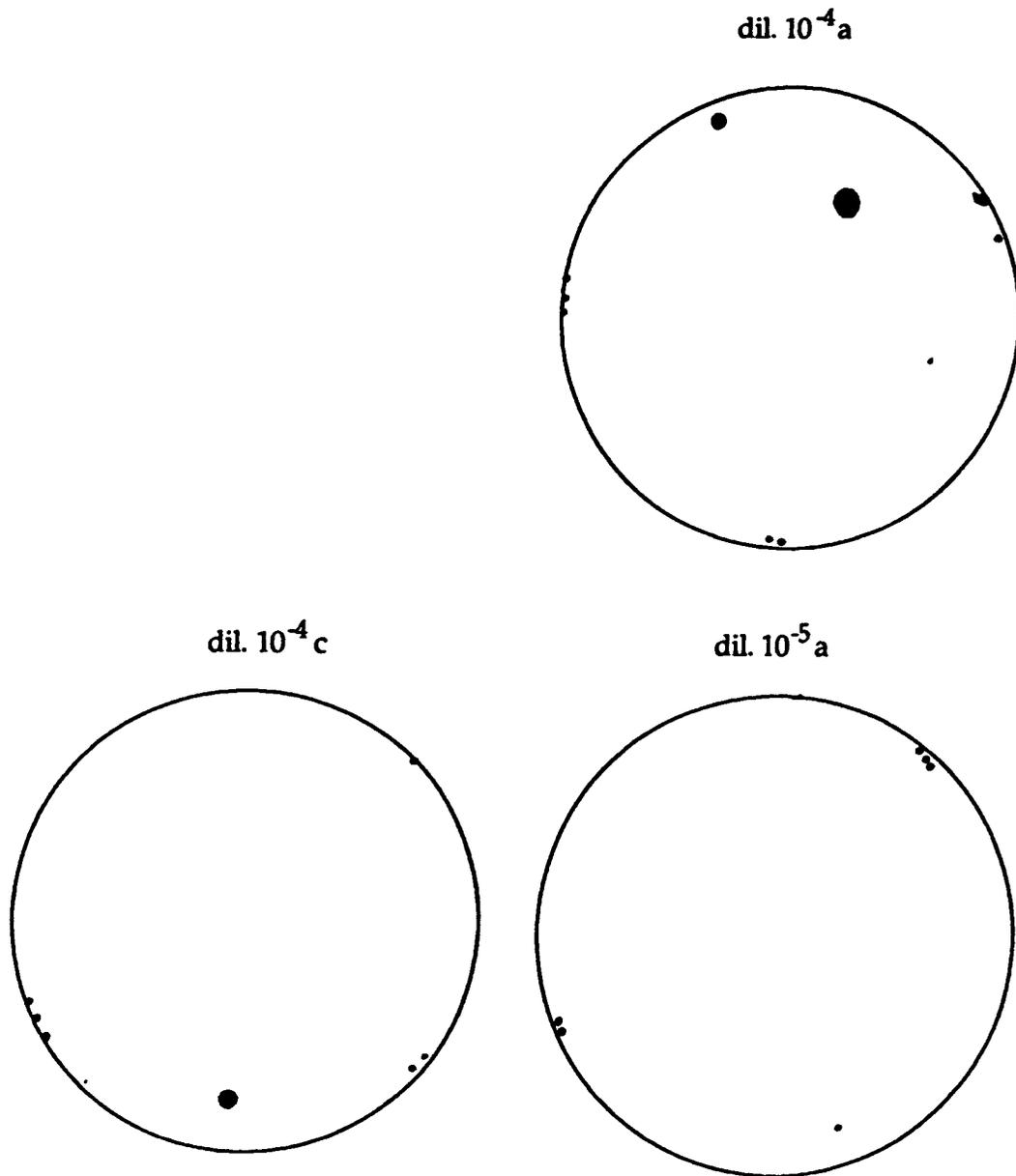


Figure 2

Hybridation ADN-ADN sur colonie  
avec la sonde *alkB* codant pour l'alcane hydroxylase

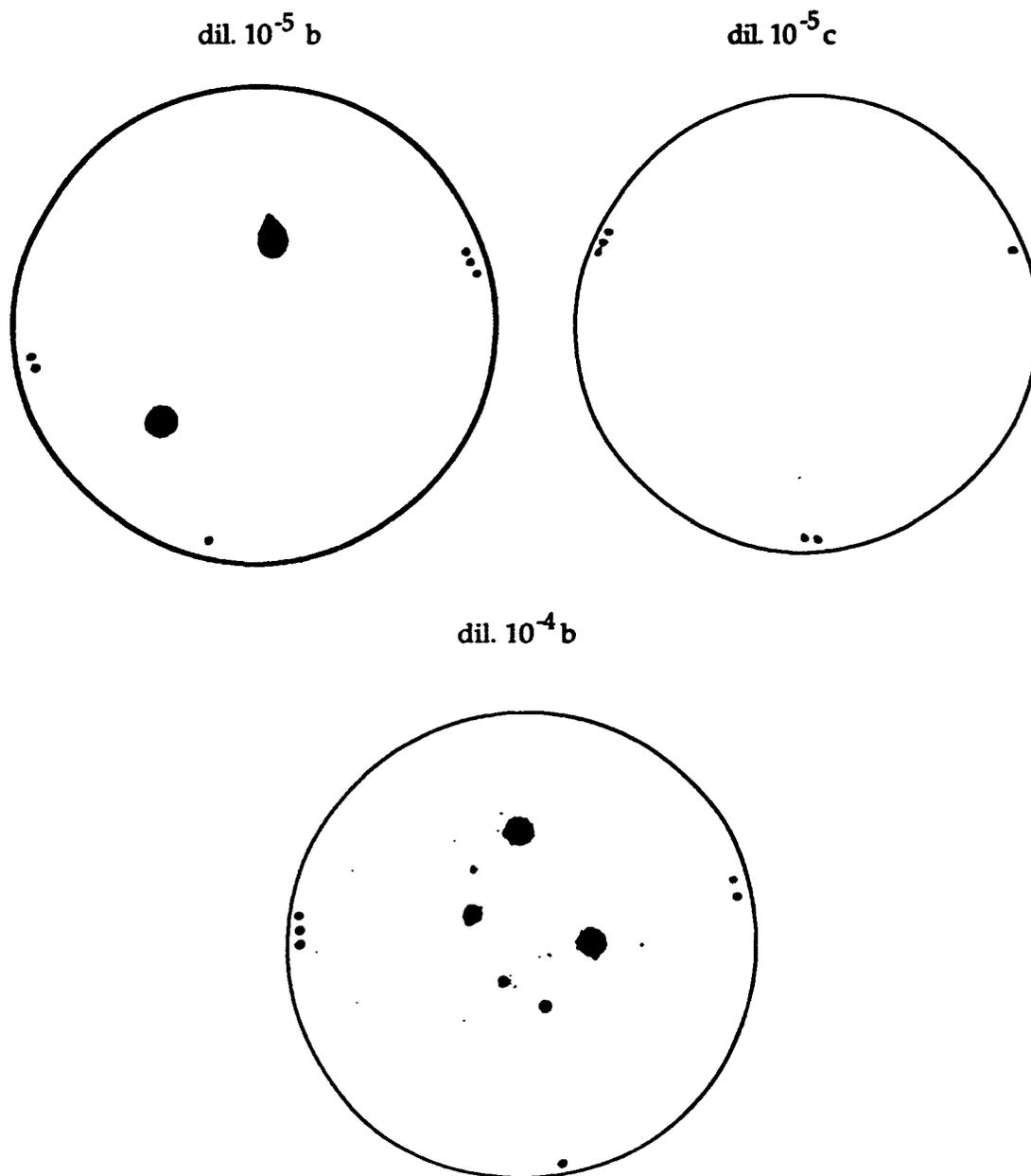


Figure 3

### 4.3 Biodégradation des hydrocarbures (Analyse respirométrique et minéralisation)

Après 60 jours d'incubation nous avons observé une dégradation des huiles et graisses représentant environ 9% (2,150ppm). Il est intéressant de constater que les bactéries du sol dégradent préférentiellement les hydrocarbures de haut poids moléculaire (Figure 4). Ainsi, les chromatogrammes montrent que ce sont surtout les composés de poids moléculaire entre  $C_{24}$  et  $C_{36}$  qui ont le plus diminué. Après 60 jours d'incubation les bactéries du sol contaminé n'ont pas minéralisés plus de 5% de l'hexadécane ajouté. De plus, on observe que l'oxygène consommée par les bactéries du sol contaminé est très faible (Figure 5), ce qui indique que l'activité hydrocarbonoclastique de ces microorganismes est réduite.

Parallèlement à la biodégradation des hydrocarbures nous avons observé une hausse du pH de 7.2 à 8.5. Il est à noter qu'avec un pH autour de 8.5 il peut y avoir intoxication par la présence de gaz ammoniacal provenant de la minéralisation de l'azote. Ce phénomène est très courant lors de la dégradation des hydrocarbures dans des milieux non-tamponés. Il peut être causé par le fait qu'il y avait une source d'azote organique dans le sol et par l'addition d'azote qui fut faite pour stabiliser le rapport NPK. À cause du faible pouvoir tampon du sol contaminé, il y aurait lieu d'optimiser le rapport CNP. Ainsi, un contrôle du pH par l'addition d'agent tampon (ex: gypse) ou par une meilleure définition des nutriments pourrait permettre de maintenir l'activité biologique sur une période beaucoup plus prolongée que 60 jours. Cette procédure est quelque fois utilisée par les compagnies travaillant dans le secteur.

Malgré le fait que nous avons ajouté des agents tensio-actifs (Triton X-100™ et glucoheptonate) nous n'avons pas observé une performance de biodégradation supérieure à 9% après 60 jours.

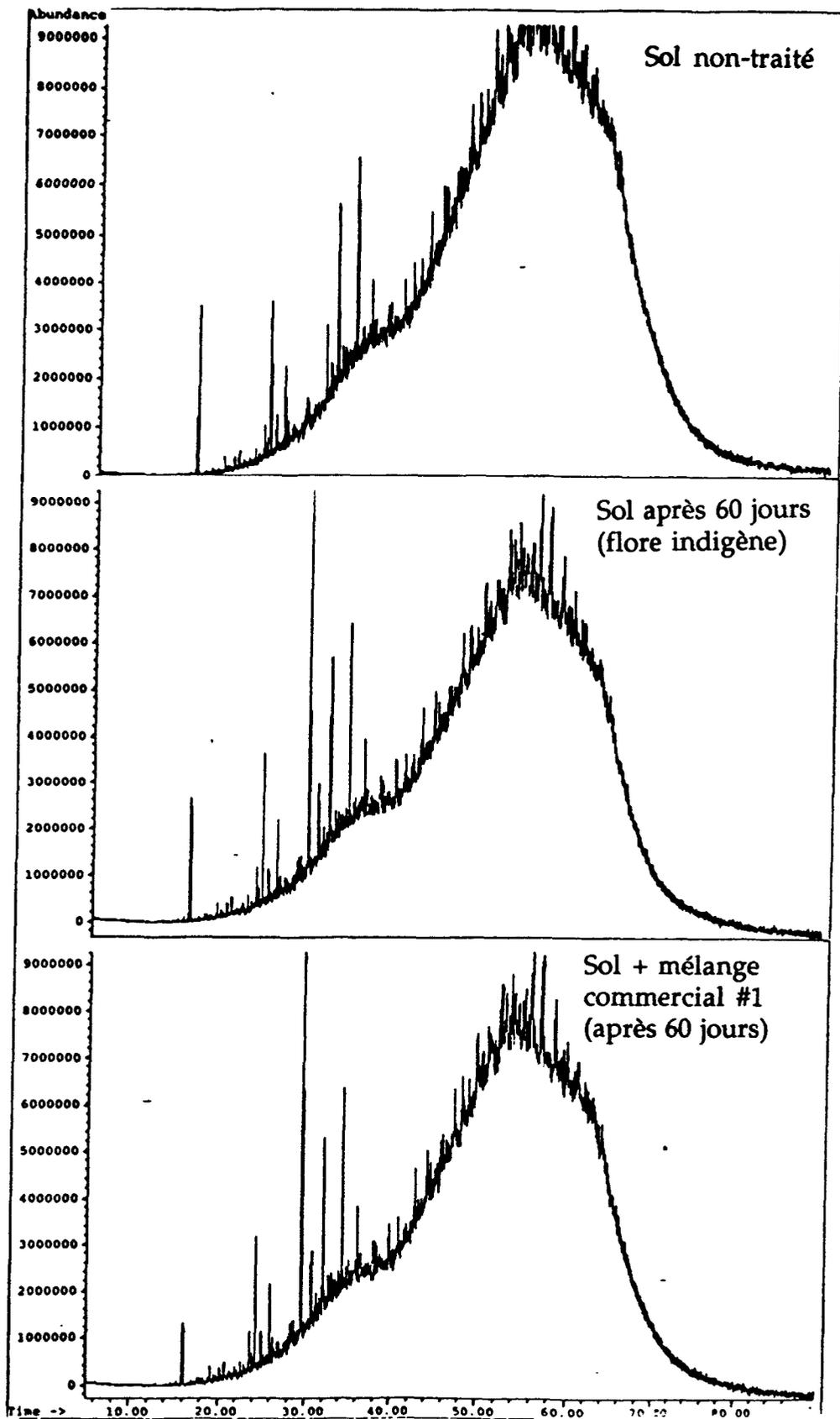


Figure 4: Chromatogramme montrant la disparition des composés de haut poids moléculaire après 60 jours de traitement biologique.

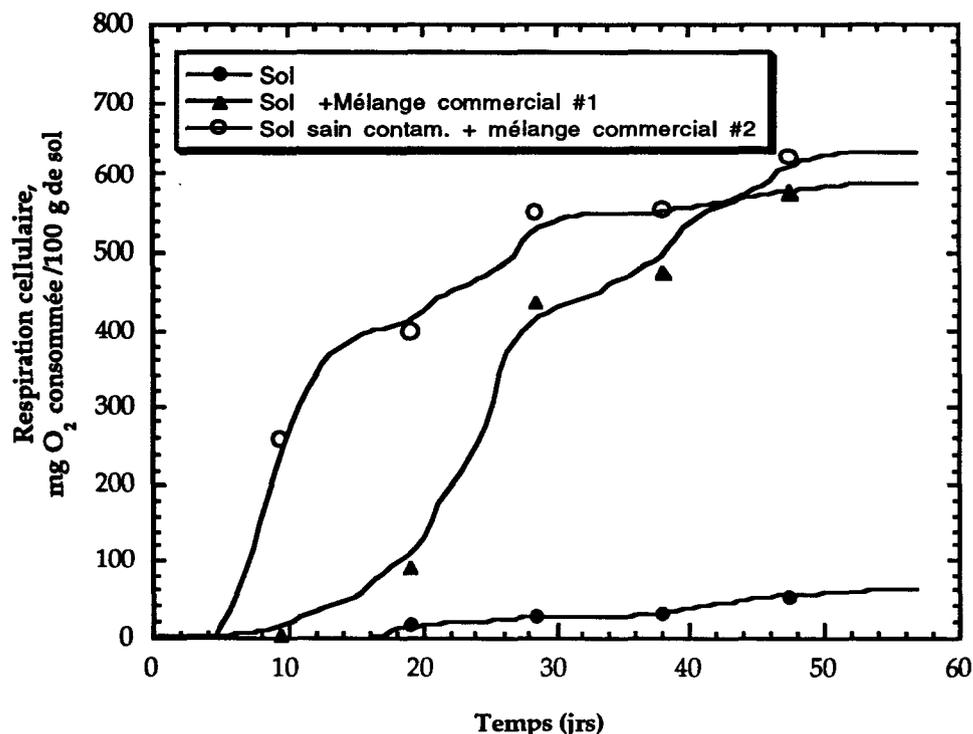


Figure 5: Activité biologique (respiration) des bactéries , et mélanges commerciaux

De plus, les bactéries ont minéralisé jusqu'à 60% du dotriacontane, après seulement 28 jours d'incubation. Il faut noter qu'il était impossible d'évaluer le taux de minéralisation du dotriacontane car ce dernier ne pouvait être dispersé convenablement dans l'échantillon de sol. Il est intéressant de constater que cette augmentation d'activité ne s'est pas traduite par une diminution importante de la concentration en huiles et graisses (seulement 8% après 60 jours). Cependant, la vitesse de biodégradation de l'hexadécane (5 mg / kg / jour) ne représentait que 10 à 15% de la vitesse de biodégradation des hydrocarbures totaux par les bactéries indigènes. Actuellement, nous n'avons pas d'explication pour ce phénomène.

L'addition de deux types de mélange bactériens commerciaux a contribué à l'augmentation des performances pour ce qui a trait à la biodégradation de l'hexadécane. Ainsi nous avons observé jusqu'à 60% de minéralisation de l'hexadécane lorsque le sol

contaminé était inoculé avec les deux mélanges commerciaux (Figure 7). Ce pourcentage est très élevé si l'on considère qu'entre 30 et 40% du carbone est assimilé sous forme de biomasse. Le fait que les mélanges commerciaux ont montré une activité respirométrique (oxygène consommé, figure 6) beaucoup plus importante que les bactéries indigènes du sol est probablement causé par la biodégradation des éléments nutritifs qui sont ajoutés dans la préparation des mélanges.

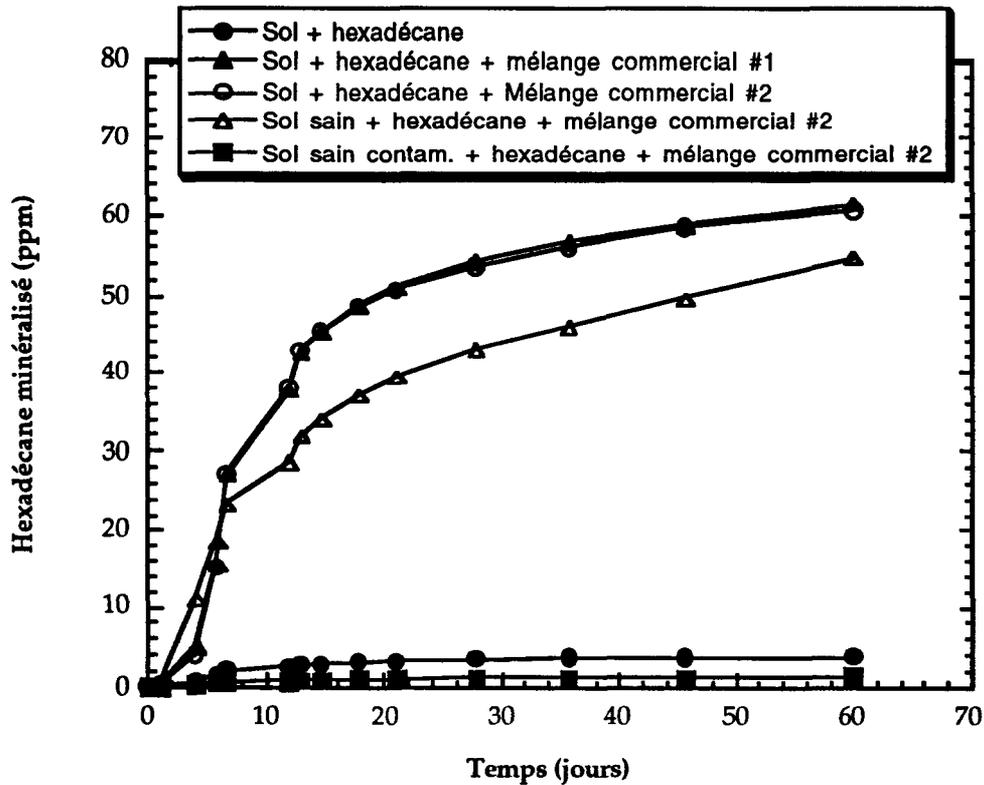


Figure 6: Minéralisation de l'hexadécane radioactif par les bactéries indigènes du sol contaminé et les mélanges commerciaux.

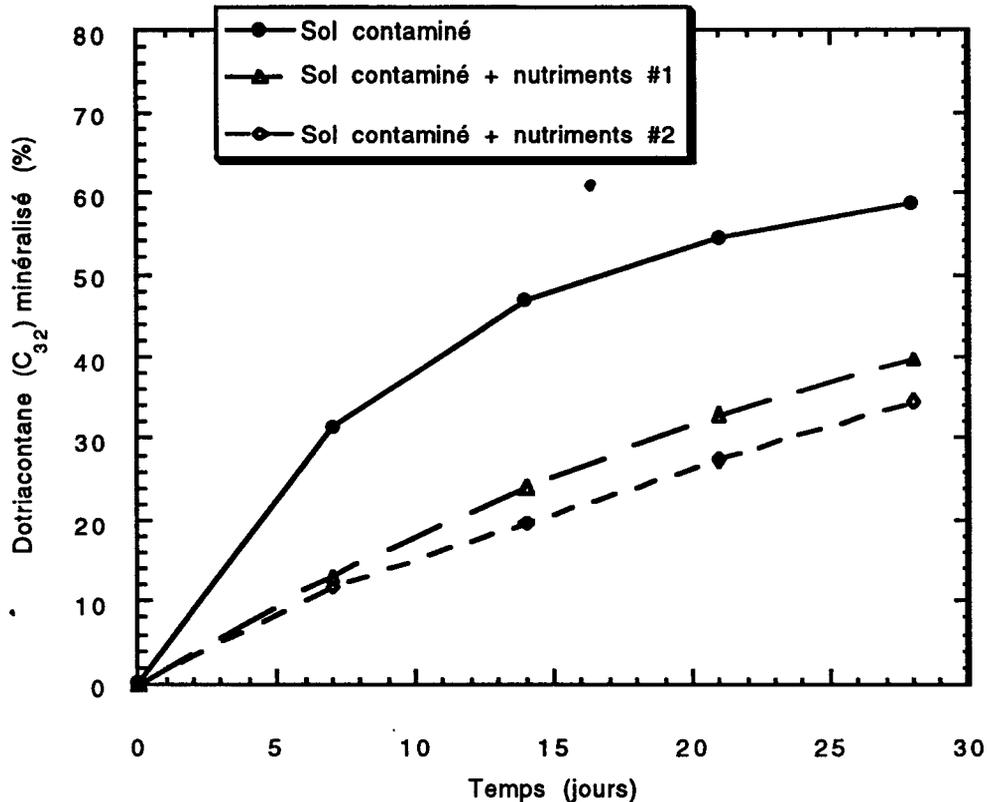


Figure 8: Minéralisation du dotriacontane par les microorganismes indigène du sol

L'inoculation d'un sol sain par le mélange d'hydrocarbures extrait du sol contaminé nous a donné des résultats surprenants. Ainsi, la présence des huiles et graisses dans un sol sain a inhibé la minéralisation de l'hexadécane. Toutefois l'activité biologique dans ce sol a été très importante. Le taux de dégradation des huiles et graisses a été de 16% (2,058 ppm) et le taux de biodégradation était de 37 mg / kg / jour, c'est-à-dire le double de celui observée dans le sol contaminé. Toutefois ces microorganismes n'ont pas eu d'effets négatifs sur la performance des bactéries indigènes. Ces données suggèrent que le sol contaminé n'a pas vraiment d'effet inhibiteur sur l'activité des bactéries indigènes.

Si on compare les données cinétiques obtenues lors de nos expériences avec des données issues de la littérature scientifique on s'aperçoit que le taux de biodégradation observé dans le sol contaminé (35-50 mg/kg/jour) est comparable à l'activité retrouvée dans un

sol dont les conditions environnementales n'auraient pas été optimisées (Tableau 1). On doit noter que nos essais ont été réalisés en présence d'éléments nutritifs et d'agents tensio-actifs.

**Tableau 1: Taux de biodégradation des hydrocarbures par les bactéries du sol contaminé en comparaison avec des données issues de la littérature.**

	Taux de biodégradation mg/kg/jour
Monoculture en fermenteur	10,000 - 100,000
Communauté bactérienne du sol (optimisé)	65-800
Communauté bactérienne du sol (ambiant)	25-240
Communauté bactérienne marine	0.5-500
Sol + nutriments(cette étude)	35-50

Les données présentées pour ce sol indiquent donc que l'utilisation d'un procédé de biotraitement serait risquée sans un essai préliminaire à l'échelle pilote. En effet, les polluants (hydrocarbures) retrouvés sont en concentration importante, leur composition indiquent la présence de constituants de hauts poids moléculaires reconnus comme étant difficilement biodégradables. Les microorganismes hydrocarbonoclastiques ne représentent pas plus de 0,5% de la population totale. Enfin les taux de minéralisation et de respiration sont relativement faible. Pour ce sol, il y aurait lieu d'essayer de déterminer de meilleures conditions nutritives pour la survie des microorganismes. La stabilisation du pH par l'addition de substance tampon (ex: gypse) aurait un effet positif.

## 5. Conclusions et recommandations:

La procédure décrite dans ce document est relativement complexe et assez coûteuse à mettre en place. En effet, on doit acquérir certains équipements spécialisés et les sondes biomoléculaires ne sont pas encore disponibles commercialement. Toutefois, lorsque l'équipement est disponible il est possible de réaliser un test complet (1 échantillon avec témoin) pour environ \$3,000. Les avantages qu'offrent cette méthodologie justifient

pleinement l'investissement. De plus, les sommes d'argent qui pourront être économisées par la diminution d'essais pilotes inutiles compenseront facilement le coût du test. Nous croyons qu'un laboratoire privé spécialisé en analyse chimique et microbiologique pourrait offrir ce service aux industriels oeuvrant dans le secteur de la restauration biologique des sols.

Dans ce document nous avons démontré le potentiel de ce protocole pour évaluer la biotraitabilité d'un sol, toutefois nous n'avons aucune donnée confirmant des résultats positifs ou négatifs qui auraient été obtenus lors de traitement à grande échelle. Ce protocole peut être utilisé pour suivre la performance d'un système de biodégradation en fonction du temps. Ainsi les données obtenues permettront d'avoir une vision assez précise de l'état biologique de la pile ou du bioréacteur. En cas de mauvaise performance une action préventive ou correctrice pourra être prise en connaissance de cause. Afin de valider cette méthodologie il serait intéressant d'étudier la performance d'un système de traitement en pile tout au long de la période de traitement.

## **6. Remerciements:**

Les auteurs tiennent à remercier Chantale Beaulieu pour la caractérisation chimique par GC/MS, Sylvie Sanschagrin pour l'opération des respiromètres et le Dr Jalal Hawari pour ses conseils sur l'interprétation des spectrogrammes de masse. De plus l'IRB est remercie la compagnie BioGéo Environnement Inc pour nous avoir permis d'évaluer cette procédure avec des sols contaminés provenant de leur client .

## **7. Références citées**

1. Ahmed, M. and D. D. Focht. Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Achromobacter* pCB. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 10: 70-72, 1973.
2. Al-Bashir, B., T. Cseh, R. Leduc and R. Samson. Effect of soil/contaminant interactions on the biodegradation of naphthalene in flooded soil under denitrification conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 414-419, 1990.
3. Arvin, E., B. Jensen, J. Aamand and C. Jørgensen. The potential of free-living ground water bacteria to degrade aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. *Wat. Sci. Tech.* 20(3): 109-118, 1988.

4. Arvin, E., B. K. Jensen and A. T. Gundersen. Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(12): 3221-3225, 1989.
5. Atlas, R. M. "Biodegradation of hydrocarbons in the environment." *Environmental Biotechnology*. Omenn ed. 1987 Plenum Press. New York.
6. Atlas, R. M. and R. Bartha. Degradation and mineralization of petroleum by two bacteria isolated from coastal waters. *Biotechnol. Bioeng.* 14: 207-308, 1972.
7. Bauer, J. E. and D. G. Capone. Degradation and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene, and naphthalene in intertidal/marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 81-90, 1985.
8. Belic, L, E. Ghera, H. E. Gottlieb and A. Plemenitas. Bioconversion of cyclohexene derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 201: 310-312, 1984.
9. Berry, D. F., A. J. Francis and J.-M. Bollag. Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiol. Rev.* 51(1): 43-59, 1987.
10. Brown, J. F., D. L. Bedard, M. J. Brennan, J. C. Carnanham, H. Feng and R. E. Wagner. Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments. *Science.* 236: 709-712, 1987.
11. Brown, M. P., B. Bush, G. Yull Rhee and S. L. PCB dechlorination in Hudson River sediment. *Science.* 240: 1674-1676, 1988.
12. Brunner, W., F. H. Sutherland and D. D. Focht. Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil by analog enrichment and bacterial inoculation. *J. Environ. Qual.* 14: 324-328, 1985.
13. Cerniglia, C. E. and M. A. Heitkamp. "Microbial degradation of PAH in the aquatic environment." *Metabolism of Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment*. Varanasi ed. 1989 CRC Press. Boca Raton, Florida.
14. Cerniglia, C. E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.* 30: 31-71, 1984.
15. Cerniglia, C. E., G. L. White and R. H. Heflich. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch. Microbiol.* 143: 105-110, 1985.
16. Cripps, C., B. J.A. and A. S.D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(4): 1114-1118, 1990.
17. Daley, P. S. Cleaning up sites with on-sites process plants. *Environ. Sci. Technol.*

23(8): 912-916, 1989.

18. Dangel, W., A. Tschsch and G. Fuchs. Anaerobic metabolism of cyclohexanol by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 150: 358-362, 1988.
19. Di Toro, D. M. and L. M. Horzempa. Reversible and resistant components of PCB adsorption-desorption. *Environ. Sci. Technol.* 16: 594-602, 1982.
20. Farmer, W. S., K. G. Robinson and J. T. Novak. "Effect of bacteria addition on biodegradation of toluene in subsurface soils." *Proceedings of the 43rd Industrial Waste Conference Purdue University.* Bell ed. 1989 Lewis Publishers. Chelsea, Michigan.
21. Fewson, C. A. Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds: the causes of recalcitrance. *Tibtech.* 6: 148-153, 1988.
22. Focht, D. D. "Performance of biodegradative microorganisms in soil: Xenobiotic chemicals as unexploited metabolic niches." *Environmental Biotechnology.* Omenn ed. 1987 Plenum Press. New-York.
23. Furakawa, K. "Microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs)." *Biodegradation and detoxification of environmental pollutants.* Chakrabarty ed. 1983 CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
24. Furukawa, K., N. Tomizuka and A. Kamibayashi. "Bacterial degradation of polychlorinated biphenyls (PCB) and their metabolites." *Biological reactive intermediates-11, part A.* Snyder ed. 1982 Plenum publishing corporation. Tsukuba, Ibaragi, Japan 305.
25. Gibson, D. T. "Microbial transformation of aromatic pollutants." *Aquatic pollutants: Transformation and biological effects.* Hutzinger ed. 1978 Academic Press. Oxford.
26. Gibson, D. T. Microbial degradation of aromatic compounds. Metabolic pathways reveal a general formula for the degradation of several aromatic compounds. *Science.* 161: 1093-1097, 1986.
27. Grbic-Galic, D. and T. M. Vogel. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(2): 254-260, 1987.
28. Haines, J. R. and M. Alexander. Microbial degradation of high molecular weight alkanes. *Appl. Microbiol.* 28(6): 1084-1085, 1975.
29. Heitkamp, M. A. and C. E. Cerniglia. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(6): 1612-1614, 1988.
30. Holliger, C., A. J. M. Stams and A. J. B. Zehnder. Anaerobic degradation of

recalcitrant compounds. Proc. 5th Int. Symp. on Anaerobic Digestion. 211, 1988.

31. Hughes, D. E. and P. McKenzie. The microbial degradation of oil in the sea. Proc. Royal Soc. London Ser. B. 189: 375-390, 1975.
32. Hutchins, S. R., G. W. Sewell, D. A. Kovacs and G. A. Smith. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. Environ. Sci. Technol. 25(1): 68-76, 1991.
33. Hwang, H.-M., R. E. Hodson and D. L. Lewis. Microbial degradation kinetics of toxic organic chemicals over a wide range of concentrations in natural aquatic systems. Environ. Toxicol. Chem. 8(1): 65-74, 1989.
34. Isaacson, P. J. and C. R. Frink. Nonreversible sorption of phenolic compounds by sediment fractions: The role of sediment organic matter. Environ. Sci. Technol. 18(1): 43-48, 1984.
35. Kiyohara, H., N. Takizawa, T. Uchiyama, H. Ikarugi and K. Nagao. Degradability of polychlorinated phenols by bacterial populations in soil. J. Ferment. Bioeng. 67(5): 339-344, 1989.
36. Kuhlmeier, P. D. "On-site treatment systems for aquifer restoration biological treatment." 42nd Purdue University Industrial Waste Conference Proceedings. 1988 Lewis Publishers. Chelsea, Mi.
37. Kuhn, E. P. and J. M. Suflita. Microbial degradation of nitrogen, oxygen and sulfur heterocyclic compounds under anaerobic conditions: Studies with aquifer samples. Environ. Toxicol. Chem. 8(12): 1149-1158, 1989.
38. Lee, M. D., J. M. Thomas, R. C. Borden, P. B. Bedient, C. H. Ward and J. T. Wilson. Biorestauration of aquifers contaminated with organic compounds. CRC Crit. Rev. Environ. Control. 18(1): 29-89, 1988.
39. McDermott, J. B., R. Unterman, M. J. Brennan, R. E. Brooks, D. P. Mobley, C. C. Schwartz and D. K. Kietrich. Two strategies for PCB soil remediation: biodegradation and surfactant extraction. Environ. Progress. 6: 46-51, 1989.
40. Middleton, A. C. Land disposal and spill site environments. LIVRE. 28: 137-149, 1984.
41. Mihelcic, J. R. and R. G. Luthy. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1182-1187, 1988.
42. Mihelcic, J. R. and R. G. Luthy. Microbial degradation of acenaphthene and

naphthlene under denitrification conditions in soil-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1188-1198, 1988.

43. Mikesell, M. D. and S. A. Boyd. Reductive dechlorination of the pesticides 2,4-D, 2,4,5-T, and pentachlorophenol in anaerobic sludges. *J. Env. Qual.* 14(3): 337-340, 1985.

44. Mikesell, M. D. and S. A. Boyd. Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 861-865, 1986.

45. Mikesell, M. D. and S. A. Boyd. Enhancement of pentachlorophenol degradation in soil through induced anaerobiosis and bioaugmentation with anaerobic sewage sludge. *Environ. Sci. Technol.* 22(12): 1411-1414, 1988.

46. Mirsatari, S. G., M. M. McChesney, A. C. Craigmill, W. L. Winterlin and J. N. Seiber. Anaerobic microbial dechlorination: An approach to on-site treatment of toxaphene-contaminated soil. *J. Environ. Sci. Health.* B22(6): 663-690, 1987.

47. Morgan, P. and R. J. Watkinson. Assessment of the potential for in situ biotreatment of hydrocarbons contaminated soils. *Water Sci. Technol.* 22(6): 63-68, 1988.

48. Mueller, J. G., P. J. Chapman and P. Hap Pritchard. Creosote-contaminated sites. *Environ. Sci. Technol.* 23(10): 1197-1201, 1989.

49. Ogram, A. V., R. E. Jessup, L. T. Ou and P. S. C. Rao. Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 582-587, 1985.

50. Paul, E. A. and F. E. Clark. "Soil microbiology and biochemistry." 1989 Academic Press. San Diego, CA.

51. Quensen, J. F., J. M. Tiedje and S. A. Boyd. Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments. *Science.* 242: 752-754, 1988.

52. Richardson, K. J., M. H. Stewart and R. L. Wolfe. Applications of gene probe technology to the water industry. *J. Am. Water Work Ass.* : 71-81, 1991.

53. Rijnaarts, H. H. M., A. Bachmann, J. C. Jumelet and A. J. B. Zehnder. Effect of desorption and intraparticle mass transfer on the aerobic biomineralization of a-hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil. *Environ. Sci. Technol.* 24(9): 1349-1354, 1990.

54. Safe, S. H. "Microbial degradation of polychlorinated biphenyls." *Microbial degradation of organic compounds.* Gibson ed. 1984 Dekker. New-York.

55. Sahasrabudhe, S. R., A. R. Amin and V. V. Modi. Transformation of chlorinated benzoates and other benzene derivatives by *Aspergillus japonicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 365-367, 1985.
56. Samson, R., T. Cseh, J. Hawari, A. Demeter, B. Al-Bashir and R. Leduc. Effect of redox conditions, soil/contaminant interactions and chemical structure on the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in flooded soil. *World Environment'91.* 78-82, 1991.
57. Samson, R., T. Cseh, J. Hawari, C. W. Greer and R. Zaloum. *Biotechnologies appliquées à la restauration de sites contaminés avec exemple d'application d'une technique physico-chimique et biologique pour les sols contaminé par des BPC.* *Sci. Technique Eau.* : 1990.
58. Scott, H. D., D. C. Wolf and T. L. Lavy. Apparent adsorption and microbial degradation of phenol by soil. *J. Environ. Qual.* 11(1): 107-112, 1982.
59. Subba-Rao, R. V. and M. Alexander. Effect of sorption on mineralization of low concentrations of aromatic compounds in lake water samples. *Appl. Environ. microbiol.* 44(3): 659-668, 1982.
60. Wilson, J. T., J. M. Henson, M. D. Piwoni, B. H. Wilson and P. Banerjee. Biodegradation and sorption of organic solvents and hydrocarbon fuel constituents in subsurface environments. 1988.
61. Zeyer, J., E. P. Kuhn and R. P. Schwarzenbach. Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(4): 944-947, 1986.

